

DAMIEN D. HINSINGER

Diversité et évolution du genre *Fraxinus*

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Sciences forestières
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DU BOIS ET DE LA FORÊT
FACULTÉ DE FORESTERIE ET GÉOMATIQUE
QUÉBEC

2010

THÈSE DE DOCTORAT DE L'ENGREF
(École Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts)

Spécialité Sciences forestières

ET DE L'UNIVERSITE LAVAL

Spécialité Sciences forestières

Présentée par

M. Damien D. HINSINGER

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'ENGREF et Ph. D. de l'UNIVERSITÉ LAVAL

Sujet de la thèse :

Diversité et évolution du genre *Fraxinus*

Soutenue le 29 juin 2010

Devant le jury composé de :

M. Maurice Lalonde (Professeur Université Laval, Québec)

Rapporteur

M. François Lefèvre (Chercheur, INRA, Avignon)

Rapporteur

M. Guillaume Lecointre (Professeur MNHN, Paris)

Examineur

Mme Nathalie Frascaria-Lacoste (Professeur AgroParisTech, Paris)

Directrice de thèse

M. Jean Bousquet (Professeur Université Laval, Québec)

Directeur de thèse

C'est en effet pour le bois que la nature a produit les autres arbres, et le **frêne** surtout en fournit en abondance. C'est un arbre élevé et rond; la feuille en est pinnée : il a été rendu très célèbre par les éloges d'Homère et par la lance d'Achille (Il. XX, 277). Le bois en est employé dans plusieurs ouvrages. Le **frêne** qui croît sur le mont Ida en Troade ressemble tellement au cèdre, que, l'écorce étant enlevée, il trompe les acheteurs. Les Grecs en ont distingué deux espèces : l'une longue et sans nœud, l'autre courte, plus dure, plus foncée, à feuilles de laurier. Les Macédoniens donnent le nom de bumella à un **frêne** très grand, et dont le bois est très flexible. D'autres ont divisé les espèces d'après la considération de l'habitat, le **frêne** de plaine ayant le bois madré, celui de montagne l'ayant serré. Les auteurs grecs disent que les feuilles de cet arbre sont mortelles aux bêtes de somme, et inoffensives pour les ruminants.

Pline l'ancien, *Histoire naturelle*, Livre XVI, XXIV.

Résumé

Le genre *Fraxinus* comprend environ 45 espèces d'arbres et d'arbustes de zones tempérées, colonisant des habitats variés de l'hémisphère Nord. Une diversité intraspécifique et interspécifique élevée justifiait le besoin de l'estimation d'une phylogénie moléculaire permettant de mieux reconstituer et interpréter l'histoire biogéographique de ce genre d'angiospermes circumpolaires, et ce à l'échelle générique, mais aussi à l'échelle spécifique en Europe.

L'étude de la diversité génétique des séquences du génome chloroplastique n'a pas permis de distinguer les différentes espèces du genre, particulièrement lorsque ces espèces étaient phylogénétiquement proches, en raison de taux de divergence particulièrement bas. Toutefois, certaines sections taxonomiques du genre ont pu être identifiées convenablement grâce à ces séquences d'ADN chloroplastique. Ces résultats montrent que l'utilisation de régions du génome chloroplastique comme code-barre moléculaire, en dépit de bons résultats dans plusieurs genres non ligneux, ne pourrait être une solution universelle pour l'estimation de la biodiversité et la reconnaissance taxonomique chez les arbres.

Les efforts subséquents se sont donc portés sur l'identification et l'utilisation de régions du génome nucléaire pour l'estimation de la phylogénie du genre. Les sections précédemment décrites dans la littérature ont été retrouvées, et les espèces n'ayant pu être attribuées à un groupe taxonomique (*incertae sedis*) ont été assignées de manière robuste à la section *Melioides*. Certaines espèces de la section *Melioides* semblaient avoir échangé des gènes récemment ou avoir radié, formant une polytomie dans l'ensemble des jeux de données. À partir de cette phylogénie ont été inférés trois évènements de dispersions intercontinentales, deux de l'Amérique du Nord vers l'Asie, et un de l'Asie vers l'Amérique du Nord.

L'évolution de la section *Fraxinus*, qui se retrouve principalement en Eurasie, a ensuite été étudiée et datée, afin de déterminer si des facteurs géologiques ou climatiques passés pouvaient être responsables de la structure de la diversité génétique actuellement observée. Une incongruence topologique majeure a été détectée entre les phylogénies découlant de différentes régions du génome nucléaire, mettant en évidence une évolution réticulée ancienne entre *F. angustifolia* et *F. mandshurica*. La mise en place de l'Himalaya et les changements climatiques de la fin du Tertiaire pourraient expliquer les évènements de spéciation dans la section, alors que le réchauffement climatique intervenu durant le Miocène pourrait avoir offert les conditions climatiques nécessaires au rapprochement des distributions naturelles et à l'évolution réticulée observée entre *F. angustifolia* et *F. mandshurica*.

L'ensemble de nos résultats confirme le rôle important joué par l'hybridation naturelle et l'évolution réticulée ancienne, apportant un éclairage nouveau sur l'influence majeure qu'ont eu les changements environnementaux sur la mise en place de la diversité génétique et taxonomique actuelle dans le genre *Fraxinus*.

Abstract

The genus *Fraxinus* contains about 45 species of temperate trees and shrubs colonizing various habitats in the Northern hemisphere. A great intraspecific and interspecific diversity indicated the need to estimate a molecular phylogeny in order to reconstruct and interpret the biogeographic history of this circumpolar angiosperm tree genus, both at the generic and the specific scale in Europe.

The study of cpDNA diversity did not allow to distinguish among the different species of the genus, particularly when these species were closely related, due to very low divergence rates at the nucleotide level. However, some taxonomical sections of the genus could be recognised. These results show that the use of cpDNA regions as a molecular barcode cannot be a universal answer for the estimation of forest tree biodiversity, despite the good discrimination and results obtained with herbaceous plants.

Thus, subsequent efforts at estimating the phylogeny of the genus were thus directed towards nuclear regions. The sections previously described were retrieved, and species that could not be attributed to a taxonomic group (*incertae sedis*) were assigned with confidence to the section *Melioides*. Some species of the section *Melioides* appeared to have exchanged genes recently or having radiated, forming a polytomy in all datasets. According to this phylogeny, three dispersal events were inferred, two from North America to Asia, the last from Asia to North America.

The evolution of the section *Fraxinus*, which is mainly found in Eurasia, was further investigated and the phylogeny dated, in order to determine associations between past geological and climatic changes and the extant genetic diversity. A major incongruence was detected between tree topologies derived from different regions of the nuclear genome, indicating ancient reticulate evolution between *F. angustifolia* and *F. mandshurica*. The Himalaya uplift and climatic changes observed during the end of Tertiary could explain the speciation events in the section, whereas the warmer climate during the Miocene could have provided favourable conditions for expanding natural ranges, favouring reticulate evolution between *F. angustifolia* and *F. mandshurica*.

All these results confirm the key role of natural hybridization and ancient reticulate evolution, highlighting the major influence of environmental changes on structuring the present taxonomical and genetic diversity of the genus *Fraxinus*.

Remerciements

Il est bien évident qu'en trois ans (voire même un peu plus) de doctorat, la liste des personnes m'ayant aidé d'une quelconque manière commence à devenir impressionnante. Je vais donc essayer ici de remercier toutes ces personnes.

Tout d'abord, je tiens à remercier particulièrement mes deux directeurs de thèse. Nathalie qui m'a encadré, même à distance durant mon séjour à Québec, qui a supporté ma mauvaise habitude d'être plus efficace dans l'urgence (ce manuscrit en est une preuve singulière), qui m'a toujours conseillé et à qui j'ai malheureusement fait quelques frayeurs en oubliant de prévenir que je travaillais chez moi certains jours. Merci de m'avoir fait confiance pendant presque quatre ans, je pense avoir eu une très bonne formation à la recherche avec toi.

Jean m'a accueilli dans son laboratoire à Québec, où j'ai pu goûter à la simplicité et à l'efficacité administrative nord-américaine. Ses discussions autour d'une pinte de blonde m'ont beaucoup apporté, et je le remercie vivement du temps qu'il m'a accordé malgré son emploi du temps très chargé, et de la période qui s'achève. Je relis parfois ton livre sur Québec, où je retrouve beaucoup de bons souvenirs de mon séjour.

Merci pour la liberté de recherche que vous m'avez donnée tous les deux, et si deux têtes valent mieux qu'une, je peux dire que deux directeurs de thèse sont inestimables.

Merci à Sauphie et à Paola sans qui mes trois ans de travaux n'auraient pas pu être productifs « pantoute ». Merci à elles pour les nombreuses commandes parfois un peu farfelues ou difficilement réalisables qu'elles ont réussi à obtenir. Merci à Sauphie pour m'avoir aidé à gérer ma scolarité à distance, et pour avoir été mes « yeux » auprès de Jean pour lui transmettre les impressions de draft et autres courriels, et pour les 5 à 7 au pub ou ailleurs. Merci à Paola pour les jours d'échantillonnage passés dans des endroits plutôt agréables (Barcelone) ou bien plus humides (Sir Hillier Arboretum à Southampton, Arboretum des Barres) et pour le travail matinal. Merci également pour toutes les astuces que tu m'as transmises au laboratoire. Merci à Mariangela Arca pour son implication dans l'étude barcode, et pour avoir fait l'essentiel du dépôt des séquences GenBank d'ADN chloroplastique.

Je tiens à remercier tous les membres de mon comité de thèse, ainsi que les membres examinateurs de mes examens doctoraux à l'Université Laval pour leurs remarques, leurs

conseils et leurs suggestions concernant le déroulement de mon doctorat et de mes manip'. Merci au jury qui jugera ce manuscrit et prendra le temps de le lire.

Merci également à Juan et à Christian, les deux bibles du frêne, pour leurs discussions toujours passionnantes. Merci à Juan pour les explications concernant GeneMapper, et les simulations écologiques, et le partage de ses connaissances (et de la bibliographie) sur l'hybridation. Merci à Christian pour son aide dans la préparation des (nombreuses) graines de frênes européens. Merci à Jérôme Laroche du centre de bioinformatique pour son aide dans l'utilisation des serveurs du 4^{ème}.

Merci à tous les collègues d'Orsay (Michael, Benjamin, Marie, Diane, Alexandre, Samah, Magalie, JT, et tous les autres) et de Québec (Julie, Julien, Sébastien, Benjamin, André, Alain, Karine, Stéphanie de Vancouver, et tous les autres) pour les nombreuses discussions plus ou moins scientifiques, mais toujours dans la bonne humeur. Merci à eux pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter durant mes manip' ou durant la rédaction. Merci à Jean-Tristan et Michaël pour les scripts qu'ils m'ont écrits et qui m'ont bien servi.

Un travail de recherche n'est rien sans les échantillons biologiques, merci donc aux arboreta, pépinières et jardins botaniques qui m'ont aimablement fourni des échantillons de la presque totalité du genre. Merci à Naoko pour ses échantillons provenant du Japon, et à Jean Dufour pour les échantillons de frênes à l'échelle de l'Europe.

Merci à mes anciens encadrants de Master 1 et Master 2 pour m'avoir fait découvrir la systématique et la phylogénie et m'avoir incité à m'engager dans la recherche dans ce domaine passionnant.

Merci à toute ma famille pour m'avoir supporté tout au long de ma scolarité, et pour avoir suivi (de loin) mes études et mes recherches. Merci à tous ceux qui m'ont hébergé durant mes stages et mes études.

Merci enfin à ma chère et tendre, qui a supporté durant quatre longues années mes tendances monomaniaques et mes obsessions d'échantillonnage. Je crois bien que rien de ce que je pourrais écrire ne suffirait à décrire mon admiration pour ta patience, ton soutien de tous les instants, tes encouragements, et pour avoir supporté l'éloignement lié à mes différents voyages de recherche (Santo et Québec). Chantal, je te promets que ceci sera mon seul et dernier doctorat !

Table des matières

RESUME	I
ABSTRACT	III
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIERES	VI
Liste des tableaux	IX
Liste des appendices	X
Liste des figures	XI
1 INTRODUCTION	1
1.1 L'ESPECE, UNITE DE BASE DE LA BIOLOGIE EVOLUTIVE.....	1
1.2 LE « LINEAGE SPECIES CONCEPT » (SENS DE QUEIROZ, 1998).....	4
1.3 HYBRIDATION ET ESPECE.....	5
1.4 LE GENRE <i>FRAXINUS</i>	9
1.4.1 Généralités.....	9
1.4.2 Systématique du genre <i>Fraxinus</i>	10
1.4.3 Utilisations du frêne.....	11
1.4.4 L'évolution dans le genre <i>Fraxinus</i>	14
1.5 CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE.....	22
1.6 OBJECTIFS DE LA THESE.....	24
1.7 REFERENCES.....	26
2 BARCODE MOLECULAIRE DANS LE GENRE <i>FRAXINUS</i>	35
2.1 INTRODUCTION.....	35
2.2 LIMITATIONS OF A STANDARDISED PROTOCOL FOR DNA BARCODING IN THE <i>FRAXINUS</i> GENUS.....	37
2.3 RESUME.....	38
2.3.1 Abstract.....	38
2.3.2 Introduction.....	40
2.3.3 Materials and Methods.....	41
2.3.3.1 Sampling.....	41
2.3.3.2 Molecular methods.....	42
2.3.3.3 Analysis.....	43
2.3.4 Results.....	43
2.3.4.1 Sequence diversity.....	43
2.3.4.2 Substitution rates.....	45
2.3.4.3 Neighbor-joining trees.....	45
2.3.4.4 BLAST method.....	50
2.3.5 Discussion.....	50
2.3.6 Acknowledgments.....	55
2.3.7 Literature cited.....	56
2.4 CONCLUSIONS.....	68
2.5 REFERENCES DE L'INTRODUCTION ET DES CONCLUSIONS.....	70
3 PHYLOGENIE MONDIALE DU GENRE <i>FRAXINUS</i>	71
3.1 INTRODUCTION.....	71
3.2 THE PHYLOGENY OF THE GENUS <i>FRAXINUS</i> BASED ON PLASTID, NUCLEAR RIBOSOMAL AND NUCLEAR LOW-COPY DNA.....	75
3.2.1 Résumé.....	76
3.2.2 Abstract.....	76
3.2.3 Introduction.....	77
3.2.4 Materials and Methods.....	79
3.2.4.1 Plant material.....	79

3.2.4.2	Sequence datasets	79
3.2.4.2.1	Chloroplast sequences	79
3.2.4.2.2	Nuclear ribosomal spacers (nETS and nITS)	79
3.2.4.2.3	<i>Phantastica</i>	80
3.2.4.3	Sequences analysis.....	81
3.2.5	<i>Results</i>	82
3.2.5.1	Analysis of separate datasets.....	82
3.2.5.1.1	CpDNA intergenic regions.....	82
3.2.5.1.2	nITS.....	85
3.2.5.1.3	nETS.....	86
3.2.5.1.4	<i>Phantastica</i>	88
3.2.5.2	Combined dataset.....	88
3.2.6	<i>Discussion</i>	90
3.2.6.1	The phylogeny of the genus <i>Fraxinus</i>	90
3.2.6.2	The evolution of floral morphology.....	90
3.2.6.3	New insights about the placement of <i>F. platypoda</i> and the incertae sedis species.....	91
3.2.6.4	The biogeography of the genus <i>Fraxinus</i>	92
3.2.6.5	Radiation of the section <i>Melioides</i> ?	94
3.2.7	<i>Conclusions</i>	95
3.2.8	<i>Acknowledgments</i>	95
3.2.9	<i>Literature cited</i>	96
3.3	CONCLUSIONS	107
3.4	REFERENCES DE L'INTRODUCTION ET DES CONCLUSIONS.....	109
4	PHYLOGEOGRAPHIE DES ESPECES DE LA SECTION <i>FRAXINUS</i>	112
4.1	INTRODUCTION.....	112
4.2	THE PHYLOGEOGRAPHY OF EURASIAN <i>FRAXINUS</i> SPECIES REVEALS ANCIENT TRANSCONTINENTAL RETICULATION.....	115
4.2.1	<i>Résumé</i>	116
4.2.2	<i>Abstract</i>	117
4.2.3	<i>Introduction</i>	118
4.2.4	<i>Materials and Methods</i>	122
4.2.4.1	Plant material	122
4.2.4.2	Molecular methods	122
4.2.4.2.1	Amplification and sequencing of the nETS and nITS.....	122
4.2.4.2.2	Sequence analysis	124
4.2.4.2.3	AFLP markers.....	125
4.2.4.2.4	AFLP analysis	126
4.2.4.3	Estimations of molecular divergence times.....	127
4.2.5	<i>Results</i>	128
4.2.5.1	Phylogenies from DNA sequences	128
4.2.5.2	AFLP.....	130
4.2.5.2.1	Neighbor-Net network.....	130
4.2.5.2.2	Structure.....	133
4.2.5.3	Incongruence between nuclear datasets.....	134
4.2.5.4	Estimations of molecular divergence times.....	134
4.2.6	<i>Discussion</i>	138
4.2.6.1	Methodological considerations.....	138
4.2.6.2	Molecular paleo-biogeography	140
4.2.6.2.1	Ancient reticulate evolution in Eurasian ashes	140
4.2.6.2.2	The split between <i>F. nigra</i> and <i>F. mandshurica</i>	142
4.2.6.2.3	Speciation among Eurasian species	142
4.2.6.2.4	Reticulation between <i>F. angustifolia</i> and <i>F. mandshurica</i>	143
4.2.6.3	Taxonomic implications	144
4.2.7	<i>Conclusions</i>	145
4.2.8	<i>Acknowledgements</i>	146
4.2.9	<i>Literature cited</i>	147
4.3	CONCLUSIONS	164
4.4	REFERENCES DE L'INTRODUCTION ET DES CONCLUSIONS.....	166
5	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	168

5.1	CONCLUSIONS GENERALES.....	168
5.1.1	<i>Aspects généraux</i>	168
5.1.2	<i>Aspects biogéographiques et systématiques</i>	169
5.2	PERSPECTIVES	170
5.3	REFERENCES	175

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Les différents concepts alternatifs de l'espèce.	2
Tableau 1.2. Différents types de spéciation	3
Tableau 1.3. Anciens schémas de classification du genre <i>Fraxinus</i>	12
Tableau 1.4. Extrait de l'échelle des temps géologiques.	14
Tableau 1.5. Classification du genre <i>Fraxinus</i> selon Wallander (2008).	21
Table 2.1. Sequence variation and discrimination power of the barcode regions in <i>Fraxinus</i> spp.	44
Table 3.1. Sequence variation and parameters of phylogenetic analyses for various datasets in the genus <i>Fraxinus</i>	82
Table 4.1. Populations data for samples of the <i>Fraxinus</i> section included in this study.	123
Table 4.2. Estimations of divergence times from the nITS dataset.	138

Liste des appendices

Appendix 2.1. Samples used in this study and newly published sequences	60
Appendix 3.1. Samples used in this study and newly published sequences	98
Appendix 4.1. Accession data for samples of the <i>Fraxinus</i> section included in this study ...	153

Liste des figures

Figure 1.1. Schéma simplifié montrant l'existence d'une zone grise lors d'une spéciation	4
Figure 1.2. Répartition mondiale du genre <i>Fraxinus</i> L.....	9
Figure 1.3. Distribution géographique et fréquences des haplotypes microsatellites chloroplastiques chez les frênes européens	19
Figure 2.1. NJ tree for the barcode option 1 (<i>rpoC1</i> , <i>rpoB</i> , and <i>matK</i>)	46
Figure 2.2. NJ tree for the barcode option 2 (<i>rpoC1</i> , <i>matK</i> and <i>trnH-psbA</i>)	47
Figure 2.3. NJ tree for the <i>trnH-psbA</i> dataset implicating the sample set 2	48
Figure 2.4. NJ tree for the <i>rpl32-trnL</i> dataset implicating the sample set 2	49
Figure 3.1. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of the cpDNA intergenic spacers dataset.....	83
Figure 3.2. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of nITS dataset	84
Figure 3.3. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of nETS dataset	85
Figure 3.4. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of <i>phantastica</i> dataset.....	87
Figure 3.5. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of combined dataset (with nITS)...	89
Figure 4.1. Location of sampled populations of <i>F. angustifolia</i> and <i>F. excelsior</i>	120
Figure 4.2. Tree from Bayesian analysis of nETS haplotypes	129
Figure 4.3. Phylogram from maximum likelihood analysis of nETS haplotypes	131
Figure 4.4. Tree from Bayesian analysis of nITS haplotypes	132
Figure 4.5. Phylogram from maximum likelihood analysis of nITS haplotypes	133
Figure 4.6. AFLP Neighbor-Net network	136
Figure 4.7. Bar-plot of Structure analysis of AFLP data	136
Figure 4.8. Schematic representation showing incongruence between nITS and nETS phylogenies.....	139
Figure 4.9. Chronogram of <i>Fraxinus</i> section based on Bayesian analysis of nITS data	140

« Regardez bien la pousse des arbres
Si le Chêne est vert avant le Frêne,
Vous serez sec jusqu'à l'automne.
Si le Frêne est vert avant le Chêne,
Tout l'été sera mouillé. »

Dicton populaire.

1 Introduction

La question de la réalité de l'espèce est un débat de longue date (Ghiselin, 1974; Levin, 1979; Nelson, 1989; Rieseberg et Burke, 2001; Lee, 2003; Rieseberg *et al.*, 2006), certains auteurs considérant que la notion d'espèce est purement conceptuelle et déconnectée de la nature (Levin, 1979; Nelson, 1989), et mettant en exergue les difficultés de délimitations et de définitions observées dans plusieurs groupes biologiques. Toutefois, d'autres auteurs considèrent que les difficultés que peuvent rencontrer les biologistes sur le terrain ne sauraient être une preuve de la non-existence des espèces dans la nature, et que la notion d'espèce est donc une réalité (revue dans Rieseberg et Brouillet, 1994; Rieseberg *et al.*, 2006), l'espèce représentant une unité évolutive critique, la genèse de nouvelles espèces ou de futures spéciations, la seule voie pour étudier la diversification des lignées (Rieseberg et Brouillet, 1994). Le but de ce manuscrit n'étant pas de tenter d'apporter une réponse à cette question probablement insoluble mais de questionner la délimitation d'espèces, il me semble préférable de postuler que les espèces sont une réalité biologique, comme on peut l'observer dans de nombreux groupes biologiques (Rieseberg *et al.*, 2006).

1.1 L'espèce, unité de base de la biologie évolutive

En 1758, Carl von Linnaeus introduit le système de nomenclature binominal pour l'ensemble des êtres vivants, et par là même le concept suivant lequel les entités biologiques peuvent être regroupées en « espèces » clairement différenciées et séparées. Même si les grecs anciens, et probablement depuis plus longtemps encore d'autres populations humaines, se sont intéressés à nommer les êtres vivants qui les entourent et à les regrouper en entités discrètes, il s'agissait de différencier les aliments comestibles d'autres toxiques, les plantes qui soignent de celles qui tuent, ou d'autres groupements, mais toujours pour des raisons pratiques. Le processus assez simple selon lequel un observateur forme des groupes discrets d'individus partageant des caractéristiques similaires semble présent dans toutes les populations humaines, dans toutes les cultures. Avec Linné, la classification sert l'homme, mais elle sert surtout à illustrer l'œuvre divine. Linné étant officiellement fixiste, il considère les espèces comme le résultat de la création divine au moment de la Genèse, qui donc, du fait même de leur non-modification, sont parfaitement homogènes et idéalisées (concept essentialiste de l'espèce). Les individus sont rassemblés en espèces sur des critères de « ressemblances » morphologiques, ou d'affinités supposées au moment de la Création. La

notion de reproduction apparue auparavant dans la définition de l'espèce avec John Ray (1628-1705), pour qui l'espèce est « *un ensemble d'individus qui engendrent, par la reproduction, d'autres individus semblables à eux-mêmes* », est reprise par Linné, « fixant » définitivement la non-modification des espèces. Si la classification binominale est la norme encore aujourd'hui, certaines limites sont clairement identifiées, notamment l'absence de variations intra-spécifique que suppose la définition d'une espèce basée sur un seul individu (l'holotype). Pour Linné, l'espèce est l'entité insécable et homogène de la nature.

Tableau 1.1. Les différents concepts alternatifs de l'espèce et propriétés de base de ces concepts. Les propriétés en italique sont généralement considérées comme nécessaires. D'après De Queiroz (2007).

Concept	Propriétés	Auteurs principaux
Biologique	Reproduction menant à une descendance viable et fertile	(Mayr, 1942) (Wright, 1940) (Dobzhansky, 1950)
Isolement	<i>Isolement reproducteur intrinsèque : absence de reproduction entre organismes hétérospécifique sur la base de propriétés intrinsèques, par opposition à des barrières extrinsèques (par ex. géographiques)</i>	(Mayr, 1942) (Dobzhansky, 1970)
Reconnaissance	<i>Partage d'un système de reconnaissance pour la reproduction ou la fertilisation (mécanismes par lesquels des organismes conspécifiques ou leurs gamètes, reconnaissent l'autre pour la reproduction ou la fertilisation)</i>	(Paterson, 1985) (Masters et al., 1987) (Lambert et Spencer, 1995)
Ecologique	<i>Même niche ou zone adaptative (composantes de l'environnement avec lesquelles des organismes conspécifiques interagissent)</i>	(Van Valen, 1976) (Andersson, 1990)
Evolutif	Rôle évolutif, tendance et devenir historique unique	(Simpson, 1951) (Wiley, 1978) (Mayden, 1997)
certaines interprétations	<i>Diagnosabilité (différence quantitative fixées)</i>	(Grismer, 1999, 2001)
Phylogénétique	Concept très hétérogène (voir ci-dessous)	
Hennigien	<i>L'ancêtre s'éteint à la divergence pour former 2 nouvelles espèces</i>	(Hennig, 1966) (Ridley, 1989) (Meier et Willmann, 2000)
Monophylie	<i>Tous les descendants de l'ancêtre commun partagent des caractères dérivés</i>	(Rosen, 1979) (Donoghue, 1985) (Mishler, 1985)
Genéalogique	<i>Coalescence exclusive d'allèle (tous les allèles d'un gène donné descendent d'un allèle ancêtre commun qui n'est pas partagé avec d'autres espèces)</i>	(Baum et Shaw, 1995) voir aussi Avise et Ball (1990)
Diagnosabilité	<i>Possibilité de diagnose (qualitative, différences fixées)</i>	(Nelson et Platnick, 1981) (Cracraft, 1983) (Nixon et Wheeler, 1990)
Phénétiq	<i>Similarité (quantitative)</i>	(Michener, 1970) (Sokal et Crovello, 1970) (Sneath et Sokal, 1973)
Cohésion	Cohésion phénotypique (génétique ou démographique, interchangeabilité)	(Templeton, 1989, 1998)
Groupes génétiques	<i>Groupes génétiques homogènes, variance intragroupe minimisée, variance intergroupe maximisée</i>	(Mallet, 1995)

Tableau 1.2. Différents types de spéciation. La spéciation allopatrique est considérée comme la plus fréquente chez les plantes (Rieseberg et Brouillet, 1994), mais la spéciation par hybridation et polyploidisation est de plus en plus mise en évidence (Rieseberg, 1997).

Spéciation allopatrique dans laquelle une population ou un ensemble de population est subdivisée par le développement de barrières géographiques (*spéciation allopatrique par subdivision* (Grant, 1981)) ou par extinction des populations intermédiaires.

Spéciation allopatrique par effet fondateur (Templeton, 1980), dans laquelle la diminution soudaine ou la colonisation d'une nouvelle aire géographique par quelques individus amène, sous l'effet de la dérive génétique et de la dépression de consanguinité, à la fixation d'allèles différents de la population parentale, en qualité ou en fréquence.

Spéciation parapatrique (White, 1978) dans laquelle des différences apparaissent entre populations continues situées sur un cline géographique (température, précipitations, etc.).

Spéciation sympatrique par spécialisation pour un hôte (Bush, 1975) ou un pollinisateur particulier, par hybridation (voir texte pour plus de détails), ou polyploidisation (Rieseberg et Willis, 2007).

Toutefois, depuis Darwin (1859), la biologie ne saurait se concevoir sans le concept d'évolution, au point que l'on parle désormais de « biologie évolutive ». Ce concept d'évolution implique que les espèces se modifient au cours de temps généralement longs, et que deux populations séparées et isolées, si un temps suffisant s'écoule, deviennent deux espèces « séparées », soit sous l'action de la sélection naturelle (Darwinisme), soit sous l'action de mutations neutres et de la dérive génétique (Théorie Neutraliste de l'évolution ou théorie de l'évolution neutre), soit sous l'action combinée de plusieurs de ces forces évolutives, comprenant les deux forces citées ci-dessus (théorie néo-darwinienne de l'évolution). Le fait que deux individus ayant un ancêtre commun puissent appartenir à deux espèces distinctes nous amène à tenter de définir le concept d'espèce. Il ne s'agit pas de fournir une nouvelle définition de l'espèce (bien d'autres avant moi s'y sont attachés), le nombre important de concepts dérivés des grandes classes (concept écologique, concept évolutif, concept phylogénétique, concept phénétique – le plus intuitif, concept de cohésion et les concepts de groupes génétiques) (voir tableau 1.1) fournissant assez de littérature et de débats pour intéresser plusieurs mémoires de doctorat (De Queiroz, 2007), mais de présenter celui qui me semble apporter la réponse la plus satisfaisante, le « Lineage Species Concept » (LSC, De Queiroz, 1998; De Queiroz, 2007).

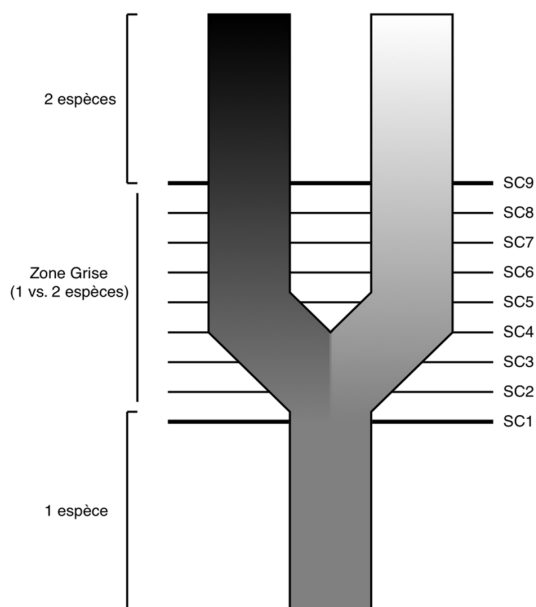


Figure 1.1. Schéma simplifié montrant l'existence d'une zone grise lors d'une spéciation. Peu après la divergence « réelle » des espèces, plusieurs critères de délimitation d'espèces (notés SC1 à SC9) apparaissent, durant une période (la zone grise) où les concepts précédents (considérés comme des critères) ne sont pas congruents, jusqu'à ce que tous les critères de délimitation s'accordent sur la présence de deux espèces. Cette figure simplifiée ne tient pas compte de la possibilité d'évolution réticulée lors de la spéciation. D'après De Queiroz, 2007.

