

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE – GEMBLOUX AGRO-BIO TECH

**HISTOIRE EVOLUTIVE DU COMPLEXE *AFZELIA* SMITH (LEGUMINOSAE - CAESALPINIOIDEAE)
DANS LES ECOSYSTEMES FORESTIERS ET SAVANICOLES D'AFRIQUE TROPICALE**

Segbedji Armel Loic DONKPEGAN

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences Agronomiques
et Ingénierie Biologique

(co) Promoteur(s) : Pr. Jean-Louis DOUCET, Dr. Olivier J. HARDY
Année 2017

© 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.

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE – GEMBLOUX AGRO-BIO TECH

**HISTOIRE EVOLUTIVE DU COMPLEXE *AFZELIA* SMITH (LEGUMINOSAE - CAESALPINIOIDEAE)
DANS LES ECOSYSTEMES FORESTIERS ET SAVANICOLES D'AFRIQUE TROPICALE**

Segbedji Armel Loic DONKPEGAN

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences Agronomiques
et Ingénierie Biologique

(co) Promoteur(s) : Pr. Jean-Louis DOUCET, Dr. Olivier J. HARDY
Année 2017

A la mémoire de mes parents, Clotaire D. DONKPEGAN & Julienne A. CODO

Donkpegan S.L. Armel (2017) Histoire évolutive du complexe *Afzelia* Smith (Leguminosae - Caesalpinioideae) dans les écosystèmes forestiers et savanicoles en Afrique tropicale. Thèse de doctorat. Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech, Belgique. 175 p. + annexe.

Résumé :

Le genre *Afzelia* Smith (Fabaceae, Caesalpinioideae) est connu pour comporter sept espèces africaines d'arbre dont deux se retrouvent dans la région Zambézienne, une en région Soudanienne et les quatre autres en région Guinéo-Congolaise. Ces taxons, à haute valeur commerciale, sont difficiles à identifier. Ils sont donc commercialisés sous un même nom : « doussié ». Ces difficultés de distinction peuvent s'avérer préjudiciables à la gestion durable des populations.

Le but de cette thèse de doctorat est de caractériser l'histoire évolutive du genre *Afzelia*. Plus spécifiquement, cette étude vise à : (i) évaluer le niveau des divergences morphologiques au sein du genre *Afzelia* et décrire les relations phylogénétiques, afin de quantifier l'isolement reproductif entre les taxons d'*Afzelia* en mettant en évidence le rôle des changements climatiques passés et/ou des gradients écologiques dans la spéciation du genre ; (ii) procéder à une analyse approfondie de la diversité et de la structuration génétique spatiale d'*Afzelia* spp.; (iii) identifier et décrire les facteurs écologiques, biotiques et abiotiques susceptibles d'influencer les flux géniques à l'échelle des populations d'une espèce d'*Afzelia* (*A. bipindensis*).

Une analyse morpho-génétique des espèces a été effectuée et a confirmé la forte ressemblance botanique entre les taxons. Les espèces de savanes se sont avérées être diploïdes et présentent la moitié de la taille du génome des espèces forestières qui sont donc tétraploïdes. Les phylogénies de gènes (nucléaires et chloroplastiques) diffèrent entre elles et ne permettent pas de séparer les taxons tétraploïdes entre eux. De telles différences peuvent être générées à la suite d'épisodes d'hybridation ancestrale entre espèces. Ces hybridations seraient probablement anciennes et seraient survenues entre les lignées des espèces forestières et celles d'*A. quanzensis* (une espèce des savanes Zambéziennes). La polyploïdie serait survenue entre 7 et 9,4 millions d'années au cours de l'histoire évolutive du genre. De plus, une assignation bayésienne et des analyses d'isolement reproductif ont suggéré l'existence de croisements interspécifiques, mais uniquement chez les espèces forestières distribuées en sympatrie. A une échelle spatiale plus limitée, nous avons observé deux groupes génétiques bien différenciés en sympatrie chez *A. bipindensis*. Ceux-ci présentent une différenciation morphologique et un décalage phénologique de la floraison qui peut contribuer à leur isolement reproductif.

Cette étude a permis de mettre en évidence quelques points importants que sont : la découverte d'un complexe polyploïde au sein du genre *Afzelia*, la confirmation de la délimitation des espèces diploïdes de savanes et la nécessité de réviser la délimitation des espèces tétraploïdes forestières.

Mots clés: forêts tropicales, *Afzelia* spp., phylogénie, phylogéographie, structure et diversité génétique, polyploïdie, flux de gènes, phénologie.

Donkpegan S.L. Armel (2017) Evolutionary history of *Afzelia* Smith (Leguminosae - Caesalpinioideae) complex in forest and savannah ecosystems of tropical Africa. PhD thesis. University of Liège – Gembloux Agro-Bio Tech, Belgium. 175 p. + annexe.

Abstract :

The genus *Afzelia* Smith (Fabaceae, Caesalpinioideae) is known to have seven African tree species two of which are found in the Zambezan region, one is distributed in the Sudanian region and the four other are endemic to the Guineo-Congolian region. These taxa, of high commercial value, are difficult to identify. They are therefore marketed under the same "doussié" name. These difficulties of distinction can prove detrimental to the sustainable management of populations.

The aim of this doctoral thesis is to characterize the evolutionary history of the *Afzelia* genus. More specifically, this study aims to: (i) evaluate the level of morphological divergences within the *Afzelia* genus and describe the phylogenetic relationships in order to quantify the reproductive isolation between taxa by highlighting the role of past climate change and / or ecological gradients in the speciation of the genus; (ii) proceed to an analysis of the spatial genetic diversity and structure of *Afzelia* spp.; (iii) identify and describe ecological, biotic and abiotic factors that may influence population-level gene flows of an *Afzelia* species (*A. bipindensis*).

A morpho-genetic analysis of *Afzelia* species was carried out and confirmed the strong botanical resemblance between the taxa. The savannah species are diploid and have half the size of the genome of forest species that are tetraploid. The phylogenies of genes (nuclear and chloroplastic) differ from one another and do not allow the separation of tetraploid taxa from one another. Such differences can be generated as a result of episodes of ancestral hybridization between species. These hybridizations would probably be old and would have occurred between lineages of the forest species and *A. quanzensis* (a species of the Zambezan savannahs) lineages. Polyploidy would have occurred between 7 and 9.4 million years in the evolutionary history of the genus. In addition, Bayesian assignment and reproductive isolation analyzes suggested interspecific crosses, but only in forest species distributed sympatrically. At a more limited spatial scale, we observed two well differentiated genetic groups in sympatry in *A. bipindensis*. These show a morphological differentiation and a phenological shift of flowering which can contribute to their reproductive isolation.

This study highlighted some important points: the discovery of a polyploid complex within the *Afzelia* genus, the confirmation of the delimitation of the diploid savannah species and the need to revise the delimitation of forest tetraploid species.

Key words: tropical forests, *Afzelia* spp., phylogeny, phylogeography, structure and genetic diversity, polyploidy, gene flow, phenology

Remerciement :

Au terme de cette formidable aventure, voici venu le moment de dire « merci », oui « mille merci », en me retournant quelques secondes pour essayer d'analyser quatre années mouvementées, pleines de surprises et d'actions, où avec toutes les personnes rencontrées, j'ai échangé d'intenses émotions.

D'abord, mes premiers remerciements vont à l'endroit de mon très promoteur **Jean-Louis Doucet** sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. C'est une véritable chance, une opportunité unique que tu m'as accordé en acceptant sans hésiter d'encadrer d'abord mes travaux de master puis ensuite la présente thèse. Pour toutes ces raisons, pour avoir cru en moi et pour m'avoir permis de réaliser mon rêve, je te dis un sincère merci du fond du cœur... non que dis-je, du fond de mes trips. Merci ensuite à mon très cher co-promoteur **Olivier Hardy** pour avoir accepté de co-encadrer ce travail. Merci pour ton engagement qui est allé au-delà de l'encadrement que j'avais espéré au commencement de cette thèse. Sois en éternellement remercié pour tout ce que tu m'as apporté en génétique. « Un tout grand merci » à vous deux pour votre disponibilité constante, votre dynamisme, votre soutien indéfectible, votre simplicité et sans oublié votre amitié. Plus que des encadrants, pendant ces quatre ans, j'ai trouvé en vous des qualités humaines qui m'ont aidé aussi bien dans le travail que dans la vie de tous les jours quand j'en avais besoin. Je vous remercie également d'avoir facilité ma participation à plusieurs conférences scientifiques, tant nationales qu'internationales, et de m'avoir fait bénéficier de plusieurs collaborations en Belgique et à l'étranger.

Je voudrais également remercier le Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture - Fonds National pour la Recherche Scientifique (FRIA-FNRS) pour sa prestigieuse bourse de thèse qui m'a permis de mener à bien mes recherches dans les meilleures conditions. D'autres institutions ont également apporté leurs aides dans l'exécution de ce projet. Merci aux Fonds Léopold III, aux Fonds National pour la Recherche Scientifique (FNRS), à l'International Association for Plant Taxonomy (IAPT), à l'Université de Liège (ULg) et à l'asbl Nature+.

J'adresse toute ma profonde gratitude aux docteurs Kasso Dainou et Jérôme Duminil pour votre disponibilité, votre pédagogie, vos critiques constructives, vos encouragements, vos nombreuses lectures attentives et pour avoir considérablement amélioré ce travail. Merci aussi aux autres docteurs (Jérémy Migliore, Gilles Dauby, Ebénézer Ewedje, Rosalia Pineiro, Alexandra Ley, Nils bourlands, Christian Moupela, Achille Biwolé, Jean-François Gillet, Dakis Ouedraogo, Charles-Albert Pêtre, Barbara Haurez, Jason Vleminckx, Olivier Lachenaud, Murielle Simo-droissart) et enseignant-chercheurs (Myriam Heuertz, Cedric Vermeulen, Patrick Mardulyn, Ludivine Lassois, Yves Brostaux, Bonaventure Sonké, Madjidou Oumorou, Jeanne Zoundjihekon) pour leurs conseils scientifiques ainsi que leurs contributions diverses et variées.

Merci aussi aux membres de mon comité d'encadrement de la thèse: Philippe Lejeune, Adeline Fayolle, Grégory Mahy, pour l'intérêt que vous avez apporté à ce travail malgré vos nombreuses occupations.

Cette thèse a bénéficié de collecte de matériel végétal et de données à travers l'Afrique. C'est l'occasion de remercier une fois de plus les projets VTI-ITTO, DynafFor, DACEFI, PPECF et AFRIFORD pour leur contribution dans ces collectes. Merci également aux différents herbariums de Meise, Paris, Leiden, Bruxelles, Yaoundé et Libreville de m'avoir faciliter les collectes de matériel d'herbier pour mes analyses. J'ai également bénéficié de l'appuie de plusieurs sociétés forestières en Afrique Central. Parmi elles, je veux remercier principalement les sociétés forestières sous aménagement durable Pallisco et Precious Woods à travers Messieurs Paul Lagoute et Philippe Jeanmart respectivement. Je n'oublie pas aussi les sociétés WIJMA, NFO et SFID. Difficile d'évoquer ces sociétés forestières sans penser à vous: Patrice Tekam, Théophile Ayol, Crépin Ndjopandé, Armand Boubady, Ismael Nana et tous les autres ouvriers temporaires qui ont activement contribué à la collecte des données de terrain. Merci pour ces bons moments passés ensemble.

Je ne vous oublie pas aussi mes très cher(e)s collègues et ami(e)s de l'Unité de Gestion des Ressources forestières (tropicales et tempérées) et de l'asbl Nature+, pour m'avoir aussi aidé d'une manière ou d'une autre, directement ou non. Je veux leur dire, à, Julie Morin-Rivat, Pauline Gillet, Félicien Tosso, Richard Feteke, Anaïs Pasiphae Gorel, Chauvelin Douh, Steve N'gama, Pamela Tabi, Leslie Wilmet, Julie Linchant, Grâce Loubota, Simon Lhoest, Quentin Evrard, Manon Authelet, Fructueux Hounbegnou, Emile Fonty, Cédric Geerts, Marie Fombona, Marie-Ange Golard, Alain Monseur, Samuel Quevauvillers, Stéphanie Bonnet, Daphné Handereck, Gauthier Ligot, Sébastien Bauwens, Michèle Federspiel, Sandrine Louis, Cécile du Bois d'Enghien, Nicolas Dubart, Pierre Proces, Sylvie Boldrini, Charles Bracke, Jean-Yves De Vleeschouwer et tous les autres, MERCI. Merci pour toutes ces soirées épiques gembloutoises qui sont gravées en moi.

Je souhaite aussi remercier toutes celles et ceux que j'ai croisé au niveau de l'unité d'Evolution Biologique et Ecologie (EBE/ULB), et qui m'auront fourni tantôt une aide quelconque, tantôt un appui technique (ou les deux). Nommément, je remercie Esra Kaymak, toujours si occupé mais toujours disponible pour un coup de main et pour mes interrogations multiples et variées; Serge Aron, Laurent Grumiau, Boris Demenou, Franck Monthé, Junior-Brandet Lissambou, Davy Ikabanga, Arthur Boom, Dario Oyeda Alayon, Hugo Darras, Fransisco Davilla, Chedly Kastally.

Pour finir, je voudrais remercier toute ma famille et mes amis pour m'avoir accompagné tout au long de cette aventure : une pensée spéciale à mes feux parents Clotaire et Julienne ; papa et maman, vous serez toujours dans mon cœur. Un ultra-grand merci à ma « honey » chérie et à notre boud'chou Léna d'être là en toute discrétion, mais toujours comme il faut et quand il faut. C'est vrai que ça n'a pas toujours été facile, mais vos tendresses m'ont permis de travailler avec plus de courage et de persévérance. Merci à ma chère sœur Imelda et mon cher frère Gildas pour leur soutien indéfectible. Merci à tous mes cousins et amis en particulier, Gontran, Hervé, Freddy, Sylvanus, Martial, Nadège, Eric, Alec, Laura, Cynthia, Gael, Peggy, Expédit, Anicette, Eudes, Dagbéli, Lola et Laurent pour leur soutien et affectueux attachement.

Merci...

Tables des matières

1. Introduction générale	21
1.1. Forêts tropicales et savanes.....	21
1.1.1. Distribution et diversité végétale dans les forêts tropicales humides.....	22
1.1.2. Distribution mondiale des savanes.....	23
1.1.3. Particularité des forêts et savanes tropicales africaines et centres d'endémismes.....	23
1.1.4. Fluctuations climatiques passées.....	25
1.1.5. Perturbations anthropiques.....	27
1.2. Mécanismes de spéciation.....	28
1.2.1. Notion d'espèce.....	28
1.2.2. Facteurs de diversification et de distribution des espèces.....	29
1.2.2.1 Les modèles de spéciation allopatrique.....	29
1.2.2.2. Les modèles de spéciation parapatrique.....	30
1.2.2.3. Les modèles de spéciation sympatrique.....	30
1.2.3. Les modèles de spéciation par polyploïdisation.....	30
1.2.3.1. Formation via un doublement somatique du génome.....	31
1.2.3.2. Formation via gamètes non réduits.....	32
1.2.3.3. Formation via hybridation interspécifique.....	32
1.3. Délimitation des espèces par des approches phylogénétiques.....	32
1.4. Diversité intraspécifique : phylogéographie, structure génétique spatiale et système de reproduction.....	34
1.4.1. Phylogéographie et événements démographiques.....	34
1.4.1.1. Patrons de distributions phylogéographiques en Afrique.....	35
1.4.1.2. Marqueurs moléculaires utilisés en phylogéographie.....	37
1.4.2. Structure génétique spatiale et flux de gènes.....	37
1.4.3. Système de reproduction : phénologie.....	38
1.5. Objectifs, questions et structuration de la thèse.....	39
1.5.1. Objectifs et questions de recherche.....	39
1.5.2. Structuration de la thèse.....	40
2. Un complexe d'espèces d'<i>Azelia</i> des forêts africaines d'intérêt économique et écologique (synthèse bibliographique)	45
2.1. Introduction.....	46
2.2. Répartition géographique.....	47
2.3. Systématique du genre <i>Azelia</i>	47
2.3.1. Historique de la taxonomie.....	47
2.3.2. Caractérisation botanique.....	48
2.3.3. Le cas particulier des <i>Azelia</i> commerciaux.....	50
2.4. Point sur la phylogénie du genre <i>Azelia</i>	52
2.5. Origine et source de diversification probable du genre <i>Azelia</i>	53
2.6. Ecologie de reproduction des <i>Azelia</i> : cas particulier des « doussié ».....	53

2.6.1. Exigences abiotiques globales	53
2.6.2. Phénologie, croissance et régénération naturelle	54
2.7. Valeur sociale et économique des <i>Afzelia</i> : cas spécifique des « doussié »	55
2.7.1. Importance sociale	55
2.7.2. Importance industrielle et commerce international du bois	56
2.8. Conservation et gestion des populations du « doussié »	57
2.8.1. Pressions anthropiques sur les populations du « doussié »	57
2.8.2. Mesures légales en matière d'aménagement et de gestion des ressources forestières	57
2.9. Conclusion et perspectives	58
3. Microsatellite development and flow cytometry in the African tree genus <i>Afzelia</i> (Fabaceae, Caesalpinioideae) reveal a polyploid complex	61
3.1. Introduction	62
3.2. Methods and results	62
3.2.1. Microsatellite development.....	62
3.2.2. Cross-amplification in congeneric species and ploidy determination.....	65
3.2.3. Population genetics parameters in the tetraploid <i>A. bipindensis</i> and the diploid <i>A. africana</i>	66
3.3. Conclusion	66
4. Evolution in the African tropical trees displaying ploidy-habitat association: the genus <i>Afzelia</i> (Leguminosae, Caesalpinioideae)	71
4.1. Introduction	72
4.2. Materials and methods	73
4.2.1. Sampling and DNA extraction	73
4.2.2. DNA polymorphism in plastid and nuclear regions assessed by Sanger sequencing	73
4.2.3. Phylogenetic reconstructions based on plastid and nuclear regions	76
4.2.4. Plastome sequencing using HTS tools and bioinformatics	76
4.2.5. Fossil calibration and molecular dating	77
4.2.6. Morphometric analyses	78
4.3. Results.....	82
4.3.1. DNA polymorphism	82
4.3.2. Phylogenetic relationships and timing of diversification of the genus <i>Afzelia</i>	83
4.3.3. Morphologic differentiation and species delimitation.....	85
4.4. Discussion	87
4.4.1. Phylogenetic relationships and polyploid evolution in the genus <i>Afzelia</i>	87
4.4.2. Timing of diversification of the genus <i>Afzelia</i> and rain/dry forest transitions.....	87
4.4.3. Genetic and morphological species delimitation in <i>Afzelia</i>	88
4.5. Conclusion	89
4.6. Data Accessibility.....	89
5. Spatial genetic structure in African <i>Afzelia</i> savannah species (Leguminosae, Caesalpinioideae): evidence of recent colonization and expansion	93

5.1. Introduction	94
5.2. Materials and methods	95
5.2.1. Study species	95
5.2.2. Sampling strategy, DNA isolation and genotyping	96
5.2.3. Data analysis.....	97
5.2.3.1. Characterizing spatial genetic structure	97
5.2.3.2. Population genetics parameters and selfing rate estimation	97
5.2.3.3. Isolation-by-Distance at individuals and populations levels.....	97
5.2.3.4. Test of demographic scenarios	98
5.3. Results.....	100
5.3.1. Genetic diversity and structuring within each species and selfing rate	100
5.3.2. Detection of signal of Isolation-by-Distance (IBD).....	101
5.3.3. Demographic event occurring within each species	102
5.4. Discussion	103
5.4.1. Comparison of genetic diversity of <i>Afzelia</i> with other tropical species	103
5.4.2. Spatial genetic structure in the two species	103
5.4.3. Demographic history of the populations	104
5.5. Conclusion	105
6. Comparative phylogeography of <i>Afzelia</i> (Leguminosae, Caesalpinioideae) tetraploid species	
.....	109
6.1. Introduction	110
6.2. Materials and methods	111
6.2.1. Study species.....	111
6.2.2. Sampling and morphological identification	111
6.2.3. Microsatellite genotyping.....	112
6.2.4. Microsatellite data analysis	112
6.3. Results.....	113
6.4. Discussion	115
6.5. Conclusion	116
7. Evidence of sympatrically highly differentiated genetic clusters in the African tetraploid timber tree <i>Afzelia bipindensis</i> Harms (Leguminosae) showing phenological and population structure differences	
.....	121
7.1. Introduction	122
7.2. Materials and methods	123
7.2.1. Study species.....	123
7.2.2. Study area	124
7.2.3. Population sampling, DNA isolation and genetic amplification	124
7.2.4. Identification of spatial genetic structure of adults trees	124
7.2.5. Genetic diversity and identity disequilibrium-based selfing rate estimation	125
7.2.6. Isolation by distance and estimation of gene dispersal distances.....	125

7.2.7. Diameter structure, phenology study and flowering synchrony.....	126
7.3. Results.....	127
7.3.1. Detecting genetic discontinuities.....	127
7.3.2. Genetic diversity, consanguinity and selfing rates.....	128
7.3.3. Isolation by distance and estimated gene dispersal.....	130
7.3.4. Comparisons of diameter structure, phenophases and flowering synchrony.....	131
7.4. Discussion.....	131
7.4.1. Genetic structuring and differentiation.....	131
7.4.2. Effective selfing rate and inbreeding.....	132
7.4.3. Gene dispersal distance in <i>A. bipindensis</i>	133
7.4.4. Diametric structure, reproductive ecology and management implications.....	133
7.5. Conclusion.....	134
8. Discussion générale.....	137
8.1. Combien d'espèces d' <i>Afzelia</i> en définitive ?.....	138
8.2. L'origine des populations spécifiques d' <i>Afzelia</i>	139
8.3. Diversification sympatrique au sein du genre <i>Afzelia</i> : cas de <i>A. bipindensis</i>	140
8.4. Contribution à l'étude des flux géniques et à la compréhension de la biologie reproductive chez <i>Afzelia</i>	141
8.5. Conclusions et implication pour la conservation.....	143
Références bibliographiques.....	147
Annexes.....	169

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

« Lors de mes vagabondages dans les verdure éternelles j'avais l'impression de lire l'univers et la forêt était pour moi la plus belle des bibliothèques »

Gonzague Saint Bris

1. Introduction générale

Comprendre comment les espèces ligneuses d'Afrique ont réagi face aux changements climatiques passés et répondent à l'anthropisation actuelle de l'environnement, permettrait de prédire leur future trajectoire évolutive et de proposer des stratégies de mitigation adaptées.

Des études récentes de la diversité génétique de plusieurs espèces d'arbres africains ont mis en évidence une structuration génétique significative entre les populations (Daïnou et al., 2010 ; Duminil et al., 2010 ; Lowe et al., 2010 ; Allal et al., 2011 ; Duminil et al., 2015 ; Demenou et al., 2016 ; Faye et al., 2016). Ces études montrent que les régions à forte diversité génétique correspondent parfois aux refuges du Pléistocène proposés par certains palynologues (Maley, 1996). Bien que ces études procurent une meilleure compréhension des causes probables de la structuration génétique des arbres, elles ont été testées sur un nombre limité de modèles biologiques. Or toutes les espèces n'ont pas forcément la même histoire évolutive (Haffer, 2008). Une meilleure compréhension de la dynamique de la biodiversité de ces écosystèmes passera donc par l'étude de plusieurs espèces (Lovejoy & Hannah, 2005).

Par ailleurs, les pressions anthropiques sur les écosystèmes actuels jouent également un rôle important dans leur dynamique. Par exemple en Afrique Centrale, bien que l'exploitation forestière telle que pratiquée actuellement soit très sélective (Ruiz Pérez et al., 2005), son impact sur la biologie des espèces et les niveaux de diversité génétique des populations d'arbres demeure peu connus (Debout et al., 2010, Duminil et al., 2016).

Cette thèse s'intéresse à l'histoire évolutive d'un genre d'arbre (*Azelia*) largement répandu dans les forêts et savanes tropicales africaines. Successivement dans les différentes parties de cette introduction, nous allons présenter :

- la description des milieux dans lesquels se répartissent ces espèces ;
- l'histoire de ces différents écosystèmes ;
- les différents mécanismes et facteurs de diversification des espèces ligneuses ;
- les différentes notions de structure génétique spatiale, de phylogéographie et de biologie reproductive.

1.1. Forêts tropicales et savanes

La région intertropicale (23°28'N – 23°28'S), située entre les tropiques du Cancer et du Capricorne, est caractérisée par la présence de quatre principaux biomes: les forêts denses humides majoritairement localisée autour de l'Equateur, les savanes et forêts claires sèches dans les régions avec une saison sèche marquée mais des précipitations annuelles qui restent relativement élevées, et les steppes et les déserts dans les zones plus arides (Fig.1). Parmi ces biomes, c'est principalement dans les forêts denses humides que se concentre la plus grande diversité biologique (Fig. 2).

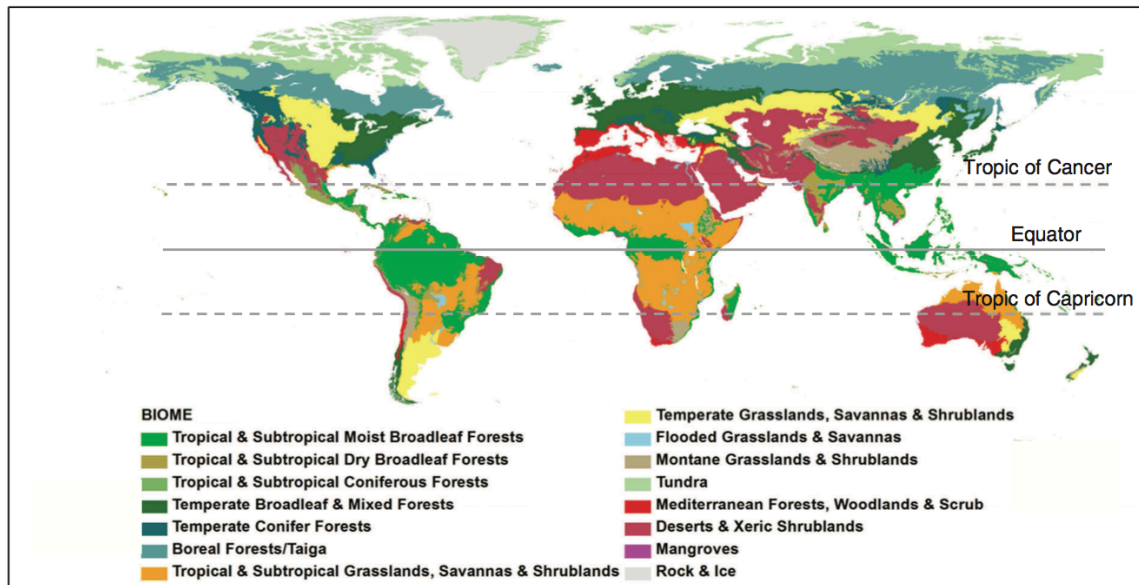


Figure 1: Répartition des biomes dans le monde d'après Olson (2001).

1.1.1. Distribution et diversité végétale dans les forêts tropicales humides

Les forêts denses humides tropicales (FDHT) s'étendent sur une superficie d'environ 1734 millions d'hectares (FAO, 2010). Elles se répartissent en trois grands blocs distincts: le bloc africain, le bloc américain et le bloc du sud-est asiatique (constitué d'un ensemble d'îles). Sans parallèle en termes de diversité biologique, elles constituent l'écosystème terrestre le plus diversifié de la planète (Gentry, 1992; Morley, 2000). Cependant, la diversité végétale est inégalement répartie dans les différents bassins tropicaux (Fig. 2 adaptée de Barthlott et al., 2007).

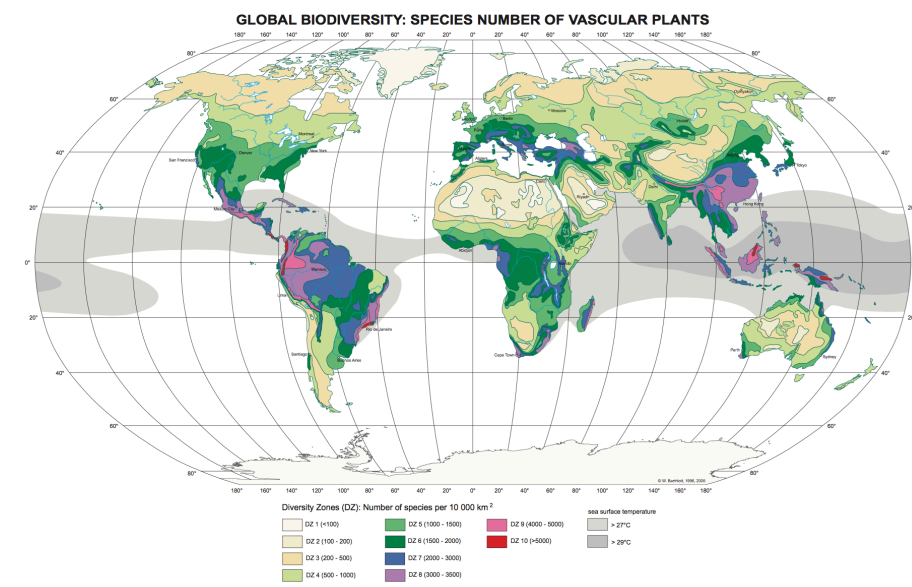


Figure 2: Répartition de la richesse spécifique des plantes vasculaires par maille de 10 000 km² sur toute la surface terrestre (Barthlott et al., 2007).

La diversité floristique des forêts africaines est nettement moins élevée que celle des forêts néotropicales et asiatiques (Richards 1973; Parmentier et al., 2007). La région indo-pacifique est aussi riche en espèces ligneuses que les néotropiques, les deux régions ayant un minimum de 19 000 à 25 000 espèces d'arbres. L'Afrique continentale quant à elle est relativement pauvre avec un minimum de ~ 4 500 à 6 000 espèces d'arbres (Silk et al., 2015).

1.1.2. Distribution mondiale des savanes

Les savanes sont définies comme un type de végétation caractérisé par un couvert ligneux inférieur à 40% (Letouzey, 1968) et un tapis d'herbacées continu (Hills and Randall, 1968). Dans la présente thèse, l'utilisation du terme de « savane » englobe un vaste ensemble de formations végétales allant des savanes herbeuses (et des prairies) aux savanes boisées (Fig. 1). Les estimations actuelles de l'étendue globale des savanes font état de 12 à 40 % de la surface terrestre mondiale (Scholes & Hall, 1996; Ramankutty & Foley, 1999; Chapin et al., 2001). La savane est le type de végétation dominant en Afrique avec 50% de superficie. Elle est aussi représentée en Amérique latine (45% - Cerrados du sud de l'Amazonie et Llanos du nord de l'Amazonie), en Australie (30%), en Inde (10%) et en Asie du sud-est (10%) (Scholes & Archer, 1997). Riches en espèces, les savanes contribuent aussi fortement à la biodiversité globale (Bond & Parr, 2010; Bestelmeyer & Briske, 2012; Suttie et al., 2005).

1.1.3. Particularité des forêts et savanes tropicales africaines et centres d'endémismes

Malgré l'existence de nombreux types forestiers d'un point de vue phytosociologique, les FDHT peuvent être catégorisées en trois principaux ensembles : (1) les forêts marécageuses et les forêts inondées périodiquement ou en permanence et étroitement liées à la dynamique hydrique de leur milieu, (2) les forêts d'altitude (montagnardes et sub-montagnardes) et (3) les forêts de basse altitude de terres fermes qui à leur tour, peuvent-être subdivisées en deux grands types : (i) les forêts sempervirentes, caractérisées par une canopée feuillue toute l'année, sont généralement présentes dans les zones où les précipitations annuelles dépassent 1700 mm et où la saison sèche ne dépasse pas 3 mois ; (ii) les forêts semi-caducifoliées ou semi-décidues caractérisées par une défoliation partielle et synchrone des arbres lors de la saison sèche, apparaissent dans des zones où les précipitations annuelles varient entre 1000 et 2000 mm et où la saison sèche ne dépasse pas 6 mois (White, 1983). Ces différents ensembles sont en outre susceptibles d'être plus ou moins secondarisés en fonction de l'importance des impacts anthropiques et des perturbations naturelles. En Afrique subsaharienne, ces forêts denses humides appartiennent principalement à trois centres régionaux d'endémisme, caractérisés par une grande hétérogénéité environnementale : les forêts d'Afrique de l'ouest centrale font partie du centre Guinéo-Congolais (Fig. 3) et les forêts côtières d'Afrique de l'est font partie du centre Zanzibar-Inhambane (Fig. 3). On trouve également plusieurs fragments forestiers en Afrique de l'est qui constitue l'*Eastern Arc Mountains* (Tanzanie et Kenya).

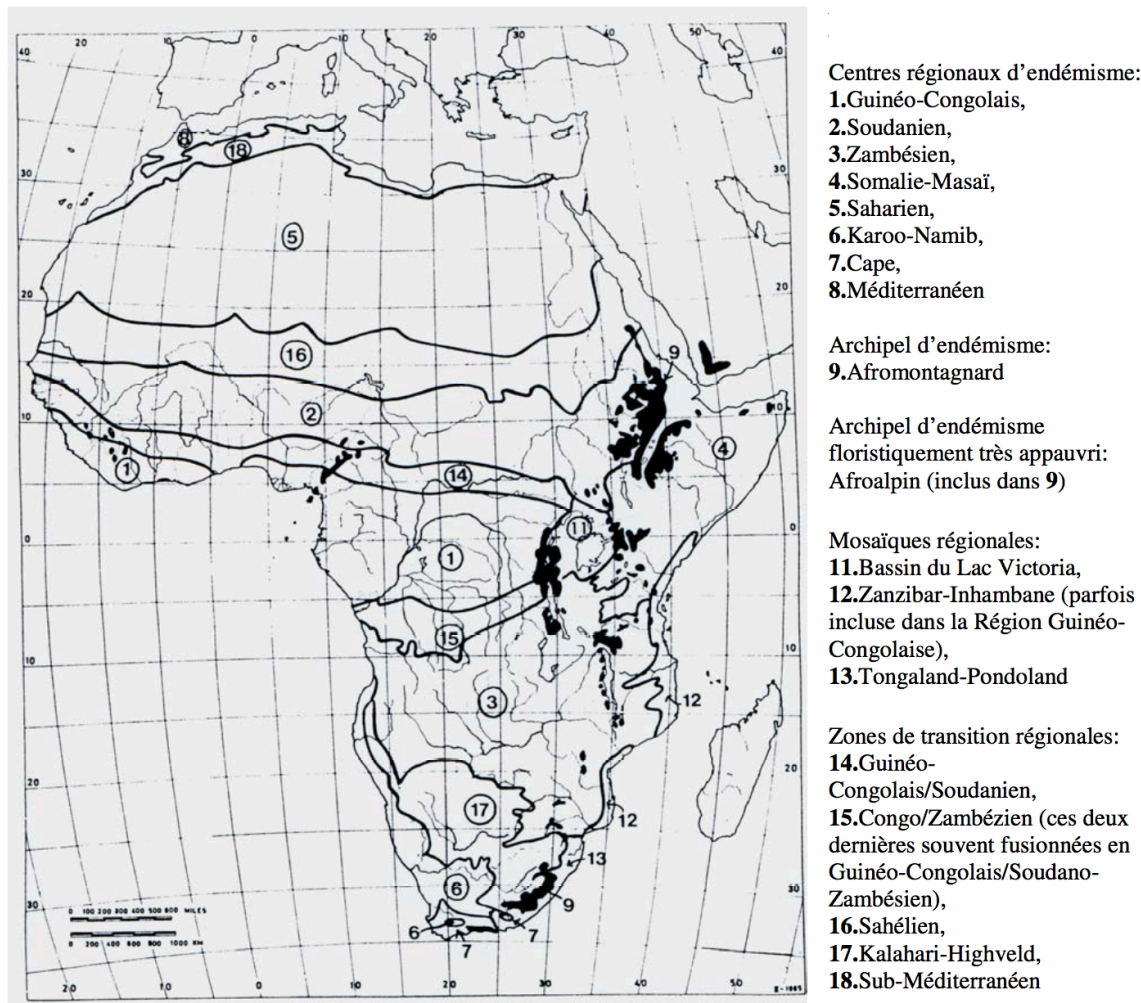


Figure 3: Carte des principales phytochories d'Afrique selon White (1979).

Les FDHT du centre d'endémisme Guinéo-Congolais couvrent une superficie avoisinant 1 700 000 km² (Doucet, 2005 ; de Wasseige et al., 2012). Ce centre se subdivise en trois sous-centres: (i) le Haut-Guinéen comprend quelques grands îlots forestiers (îlots forestiers de Gola en Siéra-Léone, de Sapo au Libéria et de Taï en Côte d'Ivoire) plus quelques fragments forestiers éparses (forêts du Ghana) ; (ii) le Bas-Guinéen, couvrant le Gabon, le sud-est du Nigéria, le Sud et l'Ouest Cameroun, la République du Congo, le sud de la Centrafrique et la Guinée équatoriale ; et (iii) le bloc Centro-Guinéen (ou bloc Congolais) qui couvre une bonne partie du bassin Congolais (White, 1979 & 1983). Ces sous-centres sont séparés par des barrières géographiques. Le Haut-Guinéen et le Bas-Guinéen sont séparés par l'intervalle du Dahomey (Dahomey-Gap), une région de végétation ouverte (savanes) parsemée de quelques îlots de forêts denses humides semi-décidues (Linder et al., 2012). Le fleuve Congo et la rivière Sangha quant à eux séparent le Bas-Guinéen du sous-centre Congolais. Les sous-centres Bas-Guinéen et Congolais abritent le second plus grand massif continu de forêt tropicale humide après le bassin Amazonien, totalisant environ 1 600 000 km² (Doucet, 2005 ; de Wasseige et al., 2012). Les forêts denses Ouest africaines ne couvrent plus que 100 000 km² environ.

Malgré le fait que ces forêts contiennent une grande diversité et un endémisme considérable de l'ordre de 47,9% (Linder et al., 2012 ; Sosef et al., 2017), elles subissent d'importantes perturbations anthropiques et climatiques (Richards, 1973), entraînant ainsi une réduction de la superficie forestière.

Les savanes et forêts claires africaines sont essentiellement localisées dans deux grands centres d'endémisme : les centres Soudanien et Zambézien. Le centre Soudanien (3 731 000 km² de superficie) est caractérisé par une flore qui comporte 2750 espèces, dont environ un tiers sont endémiques (White, 1983). D'une superficie de 3 770 000 km², le centre Zambézien est riche d'une flore de 8500 espèces végétales environ (dont 54% d'endémiques). Dans cette région, les forêts claires dominent. Elles se répartissent en « miombo », « mopane » et forêt claire zambézienne indifférenciée (White, 1983).

1.1.4. Fluctuations climatiques passées

Au cours des derniers millions d'années, le climat a basculé entre des époques successives de réchauffement et de refroidissement. Plusieurs études ont montré l'effet significatif de ces variations climatiques sur l'étendue des savanes et des forêts tropicales avec des phases répétitives d'expansion ou de rétraction majeure (Morley, 2000). Les premières réponses de ces écosystèmes aux changements climatiques passés (refroidissement des températures) remontent au Crétacé (135 - 65 Ma), au Paléocène-Néocène (65 - 46 Ma) et à l'Oligocène (33 Ma) (Fig. 4 - Zachos et al., 2008; Jacobs et al., 2010).

Plus récemment, l'optimum climatique du milieu du Miocène (~16 Ma) a été suivi d'un refroidissement plus une aridification climatique prononcée au Néogène avec une baisse progressive des températures (23 – 2,6 Ma ; Morley et al., 2000). Ce refroidissement / aridification a eu un fort impact sur les forêts tropicales humides qui ont fortement régressé au profit des savanes qui ont connu, quant à elles, une expansion maximale jusqu'à la fin du Miocène réduisant ainsi la superficie des forêts tropicales (principalement les forêts Est africaines) à de petits refuges favorables à leur survie dans des zones montagneuses et peut-être le long des plaines des systèmes fluviaux (Plana, 2004). Après cette période d'aridification extrême, l'alternance des climats froids/secs et chauds/humides du début du Pliocène (5 - 3.5 Ma) a entraîné une ré-extension des forêts tropicales (sur base des isotopes d'oxygène - Sarnthein & Fenner, 1988) suivie d'une phase d'extinction vers la fin de cette période (Fig.4).

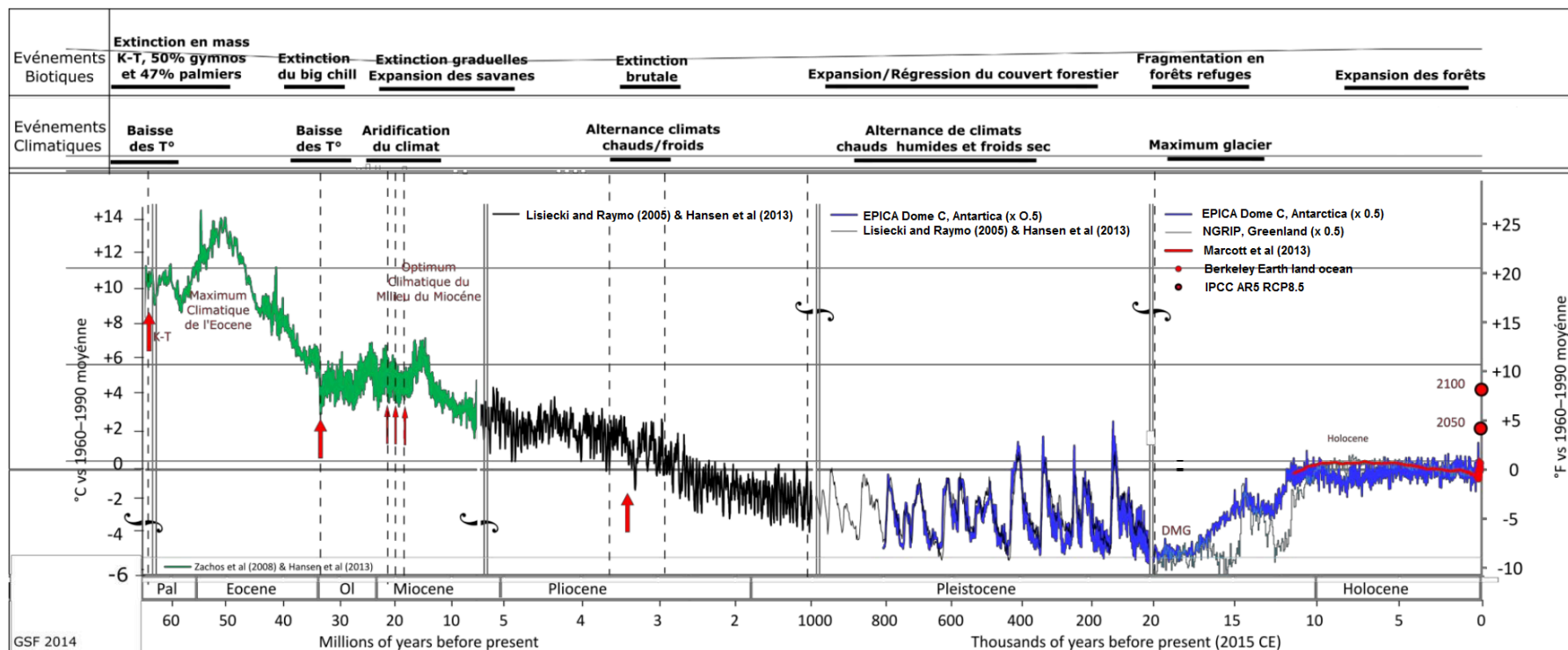


Figure 4: Estimation globale de la température en surface de l'air depuis le Crétacé terminal en relation avec les événements climatiques et biotiques. Le temps est indiqué en abscisse en millions d'années (Cénozoïque) et en milliers d'années (depuis le Pléistocène). La température de l'air en surface est tracée sous forme d'anomalies (différences) à partir de la moyenne sur l'intervalle de référence de 1960 à 1990 (qui est d'environ 14 ° C / 57 ° F), en degrés Celsius (à gauche) et Fahrenheit (à droite). Les flèches rouges indiquent les différents événements climatiques depuis le Crétacé. Source: modifiée à partir de <https://commons.wikimedia.org> et Faye, (2016).

Le Quaternaire désigne la période géologique la plus récente et est subdivisée en deux époques : le Pléistocène (entre 1,87 millions d'années et 10 000 ans Before Present) et l'Holocène (de 10 000 ans BP à nos jours). Son histoire récente montre qu'il est caractérisé par des cycles glaciaires et interglaciaires (alternances de périodes froides et chaudes) qui ont induit des phases de contraction (périodes glaciaires) et d'expansion (périodes inter-glaciaires) des forêts tropicales humides africaine (Fig. 5 - Maley, 1991 & 1996 ; Lezine, 2007). D'autres oscillations, moins importantes ont également impacté les forêts tropicales d'Afrique à l'Holocène (Maley 2000; Ngomanda et al., 2009). Durant cette période, les forêts tropicales africaines ont connu trois phases successives de perturbations: (1) de 10 000 à 4000 BP, le massif forestier d'Afrique centrale est marqué par une expansion très forte des forêts; (2) de 4000 à 1500 BP, ces forêts régressent à cause de la baisse des précipitations. Le point culminant de cette régression est intervenu vers 2500 ans BP, période durant laquelle de nombreux feux semblent être propagés; et (3) de 1500 BP à nos jours, le massif forestier du bassin du Congo est de nouveau en expansion.

En plus de ces effets climatiques, ces écosystèmes tropicaux subissent également beaucoup d'influences relatives à des perturbations anthropiques.

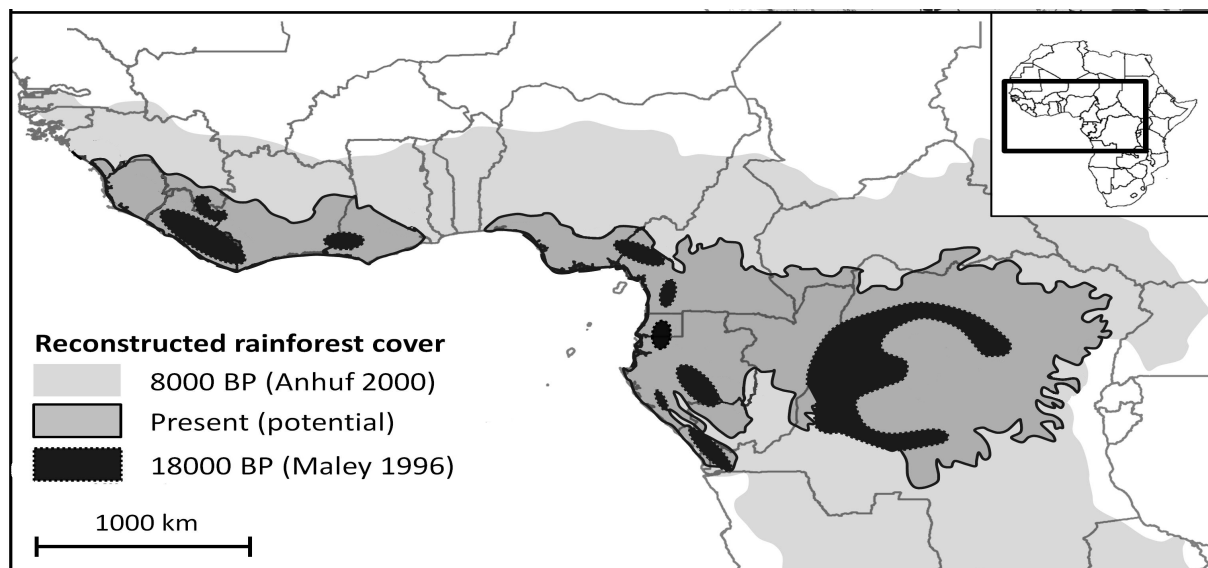


Figure 5: Localisation des refuges forestiers hypothétiques (en noir) basés sur la distribution des richesses spécifiques et des taux d'endémisme de plusieurs taxa (Maley, 1996). En gris foncé, les régions phytogéographiques du centre d'endémisme Guinéo-Congolais (distribution potentielle actuelle des forêts denses humides) et en gris clair l'extension maximale hypothétique des forêts durant la période de l'Holocène humide. Extrait de Hardy et al. (2013).

1.1.5. Perturbations anthropiques

De nombreuses études ont montré le rôle très significatif des variations climatiques passées (voir partie précédente) sur les écosystèmes d'Afrique tropicale (Schwartz & Lanfranchi, 1993). La fragmentation des aires de distribution des espèces induite par ces changements climatiques passés semble avoir joué un rôle prépondérant dans la répartition de la diversité génétique des taxons

(théorie des refuges - Maley, 1996, qui attribue un rôle majeur aux zones de stabilité environnementale). Cependant, ces événements climatiques passés n'ont pas été les seuls facteurs à avoir influencé la dynamique des forêts et des savanes en Afrique sub-saharienne. Des études archéologiques ont montré que l'Homme pratiquant l'agriculture a occupé de vastes surfaces de FDHT en Afrique centrale depuis au moins 2000 ans BP (Biwolé et al., 2015 ; Morin-Rivat et al., 2016). Cette situation n'est pas très différente dans les savanes. En effet, les savanes Est-africaines ont connu des interactions humaines majeures pendant la fin de l'Holocène (Marchant & Taylor, 1998 ; Leiju et al., 2005). Des études palynologiques de plusieurs sites en Afrique de l'Ouest montrent également que la réduction de l'abondance des taxons de forêt tropicale durant l'Holocène tardif a été couplée avec une augmentation de la présence d'*Elaeis guineensis* (voir par exemple : Sowunmi, 1981 ; Elenga et al., 1994 ; Maley et Brenac, 1998). Ainsi, la composition floristique actuelle de ces écosystèmes pourrait être en partie héritée des activités anthropiques passées (Brncic et al., 2007 ; Van Gernerden et al., 2003). En effet, les événements démographiques induits par les changements climatiques et anthropiques ont certainement exercé une influence notable sur la répartition des forêts et leur composition floristique actuelle, en laissant des signatures au niveau des génomes des espèces, du moins pour les événements les plus anciens (Morley, 2000; Plana, 2004; Jacobs et al., 2010). Cependant, bien que l'influence de ces principaux facteurs soit avérée, leur degré d'implication reste encore très mal connu et certaines études suggèrent même que le rôle des humains dans la formation de ces biomes peut être surestimé (Salzmann & Hoelzmann, 2005).

1.2. Mécanismes de spéciation

1.2.1. Notion d'espèce

Traditionnellement, une espèce est définie comme un groupe d'individus qui se distinguent d'autres groupes par des différences morphologiques. C'est sur la base de ce critère que la plupart des espèces ont généralement été décrites. Cependant, confronté à la diversité et à la complexité des organismes vivants, la reconnaissance des espèces sur la base de différences morphologiques est parfois difficile (Mayr, 1957). Darwin (1859) même affirmait déjà dans son célèbre livre de l' « Origine des espèces » que: "*No one definition has as yet satisfied all naturalists; yet every naturalist knows vaguely what he means when he speaks of a species*". Plus récemment, Hey (2006) fait un diagnostic de la complexité de la notion d'espèce par cette assertion : « *The species problem is the long-standing failure of biologists to agree on how we should identify species and how we should define the word 'species'* ». Dès lors, l'identification des espèces est souvent problématique et plusieurs concepts ont été développés (Mayden, 1997). Parmi eux, c'est le « *Biological Species Concept (BSC)* », qui est le plus admis actuellement (Mayr, 1942 ; Dobzhansky, 1951). D'après ce concept, **les espèces sont des groupes de populations naturelles interfécondes et qui sont reproductivement isolées d'autres groupes semblables**. Cependant, cette définition ne s'applique qu'aux organismes à reproduction sexuée car en cas de reproduction asexuée stricte chaque individu constituerait une espèce à lui seul. Ainsi, bien que ce concept théorique soit largement reconnu parmi la communauté scientifique, le débat sur les critères permettant de délimiter les espèces reste intense

(Hey, 2006).

1.2.2. Facteurs de diversification et de distribution des espèces

1.2.2.1 Les modèles de spéciation allopatrique

La spéciation peut intervenir suite à un processus de divergence dichotomique plus ou moins lent, par lequel deux (ou plusieurs) groupes de populations vont se différencier (jusqu'à l'isolement reproductif) et pouvoir éventuellement explorer des conditions environnementales différentes. C'est le cas de la spéciation de type allopatrique, introduit pour la première fois par Mayr (1942) et qui découle de l'isolement géographique des populations.

C'est historiquement le premier modèle proposé pour expliquer la spéciation qui est liée à la mise en place de barrières reproductives. Dans le cadre des forêts tropicales du bassin du Congo, ce modèle de spéciation combiné à l'hypothèse des refuges forestiers de Maley (1996), pourraient expliquer la diversification des espèces (Figure 6). L'hypothèse des refuges forestiers stipule que les fluctuations climatiques passées ont induit la contraction du couvert forestier en plusieurs blocs (refuges), séparés les uns des autres par des savanes. Il s'en est suivi une rupture de flux de gènes entre refuges isolés et une dérive génétique due à la réduction de la taille des populations. Ainsi l'isolement des populations au sein de ces refuges est supposée être à l'origine de la spéciation (Moritz et al., 2000) Sur base de l'étude biogéographique des Rubiaceae, Robbrecht (1996) a montré que l'isolement génétique des populations sur une longue période de temps est favorable à la spéciation allopatrique.

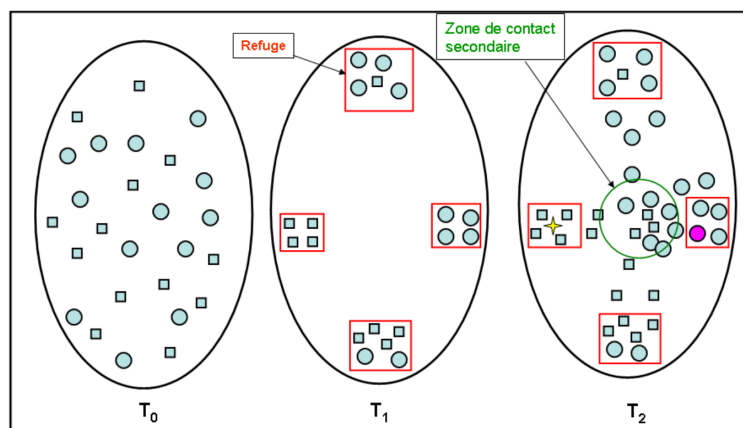


Figure 6: Représentation schématique de l'évolution de la diversité spécifique ou génétique en supposant des événements de fragmentation suivis de ré-expansion des populations. Les temps T_0 , T_1 et T_2 sont classés du plus ancien au plus récent. A l'origine (T_0) la forêt constituait un seul bloc, puis il y a eu fragmentation du bloc forestier (T_1). Les refuges évoluent indépendamment les uns des autres. Pendant les phases d'expansion (T_2), les espèces et les lignées génétiques migrent et se rencontrent dans des zones de contact secondaires. Les différents symboles et couleurs représentent des espèces ou des lignées génétiques différentes. Figure adaptée de Koffi, (2010).

D'une manière générale, dans le paysage forestier, des barrières physiques (fleuve, chaîne de montagne, large bande de savane etc...) peuvent constituer des obstacles à la dispersion des espèces (Moritz et al., 2000). Ces barrières peuvent expliquer leurs limites de distribution.

1.2.2.2. Les modèles de spéciation parapatrique

La spéciation peut aussi intervenir suite à un processus de divergence à travers des gradients environnementaux où des lignées divergentes se trouvent dans des milieux distincts (conditions environnementales différentes) mais adjacents (Fjeldsà & Lovett, 1997; Mallet, 2010). C'est le cas de la spéciation de type parapatrique qui peut subvenir sans rupture de flux de migrants ou de gènes entre les populations adjacentes (Fig. 7).