1.2 Le « Lineage Species Concept » (sens De Queiroz, 1998)

Dans son article de 1998, De Queiroz propose un concept d'espèce qui va plus loin que de simplement définir un autre critère pour la différenciation de deux espèces. En effet, il affirme que ce qui est à la base des autres concepts doit être considéré comme des critères, comme un isolement écologique, une différenciation morphologique ou d'autres éléments de délimitation d'espèces. Il considère deux individus comme appartenant à des espèces distinctes si le réseau généalogique qui les unit montre une structure faisant intervenir une spéciation, de quelque type qu'elle soit (voir tableau 1.2). Une espèce est donc une lignée d'individus qui évolue indépendamment d'autres lignées d'individus. Et ce n'est que pour identifier cet événement de spéciation que les critères d'isolement reproducteur (concept biologique), de monophylie réciproque (concept phylogénétique), de divergence écologique ou phénétique peuvent être utilisés. Il a mis en outre plus récemment en évidence (De Queiroz, 2007) la présence d'une zone grise lors du phénomène continu de la spéciation (figure 1.1). Cette zone grise correspond à la période durant laquelle différents critères de délimitation d'espèces se mettent en place (par exemple, la stérilité des hybrides, la différenciation morphologique ou l'isolement écologique), dans un ordre différent suivant les cas étudiés. L'observation de ces critères au fur et à mesure de la spéciation amène les divers concepts d'espèces à identifier la présence de deux espèces différenciés au fur et à mesure que les lignées se séparent. L'accumulation des critères de délimitation d'espèces au cours de la

spéciation entraîne une congruence progressive des différents concepts sur la présence de deux espèces vs une espèce, jusqu'à ce que tous les critères de délimitation soient acquis, et que tous les concepts affirment la présence de deux espèces.

Étant donné que les éléments de divergence, qu'ils soient intrinsèques (liés à l'histoire des lignées) ou extrinsèques (liés à l'environnement) ne se produisent pas toujours dans le même ordre, l'acquisition de caractères uniques ne saurait se dérouler ni au même rythme, ni suivant la même séquence pour toutes les spéciations. Les concepts « classiques », qui ne s'intéressent généralement qu'à un élément de la divergence, ne sont pas capables, durant la période grise, de détecter la divergence et de montrer qu'elle est définitive. Le Lineage Species Concept, en permettant la prise en compte de tous les critères disponibles, permet de détecter même des divergences récentes, en considérant un événement de spéciation lorsqu'un seul des critères (biologique, phylogénétique, écologique, etc.) est satisfait. Bien sûr, la démonstration de l'existence de plusieurs de ces critères renforce l'argumentation. Il suffit donc de montrer que deux groupes d'individus représentent des lignées évolutives différentes pour les considérer comme deux espèces distinctes. On peut noter que la divergence géographique (l'allopatrie), distincte de la divergence écologique, n'est pas prise en compte comme critère de délimitation, car elle ne suppose pas l'évolution définitivement séparée des lignées impliquées. Si l'isolement géographique n'est pas corrélé à un autre type d'isolement (écologique, reproducteur), qui pourrait en quelque sorte « garantir » la séparation définitive des lignées, ce sont alors des populations d'une même espèce qui sont observées.

Cette apparente facilité à délimiter des espèces différentes est la principale limite du LSC. Car s'il est aisé, « en théorie », de délimiter deux espèces (c.à.d. de délimiter des lignées évolutives), dans la pratique, cela peut s'avérer délicat, et les critères précédemment rejetés comme nécessaires retrouvent de leur utilité. Le critère le plus utilisé est le critère biologique (le plus intuitif), selon lequel *l'espèce est un groupe d'individus ayant la faculté potentielle ou réelle de se croiser, isolément des autres groupes* (Mayr, 1942), mais de plus en plus, le critère phylogénétique [*une espèce est un lignage simple qui sauvegarde son identité des autres lignages et qui a ses propres tendances évolutives et sa propre destinée historique*, (Wiley, 1978)] est utilisé (Doyle, 1992; Puillandre *et al.*, 2008).

1.3 Hybridation et espèce

L'hybridation peut avoir plusieurs conséquences évolutives, incluant une augmentation de la diversité génétique, l'apparition ou le transfert d'adaptations génétiques, l'apparition de

nouveaux écotypes, et le renforcement ou la rupture des barrières d'isolement reproducteur (dédifférenciation d'espèces) (Rieseberg, 1997).

Les premières études sur l'hybridation datent de 1760 avec les études expérimentales de Joseph Költeurer sur le tabac (*Nicotiana*), mais le nombre d'études sur le sujet a fortement augmenté ces dernières décennies, notamment avec l'étude poussée de certaines espèces modèles comme le coton (Rhyne, 1962; Gao *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2006; Vafaie-Tabar et Chandrashekar, 2007) le tabac (Clausen et Goodspeed, 1925; Lammerts, 1929; Lammerts, 1931; McCray, 1932; Ar-Rushdi, 1957; Hagen et Gunckel, 1958; Daly et Robson, 1969; Medgyesy *et al.*, 1985; Chase *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2009) ou le tournesol (Carney *et al.*, 2000; Welch et Rieseberg, 2002; Lexer *et al.*, 2003a; Lexer *et al.*, 2003b; Ludwig *et al.*, 2004; Baack *et al.*, 2005; Edelist *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2007). Si l'hybridation avec descendance stérile (hybrides de Költeurer, la première « mule » botanique ; Mallet, 2008) est en accord avec les critères généralement nécessaires pour délimiter les espèces, le cas des nombreuses espèces de plantes dont les hybrides ne présentent pas de stérilité ou de baisse de la fertilité est plus problématique. Certains auteurs (Mayr, 1942, 1963) ont justifié la possibilité d'hybridations rares par des situations biologiques aberrantes, comme des perturbations de l'environnement dues à l'homme. Même si cela pourrait effectivement être le cas, il n'en reste pas moins que l'hybridation est observée sur tous les continents (Mallet, 2005), et les rares revues s'intéressant à son importance montrent qu'un grand nombre d'introgessions est désormais connu chez les plantes (Arnold, 1997) et les animaux. Un exemple intéressant est celui des pinsons de Darwin (Geospizinae) observés sur les îles Galapagos et considérés depuis le XVIII^{ème} siècle comme un modèle pour l'explication des radiations évolutives et de la théorie de la sélection naturelle de C. Darwin. Tout en étant morphologiquement très proches, ils se différencient aisément par la forme de leur bec, adapté aux différents régimes alimentaires de ces espèces. Toutefois, comme le souligne Mallet (2008), les données moléculaires, qu'elles soient nucléaires ou mitochondriales, ne montrent aucune substitution fixée, suggérant soit une spéciation très récente (moins de quelques milliers d'années), soit que des flux de gènes et une introgression importante sont à l'œuvre (Grant et Grant, 1996). Cette hypothèse est supportée par la fertilité des hybrides et des individus issus de rétro-croisements (Grant et Grant, 1996). *Selon toute vraisemblance, les taxons jusque là considérés comme des espèces à part entière seraient donc plutôt des races écologiques, différenciées par leur régime alimentaire.*

Certaines espèces sont elles-mêmes issues d'une spéciation par hybridation, un type de spéciation courant chez les plantes, spécialement par polypléidisation (Rieseberg et Willis,

2007), qui se trouve facilité par l'isolement reproducteur assuré par une méiose différentielle entre les espèces parentales diploïdes et les descendants polyploïdes. Celle-ci serait responsable d'environ 40 à 80 % de la diversité des plantes vasculaires (Mallet, 2008), et aurait notamment permis une meilleure survie des taxons polyploïdes lors de la crise de la limite Crétacé/Tertiaire (Fawcett *et al.*, 2009). La spéciation par hybridation homoploïde est quant à elle possible et même fréquente lorsque les multiples barrières reproductives qui isolent habituellement deux espèces (isolement pré-zygotique – écologique, système de reproduction pour les plus importants ; ou post-zygotique – stérilité des hybrides F1) ne sont pas réunies (Rieseberg et Willis, 2007). Des cas de spéciation hybrides ont été décrits chez le tournesol (p.e. Ungerer *et al.*, 1998), certains Iris (Arnold *et al.*, 1991) et Cardamine (Franzke et Mummenhoff, 1999), dans les genre *Senecio* (Hegarty *et al.*, 2005) et *Solanum* (Spooner *et al.*, 1991) et quelques autres taxons (revue dans Rieseberg, 1997).

Outre ces cas extrêmes où l'hybridation amène à la formation de nouvelles espèces, des phénomènes d'hybridation variant en intensité ont été démontrés chez de nombreux taxons (Anderson, 1949; Sang *et al.*, 1995; Wendel *et al.*, 1995; Perron et Bousquet, 1997; Alice et Campbell, 1999; Franzke et Mummenhoff, 1999; O'Hanlon *et al.*, 1999; Terry *et al.*, 2000; Gobert *et al.*, 2002; Rauscher *et al.*, 2002; Lacape *et al.*, 2003; Nishimoto *et al.*, 2003; Choler *et al.*, 2004; Winkworth et Donoghue, 2004; Okuyama *et al.*, 2005; Allainguillaume *et al.*, 2006; Banfer *et al.*, 2006; Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006; Heuertz *et al.*, 2006; Burke et Bain, 2008; Cook *et al.*, 2008) (voir ci-dessus pour un exemple chez les Geospizinae). James Mallet (2008) estime qu'au moins 25% des espèces de plantes vasculaires de Grande-Bretagne possèdent des hybrides, et souligne qu'au regard de la distance génétique généralement plus grande entre ces espèces de climat tempéré qu'entre des espèces tropicales comme celles de la familles des Orchidaceae, ce chiffre sous-estime sans doute la proportion de taxons s'hybridant en milieu naturel. En sous-estimant à la fois le nombre d'espèces cryptiques résultant d'hybridation, mais également en considérant comme distincts des taxons différenciés (morphologiquement et/ou écologiquement, mais pas complètement isolés reproductivement) en cours de spéciation (souvent) allopatrique (la « zone grise »), qui suite à des changements du milieu (climatiques, géologiques) reviennent en contact (voir Perron *et al.*, 2000), ces chiffres montrent bien à quel point l'estimation de la biodiversité est délicate si on ne prend pas en compte ces phénomènes d'hybridations pour délimiter les espèces dans les études de diversité et de phylogénie.

Le critère utilisé dans ces études est la plupart du temps le critère phylogénétique de monophylie réciproque, bien que certaines espèces puissent être paraphylétiques lorsqu'un tri

incomplet des lignées (« incomplete lineage sorting ») est observé (voir Bouillé et Bousquet, 2005), ou dans les cas d'espèces progénitrices-dérivées (Perron *et al.*, 2000). Cette absence de monophylie d'une des espèces (ou des deux) peut être détectée par l'incongruence de topologie entre régions chloroplastiques et régions nucléaires (Soltis et Kuzoff, 1995; Hardig *et al.*, 2000; Ferguson et Jansen, 2002; Nishimoto *et al.*, 2003; Lihova *et al.*, 2006; Fehrer *et al.*, 2007), ou entre régions nucléaires (Slade *et al.*, 1994; Kawakita *et al.*, 2004). Toutefois, comme le souligne Rieseberg et Brouillet (1994), les espèces paraphylétiques ne sont pas rares chez les plantes. Ceci peut s'expliquer par le type de spéciation à l'œuvre : dans certains cas de spéciation comme les spéciations par effet fondateur ou par des cas de spéciations parapatriques, la structure des espèces suit fréquemment une séquence polyphylie→paraphylie→monophylie. Selon ces auteurs, seules les espèces ancestrales avec des flux de gènes extrêmement élevés et/ou des différenciations entre populations très faibles ou nulles (une situation rare chez les plantes annuelles, Levin, 1984, mais courante chez les espèces pérennes comme les arbres) resteraient non résolues ; les autres devant être considérées dans une logique temporelle, selon laquelle une espèce aujourd'hui paraphylétique serait très probablement monophylétique si étudiée dans une centaine de millénaires (suivant la durée du cycle de vie, la taille des populations, le système de reproduction, etc.) (Rieseberg et Brouillet, 1994).

Ceci peut nous amener à reconsidérer le critère de monophylie réciproque dans la délimitation des espèces (critère phylogénétique), spécialement chez les plantes où la paraphylie et la polyphylie sont fréquentes (Rieseberg et Brouillet, 1994; Bouillé et Bousquet, 2005) mais aussi chez les animaux où quelques cas ont été rapportés (par exemple, Patton et Smith, 1994).

1.4 Le genre *Fraxinus*

1.4.1 Généralités

Le genre *Fraxinus* L. comprend 43 espèces actuellement reconnues, mais par le passé, plus de 450 taxons ont été décrits, dont la plupart sont aujourd'hui tombés en synonymie (Lingelsheim, 1920; Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008). La dernière monographie complète du genre incluait 64 espèces (Lingelsheim, 1920), et plusieurs ont été décrites depuis. Le genre *Fraxinus* appartient à la famille des Oleaceae, et est le seul membre de la sous-tribu Fraxininae, qui est le groupe frère de la sous-tribu des Oleinae dans la tribu Oleaceae (Wallander et Albert, 2000). La monophylie du genre a été démontrée (Wallander et Albert, 2000). Il apparaît unique dans les Oleaceae par les larges feuilles imparipennées et les samares ne contenant qu'une graine. Comme la plupart des Oleaceae, les fleurs discrètes sont

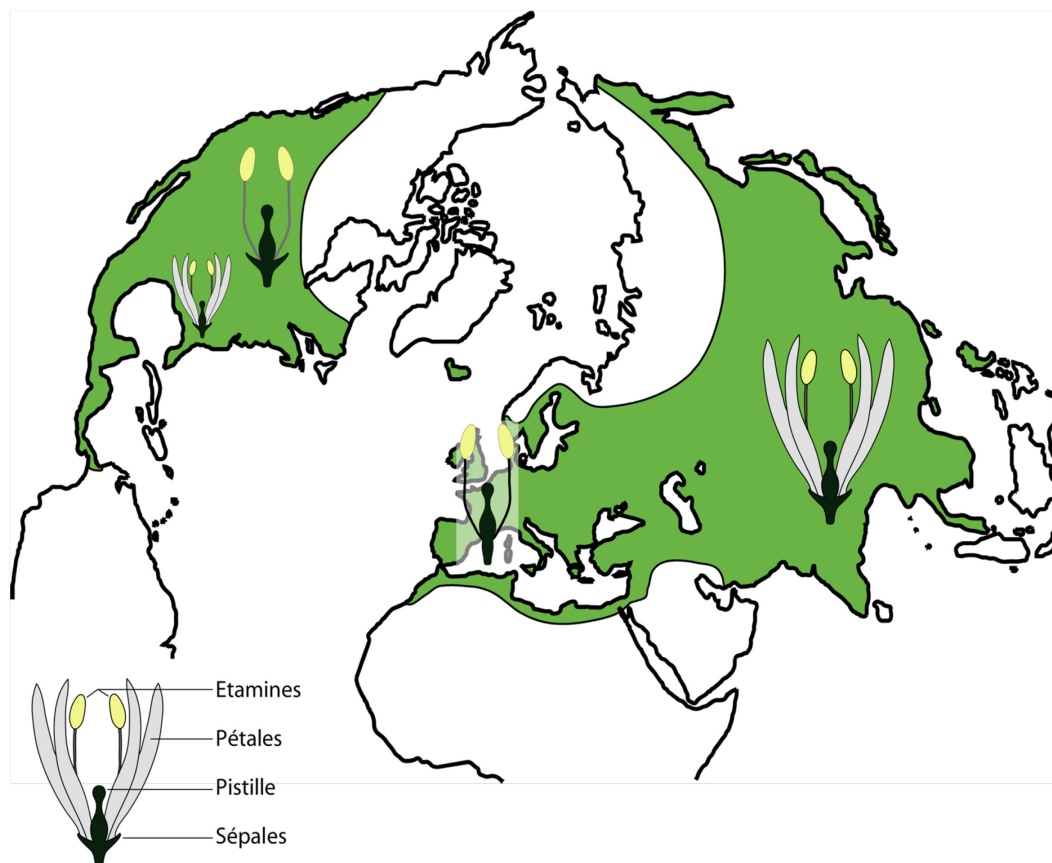


Figure 1.2. Répartition mondiale du genre *Fraxinus* L., montrant schématiquement les morphologies florales observées sur les différents continents. composées d'un pistil et de deux étamines. La corolle est absente ou formée de quatre (rarement deux) pétales blancs, linéaires et libres (rarement soudés). Le syncépale est petit,

denté et cupulaire, ou absent. Les espèces entomophiles (à deux exceptions près) forment de larges panicules qui émergent simultanément du bourgeon terminal avec les feuilles. Les fleurs apétales (espèces anémophiles), sont portées par des inflorescences latérales ou terminales et émergent avant le débourrement. L'ovaire syncarpe contient 4 ovules, deux dans chaque locule, qui se développe normalement en une samare contenant une seule graine.

On trouve le genre *Fraxinus* dans tout l'hémisphère nord (figure 1.2), des zones tempérées froides (par exemple *F. excelsior*, *F. mandshurica*, *F. nigra*, *F. pennsylvanica*) aux zones subtropicales humides (par exemple *F. chinensis*) en passant par les zones désertiques (*F. anomala*, certaines populations de *F. angustifolia*). Les variations de la morphologie florale observées au sein du genre et entre les continents (voir figure 1.2) montrent certaines incohérences, ce qui a conduit à un traitement taxonomique complexe et abondant du genre par les auteurs, de même que les morphologies foliaires variées (forme, texture, nombre de folioles, bordure des folioles, longueur du pétiole, ailes du rachis, etc.) ont entraîné la description de nombreuses espèces, pour l'essentiel tombées en synonymie (Lingelsheim, 1920; Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008) (voir tableau 1.5).

1.4.2 Systématique du genre *Fraxinus*

Le genre fut traditionnellement divisé en deux sections ou sous-genres sur la base de caractères morphologiques (voir tableau 1.3). La section ou sous-genre *Fraxinus* comprenait tous les taxons avec des inflorescences latérales, alors que la section *Ornus* comprenait les taxons dont les fleurs naissent sur un panicule terminal en même temps que les bourgeons à feuilles débourrent. La section *Fraxinus* était ensuite divisée en 5 sous-sections en fonction de la présence ou de l'absence d'un calice, du nombre de pétales, et d'un pétiole ailé ou non. La section *Ornus* était divisée en deux sous-section, *Ornus* (fleurs avec pétales) et *Ornaster* (fleurs sans pétales) (Wallander, 2008). Les espèces polyploïdes étaient présentes dans les deux sous-genres (Jeandroz *et al.*, 1997).

Le genre est actuellement divisé en 6 sections, généralement cohérentes pour la morphologie florale, et de 3 espèces classées comme *incertae sedis* (*F. spaethiana* et *F. chiisanensis* à fleurs apétales et *F. cuspidata* à fleurs complètes) :

- la section *Dipetalae*, comprenant *F. dipetala*, *F. quadrangulata* et *F. anomala*, que l'on trouve du sud des USA au nord du Mexique (*F. dipetala* et *F. quadrangulata*) ou des USA au sud du Canada (*F. quadrangulata*). Les fleurs sont complètes ou incomplètes;

- la section *Melioides*, entièrement rencontrée sur le continent nord-américain, comprenant *F. americana*, *F. uhdei*, *F. papillosa*, *F. latifolia*, *F. caroliniana*, *F. texensis*, *F. platypoda*, *F. pennsylvanica*, *F. velutina*, *F. profunda* et *F. berlanderiana*. Les fleurs sont incomplètes, avec des sépales absents ;
- la section *Pauciflorae*, qui comprend les espèces de zones arides à subdésertique, à fleur sans pétales, *F. dubia*, *F. purpusii*, *F. rufescens*, *F. greggii*, *F. gooddingii* ;
- la section *Ornus*, comprenant les espèces asiatiques du genre (*F. raibocarpa*, *F. paxiana*, *F. trifoliolata*, *F. sieboldiana*, *F. apertisquamifera*, *F. lanuginosa*, *F. bungeana*, *F. ornus*, *F. floribunda*, *F. micrantha*, *F. longicuspis* et *F. chinensis*) à fleurs complètes ;
- la section *Sciadanthus*, comprenant *F. xanthoxyloides* et l'espèce menacée *F. hupehensis* (endémique de la province de Hubei, Chine), à fleurs apétales (sauf les fleurs mâle de *F. xanthoxyloides*, nues) ;
- la section *Fraxinus*, à fleurs nues, comprenant les espèces européennes *F. excelsior* et *F. angustifolia*, l'espèce asiatique *F. mandshurica* et l'espèce nord-américaine *F. nigra* ;

1.4.3 Utilisations du frêne

Plusieurs espèces sont utilisées pour leur bois dans leur aire de répartition (*F. excelsior*, *F. chinensis*, *F. pennsylvanica*, etc.) ou leur composés intervenant dans la pharmacopée traditionnelle (*F. chinensis* et les autres espèces de la section *Ornus* en Asie). Le bois de ces espèces était utilisé en ébénisterie, pour les charpentes, mais surtout pour réaliser les manches d'outils. Le bois de *F. excelsior* est bon au polissage et au toucher onctueux. Il est dur, lourd (dense), flexible et non cassant : on en faisait, depuis l'antiquité, les hampes des lances (on plantait des Frênes près des châteaux-forts). Ovide, dans *les Métamorphoses*, le nomme "arbre aux javelots". On a découvert des outils néolithiques (5000 ans av JC) avec un manche de frêne. Dans la vie courante, on en faisait aussi des manches de bêches, des barreaux d'échelle, des gouvernails, des rames, des raquettes de sport et les anciens skis. Il n'y a pas si longtemps, les perchistes utilisaient des perches en bois de frêne. C'est en outre un excellent bois de chauffage (<http://www.lesarbres.fr/frene.html>).

Les feuilles de frêne sont réputées diurétiques et antirhumatismales. Les feuilles servaient de fourrage (comme les feuilles d'orme). De l'écorce, on extrayait le « quinquina d'Europe »,

Tableau 1.3. Anciens schémas de classification du genre *Fraxinus*. ^a(Vassiljev, 1952) et (Wei, 1992) n'incluaient pas les sections *Dipetalae* ou *Pauciflorae* car elles ne sont pas natives des régions couvertes par leurs études. Les classifications plus anciennes sont détaillées par Miller (1955). D'après Wallander (2008).

(Lingelsheim, 1920), (Rehder, 1940), (Dayton, 1954), (Miller, 1955)

Sect. *Fraxinaster* DC.

Subsect. *Bumelioides* (Endl.) Lingelsh.

Subsect. *Melioides* (Endl.) Lingelsh.

Subsect. *Sciadhanthus* (Coss. et Dur.) Lingelsh.

Subsect. *Dipetalae* Lingelsh.

Subsect. *Pauciflorae* Lingelsh.

Sect. *Ornus* (Neck.) DC.

Subsect. *Euornus* Lingelsh.

Subsect. *Ornaster* (Koehne et Lingelsh.) Lingelsh.

(Vassiljev, 1952)^a

Subgenus *Fraxinaster* (DC.) V. Vassil.

Sect. *Melioides* (Endl.) Pfeiff.

Sect. *Bumelioides* (Endl.) Pfeiff.

Subgenus *Ornus* (Boehm.) Pers.

Sect. *Euornus* Koehne et Lingelsh.

Sect. *Ornaster* Koehne et Lingelsh.

(Nikolaev, 1981)

Subgenus *Fraxinus*

Sect. *Fraxinus* Subsect. *Paniculatae* E. Nikolaev

Subsect. *Racemosae* E. Nikolaev

Sect. *Melioides* (Endl.) Pfeiff.

subsect. *Melioides* (Endl.) Lingelsh.

Subsect. *Sciadhanthus* (Coss. et Dur.) Lingelsh (incl. subsect. *Pauciflorae* Lingelsh.)

Sect. *Dipetalae* (Lingelsh.) E. Nikolaev

Subgenus *Ornus* (Boehm.) Pers.

Sect. *Ornus* (Boehm.) DC.

Sect. *Ornaster* Koehne et Lingelsh.

(Wei, 1992)^a

Subgenus *Fraxinus*

Sect. *Fraxinus*

Sect. *Melioides* (Endl.) Pfeiff.

Sect. *Sciadhanthus* Coss. et Dur.

Subgenus *Ornus* (Boehm.) Pers.

Sect. *Ornus* (Boehm.) DC.

Sect. *Ornaster* Koehne et Lingelsh.

Wallander (2008)

Sect. *Dipetalae* (Lingelsh.) E. Nikolaev

Sect. *Fraxinus* Sect. *Melioides* (Endl.) Pfeiff.

Sect. *Ornus* (Boehm.) DC.

Sect. *Pauciflorae* (Lingelsh.) E. Wallander

Sect. *Sciadhanthus* (Coss. et Dur.) Lingelsh.

qui est fébrifuge. La fleur fraîche de *F. ornus*, additionnée de levure, produisait, après fermentation, une boisson rafraîchissante et antirhumatisme, la *frênette* (<http://wapedia.mobi/fr/Frêne>).

Certaines espèces interviennent également dans les pratiques spirituelles de plusieurs peuples, comme le frêne commun (*F. excelsior*), que les anciens celtes considéraient comme l'arbre qui soutient le monde (Yggdrasil), possédant trois racines, une plongeant dans le monde des morts, la deuxième dans le monde des vivants, et la troisième enfin plongeant dans le monde des dieux.

Dans la mythologie grecque, le frêne est né des éclaboussures de sang qui sont tombées au sol quand Cronos a coupé les parties génitales d'Ouranos. Plus tard, quand Zeus s'est essayé à donner naissance à l'homme, c'est du frêne que sont nés une sorte d'humains particulièrement violents qui ont passé leur temps à se battre entre eux et à se détruire. Il est l'arbre de Poséidon, qui est notamment le dieu des séismes. Dans *l'Illiade* d'Homère, le javelot d'Achille est en frêne. Les slaves attribuent au Frêne le pouvoir de repousser les serpents : on peut se reposer à son ombre sans crainte. Dans l'astrologie celtique, le frêne est vif, impulsif, exigeant, etc. (http://domenicus.malleotus.free.fr/v/frene_commun.htm?reload_coolmenus).

En Amérique du Nord, le bois et l'écorce de *F. nigra* sont utilisés pour la fabrication du panier servant lors de la cérémonie du « chemin de Vie ».

Il faut noter que les sujets des études faisant intervenir les espèces du genre *Fraxinus* varient fortement en fonction de la section considérée. Dans la section *Fraxinus*, la question de l'hybridation et de la proximité entre *F. excelsior* et *F. angustifolia* apparaît centrale (Jeandroz *et al.*, 1995; Jeandroz *et al.*, 1996; Morand-Prieur *et al.*, 2002; Harbourne *et al.*, 2005; Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006; Gérard *et al.*, 2006a; Heuertz *et al.*, 2006), alors que dans la section *Ornus* la qualification et quantification des composés chimiques produits par les espèces a la préférence (Guo et Zhang, 1983; Stefanova *et al.*, 1995; Hsiang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008). Les études s'intéressant à la section *Melioides* se focalisent quant à elles essentiellement sur la physiologie des espèces nord-américaines (Gomes et Kozlowski, 1980; Abrams *et al.*, 1990), probablement à la demande des forestiers cherchant à améliorer les rendements. Ces sujets d'études préférentiels reflètent sans doute autant les intérêts des chercheurs que de la société civile.

1.4.4 L'évolution dans le genre *Fraxinus*

Le plus ancien fossile connu attribuable au genre *Fraxinus* est une samare de *F. wilcoxiana*, datant de l'Eocène moyen (49-39 millions d'années) et trouvé dans le Sud-est

Tableau 1.4. Extrait de l'échelle des temps géologiques. Fond de cellule jaune : époques intéressant ce manuscrit. Modifié d'après Gradstein *et al.*, 2004.

Ère	Période ou Système	Époque ou Série	Étage	Bornes			
				Ma	±		
C É N O Z O Ï Q U E	Quaternaire	Holocène	Atlantique	0,011784	-		
			Boréale				
		Pléistocène	Tarantien	0,126	-		
			Ionien	0,781	-		
	Néogène	Pliocène	Calabrien	1,806	-		
			Gélasien	2,588	-		
			Miocène	Plaisancien	3,6	-	
				Zancléen	5,332	-	
		Messinien		7,246	-		
		Tortonien	Tortonien	11,608	-		
			Serravallien	13,82	-		
			Langhien	15,97	-		
		Tertiaire	Paléogène	Oligocène	Burdigalien	20,43	-
					Aquitaniens	23,03	-
Chattien	28,4				0,1		
Éocène	Rupélien			33,9	0,1		
	Priabonien			37,2	0,1		
	Bartonien			40,4	0,2		
	Lutétien			48,6	0,2		
Paléocène	Yprésien	55,8	0,2				
	Thanétien	58,7	0,2				
	Sélandien	61,1	0,2				
	Danien	65,5	0,3				
M É S O Z O Ï Q U E S e c o n d a i r e	Crétacé	Supérieur	Maastrichtien	70,6	0,6		
			Campanien	83,5	0,7		
			Santonien	85,8	0,7		
			Coniacien	89,3	1		
			Turonien	93,6	0,8		
			Cénomaniens	99,6	0,9		

de l'Amérique du Nord (Call et Dilcher, 1992), mais ne peut être attribué à aucune section ou

espèce moderne (voir tableau 1.4 pour l'échelle géologique). Les fossiles du genre *Fraxinus* n'apparaissent dans les registres Européens et Asiatiques qu'à partir de l'Oligocène (36 millions d'années) (revue dans Call et Dilcher, 1992). En Europe et en Amérique du Nord, du pollen fossilisé a été trouvé dans des sédiments datant du Miocène supérieur (11-5 millions d'années) (Muller, 1981).

Jeandroz *et al.* (1997) ont publié la première phylogénie moléculaire du genre *Fraxinus*, basée sur les séquences nITS-1 et nITS-2 de 20 espèces. Ils trouvent une bonne congruence entre les données moléculaires et les données morphologiques, bien que certaines espèces doivent être déplacées dans d'autres sections pour que ces dernières soient phylogénétiquement cohérentes. En effet, *F. nigra* apparaît plus apparenté aux espèces européennes qu'aux espèces américaines, avec lesquelles il partage une partie de son aire de répartition. De la même manière, *F. platypoda*, une espèce asiatique, est plus proche phylogénétiquement des espèces eurasiatiques que des espèces américaines avec lesquelles il était jusque là groupé. Pour la première fois, les auteurs ont étudié la phylogéographie du genre *Fraxinus*, montrant une probable apparition en Amérique du Nord, suivi de deux événements de dispersion vers l'Asie (Jeandroz *et al.*, 1997). Les auteurs concluent sur le rôle des changements climatiques et des barrières environnementales dans l'isolement géographique des populations de frênes ayant mené à la structure phylogéographique forte observée actuellement, rappelant que ces facteurs sont connus pour jouer un rôle central dans les événements de spéciations (Jeandroz *et al.*, 1997).

En utilisant les mêmes régions génétiques (nITS-1 et nITS-2), Wallander (2008) s'est intéressée à l'évolution de la dioécie dans le genre. En séquençant la région nITS (nITS-1 et nITS-2) pour l'ensemble du genre et non plus 20 espèces comme Jeandroz *et al.* (1997), elle présente une phylogénie complète du genre *Fraxinus*, et indique sur la phylogénie obtenue la distribution géographique et le système de pollinisation. Pour certaines espèces représentatives des différentes sections qu'elle retrouve, l'auteur présente également une comparaison des phylogénies réduites basée sur des séquences chloroplastiques combinées (intron de *rps16* et région *trnL-F*) et nITS. Le jeu de données chloroplastiques est largement congruent, mais moins résolu que l'arbre nITS basé sur le même échantillonnage. Les relations phylogénétiques entre les sections à l'intérieur du genre sont conservées, bien que la position de certaines espèces varie. On peut noter qu'aussi bien dans l'arbre basé sur les séquences nITS que chloroplastiques la position de *F. chiisanensis*, classée en *incertae sedis* par l'auteur, est proche de la section Melioides, tandis que *F. cuspidata* et *F. spaethiana*, également classées en *incertae sedis*, occupent une position non résolue à la base du genre

dans le jeu de données chloroplastiques, et sont proches de la section *Melioides* dans le jeu de données nITS. Toutefois, comme le souligne l'auteur, la position de ces trois taxons n'est soutenue dans aucun jeu de données. D'autres groupes apparaissent plus naturels, malgré leur absence dans les traitements systématiques antérieurs. La section *Dipetalae* par exemple, regroupant *F. dipetala*, *F. anomala* et *F. quadrangulata*, même si elle n'est pas en contradiction avec la phylogénie de Jeandroz *et al.* (1997) et les études d'autres systématiciens, n'avait pas été retrouvée auparavant. L'auteur confirme par ailleurs la position de *F. platypoda* précédemment observée par Jeandroz *et al.* (1997) comme fortement apparentée à *F. mandshurica* et transfère donc *F. platypoda* de la section *Melioides* vers la section *Fraxinus* (Wallander, 2008). Ce transfert est soutenu par la présence d'un indel (insertion ou délétion d'une séquence nucléotidique dans une autre séquence nucléotidique) de huit paires de bases dans le jeu de données nITS, de même que deux sections dans le genre, dont la monophylie est également soutenue par un indel, les sections *Pauciflorae* (indel de huit paires de bases dans le jeu de données nITS) et *Dipetalae* (indel de huit paires de bases dans le jeu de données *trnL-F*). Sur la base des études morphologiques et phylogénétiques, l'auteur reconnaît 43 espèces valides dans le genre *Fraxinus*.

Wallander (2008) abandonne par ailleurs la classification en sous-genre et regroupe les espèces en cinq sections, en grande partie congruentes avec les classifications précédentes, le plus grand changement étant la création de la section *Dipetalae*. Par la reconstruction de l'évolution des caractères sur l'arbre phylogénétique, l'état ancestral dans le genre *Fraxinus* a été déterminé comme étant un taxon possédant un rachis foliaire non ailé, des inflorescences latérales, des fleurs hermaphrodites avec corolle et calice. Une seule perte du calice a été inférée (dans la section *Fraxinus*), alors que la perte de la corolle était observée trois fois (proche de la base de l'arbre, et à l'intérieur des sections *Dipetalae* et *Ornus*). Dans tous les cas, la dioécie apparaît après la transition de l'entomophilie vers l'anémophilie. Enfin, l'auteur propose une nouvelle classification basée sur ses résultats (tableau 1.3 et 1.5).

Considérant les sections introduites par Wallander (2008), la majorité des études d'évolution (concernant aussi bien les « patterns » que les « process ») concerne la section *Fraxinus* (Morand-Prieur *et al.*, 2002; Harbourne *et al.*, 2005; Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006; Gérard *et al.*, 2006a; Goto *et al.*, 2006; Heuertz *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008).

A l'intérieur de cette section, l'espèce menacée *F. mandshurica* a fait l'objet d'une étude de diversité génétique dans le Nord-est de la Chine (Hu *et al.*, 2008), qui a révélé une diversité génétique nucléaire (basée sur l'analyse de microsatellites) intra-population relativement élevée et ne montrant aucun signe de goulot d'étranglement génétique récent,

contrairement à la différenciation inter-populations, très faible et ne présentant de surcroît pas de structure géographique apparente. La seule structure génétique observable concerne la baisse de la diversité génétique avec la latitude, qui pourrait être le résultat des changements de biomes durant l'Holocène moyen (voir tableau 1.4). Les auteurs expliquent l'absence de structure génétique par des flux de gènes importants entre les populations (certaines distantes de plus de 1000 km), l'absence de reliefs importants jouant le rôle de barrières, et la présence d'un grand refuge dans le Nord-est de la Chine, contrairement aux multiples refuges moins étendus envisagés jusque là (Hu *et al.*, 2008).

F. excelsior a également été l'objet d'études sur la diversité génétique dans plusieurs pays européens à l'échelle locale (Heuertz *et al.*, 2001; Ferrazzini *et al.*, 2007; Dacasa *et al.*, 2008), mais aussi à l'échelle européenne (Heuertz *et al.*, 2004a; Heuertz *et al.*, 2004b; Heuertz *et al.*, 2006).

A l'échelle locale, l'étude de la diversité génétique s'inscrit dans une démarche de conservation des ressources génétiques et d'amélioration des méthodes de foresterie. En Bulgarie, Heuertz *et al.*(2001) ont montré une grande diversité génétique intra-population contrebalancée par une faible différenciation inter-populations, et l'efficacité d'un modèle d'isolement par la distance pour rendre compte de la structure génétique entre les populations, mais aussi à l'intérieur de certaines populations. Les auteurs considèrent l'importante diversité génétique des populations Bulgares comme pouvant être due à la présence d'un refuge balkanique pour *F. excelsior*, ce qui serait en accord avec les théories actuelles (Huntley et Birks, 1983). La situation est similaire en Italie, où Ferrazzini *et al.*(2007) observent une diversité génétique « considérable » (Ferrazzini *et al.*, 2007). Leurs résultats confirment l'hypothèse d'un refuge italien important durant les périodes glaciaires du Quaternaire (Heuertz *et al.*, 2004a). En Finlande, il a été démontré que la structure génétique était fortement influencée par la fragmentation de l'habitat en limite d'aire de répartition, où la faible compétitivité du frêne entraîne une chute de la diversité génétique et une plus forte différenciation génétique entre les populations (Höltken *et al.*, 2003). *A contrario*, en Ecosse (Bacles *et al.*, 2005), des populations reliques en milieu très fragmenté présentent une diversité génétique comparable aux populations du sud-est de l'Europe, et une différenciation inter-populations faible. Comme beaucoup d'autres arbres forestiers, *F. excelsior* est majoritairement allo-fécondé, ce qui pourrait expliquer cette structure génétique (faible différenciation inter-populations et grande diversité génétique intra-population), qui permet facilement les adaptations locales (Petit et Hampe, 2006). Ainsi, Dacasa *et al.*(2008) ont testé la sélection sur les formes alléliques du locus *adh-B* (alcool déshydrogénase B) dans des

populations de frênes communs soumises à différents régimes hydriques en Allemagne, en comparant les résultats sur cette enzyme avec les résultats de l'analyse de quatre microsatellites nucléaires (les microsatellites sont considérés comme neutres, et donc représentent les variations qui ne sont pas dues à la sélection, mais à d'autres forces évolutives, tels que la dérive ou des événements démographiques). L'alcool déshydrogénase est une enzyme clef dans le métabolisme de la plante en situation d'anoxie, dont certains allèles auraient potentiellement pu être sélectionnés dans des populations soumises régulièrement aux inondations, bien que cette hypothèse n'ait pu être confirmée dans l'étude (Dacasa *et al.*, 2008).

A l'échelle européenne, des microsatellites nucléaires (Heuertz *et al.*, 2004b) et chloroplastiques (Heuertz *et al.*, 2004a) ont montré clairement l'existence de deux lignées postglaciaires, l'une s'étendant à partir de la péninsule balkanique, l'autre située en Europe de l'ouest et centrale-nord. La lignée balkanique présente une diversité nucléaire plus élevée que la lignée ouest-européenne (Heuertz *et al.*, 2004b), mais une diversité chloroplastique plus faible (Heuertz *et al.*, 2004a), suggérant une expansion rapide des populations refuges de la lignée balkanique avec pour conséquence des flux de gènes restreints (voir figure 1.3 b), alors qu'au niveau nucléaire, le mélange d'ensemble de gènes précédemment différencié et des flux de gènes importants ont pu homogénéiser la structure génétique de la lignée occidentale. En combinant ces données sur *F. excelsior* avec des données microsatellites chloroplastiques sur *F. angustifolia*, il a été observé l'hybridation naturelle entre ces deux espèces (Heuertz *et al.*, 2006), hybridation précédemment démontrée dans des croisements contrôlés (Morand-Prieur *et al.*, 2002; Raquin *et al.*, 2002). Les refuges précédemment reconnus ont été retrouvés (Péninsule ibérique, l'est des Alpes, Italie et Péninsule des Balkans), et de nouveaux ont été détectés dans le sud de l'Italie et la Turquie pour *F. angustifolia*, expliquant les niveaux de polymorphisme et de différenciation particulièrement élevés dans ces régions. En Turquie particulièrement, *F. angustifolia* montre une diversité génétique très élevée, avec un grand nombre d'allèles privés, retrouvés uniquement en Turquie (voir figure 1.3 a). *F. angustifolia* apparaît aussi comme ayant une diversité génétique plus faible que *F. excelsior*, de même que *F. ornus*, qui ne montre pas d'indices d'hybridation. *F. ornus* ne possède de plus aucun haplotype commun avec *F. excelsior* et *F. angustifolia* (voir figure 1.3 c et d). Ceci est logique, car *F. ornus* appartient à la section *Ornus* (entomophilie), et possède un système de reproduction différent de celui qui est commun à la section *Fraxinus* (anémophilie). Les trois espèces présentent des patrons d'isolement par la distance (Heuertz *et al.*, 2006), conséquence de la forte structure géographique des données. L'impact de la phylogénie d'haplotypes (voir

figure 1.3 d) sur la distribution géographique est faible et aucun signal phylogéographique n'a été détecté dans les trois espèces, probablement à cause des taux de fixations observés (assez élevés) combiné avec la faible résolution des haplotypes (Heuertz *et al.*, 2006).

L'hybridation largement étudiée (Jeandroz *et al.*, 1995; Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006; Gérard *et al.*, 2006a) apparaît comme potentiellement restreinte à certaines zones climatiques particulières, comme les vallées fluviales (Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006; Gérard *et al.*, 2006a), mais également au niveau temporel (Gérard *et al.*, 2006b).

Des patrons d'hybridation différentiels au niveau génétique et morphologique ont été montrés dans les grandes vallées fluviales, les patrons morphologiques d'hybridations étant absents dans certaines vallées (Saône), où l'introgression morphologique n'est pas encore observée, alors que dans la Loire, les individus hybrides le sont à la fois du point de vue

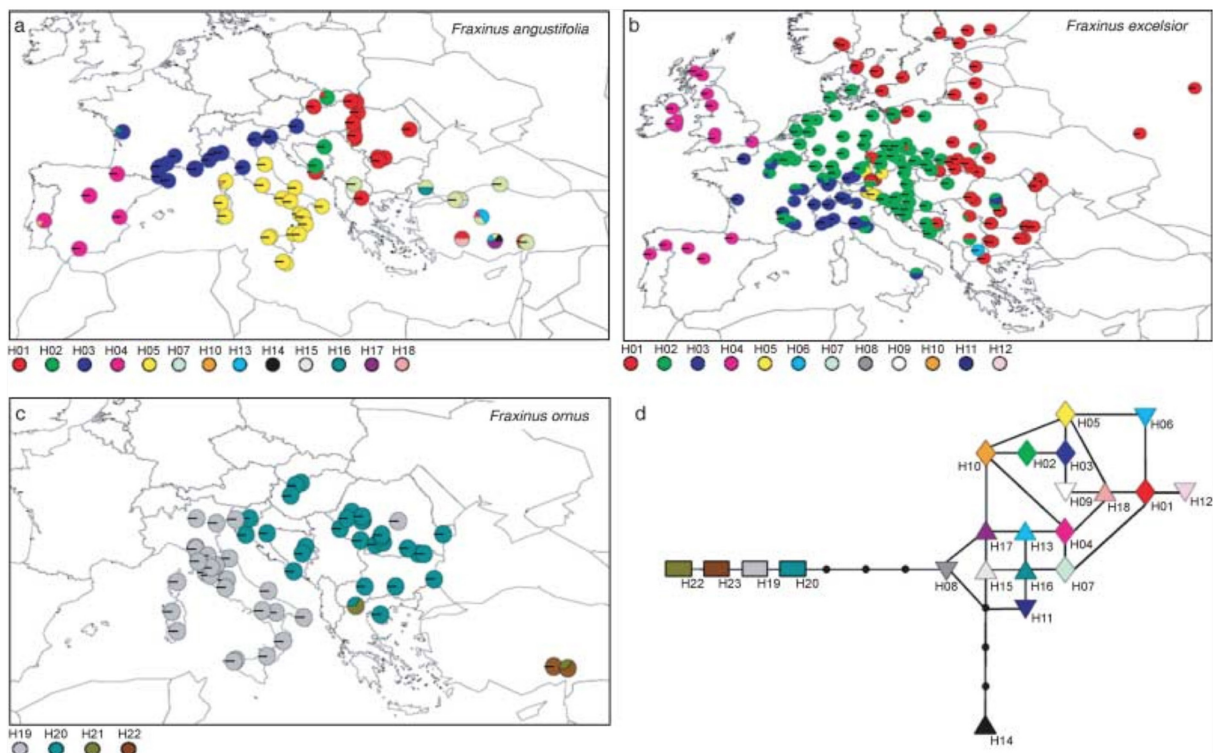


Figure 1.3. Distribution géographique et fréquences des haplotypes microsatellites chloroplastiques chez (a) *F. angustifolia*, (b) *F. excelsior* (d'après Heuertz *et al.* 2004) et (c) *F. Ornus*, et (d) Réseau de parcimonie statistique représentant le nombre minimum de différences de longueur entre les haplotypes (□*F. ornus*, ▽*F. excelsior*, △*F. angustifolia*, ◇ partagé entre *F. excelsior* et *F. angustifolia*). D'après Heuertz *et al.* (2006).

génétique et morphologique (Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006). Cette dernière étude montre également que les individus hybrides présents sur la Loire sont plus proches génétiquement

des individus de *F. angustifolia* témoins échantillonnés dans le sud de la France, alors que les individus de la Saône présentent une affinité génétique plus marquée avec les individus témoins de *F. excelsior*. Une corrélation négative entre les températures d'hiver et la proportion de génotype de type *F. angustifolia* est également marquée, suggérant le climat comme facteur limitant dans l'extension de *F. angustifolia* vers le nord de la France. La vallée de la Loire, possédant un climat intermédiaire, représente un terrain favorable pour l'hybridation entre *F. excelsior* et *F. angustifolia*, alors que le climat plus contrasté observé dans la vallée de la Saône prévient l'introgression morphologique de *F. angustifolia* dans les génomes des individus de populations de *F. excelsior*. Il est intéressant de noter que même dans les populations témoins, des traces d'hybridations peuvent être détectées, chaque espèce intervenant pour environ 20% du génome de l'autre espèce (Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006). Ceci pourrait être dû au chevauchement observé entre les phénologies des deux espèces, par exemple à Saint-Dyé, sur la Loire (Gérard *et al.*, 2006b). La morphologie est significativement liée à la phénologie observée, ce qui laisse à penser que la phénologie pourrait être utilisée comme critère de différenciation entre les deux espèces. Les individus fleurissant à des dates intermédiaires (potentiellement hybrides) produisent en moyenne plus de fleurs et de fruits que les individus ayant des phénologies contrastées (Gérard *et al.*, 2006b). Cette surproduction de fruits permettrait aux hybrides fleurissant le plus tôt d'être plus efficaces et d'avoir un meilleur succès reproducteur mâle (Gérard *et al.*, 2006a). Ce meilleur succès reproducteur aurait *in fine* comme conséquence de favoriser l'introgression de *F. angustifolia* (fleurissant tôt – Décembre/Janvier) dans les génomes de *F. excelsior* (fleurissant plus tard – Mars/Avril). Les auteurs concluent sur l'impact que pourraient avoir les changements climatiques et les hivers plus doux en France sur l'hybridation de ces deux espèces, en favorisant les individus fleurissant le plus tôt, comme donneurs de pollen (Gérard *et al.*, 2006a).

Tableau 1.5. Classification du genre *Fraxinus* selon Wallander (2008).

Section	Espèces	Synonymes les plus communs	Distribution
Dipetalae	<i>anomala</i> Torr. ex S. Wats.	<i>lowellii</i> Sarg., <i>potosina</i> T. S. Brandeg.	W USA
	<i>dipetala</i> Hook. et Arn.	<i>jonesii</i> Lingelsh., <i>trifoliata</i> (Torr.) Lewis & Epling, <i>parryi</i> Moran	SW USA, Mexique (Baja, Californie)
	<i>quadrangulata</i> Michx.		E & C USA, C Canada
Ornus	<i>apertisquamifera</i> Hara		Japon
	<i>bungeana</i> DC		Chine
	<i>floribunda</i> Wall.	<i>insularis</i> Hemsl., <i>odontocalyx</i> Handel-Mazzetti ex E. Peter, <i>retusa</i> Champ. ex Benth.	C & E Asie (de l'Afghanistan au Japon)
	<i>griffithii</i> G. B. Clarke	<i>bracteata</i> Hemsley, <i>eedenii</i> Boerl. & Koord., <i>ferruginea</i> Lingelsh., <i>formosana</i> Hayata, <i>philippinensis</i> Merr.	E Asie (du NE de l'Inde au Japon et Indonésie)
	<i>lanuginosa</i> Koidz. var. <i>lanuginosa</i> and var. <i>serrata</i> (Nakai) Hara		Japon
	<i>malacophylla</i> Hemsl.	<i>retusifoliolata</i> Feng ex P. Y. Bai	Chine, Thaïlande
	<i>ornus</i> L.		Méditerranée, N Afrique and SW Asie
	<i>paxiana</i> Lingelsh.	<i>depauperata</i> (Lingelsh.) Z. Wei, <i>sikkimensis</i> (Lingelsh.) Handel-Mazzetti, <i>suaveolens</i> W. W. Smith	Himalaya, Chine
	<i>raibocarpa</i> Regel		C Asie (Turkistan, Iran, Pakistan, Afghanistan)
	<i>sieboldiana</i> Blume	<i>mariesii</i> Hook. f.	Chine, Japon, Corée
	<i>trifoliolata</i> W. W. Smith	<i>punctata</i> S. Y. Hu	Chine
	<i>baroniana</i> Diels		Chine
<i>chinensis</i> Roxb.	<i>caudata</i> J. L. Wu, <i>lingelseheimii</i> Rehder, <i>japonica</i> Blume ex K. Koch, <i>medicinalis</i> S. S. Sun, <i>rhynchophylla</i> Hance, <i>sargentiana</i> Lingelsh., <i>szaboana</i> Lingelsh., <i>yunnanensis</i> Lingelsh.	Chine, Japon, Corée, Vietnam	
<i>longicuspis</i> Sieb. & Zucc.	<i>borealis</i> Nakai, <i>pubinervis</i> Blume	Japon	
<i>micrantha</i> Lingelsh.		C Asie (du Punjab au Népal, Himalaya)	
<i>Fraxinus</i>	<i>angustifolia</i> Vahl. ssp. <i>angustifolia</i>	<i>ratundifolia</i> Mill. (nom. rejected), <i>parvifolia</i> Lam. (nom. illegit.) <i>oxyphylla</i> ssp. <i>angustifolia</i> (Vahl) P. Fourn., <i>oxycarpa</i> Willd. var. <i>angustifolia</i> (Vahl) Lingelsh., <i>excelsior</i> L. ssp. <i>excelsior</i> var. <i>angustifolia</i> (Vahl) Fiori & Paol.	SW Europe
	<i>angustifolia</i> Vahl. ssp. <i>oxycarpa</i> (M.Bieb. ex Willd.) Franco & Rocha Afonso	<i>oxycarpa</i> Willd., <i>oxyphylla</i> M. Bieb. (nom. illeg.), <i>pallisiata</i> A. J. Willmott, <i>pojarkoviana</i> V.N.Vassil.	SE Europe
	<i>angustifolia</i> Vahl. ssp. <i>syriaca</i> (Boiss.) Yalt.	<i>syriaca</i> Boiss., <i>oxycarpa</i> Willd. var. <i>syriaca</i> (Boiss.) Yalt., <i>potamophila</i> Herder, <i>regelii</i> Dippel, <i>sogdiana</i> Bunge	W & E Asie (De la Turquie au Pakistan et à la Russie) and Algérie
	<i>excelsior</i> L.		C & N Europe
	<i>mandshurica</i> Rupr.	<i>nigra</i> ssp. <i>mandshurica</i> (Rupr.) S. S. Sun, <i>mandshurica</i> Rupr. var. <i>japonica</i> Maxim.	E Asie (Chine, Japon, Corée, E Russie)
<i>nigra</i> Marsh.	<i>sambucifolia</i> Lam.	E USA, E Canada	
<i>platypoda</i> Oliv.			
Melioides	<i>americana</i> L.	<i>bilmoreana</i> Beadle	E USA, E Canada
	<i>berlandieriana</i> A. DC.		SW USA, NE Mexique
	<i>caroliniana</i> Mill.	<i>cubensis</i> Griseb., <i>pauciflora</i> Nutt., <i>hybrida</i> Lingelsh., <i>floridana</i> (Wenzig) Sarg.	SE USA
	<i>latifolia</i> Benth.	<i>oregona</i> Nutt.	W USA
	<i>papillosa</i> Lingelsh.		SW USA (SE Arizona, SW Nouveau-Mexique, Texas), Mexique (W Chihuahua, NE Sonora)
	<i>pennsylvanica</i> Marsh.	<i>lanceolata</i> Borkh.	C & E USA, Canada
<i>profunda</i> (Bush) Bush	<i>tomentosa</i> Michx. f., <i>michauxii</i> Britt.	E USA	
<i>texasensis</i> A. Gray			
<i>uhdei</i> (Wenzig) Lingelsh.	<i>americana</i> L. var. <i>uhdei</i> , <i>cavekiana</i> Standley & Steyererm., <i>chiapensis</i> Lundell, <i>hondurensis</i> Standley	Guatemala, Honduras, Mexique, USA (Hawaii, Porto Rico)	
<i>velutina</i> Torr.	<i>toumeyii</i> Britton, <i>standleyi</i> Rehder	SW USA, N Mexique	
Pauciflorae	<i>dubia</i> (Willd. ex Schult & Schult f.) P. S. Green & M. Nee	<i>schiedeana</i> Schlecht. & Cham., <i>petenensis</i> Lundell	Mexique, Guatemala
	<i>gooddingii</i> Little		SW USA (Arizona), N Mexique
	<i>greggii</i> A. Gray	<i>schiedeana</i> var. <i>parviflora</i> Torr., <i>nummularis</i> M. E. Jones	SW USA, Mexique
	<i>purpusii</i> Brandege	<i>vellerea</i> Standley & Steyererm., <i>bicolor</i> Standley & Steyererm.	Mexique, Guatemala
	<i>rufescens</i> Lingelsh.		Mexique
Sciadhanthus	<i>xanthoxyloides</i> (G. Don) DC.	<i>dimorpha</i> Coss. & Dur.	N Africa (Algérie, Maroc) à l'Asie (de l'Afghanistan à la Chine)
	<i>hubeiensis</i> S. Z. Qu, C. B. Shang & P. L. Su		Chine
incertae sedis	<i>cuspidata</i> Torr.	<i>macropetala</i> Eastw.	SW USA, Mexique
	<i>chiisanensis</i> Nakai		Corée
	<i>spaethiana</i> Lingelsh.		Japon

1.5 Contexte et problématique

Dans le contexte actuel d'érosion de la biodiversité, mieux connaître les espèces qui nous entourent est indispensable. Il est désormais évident qu'un grand nombre d'espèces disparaissent rapidement (en 2004, plus de 3000 espèces ont été ajoutées à la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature, soit une espèce de mammifère sur quatre, une espèce d'amphibien sur trois et une espèce d'oiseau sur huit). Il est donc nécessaire de déterminer précisément un nombre d'espèces dans les différents groupes d'intérêts, mais également de mieux connaître les délimitations, la répartition et la diversité génétique des espèces dans ces groupes. C'est dans ce contexte que se place l'initiative du « Consortium for the Barcode of Life » (CBOL), visant à créer et maintenir une base de données regroupant les séquences d'une portion d'un gène standard (*CoxI*), du génome mitochondrial pour l'ensemble des animaux.

Le code-barre moléculaire basé sur la région *CoxI*, initialement proposé par Hebert *et al.* (2003), a trouvé des applications réussies dans plusieurs groupes taxonomiques (Hebert *et al.*, 2004; Hogg et Hebert, 2004; Ward *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006; Kerr *et al.*, 2007; Tavares et Baker, 2008; Lukhtanov *et al.*, 2009), mais se montre inefficace pour différencier les espèces de plantes, à cause de taux de divergence bien plus faibles chez les plantes pour l'ensemble du génome mitochondrial (Laroche *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2004). Les auteurs se sont donc tournés vers les régions du génome chloroplastique, réputées suffisamment variables (Shaw *et al.*, 2007). Plusieurs protocoles basés sur des séquences d'ADN chloroplastique ont été proposés (Newmaster *et al.*, 2006; Chase *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2007; Kress et Erickson, 2007; Fazekas *et al.*, 2008; CBOL Plant Working Group, 2009; Ford *et al.*, 2009; Hollingsworth *et al.*, 2009), certains testés (Sass *et al.*, 2007; Newmaster *et al.*, 2008; Newmaster et Ragupathy, 2009; Ragupathy *et al.*, 2009; Starr *et al.*, 2009; Van de Wiel *et al.*, 2009) avec plus ou moins de succès, mais peu d'évaluations de ces protocoles ont été réalisées, et encore moins sur des groupes d'espèces comprenant des arbres. Si cette dichotomie entre « arbres » et « herbacées » peut paraître triviale, il faut rappeler qu'être un arbre entraîne certaines conséquences évolutives, notamment des taux de spéciation particulièrement bas et des divergences génétiques interspécifiques plus faibles (en considérant une même échelle temporelle et taxonomique) que chez des espèces herbacées (Petit et Hampe, 2006).

La principale lacune des méthodes et protocoles proposés dans le cadre du projet Barcode of Life est qu'ils ne prennent pas en compte l'histoire évolutive des espèces étudiées. L'approche par code-barre moléculaire, basée sur des régions de l'ADN mitochondrial ou chloroplastique, ne saurait rendre compte des phénomènes d'hybridations et de l'histoire complexe que l'on peut observer dans certains groupes, et ne permet donc que d'avoir une image actuelle des divergences inter- et intra- spécifiques. Cette approche généraliste, visant à mesurer la magnitude de la biodiversité doit nécessairement être mise en œuvre rapidement, d'abord en raison de l'érosion de biodiversité citée ci-dessus, mais également à cause des changements climatiques globaux, qui modifieront sans doute à la fois la quantité (nombre de taxons) et la qualité (répartition des espèces, assemblages écologiques) de la biodiversité observable aujourd'hui. Elle doit donc également être couplée avec des méthodes tenant compte de l'évolution des taxons.

Une connaissance fine de l'évolution passée des espèces d'intérêt pourrait permettre de mieux prévoir leurs réactions aux changements climatiques futurs, à la fois par l'étude de leur préférences écologiques passées (et donc de leur capacité de modifications de cette niche écologique), mais aussi l'étude des phénomènes ayant potentiellement augmenté ou diminué leurs capacités d'adaptation. Parmi ces phénomènes affectant les populations très étendues et importantes en nombre d'individus (Brown *et al.*, 2004; Bouillé et Bousquet, 2005), on peut citer les évènements démographiques comme les expansions ou contractions de populations, liés à des évènements climatiques (glaciations, réchauffements, etc.) et géologiques (orogénèse, dérive des continents). Les évènements climatiques sont particulièrement intéressants en ce sens, puisque la Terre a connu de nombreux cycles glaciaires et de réchauffements, particulièrement durant le Pléistocène. La spéciation allopatrique, selon laquelle deux espèces divergent génétiquement l'une de l'autre par isolement géographique suite à l'un des évènements mentionnés ci-dessus, est généralement invoquée pour expliquer la diversité observée dans certains genres de plantes. Bien que des cas de spéciation par hybridation aient été observés (voir ci-dessus) et quelques cas observés de « progenitor-derivative species » liés aux variations passées du climat (revue dans Perron *et al.*, 2000), peu d'études se basant sur des données moléculaires s'intéressent aux facteurs ayant pu influencer les évènements de spéciation chez les arbres.

1.6 Objectifs de la thèse

L'augmentation de la quantité de données taxonomiques et un besoin pour les non-spécialistes d'identifier rapidement et simplement les produits issus d'organismes vivants rendent nécessaire le développement de méthodes standardisées de taxonomie. Les méthodes moléculaires permettent d'atteindre le débit et la standardisation tout en permettant un stockage et un partage relativement simple de l'information. Certaines méthodes, comme celle du Consortium for the Barcode of Life (CBOL), supposent une universalité pour tous les groupes étudiés. Le genre *Fraxinus* présentant un intérêt économique et écologique important, il est nécessaire de tester l'efficacité de méthode standardisée d'identification moléculaire au niveau spécifique dans le genre. Le premier axe de cette thèse, correspondant au second chapitre, visait donc à tester un protocole standardisé de code-barre moléculaire dans le genre *Fraxinus*, et d'évaluer la variabilité génétique de régions du génome chloroplastique dans le cadre de ce protocole.

L'étude des relations entre les espèces et les groupes d'espèces (sections taxonomiques) du genre *Fraxinus* permettrait également de mieux comprendre l'évolution de certains caractères, comme la morphologie florale ou les préférences écologiques liées aux aires de répartition. Toutefois, les incertitudes liées à ces études ne peuvent être maîtrisées que si elles sont basées sur une phylogénie robuste et fiable du genre *Fraxinus*. En effet, l'hybridation ou l'évolution réticulée entre espèces à l'intérieur d'un genre a pu aboutir à une histoire des espèces différente de l'histoire d'une région du génome en particulier. Afin d'éviter cet écueil, il est nécessaire d'étudier plusieurs régions du génome nucléaire et du génome chloroplastique, afin de pouvoir déterminer les patrons résultant de l'évolution des espèces de ceux provenant de l'évolution d'une région génétique en particulier. Les phylogénies existantes (Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008), basées sur le séquençage des espaceurs internes transcrits (nITS) sont donc dépendantes de l'évolution de cette région intergénique, généralement congruente avec le reste du génome lorsque d'autres régions sont analysées simultanément à l'échelle d'un genre (Gielly *et al.*, 1996; Baldwin et Markos, 1998; Downie *et al.*, 1998; Huang et Shi, 2002). La seconde étude de ce manuscrit, constituant le troisième chapitre, avait donc pour but de produire une phylogénie fiable et robuste du genre *Fraxinus* basée sur plusieurs loci nucléaires et chloroplastiques, permettant d'inférer l'histoire biogéographique du genre entier.