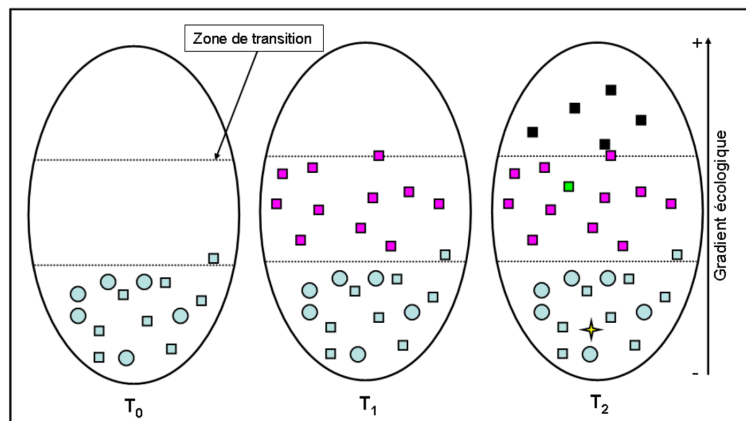


Figure 7: Représentation schématique de l'évolution de la diversité spécifique ou génétique suivant un gradient écologique. Les temps T0, T1 et T2 sont classés du plus ancien au plus récent. Il y a d'abord colonisation (T0), puis adaptation à l'environnement (T1) accompagnée d'une accumulation de lignées dans les biotopes colonisés (T2). Figure adaptée de Koffi, (2010).

Ce modèle est fondé principalement sur l'hypothèse selon laquelle la suppression des flux de gènes par une barrière physique n'est pas un pré-requis pour la spéciation (Moritz et al., 2000). Dans le cadre des forêts tropicales africaines, ce modèle pourrait s'appliquer dans les zones de transition forêt-savane (écotones) ou au niveau des gradients d'altitude (Fjeldsà & Lovett, 1997).

1.2.2.3. Les modèles de spéciation sympatrique

La définition la plus admise fait de la spéciation sympatrique celle résultant de la sélection divergente (favorisant simultanément des phénotypes divergents dans la population) entraînant une spécialisation de niche qui soit directement, soit par entraînement peut permettre le développement de barrières reproductives.

Dans ce modèle, une divergence peut se développer même en présence de flux de gènes si la sélection est forte. Des cas de spéciation malgré l'absence de barrières reproductives ont été identifiés chez les salamandres des grottes du *Tennessee* (Plethodontidae: *Gyrinophilus*) (Niemiller et al., 2008).

1.2.3. Les modèles de spéciation par polyploïdisation

Le terme « polyploïde » a été employé la première fois en 1916 par Winkler pour désigner un organisme possédant plus de deux jeux complets de chromosomes. Cette définition globale est toujours d'actualité, mais a néanmoins été renforcée depuis par d'autres terminologies beaucoup plus

restrictives. Ainsi, le terme: (i) allopolyploïde est utilisé pour décrire les espèces polyploïdes d'origine interspécifique, les sous-génomes étant qualifiés d'« homologues » ; et (ii) autopolyploïde pour désigner un organisme contenant plus de deux génomes « homologues » provenant de la même espèce (Figure 8 - Kihara et Ono, 1926). La polyploïdie est un processus évolutif fréquent et de très nombreuses espèces de plantes ont des origines auto- ou allo-polyploïdes (Soltis & Soltis, 1993, 1999; Soltis & Soltis, 2000 ; Soltis et al., 2007). Pendant longtemps, l'autopolyploïdie a été considérée comme désavantageuse en terme d'évolution, et sa prévalence chez les plantes a été négligée ou sous-estimée (Stebbins, 1950; Albertin, 2005). Néanmoins, les allopolyploïdes restent malgré tout plus fréquents que les autopolyploïdes (Soltis et al., 2007).

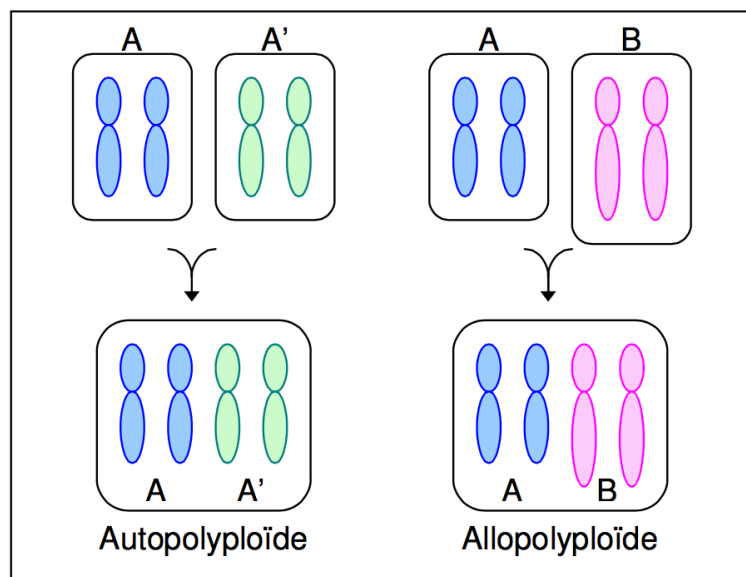


Figure 8: Schéma des catégories de polyploïdes. A et A' proviennent de la même espèce, ce sont des paires de chromosomes homologues. A et B proviennent d'espèces distinctes, ce sont des paires de chromosomes homéologues.

Plusieurs mécanismes conduisent à l'apparition d'une espèce polyploïde.

1.2.3.1. Formation via un doublement somatique du génome

La polyploïdie peut résulter d'un doublement du stock chromosomique d'une même espèce, dans ce cas on parle d'espèce autopolyploïde. Par exemple, le doublement du génome dans des cellules somatiques peut permettre la formation de nouveaux polyploïdes. Lorsque ce doublement somatique a lieu dans des tissus méristématiques, il génère des individus constitués de secteurs diploïdes et de secteurs tétraploïdes appelés chimères (Albertin, 2005). Dans ce contexte, la reproduction des zones polyploïdes peut favoriser la formation d'individus entièrement polyploïdes. Ce mécanisme de formation d'espèce polyploïde a longtemps été considéré comme le principal mode de spéciation polyploïde chez les plantes. Mais la découverte de la polyploïdie chez les animaux a conduit à envisager d'autres voies de formation, comme la voie des gamètes non-réduits, qui est aujourd'hui considérée comme le mécanisme le plus fréquent de formation des polyploïdes.

1.2.3.2. Formation via gamètes non réduits

La polyploïdie peut également résulter de la production de gamètes diploïdes résultant d'une méiose anormale. La méiose chez un individu à $2n$ chromosomes passe par deux divisions successives au cours desquelles les chromosomes homologues, puis les chromatides sœurs sont disjoints. Ce processus conduit à l'obtention de gamètes haploïdes « réduits », à n chromosomes. Des anomalies de la méiose peuvent dans certains cas conduire à la non-disjonction, totale ou partielle, des chromosomes ou des chromatides, et donc à la formation de gamètes « non-réduits diploïdes » à $2n$ chromosomes. Ces gamètes diploïdes, combinés avec des gamètes haploïdes pourront permettre la formation de triploïdes. Dans d'autres cas, la fusion de deux gamètes diploïdes conduit à la formation de tétraploïdes. La fréquence de formation des gamètes non-réduits a été estimée à moins de 1% chez les plantes issues de croisement intraspécifique, et à près de 28% chez les hybrides interspécifiques (Ramsey & Schemske, 1998; Albertin, 2005). La voie des gamètes non-réduits est généralement décrite comme le principal mécanisme de formation des polyploïdes (Pikaard, 2001; Lawton-Rauh, 2003).

1.2.3.3. Formation via hybridation interspécifique

Les espèces dites allopolyploïdes résultent principalement, quant à elles, de l'addition du génome de deux espèces distinctes mais généralement très proches, ce qui peut provoquer des associations entre chromosomes homéologues à la méiose. Dans ce cas de figure, la formation des allopolyploïdes passe nécessairement par les processus d'hybridation et de doublement de la garniture chromosomique. La stabilité des processus méiotiques des espèces allopolyploïdes est indispensable pour leur établissement, et passe par un comportement disomique strict (avec formation de bivalents en méiose) et le contrôle précis de l'appariement chromosomique (Riley et al., 1959; Jenczewski & Alix, 2004). La formation spontanée d'hybrides interspécifiques est fréquente dans le règne végétal. On compte de 16 à 34% de familles de plantes qui présentent au moins une lignée polyploïde issue d'hybridation interspécifique (Albertin, 2005). C'est ce qui expliquerait la fréquence des plantes allopolyploïdes par rapport aux plantes autopolyploïdes.

1.3. Délimitation des espèces par des approches phylogénétiques

La délimitation des espèces peut être abordée par des approches de phylogénie qui étudient les relations de parenté des espèces (Judd et al. 2002). Cette approche, née de la volonté de classer les organismes, a très tôt cherché à décrire les relations entre les êtres vivants sous forme d'arborescence (Haeckel 1866 ; Darwin 1859). Les règles de la phylogénie contemporaine se sont toutefois développées avec le cladisme ou systématique phylogénétique (Hennig 1950, 1966), qui vise à regrouper les êtres vivants en fonction de leur lien de parenté sur la base du partage d'états dérivés ou synapomorphies (et non pas d'états primitifs ou plésiomorphies) de caractères homologues hérités de l'ancêtre commun (Darlu & Tassy, 1993). Dans une représentation phylogénétique, les espèces analysées sont présentées à l'extrémité de branches terminales, et leurs relations sont représentées de façon dichotomique par une succession de nœuds (événements de spéciation) et d'entre-nœuds (lignées ancestrales). Au cours des dernières décennies, la phylogénie a connu un

essor particulier avec l'acquisition des données moléculaires (Page et Holmes 2005). Cependant, une phylogénie établie à partir d'une région unique du génome reflète avant tout l'histoire évolutive de cette région. Il est alors important de comparer et/ou d'ajouter les informations apportées par différents marqueurs moléculaires pour avoir des phylogénies mieux résolues (Huggues et al., 2002). Mais l'histoire des différents gènes utilisés pour établir les phylogénies, ne reflète pas toujours l'histoire des organismes qui les véhiculent (Doyle et Gaut, 2000).

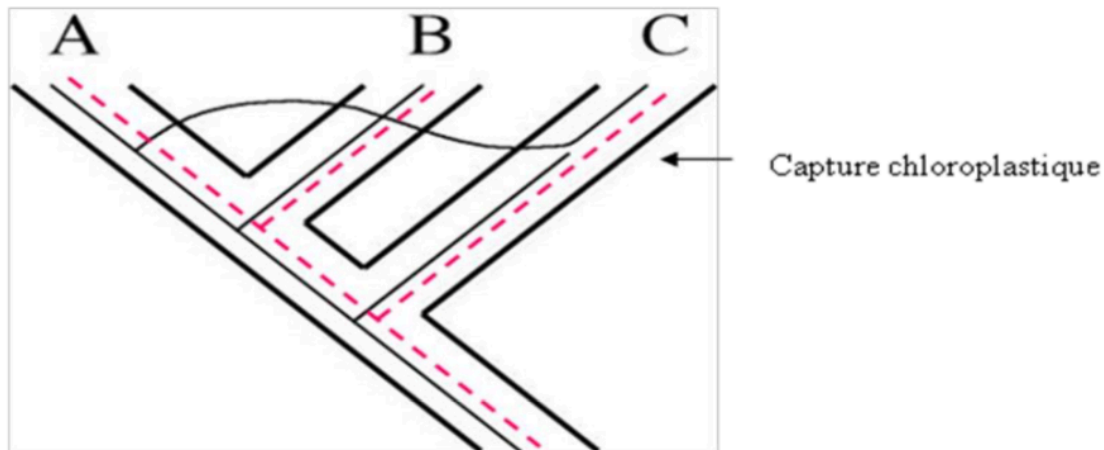


Figure 9: Exemple de source de conflit phylogénétique : évolution introgressive. En trait continu noir est représentée la lignée génétique cytoplasmique et en traits discontinus rose la lignée génétique nucléaire. Dans le cas illustré, la généalogie du gène nucléaire est conforme à la phylogénie des espèces (délimité par les traits épais). Par contre, suite à un événement de capture cytoplasmique, la généalogie cytoplasmique n'est pas conforme à la phylogénie des espèces. D'après Lyons-Weiler et Milinkovitch 1997, adapté par Philippe (2007).

Par exemple, si on considère la Figure 9, deux espèces A et C se sont hybridées et l'hybride AC s'est rétrocroisé depuis de nombreuses fois avec l'espèce parente C. L'hérédité cytoplasmique étant monoparentale, si le donneur cytoplasmique était l'espèce A à la base puis l'hybride AC lors des rétrocroisements, au bout de plusieurs générations une espèce possédant un génome nucléaire de l'espèce C mais un génome cytoplasmique de l'espèce A sera obtenue. Les gènes nucléaires de A auront été peu à peu éliminés lors des croisements successifs. Ainsi, c'est un peu comme si l'espèce C avait « capturé » un cytoplasme de l'espèce A (Rieseberg & Soltis 1991). On comprend aisément que dans ce cas les phylogénies nucléaires et cytoplasmiques soient fréquemment conflictuelles (Cronn & Wendel 2004, Doyle et al., 2004, Chat et al., 2004, Alvarez et Wendel 2006).

Ces conflits peuvent-être causés par d'autres phénomènes dont le polymorphisme insuffisant des gènes utilisés, ou encore un tri aléatoire des lignées géniques ancestrales au travers des multiples événements de spéciation (« incomplete lineage sorting ») (Doyle et Gaut, 2000).

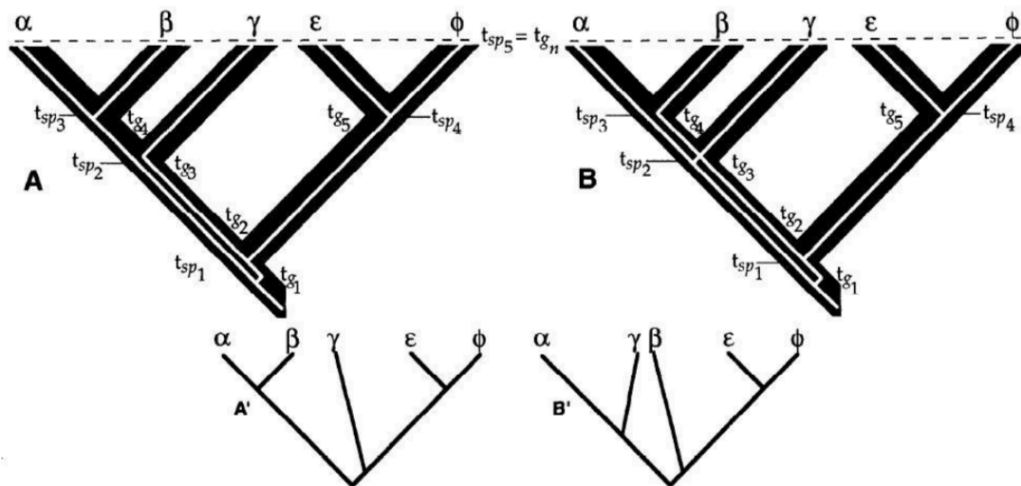


Figure 10: Exemple de source de conflit phylogénétique : deux phylogénies de gènes (lignes blanches) au sein d'une phylogénie d'espèces (autour, en noir). Phylogénie de gène A : un ancien polymorphisme persiste à deux événements de spéciation (tsp1 et tsp2) donnant des différences topologiques entre phylogénie des espèces et phylogénie du gène (A'). Phylogénie de gène B : Un ancien polymorphisme persiste suite à 3 événements de spéciation (tsp1, tsp2 et tsp3) donnant des différences entre la phylogénie du gène B (B'), la phylogénie des espèces et la phylogénie du gène A (A'). D'après Lyons-Weiler et Milinkovitch 1997, adapté par Philippe (2007).

Un échantillonnage incomplet de ces allèles peut conduire à des topologies qui seront en conflit avec l'histoire des espèces (Figure 10, Lyons-Weiler & Milinkovitch 1997). Faire la part de la délimitation spécifique dans les conflits phylogénétiques n'est pas toujours aisé et requiert l'intégration de données aux niveaux intraspécifique et populationnel (Comes & Abbott 2001).

1.4. Diversité intraspécifique : phylogéographie, structure génétique spatiale et système de reproduction

Au cours des dernières décennies, des avancées notables en biologie évolutive et en écologie ont permis de mieux comprendre l'évolution des espèces en relation avec les événements historiques biogéographiques. Une approche relative à de telles recherches combine plusieurs objectifs de la génétique des populations (diversité génétique, structure génétique spatiale à fine échelle, flux des gènes, répartition géographique des lignées ou variants génétiques, régime de reproduction).

1.4.1. Phylogéographie et événements démographiques

La phylogéographie consiste à analyser comment les lignées ou variants génétiques sont spatialement distribués. En d'autres mots, la généalogie et la géographie semblent connectées et la phylogéographie explore les liens entre différents variants génétiques (on parle d'haplotypes) et leur distribution géographique pour inférer l'histoire démographique d'une espèce ou d'un groupe d'espèces proches dans le temps et dans l'espace (Avise et al., 1987). Ces processus démographiques (isolement, expansion, événement de fondation ou goulot d'étranglement) sont souvent liés entre eux et dépendent aussi d'autres facteurs tels que les conditions environnementales, la taille et la connectivité/fragmentation des populations, les modes de reproduction et de dispersion de gènes. Cette discipline a été très utile pour retracer les voies de migration de nombreuses espèces

d'arbres forestiers lors de la recolonisation post-glaciaire au cours de l'Holocène en Europe (Demesure et al., 1996; Dumolin-Lapègue et al., 1997; Palmé & Vendramin, 2002; Grivet & Petit 2003; Petit et al., 2003 ; Heuertz et al., 2004). En Afrique subsaharienne, des analyses sur les patrons de distribution de la diversité génétique à large échelle, ont révélé l'impact des fluctuations climatiques passées sur la répartition biogéographique de certaines espèces des régions Guinéo-Congolaise, Soudanienne et Zambézienne.

1.4.1.1. Patrons de distributions phylogéographiques en Afrique

- Dans les formations sèches

Très peu d'études phylogéographiques ont été réalisées sur des espèces de savanes Soudanienne et Zambéziennes, de sorte que les effets des facteurs historiques sur l'histoire évolutive des espèces dans ces régions sont encore très mal connus. À notre connaissance, seules trois espèces soudanienne ont fait l'objet d'études génétiques à grande échelle : *Adansonia digitata* (Tsy et al., 2009; Kyndt et al., 2009), *Vitellaria paradoxa* (Allal et al., 2011) et *Khaya senegalensis* (Sexton et al., 2015) et deux espèces soudano-zambéziennes : *Acacia senegal* (Odee et al., 2012) et *Acacia nilotica* (Wardill et al., 2005). Certaines de ces études ont mis en évidence des populations en expansion au cours du dernier maximum glaciaire (Sexton et al., 2015), tandis que d'autres ont montré des signes de fragmentation probablement liés à la présence de barrières géologiques et climatiques (voir par exemple Tsy et al. 2009, Odee et al., 2012). Des efforts supplémentaires doivent donc être effectués afin de comprendre les événements démographiques qui gouvernent les patrons de répartition des espèces dans les savanes africaines.

- Dans les formations humides

Davantage d'efforts ont été consacrés depuis peu à l'étude de la structuration de la diversité génétique spatiale de quelques espèces des forêts denses humides tropicales Guinéo-Congolaises. La plupart de ces travaux ont pu identifier des patrons contrastés en lien avec la recolonisation post-glaciaire (Figure 11 - Hardy et al., 2013; Heuertz et al., 2014; Dauby et al., 2014; Ley et al., 2014; Faye et al., 2016) et des structurations génétiques importantes pour les différentes espèces étudiées (Figure 10 - Hardy et al., 2013).

Cependant, il est évident que l'étude de quelques espèces ne peut suffire pour généraliser les patrons de fragmentation-expansion de la végétation forestière africaine. Dans ces conditions, des efforts doivent être effectués pour augmenter le nombre de taxa étudiés afin d'évaluer les possibilités de généralisation des tendances obtenues.

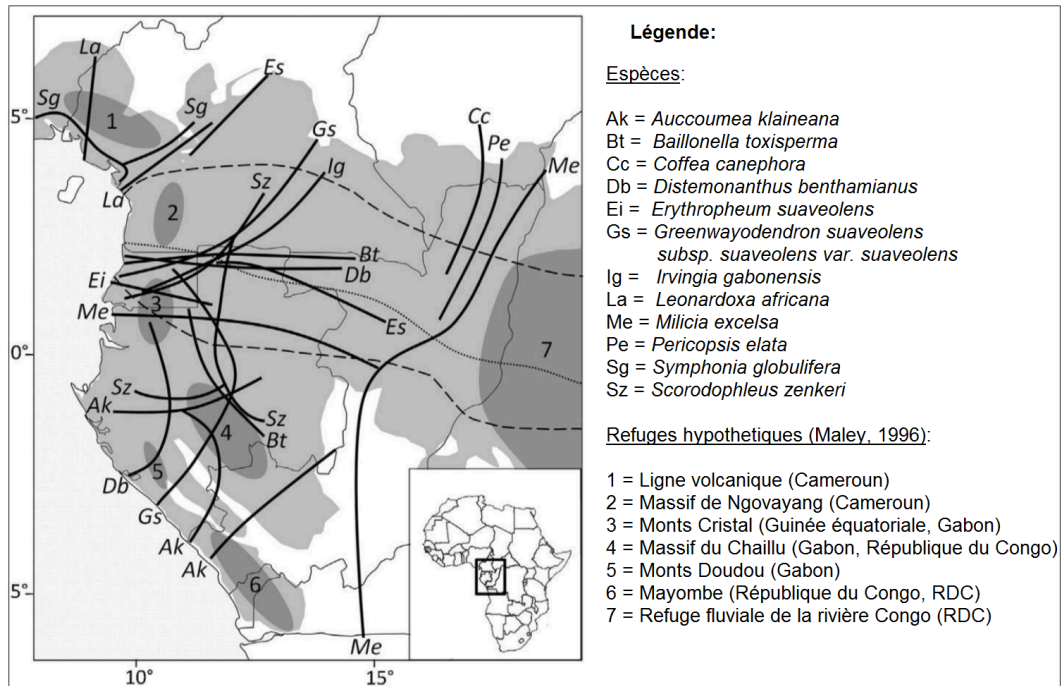


Figure 11: Positions approximatives des discontinuités génétiques identifiées chez 13 espèces d'arbres des forêts pluviales de basse Guinée. Les refuges forestiers hypothétiques durant le dernier maximum glaciaire sont représentés par les aires grisées (modifié à partir de Maley, 1996 et Colyn et al., 1991). Chacune des lignes noires foncées correspond à une discontinuité génétique ou limite géographique entre clusters géniques parapatriques, identifiés à l'aide de microsatellites nucléaires, excepté pour Ig (données RAPD) et La (limites entre clades du génome chloroplastique). La plupart des espèces n'ayant pas été échantillonnées dans la partie Est de la carte (excepté Cc, Me et Pe), le peu de discontinuités rapportées dans cette zone pourrait être un artéfact. Les deux lignes en traits interrompus délimitent approximativement le climat équatorial avec deux saisons humides et deux saisons plus sèches, ces dernières étant d'intensité égale (en terme de pluviométrie) le long de la charnière climatique (ligne pointillée); au nord, le climat boréal se caractérise par une saison sèche et ensoleillée de décembre à février, alors qu'au sud, le climat austral se caractérise par une saison sèche et nuageuse (donc moins rude) de juin à août (Source Hardy et al., 2013).

Par exemple, une étude récente de phylogéographie sur l'espèce ligneuse *Distemonanthus benthamianus* (Demenou et al., 2016) a permis de détecter des groupes génétiques différenciés résultant d'anciennes barrières à la dispersion de gènes (entre le Haut Guinéen, le Dahomey gap et le Bas-Guinéen), probablement en réponse aux perturbations climatiques historiques sur les forêts d'Afrique centrale. En effet, cette étude a montré que certaines populations auraient connu pendant cette période des réductions assez brutales de leurs tailles au sein des refuges, entraînant des phénomènes de « **bottleneck** » ou **goulot d'étranglement**. D'autres populations par contre, ont su s'adapter à ces conditions climatiques extrêmes engendrant des évènements de fondation ou « **effet fondateur** », résultant de l'expansion démographique de leurs populations, à partir d'un petit nombre d'individus. Ces deux évènements sont très proches et souvent associés car tous deux provoquent une réduction de la diversité génétique (du fait d'une réduction rapide de la taille de population) due à la dérive génétique (Loveless & Hamrick 1984). Outre ces évènements démographiques, les phénomènes d'isolement reproductif peuvent aussi influencer la structure génétique des populations.

1.4.1.2. Marqueurs moléculaires utilisés en phylogéographie

Chez les plantes, le **génom**e chloroplastique est couramment utilisé en phylogéographie parce qu'il est haploïde, non-recombinant et est très conservé à l'échelle des Angiospermes (Clegg et al., 1991). Vu le taux d'évolution très lent de ce type de génome, il est assez facile de suivre une lignée, c'est-à-dire un ensemble d'haplotypes proches génétiquement, sur l'ensemble de l'aire de distribution par le retraçage de leurs différentes voies de colonisation. Mais l'utilisation du chloroplaste ne nous renseigne que sur une partie de l'histoire démographique des populations, raison pour laquelle le **génom**e nucléaire fait également l'objet d'une utilisation croissante (Hare, 2001). En phylogéographie et en génétique des populations en général, les marqueurs moléculaires nucléaires parmi les plus utilisés actuellement sont les **marqueurs microsatellites** (Simple Sequence Repeat : SSR). Ce sont des marqueurs très polymorphes qui permettent d'estimer aussi bien les flux de gènes entre populations intraspécifiques qu'entre espèces voisines, avec la possibilité de détecter des formes et zones hybrides entre espèces proches (Duminil & Di Michele 2009).

1.4.2. Structure génétique spatiale et flux de gènes

Un autre processus, agissant sur la **structure génétique spatiale** (SGS), est l'**isolement par la distance** (IBD) qui dépend en grande partie des traits d'histoire de vie des espèces conditionnant la dispersion de leurs gènes (Hardy & Vekemans 1999). Les populations linéaires (restreintes) présentent souvent un IBD plus marqué que les populations étendues sur deux dimensions (Rousset 1997, 2000). La SGS peut être caractérisée par la décroissance des coefficients de parenté entre paires d'individus en fonction de la distance physique qui les sépare (Vekemans & Hardy 2004), ce qui permet de déduire que deux individus ont davantage de chances de se ressembler génétiquement s'ils sont proches géographiquement (Loveless & Hamrick 1984; Levin et al., 2003). Ce processus (IBD) qui est souvent représenté par un graphique montrant la décroissance du coefficient de parenté moyen entre paire d'individus en fonction de la distance spatiale, est utile pour évaluer une SGS au sein d'une population (Vekemans & Hardy 2004). Cette courbe de parenté peut, par la même occasion, fournir un aperçu de la contribution relative du pollen et de la dispersion des graines au flux de gènes global (Heuertz et al., 2003). Typiquement, lorsqu'il y a une similarité génétique entre les individus au sein d'une même population, aucune structure génétique n'est obtenue au sein d'une population (Figure 12a). Mais, lorsqu'une structure génétique émerge en fonction de la dispersion génétique limitée, la courbe de parenté résultante ressemble à une exponentielle négative (Figure 12b).

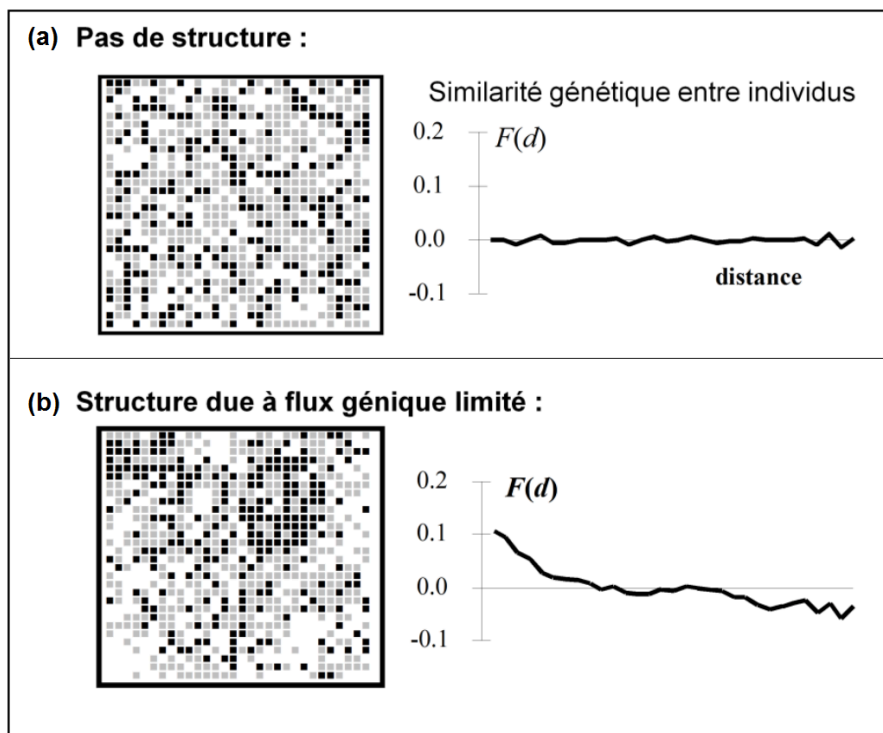


Figure 11: Illustration de l'isolement par la distance au sein d'une population théorique en un locus (2 allèles noir/blanc, gris= hétérozygotes) : (a) structure aléatoire impliquant aucune structure génétique spatiale; (b) structure résultant d'une dispersion limitée des gènes, impliquant une diminution du coefficient de parenté, mesuré ici par le paramètre $F(d)$, en fonction de la distance entre paires d'individus. D'après Vekemans & Hardy 2004.

Enfin, la compréhension des patterns de SGS repose fondamentalement sur la connaissance de la biologie et de l'écologie de reproduction (phénologie, pollinisation, germination, dispersion des diaspores).

1.4.3. Système de reproduction : phénologie

La connaissance du système de reproduction des plantes joue également un rôle majeur dans le domaine de la biologie évolutive car elle permet d'interpréter les patrons de diversité et la structure génétique des espèces. La phénologie, est un élément clé de l'autécologie des essences tropicales car elle permet de mieux appréhender leur adaptation au contexte écologique et climatique local. Si les caractéristiques écoclimatiques (température et régime hydrique) montrent une nette saisonnalité dans les régions tempérées, il n'en est pas toujours de même sous un climat équatorial. En effet, une caractéristique très importante de la plupart des écosystèmes tropicaux est leur grande variation saisonnière interannuelle. En plus de ces fluctuations climatiques, la phénologie reste très peu étudiée chez les arbres tropicaux africains (Doucet, 2003; de Freitas & Pinard, 2008 ; Freitas & Bolmgren, 2008). Ainsi, dans le contexte actuel et futur de perturbations climatiques, ce caractère adaptatif revêt donc une importance croissante dans de nombreux domaines de recherche fondamentale et appliquée.

1.5. Objectifs, questions et structuration de la thèse

1.5.1. Objectifs et questions de recherche

L'objectif de cette recherche doctorale est de caractériser l'histoire évolutive d'un genre d'arbres présents dans les savannes et les forêts africaines, le genre *Afzelia* (Fabaceae, Caesalpinioideae). Ce genre comporte sept espèces qui sont endémiques en Afrique sub-saharienne : *Afzelia africana* Sm ex pers., *A. bella* Harms, *A. bipindensis* Harms, *A. pachyloba* Harms, *A. parviflora* (Vahl) Hepper, *A. quanzensis* Welw. et *A. peturei* De Wild. Elles sont très proches du point de vue morphologique et commercialisées sous l'appellation « doussié » (ATIBT, 2010). Parfois difficilement différenciables sur le plan morphologique, elles constituent un modèle idéal pour aborder le problème de délimitation des espèces tropicales. Les espèces sont largement distribuées dans les savanes et les forêts tropicales en zone Guinéo-Congolaise, Soudanienne et Zambezienne. Ainsi, en occupant des niches écologiques relativement distinctes pour certaines et chevauchantes pour d'autres, ce genre constitue un modèle intéressant pour étudier l'influence des facteurs historiques sur les écosystèmes africains. Les *Afzelia* sont également des bois d'œuvre très recherchés sur le marché international du commerce du bois (ATIBT, 2010). L'exploitation forestière en Afrique Centrale étant soumise à une législation stricte, les espèces ne peuvent être exploitées qu'au-delà d'un certain diamètre et des mesures doivent être prises pour assurer le renouvellement de la ressource (Fargeot et al., 2004). Ainsi, au Cameroun, le diamètre minimum d'exploitation des « doussiés » est de 80 cm. L'adéquation de telles mesures avec le maintien des niveaux actuels de diversité ne peut être évaluée qu'en connaissant l'écologie reproductive des espèces. Or celle-ci demeure quasi inconnue. Les individus seraient fertiles dès 20 cm de diamètre (Doucet, comm. pers.) et compte tenu des caractéristiques des fleurs (Caesalpinioideae) et des graines (présence d'un arille), le genre serait entomophile et zoochore (Bationo et al., 2000). Ces différentes caractéristiques pourraient laisser présager des distances de flux de gènes étendues. Toutefois, les doussiés étant très disséminés en forêt (0,3 pied par hectare, d'après les rapports techniques de Nature+ et Pallisco), les impacts de l'exploitation forestière sur la diversité génétique pourraient s'avérer non négligeables.

Plus spécifiquement, cette étude vise à : (1) Evaluer le niveau de divergence morphologique entre espèces et décrire leurs relations phylogénétiques afin de quantifier leur isolement reproductif en examinant le rôle des gradients écologiques et des facteurs historiques dans la spéciation ; (2) Procéder à une analyse approfondie de la diversité et de la structuration génétique spatiale des espèces; (3) Identifier et décrire les facteurs écologiques, biotiques et abiotiques, susceptibles d'influencer les flux géniques à l'échelle des populations d'une espèce des forêts denses humides (*A. bipindensis*) : phénologie reproductive et déterminisme des événements de reproduction.

Pour atteindre ces objectifs, les questions spécifiques abordées par la présente étude sont:

- **En rapport avec l'objectif spécifique 1**

1. La synthèse des connaissances actuelles disponibles permet-elle de clarifier la taxonomie au sein du genre *Afzelia* en Afrique, et quelles sont les caractéristiques autécologiques des différentes

espèces actuellement reconnues?

2. Existe-t-il des différences de niveau de ploïdie entre les différentes espèces d'*Afzelia* et quelle est la composition de leur garniture chromosomique?

3. Etant donné l'importance des marqueurs moléculaires microsatellites dans la délimitation des espèces, le développement et l'utilisation de ces marqueurs spécifiques permettent-ils d'établir une proximité entre les différentes espèces d'*Afzelia*?

4. Les différenciations morphologiques et génétiques (fournie par des marqueurs nucléaires et chloroplastiques) concordent-elles entre individus de ces différentes espèces?

- **En rapport avec l'objectif spécifique 2**

5. Existe-t-il des discontinuités génétiques à large échelle spatiale au sein de chaque espèce qui suggèreraient une fragmentation des populations en réponse aux événements climatiques passés?

- **En rapport avec l'objectif spécifique 3**

6. Dans quelle mesure les traits d'histoire de vie de l'espèce d'*Afzelia* la plus exploitée pour le bois d'œuvre (*A. bipindensis*), affectent-ils les flux de gènes et les capacités d'expansion des populations de cette espèce à une échelle spatiale plus fine?

1.5.2. Structuration de la thèse

La présente introduction constitue le Chapitre 1 de la thèse. Les différents concepts-clés utilisés dans ce travail y ont été développés. Les chapitres suivants compilent un ensemble d'articles déjà publiés ou en préparation, qui tentent de répondre aux questions précédemment évoquées.

Le chapitre 2 fait l'état de l'art des connaissances actuelles concernant l'histoire de la taxonomie, de l'écologie et de la diversité génétique des populations spécifiques au sein du genre *Afzelia*. Ce chapitre, en répondant à la première question, récapitule également les connaissances autécologiques des différentes espèces. Il a été publié sous la référence :

Donkpegan A.S.L., Hardy O.J., Oumorou M., Daïnou K. & Doucet J-L. (2014). Un complexe d'espèces d'*Afzelia* des forêts africaines d'intérêt économique et écologique (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **18**, 220-232.

Nous avons développé des marqueurs microsatellites (SSRs) nucléaires chez *Afzelia* spp. qui sont présentés dans le chapitre 3. Ce chapitre répond à la question 2. A partir d'*A. bipindensis*, des marqueurs microsatellites ont été développés et des tests de cross-amplification ont été réalisés sur les autres espèces. Les différents niveaux de ploïdies ont été vérifiés pour ces espèces et leur garniture chromosomique a été identifiée. Il a été publié sous la référence :

Donkpegan A.S.L., Doucet J-L., Daïnou K. & Hardy O.J. (2015). Microsatellite development and flow cytometry in the African tree genus *Azelia* (Fabaceae, Caesalpinioidea) reveal a polyploid complex. *Applications in Plant Sciences*, **3** (1), 1400097.

Le chapitre 4 aborde principalement les questions 3 et 4 et explore la problématique de délimitation spécifique morphologique et génétique. Il investigate plus particulièrement la délimitation entre les espèces en utilisant des traits morphologiques (quantitatifs et qualitatifs) discriminants et des marqueurs génétiques diagnostiques (chloroplastiques et nucléaires). Des concordances ont été établies entre les niveaux de ploïdie et les habitats de ces espèces. Cette étude relève la nécessité de compléter les résultats obtenus par d'autres analyses basées sur d'autres types de marqueurs, tels que des marqueurs SSRs. Ces marqueurs SSRs permettront de mesurer les degrés d'hybridation qu'il peut y avoir entre ces espèces très proches. Il a été publié sous la référence :

Donkpegan A.S.L., Doucet J.L., Migliore J., Duminil J., Daïnou K., Pineiro R., Wieringa J., Champluvier D. & Hardy O.J. (2017). Evolution in African tropical trees displaying ploidy-habitat association: the genus *Azelia* (Leguminosae). *Molecular Phylogenetic Evolution*, **107**, 270-281.

Les chapitres 5 et 6 répondent à la question 5. Une approche de regroupement Bayésien, à l'aide des marqueurs SSRs, a été utilisée à large échelle (régions Guinéo-Congolaise, Soudanienne et Zambézienne), afin de différencier les groupes en équilibre d'Hardy-Weinberg. Ils ont été étudiés en détail (en fonction des niveaux de ploïdie) par rapport à deux aspects : leur niveau de diversité et les processus pouvant expliquer la structure génétique, dont les gradients environnementaux et les événements climatiques passés. Au vu des résultats obtenus, l'identification des clusters génétiques sympatriques a soulevé certaines interrogations relatives aux processus spécifiques de reproduction et de dispersion génique.

Le chapitre 7 tente de répondre à ces interrogations en abordant la question 6. A une échelle spatiale relativement restreinte au sein de populations d'*A. bipindensis*, à l'Est du Cameroun, ce chapitre teste l'hypothèse d'une spéciation sympatrique et un modèle d'isolement par la distance. Il analyse également les facteurs influençant la structure de population et les distances de dispersion de gènes, en relation avec les observations partielles sur les traits d'histoire de vie de l'espèce (phénologie reproductive).

Enfin, l'ensemble des résultats est commenté dans le chapitre 8 par une discussion générale qui clôt la thèse. Il synthétise les informations majeures tirées des différents articles et donne des perspectives pour de nouvelles recherches.

CHAPITRE 2

UN COMPLEXE D'ESPÈCES D'*AFZELIA* DES FORÊTS AFRICAINES D'INTÉRÊT ÉCONOMIQUE ET ÉCOLOGIQUE (SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE)

Adapté de :

Donkpegan A.S.L., Hardy O.J., Oumorou M., Dainou K. & Doucet J-L. (2014). Un complexe d'espèces d'*Azelia* des forêts africaines d'intérêt économique et écologique (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **18**, 220-232.

« *Les forêts précèdent les Hommes, les déserts les suivent* »

Chateaubriand

2. Un complexe d'espèces d'*Azelia* des forêts africaines d'intérêt économique et écologique (synthèse bibliographique)

Résumé: L'objectif de cette synthèse est d'établir un bilan actualisé des connaissances et une revue bibliographique du genre *Azelia* qui comporte un complexe d'espèces exploitées pour leur bois d'œuvre. La distribution des espèces du genre *Azelia* en Afrique suggère différentes adaptations vis-à-vis des gradients écologiques. Toutefois, sur base des seuls critères végétatifs, il est difficile de distinguer les espèces lors des inventaires forestiers, ce qui pourrait compromettre la gestion durable des populations promue par les pays d'Afrique Centrale. Globalement, nous avons montré que le genre reste très peu étudié, bien que certaines de ces espèces soient considérées par l'IUCN comme menacées. Dès lors, des investigations écologiques et génétiques approfondies seraient des plus pertinentes.

Mots clés. *Azelia*, forêt tropicale, bois d'œuvre, écologie, ressource génétique forestière, arbre à buts multiples, Afrique.

Abstract: The purpose of this review is to provide an update of knowledge and a comprehensive literature review of the genus *Azelia*, a complex of sister species exploited for their timber in central Africa. The distribution of *Azelia* species in Africa suggests various adaptations to ecological factors. However, on the basis of only vegetative criteria, it is difficult to distinguish species in forest inventory, which could compromise the sustainable management promoted by the Central African country populations. Globally, we showed that the genus remains understudied although some of its species are considered by IUCN as threatened. Therefore, the ecological and genetic aspects investigations should be relevant.

Key words. *Azelia*, tropical forest, timber tree, ecology, forest genetic resource, multi-purpose trees Africa.

2.1. Introduction

Le genre *Afzelia* Smith (Fabaceae, Caesalpinioideae¹) est un taxon paléotropical présent dans les principales formations végétales du continent africain (White, 1986). Il comporte sept espèces en Afrique dont deux se retrouvent dans les forêts claires de la région zambézienne (*A. quanzensis* Welw. et *A. peturei* De Wild.) ; quatre autres sont endémiques des forêts denses humides de la région Guinéo-Congolaise (*A. bella* Harms, *A. bipindensis* Harms, *A. pachyloba* Harms et *A. parviflora* (Vahl) Hepper et la dernière se retrouve essentiellement dans les savanes soudaniennes (*A. africana* Sm. ex Pers.). *A. bella* présenterait trois variétés : *A. bella*, var. *gracilior* Keay, *A. bella*, var. *glabra* Aubrév. et *A. bella*, var. *bella*. Quatre de ces espèces (*A. africana*, *A. bella*, *A. bipindensis* et *A. pachyloba*) sont très proches du point de vue morphologique et généralement commercialisées sous l'appellation « doussié », lequel est un bois d'œuvre très recherché par l'industrie forestière (Paradis et al., 2011; ATIBT, 2010). La distinction morphologique de ces espèces est difficile sur le terrain, créant des confusions lors des inventaires forestiers. Cette situation semble tacitement tolérée dans le commerce international des bois tropicaux (Normand, 1939 ; Mesel, 2002) bien que des propriétés technologiques différentes soient régulièrement reportées par les professionnels (CTFT, 1980), notamment en termes de retrait du bois. Lors de l'élaboration des flores d'Afrique, plusieurs auteurs ont étudié le genre (Chevalier 1940 ; Keay 1954 ; Aubréville 1959, 1968, 1970 ; INEAC 1952 ; de Saint Aubin 1963 ; Léonard 1950 ; Satabié 1994). Toutefois, à notre connaissance, la dernière révision complète du genre a été réalisée par Pennell en 1925.

Outre son intérêt économique, le genre *Afzelia*, présente en tant que complexe d'espèces, un intérêt indéniable pour tester différentes hypothèses évolutives et phylogéographiques (Duminil et al., 2010 ; Dainou et al., 2010). Par ailleurs, *A. africana*, *A. bipindensis* et *A. pachyloba* sont classées dans la catégorie « vulnérable » de la liste rouge IUCN (2012). Une confirmation de l'identité de ces espèces ne peut qu'être utile à une meilleure gestion et conservation des ressources spécifiques existantes.

Le présent article, outre la synthèse des connaissances qu'il propose sur les espèces africaines du genre *Afzelia*, vise aussi à relever les insuffisances de connaissances sur certaines espèces afin de suggérer des pistes pour des recherches futures. La recherche bibliographique a été réalisée en consultant : (1) les bases de données accessibles via le site internet de l'Université de Liège² (Scopus, CAB Abstracts), (2) la base de données de l'Institut de la Recherche pour le Développement³ (IRD), (3) Google scholar et (4) les ressources documentaires disponibles au niveau de la bibliothèque centrale de Gembloux Agro-Bio Tech. La combinaison des mots clés suivants a été utilisée en français et en anglais : *Afzelia*, doussié, description, botanique, génétique, taxonomie, phylogénie moléculaire, écologie, gestion forestière, marché, commerce.

¹ Detarioideae, d'après la nouvelle classification APG (2017)

² <http://www.bib.fsagx.ac.be>

³ <https://www.mpl.ird.fr/documentation/bureau.html>

2.2. Répartition géographique

La distribution des sept espèces africaines du genre *Azelia* sur le continent africain est reprise à la Figure 1. *A. bipindensis* est une espèce des forêts denses humides sempervirentes et semi-sempervirentes distribuée de la Côte d'Ivoire jusqu'en Angola et en Zambie (Gérard & Louppe, 2011c). Limitée aux forêts sempervirentes, *A. pachyloba* se rencontrerait du Nigéria jusqu'à la République Démocratique du Congo (Gérard & Louppe, 2011d). *A. parviflora*, est également signalée dans les forêts denses humides mais exclusivement le long des côtes s'étendant de la Guinée à la Côte d'Ivoire (Burkill, 1995). Les différentes variétés d'*A. bella*, seraient chacune endémiques de sous-régions précises du centre Guinéo-Congolais. *A. bella*, var. *gracilior* serait une variété typique de forêt dense sempervirente, du sous-centre Guinéen supérieur (Aubréville, 1968). Les deux autres variétés, *A. bella*, var. *glabra* et var. *bella*, seraient présentes uniquement dans le bassin du Congo (Aubréville, 1968). *A. africana* est une espèce qui s'étend des savanes boisées aux forêts sèches, elle pénétrerait aussi dans les forêts denses humides semi-caducifoliées (Satabié, 1994). Elle est inféodée aux habitats plus secs et répandue depuis le Sénégal jusqu'en Tanzanie (Aubréville, 1968 ; Geerling, 1982). Enfin relativement aux deux espèces du centre zambésien, la première, *A. quanzensis*, aurait une aire de répartition qui s'étendrait du sud de la Somalie au nord de l'Afrique du Sud (Brummitt et al., 2007). La deuxième, *A. peturei*, serait géographiquement limitée à la frontière de la RDC et de la Zambie (Brenan, 1967).

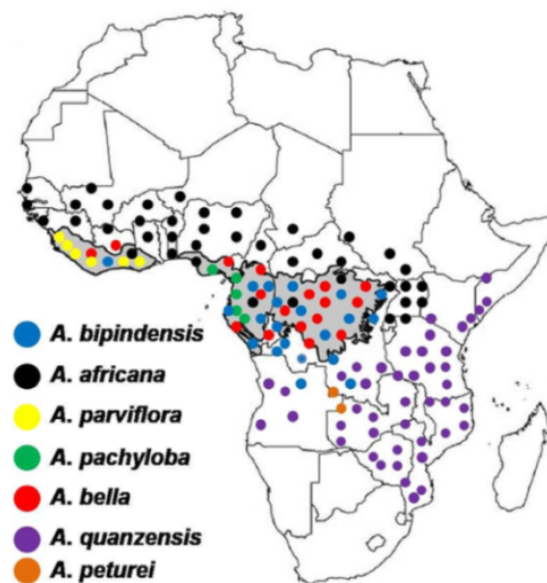


Figure 1. Répartition géographique des sept espèces africaines du genre *Azelia* (carte adaptée d'après la base de données du Conservatoire des Jardins Botaniques de Genève (CJBG), consulté le 06/11/2012 et la carte de White, 1986)

2.3. Systématique du genre *Azelia*

2.3.1. Historique de la taxonomie

Le genre *Azelia* fut proposé pour la première fois en 1792 par le botaniste Gmelin en se référant au spécimen type *A. cassioides* collecté par Adami Afzelii. Quelques années plus tard, Blake révisait le genre en excluant l'espèce *A. cassioides* qui était alors reconnu appartenir au genre *Seymeria* Purch.

Ce n'est qu'en 1798 que Smith a rétabli le genre *Afzelia* en le décrivant sur la base de l'espèce type *A. africana* collecté dans les savanes du Sénégal, sans toutefois clairement l'assigner au rang d'espèce. Il faut attendre l'année 1805 pour que le mycologue Persoon, en réétudiant le spécimen de Smith, décrive complètement l'espèce *Afzelia africana*. Il mentionnait Smith dans son protologue en le citant comme l'auteur initial de cette espèce. Suite à cette première publication valide d'une espèce d'*Afzelia*, plusieurs autres seront décrites ultérieurement : *A. bracteata* par Vogel mais publié par Bentham (1848), *A. quanzensis* par Welwitsch (1859) et *A. microcarpa* par Chevallier (1909). Quatre autres espèces appartenant au même genre seront décrites par un même auteur, Harms (1913) : *A. zenkeri*, *A. bipindensis*, *A. pachyloba* et *A. bella*, toutes définies à partir de spécimens collectés dans les forêts denses humides du bassin du Congo. Enfin, les taxons *A. bequaertii* (De Wildeman, 1925), *A. caudata* (Hoyle, 1933), *A. brieyi* (De Wildeman, 1933), *A. peturei* (De Wildeman, 1935) et *A. parviflora* Vahl (Hepper, 1972) seront décrits à partir de collectes provenant des forêts denses humides du centre Guinéo-Congolais, à l'exception d'*A. peturei* collectée dans les forêts claires zambéziennes. Celle-ci est sans doute le moins documenté des *Afzelia*. Il n'existe quasiment aucune information sur cette espèce à distribution géographique extrêmement limitée (Figure 1) et pour laquelle très peu de spécimens d'herbiers sont disponibles. Si Brummitt et al., (2007) ne remettent pas en cause la spécificité de ce taxon, ils le classe toutefois dans le groupe des "*Data deficient*", précisant qu'il n'existe pas d'information sur ses fleurs et inflorescences, et que des doutes subsistent sur la description des gousses associées à ce taxon. Léonard (1950) aurait différencié ce spécimen des autres *Afzelia* essentiellement sur la base des caractères foliaires (dimension des foliolules et certains traits des pétiolules). Le Tableau 1 présente les noms actuellement validés et/ou reclassés des espèces du genre présentes en Afrique tropicale.

Tableau 1. Liste des espèces du genre *Afzelia* présentes sur le continent africain

Dénominations actuelles acceptées (www.ville-ge.ch/cjb consulté le 07/11/2012)	Synonymes
<i>Afzelia africana</i> Sm, ex Pers (1805)	
<i>Afzelia bella</i> Harms (1913)	<i>Afzelia microcarpa</i> A. Chev (1909)
<i>Afzelia bipindensis</i> Harms (1913)	<i>Afzelia bequaertii</i> De Wild (1925) <i>Afzelia caudata</i> Hoyle (1933)
<i>Afzelia pachyloba</i> Harms (1913)	<i>Afzelia brieyi</i> De Wild (1933) <i>Afzelia zenkerii</i> Harms (1913) <i>Afzelia caudata</i> Hoyle (1933)
<i>Afzelia parviflora</i> (Vahl) Hepper (1972)	<i>Afzelia bracteata</i> Vogel ex Benth.(1848)
<i>Afzelia peturei</i> De Wild (1935)	
<i>Afzelia quanzensis</i> Welw. (1859)	

2.3.2. Caractérisation botanique

La synthèse des principales caractéristiques morphologiques des espèces africaines du genre *Afzelia* a été dressée sur la base des descriptions morphologiques de Smith (1798), Harms, (1913), Chevallier (1940), Hutchinson & Dalziel (1958), Aubréville (1959, 1968, 1970), INEAC (1952), de Saint Aubin (1963), Léonard (1950) et Satabié (1994). Les *Afzelia* sont tous de grands arbres. Les feuilles composées sont paripennées ou subimparipennées dans certains cas, avec la présence de stipules

intrapétiolaires à parties supérieures libres, linéaires, aiguës, caduques et à parties inférieures soudées, formant une pièce épaisse couvrant le bourgeon végétatif. Pourvues de pétioles courts et tordus, les feuilles possèdent généralement 3 à 9 paires de folioles opposées ou subopposées, et un limbe entier dépourvu de ponctuations translucides. Ce sont des arbres hermaphrodites et les inflorescences sont en grappe ou panicule, solitaires, terminales et axillaires de feuilles supérieures. Des bractéoles ovales ou concaves, enveloppent les très jeunes boutons, rapidement caduques ou non. Avec un pédicelle concave, surmonté par un réceptacle long ou très long incluant quatre sépales imbriqués, la fleur présente un grand pétale plus ou moins longuement onguiculé, à limbe légèrement circulaire, bilobé ou sub-entier. Il existe parfois d'autres pétales, mais ils sont alors rudimentaires. La fleur présente également des étamines fertiles (trois à huit), parfois soudées dans leur tiers inférieur, à longs filets. . Les stipes ovariens sont soudés à la paroi du réceptacle et de nombreux ovules sont présents.

Les fruits sont des gousses droites ou réniformes, généralement épaisses, oblongues, s'ouvrant en deux valves ligneuses, lisses, bosselées, sans nervures saillantes, à face interne garnie d'un tissu spongieux dans lequel sont logées les graines. Les graines, de forme ovale ou oblongue et de couleur noire, sont grandes, lisses souvent épaisses, munies d'un arille charnu coloré basilaire.

La clef de la Figure 2 permet de distinguer les espèces. Elle est adaptée de la flore du Congo-Belge (INEAC, 1952).