Toutefois, à l'échelle de paires d'espèces, où l'hybridation est plus fréquente et joue un rôle évolutif important (Rieseberg, 1995), il convient d'étudier plusieurs régions du génome, et d'inclure plusieurs individus afin de minimiser les impacts des hybrides potentiels. Ainsi, à l'intérieur de la section *Fraxinus*, *F. excelsior* et *F. angustifolia* sont connues pour s'hybrider naturellement (Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006; Gérard *et al.*, 2006a). Pour clarifier les relations de parentés et l'histoire évolutive de ces espèces, il est nécessaire de prendre en compte une échelle spatiale (échantillonnage) et temporelle (choix des marqueurs, datations moléculaires) plus large que les phylogénies (Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008) et phylogéographies déjà publiées (Heuertz *et al.*, 2006). C'est pourquoi la troisième étude de cette thèse, correspondant au quatrième chapitre, a consisté en l'étude des réticulations et hybridations potentielles entre les espèces de la section *Fraxinus*, ainsi qu'en l'inférence de l'histoire biogéographique de la section.

1.7 Références

- Abrams, M.D., Kubiske, M.E., Steiner, K.C., 1990. Drought adaptations and responses in five genotypes of *Fraxinus pennsylvanica* Marsh.: photosynthesis, water relations and leaf morphology. *Tree Physiology* 6, 305-315.
- Alice, L.A., Campbell, C.S., 1999. Phylogeny of *Rubus* (rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany* 86, 81-97.
- Allainguillaume, J., Alexander, M., Bullock, J.M., Saunders, M., Allender, C.J., King, G., Ford, C.S., Wilkinson, M.J., 2006. Fitness of hybrids between rapeseed (*Brassica napus*) and wild *Brassica rapa* in natural habitats. *Molecular Ecology* 15, 1175-1184.
- Anderson, E., 1949. *Introgressive Hybridization*. John Wiley & Sons, inc., New-York.
- Ar-Rushdi, A.H., 1957. The Cytogenetics of variegation in a species hybrid in *Nicotiana*. *Genetics* 42, 312-325.
- Arnold, M.L., 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Arnold, M.L., Buckner, C.M., Robinson, J.J., 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1398-1402.
- Baack, E.J., Whitney, K.D., Rieseberg, L.H., 2005. Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. *New Phytologist* 167, 623-630.
- Bacles, C.F., Burczyk, J., Lowe, A.J., Ennos, R.A., 2005. Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. *Evolution* 59, 979-990.
- Baldwin, B.G., Markos, S., 1998. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (nETS) of 18S-26S rDNA: congruence of nETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10, 449-463.
- Banfer, G., Moog, U., Fiala, B., Mohamed, M., Weising, K., Blattner, F.R., 2006. A chloroplast genealogy of myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae) in Southeast Asia reveals hybridization, vicariance and long-distance dispersals. *Molecular Ecology* 15, 4409-4424.
- Bouillé, M., Bousquet, J., 2005. Trans-species shared polymorphisms at orthologous nuclear gene loci among distant species in the conifer *Picea* (Pinaceae): implications for the long-term maintenance of genetic diversity in trees. *American Journal of Botany* 92, 63-73.
- Brown, G.R., Gill, G.P., Kuntz, R.J., Langley, C.H., Neale, D.B., 2004. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15255-15260.
- Burke, J.L., Bain, J.F., 2008. The origins of *Erigeron trifidus* (Asteraceae), an agamosperous rare species in Alberta. *Botany* 86, 866-876.
- Bush, G.L., 1975. Modes of animal speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 6, 339-364.
- Call, V.B., Dilcher, D.L., 1992. Investigations of angiosperms from the Eocene of southeastern North America: samaras of *Fraxinus wilcoxiana* Berry. *Review of Palaeobotanic and Palynology* 74, 249-266.
- Carney, S.E., Gardner, K.A., Rieseberg, L.H., 2000. Evolutionary changes over the fifty-year history of a hybrid population of sunflowers (*Helianthus*). *Evolution* 54, 462-474.

- CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12794-12797.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., van den Berg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L., Wilkinson, M., 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56, 295-299.
- Chase, M.W., Knapp, S., Cox, A.V., Clarkson, J.J., Butsko, Y., Joseph, J., Savolainen, V., Parokony, A.S., 2003. Molecular systematics, *gish* and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany* 92, 107-127.
- Cho, Y., Mower, J.P., Qiu, Y.L., Palmer, J.D., 2004. Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17741-17746.
- Choler, P., Erschbamer, B., Tribsch, A., Gielly, L., Taberlet, P., 2004. Genetic introgression as a potential to widen a species' niche: insights from alpine *Carex curvula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 171-176.
- Clausen, R.E., Goodspeed, T.H., 1925. Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. a tetraploid *glutinosa-tabacum* hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. *Genetics* 10, 278-284.
- Cook, L.G., Morris, D.C., Edwards, R.D., Crisp, M.D., 2008. Reticulate evolution in the natural range of the invasive wetland tree species *Melaleuca quinquenervia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, 506-522.
- Dacasa, R., dinger, M.C., Glaeser, J., Hebel, I., Dounavi, A., 2008. Genetic structures of common ash (*Fraxinus excelsior*) populations in Germany at sites differing in water regimes. *Canadian Journal of Forest Research* 38, 1199-1210.
- Daly, K., Robson, D.S., 1969. Estimates of genetic parameters from a hybrid derivative in *Nicotiana*. *Genetics* 62, 201-213.
- De Queiroz, K., 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. In: Howard, D.J., Berlocher, S.H. (Eds.), *Endless forms. Species and Speciation*. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 57-75.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56, 879 - 886.
- Downie, S.R., Ramanath, S., Katz-Downie, D.S., Llanas, E., 1998. Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoC1* intron sequences. *American Journal of Botany* 85, 563-591.
- Doyle, J.J., 1992. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Systematic Botany* 17, 144-163.
- Edelist, C., Lexer, C., Dillmann, C., Sicard, D., Rieseberg, L.H., 2006. Microsatellite signature of ecological selection for salt tolerance in a wild sunflower hybrid species, *Helianthus paradoxus*. *Molecular Ecology* 15, 4623-4634.
- Evans, K.M., Wortley, A.H., Mann, D.G., 2007. An assessment of potential diatom "barcode" genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist* 158, 349-364.
- Fawcett, J.A., Maere, S., Van de Peer, Y., 2009. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5737-5742.
- Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M., Barrett, S.C., 2008. Multiple multilocus DNA

- barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS One* 3, e2802.
- Fehrer, J., Gemeinholzer, B., Chrtek Jr, J., Bräutigam, S., 2007. Incongruent plastid and nuclear DNA phylogenies reveal ancient intergeneric hybridization in *Pilosella* hawkweeds (*Hieracium*, Cichorieae, Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42, 347-361.
- Ferguson, C.J., Jansen, R.K., 2002. A chloroplast DNA phylogeny of eastern *Phlox* (Polemoniaceae): implications of congruence and incongruence with the ITS phylogeny. *American Journal of Botany* 89, 1324-1335.
- Fernandez-Manjarres, J.F., Gérard, P.R., Dufour, J., Raquin, C., Frascaria-Lacoste, N., 2006a. Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl (Oleaceae) in eastern and western France. *Molecular Ecology* 15, 3245-3257.
- Ferrazzini, D., Monteleone, I., Belletti, P., 2007. Genetic variability and divergence among Italian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Annals of Forest Science* 64, 159-168.
- Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., Stahl, J.V., Kelly, L.J., Wikstrom, N., Hollingsworth, P.M., Duff, R.J., Hoot, S.B., Cowan, R.S., Chase, M.W., Wilkinson, M.J., 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159, 1-11.
- Franzke, A., Mummenhoff, K., 1999. Recent hybrid speciation in *Cardamine* (Brassicaceae) – conversion of nuclear ribosomal ITS sequences in *statu nascenti*. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 831-834.
- Gao, W., Chen, Z.J., Yu, J.Z., Raska, D., Kohel, R.J., Womack, J.E., Stelly, D.M., 2004. Wide-cross whole-genome radiation hybrid mapping of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genetics* 167, 1317-1329.
- Gao, Y.H., Zhu, S.J., Ji, D.F., 2005. Studies on the cytological characters of the interspecific hybrid F1 among the cultivated species in *Gossypium* and their genetic relationship. *Yi Chuan Xue Bao* 32, 744-752 (in Chinese).
- Gérard, P., Klein, E., Austerlitz, F., Fernandez-Manjarres, J., Frascaria-Lacoste, N., 2006a. Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. *BMC Evolutionary Biology* 6, 96.
- Gérard, P.R., Fernandez-Manjarres, J.F., Frascaria-Lacoste, N., 2006b. Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Molecular Ecology* 15, 3655-3667.
- Ghiselin, M.T., 1974. A radical solution to the species problem. *Systematic Zoology* 23, 536-544.
- Gielly, L., Yuan, Y.M., Kupfer, P., Taberlet, P., 1996. Phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: chloroplast *trnL* (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5, 460-466.
- Gobert, V., Moja, S., Colson, M., Taberlet, P., 2002. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *American Journal of Botany* 89, 2017-2023.
- Gomes, A.R., Kozlowski, T.T., 1980. Growth responses and adaptations of *Fraxinus pennsylvanica* seedlings to flooding. *Plant Physiology* 66, 267-271.
- Goto, S., Shimatani, K., Yoshimaru, H., Takahashi, Y., 2006. Fat-tailed gene flow in the dioecious canopy tree species *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* 15, 2985-2996.

- Grant, P.R., Grant, B.R., 1996. Speciation and hybridization in island birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 351, 765-772.
- Grant, V., 1981. *Plant Speciation*, New York.
- Gradstein, F.M., Ogg, J.G., Smith A.G., 2004. A Geologic Time Scale 2004. *Lethaia* 37, 175-181.
- Gross, B.L., Turner, K.G., Rieseberg, L.H., 2007. Selective sweeps in the homoploid hybrid species *Helianthus deserticola*: evolution in concert across populations and across origins. *Molecular Ecology* 16, 5246-5258.
- Guo, X.S., Zhang, Y.Z., 1983. [HPLC separation and determination of active constituents of Qin Pi (*Fraxinus chinensis*)]. *Yao Xue Xue Bao* 18, 525-528.
- Hagen, G.L., Gunckel, J.E., 1958. Free amino acid levels in *Nicotiana glauca*, *N. Langsdorffii* and their interspecific hybrid following gamma irradiation. *Plant Physiology* 33, 439-443.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 968-971.
- Hao, L., Song, G.L., Li, B.L., Wang, K.B., Wang, C.Y., Li, X., 2006. Karyotype analysis of *Gossypium arboreum* x *G. bickii* by genome in situ hybridization. *Yi Chuan Xue Bao* 33, 565-572.
- Harbourne, M.E., Douglas, G.C., Waldren, S., Hodgkinson, T.R., 2005. Characterization and primer development for amplification of chloroplast microsatellite regions of *Fraxinus excelsior*. *Journal of Plant Resources* 118, 339-341.
- Hardig, T.M., Soltis, P.S., Soltis, D.E., 2000. Diversification of the North American shrub genus *Ceanothus* (Rhamnaceae): conflicting phylogenies from nuclear ribosomal DNA and chloroplast DNA. *American Journal of Botany* 87, 108-123.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14812-14817.
- Hegarty, M.J., Jones, J.M., Wilson, I.D., Barker, G.L., Coghill, J.A., Sanchez-Baracaldo, P., Liu, G., Buggs, R.J., Abbott, R.J., Edwards, K.J., Hiscock, S.J., 2005. Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the *Senecio* floral transcriptome during hybrid speciation. *Molecular Ecology* 14, 2493-2510.
- Heuertz, M., Carnevale, S., Fineschi, S., Sebastiani, F., Hausman, J.F., Paule, L., Vendramin, G.G., 2006. Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp. (Oleaceae): roles of hybridization and life history traits. *Molecular Ecology* 15, 2131-2140.
- Heuertz, M., Fineschi, S., Anzidei, M., Pastorelli, R., Salvini, D., Paule, L., Frascaria-Lacoste, N., Hardy, O.J., Vekemans, X., Vendramin, G.G., 2004a. Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology* 13, 3437-3452.
- Heuertz, M., Hausman, J.F., Hardy, O.J., Vendramin, G.G., Frascaria-Lacoste, N., Vekemans, X., 2004b. 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., Hausman, J.F., Tsvetkov, I., Frascaria-Lacoste, N., Vekemans, X., 2001. Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Molecular Ecology* 10, 1615-1623.
- Hogg, I.D., Hebert, P.D.N., 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda : Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 82, 749-754.
- Hollingsworth, M.L., Clark, A.A., Forrest, L.L., Richardson, J., Pennington, R.T., Long, D.G., Cowan, R., Chase, M.W., Gaudeul, M., Hollingsworth, P.M., 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources* 9, 439-457.
- Höltken, A.M., Tähtinen, J., Pappinen, A., 2003. Effects of discontinuous marginal habitats on the genetic structure of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Silvae genetica* 52, 206-212.
- Hsiang, C.Y., Hsieh, C.L., Wu, S.L., Lai, I.L., Ho, T.Y., 2001. Inhibitory effect of anti-pyretic and anti-inflammatory herbs on herpes simplex virus replication. *The American journal of Chinese medicine* 29, 459-467.
- Hu, L.J., Uchiyama, K., Shen, H.L., Saito, Y., Tsuda, Y., Ide, Y., 2008. Nuclear DNA microsatellites reveal genetic variation but a lack of phylogeographical structure in an endangered species, *Fraxinus mandshurica*, across North-east China. *Annals of Botany (Lond)* 102, 195-205.
- Huang, Y.-l., Shi, S.-h., 2002. Phylogenetics of Lythraceae sensu lato: a preliminary analysis based on chloroplast *rbcL* gene, *psaA-ycf3* spacer, and nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. *International Journal of Plant Sciences* 163, 215-225.
- Huntley, B., Birks, H.J.B., 1983. *An Atlas of Past and Present Pollen Maps for Europe: 0-13 000 Years Ago*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jeandroz, G., Faivre-Rampant, F., Pugin, A., Bousquet, J., Bervillé, A., 1995. Organization of nuclear ribosomal DNA and species-specific polymorphism in closely related *Fraxinus excelsior* and *F. oxyphylla*. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 885-892.
- Jeandroz, S., Pugin, A., Bervillé, A., 1996. Cloning and analysis of a 6.8-kb rDNA intergenic spacer region of the European ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 92, 1003-1008.
- Jeandroz, S., Roy, A., Bousquet, J., 1997. Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7, 241-251.
- Kawakita, A., Sota, T., Ito, M., Ascher, J.S., Tanaka, H., Kato, M., Roubik, D.W., 2004. Phylogeny, historical biogeography, and character evolution in bumble bees (*Bombus*: Apidae) based on simultaneous analysis of three nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31, 799-804.
- Kelly, L.J., Leitch, A.R., Clarkson, J.J., Hunter, R.B., Knapp, S., Chase, M.W., 2009. Intragenic recombination events and evidence for hybrid speciation in *Nicotiana* (Solanaceae). *Molecular Biology and Evolution*, DOI 10.1093/molbev/msp267.
- Kerr, K.C., Stoeckle, M.Y., Dove, C.J., Weigt, L.A., Francis, C.M., Hebert, P.D., 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* 7, 535-543.
- Kress, W.J., Erickson, D.L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One* 2, e508.
- Lacape, J.M., Nguyen, T.B., Thibivilliers, S., Bojinov, B., Courtois, B., Cantrell, R.G., Burr, B., Hau, B., 2003. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a

- Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome* 46, 612-626.
- Lammerts, W., 1929. Interspecific Hybridization in *Nicotiana*. IX. Further studies of the cytology of the backcross progenies of the *paniculata-rustica* hybrid. *Genetics* 14, 286-304.
- Lammerts, W.E., 1931. Interspecific hybridization in *Nicotiana*. Xii. the amphidiploid *rustica-paniculata* hybrid; its origin and cytogenetic behavior. *Genetics* 16, 191-211.
- Laroche, J., Li, P., Maggia, L., Bousquet, J., 1997. Molecular evolution of angiosperm mitochondrial introns and exons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5722-5727.
- Lee, B.C., Lee, S.Y., Lee, H.J., Sim, G.S., Kim, J.H., Cho, Y.H., Lee, D.H., Pyo, H.B., Choe, T.B., Moon, D.C., Yun, Y.P., Hong, J.T., 2007. Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*. *Archives of pharmacal research* 30, 1293-1301.
- Lee, M.S.Y., 2003. Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *Journal of Evolutionary Biology* 16, 179-188.
- Levin, D.A., 1979. The nature of plant species. *Science* 204, 381-384.
- Levin, D.A., 1984. Immigration in plants: an exercise in the subjunctive. In: Dirzo, R., Sarukhan, J. (Eds.), *Perspectives on Plant Population Ecology*, Sunderland, MA, pp. 242-260.
- Lexer, C., Welch, M.E., Durphy, J.L., Rieseberg, L.H., 2003a. Natural selection for salt tolerance quantitative trait loci (QTLs) in wild sunflower hybrids: implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *Molecular Ecology* 12, 1225-1235.
- Lexer, C., Welch, M.E., Raymond, O., Rieseberg, L.H., 2003b. The origin of ecological divergence in *Helianthus paradoxus* (Asteraceae): selection on transgressive characters in a novel hybrid habitat. *Evolution* 57, 1989-2000.
- Lihova, J., Shimizu, K.K., Marhold, K., 2006. Allopolyploid origin of *Cardamine asarifolia* (Brassicaceae): incongruence between plastid and nuclear ribosomal DNA sequences solved by a single-copy nuclear gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39, 759-786.
- Lingelsheim, A., 1920. Oleaceae–Oleoideae–Fraxineae. In: Engler, A. (Ed.), *Das Pflanzenreich* IV, pp. 1–61.
- Ludwig, F., Rosenthal, D.M., Johnston, J.A., Kane, N., Gross, B.L., Lexer, C., Dudley, S.A., Rieseberg, L.H., Donovan, L.A., 2004. Selection on leaf ecophysiological traits in a desert hybrid *Helianthus* species and early-generation hybrids. *Evolution* 58, 2682-2692.
- Lukhtanov, V.A., Sourakov, A., Zakharov, E.V., Hebert, P.D.N., 2009. DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. *Molecular Ecology Resources* 9, 1302-1310.
- Mallet, J., 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* 20, 229-237.
- Mallet, J., 2008. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 2971-2986.
- Mayr, E., 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New-York.
- Mayr, E., 1963. *Animals Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

- McCray, F.A., 1932. A partially fertile triple species hybrid in *Nicotiana*. *Genetics* 17, 660-673.
- Medgyesy, P., Fejes, E., Maliga, P., 1985. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 6960-6964.
- Morand-Prieur, M.E., Vedel, F., Raquin, C., Brachet, S., Sihachakr, D., Frascaria-Lacoste, N., 2002. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. *Molecular Ecology* 11, 613-617.
- Muller, J., 1981. Fossil pollen records of extant angiosperms. *The Botanical Review* 47, 1-142.
- Nelson, G., 1989. Species and taxa : systematics and evolution. In: Otte, D., Endler, J.A. (Eds.), *Speciation and its Consequences.*, Sunderland, MA., pp. 60-81.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Ragupathy, S., 2006. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 84, 335-341.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, R.A.D., Janovec, J., 2008. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources* 8, 480-490.
- Newmaster, S.G., Ragupathy, S., 2009. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae). *Molecular Ecology Resources* 9, 172-180.
- Nikolaev, E.V., 1981. The genus *Fraxinus* (Oleaceae) in the flora if the USSR. *Botanicheskii Zhurnal* 66, 1419-1432.
- Nishimoto, Y., Ohnishi, O., Hasegawa, M., 2003. Topological incongruence between nuclear and chloroplast DNA trees suggesting hybridization in the urophyllum group of the genus *Fagopyrum* (Polygonaceae). *Genes & Genetic Systems* 78, 139-153.
- O'Hanlon, P.C., Peakall, R., Briese, D.T., 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals introgression in weedy *Onopordum* thistles: hybridization and invasion. *Molecular Ecology* 8, 1239-1246.
- Okuyama, Y., Fujii, N., Wakabayashi, M., Kawakita, A., Ito, M., Watanabe, M., Murakami, N., Kato, M., 2005. Nonuniform concerted evolution and chloroplast capture: heterogeneity of observed introgression patterns in three molecular data partition phylogenies of Asian *Mitella* (saxifragaceae). *Molecular Biology and Evolution* 22, 285-296.
- Patton, J.L., Smith, M.F., 1994. Paraphyly, polyphyly, and the nature of species boundaries in pocket gophers (Genus *Thomomys*). *Systematic Biology* 43, 11-26.
- Perron, M., Bousquet, J., 1997. Natural hybridization between black spruce and red spruce. *Molecular Ecology* 6, 725-734.
- Perron, M., Perry, D.J., Andalo, C., Bousquet, J., 2000. Evidence from sequence-tagged-site markers of a recent progenitor-derivative species pair in conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11331-11336.
- Petit, R.m.J., Hampe, A., 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37, 187-214.
- Puillandre, N., Samadi, S., Boisselier, M.C., Sysoev, A.V., Kantor, Y.I., Cruaud, C., Couloux, A., Bouchet, P., 2008. Starting to unravel the toxoglossan knot: Molecular phylogeny of the "turrids" (Neogastropoda: Conoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, 1122-1134.
- Ragupathy, S., Newmaster, S.G., Murugesan, M., Balasubramaniam, V., 2009. DNA barcoding discriminates a new cryptic grass species revealed in an ethnobotany study by the hill tribes of the Western Ghats in southern India. *Molecular Ecology Resources* 9, 164-171.

- Raquin, C., Brachet, S., Jeandroz, G., Vedel, F., Frascaria-Lacoste, N., 2002. Combined analyses of microsatellite and RAPD markers demonstrate possible hybridisation between *Fraxinus excelsior*. *Forest Genetics* 9, 111-114.
- Rauscher, J.T., Doyle, J.J., Brown, A.H.D., 2002. Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex. *Molecular Ecology* 11, 2691-2702.
- Rhyne, C.L., 1962. Enhancing linkage-block breakup following interspecific hybridization and backcross transference of genes in *Gossypium hirsutum* L. *Genetics* 47, 61-69.
- Rieseberg, L.H., 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* 82, 944-953.
- Rieseberg, L.H., 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 359-389.
- Rieseberg, L.H., Brouillet, L., 1994. Are many plant species paraphyletic? *Taxon* 43, 21-32.
- Rieseberg, L.H., Burke, J.M., 2001. The biological reality of species: gene flow, selection, and collective evolution. *Taxon* 50, 47-67.
- Rieseberg, L.H., Willis, J.H., 2007. Plant speciation. *Science* 317, 910-914.
- Rieseberg, L.H., Wood, T.E., Baack, E.J., 2006. The nature of plant species. *Nature* 440, 524-527.
- Sang, T., Crawford, D.J., Stuessy, T.F., 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6813-6817.
- Sass, C., Little, D.P., Stevenson, D.W., Specht, C.D., 2007. DNA barcoding in the cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. *PLoS One* 2, e1154.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L., 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94, 275-288.
- Slade, R.W., Moritz, C., Heideman, A., 1994. Multiple nuclear-gene phylogenies: application to pinnipeds and comparison with a mitochondrial DNA gene phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 11, 341-356.
- Soltis, D.E., Kuzoff, R.K., 1995. Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the *Heuchera* group (Saxifragaceae). *Evolution* 49, 727-742.
- Spooner, D.M., Sytsma, K.J., Smith, J.F., 1991. A molecular reexamination of diploid hybrid speciation of *Solanum raphanifolium*. *Evolution* 45, 757-764.
- Starr, J.R., Naczi, R.F.C., Chouinard, B.N., 2009. Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *Molecular Ecology Resources* 9, 151-163.
- Stefanova, Z., Neychev, H., Ivanovska, N., Kostova, I., 1995. Effect of a total extract from *Fraxinus ornus* stem bark and esculin on zymosan- and carrageenan-induced paw oedema in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 101-106.
- Tavares, E.S., Baker, A.J., 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evolutionary Biology* 8, 81.
- Templeton, A.R., 1980. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics* 94, 1011-1038.
- Terry, R.G., Nowak, R.S., Tausch, R.J., 2000. Genetic variation in chloroplast and nuclear ribosomal DNA in Utah juniper (*Juniperus osteosperma*, Cupressaceae): evidence for interspecific gene flow. *American Journal of Botany* 87, 250-258.
- Ungerer, M.C., Baird, S.J., Pan, J., Rieseberg, L.H., 1998. Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11757-11762.

- Vafaie-Tabar, M., Chandrashekar, S., 2007. Meiosis in a triploid hybrid of *Gossypium*: high frequency of secondary bipolar spindles at metaphase II. *Journal of genetics* 86, 45-49.
- Van de Wiel, C.C.M., Van Der Schoot, J., Van Valkenburg, J.L.C.H., Duistermaat, H., Smulders, M.J.M., 2009. DNA barcoding discriminates the noxious invasive plant species, floating pennywort (*Hydrocotyle ranunculoides* L.f.), from non-invasive relatives. *Molecular Ecology Resources* 9, 1086-1091.
- Wallander, E., 2008. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution* 273, 25-49.
- Wallander, E., Albert, V.A., 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* 87, 1827-1841.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 360, 1847-1857.
- Welch, M.E., Rieseberg, L.H., 2002. Patterns of genetic variation suggest a single, ancient origin for the diploid hybrid species *Helianthus paradoxus*. *Evolution* 56, 2126-2137.
- Wendel, J.F., Schnabel, A., Seelanan, T., 1995. An unusual ribosomal DNA sequence from *Gossypium gossypoides* reveals ancient, cryptic, intergenomic introgression. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4, 298-313.
- White, M.J.D., 1978. *Modes of Speciation*. W.H. Freeman Ltd, San Francisco.
- Wiley, E.O., 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology* 27, 17-26.
- Winkworth, R.C., Donoghue, M.J., 2004. *Viburnum* phylogeny: evidence from the duplicated nuclear gene *gbssi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33, 109-126.
- Zhang, D.-M., Wang, L.-L., Li, J., Hu, L.-H., 2007. Two new coumarins from *Fraxinus chinensis* Rehb. *Journal of Integrative Plant Biology* 49, 218-221.
- Zhou, L., Kang, J., Fan, L., Ma, X.C., Zhao, H.Y., Han, J., Wang, B.R., Guo, D.A., 2008. Simultaneous analysis of coumarins and secoiridoids in *Cortex Fraxini* by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 47, 39-46.

2 Barcode moléculaire dans le genre *Fraxinus*

2.1 Introduction

Le code-barre moléculaire est une technique développée chez les animaux depuis 2003 (Hebert *et al.*, 2003) par le Consortium for Barcode of Life (CBOL). Il est basé sur l'analyse d'une séquence nucléotidique universelle à tout le règne animal, un fragment du gène de la Cytochrome Oxydase I (*CoxI*, *COI*), d'environ 600pb, évoluant 5 à 10 fois plus rapidement que l'ADN nucléaire (Brown *et al.*, 1979).

Partant du constat de l'érosion de la biodiversité, et plus encore de l'érosion de la population de systématiciens, il apparaît clairement que pour décrire l'ensemble de la biodiversité actuelle dans un temps raisonnable, il faut développer des méthodes d'identification rapides, fiables, et accessibles aux non-spécialistes (Hebert *et al.*, 2003). Les analyses moléculaires permettent d'utiliser des méthodes standard (PCR, séquençage, etc.), tout en permettant l'automatisation nécessaire au traitement rapide de milliers d'échantillons ; le but étant d'accélérer la découverte et la description de nouvelles espèces, que ce soit des espèces cryptiques ou dans des milieux sous-étudiés au niveau taxonomique, mais aussi de mieux connaître et comprendre les assemblages biologiques observés dans des écosystèmes extrêmement riches mais menacés (récifs coralliens, forêts tropicales, etc.).

Le principe est similaire à celui du code-barre couramment utilisé dans les supermarchés du monde entier. Une séquence de chiffre est lue et après comparaison avec la base de données du magasin, le nom du produit (et son prix) s'affiche, permettant à un non spécialiste de chaque produit (le caissier) d'établir la facture. Pour que l'usage du code-barre soit efficace, il doit répondre à certaines contraintes :

- chaque produit possède un code-barre et celui-ci fait partie de la base de données;
- le code-barre d'un produit est différent de celui d'un autre produit;
- les boîtes ou bouteilles d'un même produit ont le même code-barre.

En biologie, les contraintes sur le code-barre moléculaire sont les mêmes, si ce n'est qu'en plus, on doit pouvoir amplifier facilement la région génomique concernée, ce qui est le cas du fragment *CoxI* choisi pour les animaux, efficace dans environ 95% des identifications. Toutefois, étant donné le but du code-barre moléculaire (permettre à un non-spécialiste d'identifier des individus au niveau de l'espèce, et ce pour toute l'étendue de la biodiversité), quelques cas sont problématiques, pour les espèces ayant peu de diversité génétique, ou ayant divergé récemment.

Pour l'identification des plantes (au sens large), la recherche d'une région efficace est plus difficile, car l'utilisation du gène *CoxI* n'est pas envisageable. En effet, chez les plantes, les séquences nucléotidiques du génome mitochondrial évolue plus lentement que celle du génome chloroplastique (Wolfe *et al.*, 1987; Laroche *et al.*, 1997), qui est actuellement préféré. Comme les séquences de gènes mitochondriaux, l'obtention de séquences d'ADN chloroplastique est aisée (nombreuses copies, peu de variations intra-spécifique, pas de positions hétérozygotes), et l'alignement se fait généralement facilement. Plusieurs régions ont été proposées, certaines codantes (*matK*, *rbcl*, *rpoC*, *rpoB*, etc.) (Newmaster *et al.*, 2006), d'autres intergéniques (*trnH-psbA*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH*, etc.) (Taberlet *et al.*, 2007). L'usage d'une seule région ne permettant pas d'identifier de manière fiable les espèces (Kress et Erickson, 2007), en raison d'une variabilité nucléotidique insuffisante, plusieurs combinaisons ont été proposées, combinant des séquences codantes (CBOL Plant Working Group, 2009) ou codantes/intergéniques (Chase *et al.*, 2007).

Notre objectif est de tester un protocole standard combinant à la fois des séquences codantes uniquement (Chase *et al.*, 2007 – option 1) et codantes et intergéniques (Chase *et al.*, 2007 – option 2), afin de déterminer si l'une de ces deux approches pourrait être efficace dans l'identification des espèces du genre *Fraxinus*. Ce genre comprend 43 espèces distribuées dans 4 continents, dont certaines espèces sont actuellement protégées (*F. guilinensis*) ou exploitées commercialement (*F. excelsior*, *F. chinensis*, *F. pennsylvanica*, *F. americana*, etc.).

Nous avons pour cela constitué un échantillon comprenant la quasi-totalité du genre, avec plusieurs individus par espèce. L'échantillon a été fourni par des herbiers, des arboreta, des pépinières ou des collègues. Nous avons testé sur cet échantillon le pouvoir discriminatif de deux options proposées par Chase *et al.* (2007), ainsi que celui d'une région potentiellement hypervariable, la région intergénique *rpl32-trnL* (Shaw *et al.*, 2007).

2.2 Limitations of a standardised protocol for DNA barcoding in the *Fraxinus* genus

Arca M.^{1,2,3}, Hinsinger D.D.^{3,1,2,4}, Cruaud C.⁵, Tillier, A.⁶, Bousquet J.⁴, Frascaria-Lacoste N.^{3,2,1}

¹ Université de Paris XI, UMR 8079, F-91000 Orsay, France Orsay, France

² Centre national de la recherche scientifique, UMR 8079, 910405 Orsay, France

³ AgroParisTech, UMR 8079, 91405 Orsay, France

⁴ Chaire de recherche du Canada en génomique forestière et environnementale, Centre d'étude de la forêt, Université Laval, Québec, Québec, Canada G1V 0A6

⁵ Genoscope, Centre national de séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, C.P. 5706, 91057 Evry Cedex, France

⁶ Département systématique et évolution et Service de systématique moléculaire, Muséum national d'histoire naturelle, 43 rue Cuvier, 75231 Paris, France

Keywords: angiosperm, DNA barcoding, *Fraxinus*, Oleaceae, *rpl32-trnL*

Cet article sera soumis à la revue *New Phytologist*. Mariangela Arca et Damien D. Hinsinger ont également contribué à la collecte des échantillons, au travail de laboratoire, aux analyses et à la rédaction de l'article, Corinne Cruaud a réalisé le séquençage des résultats d'amplification, Annie Tillier a coordonné la collaboration avec Corinne Cruaud pour le séquençage, Nathalie Frascaria-Lacoste et Jean Bousquet ont initié le projet et participé au choix des stratégies d'analyse ainsi qu'à la rédaction de l'article.

2.3 Résumé

L'utilité d'un protocole de code-barre pour l'identification de spécimens dans le genre *Fraxinus* a été étudiée. En accord avec le protocole de Chase *et al.* (2007), nous avons examiné la variabilité génétique des loci chloroplastiques *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, et *rpl32-trnL* sur un large échantillon d'espèces du genre *Fraxinus* collectés en arboreta et en jardins botaniques. Les résultats de notre étude suggèrent que les loci chloroplastiques proposés ne peuvent pas être utilisés pour discriminer totalement les espèces, à cause de faible taux de substitution dans le génome chloroplastique du genre *Fraxinus*. La discrimination basée sur les distances génétiques était modérément satisfaisante et n'a permis la séparation des échantillons qu'au niveau subgénérique. L'utilisation de l'algorithme BLAST a permis l'identification correcte d'environ la moitié des espèces échantillonnées, ce qui est substantiellement inférieur aux 100% de succès requis pour une approche standardisée. En conséquence, une approche de code-barre chloroplastique apparaît inadaptée pour discriminer pleinement les espèces du genre *Fraxinus*. Etant donné que les taux de substitutions bas sont communs parmi les génomes des plastides d'arbres, l'usage d'un code-barre « universel » chez les plantes pourrait ne pas être adapté à une identification sûre des espèces d'arbres.

2.3.1 Abstract

The utility of DNA barcoding protocols for identifying representative specimens in the genus *Fraxinus* was investigated. According to the barcode standardised protocol of Chase *et al.* (2007), we examined the genetic variability of the chloroplast loci *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, and *rpl32-trnL* in a large sample of *Fraxinus* species collected from arboreta and botanical gardens. The results of our study suggest that the proposed chloroplast loci cannot be used to fully discriminate among species, because of the low rates of substitution in the chloroplast genome of *Fraxinus*. Genetic distance - based discrimination was moderately successful and only resulted in the separation of the samples at the subgenus level. Use of the BLAST algorithm allowed the correct identification of approximately half of the species sampled, which was substantially lower than the 100% success rate required for a standardised approach. Consequently, a cpDNA barcode appears to be unsuitable to fully discriminate *Fraxinus* species. Given that a low rate of substitution is common among the plastid genomes

of trees, the use of the plant “universal” barcode may not be suitable for the safe identification of tree species.

2.3.2 Introduction

Recently, methods for identifying species from short orthologous DNA sequences, known as DNA barcodes, have been proposed. They have been promoted as useful for the rapid identification and discovery of species and applied to biodiversity studies. In 2004, the “Consortium for the Barcode of Life” (CBOL) proposed that this approach should be used to create a global DNA barcode database of biodiversity using standard short genomic regions that are present universally among species.

For animals, barcode research has focused on a segment of the mitochondrial cytochrome c oxidase gene (*col* or *cox1*) of over 600 base pairs. This region has sufficient sequence variation among species to be informative as well as low intraspecific variation. The levels of interspecific sequence divergence allows the unambiguous identification of more than 95% of species in most of the major animal clades. Barcoding has been successfully used to identify species in various animal taxa, including birds (Kerr *et al.*, 2007; Tavares & Baker, 2008), butterflies (Hebert *et al.*, 2004; Hajibabaei *et al.*, 2007; Lukhtanov *et al.*, 2009), bats (Clare *et al.*, 2007), and fish (Ward *et al.*, 2005). However, *col* and other mitochondrial genes are not suitable as barcodes for plants because of their very low rates of substitution in plants (Laroche *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2004). Moreover, frequent hybridisation, polyploidy, and apomixis in plants make the identification of an ideal barcode locus more difficult than in animals.

A variety of loci widely used in phylogenetic studies have been suggested as DNA barcodes for plants. These include chloroplast genes such as *rbcL*, *atpB*, *ndhF*, and *matK* (Newmaster *et al.*, 2006), and non-coding spacers such as the *trnL* intron and *trnL-trnF* in the chloroplast genome. However, none of these regions presents a sufficiently high rate of substitution to allow plant species to be distinguished using a single locus barcode, and a multilocus approach appears to be necessary (Kress *et al.*, 2005; Newmaster *et al.*, 2006; Hollingsworth *et al.*, 2009).

A standardised plant barcode has been proposed by Chase *et al.* (2007). This barcode is based on two different combinations of three separate plastid regions: option 1 comprises the three genes *rpoC1*, *rpoB*, and *matK*, whereas option 2 relies on an intergenic spacer region, *trnH-psbA*, in addition to *rpoC1* and *matK*. The non-coding plastid region *trnH-psbA* was proposed first by Kress *et al.* (2005), who compared nine candidate barcode loci, which included coding and non-coding regions of *Atropa belladonna* and *Nicotiana tabacum*. It was shown that the level of discrimination increases when a non-coding spacer is paired with one

of three coding loci. However, no reports on the effectiveness of these candidate plant barcode loci have been published, and there have been few barcoding studies of higher eudicotyledons or tree species (Sass *et al.*, 2007; Newmaster & Ragupathy, 2009).

The genus *Fraxinus* (Oleaceae) comprises between 40 and 70 species distributed in the temperate and subtropical regions of the northern hemisphere (Franc & Ruchaud, 1996; Wallander, 2008). In Western Europe, *Fraxinus excelsior* has commercial value due to the particular properties of its wood (hard-wearing but flexible), as is the case for many other species in their respective regions (*e.g.* *F. mandshurica*, *F. chinensis*, *F. americana*, *F. pennsylvanica*). In addition, many species are used for their chemical components (*e.g.* *F. ornus*, *F. chinensis*). The systematics of the genus *Fraxinus* has long been considered difficult because there is much intraspecific variation and interspecific overlap in flower and leaf morphology and in the reproductive system, and variation in these features has been the cause of most synonyms (Miller, 1955; Wallander, 2008). In many cases, species are closely related and cannot be easily discriminated based on simple morphological criteria (Miller, 1955; Wei & Green, 1996; Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006). Our goal was to assess for the genus *Fraxinus* the efficacy of the two options of the standardised DNA barcode protocol proposed by Chase *et al.* (2007) and to address the following questions: 1) How effective is the plant standardized barcoding approach at discriminating species within the genus *Fraxinus* and 2) What is the best method to identify correctly as many species and specimens as possible.

2.3.3 Materials and Methods

2.3.3.1 Sampling

For these purposes, we examined the genetic variability in a widely used arboretum collection of 52 specimens representative of 24 species of the genus *Fraxinus*, hereafter called “sample set 1”, using the two barcode options proposed by Chase *et al.* (2007). The arboretum was located at Nogent-sur-Vernisson, France (Ministère de l’Agriculture). The results obtained from applying the two barcode options to “sample set 1” were then compared with the results obtained from sequencing different cpDNA regions for a second set of individuals, “sample set 2”, composed of 254 samples from the wild and from other arboreta that represented almost the complete genus (254 individuals, 56 species and subspecies). For sample set 2, two highly variable chloroplast loci, the intergenic spacers *trnH-psbA* and *rpl32-trn-L*, were sequenced

and tested separately. We also investigated the relative efficiency of the standardised distance method suggested by CBOL and a BLAST-based method of identification, using the *trnH-psbA* intergenic spacer sequences determined for sample set 2. The species analysed in this study are shown in Appendix 2.1. Nomenclature and synonyms follow the recommendations of Wallander (2008).

2.3.3.2 Molecular methods

For each sample, 25 µg of fresh leaves were dehydrated in a alcohol/acetone 70:30 solution, and stored dry before extraction. DNA extraction was carried out using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions.

The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify DNA. Four primer pairs targeting four regions of the chloroplast genomes suggested by Chase *et al.* (2007) were used: *matK*-F1 and *matK*-R1, *rpoC1*-F1 and *rpoC1*-R1, *rpoB*-F1 and *rpoB*-R2, and *trnH-psbA*F and *trnH-psbA*R. *MatK*, *rpoC1*, *rpoB* and *trnH-psbA* were sequenced for sample set 1, and *trnH-psbA* was sequenced for sample set 2. All primer sequences and protocols are available at <http://www.kew.org/barcoding/update.html>. In addition, the *rpl32-trnL* intergenic spacer of cpDNA was tested as a potentially informative sequence due to its high variability (Shaw *et al.*, 2007): it was sequenced for all individuals of sample set 2. The primer sequences used for PCR amplification and DNA sequencing of this region were as described by Shaw *et al.* (2007).

Amplification reactions contained 2 U of Taq DNA polymerase (MP-Biomedicals), 1X Taq Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTPs, 1 µM each primer, 0.1 mg/ml BSA, and approximately 30 ng of DNA template in a total volume of 20 µl. All reactions were run using the following thermal cycling program: 1 min at 94°C followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 40 s at 53°C, and 40 s at 72°C, and finally 5 min at 72°C. The annealing temperatures for *trnH-psbA* and *rpl32-trnL* were modified to 57°C and 56°C, respectively, to improve the efficiency of PCR. PCR was performed in a PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research). The amplified PCR products were checked on 1.5% agarose gels. All DNA sequencing was performed at the Genoscope facilities at Centre National de Séquençage (91000 Evry, France). PCR products were purified using exonucleaseI and phosphatase, and sequenced using BigDyeTerminator V3.1 kit (Applied Biosystem) and a ABI3730XL sequencer. All regions were sequenced for both strands to confirm sequence accuracy. All new sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers GU991679 to GU991721

(*rpoB*), HM130620 to HM130660 (*rpoC1*), HM171487 to HM171528 (*matK*), HM222716 to HM222923 (*rpl32-trnL*) and HM367360 to HM367592 (*trnH-psbA*).

2.3.3.3 Analysis

The quality of the sequences was checked using CodonCode Aligner version 1.6.3 (Codon Code Corporation, Dedham, MA, USA). Further alignments were performed using BioEdit (Hall, 1999) followed by manual adjustments. Autapomorphic insertions or deletions in coding regions were treated as processing errors and deleted after rechecking of the chromatogram. The aligned portions of *rpoC1*, *rpoB*, *matK* and *trnH-psbA* for all individuals of sample set 1 were concatenated to produce two different three-region barcodes as indicated by Chase *et al.* (2007), and hereafter designated as “option 1” and “option 2”. Using concatenated sequences and according to the standardized protocol of Chase *et al.*, (2007), pairwise substitution rates were estimated according to the two-parameter model of Kimura (1980) and submitted to neighbor-joining (NJ) analysis using PAUP version 4.0 (Swofford, 2003). Bootstrap analyses were based on 1000 replicates in all cases. *Jasminum nudiflorum* was used as the outgroup. The sequences of the *trnH-psbA* and *rpl32-trnL* intergenic regions obtained for all individuals of sample set 2 were analysed separately but using the same numerical treatment.

An alternative approach to estimating pairwise substitution rates and constructing a NJ tree (CBOL approach) was tested. A BLAST database was built with default parameters in BioEdit using the *trnH-psbA* sequences obtained for sample set 2, which corresponded to the most variable cpDNA locus proposed by COBL (Chase *et al.* 2007). A database BLAST search was then conducted for each individual sequence and the first hit for a successful identification was checked. To avoid artefactual auto-BLAST results (when a BLAST result corresponds to the sequence itself), the sequence used for the BLAST query was removed manually from the results.

2.3.4 Results

2.3.4.1 Sequence diversity

Most of the samples from *Fraxinus* were amplified and sequenced successfully for the different cpDNA regions (details in Appendix 2.1). The loci *rpoC1*, *rpoB*, and *matK* resulted in a single amplicon for almost all samples. Ambiguous regions of each locus sequence

Table 2.1. Sequence variation and discrimination power of the barcode regions in *Fraxinus* spp.

	Number of species considered	Number of samples analysed	Nucleotide sites			Substitution rate per 100 sites		Nb. of species identified by	
			Number polymorphic	Percent	Percent informative	Minimum	Maximum	NJ tree	Blast search
Sample set 1									
Option 1 (<i>rpoC1, rpoB, matK</i>)	18	52	1704	95 (5.6)	24 (1.4)	0.0	3.08	1	
Option 2 (<i>rpoC1, matK, trnH-psbA</i>)	18	52	1909	231 (12.1)	72 (3.8)	0.0	8.38	3	
<i>matK</i>	17	52	721	61 (8.5)	19 (2.6)	0.0	3.83	2	
Sample set 2									
<i>trnH-psbA</i>	37	232	698	203 (29.1)	107 (15.3)	0.0	12.46	6	7
<i>rpl32-trnL</i>	37	204	1023	451 (44.1)	193(18.9)	0.0	16.48	2	

located near the primer sites were not considered, which resulted in slightly smaller sequences than expected. In a population sample of *F. excelsior* and *F. angustifolia* trees from diverse populations, the two species could not be recognized and were far from being monophyletic (results not shown) because almost no sequence variation could be detected. Only one indel was found after aligning sequences for sample set 1: a 3 bp insertion in *rpoC1* in one individual of *F. quadrangulata*, a 9 bp deletion in *matK* of *F. mariesii*, and a 12 bp insertion in *rpoB* for all *Fraxinus* taxa, compared to the *Jasminum nudiflorum* outgroup.

For the sample set 2, the *trnH-psbA* intergenic region contained 28 indels, with most of them being diagnostic for different sections of the genus. Notably, an insertion of 11 bp was noted in all *Fraxinus* sequences, which was absent in the outgroup *Jasminum nudiflorum*; a deletion of 196 or 197 bp was seen in some *F. velutina* specimens, and an insertion of 6 bp was noted in *F. quadrangulata*, which was shared with the outgroup *Jasminum nudiflorum*. Many Eurasian individuals (mainly *F. ornus* and synonyms, but also *F. chinensis* and *F. syriaca*) shared a 93 bp deletion, which suggested that specimens from other taxa had been misidentified.

2.3.4.2 Substitution rates

For the sample set 1, the alignment of the chloroplast *rpoC1* and *rpoB* gene sequences was straightforward and revealed a small number of variable sites for each of barcode options 1 and 2 (Table 2.1). Sequence diversity was relatively low: the proportion of variable sites was 3.8% in *rpoC1*, 3.0% in *rpoB* and 3.8% in *MatK*. In contrast, for sample set 2, the alignment of *trnH-psbA* sequences was difficult or sometimes ambiguous due to numerous deletions. In the alignment of *trnH-psbA* for sample set 2 (698 bp), 203 (29.1%) sites were variable but only 107 (15.3%) sites were informative.

2.3.4.3 Neighbor-joining trees

The bootstrap NJ trees derived from pairwise substitution rates estimated from concatenated sequences for the two barcode options of COBL are shown in Fig. 2.1 and Fig. 2.2. For sample set 1, the bootstrap tree that resulted from barcode option 1 showed only one monospecific group, which consisted of the samples of *F. chinensis* and included a specimen of *F. mandshurica* that had probably been misidentified in the arboretum. It is notable that this monospecific group did not include all samples from *F. chinensis*, which may also be the



Figure 2.1. NJ tree for the barcode option 1 (*rpoC1*, *rpoB*, and *matK*) implicating the sample set 1. Bootstrap values are shown above the branches. Species that were potentially identified with these sequences are marked by a black line. Individuals marked by asterisks were likely misidentified, and not considered in the species delineations.

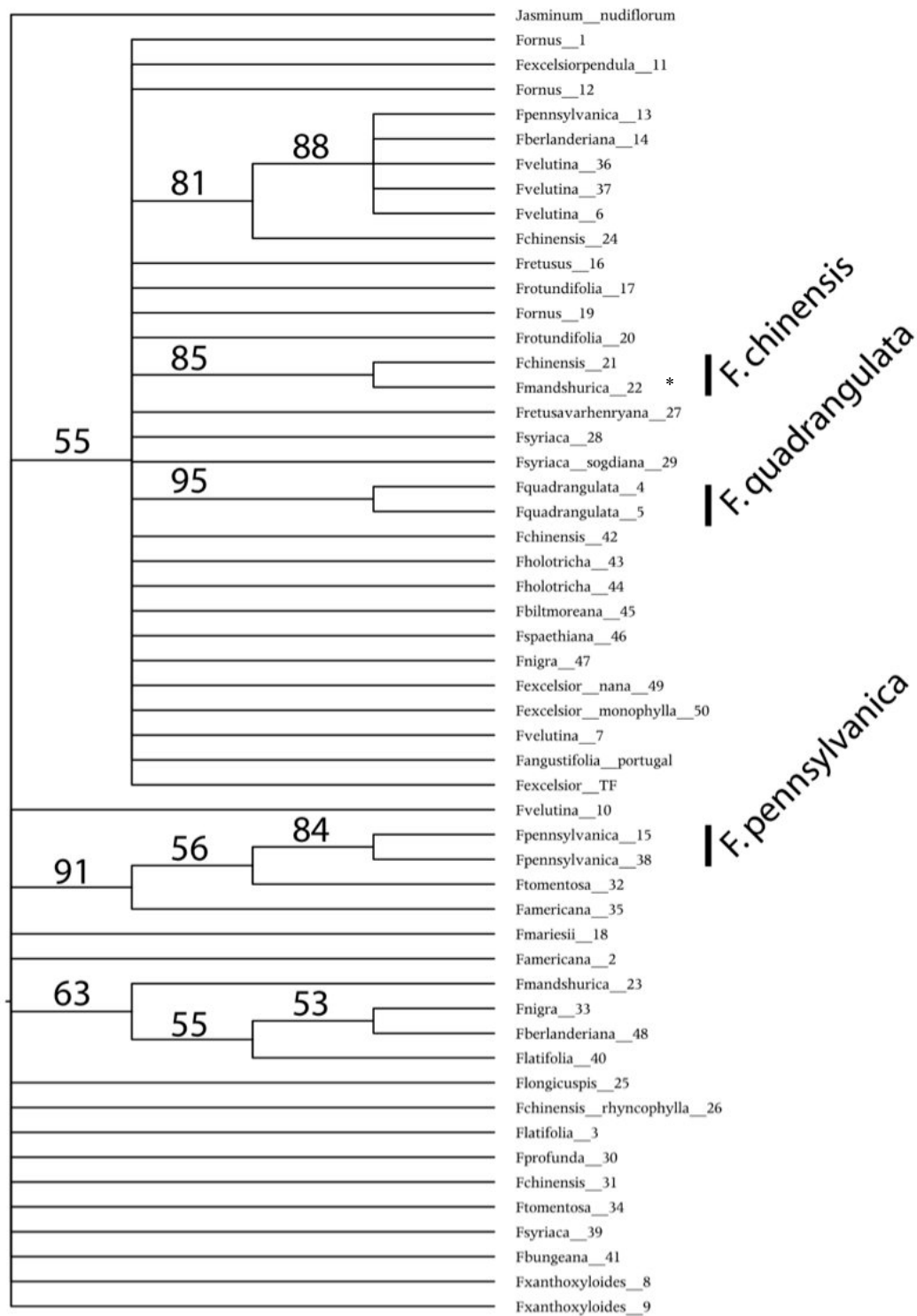


Figure 2.2. NJ tree for the barcode option 2 (*rpoC1*, *matK* and *trnH-psbA*) implicating the sample set 1. Bootstrap values are shown above the branches. Species that were potentially identified with these sequences are marked by a black line. Individuals marked by asterisks were likely misidentified, and not considered in the species delineations.

result of misidentification of individuals. The bootstrap tree derived from barcode option 2 delineated three monospecific groups: *F. quadrangulata*, *F. pennsylvanica*, and *F. chinensis*. The former group included all specimens available for this species. Both trees showed low bootstrap support for all nodes of interest, except *F. quadrangulata* in barcode option 2, which showed 95% support.

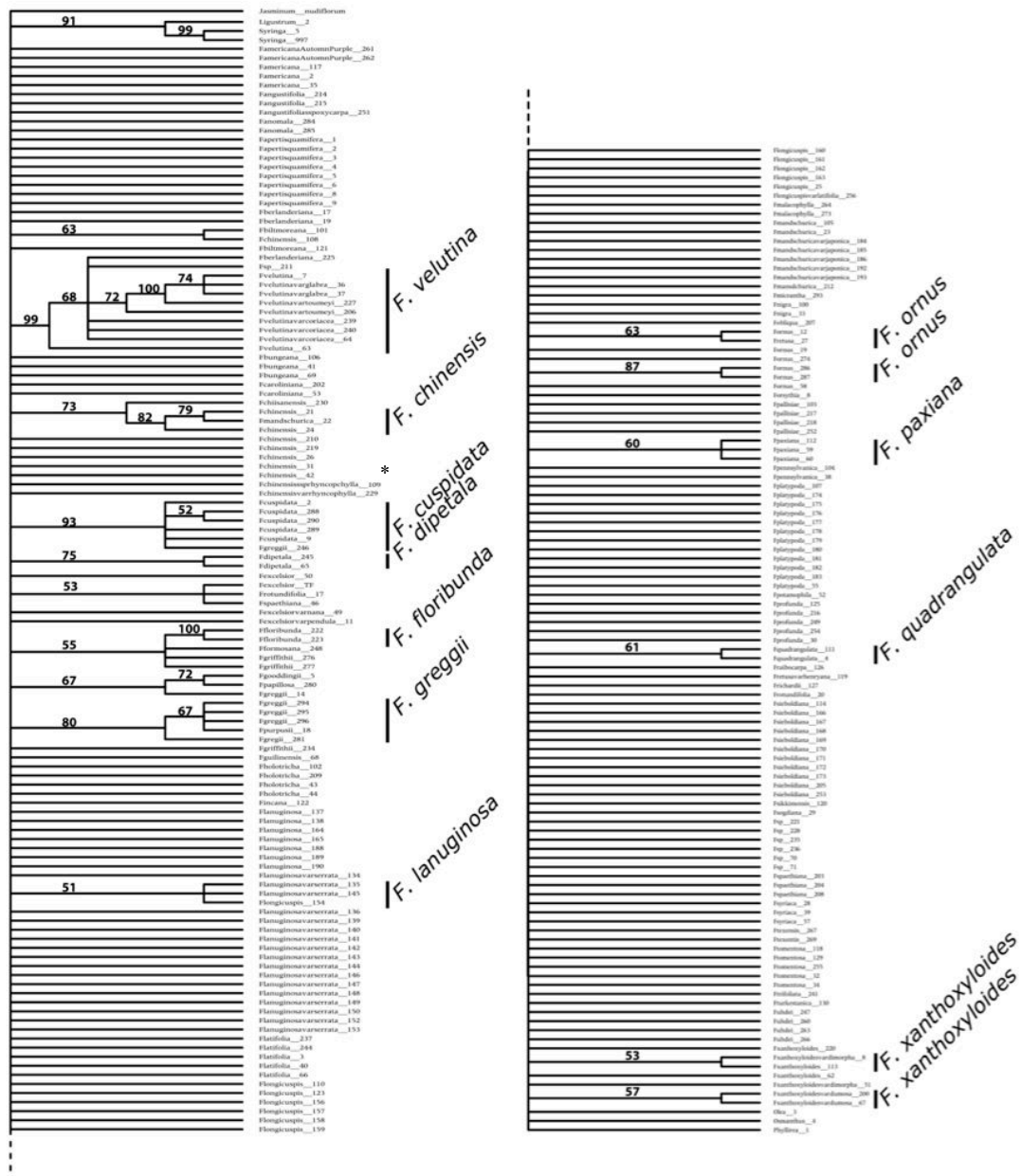


Figure 2.3. NJ tree for the *trnH-psbA* dataset implicating the sample set 2. Bootstrap values are shown above the branches. Species that were potentially identified with these sequences are marked by a black line. Individuals marked by asterisks were likely misidentified, and not considered in the species delineations.

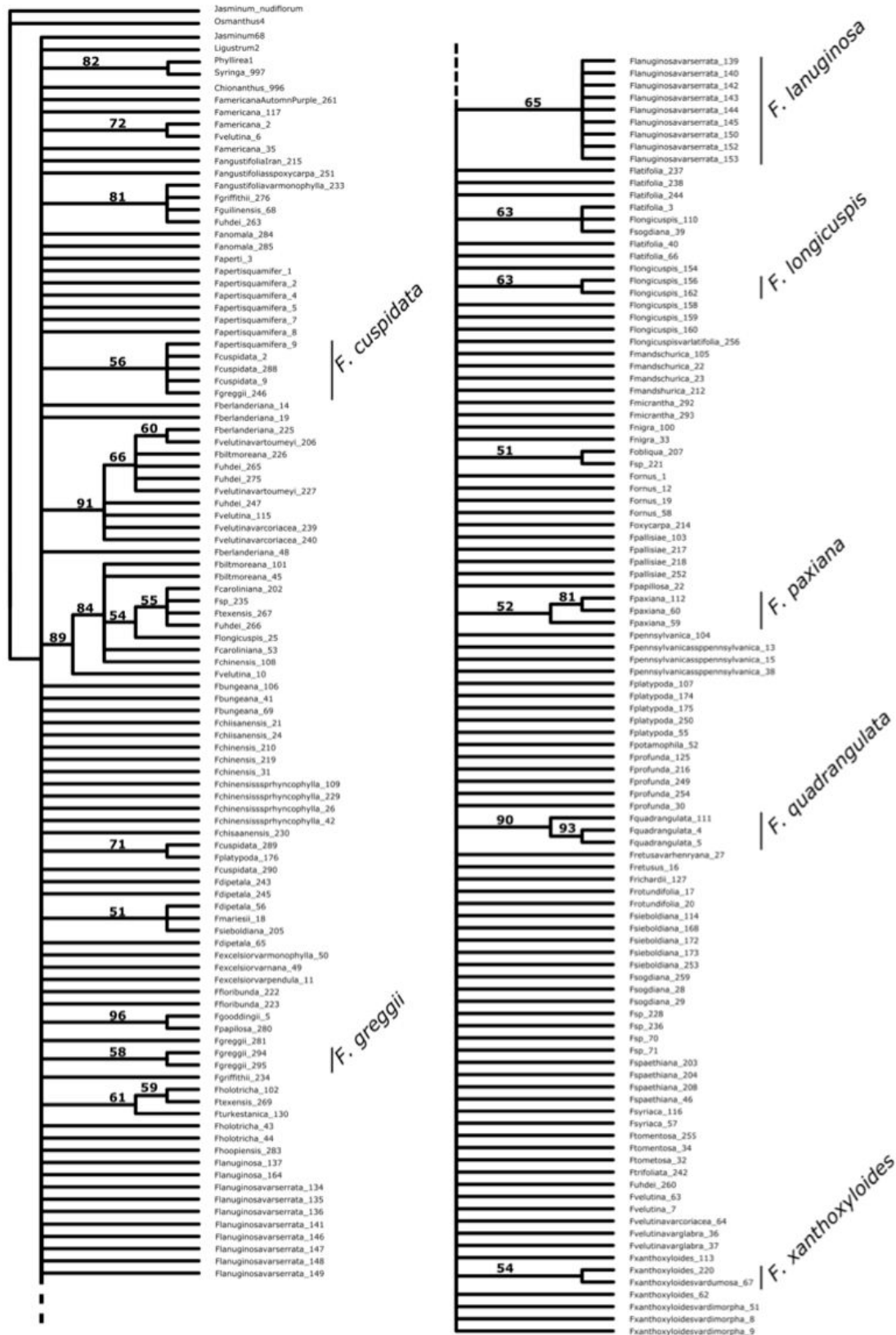


Figure 2.4. NJ tree for the *rp132-trnL* dataset implicating the sample set 2. Bootstrap values are shown above the branches. Species that were potentially identified with these sequences are marked by a black line.

The bootstrap NJ tree for sample set 2 showed that 13 groups were monospecific and six of them contained all the identified specimens of a given species (Fig. 2.3). The bootstrap values for the groups of interest ranged from 51% to 100% and, in general, were high when all individuals of a given species were included in the group. The tree for *rpl32-trnL* (Fig. 2.4) showed a lower resolution than that for *trnH-psbA*, and fewer monospecific groups, although the *rpl32-trnL* sequences showed more variation (Table 2.1). Notably, *F. quadrangulata* was the only monospecific group with high bootstrap support (90%).

2.3.4.4 BLAST method

For sample set 2 and the intergenic spacer sequences *trnH-psbA*, all specimens were correctly identified for seven species (Table 2.1), and more than 50% of the specimens were correctly identified for 17 other species. With respect to the recognition of the different sections of the genus, 83% of the *Dipetalae*, 44% of the *Fraxinus*, 89% of the *incertae sedis*, 22% of the *Melioides*, 58% of the *Ornus*, and 50% of the *Pauciflorae* individuals were correctly ascribed to their section, with an average of 51% correct section assignments, overall. The CBOL approach using NJ analysis of a Kirmura 2-parameter pairwise substitution matrix based on the same sequences and sample set resulted in the correct discrimination of only 6 species (Table 2.1), and more than 50% of the specimen could be correctly identified for only 7 species.

2.3.5 Discussion

For many groups of animals, the mitochondrial gene *co1* can be successfully used to distinguish species. In contrast, we have shown that, in the genus *Fraxinus*, a substantial number of species could not be distinguished using either options of the standardised cpDNA protocol for plant barcoding reported by Chase *et al.* (2007). The regions proposed as a plant barcode showed very low levels of polymorphism and were not sufficiently variable to distinguish adequately ash taxa.

The best case scenario was obtained with the BLAST approach applied to *trnH-psbA* intergenic sequences, where 22% of the species could be correctly identified in the sample set 2. In most case, barcoding could only be used to identify particular species identified previously as “barcodable”, i.e. groups of species in which the barcode approach have been demonstrated to be efficient enough to discriminate closely related species. Hence, it could only confirm a previous morphological or molecular identification. Accurate identification

requires that most if not all species sampled show a clear diagnostic pattern and that sufficient information is available at the interspecific level and between closely related species. Thus, the barcoding approach holds little promise of enabling the rapid and reliable identification of large numbers of ash samples, especially with respect to the non-taxonomists identification that is required in the commercial use of ash tree species.