A. Folioles de 2-6,2 cm de long et de 0,9-2,5 cm de large ; pétioles de 2-4 mm de long ; gousses réniformes :	
I. Ramilles et feuilles pubescentes ; 7-10 paires de folioles ; gousses de 13-20 cm de long et de 9-13 cm de larges ; graines de 3-4,5 (5,5) cm de long, munies d'un arille jaune citron, cupuliforme à ± bilobé, qui enveloppe la graine du 1/4 de sa longueur.....	<i>A. pachyloba</i>
II. Ramilles et feuilles glabres ; 4-7 paires de folioles ; gousses de 9-14 cm de long et de 3,5-7,5 cm de large ; graines de 2-2,6 cm de long ; munies d'un arille orange, profondément bilobé.....	<i>A. peturei</i>
B. Folioles de (3,2) 6-16 cm de long et de (1,2) 2,5-8,5 cm de large ; pétioles de 3-10 mm de long ; gousses droites ou réniformes :	
I. Folioles arrondies, tronquées ou émarginées au sommet ; pétale de 2-4 cm de long ; ovaire à stipe de 8-10 cm de long ; gousses droites ; arille cupuliforme.....	<i>A. quanzensis</i>
II. Folioles ± acuminées parfois obtuses à arrondies au sommet ; ovaire à stipe de 2-4 mm de long ; gousses réniformes ou droites ; arille profondément bilobé ou cupuliforme :	
a. Réceptacle de 0,5-0,6 cm de long ; 3-5 paires de folioles ; pétale de 1,3-1,5 cm de long ; pédicelle de 1,1-1,3 cm de long ; gousses droites ; arille cupuliforme couvrant la graine sur le 1/3 de sa longueur.....	<i>A. africana</i>
b. Réceptacle de 1-2,5 cm de long ; pétale de 3-6,5 cm de long ; gousses réniformes ; arille profondément bilobé :	
1. Arbres ; (4) 5-8 paires de folioles ; pétale de 3-4,5 cm de long et de 2-2,5 cm de large, glabre à la face externe ; gousses de (8) 11-19,5 cm de long et de 5,5-8 cm de large ; graines de 2,5-4,5 cm de long.....	<i>A. bipindensis</i>
2. Arbres ; 3-5 paires de folioles ; pétale de 3-4 cm de long, rouge, rachis de 5,5-15 cm de long ; gousse mesurant de 7-10 cm de long et 4-4,5 cm de large ; graines de 1,5-2,5 cm de long.....	<i>A. parviflora</i>
3. Généralement arbuste ; 3-6 paires de folioles ; pétale de 4-6,5 cm de long et de 2,5-4 cm de large, glabre à la face externe ; gousses de (6) 9-14 (15) cm de long et de 3-6 cm de large ; graines de 2-3,1 cm de long.....	<i>A. bella</i>

Figure 2. Clef d'identification des sept espèces africaines du genre *Azelia*

2.3.3. Le cas particulier des *Afzelia* commerciaux

Généralement quatre espèces d'*Afzelia* africains sont commercialisées et exportées pour leur bois d'œuvre sous le vocable de « doussié » ou « Afzelia » : *A. africana*, *A. bella*, *A. bipindensis* et *A. pachyloba* (Paradis et al., 2011 ; Detienne et al. 1998). A celles-ci s'ajoute occasionnellement *A. quanzensis* (plus souvent appelée « chanfuta » au Mozambique). « Lingue », « apa » ou encore « papao » sont d'autres termes fréquemment utilisés en Afrique de l'Ouest pour désigner les doussiés (Paradis et al., 2011). Dans les paragraphes suivants, nous avons compilé l'ensemble de l'information susceptible de contribuer à la délimitation morphologique des quatre espèces principalement exploitées pour leur bois d'œuvre.

A. africana et *A. bipindensis* sont de grands arbres munis à la base de plusieurs contreforts inégaux, assez épais, à profil légèrement concave. La hauteur moyenne de ces contreforts varie de 1 à 1,50 m, et ils ne s'étendent guère à plus de 1 ou 2 m de l'arbre (Aubréville, 1968). Le fût est assez droit, de longueur variable de 15 à 20 m avec un diamètre moyen à hauteur de poitrine allant de 100 à 180 cm au-dessus des contreforts (de Saint Aubin, 1963). Les deux espèces se différencient principalement par les folioles (plus larges chez *A. africana*) et par l'arille recouvrant les graines (jaune-orangé chez *A. africana* et rouge chez *A. bipindensis*). *A. bella* et *A. pachyloba* seraient un peu moins grands et leur diamètre n'excéderait pas 80 cm. Néanmoins, Gérard & Louppe (2011b) rapportent qu'en Afrique de l'Ouest, *A. bella* pourrait atteindre des dimensions similaires à celles de *A. bipindensis*. Selon Aubréville (1968) et Gérard & Louppe (2011b), cela s'expliquerait par les fortes variabilités intra-spécifiques liées à l'existence des trois variétés susmentionnées chez *A. bella* et dont les gammes de valeurs des traits quantitatifs les distinguant ne sont pas précisées.

Le Tableau 2 synthétise les caractères pouvant servir à déterminer les quatre principales espèces de « doussié ». L'analyse de ce tableau démontre clairement qu'il est difficile de différencier sur le terrain, sur base de caractéristiques végétales la plupart des espèces de « doussié » : les valeurs des traits quantitatifs se recouvrent généralement (folioles, fruits).

Tableau 2. Caractères de différenciation botanique des espèces de « doussié » sur la base de la littérature existante.

Caractères	<i>A. africana</i>	<i>A. bella</i>	<i>A. bipindensis</i>	<i>A. pachyloba</i>	Références
Fût					
Ecorce (aspect)	Gris-roussâtre, épaisse	Brun-clair, lisse ou peu écailleuse	Brun-jaunâtre ou gris rougeâtre	Brune finement craquelée	Harms (1913) ; Aubréville (1959 & 1968)
Rhytidome	Tranche rose, s'exfolie en plaque arrondies	Tranche jaunâtre granuleuse, superficiellement fendillé	Beige, écailleux s'exfoliant en plaque irrégulières	S'exfoliant en laissant des dépressions sinueuses	- de Saint Aubin, (1963) ; INEAC (1952) ; Gérard et al. (1998) ;
Bois	Aubier blanc clair ; bois de cœur orange-brun à brun doré	Bois de cœur orange-brun à brun doré	Aubier brun jaunâtre; le bois de cœur est rouge et plus foncé	Aubier blanc jaunâtre; le bois est brun-rouge	Sallenave (1964 & 1971) ; Vivien & Faure (2011) ; Wilks & Issembé (2000)
Feuilles					
Folioles	3-5 paires	3-6 paires	5-6 paires	7-10 paires	Harms (1913) ; Chevalier (1940) ;
Dimensions (limbe)	6-15 x 3,5-8,5 cm	6-16 x 2,5-7 cm	7-13 x 4,5 cm	2-6 x 1-2 cm	Aubréville (1959 & 1968) ;
Aspect et forme du limbe	Glabre largement elliptique ± acuminé	Glabre, oblong ou oblong-elliptique pointu ou acuminé	Glabre, coriace, oblong elliptique ou ovale obtus	Pubescent dessous, oblong ou oblong lancéolé	Aubréville (1959 & 1968) ; Kadiri & Olowokudejo (2008) ;
Nervures secondaires	7 à 9 paires	7 à 13 paires	Jusqu'à 15 paires	10 à 13 paires	INEAC (1952) ; Vivien & Faure (2011) ; Wilks & Issembé (2000)
Longueur du pétiole (mm)	4-10 mm	3-6 mm	3-7 mm	± 2 mm	
Fleur					
Pédicelle (mm)	1,1-1,3 cm	4-12 mm	5-12 mm	6-9 mm	Harms (1913) ; Aubréville (1959 & 1968) ;
Réceptacle	Tubiné, 5-6 mm de long	Cylindrique, 1-2,7 cm de long	Cylindrique, 1-2,5 cm de long	Cylindrique, 1,5-2 cm de long	INEAC (1952)
Staminodes (2)	5-6 mm de long	6-15 mm de long	3-21 mm de long	± 10 mm de long	
Pétale (aspect et dimensions)	Blanc avec une tâche purpurine au centre ; 0,8-1,2 x 1,3-1,5 cm	Blanc avec une grosse tâche rouge ; 2,5-4 x 4-6,5 cm	Rouge avec une bordure blanche ; 2-2,5 x 3-4,5 cm	Blanc taché de rouge ; 2-2,5 x 3-4 cm	
Fruit					
Gousses (forme et dimensions)	Droite ou à peine courbée; valves lisses ; 5-8 x 12-17 cm	Épaisse, réniforme, valves bosselées ; 4-5 x 10-12 cm	Incurvée, valves bosselées ; 5-9 x 10-15 cm	Incurvée, valves bosselées ; 9-13 x 13-20 cm	Harms (1913) ; Aubréville (1959 & 1968) ; INEAC (1952)
Arille de la graine	Orangé, lobulé, enveloppe de la graine sur 1/3 de sa longueur	Rouge orangé, bilobé, enveloppe la graine sur 2/3 de sa longueur	Orangé avec deux lobes inégaux, enveloppe la graine sur 4/5 de sa longueur	Jaune, lobé sur les bords, enveloppe la graine sur 1/4 de sa longueur	

Les caractères les plus discriminants sont en gras.

La Figure 3 présente les folioles, gousses et graines.

Pour compléter les descriptions botaniques et valider la taxonomie du genre, l'utilisation de marqueurs moléculaires pourrait être particulièrement indiquée (Duminil et al., 2006 ; Koffi et al., 2010 ; Daïnou et al., 2010).

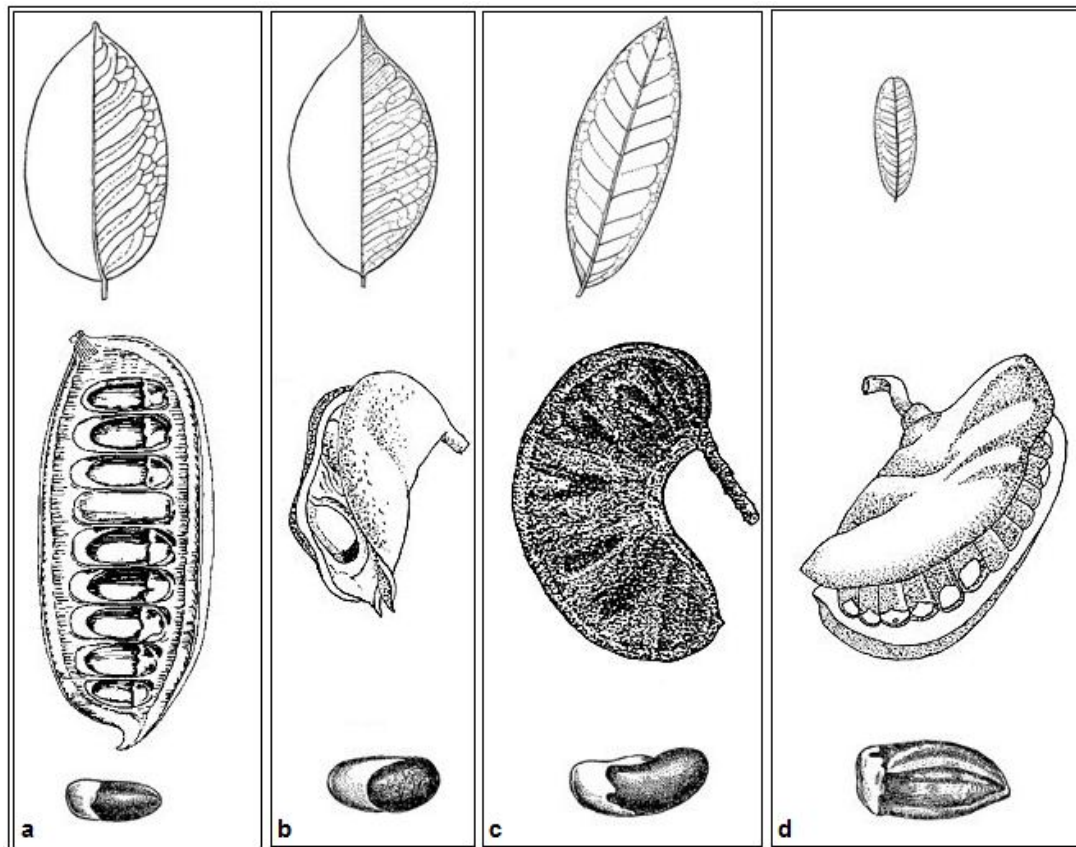


Figure 3. : Morphologie des folioles des gousses et des graines du « doussié » (Adapté de Aubréville, 1959 ; Gérard & Louppe 2011a, b, c, d). a) *Afzelia africana* ; b) *Afzelia bella* ; c) *Afzelia bipindensis* ; d) *Afzelia pachyloba*

2.4. Point sur la phylogénie du genre *Afzelia*

Un certain nombre d'études phylogénétiques ont été menées au niveau des sous-familles, des tribus et des genres des Fabaceae (Breteler, 1995 ; Breteler & Wieringa, 1999 ; Doyle et al., 2000 ; Bruneau et al., 2001 ; Sulaiman et al., 2003). Par exemple, les travaux de Bruneau et al. (2001) ont permis une meilleure définition des relations phylogénétiques entre les genres de la plus grande tribu des Fabaceae, celle des Detarieae à laquelle appartient le genre *Afzelia*. On retiendra notamment que le genre *Intsia* paraît être le plus proche voisin du genre *Afzelia*.

Sur le continent asiatique, des études ont été conduites sur la diversité génétique et les flux de gènes au sein et entre espèces du genre *Afzelia*. Le développement de marqueurs microsatellites nucléaires sur *A. xylocarpa* (Pakkad et al., 2009) et l'existence des marqueurs chloroplastiques polymorphes (Thanh et al., 2012) ont contribué à l'étude de la diversité génétique de cette espèce. Par contre, aucune étude n'a été menée sur les niveaux de différenciation moléculaire au sein du genre.

2.5. Origine et source de diversification probable du genre *Afzelia*

Plusieurs études polliniques et paléobotaniques (Lezine, 2007) ont montré le rôle des changements climatiques passés dans la composition floristique, la structure et la répartition géographique actuelle des forêts tropicales (Vincens et al., 1999 ; Lezine, 2007). Ces perturbations climatiques ont sans doute eu des impacts bien caractérisés sur les forêts denses humides tropicales (Dainou et al., 2010). En observant la distribution actuelle des espèces d'*Afzelia* qui se trouvent dans des écosystèmes relativement distincts (Figure 1), on se rend compte que leurs aires se chevauchent en général. La forte similitude morphologique de ces espèces pourrait être liée à une origine relativement récente (Dainou et al., 2011 ; Biwolé et al., 2012). Toutefois, il est peu probable que ce soit effectivement le cas, Pan et al. (2010) estimant que le genre serait apparu lors de l'Oligocène, vers 27.23 Ma.

Un concept largement débattu dans l'évolution des espèces est celui de « zones de refuges », c'est-à-dire de régions où une espèce a pu se maintenir durant les périodes climatiques qui lui étaient défavorables. Pour les espèces des forêts d'Afrique équatoriale, de tels refuges durant les maximums glaciaires du Pléistocène ont été initialement proposés par Maley (1996). Ces refuges ont dû avoir un impact majeur sur l'organisation de la diversité génétique des espèces, voire sur leur spéciation allopatrique, pour autant que les tailles de population aient été fort réduites et que la période inhérente à l'apparition des zones refuges ait été suffisamment longue. Cependant, d'autres processus de différenciation et spéciation, notamment en réponse à des pressions de sélection différentielles le long de gradients écologiques, mériteraient d'être testés (Reiseberg & Willis, 2007).

2.6. Ecologie de reproduction des *Afzelia* : cas particulier des « doussié »

Avant d'aborder le cas spécifique des « doussié », il est important de souligner que c'est l'espèce zambézienne *A. quanzensis* qui a été la mieux étudiée, probablement en raison de sa distribution dans des pays où la dynamique de recherche scientifique est plus importante (du Kenya à l'Afrique du sud). Une abondante littérature décrit les traits reproductifs de l'espèce (par exemple Chidumayo, 1992 ; Gerhardt & Todd, 2009). Parmi les quatre espèces de « doussié », c'est *A. africana* qui a fait l'objet de la plupart des recherches, vraisemblablement suite à une aire de répartition très large (Figure 1).

2.6.1. Exigences abiotiques globales

Les quatre espèces de « doussié » semblent avoir des tolérances écologiques assez distinctes, malgré le fait que certaines soient distribuées en sympatrie. *A. africana* serait caractéristique de la zone de transition entre les régions soudaniennes et Guinéo-Congolaises (Ahouangonou & Bris, 1995 ; Gérard & Louppe, 2011a). C'est une espèce qui présente une grande adaptation aux conditions climatiques, mais elle préfère les zones où la pluviométrie est supérieure à 900 mm. Elle serait présente jusqu'à 1400 m d'altitude en Afrique Centrale. Dans les régions plus sèches, elle a la réputation d'être assez résistante aux feux (Onana, 1998 ; Gérard & Louppe, 2011a). On la trouve dans les savanes boisées soudaniennes, aussi bien en terrain sec que dans les galeries forestières (Aubréville, 1959). Elle se retrouverait aussi dans certaines forêts denses mais en très faible densité, probablement au sein de peuplements résultant de colonisations de savane.

A. bipindensis se rencontrerait en forêts denses humides sempervirentes et semi-sempervirentes jusqu'à 900 m d'altitude. *A. pachyloba* serait par contre inféodée aux seules forêts sempervirentes et ne dépasserait pas 200 m d'altitude. Toutes deux se développeraient dans des forêts plus ou moins secondarisées, essentiellement sur des sols bien drainés (Gérard & Louppe, 2011c et d ; Letouzey, 1968 ; Léonard, 1950). *A. bella* quant à elle serait habituellement inféodée aux forêts humides sempervirentes et semi-décidues sur des sols argileux, mais aussi en bordure de rivière, à la limite de la mangrove et dans les endroits légèrement marécageux (Satabié, 1994 ; Hawthorne & Jongkind, 2006).

2.6.2. Phénologie, croissance et régénération naturelle

Les espèces de « doussié » en général seraient fertiles dès 20 cm de diamètre à hauteur de poitrine (Doucet, comm. pers.). Compte tenu des caractéristiques des fleurs (typique des caesalpinioideae) et des graines (présence d'un arille), le genre est probablement entomophile et zoochore (Gautier-Hion et al., 1985 ; Bationo et al., 2001).

Les arbres d'*A. africana* fleurissent normalement en petite saison pluvieuse, de mars à avril au Bénin, (Ahouangonou & Bris, 1995) et les chauves-souris consomment parfois les fleurs. La période de fructification dure six à huit mois (Figure 4) et les fruits peuvent subsister sur l'arbre pendant les six mois suivants (Bationo et al., 2001 ; Ouédraogo-Koné et al., 2008). La germination est épigée (Onana & Devineau, 2002). La régénération naturelle de l'espèce semble plus abondante en zone soudanienne (Ouédraogo et al., 2006) qu'en zone Guinéenne (Bonou et al., 2009). Ce sont les oiseaux, principalement les calaos et les rongeurs (*Proechimys* spp.) qui dissémineraient les graines d'*A. africana* (Bationo et al., 2001 ; Gérard & Louppe, 2011a).

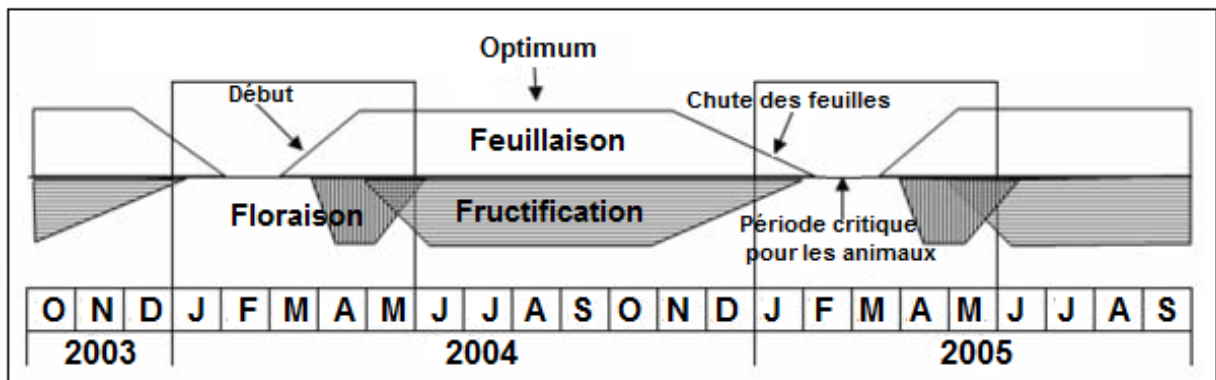


Figure 4. Phénologie d'*A. africana* au Sud du Burkina-faso (Adaptée d'après Ouédraogo-Koné et al., 2008)

L'écologie de reproduction des *Azelia* de forêts denses humides demeure très peu étudiée. Seules des informations très ponctuelles concernant les phénophases de ces espèces sont disponibles. Au Ghana, *A. bella* fleurirait en début de saison sèche (novembre), avant la défeuillaison, et les fruits mûriraient vers la fin de la saison sèche (Hawthorne & Jongkind, 2006). Au Gabon, la floraison et la fructification d'*A. pachyloba* auraient lieu en saison sèche ; les fleurs s'épanouiraient en décembre-janvier et les gousses mûriraient en janvier-février. C'est pendant cette période que les arbres perdent

en partie leurs feuilles (Chevalier, 1940). *A. bipindensis* serait plutôt relativement tolérante à l'ombrage, l'espèce ne présentant pas de déficit de régénération en forêt naturelle.

2.7. Valeur sociale et économique des *Afzelia* : cas spécifique des « doussié »

2.7.1. Importance sociale

Outre la bonne qualité de son bois, le « doussié » présente également d'intéressantes propriétés médicinales et agroforestières, tout en jouant un rôle culturel et mystique non négligeable. Le Tableau 3 montre une synthèse des différents usages des espèces de « doussié ».

Tableau 3. Importance sociale locale du « doussié » en Afrique tropicale

Parties utilisées de l'arbre	Usages			
	<i>A. africana</i>	<i>A. bella</i>	<i>A. pachyloba</i> (doussié blanc)	<i>A. bipindensis</i> (doussié rouge)
Arbre	Utilisés dans les systèmes agroforestiers, arbre fétiche	-	-	-
Bois	Fabrication de pirogues, ustensiles de cuisines, mortiers, tambours, bois de feu, charbon de bois, brosse à dent	Objets d'art et de musique, outils agricoles, manches d'outils, production de charbon de bois	Objets d'art et de musique, outils agricoles, manches d'outils, bois de feu	Objets d'art et de musique, outils agricoles, manches d'outils, bois de feu, production de charbon de bois
Sève (gomme)	Galactogène	-	-	-
Ecorce	Constipation, fièvre, vomissements, œdèmes, tachycardie, hypertension, bronchite, affections pulmonaires, antalgique, diurétique, galactagogue et aphrodisiaque	Maladies de peau, parasites intestinaux, diarrhée, trouble de menstruation, hémorroïdes et de rhumatismes, et comme tonique	-	Maux d'estomac
Feuilles	Légumes, fourrages	-	-	-
Fleurs	Condiments	-	-	-
Fruits	Castagnettes, aphrodisiaque, lèpre	-	-	-
Graines	Production d'huile, collier, parure ornementale et religieuse	-	Production d'huile qui sert à la cuisine et la production du savon	-
Tourteaux de graines	-	-	Nourriture du bétail	-
Arille (graine)	Comestible car sucré	Comestible car sucré	Comestible et serait sucré, appliqué sur la peau gercée	Lèvres gercées
Racine	Douleurs d'estomac, convulsions, trypanosomes, hernie, et sert d'antidote, poison de flèche	-	Application externe pour les douleurs rénales	-
Références	Katende et al. (1995) ; Houehanou et al. (2011) ; Igwenyi et al. (2011) ; Onweluzo et al. (1995) ; Gérard & Louppe (2011a)	Oteng-Amoako (2006) ; Neuwinger (2000) ; Assi et al. (1985) ; Gérard & Louppe (2011b)	Neuwinger (2000) ; Gérard & Louppe (2011d)	Gérard & Louppe (2011c)

- : Pas d'informations

2.7.2. Importance industrielle et commerce international du bois

Le « doussié » est un bois très stable, caractérisé par de faibles retraits linéaires de séchage (retrait radial et retrait tangentiel), un faible point de saturation des fibres, et une faible sensibilité aux variations de l'état hygrométrique (Normand, 1950 ; Normand & Paquis, 1976, Paradis et al., 2011). Cette très bonne stabilité couplée à de bonnes propriétés mécaniques font apprécier cette essence pour de nombreux emplois, entre autres pour la construction de charpentes, ponts, portes d'entrée, fermetures extérieures, fenêtres, portes-fenêtres, portes intérieures, escaliers, parquets, portes coupe feu et aménagements intérieurs. Sa très bonne durabilité naturelle vis-à-vis des champignons de pourriture, des insectes de bois sec et des termites place le Doussié parmi les meilleures essences pour des emplois extérieurs exposés, au même titre que l'Ipé (*Handroanthus spp.*), le Merbau (*Intsia bijuga*), ou le Teck (*Tectona grandis*). Il est également très apprécié et a souvent été utilisé de façon préférentielle pour la construction de pistes de vélodrome (CTFT, 1963 & 1980). Une étude réalisée sur les caractéristiques physiques et mécaniques du bois des « doussiés » (CTFT, 1980) a révélé que les principales espèces d'*Azelia* ont des bois aux propriétés voisines qui les rendent adaptés à une très large gamme d'emplois. A une humidité de 12%, la masse volumique moyenne des bois est proche de 800 kg/m³, ce qui les classe à la limite des bois mi-lourds et lourds. Quelques différences ont toutefois été notées entre les espèces (Tableau 4 ; CTFT, 1980). En général, le bois est dur et légèrement abrasif, nécessitant un matériel particulièrement puissant pour son sciage. Pour les travaux de rabotage, moulurage, tenonnage, mortaisage, perçage et ponçage, le bois se travaille très bien en raison d'une teneur en silice négligeable.

Tableau 4. Caractères distinctifs du bois des différentes espèces de « doussié » (CTFT, 1980).

Caractères	<i>A. bipindensis</i>	<i>A. africana</i>	<i>A. pachyloba</i>	<i>A. bella</i>
Masse volumique à 12% d'humidité du bois (kg/m ³)	840	790	750	700
Retrait volumique total (%)	7,7	8,2	9,2	7
Résistance du bois à la rupture en flexion dynamique	Moyenne		Peu résistante	
Taux d'extrait aux solvants du bois	12 à 23%	7,5 à 12%		

Actuellement dans le commerce international du bois, seules les espèces *A. bipindensis* et *A. pachyloba* sont officiellement mentionnées. Le « doussié » est exporté essentiellement sous forme de sciages et de parquet dont la production au Cameroun est montrée par la Figure 5. Il ressort de l'analyse de la Figure 5 que la production de sciage a fortement diminué ces dernières années, passant de 47.745 m³/an en 2005 à 11.309 m³/an en 2011. Cette diminution pourrait s'expliquer par

une raréfaction de la ressource. Des études plus poussées sont toutefois nécessaires afin de mieux comprendre cette tendance évolutive.

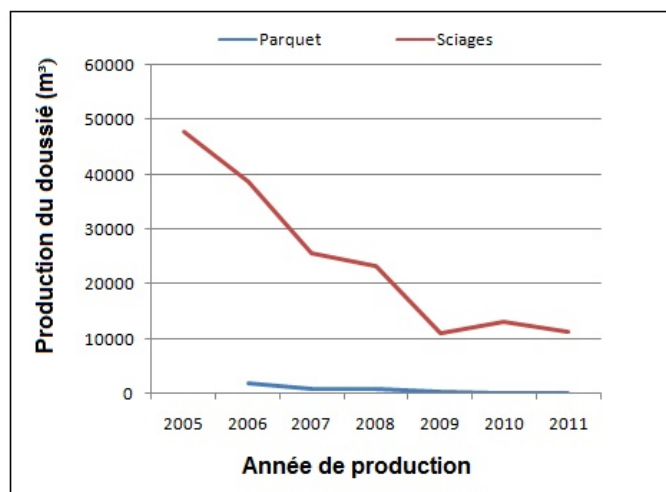


Figure 5. Evolution de la production de sciages et de parquets du « doussié » au Cameroun de 2005 à 2011 (Source : ATIBT, 2006 ; ATIBT, 2007 ; ATIBT, 2008 ; ATIBT, 2009 ; ATIBT, 2010 ; ATIBT, 2012) –

De 2005 à 2011, les sciages et parquets de « doussié » ont surtout été exportés par le Cameroun qui est le premier pays africain exportateur de bois. Les principaux importateurs sont : l'Italie (en moyenne 7.416 m³/ an), la Belgique (6.410 m³/ an), le Portugal (3.413 m³/an) et la France (3.351 m³/an).

2.8. Conservation et gestion des populations du « doussié »

2.8.1. Pressions anthropiques sur les populations du « doussié »

A. africana subit une forte pression pour la production de fourrage dans de nombreux pays (Sinsin et al., 2004 ; Ouédraogo et al., 2006). Elle est jugée comme une ressource menacée au Mali, au Burkina Faso, au Nigeria, au Cameroun (Gérard & Louppe, 2011a), et particulièrement au Bénin où elle se fait de plus en plus rare (Sinsin et al., 2004 ; Bonou et al., 2009). *A. bipindensis*, *A. pachyloba* et *A. bella* sont exploités industriellement dans le Bassin du Congo (ATIBT, 2010), mais aucune donnée n'existe sur l'impact de cette exploitation sur l'état des ressources génétiques.

2.8.2. Mesures légales en matière d'aménagement et de gestion des ressources forestières

L'exploitation forestière en Afrique Centrale étant soumise à une législation stricte, les espèces ne peuvent être exploitées qu'au-delà d'un certain diamètre et des mesures doivent être prises pour assurer le renouvellement de la ressource (Fargeot et al., 2004). En effet, les plans d'aménagement des forêts tropicales humides nécessitent de déterminer un diamètre minimum d'exploitation (DME) assurant un taux de renouvellement minimal au terme d'une période de rotation (durée entre deux coupes sur une même parcelle) déterminée, le taux de reconstitution minimal (40-50% suivant les pays) ainsi que la durée de rotation étant imposés par la législation forestière (Durrieu de Madron & Forni, 1997).

Au Cameroun, d'après la législation forestière de 1994, le DME d'*A. bipindensis*, d'*A. pachyloba* et d'*A. africana* est de 80 cm tandis qu'il est de 50 cm pour *A. bella*. L'adéquation de telles mesures avec le maintien des niveaux actuels de diversité ne peut être évaluée qu'en connaissant l'écologie reproductive des espèces de « doussié ». En particulier, le DME devrait être confronté au diamètre de fructification de l'espèce afin de mesurer l'impact de l'exploitation sur la population reproductive, et donc sur la régénération de l'espèce. Or, de telles données demeurent quasi inexistantes pour le "doussié". Les densités de populations de « doussié » sont relativement faibles en zone de forêt semi-sempervirente camerounaise (0,3 tige / ha selon Fétéké et al., 2008 pour des tiges de diamètre ≥ 20 cm). Cette caractéristique pourrait laisser présager de distances de flux de gènes importantes. Si ces taxons subissent actuellement une importante exploitation forestière, l'impact de celle-ci sur la diversité génétique et la survie à long terme des populations pourrait s'avérer importante. La connaissance de l'étendue réelle des flux de gènes pour un tel scénario est donc primordiale.

2.9. Conclusion et perspectives

De cette synthèse bibliographique, il ressort globalement que le genre *Afzelia* reste peu étudié, surtout en Afrique Centrale. Si la description morphologique des espèces associées à l'utilisation des clés de détermination systématique permettent une ordination et une identification de ces espèces, des études génétiques (sur base de marqueurs moléculaires) restent cependant indispensables pour vérifier si ces espèces répondent au concept biologique de l'espèce (entité reproductive isolée), caractériser les éventuels hybrides et inférer l'impact de l'exploitation sur les niveaux de diversité des populations.

Alors que des efforts de recherche ont été menés en zones soudanienne et zambézienne respectivement sur *A. africana* et *A. quanzensis*, les espèces de la zone Guinéo-Congolaise demeurent peu étudiées bien qu'elles soient intensivement exploitées comme bois d'œuvre (*A. bipindensis*, *A. pachyloba* et *A. bella*). Notre analyse fait ressortir la nécessité d'approfondir les connaissances relatives à :

- la différenciation du genre *Afzelia* tant au niveau interspécifique (phylogénie) qu'au niveau intraspécifique (phylogéographie), via des outils morphologiques et génétiques ;
- l'autécologie et les traits d'histoire de vie des espèces de forêts denses humides d'Afrique Centrale ;
- l'influence de l'exploitation forestière et des traits de vie sur la diversité génétique des populations de ces espèces.

CHAPITRE 3

MICROSATELLITE DEVELOPMENT AND FLOW CYTOMETRY IN THE AFRICAN TREE GENUS *AFZELIA* (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEA) REVEAL A POLYPLOID COMPLEX

Le chapitre précédent a mis en évidence des espèces morphologiquement très proches, de même que l'inexistence de marqueurs génétiques disponibles pour étudier l'histoire évolutive du genre *Afzelia*. Le présent chapitre tente d'y remédier en s'attendant à la caractérisation et à la définition de 11 marqueurs microsatellites polymorphes tout en estimant les niveaux de ploïdie des espèces d'*Afzelia*. Ce chapitre a été publié sous la référence :

Donkpegan A.S.L., Doucet J-L., Daïnou K. & Hardy O.J. (2015). Microsatellite development and flow cytometry in the African tree genus *Afzelia* (Fabaceae, Caesalpinioidea) reveal a polyploid complex. *Applications in Plant Sciences*, **3** (1), 1400097.

« Il y a toujours quelques individus que le hasard isole, ou que la génétique favorise »

Ronald Wright

3. Microsatellite development and flow cytometry in the African tree genus *Afzelia* (Fabaceae, Caesalpinioideae) reveal a polyploid complex

Abstract

Premise of the study: Microsatellites were developed in the vulnerable African rainforest tree, *Afzelia bipindensis*, to investigate gene flow patterns.

Methods and Results: Using 454GS-FLX technique, 16 primer sets were identified and optimized, leading to 11 polymorphic and readable markers displaying each 6 to 25 alleles in a population. Up to four alleles per individual were found in each of the loci, without evidence of fixed heterozygosity, suggesting an autotetraploid genome. Cross-amplification succeeded for all loci in the African rainforest species *A. pachyloba* and *A. bella*, that appeared tetraploid, and for most loci in the African woodland species *A. africana* and *A. quanzensis*, that appeared diploid, while it failed in the Asian species *A. xylocarpa*. Flow cytometry confirmed the suspected differences in ploidy.

Conclusions: African *Afzelia* species are diploid or tetraploid, a situation rarely documented in tropical trees. Our microsatellites will help studying their mating system and gene flow patterns.

Key words: *Afzelia*; Leguminosae-Caesalpinioideae; microsatellites; NGS; polyploidy; tropical timber tree.

3.1. Introduction

The African tree *Azelia bipindensis* Harms (Fabaceae-Caesalpinioideae) is an hermaphrodite Guineo-Congolese species of moist forests distributed from Ivory Coast to Angola and Zambia, up to 900 m elevation (Gérard *et al.* 2011; Donkpegan *et al.* 2014). Commonly called "red doussié", it is registered as vulnerable on the IUCN Red List (International Union for the Conservation of Nature), because it is substantially exploited for the international wood market. Other African *Azelia* include the rainforest species *A. bella* Harms, *A. pachyloba* Harms and *A. parviflora* (Vahl) Hepper, and the dry forest and woodland species *A. africana* Sm, ex Pers and *A. quanzensis* Welw. All these species are of economic importance and undergo significant exploitation. Most of these species can occur in sympatry or in parapatry and some of them are botanically similar. Therefore, thorough investigations of gene flow patterns within and among *Azelia* populations are necessary for conservation and sustainable management purposes. To this end, we developed polymorphic microsatellite markers on *A. bipindensis* and tested them on other African and Asian congeneric species. As the number of alleles found per individual suggested that some species are polyploid, flow cytometry was used to compare the ploidy levels of species for which fresh leaves were available.

3.2. Methods and results

3.2.1. Microsatellite development

A DNA bank enriched in microsatellites markers was developed from an equimolar mix of genomic DNA extracts from four species, including *A. bipindensis*, using the 454GS-FLX platform according to the protocols of Malausa *et al.* (2011) and Micheneau *et al.* (2011). The software QDD (Megléczy *et al.* 2010) detected 635 loci containing a microsatellite formed by at least five repeats, and surrounded by flanking regions adequate to define PCR primers. From these, we selected 71 loci containing perfect (*i.e.* not compound) microsatellites with at least nine dinucleotide (or trinucleotide for two loci) repeats and with primers situated at least 20bp from the microsatellite region. We also considered the primers of eight microsatellite loci defined on *A. xylocarpa*, an Asian species (Pakkad *et al.* 2008). Following Micheneau *et al.* (2011), for ordering primers (71+8=79 pairs), we added to the 5' end of the forward primer of each locus one of four possible linkers (Q1 to Q4) allowing to label the PCR products with a fluorochrome ("M13" protocol). These pairs of primers were tested individually on *A. bipindensis* samples using the following PCR conditions: a reaction volume of 15 µL containing 1.5 µL of Buffer (10X), 0.6 µL of MgCl₂ 25 mM, 0.45 µL of dNTPs (10 mM each), 0.3 µL of each primer (0.2 mM), 0.08 µL of DNA polymerase TOPTAQ 5 U/µL (QIAGEN, Venlo - Netherlands), 1.5 µL of Coral Load, H₂O and 1.5 µL of DNA extract. The amplification reactions were carried out using the MJ Research PTC-200 Thermal Cycler using the following program: 4-min initial denaturation at 94 °C, followed by 30 cycles of denaturation / annealing / extension (94 °C for 30 s, 52 or 55 °C for 45 s, 72 °C for 1 min). The final elongation step was at 72 °C for 10 minutes. The PCR products were visualized on a 1% agarose gel and stained with SYBR Safe (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). DNA extracts were obtained using the NucleoSpin Plant kits (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Table 1. Characterization of 11 polymorphic nuclear microsatellite loci isolated from *Afzelia bipindensis* and tests of cross-amplification in polymorphic loci.

Locus	Primer sequence (5'-3')	Labeled primer	Repeat motif	Ta(°C)	Successful cross-amplification*	GenBank accession n°
R9-48†	F: TTCCACCAGAGAACAATCACA R: AAGGAAAGACAATGTTAGACTGGA	Q4-PET	(AC)12	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i> , <i>A. afr</i> , <i>A. qua</i>	KP076432
R9-01‡	F: CACTCTTTCTTCCTTTTCAACCA R: AAGATTGAAGCTTGAAAATTCACC	Q1-6-FAM	(CT)11	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i> , <i>A. afr</i> , <i>A. qua</i>	KP076434
R9-07‡	F: GCAAAGACACGCAAACCTGAA R: TTCGATAAACCGATCCATGTC	Q4-PET	(AG)10	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i> , <i>A. afr</i> , <i>A. qua</i>	KP076426
R9-19†	F: TGTGATAGGAAGTGAGATTGCG R: TGTATAAGACAAAGACCCACCTT	Q2-NED	(CT)10	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i> , <i>A. afr</i> , <i>A. qua</i>	KP076435
R9-51‡	F: CAAATGCTCAAATGACTAACCA R: GCAATTCAATGATGTCTTGCTT	Q2-NED	(AC)13	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i>	KP076436
R9-73‡	F: CAGTCACACCTGCTTTTCAGC R: CCAACAATCAAATCACTCATCG	Q1-6-FAM	(CT)9	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i>	KP076430
R9-65†	F: CGAAAGTAAGAACCGTGCAA R: AACAGGTAATGAAAGCAAAGGG	Q1-6-FAM	(CA)9	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i> , <i>A. afr</i> , <i>A. qua</i>	KP076431
R9-61†	F: TCAAGGGATGACTTGGCTTT R: GAGAAAGACAGCTTAATTTTACCCC	Q2-NED	(TC)10	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i> , <i>A. afr</i> , <i>A. qua</i>	KP076424
R9-54‡	F: TCCCTTACCAAATTTGTGAACAT R: CCCGTTGGTTTCAGTAGCAAT	Q4-PET	(GA)11	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i>	KP076425
R9-53‡	F: TTAATCGAGCTTAGTCGAGC R: GACTCAAGAGAAGCAAGCTAAGA	Q3-VIC	(TC)10	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i>	KP076433
R9-60‡	F: CTTTCCCTCCTTTCTTTCAA R: GTTATGCTAGACATTTAATCCC	Q2-NED	(TC)9	57	<i>A. pach</i> , <i>A. bel</i> , <i>A. afr</i> , <i>A. qua</i>	KP076427

*All loci are polymorphic for these species except R9-48, R9-07 and R9-60 which are monomorphic for *A. quanzensis* and R9-19 for *A. africana*, considering these samples ; (†Mix1, ‡ Mix2); *A. pach*=*A. pachyloba*, *A. bel*=*A. bella*, *A. afr*=*A. Africana*, *A. qua*=*A. quanzensis*; Q1=TGTAACGACGGCCAGT (Schuelke 2000); Q2=TAGGAGTGACGCAAGCAT; Q3=CACTGCTTAGAGCGATGC Q4=CTAGTTATTGCTCAGCGGT (Q2-Q4, after Culley *et al.* 2008); Ta, annealing temperature in °C

Two of the eight loci developed for *A. xylocarpa* amplified on *A. bipindensis* samples but resulted in illegible multi-peak band patterns, so that none was kept. For the new microsatellite bank, 16 primer pairs amplified consistently on *A. bipindensis* samples and were tested again to assess their levels of polymorphism in seven individuals of *A. bipindensis* from Cameroon, Gabon and the Republic of Congo. Fluorescent labeling was performed via amplification with: the reverse primer, the forward primer with a Q1–Q4 universal sequence at the 5' end, and a Q1–Q4 primer labeled with 6-FAM, NED, VIC, and PET, respectively (Schuelke 2000; Micheneau *et al.* 2011). PCR conditions were identical to those we mentioned before, but the Q-tailed forward primer was used at one-third the amount (0.7 µM) of the reverse and fluorescently labeled primers (2 µM). PCR conditions were: 94 °C (4 min), followed by 25 cycles each at 94 °C (30 sec), 55 °C (45 s), 72 °C (1 min), more 10 cycles each at 94 °C (30 s), 53 °C (45 s), 72 °C (45 s), and a final extension at 72 °C for 10 min.

Table 2. Characterization of the polymorphism of nuclear microsatellite loci in a sample of 42 individuals of *Afzelia bipindensis* from Eastern Cameroon and 39 individuals of *Afzelia africana* from North Benin

Species	Locus	Allele sizes (bp)	<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>	<i>He(Cd)</i>	<i>F(Cd)</i>
<i>A. bipindensis</i>								
	R9-48	151-170	14	0.54	0.80	0.32***	0.75	0.27***
	R9-01	84-132	18	0.56	0.84	0.34***	0.79	0.29***
	R9-07	102-129	14	0.51	0.73	0.30***	0.68	0.25***
	R9-19	111-150	14	0.54	0.60	0.10***	0.56	0.04***
	R9-51	154-172	11	0.60	0.84	0.29***	0.79	0.23***
	R9-73	223-243	8	0.22	0.30	0.28***	0.28	0.22***
	R9-65	210-218	6	0.50	0.69	0.28***	0.64	0.22***
	R9-54	193-239	25	0.53	0.83	0.37***	0.78	0.32***
	R9-61	188-270	20	0.70	0.91	0.23***	0.85	0.17***
	R9-60	185-228	21	0.79	0.83	0.04***	0.77	-0.02***
	R9-53	182-225	13	0.35	0.87	0.59***	0.81	0.57***
<i>A. africana</i>								
	R9-48	150-166	5	0.51	0.76	0.33*		
	R9-01	86-151	13	0.87	0.87	-0.01		
	R9-07	105-128	5	0.1	0.1	-0.02		
	R9-19	88-140	1	0	0	0		
	R9-65	199-226	9	0.72	0.78	0.08		
	R9-61	195-204	4	0.57	0.73	0.22*		
	R9-60	174-214	11	0.62	0.8	0.23*		

Na, number of alleles; *Ho*, observed heterozygosity; *He*, expected heterozygosity (assuming chromosome segregation in the tetraploid *A. bipindensis*); *He(Cd)*, expected heterozygosity assuming chromatid segregation; *F*, fixation index. For *F* and *F(Cd)*, significance for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium: * ($P < 0.05$), *** ($P < 0.001$).

After excluding loci that did not amplify or were unreadable, we selected 11 polymorphic loci. They were combined in two multiplexed reactions (Table 1) using MULTIPLEX MANAGER 1.0 software (Holleley & Geerts, 2009). Preliminary population genetics analyses were performed on 42 individuals from a *A. bipindensis* population from eastern Cameroon (**Appendix S1**). Multiplexed PCR's were carried out using the Type-it Microsatellite PCR Kit (QIAGEN) as follows: 7.5 μ L multiplex Master Mix, 0.1 μ L (0.07 mM) of forward primer and 0.15 μ L (0.1 mM) of reverse primer labeled by Q-tailed fluorescent Q1 to Q4, H₂O and 1.5 μ L of DNA extract. Multiplex PCR programs consisted of: 95 °C (5 min), followed by 20 cycles at 95 °C (30 sec), 57 °C (90 sec), 72 °C (30 s), then 8 cycles at 94 °C (30 s), 53 °C (45 s), 72 °C (45 s), and a final extension step at 60 °C (30 min). 0.8 mL of each PCR product was directly added to 12 μ L of Hidi formamide and 0.3 μ L of Radian DYE size standard and genotyped on an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, Lennik, Netherlands). Results were analyzed using two programs: Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems) and GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems). Some read errors were corrected manually.

The eastern Cameroon population of *A. bipindensis* revealed a high degree of polymorphism with the number of alleles per locus ranging from 6 to 25 (average of 14.9 alleles per locus; Table 2). We

noticed that the number of alleles per individual and locus ranged from 1 to 4, suggesting a tetraploid genome. As single-locus genotypes did not show fixed heterozygosity at any locus, *A. bipindensis* would be a priori an autotetraploid.

3.2.2. Cross-amplification in congeneric species and ploidy determination

All the 11 loci successfully amplified on *A. bella* (N=5), *A. pachyloba* (N=5) and seven amplified in *A. africana* (N=39) and *A. quanzensis* (N=19) [see **Appendix S1**]. In *A. bella* and *A. pachyloba*, all these loci were polymorphic and the observed genotypes presented up to four alleles per locus and individual, indicating that these species are probably tetraploid. By contrast, *A. africana* and *A. quanzensis* individuals never displayed more than two alleles per locus, suggesting diploid genomes.

To confirm whether *Afzelia* species have different ploidy levels, we relied on flow cytometry, a convenient and rapid method for estimating the size of the nuclear genome. The fresh material used was obtained through seeds from five species collected in Southwest Cameroon for *A. bipindensis*, northwestern Cameroon for *A. bella*, north-east of Benin for *A. africana*, northern Zimbabwe for *A. quanzensis* and northern Thailand for *A. xylocarpa* (**Appendix S1**). These seeds were planted in a greenhouse in order to collect fresh leaves for our analyses. Flow cytometry was carried out using a Ploidy Analyser equipment from PARTEC (Munster - Germany). Nuclear suspensions of leaf cells were obtained from 1 cm² fresh leaves lacerated with a razor blade in a buffer solution using the CyStain® UV Precise P kit (PARTEC), following the manufacturer protocol. This kit uses DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate), a blue fluorescent stain that preferentially binds double stranded DNA with A-T nucleotides. We used as internal standard either pea, *Pisum sativum* L. "Express Long" (genome size 2C value = 8.37 pg, 49.5% GC) or tomato, *Solanum lycopersicum* L. "Montfavet 63-5" (2C = 1.99 pg, 40.0% GC; Marie & Brown 1993). Each sample was first analyzed alone to identify its fluorescence intensity profile and then analyzed with an internal standard to measure their ratio of mean cell fluorescence intensities, which is approximately proportional to their C values ratio, at least if the GC contents of species are similar.

Our genome size estimates (2C values) ranged from 4.9 to 5.3 pg in *A. africana* (n=3), 5.0 pg in *A. quanzensis* (n=1), 4.3 to 4.4 pg in *A. xylocarpa* (n=2), 9.9 pg in *A. bipindensis* (n=3), and 8.5 to 9.6 pg in *A. bella* (n = 2). For a same species, estimates were usually a bit larger using pea as internal standard rather than tomato. Although these 2C estimates should be considered with caution given that the CG content of *Afzelia* species is unknown, their relative values clearly show that the genome size of *A. bipindensis* and *A. bella* is nearly the double of the genome size of *A. africana*, *A. quanzensis* and *A. xylocarpa*. This was confirmed when analyzing together *A. bipindensis*, *A. bella* and *A. africana* in the flow cytometer which then displayed two peaks with a ratio of fluorescence intensity of 1.9. Hence, together with the microsatellite profiles, the flow cytometry results confirm that *Afzelia* forms a polyploid complex, with *A. africana*, *A. quanzensis* and *A. xylocarpa* being diploid while *A. bipindensis*, *A. bella* and *A. pachyloba* are tetraploid.

3.2.3. Population genetics parameters in the tetraploid *A. bipindensis* and the diploid *A. africana*

For *A. bipindensis* we considered the 42 individuals from a population from Eastern Cameroon (see above) and calculated heterozygosities assuming autopolyploidy, using the software AUTOTET (Thrall & Young 2000). In autotetraploids, multiple levels of heterozygosities can occur at a single locus because a genotype can contain 1 to 4 alleles, and a genotype with just 2 or 3 alleles can present different allelic dosages (1:3, 2:2 or 3:1 for 2 alleles; 1:1:2, 1:2:1 or 2:1:1 for 3 alleles). Defined as the probability that a random pair of gene copies bears different alleles within individual, the observed heterozygosity is 0 for a genotype AAAA, 0.5 for AAAB, 0.667 for AABB, 0.833 for AABC, and 1 for ABCD. The allelic dosage could be estimated based on the ratios between peak intensities following Esselink *et al.* (2004). The expected heterozygosity (H_e) under random mating was computed separately under either random chromosome segregation ($RCeS$) or random chromatid segregation ($RCdS$) which assumes maximum double reduction ($\alpha = 1/7$; Wricke & Weber 1986). Fixation indices F were calculated as $1 - (H_o/H_e)$. Departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested with χ^2 goodness-of-fit tests for observed to expected genotype frequencies, under either $RCeS$ or $RCdS$. The χ^2 test is known to give suspect results when expected frequencies of some genotypic classes are low. Consequently, we pooled into a same class all alleles except the most common one.

Overall, the 11 microsatellite loci were highly polymorphic, with a mean \pm SE H_e of 0.75 \pm 0.17 under $RCeS$ and 0.70 \pm 0.16 under $RCdS$; the mean \pm SE of $H_o = 0.53 \pm 0.15$ (Table 2). They showed a large number of rare alleles, with an average of 44% of alleles with a frequency < 2%. These results are concordant with the results of Truong *et al.* 2004 (on the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *tortuosa*) and with the relative conservancy of the tetrasomic genome, in which rare alleles are eliminated much more slowly than under strict disomic inheritance and allelic richness is usually higher compared with related diploids (Bever & Felber 1992). In total, all polymorphic loci significantly deviated from HWE because of heterozygote deficiency, even under $RCdS$. Further work is needed to test if heterozygote deficiency results from the mating system (e.g. high selfing) and/or null alleles.

For *A. africana* we considered 39 individuals from a population in Benin (1.55586°N, 9.26674°E). Seven microsatellites (*i.e.*, R9-48, R9-01, R9-07, R9-19, R9-65, R9-61 and R9-60) amplified on all individuals. Observed and expected heterozygosities as well as the fixation index F were calculated for each locus with SPAGeDi (Hardy & Vekemans 2002).

The seven loci exhibited from 1 to 13 alleles per locus (mean = 6.8) with $H_o \pm SE = 0.48 \pm 0.14$ and $H_e \pm SE = 0.58 \pm 0.15$. Only locus R9-19 was monomorphic (but some polymorphism was detected in other *A. africana* individuals, results not shown). Locus R9-48 exhibited significant deficit of heterozygotes (Table 2).

3.3. Conclusion

By developing microsatellite markers in the vulnerable (IUCN Red List) timber tree *Azelia bipindensis*, we found that the species is tetraploid (possibly a selfing autotetraploid). Tetraploidy was also found in other congeneric African rainforest species by successful cross-amplification of the microsatellites and

flow cytometry, while the African woodland species *A. africana* and *A. quanzensis* appear diploid and only a subset of the microsatellite markers are transferable to them. To the best of our knowledge, polyploidy had never been documented in the genus *Azelia*, and rarely in tropical timber tree species. The microsatellite loci will be useful for assessing the mating system, gene flow and evolutionary relationships of *Azelia* species, and will provide essential information for their conservation.

CHAPITRE 4

EVOLUTION IN AFRICAN TROPICAL TREES DISPLAYING PLOIDY-HABITAT ASSOCIATION: THE GENUS *AFZELIA* (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEA)

Le chapitre précédent a mis en évidence l'existence d'espèces polyploïdes au sein du genre *Azelia*. Le présent chapitre explore plus particulièrement le rôle de la polyploïdisation dans la divergence du taxon étudié. Il établit ainsi les liens entre la polyploïdisation et l'habitat des taxons. Il a été publié sous la référence :

Donkpegan A.S.L., Doucet J.L., Migliore J., Duminil J., Daïnou K., Rosalia P., Wieringa J., Champluvier D. & Hardy O.J. (2017). Evolution in African tropical trees displaying ploidy-habitat association: the genus *Azelia* (Leguminosae). *Molecular Phylogenetic Evolution*, **107**, 270-281.

« *En biologie, rien n'a de sens si ce n'est à la lumière de l'évolution* »

Theodosius Dobzhansky

4. Evolution in the African tropical trees displaying ploidy-habitat association: the genus *Afzelia* (Leguminosae, Caesalpinioideae)

Abstract

Polyploidy has rarely been documented in rain forest trees but it has recently been found in African species of the genus *Afzelia* (Leguminosae), which is composed of four tetraploid rain forest species and two diploid dry forest species. The genus *Afzelia* thus provides an opportunity to examine how and when polyploidy and habitat shift occurred in Africa, and whether they are associated. In this study, we combined three plastid markers (*psbA*, *trnL*, *ndhF*), two nuclear markers (ribosomal *ITS* and the single-copy *PEPC E7* gene), plastomes (obtained by High Throughput Sequencing) and morphological traits, with an extensive taxonomic and geographic sampling to explore the evolutionary history of *Afzelia*. Both nuclear DNA and morphological vegetative characters separated diploid from tetraploid lineages. Although the two African diploid species were well differentiated genetically and morphologically, the relationships among the tetraploid species were not resolved. In contrast to the nuclear markers, plastid markers revealed that one of the diploid species forms a well-supported clade with the tetraploids, suggesting historical hybridisation, possibly in relation with genome duplication (polyploidization) and habitat shift from dry to rain forests. Molecular dating based on fossil-anchored gene phylogenies indicates that extant *Afzelia* started diverging c. 14.5 or 20 Ma while extant tetraploid species started diverging c. 7.0 or 9.4 Ma according to plastid and nuclear DNA, respectively. Additional studies of tropical polyploid plants are needed to assess whether the ploidy-habitat association observed in African *Afzelia* would reflect a role of polyploidization in niche divergence in the tropics.

Keywords: *Afzelia*, Leguminosae (Detarioideae), diversification, morphometry, niche evolution, molecular phylogeny, polyploidy

4.1. Introduction

The evolutionary mechanisms that have driven the diversification of rain forest species are still poorly understood. Evidence from recent biogeographical and phylogenetic insights indicate that Guineo-Congolian rain forests (i.e. lowland rain forests from West and Central Africa; White, 1983) contain both recent and relict species and it is difficult to evaluate the influence of past environmental changes on the evolutionary history of this melting-pot of lineages and taxa (Plana, 2004). In addition, factors as diverse as reproductive isolation, ecological gradients and/or polyploidization may have played a key role on current patterns of biodiversity (Baraloto et al., 2012; Dauby et al., 2014).

It is now widely recognized that polyploidy is an important evolutionary mechanism in plant diversification (Soltis et al., 2014). It can confer new adaptive capacities and be particularly important in a changing environmental context (Ramsey & Schemske, 2002; Soltis et al., 2004, 2007). Polyploid species are often characterized by a broader ecological tolerance than their diploid progenitors (Otto & Whitton, 2000). Nevertheless, these predictions seem to be species-specific and need to be better examined in an evolutionary framework (e.g. Baack & Stanton, 2005; Sampoux & Huyghe, 2009; Ramsey, 2011; McIntyre, 2012; Theodoridis et al., 2013). In the arctic flora, allopolyploid plants dominate in deglaciated regions, suggesting that polyploidization could favour adaptation to new or harsh habitats (Brochmann et al., 2004). Whether this could also hold in tropical biomes is unknown, but in Africa, palynological data show cyclic vegetation changes from rain forest to savannah and vice versa during the Quaternary (Dupont, 2000), thus offering conditions that may have promoted polyploids if they are better adapted to changing conditions.

To our knowledge, polyploidization has been rarely documented in tropical trees except in some species belonging to the genera *Shorea* (Dipterocarpaceae; Jong & Lethbridge, 1967), *Terminalia* (Combretaceae; Ohri, 1996), *Polylepis* (Rosaceae; Schmidt-Lebuhn et al., 2010) and *Adansonia* (Bombacaceae; Pettigrew et al., 2012). In the Legume family, where ancient polyploidization events might have played an important role for its early diversification (Pfeil et al., 2005; Cannon et al., 2010 & 2015; Doyle 2012), polyploid tropical trees have been found in the genera *Acacia* (Assoumane et al., 2013), *Leucaena* (Hughes et al., 2002), and recently in *Afzelia* using flow cytometry and nuclear microsatellites (Donkpegan et al., 2015).

The Palaeotropical genus *Afzelia* (tribe Detarieae) has been revised repeatedly by taxonomists (Chevalier, 1940; Leonard, 1950; INEAC, 1952; Keay, 1954; Aubreville, 1959, 1968, 1970; Satabie, 1994). At present, most taxonomists agree that the genus contains 11 species, even if it remains difficult to unambiguously delimit them in the field using morphological traits (Donkpegan et al., 2014). Four species grow in Southeast Asia: *A. xylocarpa* (Kurz) Craib, *A. rhomboidea* (Blanco) S.Vidal, *A. javanica* (Miq) J. Léonard and *A. palembanica* Baker, and seven are distributed in sub-Saharan Africa: *A. bipindensis* Harms, *A. bella* Harms, *A. pachyloba* Harms, *A. parviflora* (Vahl) Hepper, *A. africana* Sm. ex Pers., *A. quanzensis* Welw., and *A. peturei* De Wild. Interestingly, in Africa, ecological niche and ploidy levels appear linked, since diploidy is found in dry forest species allopatrically distributed (*A. africana* and *A. quanzensis*), whereas tetraploidy is associated with rain forest sympatrically distributed species (*A. bipindensis*, *A. bella*, *A. pachyloba*, and *A. parviflora*) (Donkpegan et al., 2015). Whether morphological differentiation between species is also linked to ploidy level and habitats has

not been documented. However, the absence of a reliable phylogenetic framework limits our ability to further infer the evolutionary relationships between these species.

The present study aims to better understand the drivers of plant diversification in tropical Africa, with a focus on the role of polyploidy, using the genus *Afzelia* as a model. More specifically, we address the following questions: (1) Do polyploid species form a single clade, suggesting a potentially unique polyploidization event, or can we document repeated polyploidization events, possibly driving particular niche adaptation? (2) When did *Afzelia* diversification occur, in particular in relation to ploidy and habitat shifts? (3) Is morphological differentiation related to phylogenetic divergence and/or difference of ploidy and habitat? To answer these questions we combined morphological and genetic data, used both plastid (*psbA*, *trnL*, *ndhF*) and nuclear (ribosomal *ITS* and *PEPC-E7*) DNA sequences to infer phylogenetic relationships, and relied on High Throughput Sequencing (HTS) of the plastome of a subset of samples to increase phylogenetic resolution and improve molecular dating.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Sampling and DNA extraction

For genetic analyses, leaflets and cambium samples (dehydrated with silicagel) were collected on 43 specimens representing six African *Afzelia* species (39 specimens from 11 countries), two Asian *Afzelia* species (three specimens), and *Intsia bijuga* (one specimen from Madagascar) which is sister to the genus *Afzelia* (Mackinder et al., 2013) (Table 1). Species identification in the field was performed using the criteria described in Donkpegan et al. (2014). Only one sample per taxon was included for whole plastome sequencing (six African and two Asian *Afzelia* species, and *Intsia bijuga*; Table 1), while 15 to 31 samples were sequenced at particular plastid and/or nuclear regions (Table 1). DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), following the manufacturer's instructions. For plastome High Throughput Sequencing (HTS), the CTAB protocol was used (Doyle & Doyle, 1987) coupled with QIAquick purification kits (Qiagen), and followed by Qubit® 2.0 Fluorometer quantification (Life Technologies, Invitrogen, Foster City, USA).

4.2.2. DNA polymorphism in plastid and nuclear regions assessed by Sanger sequencing

For 31 samples, two plastid DNA (pDNA) intergenic regions (*psbA-trnH* and *trnL*) and two plastid coding genes (*ndHF84F-ndHF713R* and *matK1R-3F*) were amplified and sequenced using universal primers (Kim & Jansen, 1995; Chase et al., 2007; Bruneau et al., 2008). Then, *matK* sequences were discarded due to their lower sequencing success and polymorphism in comparison to other loci. The PCR reaction used 1.5 µL of DNA template (20-50 ng), 0.1 µL of *Taq* polymerase (Qiagen), 2.5 µL of PCR buffer, 1 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL of dNTPs (10 mM), 0.25 µL of each primer (10 mM), and 19.375 µL of H₂O. The PCR cycling profile included 4 min at 94°C, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 56°C, and 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. Sanger sequencing was performed on a 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) in the ULB-EBE platform (Brussels, Belgium).

Table 1 Material used for the molecular analyses of *Azelia*

Species	Country	Location	Vouchers	Collectors	Herbarium	Latitude	Longitude	Markers successfully sequenced
<i>A. quanzensis</i> 2X	Kenya	Gede	AD522	Donkpegan S.L.A.	BRLU	-3.30295	39.9845	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. quanzensis</i>	Kenya	kwalé	AD523	Donkpegan S.L.A.	BRLU	-4.18279	39.4405	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. quanzensis</i>	Kenya	Gede	AD518	Donkpegan S.L.A.	BRLU	-3.27098	39.98244	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. quanzensis</i>	Kenya	Gede	AD519	Donkpegan S.L.A.	BRLU	-3.30439	39.98602	<i>ITS2</i> , <i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. quanzensis</i>	Kenya	Gede	AD520	Donkpegan S.L.A.	BRLU	-3.30715	39.98181	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. quanzensis</i>	Kenya	Gede	AD521	Donkpegan S.L.A.	BRLU	-3.30324	39.98324	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. quanzensis</i>	Kenya	Gede	AD524	Donkpegan S.L.A.	BRLU	-3.3036	39.99108	<i>ITS2</i>
<i>A. quanzensis</i>	Kenya	Witu	AD889	Donkpegan S.L.A.	BRLU	-2.37063	40.48026	plastome
<i>A. africana</i> 2X	Benin	Lama	AD17	Donkpegan S.L.A.	BRLU	6.97694	2.13496	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. africana</i>	Benin	Pénéssoulou	AD88	Donkpegan S.L.A.	BRLU	9.26313	1.50939	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. africana</i>	Benin	Lama	AD20	Donkpegan S.L.A.	BRLU	6.97681	2.13497	<i>ITS2</i>
<i>A. africana</i>	Benin	Lama	AD21	Donkpegan S.L.A.	BRLU	6.97673	2.13515	<i>ITS2</i>
<i>A. africana</i>	Benin	Lama	AD26	Donkpegan S.L.A.	BRLU	6.97659	2.13529	<i>ITS2</i>
<i>A. africana</i>	Benin	Lama	AD27	Donkpegan S.L.A.	BRLU	6.97603	2.14591	plastome
<i>A. africana</i>	Senegal	Casamance	AD123	Donkpegan S.L.A.	BRLU	12.49356	-16.21985	<i>ITS2</i> , <i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. africana</i>	Senegal	Casamance	AD125	Donkpegan S.L.A.	BRLU	12.88330	-16.13330	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. africana</i>	Burkina-Faso	Pama	ADJu1	Donkpegan S.L.A.	BRLU	11.25120	0.78157	<i>ITS2</i> , <i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. africana</i>	Burkina-Faso	Pama	ADJu2	Donkpegan S.L.A.	BRLU	11.32541	0.82232	<i>ITS2</i> , <i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. africana</i>	Ghana	Akwapim	NB-0522	Bourland N.	BRLU	5.95632	-0.16978	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. bipindensis</i> 4X	Cameroon	Makalaya	AD270	Donkpegan S.L.A.	BRLU	3.28469	14.33968	<i>ITS2</i> , <i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. bipindensis</i>	Republic of Congo	Loundoungou	JFG-744	Gillet J-F	BRLU	2.3776	17.0641	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. bipindensis</i>	Republic of Congo	Pokola	JFG-864	Gillet J-F	BRLU	1.32573	16.39493	<i>psbA</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnL</i> and <i>PEPC</i> E7
<i>A. bipindensis</i>	Cameroon	Makalaya	AD455	Donkpegan S.L.A.	BRLU	3.28157	14.33568	<i>ITS2</i>
<i>A. bipindensis</i>	Gabon	Bambidie	AD626	Donkpegan S.L.A.	BRLU	-0.73304	12.91774	plastome

<i>A. pachyloba</i> 4X	Cameroon	Maan	AD411	Donkpegan S.L.A.	BRLU	2.24512	10.47447	<i>ITS2, psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. pachyloba</i>	Cameroon	Maan	AD413	Donkpegan S.L.A.	BRLU	2.25146	10.46291	<i>ITS2, psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. pachyloba</i>	Cameroon	Campo	AD485	Donkpegan S.L.A.	BRLU	2.46473	9.90157	plastome, <i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. pachyloba</i>	Cameroon	Campo	AD486	Donkpegan S.L.A.	BRLU	2.46573	9.90142	<i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. bella</i> 4X	Cameroon	Mamfé	AD440	Donkpegan S.L.A.	BRLU	5.738582	9.555438	<i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. bella</i>	Cameroon	Mamfé	AD442	Donkpegan S.L.A.	BRLU	5.750495	9.547516	<i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. bella</i>	Cameroon	Korup	PM4985	Parmentier I.	BRLU	5.062	8.854	<i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. bella</i>	Cameroon	Mamfé	AD436	Donkpegan S.L.A.	BRLU	5.743841	9.566711	plastome
<i>A. bella</i>	Ghana	Atiwa	NB0489	Bourland N.	BRLU	6.22959	-0.54069	<i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. bella var gracilior</i>	Liberia	Gbarpolu	HBAD27/1 0254	Jongkind C.C.H.	BRLU /BR	7.45	-10.33	<i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. bella var gracilior</i>	Guinea	Nzérékoré	HBAD28/2 7	Haba O-O.	BRLU /BR	7.70	-8.32	<i>ITS2, psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. parviflora</i> 4X	Sierra-Leone	Tonkolili	HBAD29/1 438	Van der Burgt X.M.	BRLU /BR	8.94861	-11.76861	plastome, <i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. parviflora</i>	Liberia	Gbarnga	HBAD30/1 0979	Jongkind C.C.H.	BRLU /BR	7.183	-9.300	<i>ITS2, psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. rhomboidea</i> 2X	Indonesia	East Kalimantan	HBAD160/ AA1567	Ambri et al.	BRLU /WAG	0.49	117.33	plastome
<i>A. xylocarpa</i> 2X	Cambodia	Siem Riep	Axy1	Mouget J.	BRLU	13.45305	103.89966	<i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>A. xylocarpa</i>	Cambodia	Siem Riep	Axy2	Mouget J.	BRLU	13.45398	103.89960	plastome, <i>psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>
<i>Intsia bijuga</i> 2X	Madagascar	Tamatave	HBAD32/1 469	Schatz G.E & D'arcy W.	BRLU /BR	-18.9	49.13	<i>ITS2, plastome, psbA, ndhF, trnL and PEPC E7</i>

For the nuclear genome (nDNA), amplification and polymorphism were tested for 13 single-copy loci: *ADH*, *GScp*, *ADHc*, *Rnl1*, *TPI 6rn/4rn*, *LF4 Cl1R*, *LF4 Cl4R*, *Agt1*, *Apg1*, *At103 PEPC E1/E2*, *PEPC E2/E3* and *PEPC E7* (Li et al., 2008; Duminil et al., 2015), and two nuclear ribosomal internal transcribed spacers: ITS1 and ITS2 (Li et al., 2011). Based on amplification success and polymorphism, only *PEPC E7* and *ITS2* were retained and successfully sequenced for 31 and 15 samples, respectively. PCR reactions followed the pDNA protocol, but using 0.125 μ L of *Taq* polymerase Phusion (Qiagen), with 5 μ L of PCR buffer.

Sequences were manually edited and aligned using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004) implemented in CodonCode Aligner 3.7.1 (CodonCode, St. Louis, Missouri). For nuclear *PEPC E7* sequences, where heterozygous sites were sometimes observed, we used PHASE v2.1.1 algorithm (Stephens et al., 2001) implemented in DNASP v.5.10 program (Librado and Rozas, 2009) to infer the two alleles present in heterozygous individuals at each locus through Bayesian inference (Garrick et al. 2010). Indels were coded in FastGap 1.0.8 (Borchsenius, 2007).

4.2.3. Phylogenetic reconstructions based on plastid and nuclear regions

Phylogenetic relationships were inferred using Maximum Parsimony (MP) and Bayesian Inference (BI) methods, considering separately (i) the three concatenated pDNA loci, (ii) *ITS2*, and (iii) *PEPC E7*. Applying MP principles, median-joining networks, based on single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertions–deletions (indels), were represented using the software Network 4.6.1.3 (Bandelt et al., 1999). For the BI approach, we used MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), implementing the following evolutionary models selected according to the Bayesian Information Criterion (BIC, Schwarz, 1978) provided by jModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012): F81 for pDNA, HKY+G for *ITS2*, K80 for *PEPC E7* 2nd codon position, and JC for *PEPC E7* 1st and 3rd codon positions. The Binary model implemented in MrBayes for restriction sites was used for the indel binary dataset with the command “coding = variable” to adjust for characters not included in this matrix, as suggested by Ronquist and Huelsenbeck (2003). The Metropolis Coupled Markov Chains (MCMC) with Monte Carlo simulations were run for 10,000,000 generations, with a tree sampled every 1,000 generations. Chain stationarity was checked using the average standard deviation of split frequencies (Gelman & Rubin, 1992), and was achieved after 5,000 generations (burn-in). A 50% majority rule consensus tree was constructed from the remaining trees.

4.2.4. Plastome sequencing using HTS tools and bioinformatics

High Throughput Sequencing technology was applied to obtain more polymorphic pDNA data for each of nine species in order to improve phylogenetic resolution and perform molecular dating. We used a cost-effective enrichment through hybridisation capture of plastome at deep multiplexing levels, following Mariac et al. (2014). In summary, DNA extracts were sheared using a Bioruptor® Pico (Diagenode SA., Liège, Belgium) to yield sonicated fragments around ca. 400 bp. Sheared and sized DNA was then repaired and tagged using 6-bp barcodes for multiplexing all the samples (Rohland & Reich, 2012), after AMPure XP bead-based sample clean-up steps (Agencourt Bioscience, Beckman Coulter, Brea, USA). To

capture chloroplast sequences directly by hybridisation from the genomic DNA libraries, we used biotinylated probes previously produced in the laboratory for another Leguminosae tree from the same Detarieae clade, *Guibourtia tessmannii*, using 18 long-range universal PCR primers combinations (Uribe-Convers et al., 2014) with the LongAmp® Taq PCR Kit (New England Biolabs, Beverly, USA). Real-time PCRs were then performed to generate the plastome-enriched genomic libraries, on a StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, USA). Paired-end sequencing (2 × 150 bp) was performed on an Illumina MiSeq with reagent kit V2 at the GIGA platform (Liège, Belgium), using c. 1/100th of the run for each plastome enriched sample.

The plastome enrichment phase does not guarantee that all parts of the plastome are captured, given that we used probes made from another related species. Thus the protocol of genomic libraries preparation was also applied without enrichment to reconstruct a reference plastome on one sample of *A. africana* from Benin, using c. 1/30th of the MiSeq run. An independent genomic library was also obtained for *Intsia bijuga*.

Demultiplexing based on the 6-bp barcodes was performed using the freely available python script Demultadapt (<https://github.com/Maillol/demultadapt>), using a 0-mismatch threshold. Adapters and low-quality bases were removed using Cutadapt 1.2.1 (Martin, 2011) with the following options: quality cut-off = 20, minimum overlap = 7 and minimum length = 35. Reads with a mean quality lower than 30 were discarded afterwards using a freely available perl script (https://github.com/SouthGreenPlatform/arcad-hts/blob/master/scripts/arcad_hts_2_Filter_Fastq_On_Mean_Quality.pl). The software Mitobim 1.5 (Hahn et al., 2013) was used to reconstruct the plastid genome of *A. bipindensis*, assembling the reads from the non-enriched genomic DNA library. Mitobim mapped these reads using MIRA 3.4.1.1 (Chevreux et al., 1999) to highly conserved regions of the closely related reference genome available in GenBank: *Tamarindus indica* (Leguminosae Detarieae; NC_026685.1). The mapping of plastid DNA enriched libraries was performed using Bwa Mem 0.7.5a-r405 (Li & Durbin, 2009) with -M and -B 4 options, using the plastid reference genomes reconstructed in the previous steps with the genomic library of *A. bipindensis*. Samtools 1.1 (Li & Durbin, 2009) was used to generate a mpileup file with option -B, following Scarcelli et al. (2015). We used Varscan 2.3.7 (Koboldt et al., 2012) to call SNPs (option -min-var-freq set to 50%) before converting it to a fasta multi-alignment file.

Plastome sequences from *Azelia* and *Intsia* were aligned in MEGA 5.0.3 (Tamura et al., 2011). The model JVM+G was chosen using jModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012). The appropriate code for this model was imported from the BEAST webpage (<http://beast.bio.ed.ac.uk/substitution-model-code>) and we modified the input file accordingly.

4.2.5. Fossil calibration and molecular dating

Dated phylogenies were reconstructed for (i) the nine plastomes and (ii) the 17 haplotypes of the *PEPC* E7 with the Bayesian MCMC analysis implemented in BEAST v1.7.4 (Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees; Drummond & Rambaut, 2007). To time-calibrate the phylogenies we considered an *Azelia* fossil dated to 27.23 Ma (Pan et al., 2010) which provides a minimal age for the divergence

between *Intsia* and *Afzelia*. As these sister genera belong to the large Amherstieae clade (Bruneau et al., 2008), they must have diverged more recently than the age of Amherstieae, estimated at 52.1 Ma by Bruneau et al. (2008). Thus, we anchored the phylogenies by setting the age of the divergence between *Intsia* and *Afzelia* as a gamma distributed random variable offset by 27.23 Ma (shape = 4, scale = 2), giving a 95% confidence interval between 29.5 and 42.8 Ma. An XML file was generated using BEAUti (Bayesian Evolutionary Analysis Utility). An uncorrelated lognormal relaxed clock model and a Yule process of speciation were applied. Two MCMC analyses were run for 50 million generations each, sampling trees at 1,000 step intervals. We used Tracer 1.4 (Drummond & Rambaut, 2007) to assess convergence, estimate Effective Sample Sizes (ESS), and examine the posteriors of all the parameters. Runs were associated with LogCombiner after removing the first 10,000 samples as burn-in. Mean heights were taken in TreeAnnotator 1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2007), and trees were plotted in FigTree 1.1.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4.2.6. Morphometric analyses

Morphological analyses were performed on 38 herbarium specimens corresponding to six African *Afzelia* taxa (*A. africana*, *A. bella* var. *bella*, *A. bella* var. *gracilior*, *A. bipindensis*, *A. parviflora*, and *A. quanzensis* – Table 2), for which fully opened flowers could be studied (no fertile vouchers were available for *A. peturei* and *A. pachyloba* specimens). Fifteen vegetative characters related to leaves (8 quantitative, 7 qualitative) and seven floral traits related to petal, pedicel and bracteole (4 quantitative, 1 qualitative) were measured (see Fig. 1 and Table 3). One open flower per specimen was rehydrated in boiling water for 30 s to 1 min to facilitate dissection in distilled water. Quantitative characters were measured with graph paper, recorded as numeric (continuous or discrete) values and standardized (Poulsen & Nordal, 2005; Marcysiak et al., 2007), whereas qualitative characters were recorded as factors and not standardized (Sneath & Sokal, 1973).

To investigate independently the assignation of specimens to species and to identify discriminant variables, a Hill-Smith analysis was first performed (Hill & Smith, 1976), using the function *dudi.hillsmith* in the Ade4 package (Chessel et al., 2004; Dray et al., 2007) available in R 3.1.2 (R-Core Team, 2013). Data were ordinated on a biplot graph using a principal coordinate analysis (PCoA) and the Gower index. These analyses were first performed separately on the vegetative and floral traits, before combining them. Quantitative variables were examined using the Shapiro-Wilk test of normality (Royston, 1982) available in the package Stats in R 3.1.2. For 10 out of the 13 quantitative characters, normality was confirmed and a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed (Sokal & Rohlf, 1995). For the three non-normal variables, the non-parametric Kruskal-Wallis test was performed (Hollander & Wolfe, 1973). For each test, the null hypothesis (H_0) was “no difference between means or medians for each group of morphospecies”. When the null hypothesis was rejected, we conducted multiple comparisons between means and medians to determine which groups were different using the Tukey’s Honestly Significant Difference test (Tukey, 1977) and the test of *kruskalmc* (Siegel & Castellan, 1988) available in the PGIRMESS package (Giraudoux, 2013).

Table 2: Material used for the morphometric analyses of African species of *Azelia*

Taxon	Geographic origin	Herbarium	Voucher	Collectors
<i>A. africana 1</i>	Cameroon	WAG	15535	Meijer W.
<i>A. africana 2</i>	Cameroon	WAG	4708	Geerling C.
<i>A. africana 3</i>	Cameroon	WAG	13335	na
<i>A. africana 4</i>	Benin	BR	8	Pierret H.
<i>A. africana 6</i>	Senegal	BR	7265	Berhaut
<i>A. africana 8</i>	DRC	BR	2218	Lebrun J.
<i>A. bella var bella 1</i>	Cameroon	BR	8307	Bos J.J.
<i>A. bella var bella 2</i>	Gabon	BR	14446	Breteler F.J.
<i>A. bella var bella 3</i>	Cameroon	BR	942	van der Burgt X.M.
<i>A. bella var bella 4</i>	DRC	BR	9785	Louis J.
<i>A. bella var bella 5</i>	DRC	BR	1027	Lebrun J.
<i>A. bella var gracilior 1</i>	Ghana	BR	5811	Andok J.E.
<i>A. bella var gracilior 2</i>	Guinea-Conakry	BR	27	Haba
<i>A. bella var gracilior 3</i>	Liberia	WAG	10254	Jongkind C.C.H.
<i>A. bella var gracilior 4</i>	Guinea-Conakry	WAG	O.O. Haba 27	WAG1704893
<i>A. bipindensis 1</i>	Cameroon	BR	8033	de Wilde J.J.F.E.
<i>A. bipindensis 3</i>	Gabon	BR	7806	Le Testu G.
<i>A. bipindensis 4</i>	Gabon	BR	na	na
<i>A. bipindensis 5</i>	RCA	BR	3930	Le Testu G.
<i>A. bipindensis 6</i>	RCA	BR	4664	Le Testu G.
<i>A. bipindensis 7</i>	Gabon	BR	344	Arends J.C. / Louis A.M. / de Wilde J.J.F.E.
<i>A. bipindensis 8</i>	Gabon	BR	7185	Le Testu G.
<i>A. bipindensis 9</i>	DRC	BR	1341	na
<i>A. bipindensis 10</i>	DRC	BR	35	Hardy Y./ Mwene Ditu
<i>A. quanzensis 1</i>	Mozambique	BR	7529	Jansen P.C.M.
<i>A. quanzensis 2</i>	Zambia	BR	898624	Milne-Redhead E.
<i>A. quanzensis 3</i>	Zambia	BR	1233	Milne-Redhead E.
<i>A. quanzensis 4</i>	Angola	BR	1138	Raimundo F. / Matos e Figueira C.
<i>A. quanzensis 5</i>	Kenya	BR	542	Reitsma J.M.
<i>A. parviflora 1</i>	Liberia	BR	10979	Jongkind C.C.H.
<i>A. parviflora 2</i>	Siera-Leone	BR	1438	van der Burgt X.M.
<i>A. parviflora 3</i>	Liberia	BR	3751	de Wilde J.J.F.E. / Voorhoeve A.G.
<i>A. parviflora 4</i>	Liberia	BR	159	Konneh P.V.
<i>A. parviflora 5</i>	Liberia	BR	288	Voorhoeve A.G.
<i>A. parviflora 6</i>	Liberia	WAG	2935	Bos J.J.
<i>A. parviflora 7</i>	Liberia	WAG	1071	Voorhoeve A.G.
<i>A. parviflora 8</i>	Liberia	WAG	922	Bos J.J.
<i>A. parviflora 9</i>	Liberia	WAG	1226	Voorhoeve A.G.

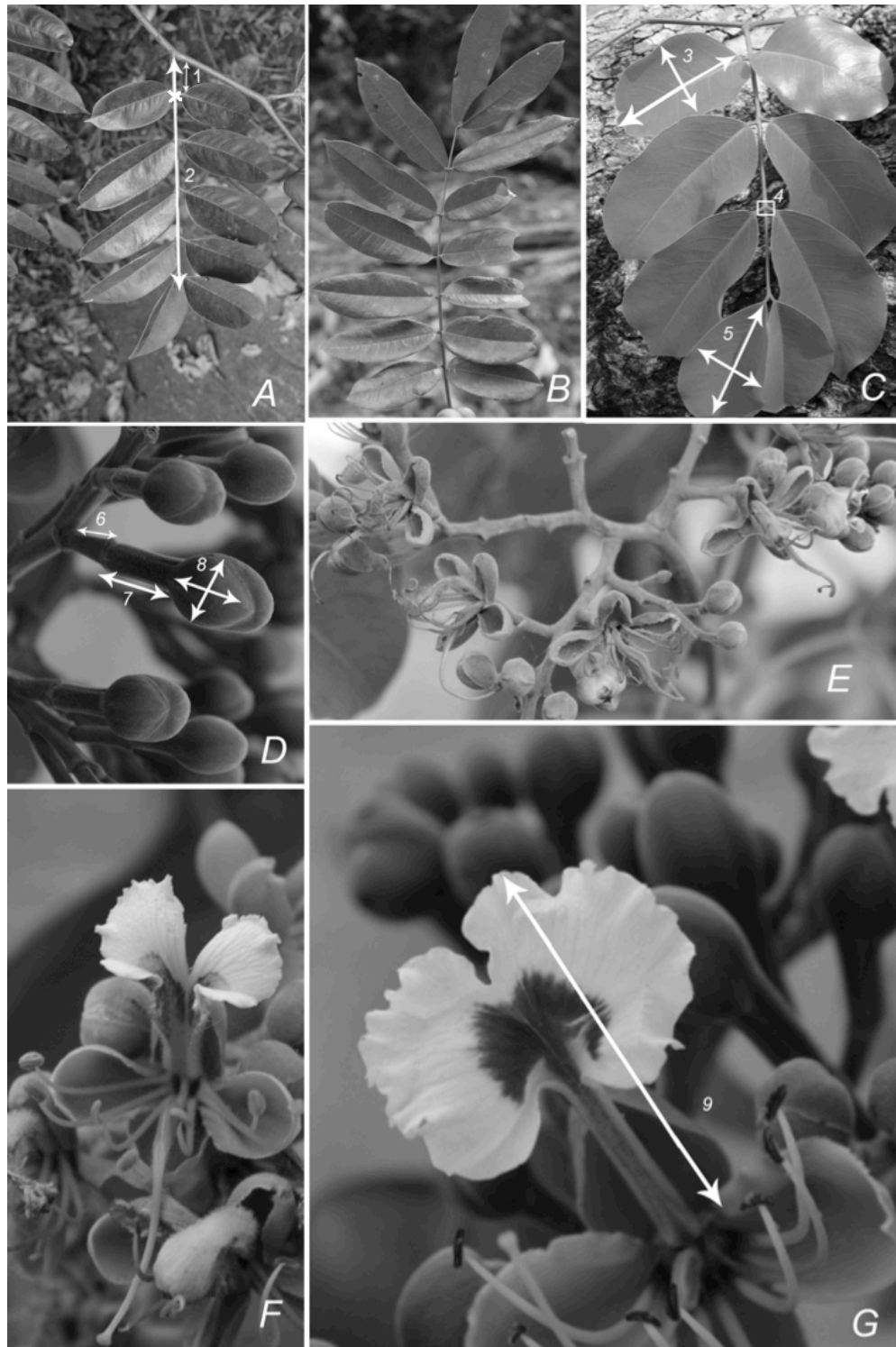


Figure 1: Illustration of some of the main vegetative and floral characters used to identify African *Afzelia* species: *A. bipindensis* (A), *A. pachyloba* (B), *A. africana* (C, E, F), and *A. bella* (D, G). 1: L_{qt}_PI, Petiole length; 2: L_{qt}_SI, Spine length; 3: L_{qt}_RILI, Ratio length/width inferior leaflet; 4: L_{qt}_Pel, Petiolule length; 5: L_{qt}_RSLI, Ratio length/width superior leaflet; 6: F_{qt}_Pedl, Pedicel length; 7: F_{qt}_RI, Receptacle length; 8: F_{qt}_RLIBr, Ratio length/width sepals; 9: F_{qt}_PI, Petal length.

Table 3: Morphometric variables assessed for the study of African species of *Afzelia*. Continuous variables were measured in mm; L=Leaf; F=Flower; qt=quantitative and ql=qualitative

N°	Characters	Codes	States
1	Leaf length	L Qt LI	Continuous (mm)
2	Spine length	L Qt SI	Continuous (mm)
3	Petiole length	L Qt PI	Continuous (mm)
4	Number of leaflets	L Qt Len	Discrete (number)
5	Lower leaflets aspect	L ql Lela	Shiny; dull
6	Higher leaflets aspect	L ql Lehi	Shiny; dull
7	Petiolule length	L Qt Pel	Continuous (mm)
8	Number secondary veins	L Qt NSV	Discrete (number)
9	Vein aspect	L ql VA	Coriaceous; fine
10	Ratio length/width superior leaflet	L Qt RSLI	Continuous
11	Ratio length/width inferior leaflet	L Qt RILI	Continuous
12	Leaflets general form	L ql Legf	Elliptic; oval; oblong; falciform; obovate
13	Leaflets apex form	L ql Leaf	Scalloped; mucronate apex; acuminate; mucronate apex with black spot
14	Leaflets basal form	L ql Lebf	Rounded; attenuated; truncated
15	Translucent dots	L ql Letd	Yes; no
16	Petal length	F Qt PI	Continuous (mm)
17	Petal hairs	F ql Ph	Pubescent; glabrous; downy
18	Pedicel length	F Qt Pedl	Continuous (mm)
19	Receptacle length	F Qt RI	Continuous (mm)
20	Ratio length/width sepals	F Qt RLIBr	Continuous
21	Ovary hairs	F ql Oh	Everywhere pubescent; glabrous; pubescent on 1 or 2 edges only; pubescent on one side only; downy; pubescent at the base
22	Ovary length	F Qt Ol	Continuous (mm)

Table 4: Characteristics and polymorphism of the four plastid and two nuclear DNA regions sequenced for *Afzelia* taxa. ^aPhylogeny with MrBayes and Network; ^bMolecular dating with BEAST; n: All missing data are replaced by N in plastome sequences

Locus	Number of samples amplified	Alignment length	Number of Indels	Polymorphic sites	Parsimony-informative sites	Model evolution	of
<i>ITS2</i> ^a	15	471	0	125 (26.5%)	73 (58.4%)	HKY+G	
<i>PEPC E7</i> ^a	31	558	0	31 (5.5%)	14 (45.2%)	K80 (2 nd) & JC (1 st & 3 rd codon positions)	
<i>psbA</i> ^a	31	368	10	15 (4.1%)	13 (86.7%)	F81	
<i>ndhF</i> ^a	31	486	0	2 (0.4%)	2 (100.0%)	F81	
<i>trnL</i> ^a	31	432	9	5 (1.2%)	3 (60.0%)	F81	
<i>Plastome</i> ^b	9	174255	n	4370 (2.5%)	692 (15.8%)	TVM+G	

4.3. Results

4.3.1. DNA polymorphism

The combined pDNA (*psbA*, *ndhF* and *trnL*) matrix comprised 1,286 bp and 31 samples. It included 21 coded indels and 22 single nucleotide polymorphic sites of which 90% were parsimony-informative sites (Table 4). A total of 12 pDNA haplotypes were identified for *Azelia*, using the MP approach developed in the software NETWORK. Haplotypes of *A. quanzensis* (H1 and H2) and *A. africana* (H4, H5 and H12) are distinct and never shared with other rain forest species; while some haplotypes (H6 and H7) are shared between rain forest species (Fig. 2AB). Private haplotypes appear however for *A. bella* (H8 and H9) and *A. parviflora* (H10) (Fig. 2B).

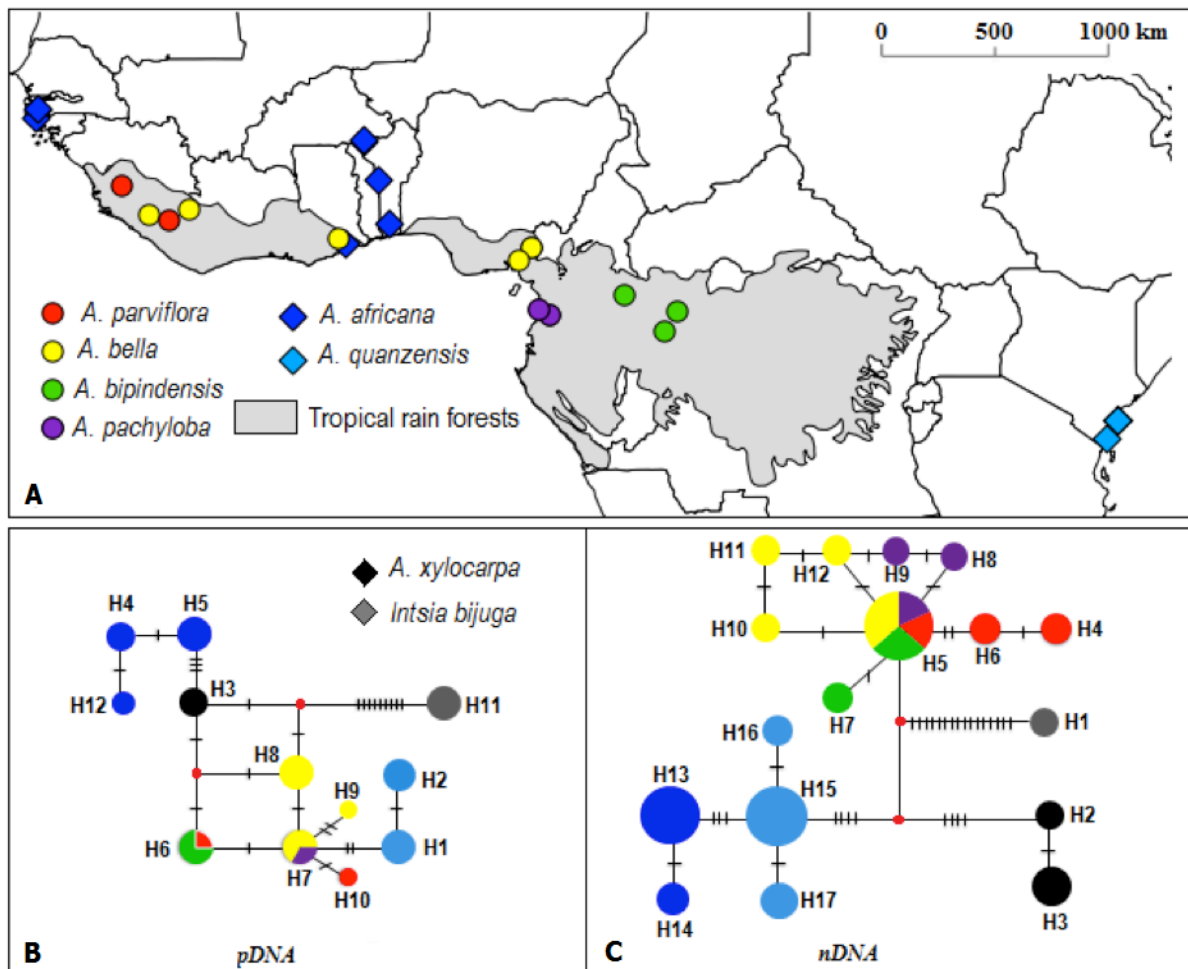


Figure 2: Location of sequenced samples of African *Azelia* species (A), and Median-joining haplotypes networks based on the plastid DNA concatenated regions *ndHF84F-ndHF713R*, *psbA-trnH* and *trnL-intron* (B) and on the nuclear *PEPC E7* gene (C). Haplotypes in dark grey and black represent the outgroup taxon *Intsia bijuga* and the Asian *Azelia xylocarpa*, respectively. Black dashes represent the number of mutations along each branch.

The nDNA *PEPC E7* alignment of 31 samples reached 558 bp in length, with 31 polymorphic sites. Heterozygous sites (10 sequences with one heterozygous site and one sequence with two heterozygous

sites) were treated with the PHASE algorithm which provided a total of 17 haplotypes. Despite the fact that the *PEPC E7* haplotype H5 is shared between all *Afzelia* rain forest species, each of these species harbours private haplotypes: H4 and H6 for *A. parviflora*, H7 for *A. bipindensis*, H8 and H9 for *A. pachyloba*, H10, H11 and H12 for *A. bella* (Fig. 2AC). Haplotypes of *A. africana* (H13 and H14) and *A. quanzensis* (H15, H16 and H17) are distinct and never shared with other rain forest species, as previously noted for the pDNA data (Fig. 2C).

Regarding the nDNA *ITS2* region aligned on 471 bp, 11 haplotypes were defined among the 15 individuals successfully sequenced. Despite the lower sampling in comparison to other markers, this locus revealed a high level of polymorphism with 125 polymorphic sites among which 73 were parsimony-informative (Table 4). There was no shared haplotype between species but the limited sample size may have prevented us detecting shared haplotypes.

The genomic library of *A. africana* used for reconstructing the reference plastome (size of 159,728 bp) contained 1,250,176 R1-R2 paired reads, of which 2.77% appeared to be of plastid origin, making an average depth of 30X. For the nine enriched libraries, on average, 336,590 R1-R2 paired reads (SD: 230,665) were obtained for each plastome capture, of which 97.17% (stdev 1.5%) appeared to be of plastid origin, illustrating a good yield for pDNA enrichment. The average depth was 304X (mean SD: 195) and the mean coverage at 10X was around 78.8% (SD: 0.05%). After SNP (Single Nucleotide Polymorphic) calling, 579 SNPs were retained and used for reconstructing fasta files of complete plastomes, which formed nine haplotypes.

4.3.2. Phylogenetic relationships and timing of diversification of the genus *Afzelia*

Bayesian phylogenetic reconstructions indicate that while each African diploid species (*A. africana* and *A. quanzensis*) appears monophyletic, the tetraploid rain forest species are paraphyletic and embedded within a clade excluding *A. africana* and the Asian species (**Appendix S2**). An important incongruence between pDNA and nDNA datasets appears for the position of the *Afzelia quanzensis* clade: the latter belongs to a clade including all tetraploid rain forest species according to pDNA (including the whole plastome phylogeny), while it is not related to tetraploids but appears sister to *A. africana* according to the *PEPC E7* and *ITS2* phylogenies (**Appendix S2**). The two Asian *Afzelia* species form a clade according to the whole plastome phylogeny but their divergence from African *Afzelia* is not well resolved: they could be sister to the clade of diploid African species or to the clade of tetraploid species according to the *PEPC E7* phylogeny. According to the whole plastome phylogeny they appear sister to the clade including tetraploids and *A. quanzensis*, where *A. africana* is the most basal (Fig. 3A).

The diversification of *Afzelia* seems to have started in the early or mid-Miocene, the posterior mean age of the common ancestor (MRCA) of *Afzelia* being estimated at 14.5 Ma (95% highest posterior density HPD between 6.7 and 27.2 Ma) according to plastomes, and 20 Ma (95% HPD between 11.0 and 32.0 Ma) according to *PEPC E7* (Fig. 3AB). The Asian species sequenced would have diverged just afterwards (12.5 Ma or 16.8 Ma ago according to plastomes and *PEPC E7* data, respectively). The diversification of

tetraploid rain forest *Azelia* would have started in the late Miocene (age of MRCA of haplotypes estimated at 7.0 Ma and 9.4 Ma according to plastomes and PEPC E7, respectively).

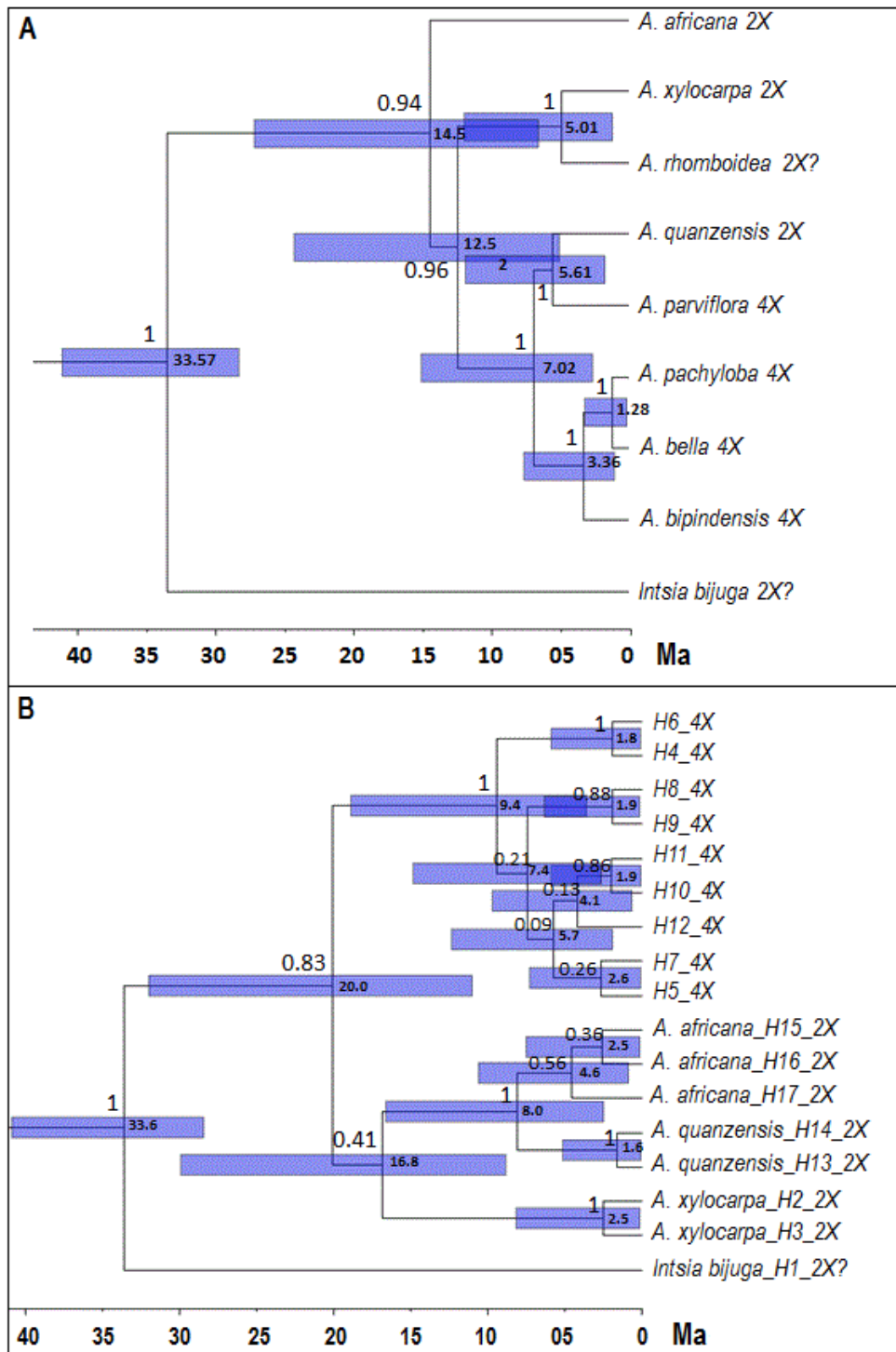


Figure 3: Divergence time chronograms of the whole plastomes (A) and the nDNA PEPC E7 haplotypes (B, see Fig. 2C for corresponding haplotype numbers) sampled in *Azelia* species (Bayesian maximum clade credibility trees). Numbers on nodes indicate the mean divergence time estimate (in Ma) and numbers on branches the branch support (posterior probability). Bars indicate the 95% highest posterior density intervals around node ages. The names of

tetraploid species have been omitted from panel B because they share some of the *PEPC* E7 haplotypes. In fact, as the four tetraploid species (4X) share both pDNA and nDNA haplotypes (Fig. 2B,C), divergence times between tetraploid samples should not be interpreted as the corresponding divergence times between tetraploid species.

Although pDNA and nDNA data diverge regarding the position of *A. quanzensis*, they both situate the divergence between *A. quanzensis* and *A. africana* in the mid or late Miocene (14.5 Ma and 8 Ma according to plastomes and *PEPC* E7, respectively) (Fig. 3AB).

4.3.3. Morphologic differentiation and species delimitation

The projection of the PCoA using the two first axes (axis 1: 11.6% and axis 2: 8.86%) for the floral variables measured on five *Azelia* species (*A. africana*, *A. bella*, *A. bipindensis*, *A. parviflora*, *A. quanzensis*) showed that *A. africana* and *A. bipindensis* are well differentiated, whereas *A. bella*, *A. parviflora* and *A. quanzensis* present overlapping morphological traits (Fig. 4A). Similar results were obtained with the other axes.

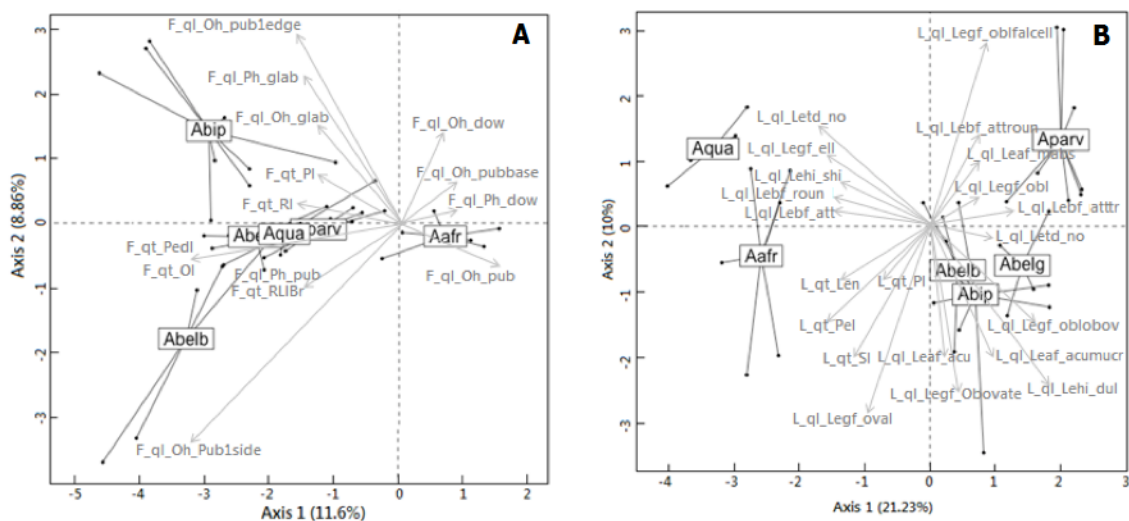


Figure 4: Morphological variability of 38 specimens of African *Azelia* for seven floral characters (A) and 15 vegetative characters (B), using the two first principal coordinates (PCoA, Hill-Smith analysis). Abip: *A. bipindensis*; Abelb: *A. bella* var *bella*; Abelg: *A. bella* var *gracillior*; Aparv: *A. parviflora*; Aafr: *A. africana*; Aqua: *A. quanzensis*. See Table 3 for codes of morphological characters.

By contrast the vegetative characters provided distinct groups delimiting each species, with the exception of *A. bipindensis* that overlaps with the two varieties of *A. bella* included in the analysis (PCoA axis 1: 21.23% and axis 2: 10%; Fig. 4B). The main discriminant variable is the general form of leaflets: elliptic or oval for *A. africana* and *A. quanzensis*, oblong-falciform for *A. parviflora*, oblong and oblong-obovate for *A. bella* and *A. bipindensis*. In addition, dry forest species (*A. africana* and *A. quanzensis*) are clearly segregated from rain forests species (*A. bella*, *A. bipindensis*, and *A. parviflora*) along the first PCoA axis. This same pattern is also observed by combining vegetative and floral variables for all these five species. The main discriminant variables which separate dry forest versus rain forest species are, respectively: (i)

the rounded versus truncated-attenuated basal leaflet shape; (ii) at the distal end of the leaflets, the scalloped versus acuminate and mucronate (sometimes with black spots) (Fig. 4B).

The pairwise comparisons of means or medians using the Tukey-Kramer or Kruskal-Wallis methods revealed significant differences among species for all quantitative variables except the length of pedicel and the ratio length/width of bracteoles (Table 5). By contrast, few characters differed significantly between dry and rain forest species.

Table 5: Mean \pm standard deviation [range] of 13 quantitative morphometric variables measured in six *Azelia* taxa. Significant differences of means (10 normally distributed variables) or medians (three not normally distributed variables, grey shading) among taxa tested using Tukey-Kramer HSD and Kruskal-Wallis tests, respectively. Taxa that do not differ significantly share a common subscript letter. See Table 3 for abbreviations.

	F_{4,33}	Pvalue	<i>A. africana</i> (6)	<i>A. quanzensis</i> (5)	<i>A. bella</i> var <i>bella</i> (5)	<i>A. bella</i> var <i>gracilior</i> (4)	<i>A. bipindensis</i> (9)	<i>A. parviflora</i> (9)	
L_{qt}_LI	16.6	<0.0001***	29.17 ^a 4.86 [22.5-35]	± 24.94 ^{ab} ±1.60 [22.5-27]	23.00 ^b ±2.32 [20.5-26]	19.50 ^{bc} ± 3.49 [15.5-24]	23.30 ^b ±2.19 [16.5-26.5]	15.67 ^c ±2.87 [12.5-21]	
L_{qt}_SI	17.1	<0.0001***	25.20 ^a ± 4.50 [18.7-30]	20.98 ^{ab} ± 1.04 [20-22.5]	19.30 ^b ± 1.90 [17.5-22]	16.25 ^{bc} ±3.12 [13-20.5]	20.35 ^b ± 1.73 [18-23.5]	13.17 ^c ± 2.56 [10-18]	
L_{qt}_PI	5.0	0.0017**	3.97 ^a ± 0.55 [3.5-5]	3.96 ^a ± 0.94 [2.5-5]	3.60 ^{ab} ± 0.89 [3-5]	3.76 ^{ab} ± 0.63 [2.5-4]	2.94 ^{ab} ± 0.68 [2-4]	2.50 ^b ± 0.54 [1.5-2.8]	
L_{qt}_NSV	7.4	<0.0001***	8.50 ^a ±1.38 [7-10]	7.40 ^a ±0.89 [6-8]	10.80 ^{bc} ±1.3 0 [9-12]	9.50 ^{abc} ±0.58 [9-10]	10.78 ^b ±0.97 [10-13]	9.00 ^{ac} ±1.50 [7-11]	
L_{qt}_Pel	9.3	<0.0001***	7.50 ^a ±1.18 [6.5-9]	6.36 ^{ab} ±1.96 [4.5-8.5]	5.60 ^{ab} ±1.02 [4-6.5]	4.08 ^{bc} ±0.65 [3.5-5]	5.06 ^{ab} ±1.47 [3-7.5]	3.46 ^c ±0.74 [2.5-4.5]	
L_{qt}_RILI	9.9	<0.0001***	1.74 ^{ab} ±0.21 [1.5-2.04]	1.46 ^b ±0.15 [1.4-1.7]	1.76 ^{ab} ±0.23 [1.4-2]	2.40 ^c ±0.43 [1.8-2.8]	1.87 ^a ±0.16 [1.6-2.05]	1.98 ^a ±0.15 [1.8-2.04]	
L_{qt}_RSLI	4.5	0.0034**	2.00 ^a ±0.25 [1.6-2.4]	1.96 ^a ±0.19 [1.7-2.1]	2.38 ^{ab} ±0.25 [2.1-2.7]	2.50 ^b ±0.26 [2.2-2.8]	2.40 ^b ±0.29 [2.02-2.8]	2.23 ^{ab} ±0.20 [1.8-2.4]	
F_{qt}_PI	21.5	<0.0001***	16.58 ^a ± 2.37 [14-19.5]	33.50 ^c ± 2.83 [31-38]	54.00 ^b ± 5.40 [48.5-61]	44.63 ^{bc} ± 5.00 [41-52]	40.80 ^c ± 7.00 [33-52]	40.06 ^c ± 9.12 [28-59]	
F_{qt}_Pedl	2.3	0.0663	8.00 ^a ±1.30 [6.5-10]	8.40 ^a ±2.07 [7-12]	9.66 ^a ±1.33 [8.8-12]	8.65 ^a ±2.62 [5-11]	10.22 ^a ±1.28 [8.5-12]	8.11 ^a ±1.50 [6.5-11.5]	
F_{qt}_RI	9.7	<0.0001***	8.65 ^a ±2.25 [5-11.5]	17.46 ^{bc} ±4.40 [11-21.5]	19.16 ^{bc} ±2.0 5 [15.5-20.3]	18.00 ^{bc} ±2.34 [16.5-21.5]	20.22 ^b ±5.21 [12-28.5]	14.67 ^c ±1.70 [12.5-17.5]	
			X²₅						
L_{qt}_Len	17.0	0.0045*	4.50 ^{ab} ±0.55 [4-5]	6.00 ^a ±0.55 [5-6]	4.00 ^{ab} ±0.84 [3-5]	5.50 ^{ab} ±0.96 [4-6]	5.00 ^{ab} ±0.83 [4-6]	4.00 ^b ±0.60 [3-5]	
F_{qt}_RLIB r	9.2	0.0999	1.30 ^a ±0.18 [1.2-1.7]	1.60 ^a ±0.24 [1.1-1.7]	1.80 ^a ±0.40 [1.3-2.1]	1.40 ^a ±0.20 [1.1-1.6]	1.40 ^a ±0.18 [1.05-1.6]	1.30 ^a ±0.16 [1.1-1.3]	
F_{qt}_OI	15.9	0.0072*	6.35 ^a ±1.05 [5.5-8.5]	14.50 ^b ±4.42 [8-18.5]	9.50 ^{ab} ±1.30 [8.5-11.5]	10.00 ^{ab} ±7.30 [6.5-23]	12.00 ^b ±2.34 [8-12.5]	8.80 ^{ab} ±2.07 [5.5-12]	

4.4. Discussion

4.4.1. Phylogenetic relationships and polyploid evolution in the genus *Afzelia*

Our study reveals a discrepancy between nuclear and plastid phylogenies reconstructed within the genus *Afzelia* (Fig. 2). According to the two nDNA markers, there is a clear separation between two African clades: one with four tetraploid species (*A. bella*, *A. bipindensis*, *A. pachyloba* and *A. parviflora*), and the other with diploid ones *A. africana* and *A. quanzensis* (Fig. 3A). On the other hand, the three plastid regions reveal that the diploid species *A. quanzensis*, although monophyletic, is included in a clade grouping the tetraploid species, rather than sister to *A. africana*; a topology confirmed by whole plastome sequencing (Fig. 3A). While reciprocal monophyly is observed for the two diploid species, all four tetraploid species appear paraphyletic and share several haplotypes (H5 for nDNA and H6-H7 for pDNA; Fig. 2). Therefore, our molecular phylogenies do not allow us to assess speciation events among the African rain forest species, suggesting they have diverged recently and/or are in the process of introgressing.