Few barcode analyses at the species level have been reported in plants, but some general deductions can be made from the published data. Among gymnosperms, cycadales showed contrasting results, depending on the genus analysed (Sass *et al.*, 2007). Good species discrimination was obtained in some genera (*Mycrocycas*, *Strangeria*, *Lepidozamia*), whereas others showed poor discrimination between closely related species (Sass *et al.*, 2007). Despite relying on seven chloroplast loci, including standard regions, Sass *et al.* (2007) showed that the cpDNA regions tested “do not have sufficient variability to provide the unique sequences to identify an individual species”. Among basal angiosperms, Myristicaceae appeared to be more suited for DNA barcoding than gymnosperms (Newmaster *et al.*, 2008), although the authors acknowledge “that many of the plastid regions suggested for plant barcoding will not differentiate species in *Compsonera*”. They found that only *trnH-psbA* harbored a unique sequence for each species. In our study, identical *trnH-psbA* sequences were shared by many species, particularly in the same geographic areas (Japan, Europe), which suggests reticulate evolution or recent divergence at several places in the genus *Fraxinus*. In the study of Newmaster *et al.* (2008), the *matK* sequence was unique in half of the species investigated, and by combining the *matK* and *trnH-psbA* datasets, nearly 95% of the specimens could be identified successfully at the species level with a BLAST approach (Newmaster *et al.*, 2008). However, in the *Fraxinus* samples, very few variable nucleotides were identified in the various cpDNA regions proposed in the two barcoding options of Chase *et al.* (2007), which implies that the chloroplast genomes of these tree species show little variation. Studies that have relied on *trnH-psbA* alone (Van de Wiel *et al.*, 2009) or in combination with other regions (Newmaster & Ragupathy, 2009; Ragupathy *et al.*, 2009) have confirmed the utility and efficacy of this region for plant barcoding. Our results indicate that even the more variable *trnH-psbA* region would not represent a suitable locus for a standardised barcode approach for the non-specialist identification of plant material in the genus *Fraxinus*.

Many alternative loci have been developed and proposed for a standardised barcode protocol (for a review, see Hollingsworth *et al.*, 2009). However, many did not yield good results for tree species (Hollingsworth *et al.*, 2009) or simply failed for *Fraxinus* species, such as *matK*, *rpoB*, *rpoC1* (Ford *et al.*, 2009, this study). These results highlight the difficulty in

finding a universally applicable locus, especially for tree taxa. Recently, the CBOL Plant Working Group has proposed a two-locus barcode, based on *rbcL* and *matK* (CBOL Plant Working Group, 2009). *MatK* had been previously ruled out (Kress & Erickson, 2007) due to limitations in its application, for example, a lack of universality of primers, and *rbcL* was shown to be less variable than *trnH-psbA* (Kress & Erickson, 2007; CBOL Plant Working Group, 2009). The CBOL Plant Working Group (2009) rejected *trnH-psbA* because some monocot and conifer taxa produced amplicons that were more than 1000 bp in length, which complicated sequencing. This issue should be alleviated in the near future by the rapid technical progress being made in sequencing, combined with a decrease in its cost. In the study described herein, the *trnH-psbA* region was the least conserved and most informative of the chloroplast loci analysed. *rpl32-trnL*, despite a promising variability (Shaw *et al.*, 2007), showed little variation in the genus *Fraxinus*. The *rpl32-trnL* tree showed lower level of identification than the tree resulting from the analysis of the *trnH-psbA* dataset. The *rpl32-trnL* intergenic spacer could however be combined with other cpDNA regions in phylogenetic analysis.

Our results derived from the analysis *trnH-psbA* sequences for sample set 2 suggest that BLAST analysis can distinguish more species than the use of substitution rates matrices and distance-based tree construction methods such as NJ, as suggested by CBOL (Chase *et al.* 2007). This is probably because distance-based methods combine all sites in each sequence in a single index, whereas the BLAST algorithm uses local comparisons, which are more sensitive to small differences. Kress and Erickson (2007) proposed the replacement of the BLASTn algorithm by a global alignment algorithm, such as the one used in BOLD (Barcode Of Life Database), which could discriminate closely related species more effectively. In our study, the BLAST algorithm outperformed the NJ method when relying on the most variable region, *trnH-psbA*, though it did not result in clear identification for most species. Several studies (Newmaster & Ragupathy, 2009; Ragupathy *et al.*, 2009; Van de Wiel *et al.*, 2009) recently proposed that different methods of analysis, such as graphical representation (multidimensional analysis), could be more effective than NJ tree-based methods (as recommended by CBOL), even though these studies handled datasets with very low sequence divergence between species (0.5% divergence in Van de Wiel *et al.*, 2009; 0.2% in Ragupathy *et al.*, 2009), or had little bootstrap support for the monospecific groups delineated (Van de Wiel *et al.*, 2009), or had no tree-based representation of the results obtained (Newmaster & Ragupathy, 2009; Ragupathy *et al.*, 2009). The question of a most suitable method of phylogenetic analysis has been debated extensively over the past 20 years (Huelsenbeck &

Hillis, 1993; Cunningham, 1997; Huelsenbeck & Rannala, 1997; Martins & Hansen, 1997), but it remains that fixed nucleotide differences between species must be observed for any barcoding discrimination method to be successful, the more the better. Thus, it is clear that the major challenge in the quest for a universal barcode is finding a region of the genome variable enough; bio-computing does not appear to be the limiting factor.

Independent surveys of cpDNA polymorphisms have been conducted for some species of the *Fraxinus* (Gielly & Taberlet, 1994) and the maternal inheritance of cpDNA has been well demonstrated (Morand-Prieur *et al.*, 2002). The chloroplast intron *trnL* and the intergenic spacer between the 3' exon of *trnL* and *trnF* (Gielly & Taberlet, 1994) did not show any interspecific variation between four *Fraxinus* species that are considered to be relatively distant phylogenetically, *F. excelsior* and *F. oxyphylla* from the *Fraxinus* section, and *F. americana* and *F. pennsylvanica* from the *Melioides* section (Jeandroz *et al.*, 1997). It has been possible to discriminate *F. excelsior* from *F. oxyphylla* (also known as *F. angustifolia*) in some mixed samples of common ash using a cpDNA simple sequence repeat (SSR) but, unfortunately, this marker was less effective in hybrid zones involving these species (Morand-Prieur *et al.*, 2002). Thus, ash species appear to show low levels of overall variation in cpDNA sequences, especially fixed interspecific differences. Moreover, it has been shown that trees and other perennial plants might have lower rate of substitutions per year than that of annual plants for chloroplast loci (Bousquet *et al.* 1992; Petit & Hampe, 2006). These differences could be related reduced mutation rate (Petit & Hampe, 2006) or longer generations, larger population sizes and reduced rates of fixation in trees (Bousquet *et al.* 1992). Indeed, many tree species harbor large effective population sizes, promoted by predominantly outcrossing mating system and wind pollination, such as in allogamous ashes (Morand-Prieur *et al.*, 2002). In such a context, it has been showed that incomplete lineage is more likely, affecting the balance between shared versus fixed interspecific polymorphisms (Bouillé & Bousquet, 2005) and thus, limiting the availability of fixed polymorphisms for species identification. This problem might be particularly acute for recently diverged species in conserved regions of the genome.

The number of land plant species is approximately 400,000, and, therefore, the 100,000 or so tree species would represent a quarter of land plant biodiversity (Petit & Hampe, 2006). This corresponds to a substantial proportion that will probably be impossible to barcode using an affordable and simple approach solely based on cpDNA. Considering the presently proposed standardised barcode regions, tree species might represent for a while a black box in the Barcode Of Life Database, because they might be forgotten by the barcoders due to the

lack of an appropriate and universal region for analysis. Therefore, we outline below some alternative solutions centering around the need to search for discriminating markers in the nuclear genome.

The search for low-copy nuclear regions with sufficient genetic variability that are amplifiable with universal markers is difficult in plants because most nuclear genes are organized in multigene families (Kinlaw & Neale, 1997) and because of the abundance of retrotransposons and other repetitive elements in the plant genome (Friesen *et al.*, 2001). A region that is commonly used for phylogenetic studies of land plants is the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nITS). However, the presence of paralogous nITS sequences in some genera such as in the conifer *Picea* might pose some problems for the universal use of nITS in plant barcoding (Campbell *et al.*, 2005). However, in *Fraxinus*, nITS sequences have been used successfully to investigate the phylogeny of the genus (Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008), as for many other angiosperm genera (Baldwin, 1992; Baldwin & Markos, 1998; Li *et al.*, 2002; Acevedo-Rosas *et al.*, 2004; Cabrera *et al.*, 2009; Urbatsch *et al.*, 2009). Another potentially useful region for barcoding in *Fraxinus* is the nuclear external transcribed spacer (nETS). It shows a high level of concerted evolution (Linder *et al.*, 2000), with potentially useful polymorphisms deriving from the more or less rapid fixation of new variants within species (Okuyama *et al.*, 2005). High levels of diversity and species specificity among nETS sequences have been shown in Oleaceae (Li *et al.*, 2002) and in other angiosperm families (Acevedo-Rosas *et al.*, 2004; Burke & Bain, 2008; Trisos *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2009). Our recent work has shown highly useful information in both regions for the molecular recognition of *Fraxinus* taxa (Hinsinger *et al.*, in prep).

To identify adequately *Fraxinus* taxa from a molecular perspective and in regard of the present barcoding results from cpDNA, it is thus likely that the development of a multilocus barcode will be required, potentially combining highly variable nuclear region, such nITS or nETS, in addition to the use of the most variable regions of the chloroplast genome such as the intergenic region *trnH-psbA*. It is also likely that this approach will have to be used in conjunction with more classical molecular markers, such as microsatellites, and morphological taxonomy to identify safely individuals at the species level. This approach is similar to that of Newmaster *et al.* (2006) who proposed a compartmentalised barcode, in which a more conserved region, such as *rbcl* (or *trnH-psbA*, given our results) is used first to establish the taxonomic group such as the generic or subgeneric recognition, and then, a suitable highly variable region of the genome is used to identify the species. In *Fraxinus*, this

more variable region could be a combination of nITS and nETS regions of the nuclear genome, as argued above.

A simple and universal barcode for land plants probably represents a taxonomist's search for the Holy Grail (Rubinoff *et al.*, 2006). The development of such a protocol for DNA barcoding in the genus *Fraxinus* will require extensive amounts of additional sequence information, both at the genus level, in particular for the nuclear genome.

For an exhaustive evaluation of the discriminating power of the barcoding approach in land plants, it will be necessary to exchange scientific information and disseminate the development of new projects for plant barcoding. For example, the DNA barcoding efforts could now take advantage of the completely sequenced genomes of *Arabidopsis*, *Populus*, *Oryza*, *Vitis* and other species that are available in the GenBank database. Because in some cases, like in the genus *Fraxinus* and other trees species, regions thought to be neutral evolve too slowly to recognised cryptic or closely related species pairs, these comparisons will be useful to identify regions under divergent selection, which could be involved in speciation (Ashton, 1969; Petit & Hampe, 2006). Moreover, a better knowledge of the comparative organisation of paralogous and orthologous genes in sequenced species pairs will help define catalogs of genes and pick up inside promising regions that could match with the molecular barcode specifications. Until in a -perhaps not so distant- future, when, at a low price, whole cpDNA genome sequence could be determined as uninterrupted sequence from single genomic molecule (Pushkarev *et al.*, 2009), and that comparative bioinformatic tools and databases become available to process efficiently such complex information at various levels of taxonomical diversity.

2.3.6 Acknowledgments

We are grateful to the staff at all arboreta listed in Appendix 2.1 who kindly provided samples, Jean Dufour (INRA Orléans) for his aid in population sampling in the European research contract RAP-QLK-52001-00631, and Paola Bertolino for her very useful help in the laboratory and field collections. received financial support from the French Ministry of Education and the Université Paris-Sud 11 (Orsay). This work was supported by the “Consortium National de Recherche en Génomique”, and the “Service de Systématique Moléculaire” of the Muséum National d’Histoire Naturelle (IFR 101). It is part of agreement no. 2005/67 between Genoscope and the Muséum National d’Histoire Naturelle on the project “Macrophylogeny of Life”, directed by Guillaume Lecointre.

Literature cited

- Acevedo-Rosas R, Cameron K, Sosa V, Pell S. 2004. A Molecular Phylogenetic Study of *Graptopetalum* (Crassulaceae) Based on Ets, Its, *rpl16*, and *trnL-F* Nucleotide Sequences. *American Journal of Botany* 91(7): 1099-1104.
- Ashton PS. 1969. Speciation among Tropical Forest Trees: Some Deductions in the Light of Recent Evidence. *Biological Journal of the Linnean Society* 1(1-2): 155-196.
- Baldwin BG. 1992. Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: An Example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1(1): 3-16.
- Baldwin BG, Markos S. 1998. Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18s-26s rDNA: Congruence of ETS and ITS Trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10(3): 449-463.
- Bouillé M, Bousquet J. 2005. Trans-Species Shared Polymorphisms at Orthologous Nuclear Gene Loci among Distant Species in the Conifer *Picea* (Pinaceae): Implications for the Long-Term Maintenance of Genetic Diversity in Trees. *American Journal of Botany* 92(1): 63-73.
- Burke JL, Bain JF. 2008. The Origins of *Erigeron trifidus* (Asteraceae), an Agamospermous Rare Species in Alberta. *Botany* 86(8): 866-876.
- Cabrera JF, Jacobs SWL, Kadereit G. 2009. Phylogeny of the Australian Camphorosmeae (Chenopodiaceae) and the Taxonomic Significance of the Fruiting Perianth. *International Journal of Plant Sciences* 170(4): 505-521.
- Campbell CS, A. Wright W, Cox M, Vining TF, Major CS, Arsenault MP. 2005. Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) in *Picea* (Pinaceae): Sequence Divergence and Structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35(1): 165-185.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA Barcode for Land Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31): 12794-12797.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, van den Berg C, Madrinan S, Petersen G, Seberg O, Jorgensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly L, Wilkinson M. 2007. A Proposal for a Standardised Protocol to Barcode All Land Plants. *Taxon* 56(2): 295-299.
- Cho Y, Mower JP, Qiu YL, Palmer JD. 2004. Mitochondrial Substitution Rates Are Extraordinarily Elevated and Variable in a Genus of Flowering Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(51): 17741-17746.
- Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN. 2007. DNA Barcoding of Neotropical Bats: Species Identification and Discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes* 7(2): 184-190.
- Cunningham CW. 1997. Is Congruence between Data Partitions a Reliable Predictor of Phylogenetic Accuracy? Empirically Testing an Iterative Procedure for Choosing among Phylogenetic Methods. *Systematic Biology* 46(3): 464-478.
- Fernandez-Manjarres JF, Gérard PR, Dufour J, Raquin C, Frascaria-Lacoste N. 2006. Differential Patterns of Morphological and Molecular Hybridization Between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl (Oleaceae) in Eastern and Western France. *Molecular Ecology* 15(11): 3245-3257.
- Ford CS, Ayres KL, Toomey N, Haider N, Stahl JV, Kelly LJ, Wikstrom N, Hollingsworth PM, Duff RJ, Hoot SB, Cowan RS, Chase MW, Wilkinson MJ. 2009. Selection of Candidate Coding DNA Barcoding Regions for Use on Land Plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159(1): 1-11.

- Franc A, Ruchaud F 1996. Le Frêne Commun. In: CEMAGREF ed. *Autoécologie Des Feuillus Précieux: Frêne Commun, Merisier, Erable Sycomore, Erable Plane*. Riom, France, 15-68.
- Friesen N, Brandes A, Heslop-Harrison JS. 2001. Diversity, Origin, and Distribution of Retrotransposons (Gypsy and Copia) in Conifers. *Molecular Biology and Evolution* 18(7): 1176-1188.
- Gielly L, Taberlet P. 1994. The Use of Chloroplast DNA to Resolve Plant Phylogenies: Noncoding Versus *Rbcl* Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11(5): 769-777.
- Hajibabaei M, Singer GA, Clare EL, Hebert PD. 2007. Design and Applicability of DNA Arrays and DNA Barcodes in Biodiversity Monitoring. *BMC Biology* 5: 24 DOI :10.1186/1741-7007-5-24.
- Hall TA 1999. Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis. In: Department of Microbiology. North Carolina State University.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. 2004. Ten Species in One: DNA Barcoding Reveals Cryptic Species in the Neotropical Skipper Butterfly *Astraptes Fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(41): 14812-14817.
- Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL, Richardson J, Pennington RT, Long DG, Cowan R, Chase MW, Gaudeul M, Hollingsworth PM. 2009. Selecting Barcoding Loci for Plants: Evaluation of Seven Candidate Loci with Species-Level Sampling in Three Divergent Groups of Land Plants. *Molecular Ecology Resources* 9(2): 439-457.
- Huelsenbeck JP, Hillis DM. 1993. Success of Phylogenetic Methods in the Four-Taxon Case. *Systematic Biology* 42(3): 247-264.
- Huelsenbeck JP, Rannala B. 1997. Phylogenetic Methods Come of Age: Testing Hypotheses in an Evolutionary Context. *Science* 276(5310): 227-232.
- Jeandroz S, Roy A, Bousquet J. 1997. Phylogeny and Phylogeography of the Circumpolar Genus *Fraxinus* (Oleaceae) Based on Internal Transcribed Spacer Sequences of Nuclear Ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7(2): 241-251.
- Kerr KC, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, Hebert PD. 2007. Comprehensive DNA Barcode Coverage of North American Birds. *Molecular Ecology Notes* 7(4): 535-543.
- Kimura M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111-120.
- Kinlaw CS, Neale DB. 1997. Complex Gene Families in Pine Genomes. *Trends in Plant Science* 2(9): 356-359.
- Kress WJ, Erickson DL. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS One* 2(6): e508.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. 2005. Use of DNA Barcodes to Identify Flowering Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(23): 8369-8374.
- Laroche J, Li P, Maggia L, Bousquet J. 1997. Molecular Evolution of Angiosperm Mitochondrial Introns and Exons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(11): 5722-5727.
- Li J, Alexander JH, Zhang D. 2002. Paraphyletic *Syringa* (Oleaceae): Evidence from Sequences of Nuclear Ribosomal DNA ITS and ETS Regions. *Systematic Botany* 27(3): 592-597.
- Linder CR, Goertzen LR, Heuvel BV, Francisco-Ortega J, Jansen RK. 2000. The Complete External Transcribed Spacer of 18s-26s Rdna: Amplification and Phylogenetic Utility at

- Low Taxonomic Levels in Asteraceae and Closely Allied Families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14(2): 285-303.
- Lukhtanov VA, Sourakov A, Zakharov EV, Hebert PDN. 2009. DNA Barcoding Central Asian Butterflies: Increasing Geographical Dimension Does Not Significantly Reduce the Success of Species Identification. *Molecular Ecology Resources* 9(5): 1302-1310.
- Martins EP, Hansen TF. 1997. Phylogenies and the Comparative Method: A General Approach to Incorporating Phylogenetic Information into the Analysis of Interspecific Data. *The American Naturalist* 149(4): 646.
- Miller GN 1955. The Genus *Fraxinus*, the Ashes, in North America, North of Mexico. *Cornell University Agricultural Experiment Station Memoire*. 1-64.
- Morand-Prieur ME, Vedel F, Raquin C, Brachet S, Sihachakr D, Frascaria-Lacoste N. 2002. Maternal Inheritance of a Chloroplast Microsatellite Marker in Controlled Hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. *Molecular Ecology* 11(3): 613-617.
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Ragupathy S. 2006. DNA Barcoding in Land Plants: Evaluation of *rbcL* in a Multigene Tiered Approach. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 84(3): 335-341.
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD, Janovec J. 2008. Testing Candidate Plant Barcode Regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources* 8(3): 480-490.
- Newmaster SG, Ragupathy S. 2009. Testing Plant Barcoding in a Sister Species Complex of Pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae). *Molecular Ecology Resources* 9(s1): 172-180.
- Okuyama Y, Fujii N, Wakabayashi M, Kawakita A, Ito M, Watanabe M, Murakami N, Kato M. 2005. Nonuniform Concerted Evolution and Chloroplast Capture: Heterogeneity of Observed Introgression Patterns in Three Molecular Data Partition Phylogenies of Asian *Mitella* (Saxifragaceae). *Molecular Biology and Evolution* 22(2): 285-296.
- Petit RMJ, Hampe A. 2006. Some Evolutionary Consequences of Being a Tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37(1): 187-214.
- Pushkarev D, Neff NF, Quake SR. 2009. Single-Molecule Sequencing of an Individual Human Genome. *Nature Biotech* 27(9): 847-850.
- Ragupathy S, Newmaster SG, Murugesan M, Balasubramaniam V. 2009. DNA Barcoding Discriminates a New Cryptic Grass Species Revealed in an Ethnobotany Study by the Hill Tribes of the Western Ghats in Southern India. *Molecular Ecology Resources* 9(s1): 164-171.
- Rubinoff D, Cameron S, Will K. 2006. Are Plant DNA Barcodes a Search for the Holy Grail? *Trends in Ecology and Evolution* 21(1): 1-2.
- Sass C, Little DP, Stevenson DW, Specht CD. 2007. DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the Potential of Proposed Barcoding Markers for Species Identification of Cycads. *PLoS One* 2(11): e1154.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007. Comparison of Whole Chloroplast Genome Sequences to Choose Noncoding Regions for Phylogenetic Studies in Angiosperms: The Tortoise and the Hare Iii. *American Journal of Botany* 94(3): 275-288.
- Swofford DL 2003. Paup*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). In. Sunderland, Massachusetts.: Sinauer Associates.
- Tavares ES, Baker AJ. 2008. Single Mitochondrial Gene Barcodes Reliably Identify Sister-Species in Diverse Clades of Birds. *BMC Evolutionary Biology* 8: 81 DOI 10.1186/1471-2148-8-81.

- Trisos CH, Verboom GA, Bergh NG. 2008. Phylogeny of the Daisy Genera *Ifloga* and *Trichogyne* (Asteraceae: Gnaphalieae) and Evaluation of the Link between Annuality and Aridity in the Succulent Karoo. *South African Journal of Botany* 74(2): 379-379.
- Urbatsch LE, Baldwin BG, Donoghue MJ. 2009. Phylogeny of the Coneflowers and Relatives (Heliantheae: Asteraceae) Based on Nuclear Rdna Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences and Chloroplast DNA Restriction Site Data. *Systematic Botany* 25(3): 539-565.
- Van de Wiel CCM, Van Der Schoot J, Van Valkenburg JLCH, Duistermaat H, Smulders MJM. 2009. DNA Barcoding Discriminates the Noxious Invasive Plant Species, Floating Pennywort (*Hydrocotyle Ranunculoides* L.F.), from Non-Invasive Relatives. *Molecular Ecology Resources* 9(4): 1086-1091.
- Wallander E. 2008. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and Evolution of Dioecy. *Plant Systematics and Evolution* 273(1): 25-49.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. 2005. DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462): 1847-1857.
- Wei Z, Green PS 1996. *Fraxinus*. In: Z. WuP. H. Raven eds. *Flora of China*. Missouri: Science Press, Missouri Botanical Garden, 273-279.

Appendix 2.1. Samples used in this study and newly published sequences. ‘Barres’, Arboretum National des Barres. Botanical garden ID: botanical garden identifier. Tree ID: identifier for samples in the tree reconstruction figures.

Taxa	Botanical garden ID	Tree ID	Regions of the chloroplast genome				
			<i>trnH-psbA</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>matK</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpoC1</i>
<i>Fraxinus americana</i>	15	2	Yes	Yes	Yes	GU991679	HM130620
<i>Fraxinus americana</i>	1137	35	Yes	Yes			HM130621
<i>Fraxinus americana</i>		117	Yes	Yes			
<i>Fraxinus americana</i> 'Autumn purple'	2793 Kipling Street 598 Loma Verde	261	Yes	Yes			
<i>Fraxinus americana</i> 'Autumn purple'	Avenue	262	Yes				
<i>Fraxinus americana</i> var. <i>biltmoreana</i>	3826	45		Yes	Yes	GU991682	HM130625
<i>Fraxinus americana</i> var. <i>biltmoreana</i>		121	Yes				
<i>Fraxinus angustifolia</i>	1877	17	Yes	Yes	Yes		
<i>Fraxinus angustifolia</i>	1929	20	Yes	Yes	Yes	GU991709	HM130652
<i>Fraxinus angustifolia</i>	1991.0384*A	215	Yes	Yes			
<i>Fraxinus angustifolia</i> ssp. <i>oxycarpa</i>	1731-1991	251	Yes	Yes			
<i>Fraxinus angustifolia</i> var. <i>monophylla</i>	1979.0263*A	233		Yes			
<i>Fraxinus angustifolia</i>		Portugal1				GU991680	HM130622
<i>Fraxinus anomala</i>	B0702	284	Yes	Yes			
<i>Fraxinus anomala</i>	B0703	285	Yes	Yes			
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	1	1	Yes	Yes			
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	2	2	Yes	Yes			
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	3	3	Yes	Yes			
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	4	4	Yes	Yes			
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	5	5	Yes	Yes			
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	6	6		Yes			
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	7	7	Yes				
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	8	8	Yes	Yes			
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	9	9	Yes	Yes			
<i>Fraxinus berlandieriana</i>	1638	14		Yes		GU991681	HM130623
<i>Fraxinus berlandieriana</i>	1158611	17	Yes				
<i>Fraxinus berlandieriana</i>	991880	19	Yes	Yes			
<i>Fraxinus berlandieriana</i>	3617	48		Yes	Yes	GU991722	HM130624

<i>Fraxinus berlanderiana</i>	1977.1152*Y	225	Yes	Yes			
<i>Fraxinus biltmoreana</i>		101	Yes	Yes			
<i>Fraxinus biltmoreana</i>	1977.2370*Q	226		Yes			
<i>Fraxinus bungeana</i>	3811	41	Yes	Yes	Yes	GU991683	
<i>Fraxinus bungeana</i>		69	Yes	Yes			
<i>Fraxinus bungeana</i>		106	Yes	Yes			
<i>Fraxinus caroliniana</i>		53	Yes	Yes			
<i>Fraxinus caroliniana</i>	1980.0206*A	202	Yes	Yes			
<i>Fraxinus chiisanensis</i>	8994	21	Yes	Yes	Yes	GU991684	HM130626
<i>Fraxinus chiisanensis</i>	8907	24	Yes	Yes	Yes	GU991685	HM130627
<i>Fraxinus chiisanensis</i>	2006.0536*A	230	Yes	Yes			
<i>Fraxinus chinensis</i>	1992	31	Yes	Yes	Yes	GU991686	HM130629
<i>Fraxinus chinensis</i>		108	Yes	Yes			
<i>Fraxinus chinensis</i>	1982.2663*A	210	Yes	Yes			
<i>Fraxinus chinensis</i>	1966.2754*A	219	Yes	Yes			
<i>Fraxinus chinensis</i> ssp. <i>rhyncophylla</i>	2140	26	Yes	Yes	Yes		HM130628
<i>Fraxinus chinensis</i> ssp. <i>rhyncophylla</i>	3815	42	Yes	Yes	Yes	GU991687	HM130630
<i>Fraxinus chinensis</i> ssp. <i>rhyncophylla</i>		109	Yes	Yes			
<i>Fraxinus chinensis</i> ssp. <i>rhyncophylla</i>	2001.0366*A	229	Yes	Yes			
<i>Fraxinus cuspidata</i>	758471	2	Yes	Yes			
<i>Fraxinus cuspidata</i>	658827	9	Yes	Yes			
<i>Fraxinus cuspidata</i>		288	Yes	Yes			
<i>Fraxinus cuspidata</i>		289	Yes	Yes			
<i>Fraxinus cuspidata</i>		290	Yes	Yes			
<i>Fraxinus dipetala</i>		56		Yes			
<i>Fraxinus dipetala</i>		65	Yes	Yes			
<i>Fraxinus dipetala</i>	13476*D2	243		Yes			
<i>Fraxinus dipetala</i>	10303*A6	245	Yes	Yes			
<i>Fraxinus excelsior</i>		221	Yes	Yes			
<i>Fraxinus excelsior</i>		228	Yes	Yes			
<i>Fraxinus excelsior</i>	1977.0646	232	Yes				
<i>Fraxinus excelsior monophylla</i>	3263	50	Yes	Yes	Yes		HM130633
<i>Fraxinus excelsior</i> var. <i>nana</i>	3337	49	Yes	Yes	Yes		HM130634
<i>Fraxinus excelsior</i> var. <i>pendula</i>	350	11	Yes	Yes	Yes	GU991689	HM130631

<i>Fraxinus excelsior</i>		TF				GU991688	HM130632
<i>Fraxinus floribunda</i>	1739	16		Yes	Yes	GU991708	HM130651
<i>Fraxinus floribunda</i>	1977.0718*S	222	Yes	Yes			
<i>Fraxinus floribunda</i>	1977.0702*Y	223	Yes	Yes			
<i>Fraxinus formosana</i>	OSN84-00-0285-60	248	Yes				
<i>Fraxinus gooddingii</i>	1214941	5	Yes	Yes			
<i>Fraxinus greggii</i>	529898	14	Yes				
<i>Fraxinus greggii</i>	801	281	Yes	Yes			
<i>Fraxinus greggii</i>		294	Yes	Yes			
<i>Fraxinus greggii</i>		295	Yes	Yes			
<i>Fraxinus greggii</i>		296	Yes				
<i>Fraxinus gregii</i>	19860253	246	Yes	Yes			
<i>Fraxinus griffithii</i>	1977.2517*T	234	Yes	Yes			
<i>Fraxinus griffithii</i>	783-01	276	Yes	Yes			
<i>Fraxinus griffithii</i>	783-10	277	Yes				
<i>Fraxinus guilinensis</i>		68	Yes	Yes			
<i>Fraxinus holotricha</i>	3819	43	Yes	Yes	Yes	GU991690	HM130635
<i>Fraxinus holotricha</i>	3820	44	Yes	Yes	Yes	GU991691	
<i>Fraxinus holotricha</i>		102	Yes	Yes			
<i>Fraxinus holotricha</i>	1982.0066*A	209	Yes				
<i>Fraxinus hoopiensis</i>	19990031	283		Yes			
<i>Fraxinus incana</i>		122	Yes				
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	107	137	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	108	138	Yes				
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	107	164	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	108	165	Yes				
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	274	188	Yes				
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	275	189	Yes				
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	276	190	Yes				
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	78	134	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	83	135	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	97	136	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	113	139	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	132	140	Yes	Yes			