The observed nuclear/plastid incongruence could have resulted from incomplete lineage sorting or from hybridisation events. The latter could be linked to polyploid formation involving more than one species. Many alternative scenarios could be conceived to explain the origin of polyploidization in this genus (e.g. involving unreduced gametes, triploids, Petit et al., 1999; Burton & Husband, 2000) however, only a much more detailed analysis of the nuclear genome would bring additional insights. What can be confirmed, at least for the tetraploids, is that (i) they are closely related between themselves and did not derive from *A. africana*, (ii) an ancestor of *A. quanzensis* would have provided their plastid genome but not their nuclear genome, (iii) there is no evidence of a multiple origin of the tetraploids (although we cannot completely exclude it with current data).

4.4.2. Timing of diversification of the genus *Afzelia* and rain/dry forest transitions

According to the plastome and *PEPC* E7 phylogenetic trees, time-calibrated by 27.2 Ma old fossils attributed to *Afzelia* (Pan et al., 2010), the diversification of the genus leading to extant species seems to be concentrated in two phases: (i) the divergence between *A. africana*, the Asian *Afzelia* species, and the clade including tetraploid species in the early or mid-Miocene, from 12 to 15 Ma (plastomes) or 16 to 20 Ma (*PEPC* E7), (ii) the diversification of African tetraploid and wet forest species, initiated in the late-Miocene around 7.0 Ma (plastome, 95% HDP 2.8 - 15.1 Ma) or 9.4 Ma (*PEPC* E7, 95% HDP 3.5 - 18.8 Ma). In fact, our gene trees do not allow us to assess speciation times between tetraploid species because they are paraphyletic and share many haplotypes. However, our gene trees are still indicative of the time frame of diversification of the tetraploids taken as a whole. It is interesting to note that a fossil fruit from Uganda attributed to the tetraploid *A. bipindensis* has been dated around 5 - 6.5 Ma (Dechamps et al., 1992), which is compatible with the MRCA found for the tetraploid species. This tempo of diversification of the genus *Afzelia* is consistent with evidence from several plant and animal lineages suggesting that Guineo-Congolian rain forest species originated after 10 Ma (Plana, 2004). One classical

hypothesis to explain the diversification of tropical species is that past climate changes (e.g., the progressive global cooling since the Miocene; Zachos et al., 2001), drastically modified the distribution of ecosystems and could have favoured species diversification, as hypothesised in Leguminosae (Pfeil et al., 2005; Cannon et al., 2010). In *Erythrophleum*, another Leguminosae genus that includes African rain forest and dry forest species as well as Asian species (all diploid), Duminil et al. (2015) reported a diversification during the late-Miocene and Pliocene (3 to 8 Ma) using plastid and nuclear gene trees. However, these authors detected a more recent diversification (late-Pliocene and Pleistocene, 0.6 to 4 Ma, for the African species) when they reconstructed a species tree using several nuclear genes. This contradiction between species trees and gene trees could be explained by the slow rate of coalescence in organisms with a long generation time, such as trees, favouring parphyly.

Afzelia is included in a clade of mostly Asian tropical tree species (Bruneau et al., 2008), so African *Afzelia* may originate from Asia. However, Asian *Afzelia* do not occupy the most basal position in the phylogenies, suggesting forth and back migrations between Asia and Africa, although data on more loci would be required to test this idea. The alternation of cold and warm periods could explain successive contraction and expansion of rain forests, with persistence in refuge areas (Maley, 1991, 1996; Dauby et al., 2014). Such phenomenon may have acted as a speciation pump for tetraploids but more detailed phylogeographical data are needed to confirm this hypothesis. The fragmentation induced by past Quaternary climate changes could have favoured the habitat shift between rain and dry forests species, combined with the phenomenon of polyploidization. However, if tetraploids have a unique origin as supported by our data, the correlation between ploidy and dry/rain forest habitat may be spurious and due to niche conservatism after an initial niche diversification event coinciding with the polyploidization. As diploid dry forest species are basal while tetraploid rain forest species form a derived clade according to nuclear data, the rain forest *Afzelia* species could originate from dry forest species. However, an alternative scenario with a rain forest dwelling ancestor cannot be excluded. Firstly, we can imagine a polyploidization scenario where the nuclear genome of tetraploids may derive from an extinct diploid species that could have already been adapted to rain forests. Secondly, Asian *Afzelia* and the sister genus *Intsia* are not dry forest trees (Asian *Afzelia* species occur in deciduous or inundated forests, *Intsia* species are found in coastal or mangrove forests). Thirdly, the *Afzelia* fossil of 27 Ma discovered in Ethiopia came from a riparian forest ecosystem (Pan et al., 2010).

4.4.3. Genetic and morphological species delimitation in *Afzelia*

From the patterns obtained from both plastid and nuclear markers, we find that each diploid species is monophyletic with high posterior probabilities while tetraploid species form a monophyletic group whose internal resolution is so shallow that not a single clade can be recognized and several tetraploid species share nDNA or pDNA haplotypes (Fig. 2-3). This low potential of pDNA and nDNA to discriminate tetraploid species could be due to taxonomic problems in species delimitation and/or to the retention of ancestral polymorphism. It is worth noting that the time needed to reach reciprocal monophyly can be very long in long-living organisms like canopy trees, and this effect is reinforced in polyploids. Indeed,

coalescence theory shows once a diploid population splits in two reproductively isolated populations (speciation event) of effective size N_e , at least $5 N_e$ generations are needed to reach reciprocal monophyly at most nuclear genes (Hudson & Coyne, 2002). In the case of an outbreeding autotetraploid (tetrasomic inheritance), c. $10 N_e$ generations are needed. Thus, assuming a N_e of at least 5,000 and a mean generation time of ca. 200 years, it is not unlikely that million(s) of years may be needed after a speciation event before reaching reciprocal monophyly in our tetraploid species. Therefore, species can be paraphyletic, similar to what Dainou et al. (2014) as well as Pennington and Lavin (2016) found in their species delimitation studies.

Our morphological analyses (with vegetative traits) supported that *Afzelia* species can be ordinated into two major groups, congruent with those revealed by our nDNA molecular phylogeny. Despite the morphological differences between dry and rain forest species, they have similarities on floral and seeds traits (data on colour of petals and seeds characteristics not available in herbarium), related potentially to similar pollination mechanisms. Overall the tetraploid species do not appear well differentiated morphologically (with the exception of *A. pachyloba*, not included in our analysis due to a lack of fertile material, but characterized by small leaflets).

4.5. Conclusion

This work is the first, to our knowledge, to assess whether polyploidization could be involved in habitat shift in tropical trees. Our genetic and morphological data on African *Afzelia* species indicate that while diploid species are well delimited, this is not the case for most of the tetraploid species. This pattern is coherent with our molecular dating suggesting that tetraploids diversified more recently than diploids. African *Afzelia* show a strong association between species diversification, polyploidy and habitat specialisation, suggesting that the differentiation between the savannah-dwelling diploid species and the forest-dwelling tetraploid species might be related to ecological gradients or past environmental changes. However, because polyploids form a single clade, this ploidy-habitat association lacks phylogenetic independence and no causal link can be inferred. Additional studies on tropical genera with varying ploidy levels are needed to test if polyploidization can facilitate a shift of habitat in the tropics, as was shown for example in arctic regions (Brochmann et al., 2004).

4.6. Data Accessibility

DNA sequences have been deposited in GenBank under the following accession numbers: *psbA/trnH*: KX657797-KX657827; *ndHF84F/ndHF713R*: KX690241-KX690271; *trnL*: KX690210-KX690240; *PEPC* E7: KX690272-KX690288; *ITS2*: KX690289-KX690303; Plastomes: KX673213-KX673214.

CHAPITRE 5

SPATIAL GENETIC STRUCTURE IN AFRICAN *AFZELIA* (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEA) SAVANNAH SPECIES : EVIDENCE OF RECENT COLONISATION AND EXPANSION

Le chapitre précédent a montré, à partir des divers marqueurs, que les deux espèces de savannes étaient génétiquement et morphologiquement bien différenciées. Diploïdes, leur divergence remonterait au Miocène. Le présent chapitre tente de retracer l'histoire des deux espèces en lien avec les changements climatiques passés en utilisant des marqueurs microsatellites.

« D'une certaine façon, la génétique n'est qu'une mémoire. Celle de notre évolution, incrustée dans notre chair. »

Jean-Christophe Grangé

5. Spatial genetic structure in African *Azelia* savannah species (Leguminosae, Caesalpinioideae): evidence of recent colonization and expansion

Abstract

Spatial Genetic Structure (SGS) and phylogeographic studies of tropical savannah tree species provide a useful approach for studying the impact of past climate change on the current diversity of Sudanian and Zambebian species. Here, we examine the level and structuring of genetic diversity across the geographic range of two savannah woodland sister trees, *Azelia africana* and *Azelia quanzensis*. We used variation in nuclear microsatellites DNA (nSSR) to study the SGS and phylogeography of these species by genotyping: 241 individuals of *A. africana* and 113 individuals of *A. quanzensis*, sampled across their natural ranges and in herbarium. Individual-based bayesian clustering of nSSR genotypes identified two genetic clusters that correspond to the two species. There was no pattern of geographic structuring within each species. At the level of each species, we found no evidence of inbreeding (selfing rate $\sim 0\%$). The spatial genetic structure at large scale (S_p statistic = 0.006 and 0.007 for *A. africana* and *A. quanzensis* respectively) was consistent with isolation-by-distance expectations, showing that gene dispersal is spatially limited in these two species. Phylogeographic analysis using coalescent simulations indicated a recent expansion for the two species, suggesting range expansion in savannah of Sudanian and Zambebian regions, possibly during the Pleistocene period.

Keywords: microsatellite markers; spatial genetic structure; phylogeography; savannah; Africa; *Azelia africana*; *Azelia quanzensis*

5.1. Introduction

Understanding the patterns and origin of the genetic diversity distribution of tropical tree species is fundamental for their conservation. In plant species, patterns of spatial genetic structure (SGS) are largely determined by their biological traits (such as their seed and pollen dispersal mechanisms) and historical factors (eg. past climatic oscillations). This SGS is generally based on the isolation-by-distance model which describes that two individuals are more likely to genetically resemble each other if they are geographically close (Loveless & Hamrick 1984, Levin et al., 2003). Under these conditions, SGS at fine and large scale will be able to provide insights on the response of individuals, populations and species to ecosystem perturbation and climate change.

Quaternary climate changes, characterized by alternating glacial and interglacial cycles (alternation of cold and warm periods), have played a major role in plant diversification (Hewitt, 2000). During glacial phases, the climate in tropical Africa was drier and cooler, causing an expansion of savannah and a contraction of lowland tropical rain forests in small and distinct areas (theory of forest refugia – Maley, 1996). In fact, during the glacial period, the extension of the savannah to the benefit of the humid forests probably led to shrinkage of the savannah at extreme latitudes to the advantage of steppes or desert (Lioubimtseva et al., 1998). Conversely, during the interglacial period, savannahs would have lost ground to the advantage of dense forests but could have spread to more extreme latitudes (Quézel, 1965; Lézine, 1989; Waller & Salzmann, 1999; Salzmann et al., 2002; Vincens et al., 2006; Watrin et al., 2009). These movements may have had a significant impact on the vegetation but without necessarily creating savannah fragmentations (as for forests), except for a separation between Sudanian and Zambezan (but with contact via East Africa). Under this assumption, there may be less likely to have genetic discontinuities within savanna species (at least at the intra-Sudanian or intra-Zambezan level). The case of *Vitellaria paradoxa*, which shows different genetic clusters (Allal et al., 2011), might be an exception possibly due to factors specific to this species and not to the history of Sudanian vegetation.

Phylogeographic approaches, by relying on molecular markers, allow studying the impact of past climate changes on species evolutionary history. Indeed, climate-driven demographic changes have left signatures in species genomes. These signatures can be used to detect past events of population fragmentation and colonization processes using coalescent simulations (Petit et al. 2003; Taberlet et al. 1998). In plants, chloroplast DNA (pDNA) is commonly used to infer the phylogeography of species (eg. Dainou et al., 2010; Duminil et al., 2010). A complementary approach is to use neutral genetic markers such as nuclear microsatellites (nSSR). These markers have proved to be valuable, efficient and cost-effective tools in the characterization and evaluation of SGS and phylogeography within and between species.

Most phylogeographic studies on tropical African tree species have been focused on the Guineo-Congolian region (Ayele et al., 2009; Lowe et al., 2010; Budde et al., 2013; Dainou et al., 2014; Duminil et al., 2015; Demenou et al., 2016). Only few phylogeographic studies have been conducted in Sudanian and Zambezan savannah tree species, so that the effects of historical factors on species evolutionary

history in savannah regions are still largely undocumented. To our knowledge, only three Sudanian species have been genetically investigated at large scale: the baobab, *Adansonia digitata*, (Tsy et al., 2009; Kyndt et al., 2009); the shea tree *Vitellaria paradoxa*, (Allal et al., 2011); the African Mahogany *Khaya senegalensis*, (Sexton et al., 2015) and two Sudano-Zambeian species: the Arabic gum species, *Acacia senegal* (Odee et al., 2012) and *Acacia nilotica* (Wardill et al., 2005). Some of these species showed evidence of range expansions during the Last Glacial Maximum (LGM) (Sexton et al., 2015) while others showed evidence of fragmentation probably linked to the presence of geological and climatic barriers (e.g. Tsy et al., 2009; Allal et al., 2011; Odee et al., 2012). A high but contrasted level of differentiation was revealed among *V. paradoxa* populations with a clear phylogeographic signal, with both nuclear and chloroplast simple sequence repeats, separating western and eastern populations (Allal et al., 2011). Similar findings showed a significant geographic structure of *A. senegal*, with the major division separating East and Southern Africa populations from those of West and Central Africa (Odee et al., 2012). It is therefore necessary to study several models to help understand the impact of the past climate changes on African savannah species.

Afzelia (Leguminosea) is a palaetropical genus represented by woody species. In Africa, seven species are currently described and they are either found in savannah (three species) or in forests (four species). The two savannah species present an allopatric distribution (Donkpegan et al., 2014). *A. africana* Sm. ex Pers occurs in the Sudanian region (from Senegal to Tanzania; Aubréville 1968; Geerling 1982) and *A. quanzensis* Welw. in the Zambeian region (from southern Somalia to northern South Africa). According to a recent phylogeny of African *Afzelia*, the genus *Afzelia* is estimated to have appeared in the open habitats (woodlands and savannahs) of Africa since the Miocene (c. 14.5 or 20 Ma, Donkpegan et al., 2017). This period corresponds to the formation of savannas, on the ecological stage about eight million years ago with the near-synchronous expansion of C4 grasses around the world (Cerling et al., 1997; Beerling and Osborne, 2006). As the *Afzelia* species have a widespread distribution, they are ideal models to examine the potential influence of Quaternary climate changes.

In this study, our main objectives are: (i) to characterize the spatial genetic structure of *A. africana* and *A. quanzensis*, using nuclear microsatellites (nSSR), and to (ii) understand the origin of these patterns by confronting different demographic scenarios using Approximate Bayesian Computation (ABC) approaches. More specifically, we addressed the following questions: (1) How is distributed the genetic diversity within each of the species? Do some differentiated intra-specific genetic clusters exist? (2) Does the influence of past climate dynamics have left their signatures on the level and distribution of genetic variation within African savannah trees.

5.2. Materials and methods

5.2.1. Study species

Afzelia africana is characteristic of the transition zone between the Sudanian region and the Guinea-

Congolian region (Ahouangonou et al., 1995; Gerard et al., 2001). It stretches from savannah to dry forests. It can also be observed in some semi-deciduous forests, but at very low tree densities (Satabié, 1994). *A. africana* has wide ecological amplitude to various climatic conditions but it prefers areas with > 900 mm annual rainfall. It can be found up to 1400 m elevation in Central Africa. It occurs in Sudanese region both in dry savannah and in gallery forests (Aubréville, 1959). The fruiting period lasts six to eight months and fruits may persist on trees for the following six months (Bationo et al., 2001; Ouédraogo-Koné et al., 2008). Seeds are dispersed by birds (mainly hornbills) and rodents (*Proechimys* spp.) (Bationo et al., 2001; Gerard et al., 2011).

Afzelia quanzensis is associated with Zambezian savannah, from Somalia biogeographic region to Kwazulu Natal. In Kenya, this taxon mainly occurs in the semi-deciduous coastal forests region (Brummitt et al., 2007). It is a deciduous, medium to large-sized tree, usually 12-15 m in height but reaching 35 m under ideal conditions of temperature (Coates-Palgrave, 2002). The species is drought resistant but frost sensitive. Its presence is also reported in dry forest, usually in deep sandy soils but also on rocky ridges (Jacana, 1997). The large woody dehiscent pods hold six to ten hard, black seeds with an edible, red aril at the lower end (Jacana, 1997; Gerhardt and Todd, 2009). Squirrels predate the seeds while monkeys and birds (mainly hornbills) act as dispersers (Van Wyk & Van Wyk, 1997; Gathua, 2000).

Afzelia species are hermaphrodite trees and the inflorescences are in panicles, solitary, terminal and axillary of upper leaves. The flowers have a large petal, more or less long, with a slightly circular blade. The pollination mechanism could be entomophile in both species, as reported in *A. bipindensis* (a forest species) by field observations (Doucet J-L., personal communication).

5.2.2. Sampling strategy, DNA isolation and genotyping

Samples were collected directly in the field or in herbaria (National Herbarium of the Netherlands and the Botanical Garden of Meise and ULB in Belgium). Our sampling covers the whole known distribution of the two species in the Sudanian and Zambezian+Somalia regions. Thus, individuals of *A. africana* from West and Central Africa (41 locations) have been sampled, as well as 24 locations of *A. quanzensis* in South and East Africa (**Appendix S3**). Plant material sampled in the field was dried in silicagel.

Cambium or leaf material from 241 individuals of *Afzelia africana* and 113 individuals of *Afzelia quanzensis* were collected in West and East Africa respectively. Total DNA was extracted using the NucleoSpin plant kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) or the DNeasy 96 Plant Kit (QIAGEN, GmbH, Germany) for the fresh material or using the CTAB protocol (Doyle and Doyle, 1987) for the herbarium material. Six microsatellite markers isolated from the genome of *A. bipindensis* (Donkpegan et al., 2015) were amplified using two PCR multiplexes developed by Donkpegan et al. (2015) with the same protocols.

5.2.3. Data analysis

5.2.3.1. Characterizing spatial genetic structure

We used a clustering method implemented in STRUCTURE 2.3.1 to detect any putative genetic discontinuity within *A. africana* and *A. quanzensis* samples (Falush et al., 2003). This method assigns individual multilocus genotypes (data consisting of unlinked markers) probabilistically to a user-defined number K of genetic clusters, in order to approach linkage equilibrium and Hardy-Weinberg equilibrium within clusters. We ran STRUCTURE 10 times for each $K=1-10$, for 1 000 000 iterations after a burn-in period of 100 000. Analyses were run with the admixture and independent allele frequency options, without considering information on the population of origin of each sampled individual. The most likely number of genetic clusters was determined by log-likelihood of the data $\ln(P)$ and ΔK as described in Evanno et al. (2005). Individuals were assigned to a given cluster when their ancestry coefficient q for that genetic cluster was higher than 80%.

5.2.3.2. Population genetics parameters and selfing rate estimation

In order to characterize the level of diversity within each species, we computed the allelic richness (N_a), the effective number of alleles (N_{ae}) following Nielsen et al., (2003), the observed heterozygosity (H_o), the expected heterozygosity (H_E), the inbreeding coefficient (F) and the genetic differentiation based on allele identity with the statistic F_{ST} . Significance test after 1000 randomizations of gene copies among individuals were performed using SPAGeDi 1.5a (Hardy, 2015). For these analyses, we used, for both species, populations with at least 5 individuals sampled: 14 and 3 populations for *A. africana* and *A. quanzensis* respectively (Table 1). Null allele frequencies were estimated with INEST 1.0 (Chybicki & Burczyk, 2009), which also provided a corrected estimation of the inbreeding coefficient in a population.

Selfing rate (S) was estimated in major local populations (samples ≥ 25 individuals – Table 1), based on standardized identity disequilibrium assuming a Mixed Mating Model (i.e. a proportion s of selfing and $1-s$ of random outcrossing) with standard errors (SE) estimated by jackknifing over loci (see method described in Hardy, 2015 and David et al., 2007).

5.2.3.3. Isolation-by-Distance at individuals and populations levels

At individuals level, the distribution of genetic diversity within each species was further analysed using kinship coefficients between pairs of individuals i and j (F_{ij}) estimated using Nason's estimator (Loiselle et al., 1995). The standard error over loci was estimated using a jackknife method, significance was tested by 10,000 permutations of the spatial locations of individuals. To visualize SGS, F_{ij} values were averaged over a set of distance classes (d) according to a geometric progression of eleven boundaries: 0–1, 1–2, 2–5, 5–10, 10–50, 50–100, 100–200, 200–500, 500–1000, 1000–2000 and >2000 km for *A. africana* and five for *A. quanzensis*: 2–5, 5–10, 10–300, 300–500, >500 km giving $F(d)$. F_{ij} values were also regressed on

$\ln(d_{ij})$, where d_{ij} is the geographical spatial distance between individuals i and j , to provide a regression slope, b . Significance was tested by 10,000 permutations of the spatial locations of individuals. We used S_p -statistic (Vekemans & Hardy, 2004) to quantify the strength of spatial genetic structuring: $S_p = -b/(1 - F_1)$, where F_1 is the coancestry between neighboring individuals [approximated by $F(d < 2 \text{ km})$ for the first distance interval], to avoid bias from sampling effects.

At populations level for *A. africana* only, we calculated pairwise geographic and genetic distances from latitude/longitude coordinates. We calculated and tested the correlation between $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ and the natural logarithm of geographical distances between populations using the ANOVA framework in the program SPAGeDi (Hardy & Vekemans, 2004). Statistical significance was evaluated with 1000 permutations. In fact, under Wright's isolation-by-distance model, the pairwise genetic diversity between individuals and/or populations is expected to vary linearly with the logarithm of their geographic distance on a two-dimensional space (Hardy & Vekemans, 1999; Hardy, 2003).

5.2.3.4. Test of demographic scenarios

The demographic history of each species was assessed with the 'bottleneck' statistic T_2 implemented in BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). This statistic represents an average across loci of the deviation of the actual gene diversity H_e from the gene diversity expected from the number of alleles in the population assuming mutation-drift equilibrium in a population of constant size. If $T_2 > 0$, the gene diversity excess are possibly caused by recent founder events (bottlenecks), whereas $T_2 < 0$ are consistent with recent population expansion. Simulations of the coalescent process were performed under three different mutation models: the infinite allele model (IAM), the stepwise mutation model (SMM), and the two-phase model with 70% of single-step mutations (TPM). The two latter models are considered to be more appropriate for microsatellite data. 1000 simulations were performed. Significant deviation from equilibrium gene diversity was determined using the Wilcoxon signed rank test, which is the most appropriate test when only few polymorphic loci are analysed (Piry et al., 1999).

Table 1. Genetic diversity parameters and selfing rate for two species. The number of genotyped trees N and N_a are the number of alleles per locus, (N_{ae}) is the effective number of alleles following Nielsen et al., (2003), H_E and H_O are expected and observed heterozygosity respectively, F and $F_{(null)}$ inbreeding coefficient estimated respectively with and without accounting for null alleles following the method implemented in INEst. * $p < 0.05$ indicates significant deviation from HWE. NA indicates that no estimation was provided by INEst.

	Populations	Latitude	Longitude	N	N_a	N_{ae}	H_e	H_o	F	$F_{(null)}$	Selfing (S)
<i>A africana</i>	BassilaS	2.422716	9.003749	7	3.00	2.53	0.4597	0.595	-0.327*	0	∅
	BassilaN1	2.288662	9.012252	9	4.83	4.71	0.5882	0.556	0.059	0	∅
	BassilaN2	2.273789	8.82219	11	4.33	4.28	0.5159	0.470	0.094	0	∅
	BassilaN3	1.55564	9.26719	5	3.67	3.81	0.5939	0.558	0.067	0	∅
	Lama	2.1141	6.97694	34	5.00	2.45	0.4969	0.434	0.129	0	0.33±0.16
	Natitingou	1.380811	10.278574	9	4.50	3.78	0.5610	0.444	0.218*	0	∅
	ParcW1	11.29621	5.586453	18	5.17	3.69	0.5889	0.574	0.026	0	∅
	ParcW2	1.288623	6.959226	6	3.17	3.17	0.4827	0.528	-0.105	0	∅
	Pendjari	2.990943	11.510153	25	7.17	4.35	0.6415	0.693	-0.083	0	0
	Penessoulou1	3.054323	11.478876	32	5.67	3.30	0.4829	0.458	0.052	0	0±0.1
	Penessoulou2	1.524221	10.943243	8	3.00	2.65	0.4417	0.479	-0.092	0	∅
	Notse	1.50713	9.28565	12	4.17	2.99	0.5254	0.528	-0.005	0	∅
	Ngambetica	1.65837	8.9988	7	3.83	3.08	0.5659	0.500	0.125	0	∅
Yoko	12.007311	5.430952	7	3.33	2.47	0.5000	0.524	-0.052	0	∅	
<i>A quanzensis</i>	Gede	-3.30148	39.99654	31	5.50	3.45	0.4733	0.409	0.139*	0	0±0.07
	Witu	-2.3837	40.52127	48	6.00	3.23	0.5207	0.411	0.212*	0	0±0
	Lubembe	-10.916687	22.534689	9	1.83	1.68	0.4569	0.278	0.643*	NA	∅

5.3. Results

5.3.1. Genetic diversity and structuring within each species and selfing rate

At the intraspecific level, individual-based Bayesian clustering analysis in STRUCTURE identified that all individuals belonging to each species formed a unique genetic cluster (Fig. 1). For 14 and three populations of *A. africana* and *A. quanzensis* with more than five individuals respectively, we obtained the following genetic diversity parameters. A total of 67 alleles were detected over the 6 loci for *A. africana* and the mean number of alleles per locus was 11.17 and ranged from 4 to 26 alleles. Observed and expected heterozygosity estimates per population ranged from 0.43 to 0.69 and from 0.44 to 0.64, respectively (Table. 1). For *A. quanzensis*, a total of 42 alleles were detected over the 6 loci and the mean number of alleles per locus was 7.0 and ranged from 2 to 23 alleles. Observed and expected heterozygosity estimates ranged from 0.28 to 0.41 and from 0.46 to 0.52, respectively. We found a low inbreeding coefficient for all populations ($F = 0$) after correcting for null alleles. The estimated selfing rates S for three populations of *A. africana* (Lama, Penessoulou1 and Pendjari) and two of *A. quanzensis* (Gede and Witu) were close to zero (Table 1), except for Lama population. However, no inbreeding was found in this population, suggesting the absence of selfing. Frequency-based estimates of genetic differentiation identified very low but statistically substantial differentiation among the sampled populations of *A. africana* ($F_{ST} = 0.045$; $P < 0.01$) and *A. quanzensis* ($F_{ST} = 0.078$; $P < 0.01$).

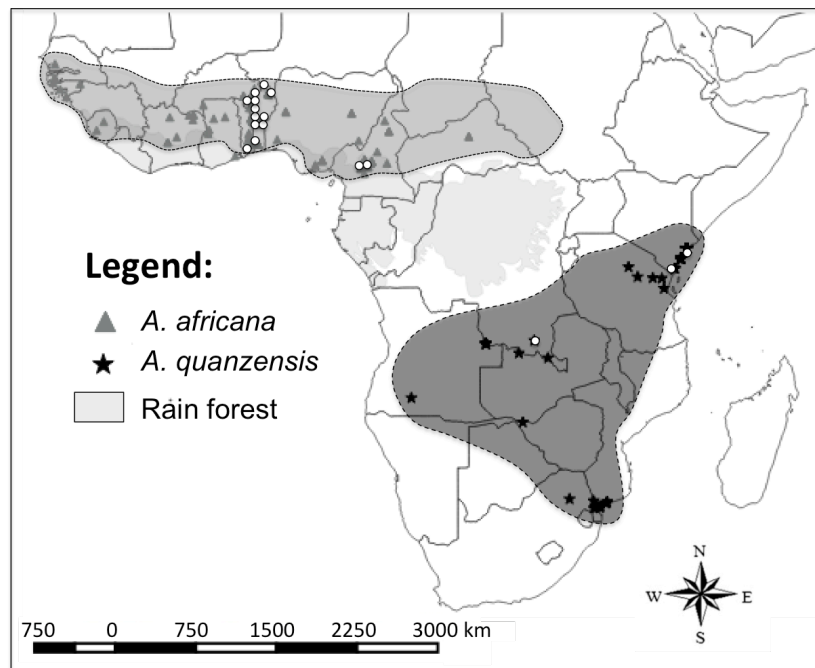


Figure 1. Synthetic map of the distribution of *A. africana* and *A. quanzensis* species in Africa. Triangle and star represent individuals genotyped at six microsatellites while circles indicates populations with at least five individuals genotyped.

5.3.2. Detection of signal of Isolation-by-Distance (IBD)

The general SGS trend in these two species, indicate a reduction of pairwise kinship with increasing geographic distance (Fig. 2). In all species, kinship for the first distance class (ca. 1000 m for *A. africana* and *A. quanzensis*) ranged around 0.05, and quickly dropped with distance, indicating a signal of isolation-by-distance. The regression slope b_{Ld} of the pairwise kinship coefficient on the logarithm of spatial distance was significant and negative in *A. africana* ($b_{Ld} = -0.005$; $P < 0.001$) and *A. quanzensis* ($b_{Ld} = -0.007$; $P < 0.001$).

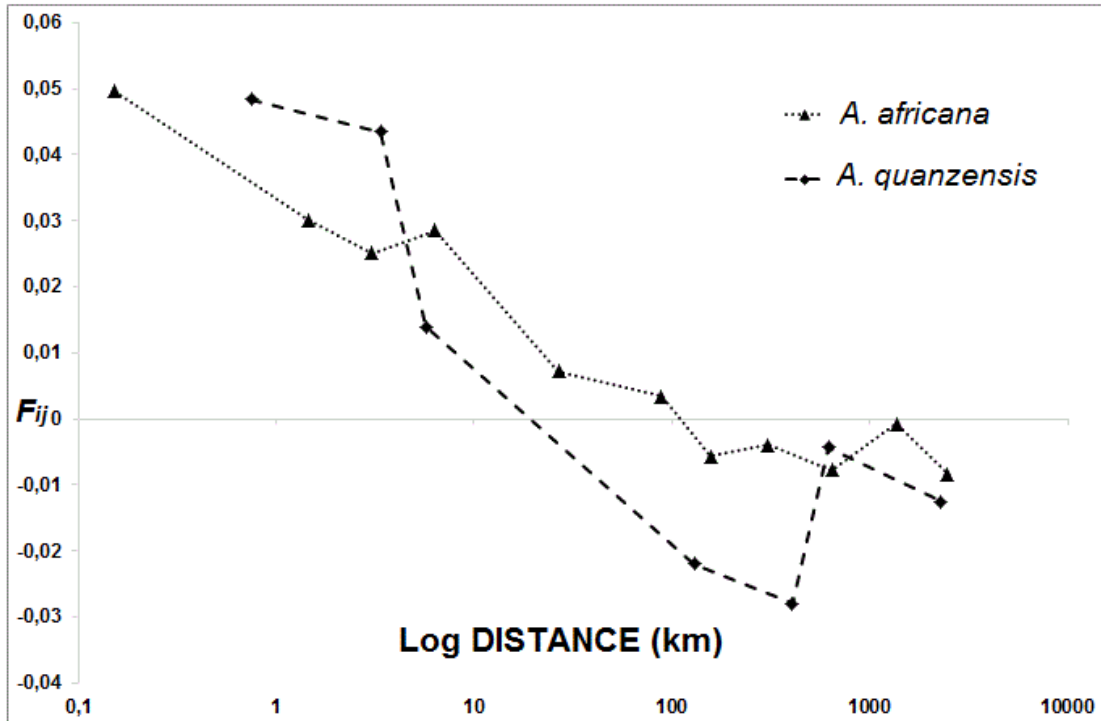


Figure 2. Average kinship-distance curves (F_{ij} plotted against spatial distance) for each species: *A. africana* and *A. quanzensis*.

$F_{ST} / (1 - F_{ST})$ matrices were compared with the natural logarithm of geographical distance between pairs of populations from the West and Central African populations of *A. africana* (Fig. 3). These results show no spatial genetic structure and suggested no isolation-by-distance pattern between *A. africana* populations, contrary to the pattern observed at the individual level.

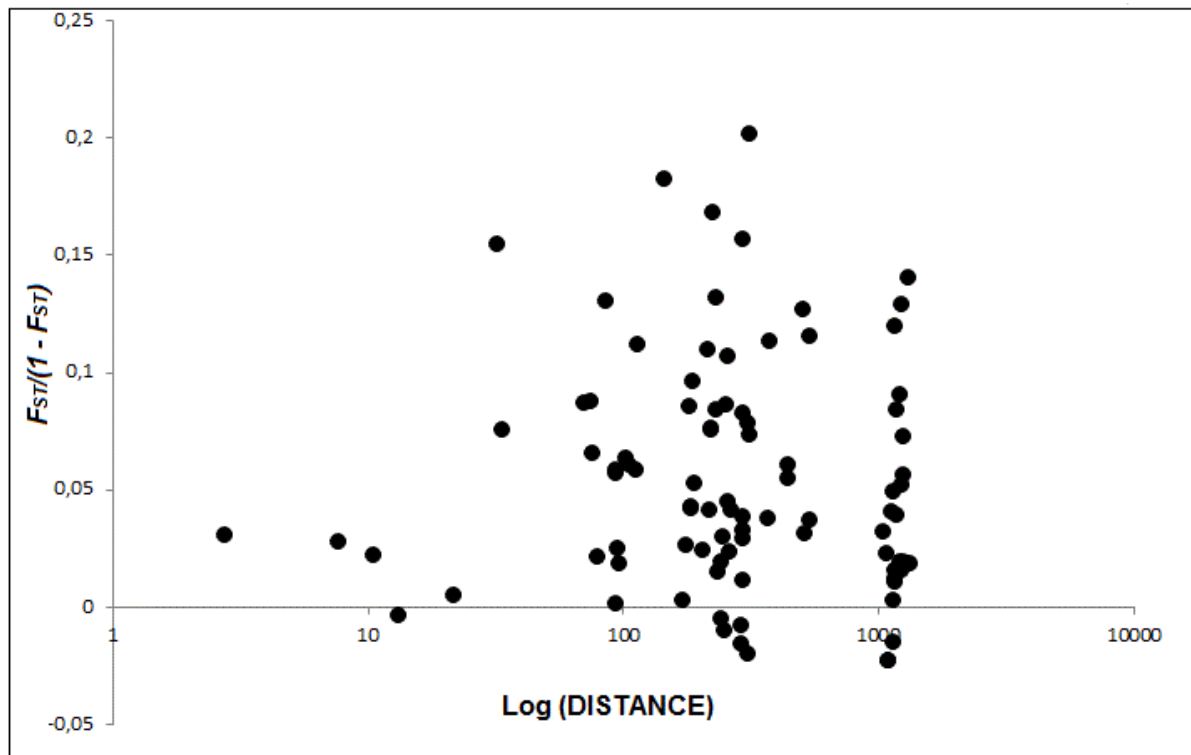


Figure 3. Scatter plot showing the relationship between $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ and the natural logarithm of geographical distances between populations of *A. africana*.

5.3.3. Demographic event occurring within each species

Under the three models implemented in BOTTLENECK (IAM, TPM and SMM), all species showed a negative value of T2 and a significant heterozygosity deficit ($P < 0.01$) for *A. africana* and non-significant for *A. quanzensis* after Wilcoxon tests. These results suggest recent population expansion for both species (Table. 2 – **Appendix S4**).

Table 2. Demographic analysis implemented with BOTTLENECK, Gene diversity-excess tests of each nSSR genetic clusters of *Azelia africana* and *Azelia quanzensis*.

	IAM		TPM		SMM	
	P (Constant)	T2	P (Constant)	T2	P (Constant)	T2
<i>A. africana</i>	0.000	-4.509	0.000	-10.818	0.000	-21.106
<i>A. quanzensis</i>	0.000	-4.397	0.000	-8.152	0.000	-14.143

P (constant) = probability of constant population size; T2= (He-HEXP/SD); IAM infinite allele model; TPM two-phase model, SMM stepwise mutation model

5.4. Discussion

Bayesian analyses with nuclear microsatellite markers indicate that *A. africana* and *A. quanzensis* were not structured in distinct genetic clusters within their respective natural ranges. Our results are consistent with those observed in other savannah tree species, namely Sexton et al., (2015) and Odee et al. (2012) who found no spatial genetic structure in *Khaya senegalensis* and *Acacia senegal* populations; and contrast with other studies that reported that past geological and climatic barriers may have caused genetic differentiation in taxa such as *Adansonia digitata* and *Vitellaria paradoxa* in West African savannah (Tsy et al., 2009; Allal et al., 2011).

5.4.1. Comparison of genetic diversity of *Afzelia* with other tropical species

Comparison of gene diversity parameters for nuclear microsatellite markers showed that the genetic diversity of *A. africana* ($H_E = 0.46\text{--}0.66$) and *A. quanzensis* ($H_E = 0.40\text{--}0.66$) population was of the same order than in other African savannah tree species such as *Khaya senegalensis* ($H_E = 0.44\text{--}0.71$; Sexton et al., 2015), *Vitellaria paradoxa* ($H_E = 0.42\text{--}0.62$; Allal et al., 2011) and *Acacia senegal* ($H_E = 0.63\text{--}0.70$; Omondi, et al., 2010). The diversity of these species are much greater than that of *Adansonia digitata* ($H_E = 0.27\text{--}0.35$; Kyndt et al., 2009). More generally, comparisons of gene diversity parameters with rain forest tree species show that this genetic diversity is also similar. This is the case of *Aucoumea klaineana* ($H_E = 0.38\text{--}0.55$; Born et al., 2008), *Distemonanthus benthamianus* ($H_E = 0.470\text{--}0.567$; Debout et al., 2011), *Baillonella toxisperma* ($H_E = 0.56\text{--}0.58$; Ndiade-Bourobou et al., 2010) and *Milicia excelsa* ($H_E = 0.53\text{--}0.56$; Bizoux et al., 2009). Finally, these results indicate that the two savannah species of *Afzelia* exhibit a level of nuclear gene diversity similar to that of many tropical tree species.

The few significant F values obtained with SPAGED1 are probably due to null alleles. Indeed, when using INEST, we obtained corrected values of F ($F=0$) suggesting that the studied populations of the two species did not inbred and are at Hardy–Weinberg equilibrium. Using the Mixed Mating Model approach (Hardy, 2015), estimates of selfing rate were close to zero for each species in the five studied populations. Thus, inbreeding and selfing rates remain very low in adults' populations of *A. africana* and *A. quanzensis*.

5.4.2. Spatial genetic structure in the two species

With nSSR, we evidenced a pattern of IBD in the samples of *A. africana* and *A. quanzensis*: kinship between individuals was shown to decrease with spatial distance in both species. The significant SGS observed in these two species can be explained by limited gene dispersal within each species. These results are expected considering the fact that their diaspores are heavy and also seed dispersal is mainly done by rodents (*Proechimys* spp.), monkeys (*Cercopithecus albogularis*) and birds (mainly hornbills) (Gathua, 2000; Bationo et al., 2001). The strength of the SGS, evaluated by the Sp-statistic ($Sp = 0.006$ for *A. africana* and $Sp = 0.007$ for *A. quanzensis*) was similar to most values reported for rodent-dispersed

tropical tree species, and lower than those observed in bat or bird dispersed species (Hardy et al., 2006; Dick et al., 2008; Bizoux et al., 2009; Kyndt et al., 2009).

In contrast to the SGS detected between individuals, no IBD pattern was detected among *A. africana* populations, indicating that the IBD pattern occurs essentially at a local scale, within population.

5.4.3. Demographic history of the populations

Different scenarios were tested to reconstruct the demographic history of each species. Signals of population expansions were detected in both species: significant heterozygosity-deficiency, indicative of population expansions, was detected under the three mutation models of BOTTLENECK (IAM, SMM and TMM). Given these results, it is highly plausible that during the LGM, savannahs have not experienced major upheavals leading to their fragmentation as other studies suggest (Bryja et al. 2010; Odee et al. 2012, Sexton et al., 2015). However, additional data (on other savannah species) will be needed to confirm this assumption.

The absence of nuclear genetic discontinuity within each species show that their populations had not had time to differentiate substantially (Fig. 3) despite the signal of isolation-by-distance observed at a local scale (corresponding to an intrapopulation differentiation).

In Sudanian savannah, several scenarios can explain the lack of genetic structure, with respect to gene dispersal mechanisms of *A. africana*. First, if we make the assumption that this ecosystem have formed refuges along sections of the major river systems during the glaciations (eg. in *Vitellaria paradoxa*), *A. africana* has been much more affected than *V. paradoxa* by past climate shifts and have survived at the level of a single fluvial refuge from which it would have recently recolonised to its current distribution. Second, the past disturbances might have not had a significant impact on these savannahs, causing thereby their non-fragmentation as reflected in *A. africana*. Under these conditions, the strong differentiation detected in *V. paradoxa* would be related to the life history of this species. In addition to human activities, other gene flow barriers (Adamawa Highlands) have been able to favorise differentiation in *V. paradoxa* (Allal et al., 2011). Additional phylogeographic studies with several plants models, distributed in the same area, are necessary to identify the best hypothesis.

Except for the study of *Acacia senegal* and *Acacia nilotica*, conducted from the Sudanian region to the Zambezan region (Odee et al., 2012; Wardill et al., 2005), no other large-scale phylogeographic studies were conducted in the Zambezan region, so it is difficult to compare our findings in order to propose a scenario. However, to our knowledge, all phylogeographical studies made in the Zambezan region on animal models show evidence of fragmentation and presence of barriers to gene flow potentially related to past climate changes in this area (eg. Lorenzen et al., 2010 for common eland antelope, *Taurotragus oryx*). Barlow et al. (2013) found five divergent mitochondrial lineages for a savannah viper species (*Bitis arietans*) in Eastern and Southern Africa. McDonough et al. (2015) also showed, for a widespread rodent

(*Gerbilliscus leucogaster*), evidence of the fragmentation of this area into three distinct genetic clusters. However, since gene flow barriers are not the same in animals as in plants, several phylogeographic studies with plants models, distributed in this climatic area are also needed.

5.5. Conclusion

The microsatellite data analyses of *Afzelia* savannah species have shown that both species did not exhibit genetic differentiation across their Sudanian and Zambebian ranges, suggesting a recent colonisation and expansion events characterised by extensive gene flow within each species.

CHAPITRE 6

COMPARATIVE PHYLOGEOGRAPHY OF *AFZELIA* (LEGUMINOSAE- CAESALPINIOIDEA) TETRAPLOID SPECIES

Sur le même plan que le chapitre précédent, et à partir des divers marqueurs, les quatre espèces de forêts étaient génétiquement et morphologiquement mal différenciés dans l'analyse présentée au chapitre 4. Tétraploïdes, leur divergence serait plus récente que celle des diploïdes. Le présent chapitre tente de retracer l'historique de délimitation des quatre espèces en utilisant des marqueurs microsatellites.

« Tout prend beaucoup plus de sens à la lumière de la phylogénie. »

Douglas & Pamela Soltis

6. Comparative phylogeography of *Afzelia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) tetraploid species

Abstract

Phylogeographic studies are crucial to understand the history of the structuring of the genetic diversity in contemporary populations of rainforest trees. Such work has been rarely documented in polyploid species. The objective of this study is to investigate spatial genetic structure and genetic differentiation patterns among four tetraploid rainforests species belonging to the genus *Afzelia* (*A. bipindensis*, *A. bella*, *A. pachyloba* and *A. parviflora*). Genotyping of 302 trees at 11 microsatellite loci was performed. We emphasized evidence of hybridization between the four putative species. The high levels of admixture is probably linked to the inadequate taxonomic delimitation, rather than to physical barriers to gene flow. Our results also highlight that current taxonomic delimitation must probably be revised in tetraploid *Afzelia*.

Key words: *Afzelia* – polyploidy – spatial genetic structure – Central Africa rain forests.

6.1. Introduction

The African tropical rain forests contain high levels of species diversity. Their current distribution in tropical Africa seems to have been largely influenced by the alternation of glacial and interglacial periods in the Pleistocene, especially in that of last glacial maximum (LGM, 24 k – 12 k years ago) (Morley 2000; Dupont et al., 2000; Plana 2004; Miller & Gossling, 2014). The fossil pollen records suggest that during the glacial periods, savannas expanded and rainforests withdrew to isolated refugia, whereas in the interglacial periods the rainforests extended up, possibly reaching a distribution slightly greater than today, as it was shown during the African Humid Period, c. 9000-5500 yr. BP (Maley 1996; Salzmann & Hoelzmann 2005; Anhof et al., 2006). To date, most studies looking at genetic structure and dynamics of African rain forest plant species have mainly focused on diploid taxa among trees (Hardy et al., 2013; Heuertz et al., 2014; Dauby et al., 2014; Demenou et al., 2016), Maranthaceae (see Ley et al., 2014) and palms (Faye et al., 2016).

Polyploidy, which is a major force in evolution and diversification, is more frequent in plants than in animals. It's has been demonstrated that it's a driver of speciation within the Angiosperms (Ramsey & Schemske, 2002; Wendel, 2000). Its prevalence in flora is influenced by abiotic factors such as environmental heterogeneity and past climate change that have been identified as main drivers of plants diversification (Otto and Whitton, 2000). Despite the widely recognized importance of polyploidization in plant diversification, very little is known about its contribution (combined with environmental factors) to the high diversity on the African rainforests.

Afzelia Sm. (Leguminosae) presents an interesting system in order to examine biogeography and diversification across African rainforests. Recent studies have shown that *Afzelia* includes savannas diploid species (well differentiated between them) and tetraploid rainforests species (very similar morphologically and phylogenetically) (Donkpegan et al., 2015 & 2017). The distribution of genetic units within the geographical range of rainforest species of *Afzelia* could reflect the consequences of historical events, likely linked to forest fragmentation, during cold and dry periods occurring in the last glacial maximum in Africa (Donkpegan et al., 2017). Phylogenetic approaches based on plastid sequences and one nuclear gene found many shared haplotypes between tetraploid species which would have diversified since the late Miocene (Donkpegan et al., 2017). Hence, the forest *Afzelia* species may in fact correspond to a complex of species and the current taxonomic classification may need a revision.

In this study we tested a main hypothesis on delimitation of *Afzelia* rainforests species. Because *A. bipindensis*, *A. bella*, *A. pachyloba* and *A. parviflora* are morphologically similar and broadly sympatric, we hypothesized that gene flow would have occurred between these four species.

6.2. Materials and methods

6.2.1. Study species

Azelia forest species are distributed sympatrically in semi-deciduous and evergreen areas in Africa. Taxonomists currently recognize four forest species. Despite the fact that they are very close morphologically, some small differences distinguish them. *A. bipindensis* is a large tree with several irregular foothills at the base, rather thick, with a slightly concave profile and fully grown individuals can reach a diameter ranging from 100 to 180 cm above the foothills. *A. bella*, *A. parviflora* and *A. pachyloba* would be smaller and their diameter would not exceed 80 cm. *A. pachyloba* is mainly distinguished by its leaflets which are smaller than those of the other three species. Apart from these few distinctive features, several other morphological characteristics overlap consistently between all these species (Donkpegan et al., 2017).

6.2.2. Sampling and morphological identification

Leaf and cambium samples (dehydrated with silica gel) were collected from naturally occurring *Azelia* populations across Africa between April 2012 and August 2016.

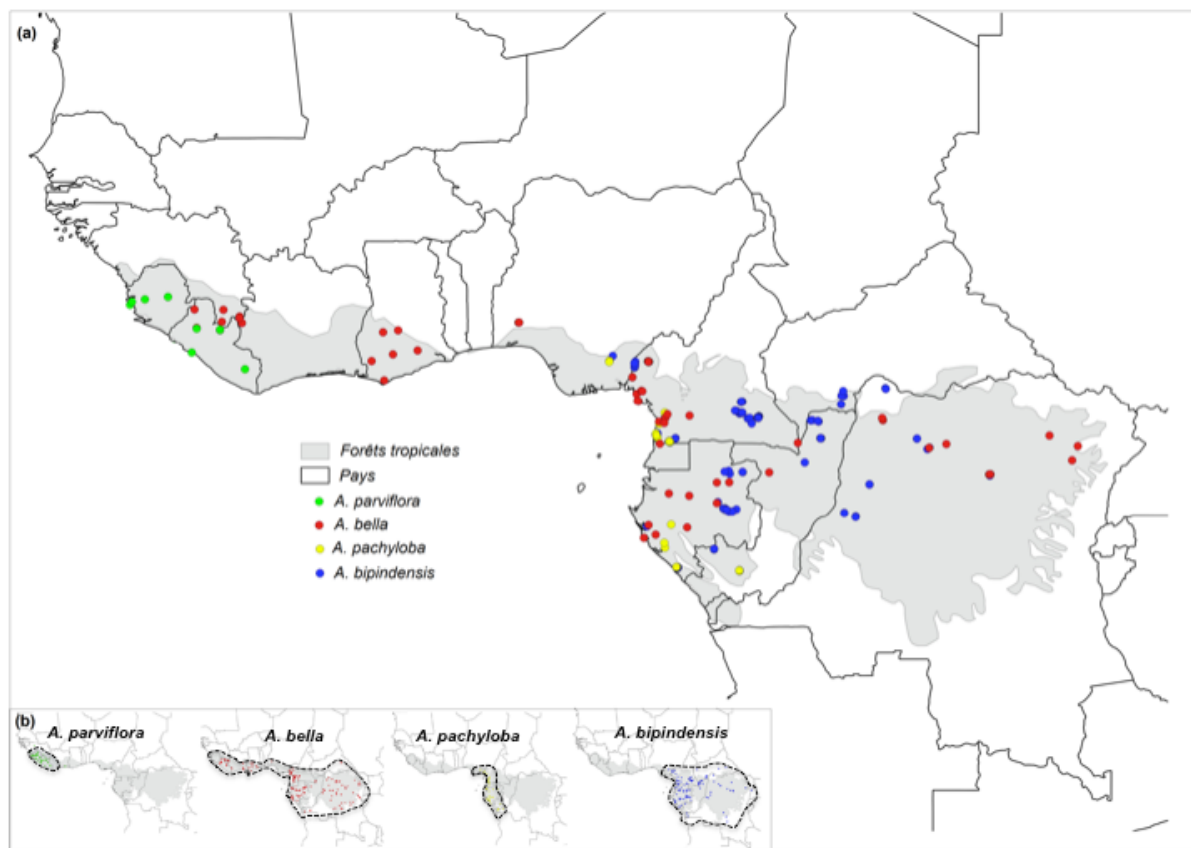


Figure 1. Sampling strategies of 302 individuals from *Azelia* forest species (a) on their geographic range (b). The species distribution maps were made from the data collected in the RAINBIO database (Dauby et al., 2016).

243 samples were collected in West and Central Africa (Fig. 1). Species were identified based on leaf or floral morphology according to Donkpegan et al. (2014). Additionally, 59 samples were obtained from the national herbarium of Naturalis (Leiden, Netherlands) and the Botanical Garden of Meise (Belgium). Overall, 302 *Azelia* samples were collected from 88 populations. Of these, 200 samples were identified as *A. bipindensis*, 66 as *A. bella*, 26 as *A. pachyloba* and 10 as *A. parviflora*.

6.2.3. Microsatellite genotyping

Genomic DNA was isolated from dried cambial tissue or leaves using the NucleoSpin plant kit (Macherey-Nagel) and the DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen), for the fresh material sampled (in silicagel) following the manufacturer's instructions. The cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol (Doyle and Doyle 1987) was used for the herbarium material. A set of 11 microsatellite loci developed for *A. bipindensis* (Donkpegan et al., 2015) were genotyped (**Table S1, Supporting information**). Fragment lengths were determined by capillary gel electrophoresis with capillary sequencer ABI 3730 (Applied Biosystems, Lennik, The Netherlands). We determined fragment size using a MapMarker® 500size standard labeled with DY-632 (Eurogentec, Seraing, Belgium). All step of genotyping and allelic dosage (on tetraploid) were carried out as described in Donkpegan et al. (2015).

6.2.4. Microsatellite data analysis

Principal coordinates (PCoA) analysis of microsatellite data was performed using POLYSAT (Clark & Jasieniuk 2011) implemented in R 2.15.3 (R Core Team 2015), based on pairwise genetic distance calculated by Lynch's methods (Lynch, 1990). POLYSAT was designed to analyse polyploid microsatellite data by assuming that the allele copy number was ambiguous in any heterozygotes.

We also analysed the microsatellite data with a Bayesian clustering approach in STRUCTURE 2.3.4 (Falush et al., 2003) to identify the most likely number of genetic clusters (K), to complement the inference of taxonomic classification. This method implements algorithms accounting for genotypic uncertainty arising from copy number variation when the data include polyploids, and we also declared the possibility that null allele occurs at each locus (i.e. an allele recessive with respect to all other alleles). Individuals were assigned to genetic clusters based on multilocus genotypes. We performed ten replicates (500 000 generations and a burn-in of 50 000 for each run) at each value of K from one to ten under the admixture model with the assumption of correlated allele frequencies among populations. Individuals were assigned to clusters based on the highest membership averaged coefficient. The ΔK was calculated based on the rate of change in the log probability of the data between successive K values (Evanno et al. 2005). Replicate runs were grouped based on a symmetric similarity coefficient of >0.7 using CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007) and visualized in DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004). We chose the optimal value of K based on the ΔK analysis of the STRUCTURE outputs.

The following population genetic parameters were calculated for each genetic cluster: the allelic richness (N_A), the effective number of alleles (N_{AE}) following Nielsen et al., (2003), the expected heterozygosity (H_E), the observed heterozygosity (H_O) and the inbreeding coefficient (F) as implemented in the program

SPAGeDi version 1.5a (Hardy 2015). Differentiation among genetic clusters and species was analysed based on allele identity with the statistic F_{ST} , or on allele size with R_{ST} . The contribution of stepwise-like mutations to population differentiation, that is, whether $R_{ST} > F_{ST}$, was investigated by testing whether the observed R_{ST} was larger than its value obtained after permuting allele sizes among allelic states (Hardy et al., 2003).

6.3. Results

The Lynch's genetic distances of all 302 individuals were calculated and scaled. The four distinct morpho-species could not be clearly separated. The first axis of the PCoA (Fig. 2) only separated *A. bipindensis* from *A. parviflora* while *A. pachyloba* was mixed with *A. bipindensis* and *A. bella*.

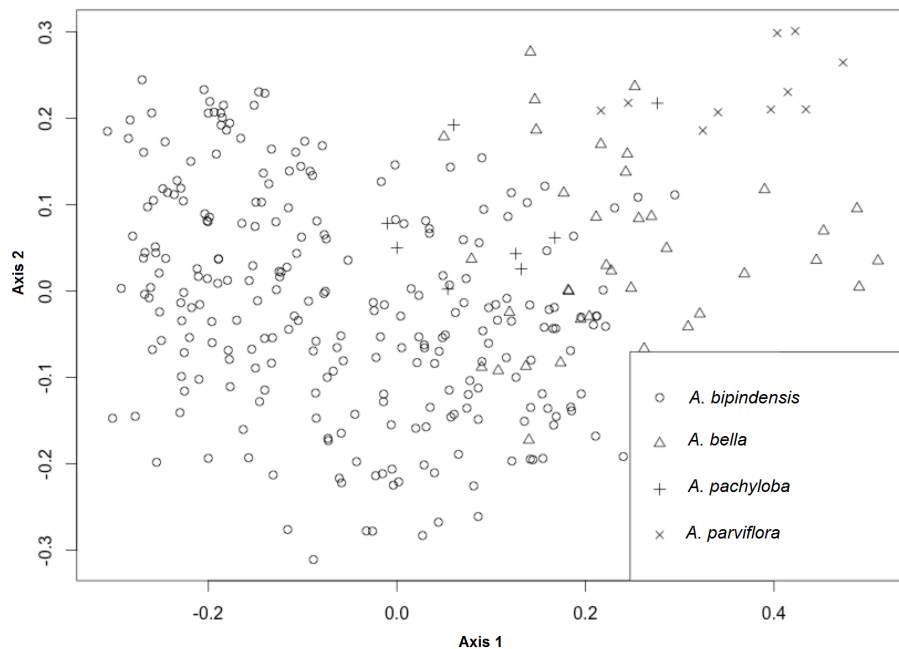


Figure 2. Principal coordinates (PCoA) analysis of microsatellite genotypes of 302 *Afzelia* individuals identified as *A. bella*, *A. bipindensis*, *A. pachyloba* or *A. bella*, based on Lynch's genetic distance

The STRUCTURE clustering algorithm showed that the log-likelihood of the data increased with the number of genetic clusters until $K = 4$. The hierarchical Evanno's delta K method also indicated that the most likely number of genetic clusters was $K = 4$ (Fig. 3). However, there was no clear-cut correspondence between taxonomic species identification and genetic clusters. Higher levels of admixture from four *Afzelia* species were found in the African rain forests, especially in Central Africa. The first genetic cluster (GC1) occurs in Lower Guinea and includes only *A. bipindensis* individuals; GC2 is presented to Upper and low Guinea and gathers all the populations from *A. parviflora* and West African populations of *A. bella*. GC3 ranges from Lower Guinea to Congolia and includes *A. bella* (Central African populations) and *A. pachyloba* which seem therefore to introgress. Finally, GC4 also ranges from Lower Guinea to Congolia and includes

A. bella and *A. bipindensis* (Fig. 4). The genetic clusters thus show more geographic structure than the taxonomic species.

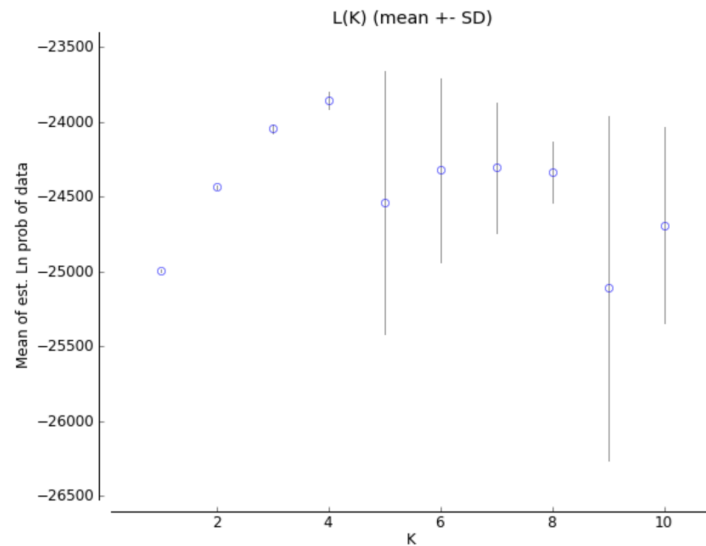


Figure 3. Determination of the number of clusters in the nSSR data set of forest *Afzelia* species using the log probability of the data between successive K values (Evanno et al. 2005), based on STRUCTURE analyses.

Table 1. Genetic diversity and differentiation parameters of the four genetic clusters inferred in rain forest *Afzelia* species (*A. bella*, *A. bipindensis*, *A. pachyloba*, *A. bella*) using 11 nuclear SSR loci (only samples assigned to a genetic cluster with a probability ≥ 0.7 were included). Differentiation: F_{ST} below and R_{ST} above the diagonal; test of phylogeographical signal (i.e. $R_{ST} > F_{ST}$) are indicated by * $P < 0.05$ and by *ns* ($P > 0.05$). Diversity: N : sample size, A : Number of alleles, H_E : expected heterozygosity corrected for sample size, F : inbreeding coefficient.

Genetic clusters	Differentiation parameters: R_{ST}/F_{ST}				Diversity parameters				
	GC1	GC2	GC3	GC4	N	A	H_E	H_O	F
GC1		0.24	0.10	0.06	103	14	0.73	0.49	0.33
GC2	0.39*		0.19	0.14	25	9	0.62	0.31	0.49
GC3	0.26*	0.13 ^{ns}		0.04	59	14	0.77	0.38	0.51
GC4	0.12*	0.11 ^{ns}	0.04*		49	18	0.84	0.72	0.14
All samples	$R_{ST} = 0.18$			$F_{ST} = 0.11$	236	22	0.82	0.49	0.39

Pairwise F_{ST} differentiation among the four genetic clusters revealed that the three sympatric genetic clusters (GC1, GC3 and GC4) were closely related (F_{ST} between 0.04 and 0.10). They were well differentiated from the west group (GC2) (F_{ST} ranging from 0.14 to 0.24; Table 1). R_{ST} values showed a higher differentiation between GC1 and other genetic clusters (GC2, GC3, GC4) with significantly larger values than F_{ST} indicating a phylogeographical signal ($P < 0.01$; allele size permutation tests; Hardy et al., 2003). Observed heterozygosity is lower than expected heterozygosity and estimates ranged from 0.31 to 0.72 and from 0.62 to 0.84, respectively.

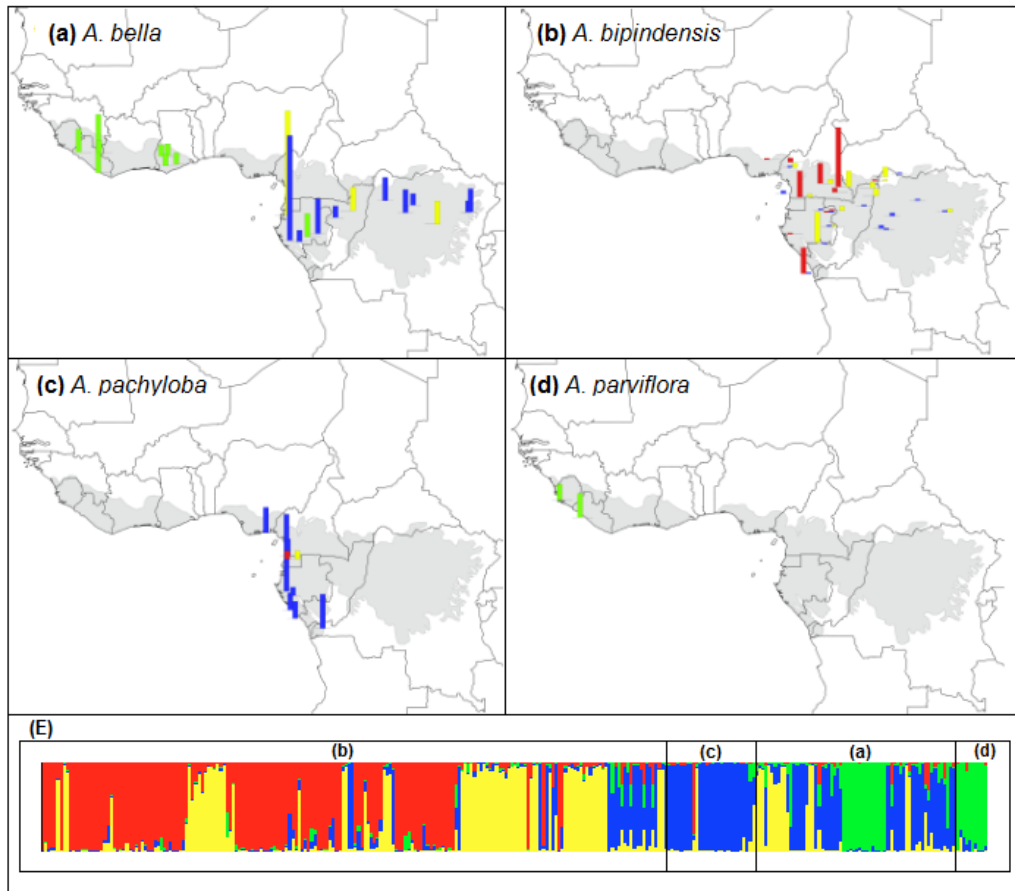


Figure 4. Genetic admixture among the four rain forests *Afzelia* species in Africa. Genetic clusters (E) detected in *A. bella* (a), *A. bipindensis* (b), *A. pachyloba* (c) and *A. parviflora* (d) using the Bayesian clustering algorithm implemented in STRUCTURE (K=4). The four genetic clusters are presented as histograms (with individuals percentage). Red color indicated GC1, yellow: GC4, Blue: GC3 and green: GC2.

6.4. Discussion

Very few studies described diversity within and between populations of polyploid tree species in the same genus. This work is the first one conducted on African polyploid tree species. Our data revealed limited concordance between the patterns of genetic variation and the taxonomic species currently recognized. This can be interpreted in two ways: (1) the taxonomy of forest *Afzelia* is inadequate and must be revised, or (2) substantial gene flow between the four morpho-species blurs their genetic differentiation. These two interpretations are not necessarily exclusive, and largely depend on the species concept one wish to adopt.

In West African forests, only one genetic cluster was observed, suggesting a genetic homogeneity between *A. parviflora* and West African populations of *A. bella*. Insofar, making the assumption that we have actually a single forest species of *Afzelia* in West Africa, our results would be similar compared to other West African forest species, like *Pentadesma butyracea* (Ewedje, 2012) and *Distemonanthus benthamianus* (Demenou et al., 2016) suggesting that the West African forest has not been deeply fragmented following past climate changes. In central Africa, we obtained three genetic clusters, shared

between *A. bipindensis*, *A. pachyloba* and *A. bella* (with limited differentiation). This pattern of shared polymorphism was also observed by Donkpegan et al. (2017) with nuclear and chloroplast genes.

According to our results, the question of delimitation of these species arises. Systematists and evolutionary biologists have typically recognized two general categories of polyploidy: allopolyploidy results from the hybridization of several parental species while autopolyploidy results from a single parental species (Soltis et al., 2007). While allopolyploids may differ from their diploid progenitors, autopolyploids are often more difficult to distinguish from their parental species on the basis of the morphology (Levin, 1983, 2002). Gene inheritance in allopolyploids is usually disomic (i.e. like in diploids), meaning that homeologous chromosomes originating from each parent species do not pair during meiosis, so that their respective allelic composition can diverge or maintain an initial divergence. This typically leads to fixed heterozygosity, or at least an heterozygosity excess at several loci. By contrast, autotetraploids usually display polysomic inheritance whereby the rate of heterozygosity can be deduced from allele frequencies under random mating, or show a deficit of heterozygosity in case of (biparental) inbreeding. As observed heterozygosity was lower than expected heterozygosity at all loci within each genetic cluster, we can conclude that tetraploid *Afzelia* should follow a tetrasomic mode of inheritance and can be considered as autotetraploids (Donkpegan et al., 2015). Furthermore, other studies showed that independent polyploid lineages may be interfertile, and thus interbreed when they come into contact, and could be grouped as one biological species (Soltis et al., 2007).

If we accept the taxonomic status of the four species, given that they currently have sympatric distributions and often occur close together in natural environments, the genetic pattern we observed is therefore likely to be caused by hybridization. In fact, allele sharing among closely related species may occur because alleles may have moved from one species to another via introgressive hybridization within a framework of stable species' ranges, perhaps assisted by gene flow related to environmental conditions (Wang et al., 2014). Under this scenario, we should assume that some genomic regions are mainly responsible for the morphological differences between species while most of the other genomic regions would mix between species, a pattern reminiscent of oaks (*Quercus*, e.g.- Scotti-Saintagne et al., 2004).

Recent studies on diversification of African *Afzelia* tetraploid species, showed that tetraploid diversification was initiated in the late-Miocene around 6.5 Ma to 9.4 Ma (Dechamps et al., 1992; Donkpegan et al., 2017). Indeed, the upper Miocene time had experienced a climatic optimum which have favored diversification of tropical forests (Morley 2000; Zachos et al., 2001; Plana 2004; Hoorn et al. 2010) and may have played a possible role in the ongoing diversification within the four *Afzelia* rain forests species (Donkpegan et al., 2017).

6.5. Conclusion

We conclude that a high hybridization occur between *A. bipindensis*, *A. bella*, *A. pachyloba* and *A. parviflora* through the African rain forests, leaving behind a footprint of introgressed genes in the genome of these species. Our results support the following three hypotheses: (1) the four recognized species are biological realities and our data is explained by the hybridization. But it must be assumed that there are

regions of the genome responsible for the morphological differences between these species; (2) the species delimitation must be questioned between these species. However, the observation of separate genetic clusters in sympatry suggests that there are still distinct entities (species, ecotypes,...); (3) the species are true and differentiated morphologically, but there are many errors of their identification. A possible mix of all these hypotheses is possible. But new data more powerful, such as provided by Next Generation Sequencing (NGS), would be very useful to complete the characterization of the large-scale genetic structure (phylogeographic approach), and they might give additional insights into the evolutionary history of these species.

CHAPITRE 7

EVIDENCE OF SYMPATRICALLY HIGHLY DIFFERENTIATED GENETIC CLUSTERS IN THE AFRICAN TETRAPLOID TREE *AFZELIA BIPINDENSIS* (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEA) SHOWING PHENOLOGICAL AND POPULATION STRUCTURE DIFFERENCES

Le chapitre précédent a mis en exergue la probable nécessité de devoir réviser la classification taxonomique des *Afzelia* tétraploïdes. Parmi ceux-ci, *A. bipindensis* se répartit entre deux clusters génétiques. Le présent chapitre explore la structure génétique à fine échelle et les distances de flux de gènes dans une région où les deux clusters sont en sympatrie.

« Les biologistes s'intéressent davantage à l'espèce qu'à l'individu, qui se range évidemment dans la catégorie de l'espèce, mais reste singulier. L'individu n'existe qu'une fois, il est "un fusil à un coup." »

Alain Prochiantz

7. Evidence of sympatrically highly differentiated genetic clusters in the African tetraploid timber tree *Afzelia bipindensis* Harms (Leguminosae) showing phenological and population structure differences

Abstract

The genetic diversity and mating system of polyploid trees have been rarely documented in wet tropical forests despite their importance to understand plant evolution. In this study, we analyzed genetic differentiation, mating system and phenological pattern at fine scale in *Afzelia bipindensis* Harms (Leguminosae), an insect-pollinated autotetraploid tree occurring at low density (6 to 15 adults/km²) in African rain forests. Eleven microsatellite markers were used to type 178 individuals sampled in a c. 5 x 4 km² forest area in eastern Cameroon. Bayesian clustering detected two discrete genetic clusters in sympatry showing moderate but significant differentiation ($F_{ST} = 0.06$, $P < 0.01$) despite the presence of potential hybrids. The two genetic clusters show overlapping flowering periods but with flowering peaks delayed by one to two months. They also display different size distributions for their diameters at breast heights (means of 37 and 62 cm). Mantel tests indicated a significant, albeit weak, correlation between geographic and genetic distances between individuals within each genetic cluster, consistent with indirect estimates of gene dispersal distances ranging from $\sigma_g = 1.71$ to 3.23 km. Selfing rates was very low (not significantly different from zero) among adults for both genetic entities. Our results highlight that *Afzelia bipindensis* should be considered as a complex tetraploid species with multiple genetic groups or as a complex of tetraploid species. Further work on the relationships between the inferred genetic clusters should improve our understanding of this peculiar taxon, which might shed light on the evolution of polyploid tree species.

Key words: tetraploid – *Afzelia bipindensis* – sympatric genetic differentiation – selfing – gene dispersal – phenology – low density – Central Africa rain forests.

7.1. Introduction

Diversification is a key issue in plant evolution. It is usually based on mechanisms of reproductive isolation (due to barriers to gene flow) that depend on spatial isolation (allopatric speciation) or not (sympatric speciation). It has long been believed that species originate mostly through allopatric divergence (Mayr, 1947 & 1963). The possibility of sympatric speciation in populations has been considered problematic because recombination between different subsets of a population that have adapted to different habitats was considered to counteract natural selection for locally adapted gene combinations (Rice, 1984; Johannesson, 2001). Thus, the relative importance of the different evolutionary processes of diversification of sympatric plant populations and their interplay with the ecology of the organisms are complex (Savolainen et al., 2006). Unraveling this complexity is an exciting challenge for evolutionary ecologists, especially for those dealing with tropical tree taxa. Moreover, understanding the size and connectedness of tree populations within an area of interest has major implications for the management of tropical rainforests.

Divergence between highly structured populations can be examined through their reproduction process (Murawski & Hamrick 1992; Nason & Hamrick 1997; Fuchs et al., 2003). Plant sexual reproduction is an important phenomenon which is achieved by mechanisms involving selfing or outcrossing. Treating plant reproductive biology requires also to investigate the conditions that lead to the mix of any of these two alternative forms of mating (Holsinger, 2000; Goodwillie et al., 2005). These main components of plant mating system are influenced by a variety of plant traits, including floral morphology, self-incompatibility, inflorescence architecture, pollinator behavior and phenology (Wyatt, 1982; Richards, 1986; Harder and Barrett, 1996). Flowering phenology is an important adaptive trait that directly determines the effective number of pollen donors and the density of flowering individuals, both of them affecting the patterns of gene flow between individual trees (Stephenson, 1982).

Gene flow, induced by the dispersal of seeds and pollen, has already been characterized for several tropical trees. For example Hardy et al. (2006) observed varying spatial genetic structure in Amazonian tree species and inferred a dispersal distance (σ) ranging from 0.1 to 1.2 km. Although most tropical rainforests tree species show low potential gene flow under relatively high population densities [0.4-1 km for *Distemonanthus benthamianus* (10–70 trees/km²) - Debout et al., 2011; 0.4-0.5 km for *Erythrophleum suaveolens* (10–170 trees/km²) – Duminil et al., 2016a; 0.2 - 0.6 km for *Aucoumea klaineana* (187 trees/km²) - Born et al. 2008], gene flow can be extensive when population densities are low [6.6 - 9.9 km for *Baillonella toxisperma* (5–7 trees/km²) - Ndiade-Bourobou et al., 2010 ; 1-7 km for *Milicia excelsa* (2–20 trees/km²) - Bizoux et al., 2009]. Gene flow can be characterized using neutral genetic markers such as simple sequence repeat (SSR), also call microsatellites. Despite the interest of this type of genetic markers in mating system studies, they are not easily used in polyploids (Dufresne et al. 2014). Population genetic analyses of polyploids, especially autopolyploids with tetrasomic inheritance, have traditionally been fraught with difficulties associated with the identification of loci and the exact scoring of genotypes (Trapnell et al., 2011). Accurate interpretation of the phenotypic expression of a marker (i.e., determination

of both the correct number of distinct alleles and copy number of alleles per locus [i.e., dosage]) is essential for the precise determination of multilocus genotypes and allele frequencies (Trapnell et al., 2011; Hardy, 2015).

In some low-order polyploids, allele copy numbers can be estimated from peak heights and extensions of the statistics developed for diploids used to assess population genetic (Obbard et al., 2006; Sampson & Byrne, 2012). However, in most of the cases, these statistics are limited to the study of estimating allele frequencies of polyploid populations (Thrall et al., 2000; De Silva et al., 2005; Markwith et al. 2006; Liao et al. 2008; Van Puyvelde et al. 2010; Huang et al., 2014). Few programs exist for mating system analysis in polyploid. ORCHARD (Spielmann et al., 2015) and POLYPATEX (Zwart et al., 2016) allow the characterization of gene flow among polyploids, using direct methods, such as paternity analysis. However, such analysis requires an exhaustive sampling of adults, which is extremely challenging in natural tropical forests. An alternative approach is to use indirect methods such as the one developed by Hardy (2015) who provided general expressions for the inbreeding and identity disequilibrium coefficients under a mixed mating model (MMM) for polyploid organisms with polysomic inheritance. The strong dependence of these coefficients with respect to the selfing rate makes them interesting for breeding system inferences using molecular markers (Hardy, 2015).

In this study, we investigated fine scale gene flow in a population of the low density (6-15 adult trees/km²) autotetraploid timber tree species *Afzelia bipindensis* Harms whose pollen and seeds are dispersed by animals and which is of both economic and ecological interest in Central Africa. We sampled 178 trees in a c. 20 km² area in south eastern Cameroon, in forest concessions under sustainable management of the logging company Pallisco, and we followed the phenology of a subset of trees over 2 years. We used 11 nuclear microsatellites to assess the genetic structure and estimate selfing rate and gene flow. Two genetic clusters were found in sympatry at fine scale, confirming the subdivision of the species between two clusters as evidenced by **chapter 6** (fig. 4). Following this result we (i) characterized the fine scale genetic structure within each cluster and estimated their respective selfing rates and gene dispersal distances, (ii) compared the flowering phenology and diameter distributions of the two genetic clusters, (iii) searched for evidence of genetic introgressions between these clusters.

7.2. Materials and methods

7.2.1. Study species

Afzelia bipindensis Harms (Leguminosae) is a hermaphrodite Guineo-Congolese tree species of moist evergreen and semi-evergreen forests distributed in Central African up to 900 m elevation (Gérard and Louppe, 2011; Donkpegan et al., 2014). It is a non pioneer light-demanding species (Doucet et al., 2016) that has no regeneration deficit in natural forests (Feteke & Philippart 2008). The trunk presents at the base, several uneven foothills and a slightly concave profile (Aubréville, 1968). When they top the canopy, adult trees can reach 40 m height and 100–180 cm diameter (de St. Aubin, 1963). The reproductive ecology of this species remains poorly studied (Donkpegan et al., 2014). Its fruits are kidney-shaped pods

(5-9 x 10-15 cm; Donkpegan et al., 2014), opening in two valves, hummocky, and housing 2 - 12 seeds. The seeds, oval or oblong, are large (1.14 x 2.78 cm), smooth, and fitted with a colorful fleshy basilar aril. They are heavily collected by a rodent (*Cricetomys emini*), which is probably their main predator but could also be their main disperser through scatter-hoarding behavior (Evrard, 2015). Pollination would be mediated by butterflies according to some observations made on low branches (Doucet J-L., personal observation). Fruiting begins around 15 cm in diameter. Hence in our study only individuals with a dbh \geq 15 cm were considered as adult trees. *A. bipindensis* is generally represented by scattered isolated individuals, with an average density of 6-15 adult trees/km² in the study zone (Feteke & Philippart 2008). Two genetic clusters have been observed for this species (**chapter 6**).

7.2.2. Study area

The study area is a plot of 400 ha, and the surrounding area situated in south East-Cameroon (14.34°E, 3.28°N), and located in a sustainably managed logging concession granted to the company Pallisco. The climate is equatorial, with two rainy periods (March to June and August to December). Mean annual rainfall is 1550 mm, and mean annual temperature is 24°C (Dainou et al., 2012). The forest is semi-deciduous with a canopy dominated by Meliaceae, Combretaceae, Sterculiaceae and Ulmaceae (Letouzey, 1970). The two clusters of *A. bipindensis* are present in the study area (**chapter 6**).

7.2.3. Population sampling, DNA isolation and genetic amplification

We performed an exhaustive sampling of all *A. bipindensis* trees of dbh>10cm in the 400 ha-plot. We also collected adult trees in the surroundings in order to increase sample size. Overall, we collected samples (leaves or pieces of cambium) from 178 adults and 156 seeds coming from 15 mother trees. Samples were immediately dried in silicagel.

DNA was extracted from leaf or cambium, or from embryo tissues in the case of seeds, using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA). Samples were genotyped using 11 microsatellite loci following the protocol of Donkpegan et al. (2015). Amplified DNA fragments were revealed using an automated ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, Lennik, The Netherlands). The steps of genotyping and allelic dosage determination (on tetraploid) were carried out as described in Donkpegan et al. (2015).

7.2.4. Identification of spatial genetic structure of adults trees

Population genetic structure was first assessed using the clustering algorithm implemented in STRUCTURE (Falush et al., 2003), which allows treating polyploid datasets assuming polysomic inheritance (Dufresne et al., 2014). From the allele frequencies estimated by STRUCTURE, we generated theoretical genotypes belonging to each cluster (50 genotypes of each cluster) and repeated the same clustering analyzes. Theoretical hybrid genotypes between clusters (50 individuals) were also generated and then added to the clustering analyzes. As two genetic clusters were detected but some individuals appeared intermediate, we simulated genotypes to assess whether seemingly hybrid individuals could

occur by chance due limited differential between the two clusters, or represented truly admixed individuals. Differentiation between the two identified genetic clusters was analyzed based on allele identity with the statistic F_{ST} , or on allele size with R_{ST} . The contribution of stepwise-like mutations to population differentiation was investigated by testing whether the observed R_{ST} was significantly larger than its value obtained after permuting allele sizes among allelic states (Hardy et al., 2003).

Given the difficulty in assigning microsatellite allele dosage in polyploids, we also used genetic distance matrices between individuals that were generated in the package POLYSAT (Clark and Jasieniuk, 2011) implemented in R 3.1.2 (R-Core Team, 2013), to perform an ordination of the genetic diversity of individuals. The raw data (without allelic dosage) were ordinated on a biplot graph using a principal coordinate analysis (PCA) applied on a matrix of the Lynch distance metric (Lynch, 1990). The Lynch distance metric was chosen because it is based on allele frequency and implements a band-sharing dissimilarity index that is more appropriate for autopolyploid species (Lynch, 1990; Clark & Jasieniuk, 2011). Finally, genetic distance values were then subjected to another principal component analysis (PCA) as implemented in GenAlEx (Peakall & Smouse 2006). To this end, we coded genotypes in terms of presence/absence data without allele dosage information. PCA examines a dissimilarity matrix (based on genetic distance) of pairwise differences between individuals and uses eigenvalue analysis to take the variation between samples and condense them into a limited number of dimensions.

7.2.5. Genetic diversity and identity disequilibrium-based selfing rate estimation

For each genetic cluster, genetic variation was characterized by calculating the allelic richness (N_A), the effective number of alleles (N_{AE}) following Nielsen et al., (2003), expected heterozygosity (H_E) and observed heterozygosity (H_O). The inbreeding coefficient (F) was tested by 999 randomizations of gene copies among individuals using the program SPAGeDi version 1.5a (Hardy 2015). For SPAGeDi, allele dosage was inferred from the relative intensities of alleles in chromatograms.

Selfing rates (S) were estimated based on standardized identity disequilibrium (assuming a Mixed Mating Model in an autopolyploid organism with chromosome segregation; Hardy 2015) using either genotypes with inferred allelic dosage or phenotypes (i.e. irrespective of allele dosage). Standard errors were provided by jackknifing over loci. The significance of the multilocus standardized identity disequilibrium coefficient (g_{2z}) was tested unilaterally by a permutation test whereby single-locus data are randomly permuted among individuals within each *A. bipindensis* genetic cluster (David et al. 2007).

7.2.6. Isolation by distance and estimation of gene dispersal distances

For all adults in the study area, we computed pairwise geographic distances from geographic coordinate. Pairwise kinship coefficients (F_{ij}) were estimated between individuals using the Nason's estimator of kinship coefficient (Loiselle et al., 1995) as implemented in the software SPAGeDi 1-5a (Hardy & Vekemans 2002).

Rho-statistic, which is an intra-class relatedness coefficient for polyploid species (Ronfort et al. 1998), was also calculated for all individuals as it can be interpreted as an average relationship coefficient between

individuals within population. Mantel tests (9999 permutations) were performed independently for all individuals at fine scale, to test whether neighboring individuals had a higher degree of genetic similarity than more distant individuals using SPAGeDi.

We estimated the neighbourhood size (N_b) and the gene dispersal distance σ_g of the studied population following the procedure described in Hardy et al. (2006): The Wright's neighbourhood size (N_b) was computed as $N_b \approx 4\pi D_e \sigma_g^2$, with D_e the effective population density and σ_g^2 half the mean squared parent-offspring distance. As σ_g is unknown, an iterative approach can be applied to estimate jointly N_b and σ_g knowing D_e , following Vekemans & Hardy (2004). It can be estimated as $N_b = -(1 - F_{(1)})/b_r$ with b_r is the restricted regression slope of F_{ij} on the natural logarithm of the spatial distance between individuals, $\ln(d_{ij})$ within a limited distance range $\sigma_g > d_{ij} > 20\sigma_g$. The quality of the joint estimate is highly sensitive to the quality of the value assumed for D_e . D_e can be approximated as $D \times N_e/N$, where N_e/N is the ratio of the effective population size, namely the N_e ; to the total population size, N (Vekemans and Hardy, 2004). We thus used $D/2$, $D/4$ and $D/10$ as alternative estimates for D_e . According to the sampling in the c. 20 km² area, the population density (D) for *A. bipindensis* is $D = 6$ and 15 trees/km² for trees with a diameter greater than 20 cm, respectively for the two clusters. Therefore, we used three following effective densities $D_e = 3, 1.5$ or 0.6 trees / km² and $7.5, 3.75$ or 1.5 trees / km² for these two clusters respectively.. Approximate standard errors were obtained by jackknifing over loci.

7.2.7. Diameter structure, phenology study and flowering synchrony

Analysis of the horizontal diameter was made from the distribution of trees (DBH ≥ 10 cm) in diameter classes of 10 cm amplitude. In order to compare the averages diameter distribution of the two clusters, we performed a student *t test*. Phenological observations were conducted over twenty months, from September 2014 to September 2016, on a subsample of 97 trees out of the 178 individuals sampled for genetic investigations. Their diameter ranged between 15.5 and 124.1 cm. Timing, duration, and intensity of flowering, were recorded once a month for each individual. Using binoculars and a semi-quantitative method (Morellato et al., 2000), a team of three local technicians estimated (once a month) the intensity of the phenophases based on the percentage of the crown covered by the organ types (leaves, flowers, unripe fruits, ripe fruits) (Dainou et al., 2012). We computed a within-year synchronization index I for each of the studied periods (2015 and 2016). The index I can be defined as the average proportion of trees that flower together at a given time, regardless the intensity or abundance of flowers, according to Augspurger (1983) and Elzinga et al. (2007):

$$I = \left(\frac{1}{n-1}\right) \left(\frac{1}{f_i}\right) \sum_{j=1}^n W_j$$

where I is the synchrony index of the individual plants; n is the total number of flowering individuals in a given year; f_i is the number of census days when tree i flowers; W_j is the number of census days where tree i and tree j ($j \neq i$) flower simultaneously.

7.3. Results

7.3.1. Detecting genetic discontinuities

Based on outputs from STRUCTURE, the most likely number of genetic clusters was $K = 2$ according to the delta K method (Evanno et al., 2005), with a high assignment probability ($P > 83\%$) (Fig.1A). The ordered histogram of assignment values (Fig. 1B) shows that 15 individuals have intermediate assignment values and may represent hybrids. Bayesian clustering analyzes on simulated genotypes including pure individuals from each genetic cluster do not show intermediate individuals (Fig. 2).

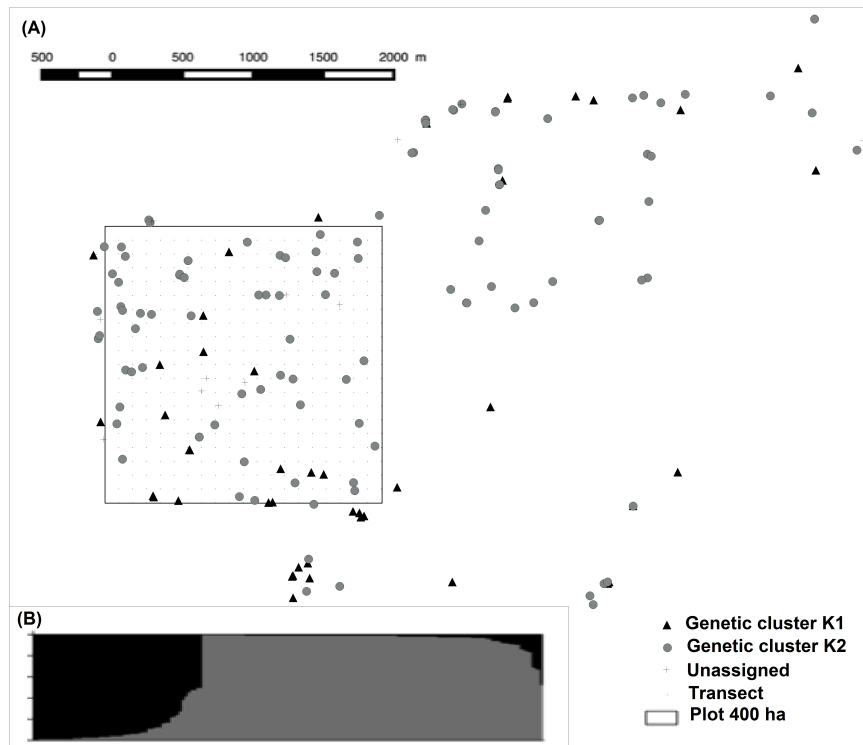


Figure 1. Synthetic map of the genetic clustering of *A. bipindensis* species at fine scale in eastern Cameroon (A), based on STRUCTURE results for an optimal number $K=2$ clusters. Complete inventories of adults trees were carried out in the 400 ha plot. The histogram (B) shows the individual assignment to clusters for $K = 2$

When simulated F1 hybrids were added in this analysis, we see the same clustering pattern that the actual data. However, the genetic distance based on F_{ST} between K1 and K2 was $F_{ST} = 0.06$. R_{ST} value, which accounts for microsatellite allele sizes, was slightly larger ($R_{ST} = 0.08$). This indicates a non-significant phylogeographical signal between K1 and K2, in connection with low geographical structuring between the two identified genetic clusters (Fig. 1). PCA based on the distance measure of Lynch (Lynch, 1990) also showed two groups corresponding to the two clusters obtained with STRUCTURE (Fig. 3). The first axis explained 14.9% of the total variation in the data set, while the second axis explained only 9.2% of the total variation. These results are confirmed with the PCA obtained with the presence/absence data of alleles, according to Nei's genetic distance using GenAIEx (**Appendix S5**).

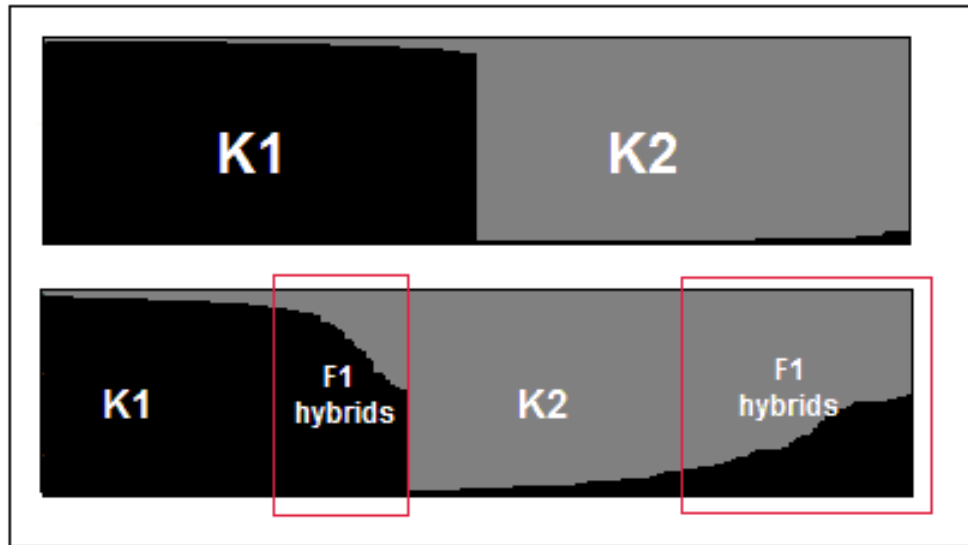


Figure 2. Genetic clusters detected in simulated data from genetic clusters K1 and K2 using the Bayesian clustering algorithm implemented in STRUCTURE. The histograms show the individual assignment of pure individuals from clusters K1 and K2 (above) and K1, K2 and hybrids F1 (below).

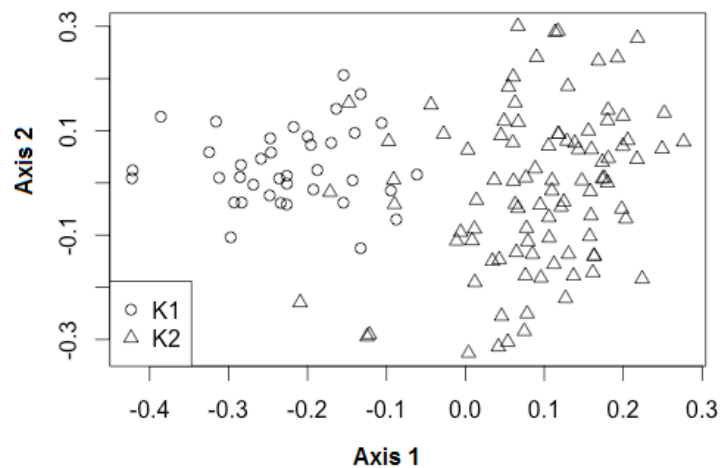


Figure 3. Principal coordinates (PCoA) analysis of microsatellite genotypes in *A. bipindensis* populations sampled at fine scale in eastern Cameroon, based on Lynch's genetic distance.

7.3.2. Genetic diversity, consanguinity and selfing rates

The genetic diversity parameters computed for adults and seeds were similar for N_A , N_{AE} and H_E between the two clusters K1 and K2. Only H_O presented differences (Table 1) but this can be attributed to a sampling artifact ($n=48$ and $n=115$ for K1 and K2, respectively) and low mother trees. The inbreeding coefficient (F) was significantly higher than zero in all populations and seeds. F values indicated that all

individuals of K2 have a more pronounced consanguine tendency (probably due to null alleles) relative to populations of K1.

The permutation test of multilocus standardized identity disequilibrium coefficient (g_{2z}) was significant ($P < 0.05$) within each ontogenetic group (adults and seeds) with the exception of adults of cluster K2 (Table 1). Considering the genotypes and phenotypes, the estimated selfing rate S for each predefined genetic cluster was close to zero for all adults' populations of *A. bipindensis* (Table 1), while it was strongly greater than zero for the offspring may be biased by the limited sample size of progeny families (0.19-0.24 for the seeds in K1; 0.59 for K2' seeds).

Table 1. Genetic diversity parameters, inbreeding coefficient (F) and selfing rate (S) on populations of adults and progeny of *A. bipindensis*. The number of genotyped trees (N) and N_A are the number of alleles per locus, N_{AE} : effective number of alleles, H_E and H_O are expected and observed heterozygosity respectively. g_{2z} is the multilocus standardized identity disequilibrium coefficient. P-values: *** for $P \leq 0.001$; ** for $0.001 < P \leq 0.01$; * $0.01 < P \leq 0.05$ and ns for $P > 0.05$

Genetic clusters		Diversity parameters						S		g_{2z}	
		N	NA	NAe	He	Ho	F	Genotypes	phénotypes	Genotypes	phénotypes
K1	Adults	48	14.18	5.86	0.79	0.72	0.10***	0.08 _(0.11)	0.12 _(0.12)	0.003**	0.004 [†]
	Seeds	104 [#]	11.73	4.48	0.72	0.67	0.07***	0.19 _(0.07)	0.24 _(0.07)	0.008**	0.01***
K2	Adults	115	12.82	5.16	0.71	0.47	0.33***	0.00 _(0.00)	0.00 _(0.00)	0.007 ^{ns}	-0.007 ^{ns}
	Seeds	28 [#]	7.82	4.31	0.72	0.46	0.36***	0.59 _(0.12)	0.59 _(0.11)	0.05***	0.07***

[#] indicate that there are respectively 7 and 6 mother trees which have generated the seeds of groups K1 and K2

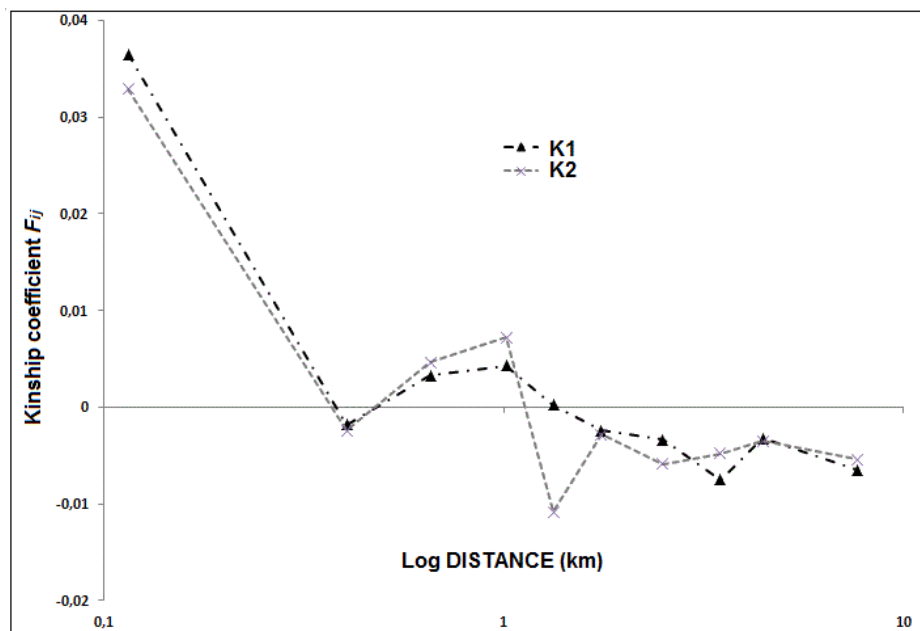


Figure 4. Average kinship-distance curves (F_{ij} plotted against spatial distance) for two clusters identified in *A. bipindensis* population at fine scale in eastern Cameroon.

7.3.3. Isolation by distance and estimated gene dispersal

The kinship coefficient F_{ij} decays with spatial distance in two phases: (i) at distance < 300 m, it decreases rapidly from a value of ca. 0.038 between neighbouring individuals to near 0 at 300 m; (ii) at distances > 300 m, it decays approximately linearly with the spatial distance (Fig. 4). Mantel tests indicated a significant, albeit weak, correlation between the natural logarithm of geographic and genetic distances: $R^2 = 0.0121$ ($P < 0.001$) for cluster K1 (**Appendix. S6-A**); and $R^2 = 0.0021$ ($P < 0.001$) for cluster K2 (**Appendix. S6-B**).

The procedure to estimate gene dispersal parameters only converged for the cluster K1. Depending on the assumed effective density (D_e), estimates of mean gene dispersal distances (σ_g) ranged from 1.71 to 3.23 km (Table 2). The corresponding Wright's neighborhood size N_b varied from 182 to 310 trees (Table 2) with large confidence intervals. These results, although indicative, show a high gene flow in *A. bipindensis*.

Table 2. Indirect estimation of historical dispersal distance in K2 for global genes (σ_g) as well as Wright neighbourhood (N_b) for the pooled population using an iterative procedure with three estimates of effective densities ($D_e = D, D/2, D/4$ and $D/10$) given for σ_g and N_b

K1		
D_e	σ_g (km)	N_b
D/2	1.71 (*)	221 (*)
D/4	2.71 (1.14 - 4.19)	310 (49 - 661)
D/10	3.23 (0.61 - 6.16)	182 (6 - 573)

*No convergence of the iterative computation.

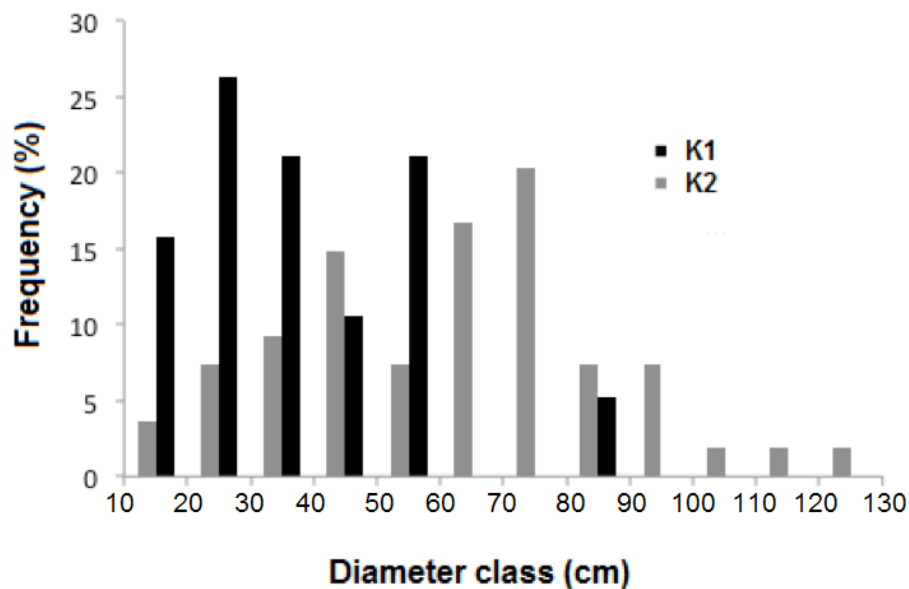


Figure 5. Frequency distribution of diameters at breast height of *A. bipindensis* trees for the two genetic clusters K1 and K2, in a 400 ha plot of eastern Cameroon. The numbers 10 to 130 correspond to the limit of the internal diameters class.

7.3.4. Comparisons of diameter structure, phenophases and flowering synchrony

Comparison of diameter structures showed that population K2 had bigger trees than population K1 (Fig. 5). Both K1 and K2 populations did not have similar mean diameters (Student's *t* test, $t = -4.82$, $df = 46.3$, $P < 0.001$). The minimum flowering diameter was dbh = 12.5 and 12.7 cm for K2 and K1 respectively.

The first year of observation, flowering of *A. bipindensis* occurred respectively from February to July 2015 (peak in April) for K1 and November 2014 to May 2015 (peak in March) for K2. The second year, flowering occurred respectively from January to June 2016 (peak in April) for K1 and December 2015 to June 2016 (peak in February) for K2 (Figure 6). On average, there is a flowering offset of one to two months between the two clusters. However, for both populations, the fructification peaks in July (results not shown).

The synchrony index (*l*) computed from trees that flowered during the two monitored years ranged from 0.64 to 0.79.

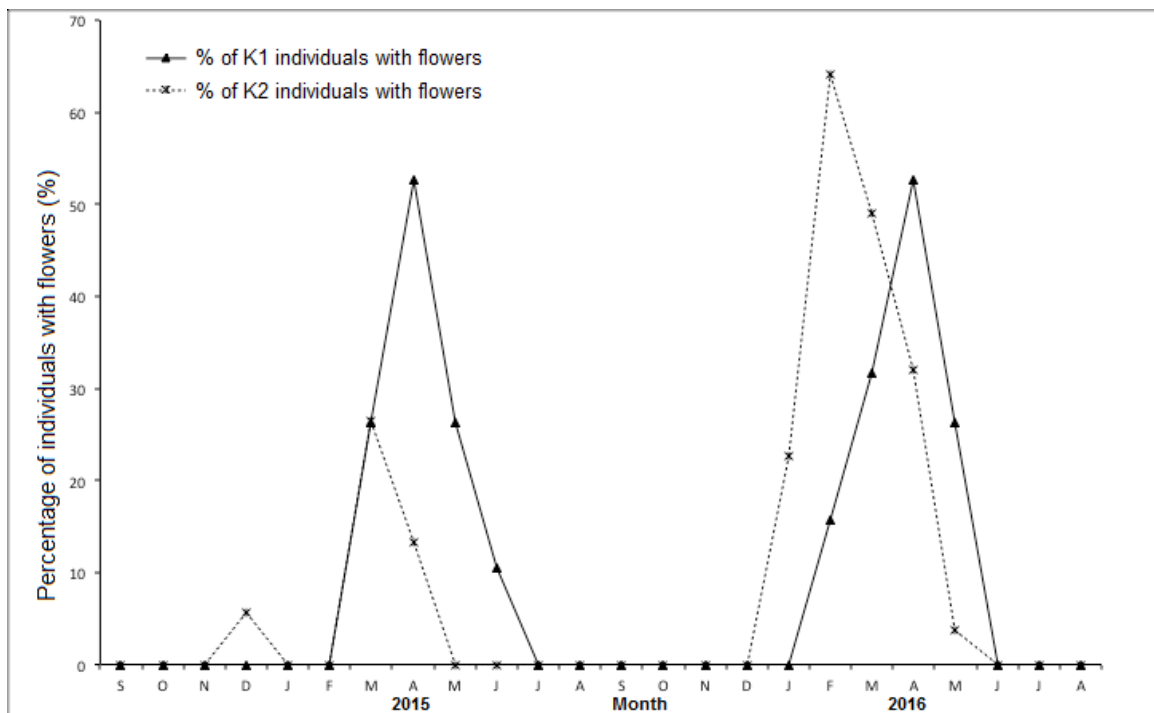


Figure 6. Flowering phenology of *A. bipindensis* trees from genetic clusters K1 and K2 from September 2014 to August 2016 in a 400 ha plot of eastern Cameroon.

7.4. Discussion

7.4.1. Genetic structuring and differentiation

Bayesian clustering analysis of our genotypic data led to an unexpected result: we detected two genetic clusters in the taxon *A. bipindensis* at a fine scale in eastern Cameroon, with a high assignment probability value ($P > 0.83$): 48 individuals belonging to cluster K1 and 115 individuals belonging to K2. All seeds were assigned to the cluster of their respective mother, so that there was no evidence of hybrid seeds.

Nevertheless, five samples could not be assigned to any cluster, suggesting that some individuals may result from admixture between the two clusters. The individuals of these two clusters occurred in sympatry (Fig. 1). Additional Bayesian clustering analyzes on a data simulated from the genotypes of these two clusters have confirmed the existence of two sympatric groups without potential hybrids. Interestingly, when we repeated the analysis by adding simulated F1 hybrids, we obtained the same clustering pattern as the one found in the actual data. From our results raised the question: what mechanisms can explain the restriction in gene flow observed between *A. bipindensis* populations in sympatry at fine scale? A main hypothesis can be advanced: populations in fragmented habitat may have experienced restricted gene flow, resulting in high levels of genetic differentiation among populations (Harrison & Hastings 1996; Hutchinson & Templeton 1999). This assumption is not plausible here because: (i) the habitat of the studied area is not fragmented; (ii) both genetic clusters are distributed in sympatry and have similar allele frequencies (Table. 1).

The relationships between populations based on PCA plots of pairwise polyploid genetic phenotypes were consistent with the pattern obtained from the Bayesian analysis. This indicates the presence of a diverging group, and suggests that the populations of both clusters are probably well differentiated morphologically. This morphological differentiation of tetraploid lineages suggests that further research is needed to confirm the identification and origin of these two groups identified in *A. bipindensis* at fine spatial scale.

7.4.2. Effective selfing rate and inbreeding

The inbreeding coefficient F was significantly positive and varied between clusters. The F values were close to zero for K1 and very large for K2. These departures observed in K2 might be attributed to either a mating system with closely related individuals or to selfing. STRUCTURE estimated higher rates of null alleles at most loci in K2. This seems to be the reason for the difference of F value because estimates of selfing rates from adult genotypes using identity disequilibrium, which is robust to the presence of null alleles or biparental inbreeding, indicated that the two clusters are predominantly outcrossing. A result further supported by the fact that most seeds had several alleles not present in their mother. Based on the Standardized identity disequilibrium (assuming a Mixed Mating Model), estimates of the selfing rate S were high (ca. 19 to 59%) among both cluster offsprings while the values obtained for the adults were close to zero. Thus, despite the low population density, inbreeding and selfing remain very low among adults of *A. bipindensis*. This low rate could be explained by the selective abortion or selection against inbred individuals at an early stage of growth, as its the case at *E. suaveolens* (Duminil et al., 2016a).

Our results can also be interpreted in connection with the discovery of polyploidy in *A. bipindensis*. The relationship between polyploidy and selfing in plants is increasingly documented (Barringer, 2007), because it is widely held that polyploids have higher selfing rates than their diploid relatives (Stebbins, 1950; Mable, 2004).

7.4.3. Gene dispersal distance in *A. bipindensis*

In both sympatric populations, short-range gene flow was apparently limited (Fig. 4 and **Appendix S5**). The observed spatial genetic structure for the *A. bipindensis* pooled population highlighted the fact that genetic similarities were higher among neighbours than among more distant individuals, as expected under isolation by-distance (Vekemans & Hardy, 2004). This result might reflect limited seed dispersal as a result of heavy fruits (Cordeiro & Howe, 2003).

In tropical forests, indirect approaches are often required for estimation of genetic distances of dispersion because direct paternity analyses are very difficult (Heuertz et al., 2003; Hardy et al., 2006; Born et al., 2008; Bizoux et al., 2009; Ndiade-Bourobou et al., 2010; Debout et al., 2010; Duminil et al., 2016a & 2016b). In this study, estimates of gene dispersal (σ_g) ranged from 1.71 to 3.69 km in one of two genetic clusters of *A. bipindensis*, identified in sympatry. The associated Wright's neighbourhood size (N_b) for global gene flow (σ_g) ranged from 139 to 310 trees, depending on the assumptions on effective density (D_e). Generally, in the tropical trees previously studied for gene dispersal, estimates of σ_g were found to be below 600 m (Hardy et al., 2006; Born et al., 2008; Debout et al., 2010; Duminil et al., 2015). Nevertheless, we found high quite values of σ_g , in some other tropical trees (Bizoux et al., 2009; Ndiade-Bourobou et al., 2010). Our indirect estimates of gene dispersal distances cannot distinguish between seed and pollen dispersal, and according to our knowledge on seed dispersal/predation vectors (essentially rodents: *Cricetomys emini* and squirrels: *Epixerus wilsoni*, *Protoxerus stangeri*; Evrard, 2015), we expect that pollen is the main contributor to long-distance gene dispersal. The correlation between extensive gene flow (due to pollen) and low trees density in tropical forests have been proven (Cascante et al., 2002; White et al., 2002; Dick et al., 2003). Other studies have also shown the high potential of pollen dispersal by some insects (e.g Ahmed et al., 2009 for pollination by wasps; Dick et al., 2004 for pollination by *Euglossini* bees).

Entomological research on *A. bipindensis* is not well advanced. Recent observations in eastern Cameroon, on open flowers of *A. bipindensis*, suggested that an assortment of large insects (such as butterflies from the Sphingidae family) could be efficient pollinators of this species. Referring to the scale of the genus, the main pollinator of *Afzelia xylocarpa* in the tropical monsoon forest in Southeast Asia is the large *Xylocopa* bees (Bawa 1990; Kato et al., 2008). Therefore, the high gene dispersal distances in *A. bipindensis* may be explained, in part, by high potential of pollen dispersal.