<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	139	141	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	165	142	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	170	143	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	176	144	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	181	145	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	185	146	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	188	147	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	191	148	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	192	149	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	194	150	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	218	152	Yes	Yes			
<i>Fraxinus lanuginosa</i> var. <i>serrata</i>	238	153	Yes	Yes			
<i>Fraxinus latifolia</i>	408	3	Yes	Yes	Yes		HM130636
<i>Fraxinus latifolia</i>	3808	40	Yes	Yes	Yes	GU991692	HM130637
<i>Fraxinus latifolia</i>		66	Yes	Yes			
<i>Fraxinus latifolia</i>	10501*C1	237	Yes	Yes			
<i>Fraxinus latifolia</i>	8669*A4	238		Yes			
<i>Fraxinus latifolia</i>	10521*A3	244	Yes	Yes			
<i>Fraxinus longicuspis</i>	2083	25	Yes	Yes	Yes	GU991693	HM130638
<i>Fraxinus longicuspis</i>		110	Yes	Yes			
<i>Fraxinus longicuspis</i>		123	Yes				
<i>Fraxinus longicuspis</i>	1	154	Yes	Yes			
<i>Fraxinus longicuspis</i>	3	156	Yes	Yes			
<i>Fraxinus longicuspis</i>	4	157	Yes				
<i>Fraxinus longicuspis</i>	5	158	Yes	Yes			
<i>Fraxinus longicuspis</i>	6	159	Yes	Yes			
<i>Fraxinus longicuspis</i>	7	160	Yes	Yes			
<i>Fraxinus longicuspis</i>	8	161	Yes				
<i>Fraxinus longicuspis</i>	9	162	Yes	Yes			
<i>Fraxinus longicuspis</i>	10	163	Yes				
<i>Fraxinus longicuspis</i> var. <i>latifolia</i>	1438-1972	256	Yes	Yes			
<i>Fraxinus malacophylla</i>		273	Yes				
<i>Fraxinus malacophylla</i>	1969-1384-P	264	Yes				
<i>Fraxinus mandshurica</i>	2456	22	Yes	Yes	Yes	GU991694	

<i>Fraxinus mandshurica</i>	2500	23	Yes	Yes	Yes	GU991695	HM130639
<i>Fraxinus mandshurica</i>		105	Yes	Yes			
<i>Fraxinus mandshurica</i>	1982.2662*A	212	Yes	Yes			
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	263	184	Yes				
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	264	185	Yes				
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	265	186	Yes				
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	296	192	Yes				
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	297	193	Yes				
<i>Fraxinus mariesii</i>	1883	18		Yes	Yes	GU991696	HM130640
<i>Fraxinus micrantha</i>		292		Yes			
<i>Fraxinus micrantha</i>		293	Yes	Yes			
<i>Fraxinus nigra</i>	1994	33	Yes	Yes		GU991697	HM130641
<i>Fraxinus nigra</i>	3828	47				GU991698	HM130642
<i>Fraxinus nigra</i>		100	Yes	Yes			
<i>Fraxinus obliqua</i>	1982.3212*A	207	Yes	Yes			
<i>Fraxinus ornus</i>	741	1		Yes	Yes	GU991699	HM130643
<i>Fraxinus ornus</i>	1597	12	Yes	Yes	Yes	GU991700	HM130644
<i>Fraxinus ornus</i>	1887	19	Yes	Yes	Yes	GU991701	HM130645
<i>Fraxinus ornus</i>		58	Yes	Yes			
<i>Fraxinus ornus</i>		274	Yes				
<i>Fraxinus ornus</i>	MOSOR1	286	Yes				
<i>Fraxinus ornus</i>	MOSOR2	287	Yes				
<i>Fraxinus oxycarpa</i>	1987.1215*A	214	Yes	Yes			
<i>Fraxinus pallisiae</i>		103	Yes	Yes			
<i>Fraxinus pallisiae</i>	1982.0951*A	217	Yes	Yes			
<i>Fraxinus pallisiae</i>	1982.0951*B	218	Yes	Yes			
<i>Fraxinus pallisiae</i>	1034-1976	252	Yes	Yes			
<i>Fraxinus papillosa</i>	714886	22		Yes			
<i>Fraxinus papillosa</i>	1541	280	Yes	Yes			
<i>Fraxinus paxiana</i>		59	Yes	Yes			
<i>Fraxinus paxiana</i>		60	Yes	Yes			
<i>Fraxinus paxiana</i>		112	Yes	Yes			
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>		104	Yes	Yes			
<i>Fraxinus pennsylvanica</i> ssp. <i>pennsylvanica</i>	1609	13		Yes	Yes	GU991702	HM130646

<i>Fraxinus pennsylvanica</i> ssp. <i>pennsylvanica</i>	1639	15		Yes		GU991703	
<i>Fraxinus pennsylvanica</i> ssp. <i>pennsylvanica</i>	3806	38	Yes	Yes		GU991704	HM130647
<i>Fraxinus platypoda</i>		55	Yes	Yes			
<i>Fraxinus platypoda</i>		107	Yes	Yes			
<i>Fraxinus platypoda</i>	253	174	Yes	Yes			
<i>Fraxinus platypoda</i>	254	175	Yes	Yes			
<i>Fraxinus platypoda</i>	255	176	Yes	Yes			
<i>Fraxinus platypoda</i>	256	177	Yes				
<i>Fraxinus platypoda</i>	257	178	Yes				
<i>Fraxinus platypoda</i>	258	179	Yes				
<i>Fraxinus platypoda</i>	259	180	Yes				
<i>Fraxinus platypoda</i>	260	181	Yes				
<i>Fraxinus platypoda</i>	261	182	Yes				
<i>Fraxinus platypoda</i>	262	183	Yes				
<i>Fraxinus platypoda</i>	19810042	250		Yes			
<i>Fraxinus potamophila</i>		52	Yes	Yes			
<i>Fraxinus profunda</i>	2003	30	Yes	Yes	Yes	GU991705	HM130648
<i>Fraxinus profunda</i>		125	Yes	Yes			
<i>Fraxinus profunda</i>	1993.1156*A	216	Yes	Yes			
<i>Fraxinus profunda</i>	OSN93-12-0041-10	249	Yes	Yes			
<i>Fraxinus profunda</i>	1251-2001	254	Yes	Yes			
<i>Fraxinus purpusii</i>	833610	18	Yes				
<i>Fraxinus quadrangulata</i>	518	4	Yes	Yes	Yes		HM130649
<i>Fraxinus quadrangulata</i>	519	5		Yes	Yes	GU991706	HM130650
<i>Fraxinus quadrangulata</i>		111	Yes	Yes			
<i>Fraxinus raibocarpa</i>		126	Yes				
<i>Fraxinus retusa</i> var. <i>henryana</i>	2162	27	Yes	Yes	Yes	GU991707	
<i>Fraxinus retusa</i> var. <i>henryana</i>		119	Yes				
<i>Fraxinus richardii</i>		127	Yes	Yes			
<i>Fraxinus sieboldiana</i>		114	Yes	Yes			
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	145	166	Yes				
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	146	167	Yes				
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	147	168	Yes	Yes			
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	148	169	Yes				

<i>Fraxinus sieboldiana</i>	150	170	Yes				
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	151	171	Yes				
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	152	172	Yes	Yes			
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	153	173	Yes	Yes			
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	1977.5390*Q	205	Yes	Yes			
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	880-1988	253	Yes	Yes			
<i>Fraxinus sikkimensis</i>		120	Yes				
<i>Fraxinus sogdiana</i>	1002-2003	259			Yes		
<i>Fraxinus</i> sp.		211	Yes				
<i>Fraxinus</i> sp.		70	Yes	Yes			
<i>Fraxinus</i> sp.		71	Yes	Yes			
<i>Fraxinus</i> sp.	1977.5154	235	Yes	Yes			
<i>Fraxinus</i> sp.	1977.5155	236	Yes	Yes			
<i>Fraxinus spaethiana</i>	3825	46	Yes	Yes	Yes	GU991712	
<i>Fraxinus spaethiana</i>	1977.5659*R	203	Yes	Yes			
<i>Fraxinus spaethiana</i>	1977.5614*W	204	Yes	Yes			
<i>Fraxinus spaethiana</i>	1977.5400*Q	208	Yes	Yes			
<i>Fraxinus syriaca</i>		57	Yes	Yes			
<i>Fraxinus syriaca</i>		116			Yes		
<i>Fraxinus syriaca/sogdiana</i>	2020	28	Yes	Yes	Yes	GU991713	
<i>Fraxinus syriaca/sogdiana</i>	2019	29	Yes	Yes	Yes	GU991710	HM130653
<i>Fraxinus syriaca/sogdiana</i>	3804	39	Yes	Yes	Yes	GU991711	HM130654
<i>Fraxinus texensis</i>		267	Yes	Yes			
<i>Fraxinus texensis</i>		269	Yes	Yes			
<i>Fraxinus tomentosa</i>	2001	32	Yes	Yes		GU991714	HM130655
<i>Fraxinus tomentosa</i>	5525	34	Yes	Yes	Yes	GU991715	HM130656
<i>Fraxinus tomentosa</i>		118	Yes				
<i>Fraxinus tomentosa</i>		129	Yes				
<i>Fraxinus tomentosa</i>	2298-1961	255	Yes	Yes			
<i>Fraxinus trifoliata</i>	17232*C2	241	Yes				
<i>Fraxinus trifoliata</i>	14849*B2	242			Yes		
<i>Fraxinus turkestanica</i>		130	Yes	Yes			
<i>Fraxinus uhdei</i>	19890759	247	Yes	Yes			
<i>Fraxinus uhdei</i>	3825 Fabian Way	260	Yes	Yes			

		1636 Edgewood Drive	263	Yes	Yes			
<i>Fraxinus uhdei</i>			265		Yes			
<i>Fraxinus uhdei</i>		1963-0485-P	266	Yes	Yes			
<i>Fraxinus uhdei</i>		1967-1367-P	275		Yes			
<i>Fraxinus velutina</i>		242	6		Yes	GU991719	HM130658	
<i>Fraxinus velutina</i>		241	7	Yes	Yes	Yes	GU991720	HM130659
<i>Fraxinus velutina</i>		219	10		Yes	Yes	GU991716	
<i>Fraxinus velutina</i>			63	Yes	Yes			
<i>Fraxinus velutina</i>			115		Yes			
<i>Fraxinus velutina</i> var. <i>coriacea</i>			64	Yes	Yes			
<i>Fraxinus velutina</i> var. <i>coriacea</i>		5942*B3	239	Yes	Yes			
<i>Fraxinus velutina</i> var. <i>coriacea</i>		15292*C2	240	Yes	Yes			
<i>Fraxinus velutina</i> var. <i>glabra</i>		1149	36	Yes	Yes	Yes	GU991717	
<i>Fraxinus velutina</i> var. <i>glabra</i>		1150	37	Yes	Yes	Yes	GU991718	HM130657
<i>Fraxinus velutina</i> var. <i>toumeyii</i>		1977.5304*W	206	Yes	Yes			
<i>Fraxinus velutina</i> var. <i>toumeyii</i>		1977.0656*U	227	Yes	Yes			
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i>			62	Yes	Yes			
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i>			113	Yes	Yes			
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i>		1986.2709*A	220	Yes	Yes			
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i> var. <i>dimorpha</i>		229	8	Yes	Yes	Yes	GU991721	
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i> var. <i>dimorpha</i>		259	9		Yes			HM130660
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i> var. <i>dimorpha</i>		3018	51	Yes	Yes			
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i> var. <i>dumosa</i>			67	Yes	Yes			
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i> var. <i>dumosa</i>		1978.1290*Q	200	Yes				
Outgroup								
<i>Jasminum nudiflorum</i>		NC008407		JNC0000- JNC0005	JNC1250- JNC1260	JNC00 24	JNC0253	JNC0181

2.4 Conclusions

Le protocole standard testé ici n'est pas efficace pour identifier des individus au niveau spécifique, que ce soit l'option 1 ou l'option 2. De plus, les espaceurs intergéniques *trnH-psbA* et *rpl32-trnL* ne permettent pas une identification des frênes au niveau de l'espèce.

Récemment, le CBOL Plant Working Group (2009) a proposé une combinaison de deux régions permettant l'identification de 72% des paires d'espèces testées. Parmi ces régions, la région *matK* a été testée dans notre étude, sans révéler de polymorphisme suffisant pour une identification, même partielle au niveau des espèces.

Même sans avoir testé l'ensemble des régions possibles pour le code-barre moléculaire, il apparaît clairement, en combinant nos résultats avec les précédentes études sur l'évolution des séquences d'ADN chloroplastique chez le genre *Fraxinus* (Gielly et Taberlet, 1994) qu'aucune région du génome chloroplastique n'est suffisamment variable et informative pour délimiter clairement, totalement et simplement les différentes espèces du genre *Fraxinus*.

Le code-barre d'ADN chloroplastique, tel qu'il est actuellement proposé, ne répond donc pas au principal objectif d'un code-barre ADN, à savoir l'existence de séquence espèce-spécifique, car la même séquence peut être partagée par plusieurs espèces, voire même différentes sections.

L'utilisation de régions telles que les espaceurs internes transcrits ou les espaceurs externes transcrits, parmi les plus variables dans le génome nucléaire et largement utilisées en phylogénie, voire pour des études populationnelles, semble être mieux indiquée, et surtout beaucoup plus efficace. Le principal problème est la présence de paralogues, surtout chez des espèces fréquemment hybridées, où l'évolution concertée typique de ces régions ne permet pas de revenir assez rapidement à la séquence « type » de l'espèce. On peut cependant résoudre ce problème en utilisant des algorithmes de reconstruction de phase (PHASE, HAPAR, FastPHASE, etc.), afin de retrouver les espèces parentales.

Le code-barre moléculaire chez les plantes, en dépit de son utilité indéniable pour les non-spécialistes, se heurte encore à des difficultés liées au choix des séquences les plus utiles et les plus universelles, mais aussi à la difficulté intellectuelle à concevoir que le code-barre chez les plantes puisse ne pas être totalement universel, en privilégiant un choix de séquences spécifiques à un niveau systématique (une combinaison pour un ordre, une autre pour un autre). Contrairement à ce que l'on observe chez les animaux, le choix d'une (ou plusieurs)

régions code-barre pourrait bien représenter une quête du Graal pour les botanistes (Rubinoff *et al.*, 2006).

2.5 Références de l'introduction et des conclusions

- Brown, W.M., George, M., Jr., Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 1967-1971.
- CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12794-12797.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., van den Berg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L., Wilkinson, M., 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56, 295-299.
- Gielly, L., Taberlet, P., 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11, 769-777.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R., 2003b. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 313-321.
- Kress, W.J., Erickson, D.L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One* 2, e508.
- Laroche, J., Li, P., Maggia, L., Bousquet, J., 1997. Molecular evolution of angiosperm mitochondrial introns and exons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5722-5727.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Ragupathy, S., 2006. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 84, 335-341.
- Rubinoff, D., Cameron, S., Will, K., 2006. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *Trends in Ecology and Evolution* 21, 1-2.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L., 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94, 275-288.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermet, T., Corthier, G., Brochmann, C., Willerslev, E., 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* 35, e14.
- Wolfe, K.H., Li, W.H., Sharp, P.M., 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9054-9058.

3 Phylogénie mondiale du genre *Fraxinus*

3.1 Introduction

La phylogénie (du grec φῦλον *phylon* « tribu, race » et γεννάω, *gennan* « générer », former) est l'étude de l'évolution des êtres vivants afin de déterminer leur lien de parenté. Ces liens de parentés sont souvent, depuis Darwin et la publication de *l'Origine des Espèces*, représentés sous forme d'un « arbre » phylogénétique, dans lequel les espèces sont les « feuilles » en bout de « branches ». Dans cette représentation, les événements de spéciation interviennent au niveau des dichotomies, ou nœuds. L'arbre phylogénétique suppose que l'évolution est irréversible, c'est-à-dire que deux espèces divergent définitivement, sans possibilité de dé-différenciation secondaire. Les premières phylogénies étaient basées sur des caractères morphologiques (qualitatif – présence/absence d'une structure, quantitatif – dimensions d'une structure, nombre d'éléments d'un organe, etc.), ainsi que sur une approche de parcimonie (l'histoire évolutive vraie est celle qui nécessite le moins d'hypothèses de transformations *ad hoc* pour expliquer les données observées). Mais, depuis l'invention de la réaction de polymérase en chaîne (PCR) (Saiki *et al.*, 1988), la facilité d'usage permise par la détermination des séquences nucléotidiques tend à remplacer l'analyse de caractères morphologiques, ayant une héritabilité souvent complexe et parfois plus difficile à discrétiser « objectivement ». Dans la plupart des cas étudiés, les phylogénies morphologiques et moléculaires se sont avérées congruentes à l'échelle familiale ou supérieure (Bousquet *et al.*, 1992; Patterson *et al.*, 1993) mais plus rarement aux échelles inférieures (Hundsdoerfer *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2007).

Il faut de plus garder à l'esprit les biais pouvant résulter de l'analyse moléculaire. Par exemple, la question de l'homologie des séquences (identification des paralogues potentiels), mais aussi des caractères utilisés (biais d'alignement), semble plus critique dans les analyses moléculaires que dans la reconstruction de phylogénies morphologiques (quoique l'homoplasie soit un problème souvent difficile à détecter chez les caractères morphologiques, i.e. l'évolution récurrente du même caractère; également, la plasticité phénotypique intraspécifique, entourant tout caractère morphologique), de même que la détection de transfert horizontal (Brocchieri, 2001). Il existe également des biais possibles liés aux méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques, soit dus à une simplification excessive des modèles d'évolution de caractères (Zhang, 1999), soit à des problèmes d'estimation de la robustesse des résultats *via* par exemple la méthode de « bootstrap ». En effet, le bootstrap

(ré-échantillonnage aléatoire avec remise des caractères de la matrice pour former une nouvelle matrice perturbée) requiert des taux d'évolution égaux ainsi que des nucléotides distribués indépendamment dans le jeu de données, ce qui n'est pas toujours le cas avec les séquences nucléotidiques (Brocchieri, 2001). Enfin, les méthodes de reconstruction d'arbres elle-même présentent des différences qui peuvent modifier l'interprétation des résultats. Ainsi, dans une méthode « model-based » tel que le maximum de vraisemblance (ML) la topologie et les longueurs de branches sont traitées comme des paramètres du modèle, alors que la méthode d'inférence bayésienne (MIB) les considère comme des variables aléatoires (Douady *et al.*, 2003). Les méthodes basées sur des modèles (ML) sont en outre très consommatrices en temps de calcul informatique, car l'arbre le plus vraisemblable doit d'abord être estimé, avant que la robustesse des nœuds puisse être calculé par des méthodes non-paramétriques tels que le bootstrap. Lors de l'analyse bayésienne d'une matrice de caractères, l'arbre ayant la probabilité postérieure maximale et l'estimation de l'incertitude des nœuds sont produits simultanément, en un temps d'analyse raisonnable. De plus, les probabilités postérieures (PP) et les valeurs de bootstrap sous-estiment l'exactitude phylogénétique (la vraie probabilité de retrouver les clades observés), et apparaissent donc comme des mesures conservatives de la robustesse d'un arbre phylogénétique (Wilcox *et al.*, 2002). Toutefois, il a été montré que les PP fournissent une estimation plus proche de la vraie probabilité de retrouver les clades observés (Wilcox *et al.*, 2002). Nous considérerons donc ci-après des nœuds ayant des PP supérieures à 0,7 comme modérément soutenus, et des PP supérieures à 0,9 comme hautement soutenus.

La construction d'une phylogénie pour un groupe particulier peut avoir différentes utilités. La plus courante, mais aussi la plus ancienne, est de servir de base à la systématique, qui doit être « naturelle » au sens de Darwin, c'est-à-dire représenter les liens de filiation entre espèces, mais aussi délimiter ces espèces. Elle peut aussi être utile pour l'étude de l'évolution d'un ou plusieurs caractères particuliers dans un groupe, comme l'évolution de la morphologie florale (Jabbour *et al.*, 2008; Wallander, 2008), ou l'évolution du système de reproduction par exemple. La phylogénie permet enfin de décrire l'histoire évolutive d'un groupe, d'en retracer la biogéographie, afin d'étudier les facteurs ayant influencé les différentes spéciations et dispersions.

Le but de notre étude est de clarifier les relations phylogénétiques à l'échelle du genre, et de produire une phylogénie robuste qui pourra être utilisée comme base de travail pour les études d'évolution de différents caractères phénotypiques dans le genre *Fraxinus*, et aussi

pour retracer les événements de dispersion et de spéciation ayant abouti aux espèces et aux distributions observées aujourd'hui.

Les espèces de frêne ne pouvant être distinguées de manière fiable à l'aide de marqueurs de l'ADN chloroplastique (voir Chapitre 1), il a été nécessaire de nous tourner vers des régions du génome nucléaire, potentiellement plus variables chez les angiospermes (Laroche *et al.*, 1997). Les espaceurs internes transcrits (nITS) et les espaceurs externes transcrits (nETS) sont depuis une dizaine d'années des régions de prédilection pour les taxonomistes moléculaires (Baldwin et Markos, 1998; Franzke et Mummenhoff, 1999; Clevinger et Panero, 2000; Li *et al.*, 2002; Andreasen et Baldwin, 2003; Becerra, 2003; Acevedo-Rosas *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2005; Chaw *et al.*, 2005; Denk et Grimm, 2005; Wallander, 2008; Havill *et al.*, 2009; Soltis *et al.*, 2009; Urbatsch *et al.*, 2009). Leur présence en un grand nombre de copies dans le génome nucléaire rend leur amplification presque aussi aisée que celles des régions de l'ADN chloroplastique, tandis que l'évolution concertée (élimination d'une mutation sur une copie, ou fixation sur l'ensemble des copies du génome) qu'ils subissent réduit grandement le risque lié aux nombreuses copies présentes de retracer l'histoire des paralogues (membres d'une même famille de gènes) et non celle des espèces (Campbell *et al.*, 2005; Soltis *et al.*, 2009).

Les gènes nucléaires présents en faible nombre de copies codants pour des protéines sont une autre source d'informations utiles pour l'inférence de l'évolution d'espèces proches d'angiospermes (DeBry et Sagel, 2001; Ishida et Green, 2002; Grob *et al.*, 2004; Takishita *et al.*, 2004; Winkworth et Donoghue, 2004; Álvarez *et al.*, 2005; Lihova *et al.*, 2006), car ils permettent de retracer l'histoire des espèces de manière moins équivoque que l'analyse de régions de l'ADN chloroplastique ou mitochondrial. En effet, les gènes nucléaires ont une héritabilité biparentale, contrairement aux mitochondries et chloroplastes qui sont hérités maternellement chez la plupart des angiospermes et dans le genre *Fraxinus* en particulier (Morand-Prieur *et al.*, 2002). Cette double héritabilité permet de détecter plus facilement les hybridations potentielles. Par ailleurs, les gènes et plus encore les introns de gènes ou les régions intergéniques nucléaires présentent généralement des taux de substitution plus élevés que leurs équivalents mitochondriaux ou chloroplastiques (Wolfe *et al.*, 1987; Laroche *et al.*, 1997). Nous avons testé plusieurs loci dans le genre *Fraxinus*. La plupart présentant des problèmes d'amplification (*floricaula*, *frigida*, *adh*, *waxy*), de séquençage (*chi*, *tpi*, *pgi*, *waxy*) ou de variabilité (*g3pdh*), seuls les nITS, nETS et *phantastica* se sont révélés utiles, c.à.d. amplifiables sur un nombre suffisant d'individus d'un nombre suffisant d'espèces, pouvant être séquencés directement par la méthode de Sanger et alignés sans ambiguïté, et enfin

suffisamment variables. Le gène *phantastica* (Phan) est un gène codant pour un facteur de transcription impliqué dans la formation des feuilles d'un grand nombre d'espèces, dont *Fraxinus americana*. Par exemple, une sous-expression de ce facteur de transcription permet de produire des feuilles palmées (type cannabis) au lieu de feuilles pennées (type frêne) (Kim *et al.*, 2003; voir Eckardt, 2004 pour une revue du rôle de *phantastica*). Il est par ailleurs dépourvu d'introns qui pourraient rendre l'amplification incertaine.

Ces séquences de loci nucléaires ont été combinées avec les séquences de loci chloroplastiques du chapitre 1 (*rpl32-trnL* et *trnH-psbA*), au niveau d'analyses phylogénétiques par locus ou d'une analyse combinant l'ensemble des loci séquencés.

3.2 The phylogeny of the genus *Fraxinus* based on plastid, nuclear ribosomal and nuclear low-copy DNA

Hinsinger, D.D.^{1,2,3,4}, Gaudeul, M.⁵, Cruaud, C.⁶, Frascaria-Lacoste, N.^{1,2,3} and Bousquet, J.⁴

¹ AgroParisTech, UMR 8079, 91405 Orsay, France

² Centre national de la recherche scientifique, UMR 8079, 910405 Orsay, France

³ Université de Paris XI, UMR 8079, F-91000 Orsay, France Orsay, France

⁴ Chaire de recherche du Canada en génomique forestière et environnementale, Centre d'étude de la forêt, Université Laval, Québec, Québec, Canada G1V 0A6

⁵ Genoscope, Centre national de séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, C.P. 5706, 91057 Evry Cedex, France

⁶ Département systématique et évolution et Service de systématique moléculaire, Muséum national d'histoire naturelle, 43 rue Cuvier, 75231 Paris, France

Correspondence: Damien D. Hinsinger Fax: +33 01 69 15 73 53

E-mail: damien.hinsinger@u-psud.fr

Cet article sera soumis à la revue *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Damien D. Hinsinger a collecté les échantillons, réalisé le travail de laboratoire, les analyses, et la rédaction de l'article, Myriam Gaudeul a participé à la rédaction de l'article, Corinne Cruaud a réalisé le séquençage des résultats d'amplification, Nathalie Frascaria-Lacoste et Jean Bousquet ont initié le projet et participé au choix des stratégies d'analyse, ainsi qu'à la rédaction de l'article.

3.2.1 Résumé

Le genre *Fraxinus* comprend environ 45 espèces d'arbres et d'arbustes de zones tempérées, colonisant des habitats variés de l'hémisphère Nord. De précédentes études basées sur les espaceurs internes transcrits nucléaires (nITS) n'étaient pas claires au sujet de la phylogénie du genre, incluant plusieurs espèces en *incertae sedis*, rendant floue la séquence d'événement de dispersion, potentiellement informative. Nous avons utilisé les espaceurs externes transcrits nucléaires, la séquence partielle du gène *phantastica* et deux loci chloroplastiques (*trnH-psbA* et *rpl32-trnL*) combinés avec des séquences nITS nouvelles et publiées pour produire une phylogénie fiable et robuste du genre. Nos résultats montrent que toutes les espèces précédemment classées en *incertae sedis* devraient être incluses dans la section *Melioides*, malgré leur répartition Asiatique. Cette disjonction phylogéographique de la section *Melioides* représente un des deux événements majeurs de dispersion observés dans le genre, l'autre correspondant à l'origine d'un groupe comprenant toutes les autres espèces Eurasiatique (sections *Sciadanthus*, *Fraxinus*, et *Ornus*). L'utilisation de cette phylogénie robuste augmentera la fiabilité de futures études s'intéressant à l'évolution de caractères comme la morphologie florale ou les préférences écologiques dans le genre.

3.2.2 Abstract

The genus *Fraxinus* comprised about 45 species of temperate trees and shrubs colonizing various habitats in the Northern hemisphere. Previous analyses based on the internal nuclear ribosomal spacers (nITS) were unclear about the phylogeny of the genus, with many species classified as *incertae sedis*, blurring the potentially informative dispersal events. We used nuclear external transcribed spacers (nETS), partial *phantastica* gene sequences and two chloroplastic loci (*trnH-psbA* and *rpl32-trnL*) in combination with previously published and newly sequenced nITS sequences to produce a robust and reliable phylogeny of the genus. Our results show that all the *incertae sedis* species should be included in the *Melioides* section, despite their Asian repartition. This phylogeographic disjunction in the section *Melioides* represents one of the two major dispersal events found in the genus, the other being found at the base of the group comprising all the other old world species (sections *Sciadanthus*, *Fraxinus*, and *Ornus*). This robust phylogeny should improve the reliability of future studies of the evolution of characters such as floral morphology or habitat preference in the genus.

3.2.3 Introduction

The genus *Fraxinus* comprises 43 recognized species (Wallander, 2008) and is distributed widely in the northern hemisphere. It presents a large range of morphologies (shrubs to trees; not compound to compound leaves; etc.) and occurs in diverse habitats (semi-deserts to sub-tropical or temperate environments, sea level to sub-alpine altitudes).

The phylogeny of *Fraxinus* has been the subject of several studies using sequences of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer region (nITS) (Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008) and, at a lower intensity, cpDNA sequences (Gielly and Taberlet, 1994; Wallander, 2008). The monophyly of the genus in the tribe Oleaceae has been confirmed (Wallander and Albert, 2000). However, when considering the phylogenies obtained, many characters such as floral morphology, breeding systems and polyploidy appeared to have evolved several times (Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008). Therefore, these characters should be used carefully in the systematic treatment of the genus.

Jeandroz *et al.* (1997) proposed two hypotheses for the geographic origin of the genus, with a preference for a North American ancestor, which was the most parsimonious hypothesis, in agreement with known oldest fossils attributed to the genus (Call and Dilcher, 1992; Magallon-Puebla *et al.*, 1999; Manchester, 1999). In relation to this North American origin, they inferred two dispersal events from North America, likely during periods of warmer climate (Jeandroz *et al.*, 1997), though their inferences could not be linked precisely to paleoclimatic data or precise geological era. Wallander (2008) showed that dioecy would have had three separate origins, in each case posterior to a transition from insects to wind pollination. She presented a new classification of the genus that we retained in this study, and where the genus is divided into six sections. Three species (*F. cuspidata*, *F. spaethiana*, *F. chiisanensis*) remained unclassified (*incertae sedis*), because of their uncertain phylogenetic position (Wallander, 2008).

Three major issues remain unresolved with respect to *Fraxinus* phylogeny and classification.

First, the relationship between the species classified as *incertae sedis* (*F. chiisanensis*, *F. cuspidata*, *F. spaethiana*) and other sections remain unresolved. Such poor resolution may indicate that the early diversification of the genus has occurred via a rapid radiation, or that the sequence of the marker used simply lacks resolution. In both cases, the phylogenetic analysis of additional loci is warranted.

Second, several cases of incongruence were identified in previous phylogenetic studies. For example, using nITS sequences, Jeandroz *et al.* (1997) and Wallander (2008) showed that *F. platypoda* was closely related to *F. mandshurica*, an other North-East Asian species, contrary to previous morphological studies that placed this species in the section *Melioides*. Moreover, Wallander (2008) observed no reciprocal monophyly for these species, suggesting they could be conspecific. Adding additional individuals from these species and sequencing other nuclear regions appear necessary to shed light on such cases of incongruence.

Third, the relationships among species in some sections are still poorly resolved. The most complete phylogeny of the genus (Wallander, 2008) showed that although some of the morphological species were retrieved as monophyletic groups, many species in the section *Melioides* appeared to be unresolved or paraphyletic. Adding more individuals from problematic species should be helpful in order distinguish among incomplete lineage sorting (Bouillé and Bousquet, 2005; Willyard *et al.*, 2009), reticulate evolution (Rieseberg and Brouillet, 1994; Hamzeh and Dayanandan, 2004) and/or misidentification of arboretum specimens. For instance, the inclusion of hybrids or misidentified individuals should result in clades containing a majority of individuals of the same species, with some specimens identified as from other species; *a contrario*, no clear or majority-rule delineation should be expected in the case of incomplete lineage sorting.