7.4.4. Diametric structure, reproductive ecology and management implications

Comparison of the diameter structures among both sympatric populations revealed dissimilarities between K1 and K2 (Fig. 5). This difference of population's structure is confirmed by significant (albeit weak) deviation of the genetic diversity observed (Student's t paired test on H_e , $t = 2.3158$, $df = 10$, $p\text{-value} = 0.04308$) between the two clusters. The low density of reproductive trees we found (the minimum flowering diameter being $dbh = 12.5$ cm, Fig. 5) is expected to decrease the quantity and quality of pollen flow and seed dispersal (Nason & Hamrick 1997; Fuchs et al., 2002). This, in turn, is likely to increase

deleterious effects (such as inbreeding) on the progeny as is currently the case in the offspring of *A. bipindensis* (Charlesworth & Charlesworth 1987). But additional data are needed to confirm these results. Information on inbreeding levels is important for seed collections to develop reforestation strategies. In Cameroon, according to the 1994 forest law, the minimum diameter of exploitation of *A. bipindensis* is 80 cm (Donkpegan et al., 2014). Hence, the reproductive potential of exploited stand should remain fairly good given the capacity of the species to reproduce early.

Environmental factors affect the phenology of several tropical trees and may act as cues that set the internal biological clock of trees (Ausin et al., 2005). In this study, we have shown that phenological patterns were seasonal. *A. bipindensis* populations generally bloom in dry seasons and fructify in rainy seasons, with high value of flowering synchrony between trees (0.64 to 0.79) despite a phenological offset (on the flowering) that can reach two months (Fig. 6). This influence of seasons on reproductive phenology has been suggested by several authors (Morellato et al., 2000).

7.5. Conclusion

Patterns of genetic variation in the rainforest autotetraploid species, *Afzelia bipindensis*, at fine scale in eastern Cameroon revealed two genetic clusters distributed in sympatry, with overlapping flowering and fruiting periods levels related to low selfing rate in adults. Our indirect estimates of gene dispersal distance were extensive and suggested a risk of progeny inbreeding because of low population density. To distinguish the relative roles of seed and pollen dispersal and elucidate the contributions of dispersal agents, further insights should be obtained by genotyping offspring arrays that should provide estimates of pollen dispersal distances, by conducting direct paternity analyses (Spielmann et al., 2015; Zwart et al., 2016).

CHAPITRE 8

DISCUSSION GÉNÉRALE

« La science ? Après tout, qu'est-elle, sinon une longue et systématique curiosité ? »

André Maurois

8. Discussion générale

Nous avons appliqué une approche qui combine des études écologiques et génétiques pour investiguer les mécanismes qui gouvernent la spéciation au sein du genre *Afzelia*, un genre important dans le cadre du commerce du bois. Nos principaux résultats sont récapitulés ci-après en regard des questions de recherche retenues:

- 1- Il est difficile de distinguer les espèces lors des inventaires forestiers, ce qui pourrait compromettre la gestion durable des populations des différentes espèces. Toutefois, bien que certaines de ces espèces soient considérées par l'UICN comme menacées, il existe très peu d'études scientifiques sur les *Afzelia*.
- 2- Le développement de marqueurs SSRs a montré une différence cytogénétique entre les différentes espèces du genre : les espèces de forêt dense humide (*A. bipindensis*, *A. pachyloba*, *A. bella* et *A. parviflora*) apparaissent comme tétraploïdes, alors que les espèces de savane (*A. africana* et *A. quanzensis*) sont diploïdes. Ce résultat est confirmé par les observations de cytométrie en flux et de comptage chromosomique qui montrent que les espèces forestières présentent un génome double ($2n=48$) de celui des espèces de savane ($2n=24$).
- 3- Sur le plan de délimitation spécifique, l'ADN nucléaire et les caractères végétatifs morphologiques séparent les lignées diploïdes des lignées tétraploïdes, contrairement à l'ADN chloroplastique (y compris le plastome entier) qui regroupe les espèces tétraploïdes et une espèce diploïde dans une même lignée. Ceci suggère une hybridation historique en relation avec la duplication du génome (polyploïdisation) survenue au cours de l'histoire évolutive du genre.
- 4- La datation moléculaire basée sur des phylogénies de gènes calibrés par des fossiles indique que les espèces du genre *Afzelia* auraient commencé à diverger entre 14,5 ou 20 Ma au Miocène. La polyploïdie serait apparue plus tard dans le genre (entre 7,0 et 9,4 Ma) suggérant ainsi une adaptation des espèces de savanes aux forêts denses humides tropicales.
- 5- L'étude de la caractérisation et de la répartition spatiale des groupes génétiques SSRs indiquent que les espèces diploïdes se distinguent par des clusters génétiques bien distincts tandis que les espèces tétraploïdes partagent des clusters génétiques qui sont chevauchants. Ces résultats plaident pour une révision de la taxonomie des espèces forestières d'*Afzelia*.
- 6- La différenciation sympatrique au sein du taxon *A. bipindensis* est confirmée à fine échelle spatiale, par l'obtention de deux groupes génétiques. L'étude des traits d'histoire de vie, chez ce taxon, montrent un décalage phénologique d'un à deux mois (malgré quelques chevauchements) entre les deux groupes et une différence de structure de population. Ces informations suggèrent l'existence de deux espèces et de nouvelles investigations sont nécessaires afin d'élucider les mécanismes de spéciation chez les espèces d'arbres polyploïdes. Ces différents résultats ouvrent

de nombreuses perspectives pour de futures recherches et soulèvent des questions complémentaires.

8.1. Combien d'espèces d'*Afzelia* en définitive ?

Les chapitres 3, 4 et 5 ont été consacrés à cette problématique par l'utilisation de plusieurs marqueurs tels que (1) des caractéristiques morphologiques végétatives et reproductives, (2) des marqueurs moléculaires chloroplastiques et nucléaires et (3) des marqueurs microsatellites nucléaires.

Au terme de ce projet de recherche doctoral, il s'avère que les problèmes d'identification morphologique persistent toujours dans le genre *Afzelia* (Donkpegan et al., 2014), en particulier au sein des espèces forestières. L'approche morphométrique utilisée dans cette étude, relative à une analyse en composante principale de Hill-Smith (PCoA) a permis d'analyser la délimitation des espèces africaines du genre *Afzelia* à travers la combinaison de caractères végétatifs et reproductifs discriminants (quantitatifs et qualitatifs). Malgré le fait que les caractères utilisés seraient issus des clés de détermination établies par des auteurs qui ont récemment revu la taxonomie du genre, notre approche n'a pas pu hiérarchiser les différentes morpho-espèces d'*Afzelia* de manière discriminante (Chapitre 4). Toutefois, cette analyse a mis en évidence une nette différenciation des espèces en deux grands groupes : le premier groupe se compose d'espèces de formations végétales sèches (*A. africana* et *A. quanzensis*) et le deuxième regroupe les espèces de formations tropicales humides (*A. bipindensis*, *A. bella* et *A. parviflora*) (Fig. 4 – Chapitre 4). En réalité, des analyses complémentaires (chapitre 4) ont montré que ce sont les traits végétatifs (taille et forme des folioles principalement) qui ont le plus fort pouvoir discriminant parmi les traits étudiés. Ces résultats sont tout de même surprenants car la variabilité des caractères végétatifs est souvent reliée à une plasticité phénotypique, elle même liée à l'environnement, de sorte que ces caractères sont souvent considérés comme moins fiables que les caractères floraux pour les études de délimitation (Ingrouille & Chase, 2004 ; Das et al., 2007). Certes, quelques différences ont été observées avec certaines variables quantitatives florales (longueur de pétale - F qt_PI et longueur du réceptacle - F qt_RI – Tableau 5 – chapitre 4), mais ces traits ne sont pas assez discriminants pour différencier les espèces d'*Afzelia*. Toutefois, notre analyse reposant majoritairement sur des échantillons d'herbier, plusieurs caractéristiques quantitatives (stature des individus) ou qualitatives (couleur de l'écorce, des fleurs, etc...) ont dû être omises. En effet, les informations mentionnées sur étiquettes d'herbier sont souvent très succinctes et les couleurs disparaissent sur le matériel sec. Des investigations complémentaires relevant des caractéristiques à l'état frais sont donc nécessaires pour alimenter le débat sur la différenciation phénotypique des espèces. Ceci dit, nous avons pu constater que l'histoire des relations phylogénétiques entre les espèces ne correspondait pas forcément à ce qu'on attendait, notamment chez les taxons forestiers où les relations entre espèces sont plus complexes que celles proposées par la taxonomie et la classification actuelle. Dès lors, la question de la caractérisation morphologique comme meilleure ou unique voie de délimitation des espèces se pose. Il est évident qu'historiquement les critères d'identification les plus fréquemment utilisés par les taxinomistes sont basés

sur une plus grande ressemblance physique entre organismes appartenant à une même espèce (morpho-espèce). Toutefois, ces caractères morphologiques constituent un ensemble de traits complexes, qui sont en prise directe avec les forces de sélection. En conséquence, recourir uniquement à la taxonomie morphologique peut induire des biais dans l'estimation de la biodiversité. A l'évidence donc, les groupes définis au sein du genre *Afzelia* par les critères morphologiques ne reflètent pas l'histoire évolutive des espèces et devront être revus à la lumière d'études approfondies, utilisant les approches récentes de la génomique évolutive (Eaton & Ree, 2013).

De ce point de vue, la présente thèse a tenté d'apporter de nouveaux éléments de réponse, en utilisant des gènes chloroplastiques et nucléaires. Mais en comparant les topologies obtenues à partir des différents gènes analysés, nous avons obtenu des résultats contrastés. Selon le gène considéré, certaines espèces se sont placées de manière inattendue (Fig. 2 & 3 – Chapitre 4), et engendrent des conflits phylogénétiques. Nous pouvons donc dire que chaque gène raconte sa propre histoire et non celle de l'organisme qui le porte. Avec les marqueurs microsatellites nucléaires, nous avons également constaté une non-concordance entre les assignations génétiques et morphologiques. Cependant, contrairement aux autres types de marqueurs utilisés, les marqueurs microsatellites se sont avérés plus précis car ils ont permis d'identifier de potentiels hybrides entre les espèces forestières d'*Afzelia* et des subdivisions au sein d'un taxon forestier. Ainsi, la combinaison d'approches morpho-génétique dans le cadre de cette étude ne peut à elle seule trancher sur le nombre réel d'espèces dans le genre *Afzelia*. Le possible coexistence de deux espèces du taxon *A. bipindensis* (Chapitre 7) rend la situation encore plus floue. Tout ceci semble confirmer l'assertion de certains biologistes qui estiment que la définition de l'espèce est encore un concept arbitraire (Hey, 2006). Au terme de cette étude, nous pouvons simplement suggérer, outre la confirmation de deux taxons (*A. africana* et *A. quanzensis*), que des croisements à descendance fertile sont possibles entre les espèces forestières d'*Afzelia*. De tels croisements interspécifiques ne sont pas rares, et ont même été mis en évidence récemment dans le genre tropical africain *Milicia* (Dainou et al., 2014 & 2016).

8.2. L'origine des populations spécifiques d'*Afzelia*

Nous avons été confrontés au début de cette thèse à la découverte de la ploïdie, laquelle était inattendue dans le genre *Afzelia*. Cette découverte nous a amené à repréciser nos hypothèses de départ pour tenter de reconstruire l'histoire évolutive des espèces à partir des mécanismes qui induisent l'apparition de la polyploïdie dans les lignées végétales. Historiquement, la fréquence de la polyploïdie est largement documentée chez les plantes. On la retrouve dans toutes les lignées végétales: chez les Algues (Pacak & Szweykowska-Kulińska, 2002), les Bryophytes (Wyatt et al., 1988), les Ptéridophytes (Bryan & Soltis, 1987 ; Ranker et al., 1989), les Gymnospermes (Won & Renner, 2005), les champignons (Rogers, 1973) et chez les Angiospermes où elle est étudiée depuis longtemps (Stebbins 1958 ; Leitch & Bennett, 1997).

Deux niveaux de ploïdie (diploïde et tétraploïde) ont été trouvés dans le genre *Afzelia* (Leguminosae).

Généralement, l'apparition de la polyploidie dans une lignée est souvent subordonnée à de multiples origines, soutenues par un polymorphisme partagé entre les niveaux de ploïdie et / ou l'incongruité phylogénétique entre loci (voir par exemple Soltis DE & Soltis PS, 1993, 1999; Soltis PS & Soltis DE 2000). Le non-partage de polymorphisme (se basant sur tous les types de marqueurs) à travers les deux niveaux de ploïdie chez les *Afzelia*, pourrait *a priori* être attribué à une origine unique de la polyploïde dans le genre. En effet, chez les espèces forestières tétraploïdes sympatriques au sein desquelles les taxons semblent moins différenciés, nos résultats suggèrent que la spéciation polyploïde n'induit pas encore un réel isolement reproductif entre ces taxons. L'obtention de clusters géniques partagés entre morpho-espèces et la non-assignation à des groupes génétiques de certains individus (potentiellement assimilable à des hybrides) en sont des exemples concrets. Ce qui implique que l'hybridation post-polyploïdisation pourrait contribuer de manière significative à la variation génétique dans les polyploïdes nouvellement formés, comme c'est le cas par exemple chez l'espèce tétraploïde *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae) (Slotte et al., 2008). Nos estimations en termes de divergence ont montré que le clade *Afzelia* a une origine datée du Miocène (autour de 14,5 à 20 Ma) qui a été identifiée comme une période de diversification importante chez les plantes tropicales (Plana, 2004). Cette origine serait plus récente, de l'ordre de 7 à 9,4 Ma, chez les tétraploïdes. Ces âges de divergences nous renseignent sur l'évolution de la ploïdie chez les *Afzelia* qui serait passée de diploïde (état ancestral plésiomorphe) à tétraploïde (état dérivé apomorphe) suivant la théorie de l'évolution des niveaux de ploïdie de Ohno (1970). Ainsi, la fragmentation induite par les changements climatiques passés, sur les zones de distribution des espèces combinées avec les évènements de polyploïdisation, pourraient avoir joué un rôle dans la diversification au sein du genre *Afzelia* (Pfeil et al., 2005; Cannon et al., 2010).

8.3. Diversification sympatrique au sein du genre *Afzelia*: cas de *A. bipindensis*

Nos résultats ont montré une différenciation génétique sympatrique des populations d'*A. bipindensis* à large échelle (Chapitre 5) et à échelle locale (Chapitre 6). Deux *clusters* génétiques présentant une différenciation modérée mais significative ($F_{ST} = 0,06$, $P < 0,01$) ont été détectés, en dépit de la présence d'hybrides potentiels. Une telle diversification sympatrique peut paraître surprenante, mais n'est pas très rare en réalité, surtout chez les espèces polyploïdes (Soltis DE & Soltis PS, 1999). Plusieurs cas de différenciation sympatrique (significatives) ont été démontrés dans des taxons tropicaux africains sur base d'utilisation des marqueurs microsatellites nucléaires. C'est le cas de l'espèce *Santiria trimera* (Koffi, 2010 ; Ikabanga et al. Données non publiées) au sein desquels des *clusters* génétiques différenciés ont été distinctement identifiés en sympatrie et sont considérés comme des espèces distinctes par Ikabanga et al. (Données non publiées).

En observant de plus près le phénotype des groupes génétiques identifiés au sein d'*A. bipindensis*, nous avons constaté une variation importante des caractéristiques du tronc. Un groupe présente un fût rougeâtre écailleux contrairement au deuxième qui a un fût de teinte clair et lisse (parfois sinueux). Un réexamen minutieux des traits morphologiques associés à chaque *cluster* génétique peut s'avérer très

utile pour appuyer cette différenciation sympatrique. Ceci confirme qu'il convient de prendre en compte des aspects non reportés sur des planches d'herbiers (couleur des organes, caractéristiques du tronc et de l'écorce, ...). Dans ces conditions, la taxonomie peut donc grandement bénéficier d'approches de génétique des populations pour résoudre les complexes d'espèces.



Figure 1: Caractéristiques morphologiques sur le morphotype avec un fût rougeâtre écaillé (à gauche) et le morphotype avec un fût gris clair et lisse (à droite).

8.4. Contribution à l'étude des flux géniques et à la compréhension de la biologie reproductive chez *Azelia*

Pour *A. bipindensis* et à défaut de mener des investigations sur toutes les espèces, nous avons analysé et caractérisé (i) l'effet de la densité sur la dispersion des gènes et les taux d'autofécondation, (ii) l'effet de l'isolement spatial des adultes en relation avec l'écologie de reproduction, aux travers des marqueurs à hérédité biparentales et (iii) la phénologie et la structure diamétrique des populations.

L'estimation des flux géniques à longues distances chez *A. bipindensis* (2,71 à 3,69 km – cluster 1) a confirmé l'hypothèse de Loveless & Hamrick (1984) qui précisent que les faibles densités de populations induiraient généralement une augmentation des distances de dispersion. D'autres espèces étudiées dans les forêts Guinéo-Congolaise présentent également des corrélations similaires. C'est le cas notamment de *Milicia excelsa* (Bizoux et al., 2009), de *Baillonella toxisperma* (Ndiade-Bouroubo et al., 2010) et de *Erythrophleum suaveolens* (Duminil et al., 2016). Cependant, aucun lien direct n'a été établi entre la densité faible de *A. bipindensis* et les taux d'autofécondation. Nos résultats montrent juste que ces taux sont faibles chez les adultes alors qu'ils semblent élevés dans la descendance (jusqu'à 50%). Mais d'autres études, avec un échantillonnage conséquent restent néanmoins nécessaires pour valider ces

observations.

La structure génétique spatiale observée au sein de chaque groupe génétique c'est-à-dire de *A. bipindensis* a mis en évidence des similitudes génétiques (quoique faibles) plus importantes entre voisins qu'entre individus plus éloignés, comme on pouvait s'y attendre selon un isolement par la distance (Vekemans & Hardy, 2004). Ce résultat est parfaitement en accord avec les vecteurs de pollinisation supposés (Sphingidae, Doucet J-L., Communication personnelle) et de dispersion des semences (rongeurs essentiellement- Evrard, 2015). Par ailleurs, le rôle effectif de dispersion des rongeurs chez *A. bipindensis* pourrait être remis en cause car ces animaux sont *a priori* connus pour leur rôle de prédation (Evrard, 2015). Toutefois, bien qu'il existe des preuves que les prédateurs de graines causent de grandes pertes au stock initial, ceux-ci peuvent participer à leur dispersion sous certaines conditions ou circonstances (Norconk et al., 1998 ; Hirsch et al., 2012). Jansen et al. (2002) ont même montré que les rongeurs les plus gros peuvent disperser les graines jusque 124 mètres par la pratique du « scatter hoarding » (cachette de graines). Par ailleurs, le contexte écologique de la zone d'étude a vraisemblablement une importance cruciale. Une variation du cortège de disperseurs, par exemple suite au braconnage, doit certainement influencer la dispersion. Le présent travail présente des limites car nous n'avons pas pu quantifier les parts de dispersion des graines et du pollen indépendamment via des analyses directes. Un autre projet doctoral (porté par Q. Evrard), tentera d'apporter plus de précisions sur ces aspects.

La compréhension des analyses de variabilité génétique intraspécifique requiert également une bonne connaissance d'autres aspects de l'écologie de reproduction de l'espèce étudiée. Pour comprendre davantage les patrons des flux géniques au sein et entre populations voisines, plusieurs auteurs préconisent d'étudier la phénologie reproductive. Celle-ci peut en effet jouer un rôle non négligeable sur la structuration génétique des populations de plantes (Fuchs et al., 2003; Elzinga et al., 2007). Non seulement la phénologie reproductive affecte les patrons de dispersion du pollen, mais elle influence aussi la nature et le comportement des disperseurs de graines (Dick et al., 2008). Les résultats présentés dans le chapitre 7 illustrent bien cette relation en mettant en évidence deux groupes génétiques sympatriques avec des différences phénologiques et structurelles de leurs populations. Dans cette étude, nous avons montré que les patrons phénologiques étaient saisonniers synchrones ($I = 0,64$ à $0,79$) malgré un décalage phénologique (sur la floraison) pouvant atteindre deux mois. Le décalage phénologique entre les deux groupes génétiques sympatriques de *A. bipindensis* limite partiellement les flux de gènes entre eux. On ignore toutefois si ce décalage est une des causes du processus de spéciation ou serait apparu plus tard afin d'éviter la formation d'hybrides. 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, comme c'est le cas chez *A. bipindensis* (Elzinga et al., 2007). Toutefois, la poursuite des observations phénologiques sur une longue période, sera très utile pour valider ces analyses préliminaires.

Au total, la collecte d'informations sur les patrons rencontrés chez *A. bipindensis*, peut être extrapolée aux autres espèces d'*Afzelia* et ainsi contribuer à produire des simulations réalistes sur l'évolution des systèmes de reproduction de ces espèces en fonction de leurs différents types d'habitat et de leurs niveaux de ploïdie. Cependant, la complexité de la délimitation de ces espèces pourrait limiter l'efficacité des actions à mener pour la compréhension réelle de leurs mécanismes de reproduction.

8.5. Conclusions et implication pour la conservation

Notre étude a permis d'apporter des clarifications sur l'histoire évolutive des espèces au sein du genre *Afzelia* en Afrique. Il ressort de nos travaux que les deux espèces diploïdes appartiennent à des clusters génétiques bien distincts avec une taxonomie valide et soutenue. Nos résultats confirment bien que *A. africana* et *A. quanzensis* seraient limitées respectivement aux domaines Soudanien et Zambézien en Afrique (voir chapitre 5). La situation est moins claire chez les espèces forestières tétraploïdes qui mériteraient une révision taxonomique au stade actuel. Ainsi, grâce à la biologie moléculaire, nous avons mis en exergue les problèmes de délimitation d'espèces qui peuvent limiter, dans certaines conditions, l'impact des mesures de gestion durable de ces espèces. Par exemple, des espèces très largement distribuées pourraient s'avérer être constituées de plusieurs espèces différentes et endémiques de petites zones. La méconnaissance des patrons évolutifs des espèces commerciales comme le « doussié », renforce donc le besoin d'un recueil de connaissances scientifiques pour proposer des mesures de protection et de préservation appropriées. La caractérisation de la distribution de la variation à large échelle, peut servir à identifier des groupes génétiques pour les collections des banques génétiques utiles aux programmes de conservation. Ce faisant, ces banques de gènes pourraient contribuer aux outils d'aide à la décision des programmes de conservation et de gestion des forêts tropicales africaines.

Plus spécifiquement, avec l'évolution des normes de certifications forestières auxquelles sont contraints les exploitants forestiers ayant opté pour la certification FSC, les analyses de parenté et de paternité pourraient servir à orienter les densités de semenciers à maintenir en plus des diamètres minimum d'exploitation (DME). Par ailleurs, l'autofécondation observée au niveau des graines (chapitre 7) et les dépressions de consanguinité qui s'en suit, appellent à la plus grande prudence lors de la collecte des graines pour la production de plants en pépinière. Il conviendra en effet d'éviter de collecter sur des pieds très isolés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Ahmed S., Compton S.G., Butlin R.K. and Gilmartin P.M. 2009 Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 20342–20347.
- Ahouangonou S. & Bris B., 1995. *Azelia africana* Sm. *Le Flamboyant*, **42**, 7–10.
- Albertin W. 2005. Régulation de l'expression des gènes dupliqués chez les polypléides : approche protéomique appliquée à l'analyse de Brassicacées autopolyploïdes et allopolyploïdes. Thèse de doctorat. Université Paris XI Orsay, France. 215 p. + annexe
- Allal F., Sanou H., Millet L., Vaillant A., Camus-Kulandaivelu L., Logossa Z.A., Lefevre F. & Bouvet J-M. 2011. Past climate changes explain the phylogeography of *Vitellaria paradoxa* over Africa. *Heredity*, **107**, 174-186.
- Alvarez I. & Wendel J.F. 2006. Cryptic genetic introgression and genetic differentiation within *Gossypium aridum* (Malvaceae) and its relatives. *Evolution*, **60** (3), 505-517.
- Anhuf D., Ledru M.P., Behling H., Da Cruz Jr.F.W., Cordeiro R.C., Van der Hammen T., Karmann I., Marengo J.A., De Oliveira P.E., Pessenda L., Siffedine A., Albuquerque A.L., Da Silva Dias P.L.. 2006. Paleo-environmental change in Amazonian and African rainforest during the LGM. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **239**, 510-527.
- Assi A.L., Abeye J., Guinko S., Riguet R. & Bangavou X., 1985. Médecine traditionnelle et pharmacopée - Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Centrafricaine. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris, France. 140 p.
- Assoumane, A., Zoubéirou, A.M., Rodier-Goud, M., Favreau, B., Bezançon, G., Verhaegen, D., 2013. Highlighting the occurrence of tetraploidy in *Acacia senegal* (L.) Willd. and genetic variation patterns in its natural range revealed by DNA microsatellite markers. *Tree Genetics and Genomes*, **9**, 93–106.
- ATIBT (Association Technique Internationale des Bois Tropicaux), 2006. *La lettre de l'ATIBT n°24 : statistiques 2005*. Paris : Association Technique Internationale des Bois Tropicaux.
- ATIBT (Association Technique Internationale des Bois Tropicaux), 2007. *La lettre de l'ATIBT n°26 : statistiques 2006*. Paris : Association Technique Internationale des Bois Tropicaux.
- ATIBT (Association Technique Internationale des Bois Tropicaux), 2008. *La lettre de l'ATIBT n°28 : statistiques 2007*. Paris : Association Technique Internationale des Bois Tropicaux.
- ATIBT (Association Technique Internationale des Bois Tropicaux), 2009. *La lettre de l'ATIBT n°30 : statistiques 2008*. Paris : Association Technique Internationale des Bois Tropicaux.
- ATIBT (Association Technique Internationale des Bois Tropicaux), 2010. *La lettre de l'ATIBT n°32 : statistiques 2009*. Paris : Association Technique Internationale des Bois Tropicaux.
- ATIBT (Association Technique Internationale des Bois Tropicaux), 2012. *La lettre de l'ATIBT n°34 : statistiques 2010*. Paris : Association Technique Internationale des Bois Tropicaux.
- Aubréville A., 1959. La flore forestière de la Côte d'Ivoire. Deuxième édition révisée. Tome premier. Publication N°15. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne, France. 369 p.
- Aubréville A., 1968. Légumineuses – Césalpinioïdées. Flore du Gabon. Muséum National d'Histoire Naturelle, Volume **15**, Pp : 111-118.
- Aubréville A., 1970. Légumineuses - Césalpinioïdées (Leguminosae - Caesalpinioideae). Flore du Cameroun. Volume **9**. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France. 339 p.
- Augspurger K.C. 1983 Phenology, flowering synchrony and fruit set of six neotropical shrubs. *Biotropica*, **15**, 257–267.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., & Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annu. Rev. Ecol Syst*, **18**, 489-522.
- Ausin I., Alonso-Blanco C. and Martinez-Zapater 2005 Environmental regulation of flowering. *International Journal of Developmental Biology*, **49**, 689–705.

- Ayele T.B., Gailing O., Umer M. and Finkeldey R. (2009) Chloroplast DNA haplotype diversity and postglacial recolonization of *Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel. in Ethiopia. *Plant. Syst. Evol.*, **280**, 175–185
- Baack, E.J., Stanton, M.L., 2005. Ecological factors influencing tetraploid speciation in snow buttercups (*Ranunculus adoneus*): niche differentiation and tetraploid establishment. *Evolution*, **59**, 1936–1944.
- Baker, T.R., Pennington, R.T., Magallon, S. et al. (2014) Fast demographic traits promote high diversification rates of Amazonian trees. *Ecology Letters*, **17**, 527–536.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Baraloto, C., Hardy, O.J., Paine, C.E.T., Dexter, K.G., Cruaud, C., Dunning, L.T., Gonzalez M-A., Molino, J-F, Sabatier, D., Savolainen, V., Chave J., 2012. Using functional traits and phylogenetic trees to examine the assembly of tropical tree communities. *Journal of Ecology*, **100**, 690–701.
- Barlow A., Baker K., Hendry C.R., Peppin L., Phelps T., Tolley K.A., Wüster C.E. and Wüster W. (2013) Phylogeography of the widespread African puff adder (*Bitis arietans*) reveals multiple Pleistocene refugia in southern Africa. *Molecular Ecology*, **22** (4), 1134–1157
- Barringer B.C. 2007 Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *American Journal of Botany*, **94** (9), 1527–1533.
- Barthlott W, Hostert A, Kier G, Küper W, Kreft H, Mutke J, Rafiqpoor MD, Sommer JH. 2007. Geographic Patterns of Vascular Plant Diversity at Continental to Global Scales (Geographische Muster der Gefäßpflanzenvielfalt im kontinentalen und globalen Maßstab). *Erdkunde*: 305-315.
- Bationo B.A., Ouedraogo S.J. & Guinko S., 2001. Longévité des graines et contraintes à la survie des plantules d'*Azelia africana* Sm. ex Pers. dans une savane boisée du Burkina Faso. *Annals of Forest Science* **58** (1), 69–75.
- Bawa K.S. 1990 Plant–pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**, 399–422.
- Beerling D.J. and Osborne C.P. (2006) The origin of the savanna biome. *Glob. Change. Biol.*, **12**, 2023–2031
- Bentham G., 1848. Brief Descriptive Characters and Remarks of New or Rare Plants. *Icones Plantarum*, **4**:790, London.
- Bestelmeyer, B.T. & Briske, D.D. 2012. Grand challenges for resilience-based management of rangelands. *Rangeland Ecology & Management*, **65**, 654–663.
- Bever J.D. & Felber F., 1992. The theoretical population genetics of autopolyploidy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, **8**, 185–217.
- Biwolé A.B., Bourland N., Daïnou K., & Doucet J-L., 2012. Définition du profil écologique de l'azobé, *Lophira alata*, une espèce ligneuse africaine de grande importance : synthèse bibliographique et perspectives pour des recherches futures. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **16** (2), 217-228.
- Biwolé A.B., Morin-Rivat J., Fayolle A. et al. 2015. New data on the recent history of the littoral forests of southern Cameroon: An insight into the role of historical human disturbances on the current forest composition. *Plant Ecology and Evolution* **148**(1), 19–28.
- Bizoux J.P., Dainou K., Bourland N., Hardy O.J., Heuertz M., Mahy G. et al. 2009. Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low-density wind-pollinated tropical tree. *Molecular Ecology*, **18**, 4398–4408.
- Blake J. F., 1915. Based on "Anonymos cassioides Walt.", *Rhodora*, **17** :134.
- Bond, W. J. and Parr, C. L. 2010. Beyond the forest edge: Ecology, diversity and conservation of the grassy biomes. *Biological Conservation* **143**, 2395-2404.
- Bonou W., Glèlè-Kakai R., Assogbadjo A.E., Fonton H.N. & Sinsin B., 2009. Characterisation of *Azelia africana* Sm. habitat in the Lama forest reserve of Benin. *Forest Ecology and Management*, **258**, 1084–1092.
- Borchsenius, F., 2007. FastGap 1.0.8. Software distributed by the authors. Aarhus (Denmark): Department of Biological Sciences, University of Aarhus. Available from: <http://192.38.46.42/aubot/fb/FastGap/home.htm>.

- 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. *Molecular Ecology*, **17**, 2041–2050
- Brenan, J.P.M., 1967. Leguminosae, subfamily Caesalpinioideae. In: Milne-Redhead, E. & Polhill, R.M. (Editors). *Flora of Tropical East Africa*. Crown Agents for Oversea Governments and Administrations, London, United Kingdom. 230 p.
- Breteler F.J., 1995. The Boundary between Amherstieae and Detarieae (Caesalpinioideae). In : Crisp, M.D. and Doyle, J.J. (eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part 7. Kew, Royal Botanical Gardens, London, pp. 53-62.
- Breteler F.J. & Wieringa J.J., 1999. *Generic Delimitation in Caesalpinioideae*. XVI International Botanical Congress, St. Louis, Missouri, USA.
- Brncic T.M., Willis M.K.J., Harris D.J. et al. 2007. Culture or climate? The relative influences of past processes on the composition of the lowland Congo rainforest. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **362**, 229–242.
- Brochmann, C., Brysting, A.K., Alsos, I.G., Borgen, L., Grundt, H.H., Scheen, A-C., Elven, R., 2004. Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, **82**, 521–536.
- Brummitt, R.K., Chikuni, A.C., Lock, J.M. & Polhill, R.M., 2007. Leguminosae, subfamily Caesalpinioideae. In: Timberlake, J.R., Pope, G.V., Polhill, R.M. & Martins, E.S. (Editors). *Flora Zambesiaca*. Volume 3, part 2. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, United Kingdom. 218 p.
- Bruneau A., Forest, F., Herendeen P.S., Klitgaard B.B. & Lewis G.P., 2001. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Syst. Bot.* **26**, 487-514.
- Bruneau, A., Mercure, M., Lewis, G.P., Herendeen, P.S., 2008. Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. *Systematics Research. Botany*, **86**, 697–718.
- Bruvo R., Michiels N.K., D'Souza T.G., Schulenburg H. 2004 A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology*, **13**, 2101–2106.
- Bryan F.A. & Soltis D.E. 1987. Electrophoretic evidence for allopolyploidy in the fern *Polypodium virginianum*. *Systematic Botany*, **12**, 553-561.
- Budde K.B., Gonzalez-Martinez S.C., Hardy O.J. & Heuertz M. (2013) The ancient tropical rainforest tree *Symphonia globulifera* L. f. (Clusiaceae) was not restricted to postulated Pleistocene refugia in Atlantic Equatorial Africa. *Heredity*, **111**, 66–76
- Burkill H.M., 1995. *The useful plants of West Tropical Africa*. 2nd Edition. Volume 3, Families J–L. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, United Kingdom. 857 p.
- Burton, T.L., Husband B.C., 2000. Fitness differences among diploids, tetraploids, and their triploid progeny in *Chamerion angustifolium*: mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. *Evolution*, **54** (4), 1182-1191.
- Cannon S.B., Ilut D., Farmer A.D., Maki S.L., May G.D., Singer S.R., Doyle J.J. 2010. Polyploidy did not predate the evolution of nodulation in all legumes. *PLoS ONE*, **5** (7), e11630.
- Cannon, S.B., McKain, M.R., Harkess, A., Nelson, M.N., Dash, S., Deyholos, M.K., Peng, Y., Joyce, B., Stewart, Jr C.N., Rolf, M., Kutchan, T., Tan X., Chen, C., Zhang, Y., Carpenter, E., Wong, G.K-S., Doyle, J.J., Leebens-Mack, J. 2015. Multiple Polyploidy Events in the Early Radiation of Nodulating and Nonnodulating Legumes. *Molecular Biology and Evolution*, **32**(1), p. 193.
- Carnaval A. C. & Moritz C. 2008. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J. Biogeogr.* **35**, 1187-120
- Cascante A. M., Quesada J. A. Lobo and E. J. Fuchs 2002 Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree, *Samanea saman*. *Conservation Biology*, **16**, 137–147.
- Cerling T.E., Harris J.M., Macfadden B.J., Leakey M.G., Quade J., Eisenmann V. et al. (1997) Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. *Nature*, **389**, 153–158
- Charlesworth D. and Charlesworth B. 1987 Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 237–268.

- Chase, M.W., Cowan R.S., Hollingsworth P.M. et al., 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, **56**, 295–299.
- Chat J., Jauregui B., Petit R. and Nadot S. 2004. Reticulate evolution in kiwifruit (*Actinidia*, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies. *Amer. J. Bot.*, **91**, 736-747.
- Chessel, D., Dufour, A.B., Thioulouse, J., 2004. The ade4 package - I: One-table methods. *R News*, **4**, 5–10.
- Chevalier A., 1909. In *Végétaux Utiles de l'Afrique Tropicale Française* ; Etudes Scientifiques et Agronomiques, 172, Paris.
- Chevalier A., 1940. Sur un arbre du Cameroun et du Gabon à bois utilisable (*Afzelia pachyloba* Harms). *Botanique Appliquée et Agriculture Tropicale*, **19**, 484-488.
- Chevreur, B., Wetter, T., Suhai S., 1999. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information Computer Science and Biology: *Proceedings of the German Conference on Bioinformatics*, **99**, 45-56.
- Chybicki I.J., Burczyk J. (2009) Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *J. Hered.*, **100**, 106–113
- Clark L.V. and Jasieniuk M., 2011. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 562–566.
- CTFT (Centre Technique Forestier Tropical), 1963. Résultats des observations et des essais effectués au Centre Technique Forestier Tropical sur le doussié: *Afzelia* spp., *A. bipindensis*, *A. pachyloba*, *A. africana*. Information technique No 184, CTFT, Nogent-sur-Marne, France, 9 p.
- CTFT (Centre Technique Forestier Tropical), 1980. « Doussié ». *Bois et Forêts des Tropiques* **189**, 37–54.
- Chidumayo E.N., 1992. Effects of shoot mortality on the early development of *Afzelia quanzensis* seedlings. *J. Appl. Ecol.*, **29**, 14–20.
- Clegg M.T., Gaut J.B.S., Learn G.H. & Morton B R. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc Nat Acad Sci USA* ; 1991 : 6795-801.
- Coates Palgrave M. and Coates Palgrave K. (2002) *Trees of Southern Africa* (3rd ed), Struik Publishers (Pty) Ltd., Cape Town
- Colyn M., Gautier-Hion A., & Verheyen W. 1991. A Re-Appraisal of Palaeoenvironmental History in Central Africa: Evidence for a Major Fluvial Refuge in the Zaire Basin. *Journal of Biogeography*, **18**, 403-407.
- Comes H.P. & Abbott R.J. 2001. Molecular phylogeography, reticulation, and lineage sorting in Mediterranean *Senecio* sect. *Senecio* (Asteraceae). *Evolution*, **55**, 1943-1962.
- Cordeiro N. J. & Howe H. F. 2001. Low recruitment of trees dispersed by animals in African forest fragments. *Conserv. Biol.*, **15**, 1733-1741.
- Cordeiro N.J. and Howe H.F. 2004 Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100** (24), 14052–14056.
- Cornuet J.M. and G. Luikart (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144** (4), 2001-2014
- Coyne J.A. 2007 Sympatric speciation. *Current Biology*, **17**, 787-788.
- Cronn R.C. & Wendel J.F. 1998. Simple methods for isolating homoeologous loci from allopolyploid genomes. *Genome*, **41**, 756–762.
- da Silva H.N., Hall A.J., Rikkerink E., McNeilage M.A. and Fraser L.G. 2005 Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance. *Heredity*, **95**, 327–334.
- 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.
- Daïnou K., Doucet J.-L., Sinsin B. & Mahy G., 2011. Identité et écologie des espèces forestières commerciales d'Afrique Centrale: le cas de *Milicia* spp. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **16** (2), 229-241.
- Dainou K., Laurenty E., Mahy G., Hardy O.J., Brostaux Y., Tagg N. et al. 2012. Phenological patterns in a natural population of a tropical timber tree species, *Milicia excelsa* (Moraceae): evidence of isolation by time and its interaction with feeding strategies of dispersers. *American Journal of Botany*, **99**, 1453–1463.

- Dainou, K., Mahy, G., Duminil, J., Dick, C.W., Doucet, J.-L., Donkpegan, A.S.L., Pluijgers, M., Sinsin, B., Lejeune, P., Hardy, O.J., 2014. Speciation slowing down in widespread and long-living tree taxa: insights from the tropical timber tree genus *Milicia* (Moraceae). *Heredity*, **113**, 74–85.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModeltest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*, **9**, 772.
- Darlu P., Tassy P. 1993. *Reconstitution phylogénétique*. Masson, Paris.
- 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.
- Das M., Bhattacharya S., Basak J. and Pal A. 2007. Phylogenetic relationships among the bamboo species as revealed by morphological characters and polymorphism analyses. *Biol. Plantarum*, **51**, 667–672.
- Dauby G., Duminil J., Heuertz M., Koffi K.G., Stevart T., Hardy O.J. 2014. Congruent phylogeographic patterns of eight tree species in Atlantic Central Africa provide insights on the past dynamics of forest cover. *Molecular Ecology*, **23**(9), 2299–2312
- Dauby G., Zaiss R., Blach-Overgaard A., Catarino L. et al., 2016. RAINBIO: a mega-database of tropical African vascular plants distributions. *PhytoKeys*, **74**, 1-18
- David P., Pujol B., Viard F. et al. 2007 Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, **16**, 2474–2487.
- de Freitas J.V. & Pinard M.A. 2008. Applying ecological knowledge to decisions about seed tree retention in selective logging in tropical forests. *For. Ecol. Manage.*, **256**, 1434–1442.
- de Saint Aubin G., 1963. *La forêt du Gabon*. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne, France. 208 p.
- De Wildeman E. A., 1925. In *Plantae Bequaertianae: Etudes sur les Récoltes Botaniques du Dr. J. Bequaert Chargé de Missions au Congo Belge (1913-1915)*. iii. 120, Paris
- De Wildeman E. A., 1933. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*. Centralblatt für Sammlung und Veröffentlichung von Einzeldiagnosen neuer Pflanzen. [Edited by Friedrich Fedde], **13**: 369, Berlin
- De Wildeman E. A., 1935. in *Bull. Seanc. Inst. Roy. Col. Belge*, **vi**, 203.
- de Wasseige C., de Marcken P., Bayol N., Hiol Hiol F., Mayaux Ph., Desclée B., Nasi R., Billand A., Defourny P. & Eba'a Atyi R. (Eds, 2012). *Les Forêts du Bassin du Congo – État des Forêts 2010*. Office des publications de l'Union Européenne. Luxembourg. 276 p. ISBN: 978-92-79-22717-2 doi:10.2788/48830.
- 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* doi: 10.1038/hdy.2010.
- Debout G.D., Doucet J.-L. & Hardy O.J. (2011) Population history and gene dispersal inferred from spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae). *Heredity*, **106**, 88–99
- Demenou B.B., Pineiro R. & Hardy O.J. 2016. Origin and history of the Dahomey Gap separating West and Central African rain forests: insights from the phylogeography of the legume tree *Distemonanthus benthamianus*. *Journal of Biogeography*, **43** (5), 1020–1031.
- Demesure B., Comps B., Petit R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* **50**, 2515-2520.
- Dechamps, R., Senut, B., Pickford M., 1992. Fruits fossiles pliocènes et pléistocènes du Rift Occidental ougandais. Signification paléoenvironnementale. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 2, Mécanique, Physique, Chimie, Sciences de l'univers, Sciences de la Terre*, vol. 314, no3, pp. 325-331.
- Détienne P., Oyono F., Durrieu de Madron L., Demarquez B. & Nasi R., 1998. L'analyse de cernes : application aux études de croissance de quelques essences en peuplements naturels de forêt dense humide africaine. *Projet Forafri*, document n° 15, 40 p.
- 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. *Molecular Ecology*, **12**, 753–764.

- Dick C.W., Roubik D.W., Gruber K.F. and Bermingham E. 2004 Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: *Euglossini*) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular Ecology*, **13**, 3775–3785.
- 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.
- Dobzhansky, T.G. 1951. Genetics and the Origin of Species, 3rd edn. Columbia University Press, New York
- Donkpegan A.S.L., Hardy O.J., Lejeune P., Oumorou M., Dainou K. & Doucet J.-L. 2014. Un complexe d'espèces d'*Azelia* des forêts africaines d'intérêt économique et écologique (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **18** (2), 233-246
- Donkpegan, A.S.L., Doucet, J.-L., Dainou, K., Hardy, O.J., 2015. Microsatellite development and flow cytometry in the African tree genus *Azelia* (Fabaceae, Caesalpinioideae) reveal a polyploid complex. *Applications in Plant Sciences*, **3**, 1400097.
- Donkpegan A.S.L., Doucet J.L., Migliore J., Duminil J., Daïnou K., Rosalia P., Wieringa J., Champluvier D. & Hardy O.J. (2017). Evolution in African tropical trees displaying ploidy-habitat association: the genus *Azelia* (Leguminosae). *Molecular Phylogenetic Evolution*, **107**, 270-281.
- Doucet, J.-L. 2005. African rain forests: Evolution and threats. In *Tropical Forests in a changing global context*. Royal Academy of Overseas Sciences. UNESCO, Brussels, 8-9 november. pp 45-60.
- 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).
- Doucet J.-L., Daïnou K., Ligot G., Ouédraogo D.-Y., Bourland N., Ward S.E., Tekam P., Lagoute P. and Fayolle, A. 2016 Enrichment of Central African logged forests with high-value tree species: testing a new approach to regenerating degraded forests. *Int. J. Biodivers. Sci. Ecosyst. Serv. Manage.*, 1–13.
- Doyle, J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11–15.
- Doyle J.J. & Gaut B.S. 2000. Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Mol. Biol.*, **42**, 1-23.
- Doyle J.J., Doyle J.L., Rauscher J.T. and Brown A.H.D. 2004. Diploid and polyploid reticulate evolution throughout the history of perennial soybeans (*Glycine* subg. *Glycine*). *New Phytol.*, **161**, 121-132.
- Doyle J.J., Chapill J.A., Bailey C.D. & Kajita T., 2000. Towards a Comprehensive Phylogeny of Legumes : Evidence from *rbcL* Sequences and Non-molecular Data. In : Herendeen, P.S. and Bruneau A. (eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part **9**. Kew, Royal Botanical Gardens, London, pp. 1-20.
- Doyle, J.J., 2012. Polyploidy in legumes. In: Soltis PS, Soltis DE, eds. *Polyploidy and genome evolution*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 147-180
- Dray, S., Dufour, A.-B., Chessel, D., 2007. The ade4 Package - II: Two-table and K-table Methods. *R News*, **7**, 47–51.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, **7**, 214.
- Dufresne F., Stift M., Vergilino R. and Mable B.K. 2014 Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Molecular Ecology*, **23**, 40–69.
- 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.
- 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 Biosystems*, **143**, 528–542.
- Duminil J., Heuertz M., Doucet J.-L., Bourland N., Cruaud C., Gavory F., Doumenge C., Navascue's M. & Hardy O.J. 2010. CpDNA-based species identification and phylogeography: application to African tropical tree species. *Mol. Ecol.* **19**, 5469-5483.
- Duminil, J., Mona, S., Mardulyn, P., Doumenge, C., Walmacq, F., Doucet, J.-L., Hardy, O.J., 2015. Late Pleistocene molecular dating of past population fragmentation and demographic changes in African

- rain forest tree species supports the forest refuge hypothesis. *Journal of Biogeography*, **42** (8), 1443–1454.
- Duminil J., Daïnou K., Kombi Kaviriri D., Gillet P., Loo J., Doucet J.-L. and Hardy O.H. 2016. Relationships between population density, fine-scale genetic structure, mating system and pollen dispersal in a timber tree from African rainforests. *Heredity*, **116**, 295–303.
- Duminil J., Daïnou K., Kombi Kaviriri D., Gillet P., Loo J., Doucet J.-L. and Hardy O.H. 2016a. Relationships between population density, fine-scale genetic structure, mating system and pollen dispersal in a timber tree from African rainforests. *Heredity*, **116**, 295–303.
- Duminil J., Mendene Abessolo D.T., Ndiade Bourobou D., Doucet J.-L., Loo J. and Hardy O.J. 2016b High selfing rate, limited pollen dispersal and inbreeding depression in the emblematic African rain forest tree *Baillonella toxisperma* – Management implications. *Forest Ecology and Management*, **379**, 20–29.
- Dupont, L.M., Jahns, S., Marret, F., Shi, N., 2000. Vegetation change in equatorial West Africa: time-slices for the last 150 ka. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **155**, 95-122.
- Durrieu de Madron L., & Forni E., 1997. Aménagement forestier dans l'est du Cameroun : structure du peuplement et périodicité d'exploitation. *Bois et Forêts des Tropiques*, **254** (4), 39-50.
- Eaton D.A. & Ree R.H. 2013. Inferring phylogeny and introgression using RAD-seq data: An example from flowering plants (*Pedicularis*: Orobanchaceae). *Systematic Biology*, **62**: 689–706.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**, 1792–1797.
- 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.
- Esselink G.D., Nyobom H., Vosman B., 2004. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting—peak ratios) method. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 402–408.
- 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
- Evrard Q. 2015. Ecologie de reproduction du doussié, *Azelia bipindensis* Harms, en forêt dense humide tropicale gabonaise. Mémoire : Université de Liège/Gembloux Agro-Bio Tech, 22 p.
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. 2003 Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567–1587
- FAO. 2010. Évaluation des ressources forestières mondiales 2010 – Rapport principal. Étude FAO: Forêts 163. Rome, Italie.
- Fargot C., Forni E. & Nasser R. 2004. Réflexions sur l'aménagement des forêts de production dans le bassin du Congo. *Bois et Forêts des Tropiques* **281** (3), 19-34.
- Faye A. 2015. Dynamique évolutive des forêts tropicales humides d'Afrique Centrale: cas d'étude de la famille des palmiers (Arecaceae). Thèse de doctorat. Université de Montpellier, France. 196 p. + annexe.
- Faye A., Deblauwe V., Mariac C., Richard D., Sonké B., Vigouroux Y., Couvreur T.L.P. 2016. Phylogeography of the genus *Podococcus* (Palmae/Arecaceae) in Central African rain forests: Climate stability predicts unique genetic diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **105**, 126–138
- Fétéké F. & Philippart J., 2008. Plan d'aménagement des Unités forestières d'aménagement n° 10 030 et 10 031 regroupées. Cellule d'aménagement Pallisco, Nature Plus, Gembloux, Belgique.
- Filchak K.E., Roethele J.B. and Feder J.L. 2000 Natural selection and sympatric divergence in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *Nature* **407**, 739–742.
- 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.
- 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.

- Garrick, R.C., Dyer, R.J., Sunnucks, P., 2010. Nuclearegene phylogeography using PHASE: dealing with unresolved genotypes, lost alleles, and systematic bias in parameter estimation. *BMC Evolutionary Biology*, **10**:118.
- Gathua M. (2000) The effects of primates and squirrels on seed survival of a canopy tree, *Azelia quanzensis*, in Arabuko-Sokoke Forest, Kenya. *Biotropica* **32**, 127–132
- Gautier-Hion A., Duplantier J-M., Quris R., Feer F., Sourd C., Decoux J-P., Dubost G., Emmons L., Erard C., Hecketsweiler P., Mougazi A., Roussillon C. & Thiollay J-M., 1985. Fruit characters as a basis of fruit choice and seed dispersal in a tropical forest vertebrate community. *Oecologia*, **65**, 324-337.
- Geerling C. 1982. Guide de terrain des ligneux sahéliens et soudano-guinéens. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen, p 340, **82-3**.
- Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical Science*, **7**, 457–472.
- Gentry A. 1992. Tropical forest biodiversity: distributional patterns and their conservational significance. *Oikos*, **63**, 19-28.
- Gérard J., Edi Kouassi A., Daigremont C., Détienne P., Fouquet D. & Vernay M., 1998. Synthèse sur les caractéristiques technologiques des principaux bois commerciaux africains. Document Forafri 11. Cirad, Montpellier, France. 185 p.
- Gérard J. & Louppe D., 2011a. *Azelia africana* Sm. ex Pers. In : Lemmens R.H.M.J., Louppe D. & Oteng-Amoako A.A. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa), Wageningen, Pays Bas.
- Gérard J. & Louppe D., 2011b. *Azelia bella* Harms. In : Lemmens R.H.M.J., Louppe D. & Oteng-Amoako A.A. (Eds). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa), Wageningen, Pays Bas.
- Gérard J. & Louppe D., 2011c. *Azelia bipindensis* Harms. In : Lemmens R.H.M.J., Louppe D. & Oteng-Amoako A.A. (Eds). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa), Wageningen, Pays Bas.
- Gérard J. & Louppe D., 2011d. *Azelia pachyloba* Harms. In : Lemmens R.H.M.J., Louppe D. & Oteng-Amoako A.A. (Eds). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa), Wageningen, Pays Bas.
- Gerhardt K. & Todd C., 2009. Natural regeneration and population dynamics of the tree *Azelia quanzensis* in woodlands in Southern Africa. *African Journal of Ecology*, **47**, 583–591.
- Giraudoux, P., 2013. pgirmess: Data analysis in ecology. R pack- age version 1.5.7. Available from <http://CRAN.R-project.org/package=pgirmess>.
- Gmelin J. F., 1792. In *Systema Naturae*, Tomus II. Editio decima tertia reformatum. 2 (2): 927.
- Goodwillie C., Kalisz S. and Eckert C.G. 2005 The Evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **36**, 47-79.
- 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.
- Graham, S.W., Olmstead, G., 2000. Utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of the Basal Angiosperms. *American Journal of Botany*, **87** (11), 1712–1730.
- Haeckel, E. 1866. *Generelle Morphologie der Organismen, 2 Vols. - I. Allgemeine Anatomie der Organismen; II: Allgemeine Entwicklungsgeschichte der Organismen*, Georg Reimer Verlag, Berlin.
- Haffer J. 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Braz J Biol* **68**: 917-94.
- Hahn, C., Bachmann, L., Chevreux B., 2013. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads-a baiting and iterative mapping approach. *Nucleic Acids Research*, **41**, e129.
- Harder L.D. and Barrett S.C.H. 1996 Pollen dispersal and mating patterns in animal pollinated plants. In Lloyd D.G. and Barrett S.C.H. [eds.], *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*, 140–190. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- Hardy O.J., Born C., Budde K., Dainou K., Dauby G., Duminil J., Ewédjé E-EB., Gomez C., Heuertz M., Koffi G.K. 2013. Comparative phylogeography of African rain forest trees: a review of genetic signatures of vegetation history in the Guineo-Congolian region. *Comptes Rendus Geoscience*, **345**, 284-296.

- 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.
- Hardy O.J., Charbonnel N., Fréville H. and Heuertz M. 2003 Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *Genetics*, **163** (4), 1467-1482
- Hardy O.J., Maggia L., Bandou E., Breyne P., Caron H., Chevallier M.H. et al. 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. *Molecular Ecology*, **15**, 559–571
- Hardy O.J., Born C, Budde K, Daïnou K, Dauby G, Duminil J, Ewédjé E-EB, Gomez C, Heuertz M, Koffi GK. 2013. Comparative phylogeography of African rain forest trees: a review of genetic signatures of vegetation history in the Guineo-Congolian region. *Comptes Rendus Geoscience*, **345**, 284-296.
- Hardy O.J. 2015 Population genetics of autopolyploids under a mixed mating model and the estimation of selfing rate. *Molecular Ecology Resources*, **16** (1), 103–117
- Hare M.P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *TRENDS in Ecology & Evolution*, **16** (12), 700-706.
- Harrison S. and Hastings A. 1996 Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 180–183.
- Harms H., 1913. Leguminosae africanae. VI. Elephanorrhiza. *Botanische Jahrbücher*, **49**, 420.
- Hawthorne W. & Jongkind C., 2006. Woody plants of western African forests: a guide to the forest trees, shrubs and lianes from Senegal to Ghana. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom. 1023 pp
- Hennig, W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hennig, W. 1950. *Grundzüge einer Theorie des Phylogenetischen Systematik*. Berlin: Deutscher Zentralverlag.
- Hepper F. N., 1972. In *Kew Bulletin*. **26** (3): 565, Kew, England.
- Heuertz M., Vekemans X., Hausman J-F., Palada M. and Hardy O. 2003 Estimating seed vs pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Molecular Ecology*, **12**, 2483–2495.
- 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., Duminil J., Dauby G., Savolainen V., Hardy O.J. 2014. Comparative phylogeography in rainforest trees from Lower Guinea, Africa. *PloS one*, **9**, e84307.
- Hey J. 2006. On the failure of modern species concepts. *Trends Ecol. Evol.* **21**, 447-450
- Hewitt G.M. 2000 The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Review article. *Nature* **405**, 907–913
- Hills, T.L. and Randall, R.E. 1968. The Ecology of the Forest/savanna Boundary (proceedings of the Igu Humid Tropics Commission Symposium, Venezuela, 1964). DTIC Document.
- Hill, M.O., Smith, A.J.E., 1976. Principal components analysis of taxonomic data with multi-state discrete characters. *Taxon*, **25**, 249–255.
- Hirsch B.T., Kays R., Pereira V.E., & Jansen P.A. 2012. Directed seed dispersal towards areas with low conspecific tree density by a scatter-hoarding rodent. *Ecology Letters*, **15**(12), 1423–1429. doi:10.1111/ele.12000
- Hollander, M., Wolfe, D.A., 1973. Nonparametric statistical methods. New York, John Wiley & Sons.
- Holleley C.E. & Geerts P.G., 2009. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans out and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques*, **46**: 511-517.
- Holsinger K.E. 2000 Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97** (13), 7037–7042.
- Hoorn C., Wesselingh F.P., ter Steege H., Bermudez M. a, Mora a, Sevink J., Sanmartín I., Sanchez-Meseguer a, Anderson C.L., Figueiredo J.P., Jaramillo C., Riff D., Negri F.R., Hooghiemstra H., Lundberg J., Stadler T., Särkinen T., & Antonelli a (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science (New York, N.Y.)*, **330**, 927–931.

- Houehanou T.D., Assogbadjo A.E., Glele-Kakaï R., Houinato M. & Sinsin B., 2011. Valuation of local preferred uses and traditional ecological knowledge in relation to three multipurpose tree species in Benin (West Africa). *Forest Policy and Economics*, **13**, 554–562.
- Hoyle A. C., 1933. In *Bulletin of Miscellaneous Information*, Royal Botanical Gardens, **170**, Kew.
- Huang K., Ritland K., Guo S., Shattuck M. and LI B. 2014 A pairwise relatedness estimator for polyploids. *Molecular Ecology Resources*, **14**, 734–744.
- Hudson, R.R., Coyne, J.A., 2002. Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution*, **56**, 1557–1565.
- Hugues C.E., Bailey C.D. & Harris S.A. 2002. Divergent and reticulate species relationships in *Leucaena* (Fabaceae) inferred from multiple data sources: insights into polyploid origins and nrDNA polymorphism. *Am. J. Bot.* ; **89**, 1057-73.
- Hutchinson L.J. & Dalziel J.M., 1958. Revised by R. W. J. Keay (Ed.), *Flora of west Tropical Africa* (2nd ed., Vol. 1, Part. 2, p. 393). London: White Friars Press.
- Hutchinson D.W. and Templeton A.R. 1999 Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, **53**, 1989–1914.
- Ingrouille M. & Chase M.W. 2004. Becoming fruitful and diversifying: DNA sequence phylogenetics and reproductive physiology of land plants. In: Hemsley A, Poole I (eds) *Evolution of Plant Physiology: From Whole Plants to Ecosystems*. London Elsevier Academic Press: London, UK, pp 327–342.
- Igwenyi I.O., Offor C.E., Aja P.M., Aloh G.S., Orji O.U. & Ugwu O.O., 2011. Potentials of *Azelia africana* Vegetable oil in Biodiesel Production. *Fermentation Technology and Bioengineering*, **1**, 8-14.
- INEAC (Institut National pour l'Etude Agronomique du Congo-belge), 1952. Spermatophytes. Flore du Congo Belge et du Ruanda-Urundi. Vol III, Bruxelles, Belgique, 579 p.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), 2012. *IUCN Red list of threatened species*, www.iucnredlist.org., (08/01/2012).
- Jacana, J. 1997 Sappi Tree Spotting Lowveld. Jacana Education, Johannesburg, South Africa.
- Jacobs B.F., Pan A.D., Scotese C.R. 2010. A review of the Cenozoic vegetation history of Africa. *Cenozoic Mammals of Africa. University of California Press, Berkeley*: 57-72.
- Jakobsson M. and 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.
- Jansen P.A., Bartholomeus M., Bongers F., Elzinga J.A., Den Ouden J., & Van Wieren S.E. 2002. The role of seed size in dispersal by scatter-hoarding rodent. CABI Publishing, New York, 209-225.
- Jenczewski E. & Alix K. 2004. From diploids to allopolyploids: The emergence of efficient pairing control genes in Plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, **23**(1), 21-45.
- Johannesson K. 2001 Parallel speciation: a key to sympatric divergence. *Trends in Ecology & Evolution*, **16** (3), 148-153.
- Jong, K., Lethbridge, A., 1967. Cytological studies in the Dipterocarpaceae. I: Chromosome number of certain Malaysian genera. *Notes R Bot Gard Edinburgh*, **27**, 175-184.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. & Donoghue M.J. 2002. *Plant Systematics : a phylogenetic approach*. Sunderland (États- Unis) : Sinauer Associates ; 576 p.
- Kadiri A.B. & Olowokudejo J.D., 2008. Comparative foliar epidermal morphology of the West African species of the genus *Azelia* Smith (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Gayana Botánica*, **65**, 84–92.
- Katende A.B., Birnie A. & Tengnas B., 1995. Useful trees and shrubs for Uganda: Identification, Propagation and Management for Agricultural and Pastoral Communities. Technical handbook No. 10. Regional Soil Conservation Unit (RSCU/ SIDA), Nairobi.
- Kato M. Yasuyuki Kosaka Y., Kawakita A., Okuyama y, Kobayashi Ch., Phimminith T, and Thongphan D. 2009 Plant-pollinator interactions in tropical monsoon forests in Southeast Asia. *American Journal of Botany*, **95** (11), 1375–1394. Keay R. W. J., 1954. Revision of the "Flora of West Tropical Africa": VI, *Kew Bulletin*, **9** (2), pp. 263-275

- Kihara H. and Ono T. 1926. Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. *Zeitschr. f. Zellforsch. Mikro Anat.* **4**: 475-481.
- Kim, K.J., Jansen, R.K., 1995. ndhF sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 10379–10383.
- Koboldt, D., Zhang, Q., Larson, D., et al. 2012. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research*, **22**, 568–576.
- Koffi G. 2010. Etude de la variabilité génétique et de la phylogéographie de *Santiria trimera* (Burseraceae) - implications pour une conservation durable des forêts humides d'Afrique. Thèse de doctorat. Université Libres de Bruxelles, Belgique. 192 p. + annexe
- Koffi K.G., Heuertz M., Doumenge C., Onana J.M., Gavory F. & Hardy O.J., 2010. A combined analysis of morphological traits, chloroplast and nuclear DNA sequences within *Santiria trimera* (Burseraceae) suggests several species following the Biological Species Concept. *Plant Ecology and Evolution* **143**(2) : 160-169.
- Kyndt T., Assogbadjo A.E., Hardy O.J., Glele Kakaï R., Sinsin B., Van Damme P. and Gheysen G. 2009. Spatial genetic structuring of baobab (*Adansonia digitata*, Malvaceae) in the traditional agroforestry systems of West Africa. *Am. J. Bot.*, **96** (5), 950-957
- Lawton-Rauh, A. 2003. Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **29**(3), 396-409.
- Leitch I.J. & Bennet M.D., 1997. Polyploidy in Angiosperms. *Trends Plant Sci.*, **8**, 470-76
- Léonard J.J.G., 1950. Notes sur les genres paleotropicaux *Azelia*, *Intsia* et *Pahudia* (Legum. Caesalp.). *Reinwardtia*, **1** (1), 61-66.
- Letouzey R., 1968. *Etude phytogéographique du Cameroun*. Paris, Lechevalier.
- Lezine A-M., 2007. Postglacial Pollen Records of Africa. In *Encyclopaedia of Quaternary Sciences*, Scott A Elias ed., *Elsevier*, **4**, 2682-2698.
- Lézine A.M. 1989 Late Quaternary vegetation and climate of the Sahel. *Quaternary Research*, **32**, 317–334
- Levin, D.A., 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *American Naturalist*, **122**, 1–25.
- Levin D.A., 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford: Oxford University Press.
- 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.
- Lezine A-M. 2007. Postglacial Pollen Records of Africa. In *Encyclopaedia of Quaternary Sciences*, Scott A Elias ed., *Elsevier*. Vol.4, 2682-2698.
- Ley A.C., Dauby G., Koehler J., Wypior C., Roeser M., Hardy O.J. 2014. Comparative phylogeography of eight herbs and lianas (Marantaceae) in central African rainforests. *Frontiers in genetics*, **5**, 403.
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25**, 1754-1760.
- Liao W.J., Zhu B.R., Zeng Y.F. and Zhang D.Y. 2008 Tetra: an improved program for population genetic analysis of allotetraploid microsatellite data. *Mol. Ecol. Resour.* **8**, 1260–1262.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v.5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.
- Linder H.P., de Klerk H.M., Born J., Burgess N.D., Fjeldså J. 1 Rahbek C. 2012. The partitioning of Africa: statistically defined biogeographical regions in sub-Saharan Africa. *Journal of Biogeography*, **39**, 1189-1205.
- Lioubimtseva E, Simon B, Faure H, Faure-Denard L, Adams JM 1998. Impacts of climatic change on carbon storage in the Sahara-Gobi desert belt since the Last Glacial Maximum. *Glob. Planet Change*, **16-17**, 95–105.
- Loiselle B.A., Sork V.L., Nason J. and Graham C. 1995 Spatial genetic-structure of a tropical understory shrub, *Psychotria Officinalis* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.*, **82**, 1420–1425
- Lorenzen E.D., Masembe C., Arctander P. and Siegismund H.R. 2010 A long-standing Pleistocene refugium in Southern Africa and a mosaic of refugia in East Africa: insights from mtDNA and the common eland antelope. *J. Biogeogr.*, **37**, 571–581
- Loveless M.D., Hamrick J.L. 1984. Determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **15**, 65-95.

- Lovejoy T.E., Hannah L. 2005. Climate change and biodiversity. Yale University Press, New Haven, 418 pp.
- Lowe A.J., Harris D., Dormontt E. & Dawson I.K. 2010. Testing putative African tropical forest refugia using chloroplast and nuclear DNA phylogeography. *Tropical Plant Biology* **3** : 50-58.
- Lynch M. 1990 The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, **7**, 478-484.
- Lyons-Weiler J. & Milinkovitch M.C. 1997. A phylogenetic approach to the problem of differential lineage sorting. *Mol. Biol. Evol.*, **14**, 968-975.
- Mable B. K. 2004 Polyploidy and self-compatibility: is there an association? *New Phytologist*, **162**, 803-811.
- Mackinder, B., Saslis-Lagoudakis, H., Wieringa, J.J., Devey, D., Forest, F., Bruneau, A., 2013. The tropical African legume *Scorodophloeus* clade includes two undescribed *Hymenostegia* segregate genera and *Micklethwaitia*, a rare, monospecific genus from Mozambique. *South African Journal of Botany*, **89**, 156-163.
- Malausa T., Gilles A., Meglecz A., Blanquart E., Duthoy H., Costedoat S., Dubut C., et al., 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol. Ecol. Resour.* **11**: 638-644.
- Mallet J. 2010. Why was Darwin's view of species rejected by twentieth century biologists? *Biol. Philos.* **25**, 497-527.
- 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 quaternary. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh: Essays on the ecology of the Guineo-Congo rain forest, Huddersfield, UK, 104B : 31-73.
- Maley J, Brenac F, Bigot S, Moron V. 2000. Variations de la végétation et des paléoenvironnements en forêt dense africaine au cours de l'Holocène. Impact de la variation de températures marines. SERVANT, M. ; SER.
- Maley J. 2001 The impact of arid phases on the African rain forest through geological history. In: Weber W, White L, Vedder A, Naughton-Treves L (eds) *African Rain Forest Ecology and Conservation*. Yale University Press: New Haven, Connecticut, pp 68-87
- Marcysiak, K., Mazur, M., Romo, A., Montserrat, J.M., Didukh, Y., Boratyńska, K., Jasińska, A., Kosiński, P., Boratyński, A., 2007. Numerical taxonomy of *Juniperus thurifera*, *J. excelsa* and *J. foetidissima* (Cupressaceae) based on morphological characters. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **155**, 483-495.
- Mariac, C., Scarcelli, N., Pouzadou, J., et al., 2014. Cost-effective enrichment hybridisation capture of chloroplast genomes at deep multiplexing levels for population genetics and phylogeography studies. *Molecular Ecology Resources*, **14**, 1103-1113.
- Marie D. & Brown S.C., 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, **78**, 41-51.
- Markwith S.H., Stewart D.J. and Dyer J.L. 2006 Tetrasat: a program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*, **6**, 586-589.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet-Journal*, **17**, 10-12.
- 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.
- Mayden R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In M. F. Claridge, H. A. Dawah & M. R. Wilson (eds.), *Species: The units of diversity*,. Chapman & Hall. pp. 381-423.
- Mayr E. 1942. Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press, USA.
- Mayr, E. 1947 Ecological factors in speciation. *Evolution* **1**, 263-288.
- 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.
- Mayr E. 1963 *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
- McDonough M.M., Šumbera R., Mazoch V., Ferguson A.W., Phillips C.D. AND Bryja J. 2015 Multilocus phylogeography of a widespread savanna-woodland-adapted rodent reveals the influence of

- Pleistocene geomorphology and climate change in Africa's Zambezi region. *Molecular Ecology*, **24** (20), 5248–5266
- McIntyre, P.J., 2012. Polyploidy associated with altered and broader ecological niches in the *Claytonia perfoliata* (Portulacaceae) species complex. *American Journal of Botany*, **99**, 655–662.
- Meglec A., Costedoat S., Dubut C., Gilles A., Malausa T., Pech N. & Martin J.F., 2010. QDD: A user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics (Oxford, England)* **26**: 403 – 404.
- Mesel K., 2002. Les afzelias. Un seul nom, plusieurs espèces. *Courier du Bois*, **42** (136), 13-16.
- Micheneau C., Dauby G., Bourland N., Doucet J-L. & Hardy O.J., 2011. Development and characterization of microsatellite loci in *Pericopsis elata* (Fabaceae) using a cost-efficient approach. *Am. J. Bot.* **98**: e268–e270
- Miller CS, Gosling WD. 2014. Quaternary forest associations in lowland tropical West Africa. *Quaternary Science Reviews*, **84**, 7-25.
- Morin-Rivat J., Biwolé A., Gorel A-P., Vleminckx J., Gillet J-F., Bourland N., Hardy O.J. et al. 2016. High spatial resolution of late-Holocene human activities in the moist forests of central Africa using soil charcoal and charred botanical remains. *The Holocene*, **26**(12), 1954–1967.
- Morellato L.P.C., Talora D.C., Takahasi A., Bencke C.C., Romera E.C. and Zipparro V.B. 2000 Phenology of atlantic rain forest trees: A Comparative Study. *Biotropica*, **32** (4b), 811-823.
- Morley R.J. 2000. *Origin and evolution of tropical rain forests*. John Wiley & Sons: New York.
- 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.
- Murawski D. A. and Hamrick J. L. 1992. Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Panama. *Journal of Heredity*, **83**, 401–404.
- Nason, J.D., and Hamrick J.L. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. *Journal of Heredity*, **88**, 264–276.
- Neuwinger H.D., 2000. African traditional medicine: a dictionary of plant use and applications. Medpharm Scientific, Stuttgart, Germany, 589 p.
- Ndiade-Bourobou D., Hardy O.J., Favreau B., Moussavou H., Nzengue E., Mignot A. and Bouvet J.-M. 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. *Molecular Ecology*, **19** (22), 4949–4962.
- Ngomanda, A., Chepstow-Lusty, A., Makaya, M., Favier, C., Schevin, P., Maley, J., Fontugne, M., Oslisly, R., & Jolly, D. 2009. Western equatorial African forest-savanna mosaics: A legacy of late Holocene climatic change? *Climate of the Past*, **5**, 647-659.
- Niemiller M.L., Fitzpatrick B.M., Miller B.T. 2008 Recent divergence with gene flow in Tennessee cave salamanders (Plethodontidae : *Gyrinophilus*) inferred from gene genealogies. *Molecular Ecology*, **17**, 2258-2275.
- Nielsen R., Tarpay D.R., Reeve H.K. 2003 Estimating effective paternity number in social insects and the effective number of alleles in a population. *Molecular Ecology*, **12**, 3157–3164
- Norconk M.A., Grafton B.W. & Conklin-Brittain N.L. 1998. Seed dispersal by Neotropical seed predators. *American Journal of Primatology*, **45**, 103–126.
- Normand D., 1939. Identification et emplois des bois d'*Afzelia*. *Rev. Bot. Appl.* 19, 488-494.
- Normand D., 1950. Atlas des bois de la Côte d'Ivoire. Tome 1. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne, France, 148 p.
- Normand D. & Paquis J., 1976. Manuel d'identification des bois commerciaux. Tome 2. Afrique Guinéo-Congolaise. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne, France, 335 p.
- Nosil P. 2008. Speciation with gene flow could be common. *Molecular Ecology*, **17**, 2103-2106.
- Obbard D.J., Harris S.A. and Pannell J.R. 2006 Simple allelic phenotype diversity and differentiation statistics for allopolyploids. *Heredity*, **97**, 296–303.

- Odee D.W., Telford A., Wilson J., Gaye A., Cavers S. 2012. Plio-Pleistocene history and phylogeography of *Acacia senegal* in dry woodlands and savannahs of sub-Saharan tropical Africa: evidence of early colonisation and recent range expansion. *Heredity*, **109** (6), 372–382
- Ohno S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, New York, New York, USA.
- Ohri, D., 1996. Genome size and polyploidy variation in the tropical hardwood genus *Terminalia* (Combretaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **200**, 225–232.
- Olson, D.M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E.D., Burgess, N.D., Powell, G.V., Underwood, E. C., D'amico, J.A., Itoua, I., Strand, H.E. and Morrison, J.C. 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth: A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. *BioScience*, **51**, 933-938.
- Omondi S.F., Kireger E., Dangasuk O.G., Chikamai B., Odee D.W., Cavers S. et al. 2010 Genetic diversity and population structure of *Acacia senegal* (L.) Willd. in Kenya. *Trop. Plant. Biol.*, **3**, 59–70.
- Onana J., 1998. L'arbre à palabres sur l'utilisation et la régénération naturelle de *Azelia africana* Sm. *Le Flamboyant*, **46**, 21–33.
- Onana J. & Devineau J-L., 2002. *Azelia africana* Smith ex Persoon dans le Nord-Cameroun. Etat actuel des peuplements et utilisation pastorale. *Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **55** (1), 39-45.
- Onweluzo J.C., Onuoha K.C. & Obanu Z.A., 1995. Certain functional properties of gums derived from some lesser known tropical legumes (*Azelia africana*, *Detarium microcarpum* and *Mucuna flagellipes*). *Plant Foods for Human Nutrition*, **48**, 55-63.
- Oteng-Amoako A.A., 2006. 100 tropical African timber trees from Ghana: tree description and wood identification with notes on distribution, ecology, silviculture, ethnobotany and wood uses, 304 p.
- Otto, S.P., Whitton, J., 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, **34**, 401–437.
- Ouédraogo A., Thiombiano A., Hahn-Hadjali K. & Guinko S., 2006. Diagnostic de l'état de dégradation des peuplements de quatre espèces ligneuses en zone soudanienne du Burkina-Faso. *Science et Changements Planétaires/Secheresse*, **17**, 485–491.
- Ouédraogo-Koné S., Kaboré-Zougrana C.Y. & Ledin I. 2008 Important characteristics of some browse species in an agrosilvopastoral system in West Africa. *Agroforestry Syst.*, **74**, 213-221
- Ouédraogo-Koné S., Kaboré-Zougrana C.Y. & Ledin I., 2008. Important characteristics of some browse species in an agrosilvopastoral system in West Africa. *Agroforest Syst.*, **74**, 213–221.
- Pacak A. & Szweykowska-Kulińska Z. 2002. Organellar Inheritance in Liverworts: An Example of *Pellia borealis*. *J. Mol. Evol.*, **56**, 11-17.
- Page R. & Holmes E.C. 2005. Molecular Evolution. A phylogenetic approach. Blackwell Science Ltd.
- Palmé A.E. & Vendramin G.G. 2002. Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Mol. Ecol.*, **11**, 1769-1779.
- Pakkad G., Ueno S. and Yoshimaru H., 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in an endangered tree species, *Azelia xylocarpa* (Kurz) Craib (Caesalpinioideae). *Molecular Ecology Resources*, **9** (3), 880-882.
- Pan A.D., Jacobs B.F. & Herendeen P.S., 2010. Detarieae *sensu lato* (Fabaceae) from the Late Oligocene (27.23 Ma) Guang River flora of north-western Ethiopia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **163**, 44–54.
- Paradis S., Guibal D., Vernay M., Beauchêne J., Brancheriau L., Chalon I., Daigremont C., Détienne P., Fouquet D., Langbour P., Lotte S., Mejean C., Thévenon M.F., Thibaut A., Gérard J., 2011. Tropix 7 - Caractéristiques technologiques de 245 essences tropicales et tempérées (Technological Characteristics of 215 Tropical Timbers). CIRAD, version française et anglaise, ISBN 978-2-87614-680-8, n° de référencement APP : IDDN.FR.001.070032.002.S.P.2002.000.30615 (nouvelle version de Tropix 6.0, 2008).
- Parmentier I., Malhi Y., Senterre B., Whittaker R.J., Alonso A., Balinga M.P.B., Bakayoko A., Bongers F., Chatelain C., Comiskey J.A., Cortay R., Kamdem M.N.D., Doucet J.L., Gautier L., Hawthorne W.D., Issembe Y.A., Kouame F.N., Kouka L.A., Leal M.E., Lejoly J., Lewis S.L., Nusbaumer L., Parren M.P.E., Peh K.S.H., Phillips O.L., Sheil D., Sonke B., Sosef M.S.M., Sunderland T.C.H., Stropp J., Ter

- Steege H., Swaine M.D., Tchouto M.G.P., van Gernerden B.S., van Valkenburg J., & Woll H. 2007. The odd man out? Might climate explain the lower tree alpha-diversity of African rain forests relative to Amazonian rain forests? *Journal of Ecology*, **95**, 1058-1071.
- Peakall R. & Smouse P.E. 2006 GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288 – 295.
- Pennell F.W., 1925. The genus *Afzelia*: a taxonomic study in evolution. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **77**, 335-373.
- Pennington, R.T., Lavin, M., 2016. The contrasting nature of woody plant species in different neotropical forest biomes reflects differences in ecological stability, *New Phytologist*, **210**, 25–37.
- Persoon C. H., 1805. seu *Enchiridium botanicum*, complectens enumerationem systematicam specierum hucusque cognitarum. *Synopsis Plantarum*, 1: **7.732**, Parisiis Lutetiorum.
- Petit R.J., El Mousadik A. and Pons O. 1998 Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv. Biol.*, 12:844–855.
- Petit, C., Bretagnolle, F., Felber, F., 1999. Evolutionary consequences of diploid–polyploid hybrid zones in wild species. *Trends Ecology and Evolution*, **14** (8), 306-311.
- Petit, R.J., Aguinalgalde, I., de Beaulieu, J-L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Pedro Martin, J., Rendell, S. & Vendramin, G.G. 2003 Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity, *Science*, **300**, 1563-1565
- Pettigrew, J.D., Bell, K.L., Bhagwandin, A., Grinan, E., Jillani, N., Meyer, J., Wabuyelle, E., Vickers, C.E., 2012. Morphology, ploidy and molecular phylogenetics reveal a new diploid species from Africa in the baobab genus *Adansonia* (Malvaceae: Bombacoideae). *Taxon*, **61** (6): 1240–1250.
- 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. *Journal of Heredity*, **90**, 502 – 503
- Pfeil B.E., Schlueter J., Shoemaker R.C. Doyle, J.J. 2005. Placing paleopolyploidy in relation to taxon divergence: a phylogenetic analysis in legumes using 39 gene families. *Syst. Biol.*, **54**, 441–454.
- Philippe F. 2007. Phylogénie et dynamique des gènes dupliqués chez les plantes polyploïdes : Evolution dans les genres *Bromus* L. et *Spartina* Schreb. (Poaceae). Thèse de doctorat. Université de Rennes 1, France, 207 p. + annexe
- Pikaard, C.S. 2001. Genomic change and gene silencing in polyploids. *Trends Genet*, **17**(12), 675-677.
- Plana V. 2004. Mechanisms and tempo of evolution in the African Guineo-Congolian rainforest. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **359**, 1585-1594.
- Poulsen, A.D., Nordal, I., 2005. A phenetic analysis and revision of Guineo-Congolese rain forest taxa of *Chlorophytum* (Anthericaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **148**, 1–20.
- Quézel P. 1965 La végétation au Sahara. Du Tchad à la Mauritanie. *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart, 333 p
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <http://www.R-project.org/>
- Ramankutty N., Foley J.A. 1999. Estimating historical changes in global land cover: croplands from 1700 to 1992. *Global Biogeo- chemical Cycles*, **13**, 997–1027.
- Ramsey, J., Schemske, D.W., 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 589–639.
- Ramsey, J., 2011. Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **108**, 6697–6698.
- Ranker T.A., Haufler C.H., Soltis P.S., Soltis D.E. 1989. Genetic Evidence for Allopolyploidy in the Neotropical Fern *Hemionitis pinnatifida* (Adiantaceae) and the Reconstruction of an Ancestral Genome. *Systematic Botany*, **14**, 439-447.
- Rice W.R. 1984 Disruptive selection on habitat preference and the evolution of reproductive isolation: a simulation study. *Evolution*, **38**, 1251–1260.
- Rice W.R. & Hostert E.E. 1993. Laboratory Experiments on Speciation: What Have We Learned in 40 Years? *Evolution*, **47** (6), 1637-1653.

- Richards, P.W. 1973. Africa, the 'odd man out'. In *Tropical forest ecosystems in Africa and South America: a comparative review* (eds B.J. Meggers, E.S. Ayensu & W.D. Duckworth), pp. 21-26. Smithsonian Institution Press, Washington DC.
- Richards A.J. 1986 Plant breeding systems. Allen and Unwin, London, UK.
- Rieseberg L. & Soltis D.E. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants*, **5**, 65-83.
- Rieseberg L.H. & Willis J.H., 2007. Plant Speciation. *Science*, **317**, 910-914.
- Riley R., Chapman V., and Kimber G. 1959. Genetic control of chromosome pairing in intergeneric hybrids with wheat. *Nature*, **183** (4670), 1244-1246.
- 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.
- Rogers, J. 1973. Polyploidy in Fungi. *Evolution*, **27**, 153-160.
- Rohland, N., Reich, D., 2012. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Res.*, **22**, 939-946.
- Ronfort J., Jenczewski E., Bataillon T. and Rousset F. 1998 Analysis of population structure in autotetraploid species. *Genetics*, **150**, 921-930.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572-1574.
- Rosenberg N.A., 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 137-138.
- Royston, J.P., 1982. An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. *Journal Of The Royal Statistical Society Series C-Applied Statistics*, **31**, 115-124.
- Ruiz Perez M., Ezzine de Blas D., Nasi R., Sayer J. A., Sassen M., Angoué C., Gami N., Ndoye O., Ngonu G., Nguingui, J-C., Nzala D., Toirambe B. & Yalibanda Y. 2005. Logging in the Congo basin : a multi-country characterisation of timber companies. *Forest Ecology and Management* **214**, 221-236.
- Sallenave P., 1964. Propriétés physiques et mécaniques des bois tropicaux. Premier supplément. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne, France, 79 p.
- Sallenave P., 1971. Propriétés physiques et mécaniques des bois tropicaux. Deuxième supplément. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne, France, 128 p.
- Salzmann U., Hoelzmann P. and Morczinek I. 2002 Late Quaternary climate and vegetation of the Sudanian zone of Northeast Nigeria. *Quaternary Research*, **58**, 73-83
- 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.
- Sampoux, J.P., Huyghe, C., 2009. Contribution of ploidy-level variation and adaptive trait diversity to the environmental distribution of taxa in the 'fine-leaved fescue' lineage (genus *Festuca* subg. *Festuca*). *Journal of Biogeography*, **36**, 1978-1993.
- Sampson J.F. and Byrne M. 2012 Genetic diversity and multiple origins of polyploid *Atriplex nummularia* Lindl. (Chenopodiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **105**, 218-230.
- Sarnthein M. & Fenner J. 1988. Global wind-induced change of deep-sea sediment budgets, new ocean production and CO₂ reservoirs ca. 3.3-2.35Ma BP. *Phil Trans R Soc Lond* 318 : 487-504
- Satabié B., 1994. Biosystème et Vicariance dans la flore Camerounaise. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.*, **63**, 125-170.
- Saunders D.A., Hobbs R.J. and Margules C.R. 1991 Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology*, **5**, 18-32.
- Savolainen, V., Anstett, M.-C., Lexer, C., Hutton, I., Clarkson, J.J., Norup, M.V., Powell, M.P., Springate, D., Salamin, N. & Baker, W.J. 2006 Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* **441**, 210-213.
- Scarcelli, N., Mariac, C., Couvreur, T.L.P., Faye, A., Richard, D., Sabot, F., Berthouly-Salazar, C., Vigouroux, Y., 2015. Intra-individual polymorphism in chloroplasts from NGS data: where does it come from and how to handle it? *Mol. Ecol. Resour.* doi:10.1111/1755-0998.12462.

- Schemske D.W. 2000. Understanding the origin of species. *Evolution*, **54**, 1069–1073.
- Schmidt-Lebuhn, A.N., Fuchs, J., Hertel, D., Hirsch, H., Toivonen, J., Kessler, M., 2010. An Andean radiation: Polyploidy in the tree genus *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae). *Plant Biology*, **12**, 917–926.
- Scholes, R.J. & Hall, D.O. 1996. The carbon budget of tropical savannas, woodlands, and grasslands. In Breymer, A., Hall, D., Melillo, J. & Agren, G., *Modelling Terrestrial Ecosystems* (p. 69-1000). Chichester, Wiley.
- Scholes, R.J. & Archer, S.R. 1997. Tree-grass interactions in savannas. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**, 517-544.
- Schuelke M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* **18**: 233–234
- Schwartz, G., 1978 Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.*, **6**, 461-464.
- Schwartz D. & Lanfranchi R. 1993. Les cadres paléoenvironnementaux de l'évolution humaine en Afrique centrale atlantique. *L'Anthropologie*, **97** (1), 17-49.
- Scotti-Saintagne C., Mariette S., Porth I., Goicoechea P.G., Barreneche T., Bodénès C., Burg K. and Kremer A. 2004. Genome Scanning for Interspecific Differentiation Between Two Closely Related Oak Species [*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.]. *Genetics*, **168** (3), 1615-1626.
- Sexton G.J., Frere C.H., Kalinganire A., Uwamariya A., Lowe A.J., Godwin I.D., Prentis P.J. and Dieters M. J. 2015. Influence of putative forest refugia and biogeographic barriers on the level and distribution of genetic variation in an African savannah tree, *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. *Tree Genetics & Genomes*, 11:103
- Siegel, S., Castellan, N.J., 1988. Non parametric statistics for the behavioural sciences. New York, MacGraw Hill Humanities.
- Silk, J.W.F., Arroyo-Rodríguez, V., Aiba, S.-I., Alvarez-Loayza, P., Alves, L.F., et al., 2015. An estimate of the number of tropical tree species. *PNAS*, **112** (24), 7472–7477.
- Sinsin B., Eyog Matig O., Assogbadjo, A.E., Gaoué O.G. & Sinadouwirou T., 2004. Dendrometric characteristics as indicators of pressure of *Azelia africana* Sm. trees dynamics in different climatic zones of Benin. *Biodiversity and Conservation*, **13** (8), 1555–1570.
- Slotte T., Huang H., Lascoux M., Cepelitis A. 2008. Polyploid speciation did not confer instant reproductive isolation in *Capsella* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1472-1481.
- Smith J.E., 1798. in *Trans. Linn. Soc. London*, **4**, 221. [*Legum.*] Typus: *A. africana* Sm. ex Pers., *Syn. Pl.*, **1**, 455.
- Sneath, P.H.A, Sokal, R.R., 1973. Numerical taxonomy – the principles and practice of numerical classifications. San Francisco, W.H. Freeman.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. 3rd Ed. New York, W.H. Freeman and Co.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1993. Molecular data facilitate a reevaluation of traditional tenets of polyploid evolution. *Crit. Rev. Pl. Sci.*, **12**: 243–273.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1999. Polyploidy: origins of species and genome evolution. *Trends Ecol. Evol.*, **14**, 349–351.
- Soltis, P.S. & Soltis, D.E. 2000. The role of genetic and genomic changes in the success of polyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 7051–7057.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Tate, J.A., 2004. Advances in the study of polyploidy since Plant Speciation. *New Phytol*, **161**, 173–191.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Schemske D.W., Hancock J.F., Thompson J.N., Husband B.C. and Judd W.S. 2007. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon*, **56** (1), 13-30.
- Soltis, D.E., Visger, C.J., Soltis, P.S., 2014. The polyploidy revolution then...and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany*, **101**, 1057–1078.
- Sorenson M.D., Sefc K.M. and Payne R.B. 2003 Speciation by host switch in brood parasitic indigobirds. *Nature*, **424**, 928–931.

- Sosef M.S.M., Dauby G., Blach-Overgaard A., van der Burgt X., Catarino L., Damen T., Deblauwe V., et al. 2017. Exploring the floristic diversity of tropical Africa. *BMC Biology*, **15**:15, DOI: 10.1186/s12915-017-0356-8
- Spielmann A., Harris S.A., Boshier D.H. and Vinson C.C. 2015 ORCHARD: paternity program for autotetraploid species. *Molecular Ecology Resources*, **15**, 915–920.
- Stebbins, G.L. 1950. Variation and Evolution in Plants. Columbia University Press, New York.
- Stebbins G.L. 1958. On the Hybrid Origin of the Angiosperms. *Evolution*, **12**, 267-270.
- Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 978–989.
- Stephenson A.G. 1982 When does outcrossing occur in a mass-flowering plant? *Evolution*, **36**, 762–767.
- Sulaiman S.F., Culham A. & Harborne J.B., 2003. Molecular Phylogeny of Fabaceae based on rbcL sequence data: With special emphasis on the tribe Mimoseae (Mimosoideae). *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.*, **11** (1), 9-35
- Suttie, J.M., Reynolds, S.G. & Batello, C. (eds.). 2005. Grasslands of the world. Rome, FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G. & Cosson J.F. 1998 Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2731–2739.
- Thanh N.D., Thuy T.B. & Nghia N.H., 2012. Genetic diversity of *Afzelia xylocarpa* (Kurz) Craib in Vietnam based on analyses of chloroplast markers and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *African Journal of Biotechnology*, **11** (80), 14529-14535.
- Theodoridis, S., Randin, C., Broennimann, O., Patsiou, T., Conti E., 2013. Divergent and narrower climatic niches characterize polyploid species of European primroses in *Primula* sect. *Aleuritia*. *Journal of Biogeography*, **40**, 1278–1289.
- Thomas Y., Bethenod M.-T., Pelozuelo L., Frérot B. and Bourgueta D. 2003 Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. I. Sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. *Evolution*, **57**, 261– 273.
- Thrall P.H. & Young A., 2000. autotet: a program for analysis of autotetraploid genotypic data. *Journal of Heredity*, **91**, 348–349
- Trapnell D.W., Hamrick J.L., Parker K.C., Braungart K.W. and Glenn T.C. 2011 Evaluating the Utility of Microsatellites for Investigations of Autopolyploid Taxa. *Journal of Heredity*, **102** (4), 473-478.
- Truong C., Palmé A.E. & Naciri-Graven Y., 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *tortuosa*. *Molecular Ecology Resources*, **5** (1), 96-98
- Tsy J.L., Lumaret R., Mayne D., Mohamed V.A., Abutaba Y.I.M., Sagna M., Raoseta S., Danthu P. 2009. Chloroplast DNA phylogeography suggest a West African centre of origin for the baobab, *Adansonia digitata* L (Bombacoideae, Malvaceae). *Mol. Ecol.*, **18**, 1707–1715
- Tukey, J., 1977. Exploratory Data Analysis. Reading (Mass.), Addison-Wesley Publishing Co.
- Uribe-Convers, S., Duke, J.R., Moore, M.J., Tank, D.C., 2014. A Long PCR–Based Approach for DNA Enrichment Prior to Next-Generation Sequencing for Systematic Studies. *Applications in Plant Sciences* **2**, 1300063.
- Van Gemerden B.S., Olf H., Parren M.P.E. et al. 2003. The pristine rain forest? Remnants of historical human impacts on current tree species composition and diversity. *Journal of Biogeography*, **30**, 1381–1390.
- Van Puyvelde K., Van Geert A. and Triest L. 2010 ATETRA, a new software program to analyze tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT. *Mol. Ecol. Resour.* **10**, 331–334.
- Van Wyk B. & Van Wyk P. 1997 Field Guide to Trees of Southern Africa. Struik Publishers, Cape Town, South Africa.

- 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., Elenga H., Reynaud-Farrera I., Alexandre A., Bertaux J., Mariotti A., Martin L., Meunier J.D., Nguetsop F., Servant-Vildary M. & Wirmann D., 1999. Forest response to climate changes in Atlantic Equatorial Africa during the last 4000 years BP and inheritance on the modern landscapes. *Journal of Biogeography*, **26**, 879-885.
- Vincens A., Bremond L., Brewer S., Buchet G. and Dussouillez P. 2006 Modern pollen-based biome reconstructions in East Africa expanded to southern Tanzania. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **140**, 187-212
- Vivien, J. & Faure, J.J., 2011. Fruitiers sauvages d'Afrique: espèces du Cameroun. Nguila-Kerou, Clohars Carnoet.
- Waller M. & Salzmann U. 1999 Holocene vegetation changes in the Sahelian zone of NE Nigeria: The detection of anthropogenic activity. *Palaeoecol. Africa*, **26**, 85-102
- Wang N., Borrell J.S., Boldes W.J.A., Kuttapitiya A., Nichols R.A. and Buggs R.J.A. 2014. Molecular footprints of the Holocene retreat of dwarf birch in Britain. *Molecular Ecology*, **23**, 2771-2782.
- Wardill T.J., Graham G.C., Zalucki M., Palmer W.A., Playford J. and Scott K.D. 2005. The importance of species identity in the biocontrol process: identifying the subspecies of *Acacia nilotica* (Leguminosae: Mimosoideae) by genetic distance and the implications for biological control. *Journal of Biogeography*, **32** (12), 2145-2159
- Watrin J., Lézine A-M. & Hély C. 2009. Plant migration and plant communities at the time of the "green Sahara". *Comptes Rendus Geoscience*, **341** (8-9), 656 - 670.
- Welwitsch F. M., 1859. In *Apontamentos Phytogeographicos*, 586.
- Wendel J.F., 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Evolution*, **42** (1), 225-249.
- Westemeier R.W., Brawn J.D., Simpson S.A. et al. 1998 Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science*, **282**, 1695-1698.
- White F. 1983. The vegetation of Africa, a descriptive memoir to accompany the UNESCO / AETFAT / UNSO vegetation map of Africa. *Natural Resources. Research*. **20**: 1-356.
- White, F. 1979. The Guineo-Congolian Region and its relationships to other phytochoria. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique*, **49**, 11-55.
- White F., 1986. La végétation de l'Afrique. Mémoire accompagnant la carte de végétation de l'Afrique. Unesco/AETFAT/UNSO. ORSTOM & Unesco, Paris, Recherche sur les ressources naturelles, XX : 384 p.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 2038-2042.
- Wilks C. & Issembé Y., 2000. Les arbres de la Guinée Equatoriale, région continentale, Guide pratique d'identification. Ed. Prépresse Comm., France, 546 p.
- Winkler, H. 1916. Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Zeitschr. f. Bot.* Bd. 8.
- Won H. & Renner S.S. 2005. The internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in the gymnosperm *Gnetum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**, 581-597.
- Wricke G. & Weber W., 1986. *Quantitative Genetics and Selection in Plant Breeding*. de Gruyter, Berlin.
- Wyatt R. 1982 Inflorescence architecture: how flower number, arrangement, and phenology affect pollination and fruit-set. *American Journal of Botany*, **69** (4), 585-594
- Wyatt R., Odrzykoski I.J., Stoneburner A., Bass H.W., Galau G.A. 1988. Allopolyploidy in Bryophytes: Multiple Origins of *Plagiomnium medium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5601-5604.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K., 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, **292**, 686-693.
- Zachos, J. C., G. R. Dickens, and R. E. Zeebe 2008. An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics, *Nature*, **451**, 279 - 283.

Zwart A.B., Elliott C., Hopley T., Lovell D. and Young A. 2016 POLYPATEX: an R package for paternity exclusion in autopolyploids. *Molecular Ecology Resources*, **16**, 694–700

ANNEXES

Annexes

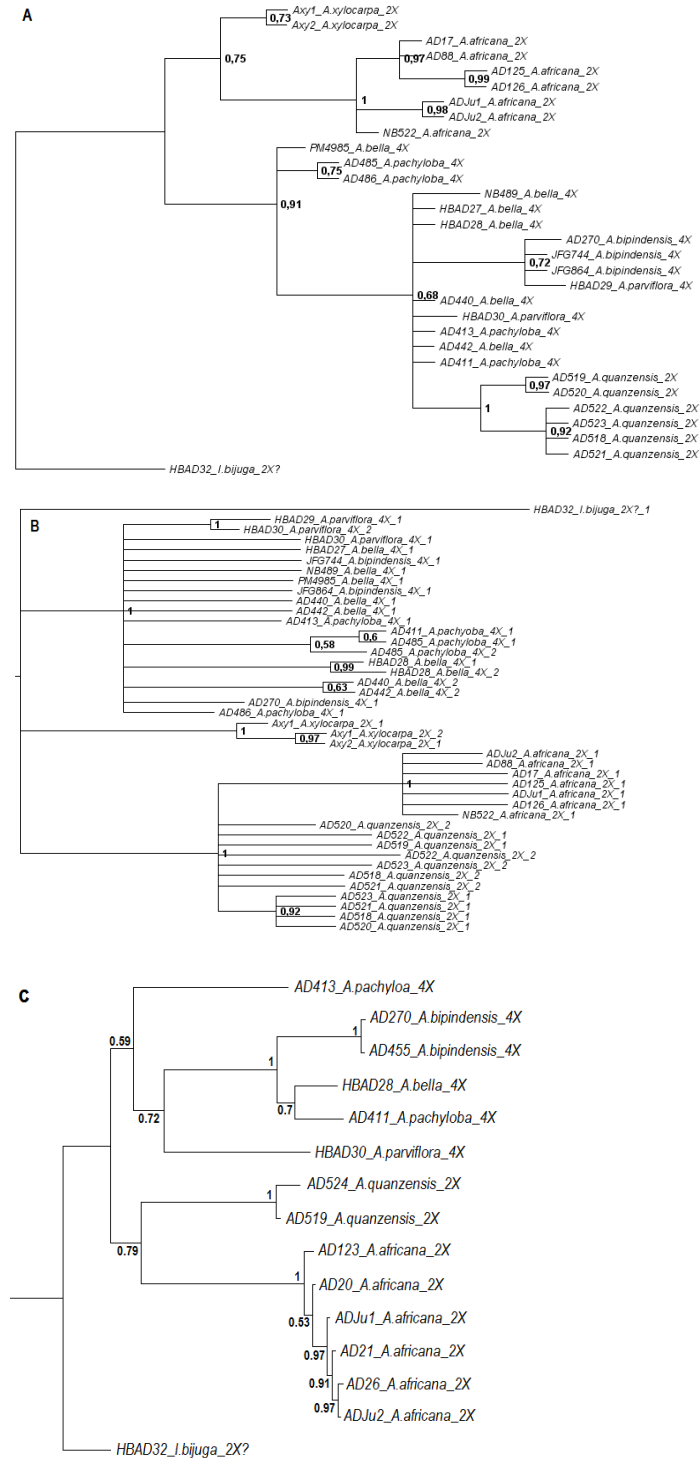
Appendix S1 : Voucher information for the samples used in this study.

	Species	n	Voucher N°	Collection locality	Geographic coordinates
Individual used for DNA bank enriched in microsatellites	<i>Afzelia bipindensis</i>	1	OH2474	Bambidie, Eastern Gabon	0.755449°S, 12.969804°E
	<i>Afzelia bipindensis</i>	42	AD336-AD338; AD340-AD346; AD254-AD269; AD349; AD350; AD352-AD357; AD367; AD368; AD372; AD374-AD377; AD455; AD660	Mindourou, Eastern Cameroon	3.2924°N, 14.343339°E
Cross amplification	<i>Afzelia africana</i>	32	AD61-AD99	Bassila, Central Benin	1.55586°N, 9.26674°E
	<i>Afzelia bella</i>	5	AD437; AD438; AD440-AD442	Manmfé, Northwestern Cameroon	5.75515°N, 9.540129°E
	<i>Afzelia pachyloba</i>	5	AD411; AD413; AD417; AD419; AD420	Campo-Ma'an, Southwestern Cameroon	2.249193°N, 10.469494°E
	<i>Afzelia quanzensis</i>	19	AD513-AD531	Gede & Kwale, Eastern Kenya	3.30317°S, 39.98346°E
	<i>Afzelia bipindensis</i>	3	AD443	Campo-Ma'an, Southwestern Cameroon	5.745634°N, 9.538056°E
Flow cytometry (code for the mother tree)	<i>Afzelia africana</i>	3	AD195	Djona, Northeastern Benin	2.992373°N, 11.50940°E
	<i>Afzelia bella</i>	2	AD426	Manmfe, Northwestern Cameroon	5.75515°N, 9.540129°E
	<i>Afzelia quanzensis</i>	1	JLD1658	Victoria Falls, Northern Zimbabwe	17.92217°S, 025.84743°E
	<i>Afzelia xylocarpa</i>	2	CL1	Khon Kaen, Northern Thailand	16.462389°N, 102.81989°E

Note: n = number of individuals

Vouchers are deposited at the BRLU (Herbarium of the Université Libre de Bruxelles, Belgium) – “silica gel” collection of Dr Olivier Hardy.

Appendix S2 : Consensus phylogram trees of *Afzelia*, based on pDNA (*ndHF84F-ndHF713R*, *psbA-trnH* and *trnL*-intron) (A), nDNA (*PEPC E7* sequences) (B) and *ITS2* sequences (C). Posterior probability values are indicated on each node, after Bayesian inference phylogenetic reconstruction. For *PEPC E7*, numbers 1 and 2 after the samples names refer to the alleles reconstructed from the PHASE analysis implemented in the DNASP program.



Appendix S3 : Herbarium material used for the SSR analyses of *Azelia* savannah species

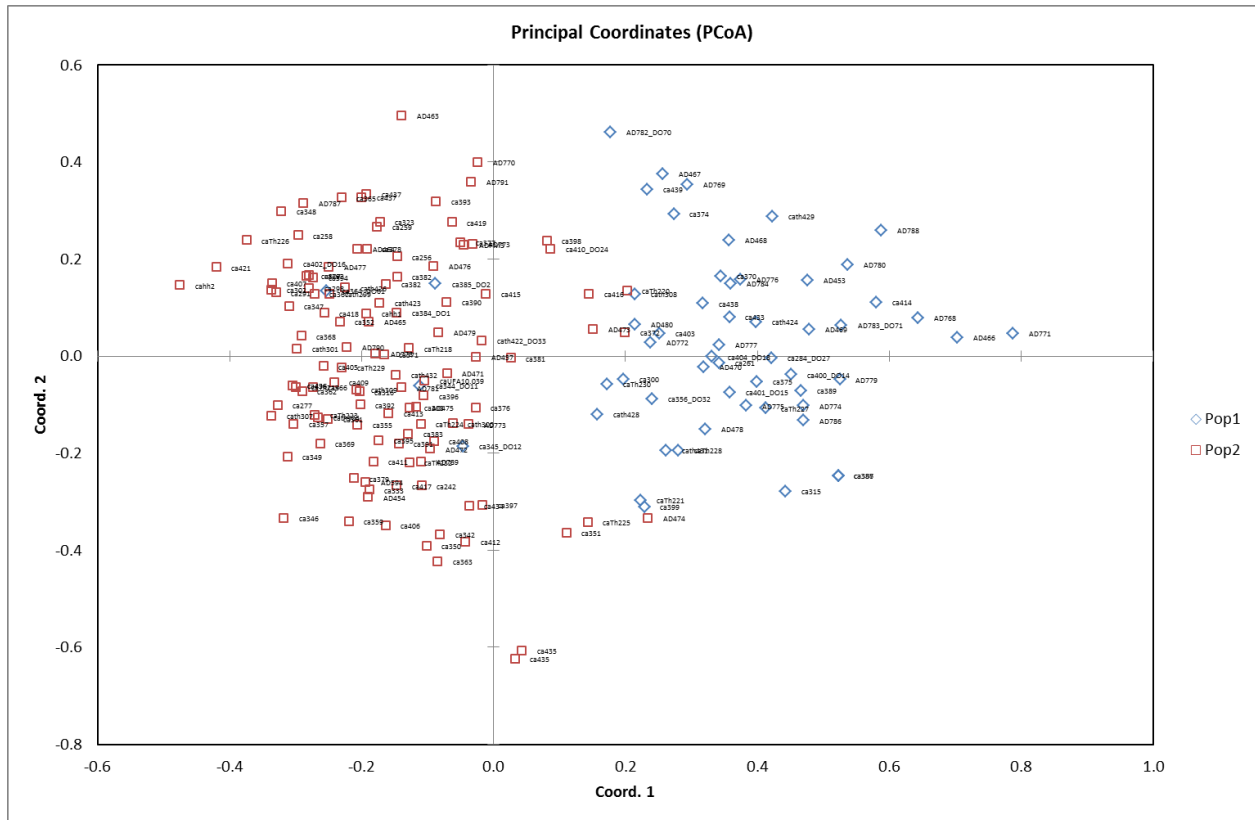
Species	Geographic origin	Herbarium	Collectors	Voucher
<i>A. quanzensis</i>	Mozambique	WAG	na	WAG1704773
	Mozambique	WAG	na	WAG1704771
	Mozambique	WAG	na	WAG1704769
	Mozambique	WAG	na	WAG1704765
	Mozambique	WAG	na	WAG1704764
	Mozambique	WAG	na	WAG1704757
	Tanzanie	WAG	na	WAG1704751
	Tanzanie	WAG	na	WAG1704749
	Tanzanie	WAG	na	WAG1704744
	Afrique du sud	WAG	na	WAG1704737
	RDC	WAG	Duvigneaud & Timperman	2496
	Angola	WAG	R. Dechamps & F. Kurta	1302
	Mozambique	WAG	de Koning Jan	8109
	Mozambique	WAG	Groenendi E.M.C.	266
	Mozambique	WAG	Van de Koning	9575
	Tanzanie	WAG	J.C. Lovett	4915
	Tanzanie	WAG	Mwangoka, M.A.	350
	<i>A. africana</i>	RCA	BRLU	Tisserant
RCA		BRLU	Tisserant	2407
Cameroun		BRLU	de Wilde W.J.J.O.	2793
Ouganda		BRLU	R.G. Sangstes	S. 223
Guinea-Bissau		BRLU	Verjans J.-M.	na
Guinea-Bissau		BRLU	Malaisse F.	na
Guinea-Bissau		BRLU	Kasper & Descheres	na
Cameroun		BR	C. Geerling & J. Nene	4708
Cameroon		BR	Geerling, C.	4708
Cameroon		BR	Wit, P.	2944
Cameroon		BR	Zon, A.P.M. van der	2579
Cameroon		BR	Wilde, W.J.J.O. de	2793
Ghana		BR	Jongkind, C.C.H.	2510
Ghana		BR	Schmidt, H.H.	1782
Ghana		BR	Morton, J.K.	1918
Ghana		BR	Cudjoe, F.S.	623
Ghana		BR	Jongkind, C.C.H.	1963
Ghana		BR	Schmidt, H.H.	3370
Ivory Coast		BR	Geerling, C.	2044
Ivory Coast		BR	Versteegh, C.	521
Ivory Coast		BR	Wilde, W.J.J.O. de	783
Togo		BR	Thijssen, M.T.	222
Ivory Coast	BR	Wilde, J.J.F.E. de	3474	
Ivory Coast	BR	Versteegh, C.	325	
Ivory Coast	BR	Oldeman, R.A.A.	332	

Ivory Coast	BR	Jongkind, C.C.H.	4410
Nigeria	BR	Chapman, J.D.	2752
Nigeria	BR	Geerling, C.	3122
Nigeria	BR	Leeuw, P.N. de	70
Burkina Faso	BR	Küppers, K.	1036
Sierra Leone	BR	Pollard, B.J.	1405
Siera Leone	BR	Cole, E.A.	121
Guinea-Bissau	BR	Espirito Santo, J.V.G. do	1508
Guinea-Bissau	BR	Espirito Santo, J.V.G. do	3469
Senegal	BR	Adam, J.-G.	8685
Ghana	BR	Jongkind, C.C.H.	2440

Appendix S4 : Summary of locus per locus of demographic analysis implemented with BOTTLENECK

Locus	R9-48 Q4	R9-01 Q1	R9-07 Q4	R9-19 Q2	R9-65 Q1	R9-61 Q2	R9-48 Q4	R9-01 Q1	R9-07 Q4	R9-19 Q2	R9-65 Q1	R9-61 Q2	R9-60 Q1
Empirical data													
Sample size	241	241	241	241	241	241	113	113	113	113	113	113	113
Heterozygosity observed (oH)	0.325	0.846	0.187	0.076	0.635	0.496	0.042	0.800	0.009	0.252	0.738	0.542	0.012
No. of alleles observed	7	26	9	7	15	6	5	23	3	4	11	10	2
IAM													
Average heterozygosity (eH)	0.573	0.883	0.642	0.568	0.777	0.514	0.504	0.898	0.324	0.417	0.749	0.723	0.180
Standard deviation (SD)	0.153	0.036	0.134	0.155	0.083	0.168	0.156	0.031	0.184	0.180	0.092	0.102	0.169
Standard deviate ($(oH-eH)/SD$)	-1.618	-1.023	-3.405	-3.165	-1.723	-0.109	-2.960	-3.150	-1.714	-0.915	-0.121	-1.779	-0.994
Probability ($H > eH$)	0.0930	0.1390	0.0050	0.0000	0.0590	0.3820	0.0000	0.0120	0.0000	0.2290	0.3570	0.0610	0.0000
TPM													
Average heterozygosity (eH)	0.665	0.922	0.732	0.669	0.849	0.617	0.583	0.926	0.385	0.496	0.811	0.792	0.204
Standard deviation (SD)	0.111	0.016	0.084	0.100	0.040	0.121	0.127	0.019	0.168	0.153	0.054	0.059	0.170
Standard deviate ($(oH-eH)/SD$)	-3.048	-4.643	-6.527	-5.936	-5.342	-1.004	-4.254	-6.777	-2.236	-1.588	-1.354	-4.229	-1.130
Probability ($H > eH$)	0.0110	0.0010	0.0000	0.0000	0.0020	0.1470	0.0000	0.0030	0.0000	0.1000	0.0860	0.0030	0.0000
SMM													
Average heterozygosity (eH)	0.753	0.939	0.811	0.750	0.892	0.709	0.669	0.939	0.452	0.586	0.858	0.843	0.227
Standard deviation (SD)	0.062	0.025	0.040	0.064	0.021	0.073	0.086	0.016	0.139	0.104	0.027	0.032	0.170
Standard deviate ($(oH-eH)/SD$)	-6.916	-3.661	-15.457	-10.513	-12.228	-2.924	-7.248	-8.761	-3.193	-3.205	-4.446	-9.302	-1.265
Probability ($H > eH$)	0.0000	0.0050	0.0000	0.0000	0.0000	0.0180	0.0000	0.0030	0.0000	0.0120	0.0020	0.0000	0.0000

Appendix S5: Principal coordinates (PCoA) analysis of microsatellite genotypes in *A. bipindensis* populations sampled at fine scale in eastern Cameroon, with the presence/absence data of alleles, according to *Nei's* genetic distance using GenAlEx, cluster K1=blue square; cluster K2=red square.



Appendix S6: Isolation-by-distance pattern in two genetic clusters of the tetraploid *A. bipindensis*. Genetic distance is weakly but significantly correlated with geographic distance with cluster K1 (A) and cluster K2 (B).