The aim of this study was to reconstruct the phylogeny of *Fraxinus* using the sequences of five DNA loci to better assess the relationships among the sections of the genus and species groups, and to understand better the causes for the incongruence between phylogenies and morphological classifications. A more robust phylogeny will be helpful to understand better the evolution of phenotypic characters and to distinguish between parallel or convergent evolution from common ancestry.

To reconstruct the phylogeny of *Fraxinus*, we sequence two cpDNA intergenic regions (*trnH-psbA* and *rpl32-trnL*), both the nuclear ribosomal nITS and nETS regions, and the nuclear low-copy gene *phantastica*. Of these five loci, three have been used previously in studies of *Fraxinus*. For example, sequences of the *trnH-psbA* and *rpl32-trnL* loci have been tested as a possible barcode system for the genus *Fraxinus* (Arca *et al.*, submitted), whereas nITS sequences have been used in previous phylogenetic analyses of the genus (Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008). nETS sequences have been used at the species level in showing an ancient transcontinental reticulation between the Asian species *F. mandshurica* and the Mediterranean species *F. angustifolia* (Hinsinger *et al.*, submitted). One additional objective

of this study was to compare the phylogenies obtained from drastically different loci, the repeated ribosomal regions, cpDNA intergenic regions and a low-copy nuclear gene.

3.2.4 Materials and Methods

3.2.4.1 Plant material

Fraxinus individuals from 40 species (*sensu* Wallander, 2008), representing almost the complete genus, were sampled both in arboreta and herbaria (see suppl. Table I), or were collected in the wild. Outgroups from the Oleaceae were selected according to Wallander and Albert (2000) (see suppl. Table I). For each sample, 50 mg of fresh leaves were dehydrated in an alcohol/acetone 70:30 solution, and dried stored. DNA extraction was done using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) following the instructions of the manufacturer.

3.2.4.2 Sequence datasets

3.2.4.2.1 Chloroplast sequences

Both *trnH-psbA* and *rpl32-trnL* sequences were from Arca *et al.* (submitted), and were concatenated to construct a chloroplastic dataset.

3.2.4.2.2 Nuclear ribosomal spacers (nETS and nITS)

SST-ETS (GGC WTG TKT GGG TAT GTT GGA T) and 18S-ETS (ACT TAC ACA TGC ATG GCT TAA TCT) primers previously used in *Syringa* (Oleaceae) (Li *et al.*, 2002) successfully amplified *Fraxinus* samples. For some difficult samples, the primers ETS-F1 (ATG CCT GTT CAT TGG ATG) and ETS-R1 (AAG YCC AVV ACR AGG ARG) were designed *de novo* for this study. The PCR reaction mix contained two units of Taq DNA polymerase MP-Biomedical ®, 1X Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of dNTPs, 1 μM of each primer, 0.1mg/ml of DMSO and 30 ng of DNA template in a 25 μl final volume. All reactions were run under the following thermal cycle program: 2 min at 94°C, 5 cycles of 15s at 94°C, 30s at 57°C and 30s at 72°C, with a touch-down of -1°C per cycle, followed by 50 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 52°C, and 30 s at 72°C, and finally 7 min at 72°C. Reactions

were performed in a Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplified PCR products were checked on 1.5 % agarose gels in order to verify PCR quality and stored at 4°C.

In addition to Genbank sequences from Wallander (2008), nITS sequences for some individuals were generated using the primers ITS4 and ITS5 (Wojciechowski *et al.*, 1993; Nickrent *et al.*, 1994), according to the reaction protocol of Wallander (2008). For some more difficult samples, nITS1 and nITS2 were separately amplified using primer pairs ITS1/ITS6 and ITS7/ITS8 (Jeandroz *et al.*, 1997). The amplified PCR products were checked on 1.5 % agarose gels to verify PCR quality and stored at 4°C, until sequencing.

3.2.4.2.3 *Phantastica*

The preliminary amplification and sequencing of several nuclear regions (e.g. *floricaula*, *frigida*, *adh*, *waxy*, *chi*, *tpi*, *pgi*, *waxy*, *g3pdh*) revealed that the *phantastica* gene was sufficiently conserved to be confidently aligned across the Oleaceae and at the same time, variable enough to resolve relationships in the genus *Fraxinus* (Hinsinger, unpublished). *Phantastica* is coding for a transcription factor that has been showed to be involved in leaf morphology, in growth, and in the dorsoventrality of lateral organs in *Anthirrhinum* (Waites *et al.*, 1998). It has also been shown to determine leaflet placement in compound leaves of various angiosperms, notably in *F. americana* (Kim *et al.*, 2003).

Phan-F (TGTAACGACGGCCAGGGGTAAGTGGTGGGAGGTTT) and Phan-R (CAG GAAACAGCTATGACCCGACTCGAGTTGCTGTTC) primers (Basak J., unpublished data) were used to amplify a \approx 625bp long fragment. PCR reactions mix contained two units of Taq DNA polymerase MP-Biomedical®, 1X Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of dNTPs, 1 μ M of each primer, 0.1mg/ml of DMSO and 30 ng of DNA template for a 25 μ l final volume. All reactions were run under the following thermal cycle program: 2 min at 94°C, 5 cycles of 15s at 94°C, 30s at 62°C and 30s at 72°C, with a touch-down of -1°C per cycle, followed by 50 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 57°C, and 30 s at 72°C, and finally 7 min at 72°C. Reactions were performed in a Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplified PCR products were checked on 1.5 % agarose gels in order to verify PCR quality and stored at 4°C.

All sequencing was performed at the Génoscope facilities-Centre National de Séquençage (91000 Evry, France). PCR products were purified using exonucleaseI and phosphatase, and sequenced using BigDyeTerminator V3.1 kit (Applied biosystem) and an

ABI3730XL sequencer. All regions were sequenced for both DNA strands to confirm accuracy of each sequence. The standard M13 primers were used for *phantastica* sequencing. All new sequences have been deposited in Genbank under Accession ...to ... (nETS),to.... (nITS), and ... to ... (*phantastica*). Sequences from Genbank and new sequences for nITS were combined in a “nITS dataset” encompassing 43 species.

3.2.4.3 Sequences analysis

Sequence alignment and contigs were checked using CodonCode Aligner version 1.6.3 (Codon Code Corporation), and manual alignment was conducted using Se-AL. Datasets were analysed separately, and then concatenated and considered altogether in a “total evidence” analysis. Aligned sequences for haplotypes were used to construct Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference Method (BIM) trees. ML trees were constructed using PhyML (Guindon and Gascuel, 2003), not considering the indels, with GTR substitution model and software-estimated parameters, with all individuals, for a total of 302 individual sequences. Bootstrap values were estimated with 1000 pseudo-replicates. Bayesian analyses were performed on reduced datasets using MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). The reduced dataset was created using one individual per species recognized by Wallander (2008), the individual being chosen according to its placement in the ML tree. Doing otherwise would have resulted in considered the whole 302 individual sequences, which would have been too time consuming for Bayesian analyses. We chose individuals for which the position was biologically coherent, grouping with other individuals from the same species in the ML tree. For some species in some analyses, we chose a different individual from the ML analysis due to the absence of the previously selected individual in a particular dataset. The newly chosen individual was chosen in the same specific group than the individual it replaced. When it happened, the species was noted without any individual number in the resulting tree.

We choose to used a GTR + I + Γ model for using in MrBayes, which have been proved to better estimates the branch length than more complex models (Sullivan and Joyce, 2005) and to not influence the nodes probabilities, even in over-parameterized analysis (Huelsenbeck and Rannala, 2004). The model employed the 6 substitution types ("nst=6") with rate variation across sites modelled using a gamma distribution, with a proportion of sites being invariant (rates="invgamma"). The Markov chain Monte Carlo search was run with 4 chains for 20 000 000 generations, with trees begin sampled every 100 generations (the first 2 000 000 trees were discarded as "burnin").

Table 3.1. Sequence variation and parameters of phylogenetic analyses for various datasets in the genus *Fraxinus*. PP > 0.50: number of nodes with posterior probability > 0.50 in Bayesian analyses ; PP > 0.90: number of nodes with posterior probability > 0.90 in Bayesian analyses. Only the nodes corresponding to the genus *Fraxinus* were considered for statistics about node support.

Sequence dataset	Length	Number of variable sites		Number of informative sites		Numbe of nodes with support	
			(%)		(%)	PP > 0.50	PP > 0.90
cpDNA	1721	223	(12.9)	94	(5.5)	19	6
nITS	676	170	(25.1)	142	(21.0)	34	27
nETS	480	170	(35.4)	112	(23.3)	26	16
<i>phantastica</i>	627	146	(23.3)	48	(7.7)	17	15
Combined	3504	709	(20.2)	396	(11.3)	36	32

3.2.5 Results

Levels of sequence polymorphisms and tree resolution per region analysed are shown in Table 3.1. Because ML trees (not shown) and Bayesian trees were largely congruent, only the Bayesian trees are presented and ML bootstrap values have been added on the Bayesian trees.

3.2.5.1 Analysis of separate datasets

3.2.5.1.1 CpDNA intergenic regions

The Bayesian tree showed moderate support for the nodes of interest (Fig. 3.1). The section *Fraxinus* was monophyletic (posterior probability –PP– of 0.99), whereas the sections *Ornus* was monophyletic (PP of 0.79), except that *F. micrantha* was placed in the basal polytomy of the genus. *F. floribunda* and *F. griffithii* grouped together (PP of 0.93), but as a sister clade to the rest of the genus *Fraxinus* (PP for the rest of *Fraxinus*: 0.61). *F. xanthoxyloides* (section *Sciadanthus*) was placed as a sister taxa to the section *Fraxinus*, with relatively high support value (PP of 0.65). The section *Ornus* was regrouped with both the sections *Fraxinus* and *Sciadanthus* (PP of 0.72). The section *Melioides* was monophyletic (PP of 0.76), except that *F. papillosa* was regrouped with the outgroup *Ligustrum*. *F. platypoda* was regrouped with *F. spaethiana* (PP of 0.89), with *F. chiisanensis* as sister taxon (PP of 0.76). These three species were placed as a sister clade to the section *Melioides* (PP of 0.52) and the other *incertae sedis* species, and *F. cuspidata* appeared in the basal polytomy of the genus. Two of the three species of the section *Dipetalae* (*F. anomala* and *F. quadrangulata*) were regrouped with high support value (PP of 0.92), the third species (*F. trifoliata* = *F. dipetala*) being placed in the basal polytomy. The section *Pauciflorae* did not

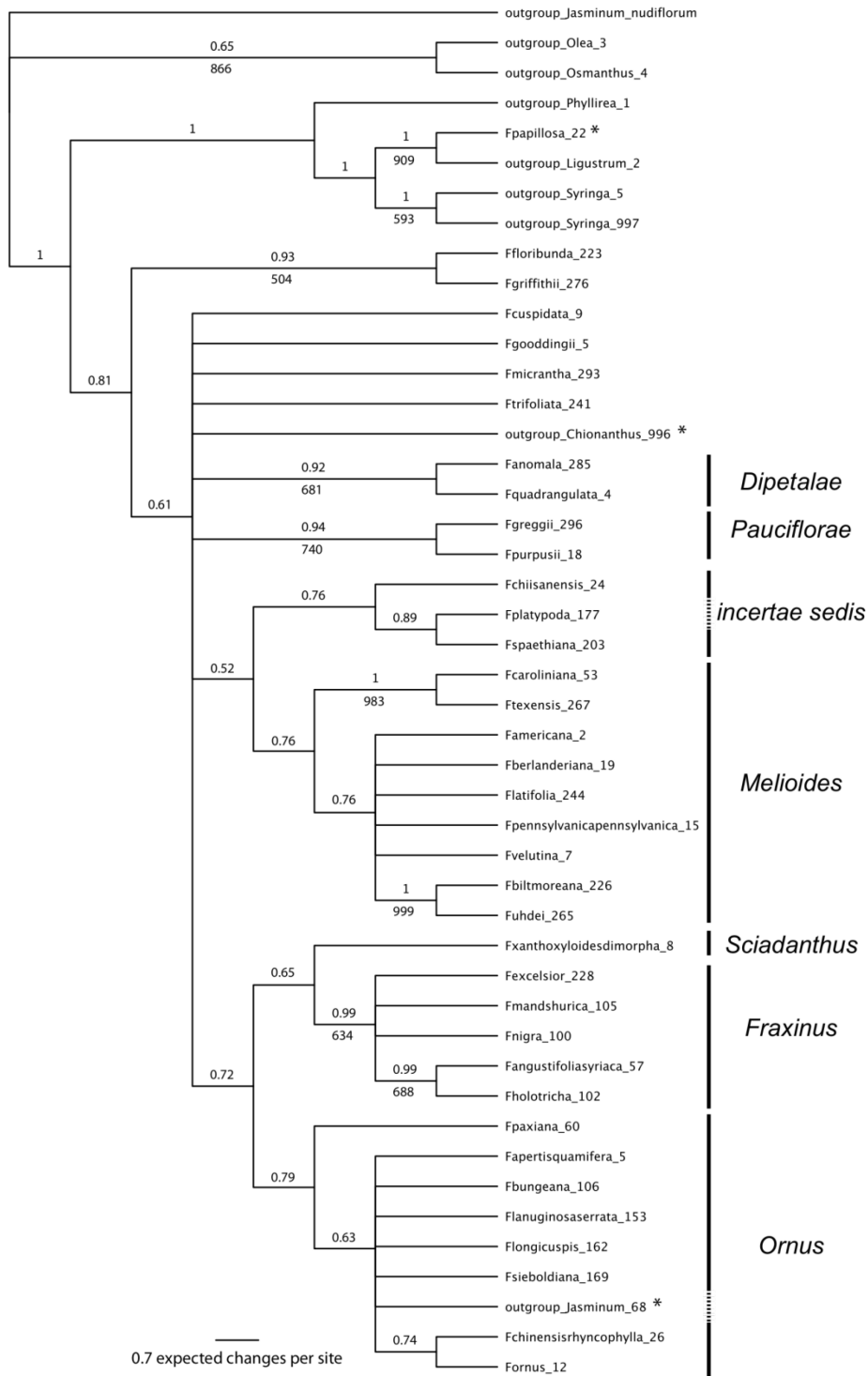


Figure 3.1. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of the cpDNA intergenic spacers dataset. Posterior probabilities > 0.50 are indicated above the branches, ML bootstrap values are indicated below the branches. Asterisk indicates a sequence clearly misplaced. Sections according to Wallander (2008) are indicated by vertical bars.

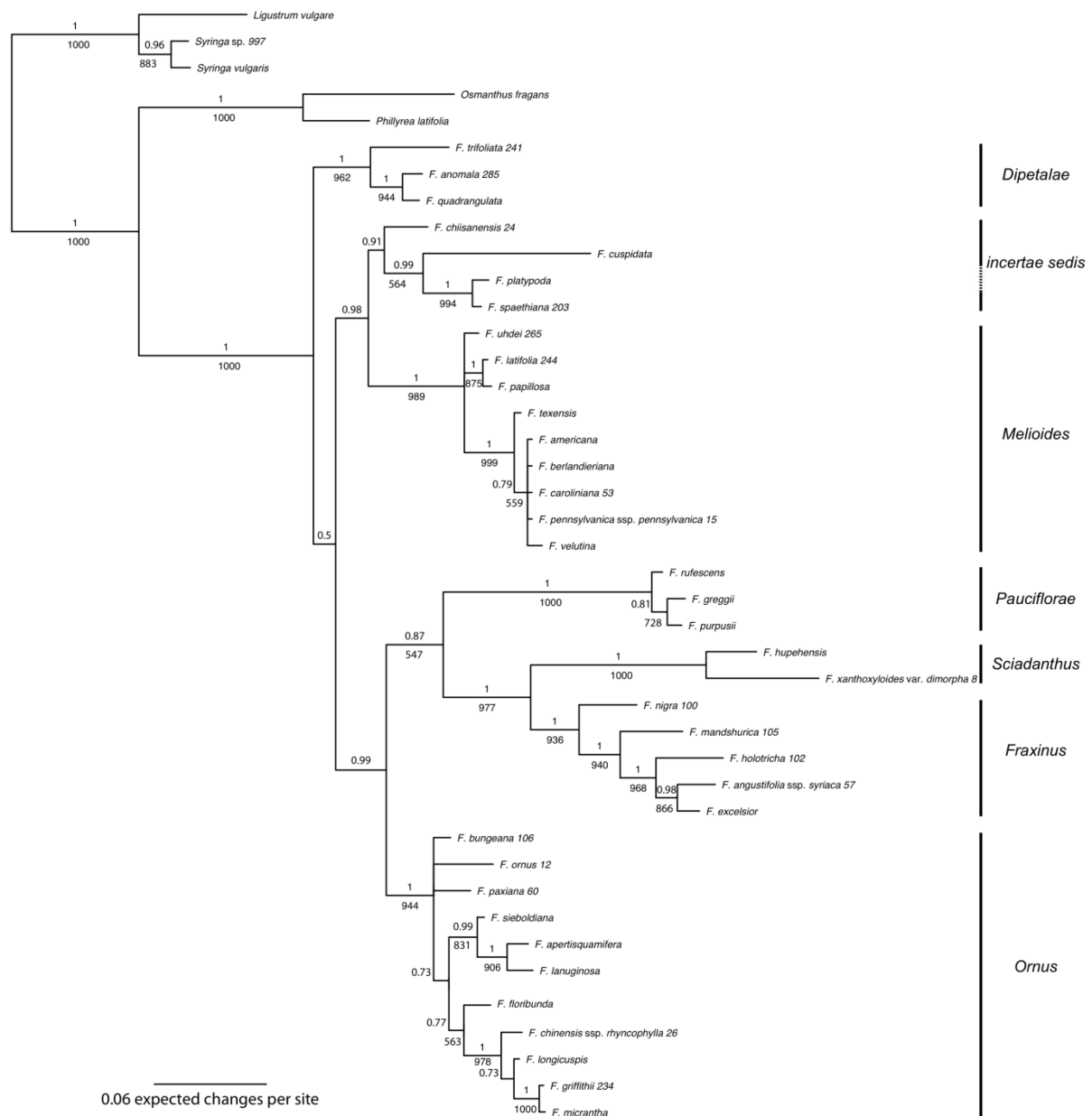


Figure 3.2. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of nITS dataset. Posterior probabilities >0.50 are indicated above the branches, ML bootstrap values are indicated below the branches. Sections according to Wallander (2008) are indicated by vertical bars.

showed evidence of paraphyly, with *F. greggii* and *F. purpusii* grouping together (PP of 0.94) and *F. gooddingii* placed in the basal polytomy. The group containing all *Fraxinus* species except *F. papillosa* was highly supported (PP of 0.81). Generally speaking, the phylogenies obtained with these cpDNA intergenic spacer sequences were not as well supported than the phylogenies obtained using nuclear DNA sequences. This is likely related to the lower sequence divergence noted for these cpDNA loci (Table 3.1).

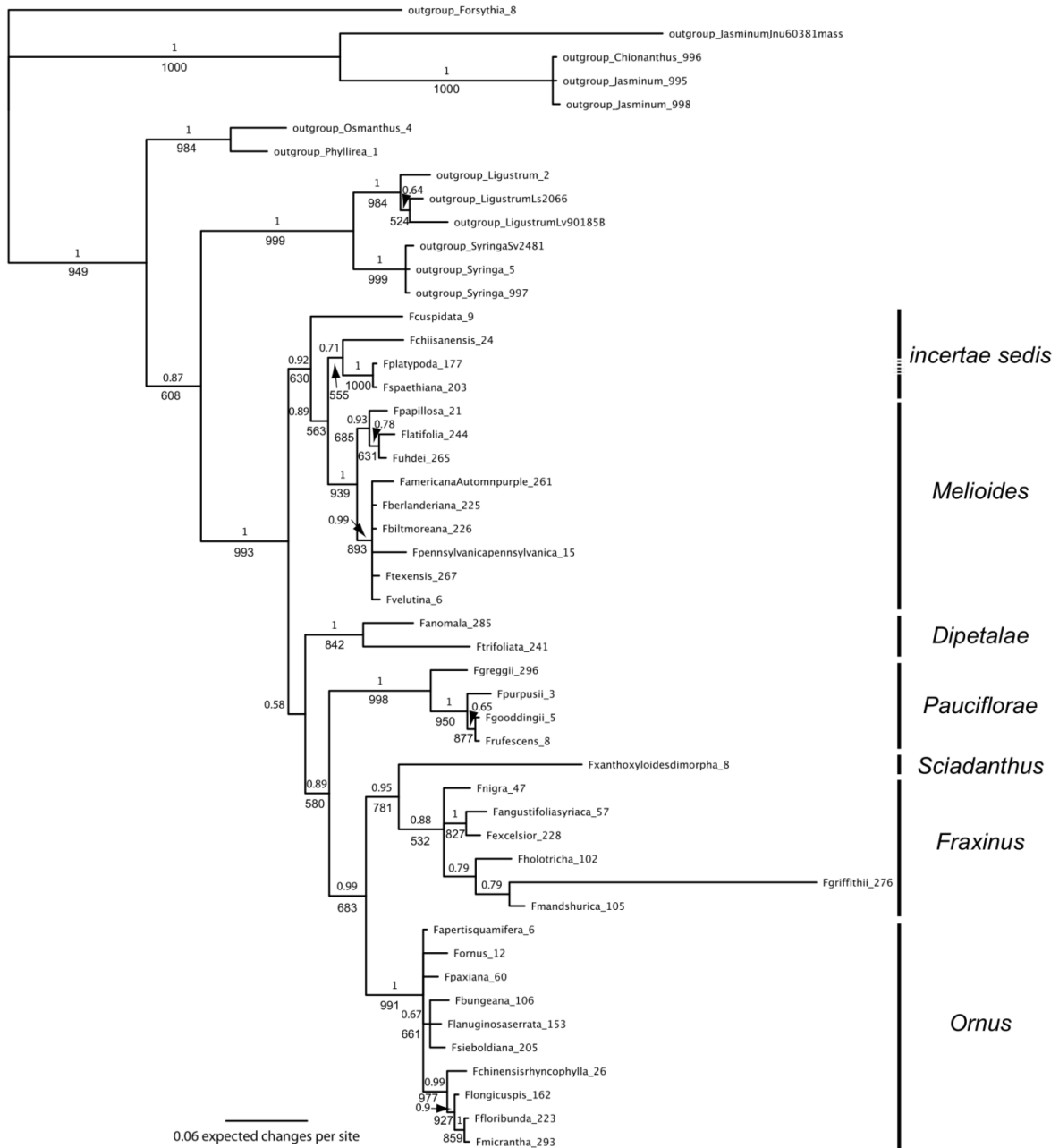


Figure 3.3. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of nETS dataset. Posterior probabilities > 0.50 are indicated above the branches, ML bootstrap values are indicated below the branches. Sections according to Wallander (2008) are indicated by vertical bars.

3.2.5.1.2 nITS

The Bayesian nITS tree (Fig. 3.2) was mostly congruent with a previously published study (Wallander, 2008), except for the placement of *F. platypoda* and the section *Pauciflorae*. *F. platypoda* formed a highly supported group (PP > 0.90) with the species classified as *incertae sedis* (*F. spaethiana*, *F. cuspidata*, and *F. chiisanensis*) and the section

Pauciflorae was closely related (PP of 0.87) to both the sections *Sciadhanthus* and *Fraxinus*. All nodes were highly (> 0.90) or moderately (> 0.70) supported, except the node supporting the basal position of the section *Dipetalae* (PP of 0.50). *F. americana*, *F. berlanderiana*, *F. caroliniana*, *F. pennsylvanica*, and *F. velutina* formed a moderately supported polytomy (PP of 0.79) in the section *Melioides*.

3.2.5.1.3 nETS

The Bayesian tree showed a strong support for nodes of interest (Fig. 3.3). The genus *Fraxinus* appeared to be split in two groups, one containing the species of section *Melioides* and the species previously classified as *incertae sedis* (Wallander, 2008) (PP of 0.92), and the other regrouping section *Dipetalae*, *Pauciflorae*, *Sciadhanthus* (*F. xanthoxyloides*), *Fraxinus* and *Ornus* (PP of 0.58). In the first group, the monophyly of the section *Melioides* was highly supported (PP of 1) but the relationships among many species (*F. americana*, *F. berlanderiana*, *F. biltmoreana*, *F. pennsylvanica*, *F. texensis*, *F. velutina*) were not well resolved. *F. spaethiana* and *F. platypoda* formed a highly supported group (PP of 1) with *F. chiisanensis* as sister taxon (PP of 0.71), whereas the third *incertae sedis* species, *F. cuspidate*, showed a basal placement as a sister species for all other *incertae sedis* and the section *Melioides* (PP of 0.89). The other group contained all the other sections of the genus, with a posterior probability of 1.0 for the sections *Dipetalae*, *Pauciflorae* and *Ornus*. The section *Dipetalae* was placed in a basal position within this group. The monophyly of the section *Fraxinus* was highly supported (PP of 0.88). The relationships among species within sections were well resolved except for the section *Ornus*, where only a few groupings were resolved. In the section *Fraxinus*, *F. griffithii* had a long branch, which could potentially result in misplacement of this species in the tree. *F. xanthoxyloides* was placed close to the section *Fraxinus* (PP of 0.95), with the section *Ornus* as a sister group (PP of 0.99). Both sections formed a sister clade to the American section *Pauciflorae* (PP of 0.89).

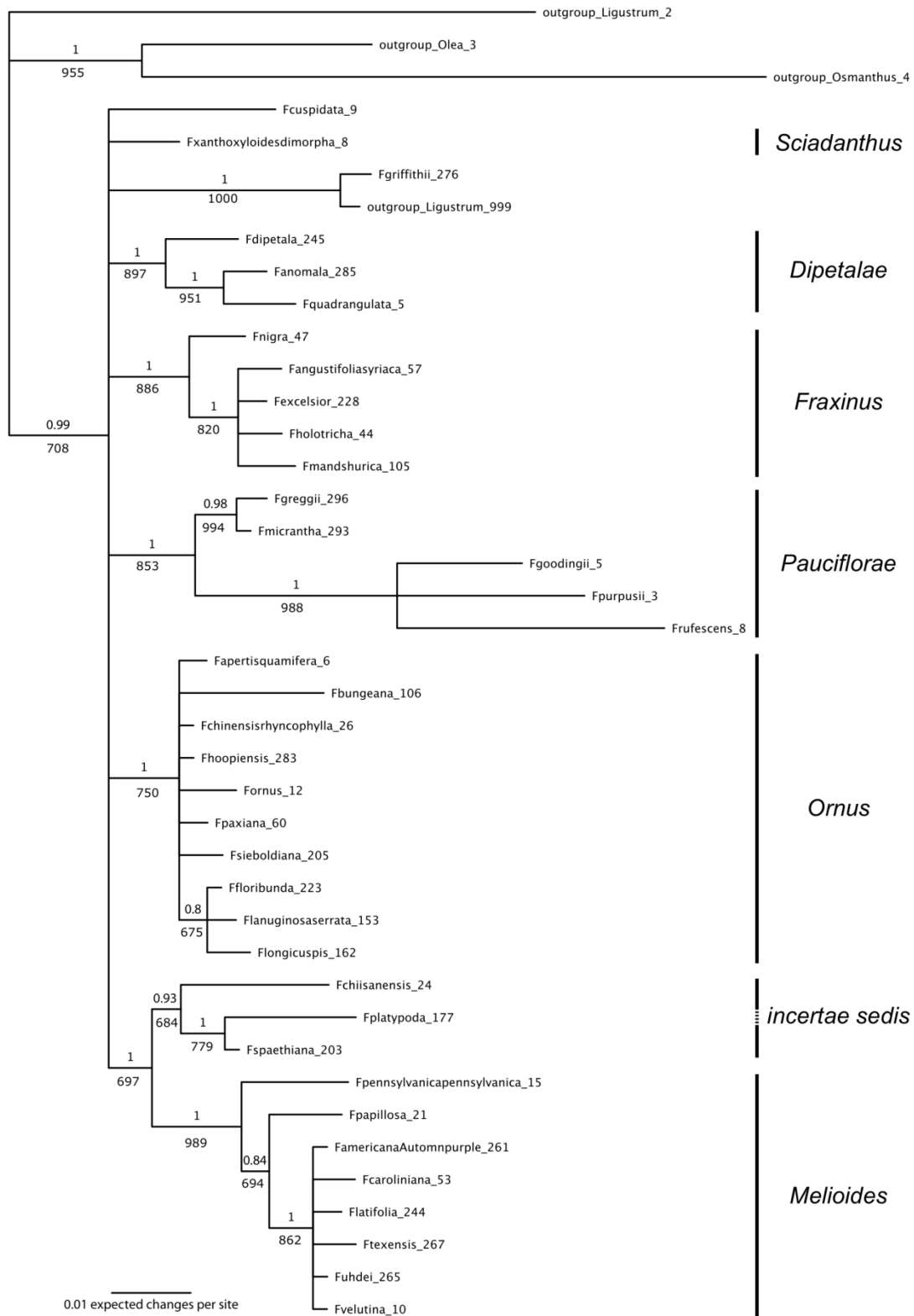


Figure 3.4. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of *phantastica* dataset. Posterior probabilities > 0.50 are indicated above the branches, ML bootstrap values are indicated below the branches. Sections according to Wallander (2008) are indicated by vertical bars.

3.2.5.1.4 *Phantastica*

The Bayesian tree resulted in highly supported monophyly for all recognized sections (PP of 1.0) except for *Ornus*, from which *F. micrantha* and *F. griffithii* were regrouped with the section *Pauciflorae* and an outgroup, respectively (Fig. 3.4). Except *F. cuspidata*, *Incertae sedis* species grouped together and as a sister group to the section *Melioides* (PP of 1.0). Many species in the section *Melioides* assembled as a large polytomy (*F. americana*, *F. caroliniana*, *F. latifolia*, *F. texensis*, *F. velutina*, and *F. uhdei*), which was highly supported (PP of 1.0). All the species but *F. floribunda*, *F. lanuginosa*, and *F. longicuspis* (PP of 0.80 for the resulting clade) formed a basal polytomy in the section *Ornus*. In the section *Fraxinus*, *F. nigra* was placed as a sister group to a polytomy comprising other species of the section. Despite that sections were monophyletic, the phylogenetic resolution among the different sections was poor, as shown by the large polytomy at the base of the genus.

3.2.5.2 *Combined dataset*

The Bayesian tree showed that the genus was monophyletic (PP of 1.0). The section *Dipetalae* was monophyletic (PP of 1.0) and sister group to all other sections of the genus, with moderate support (PP of 0.55). The rest of the genus appeared to be split in two groups (Fig. 3.5). All the sections appeared to be monophyletic (PP of 1.0), the section *Fraxinus* being closely related to the section *Sciadanthus* (that grouped with *F. hupehensis* – PP of 1.0), and forming a sister group to the section *Ornus* (all PP of 1.0). The group formed by these sections had the section *Pauciflorae* as sister group (PP of 1.0). The other part of the tree grouped the section *Melioides* with the *incertae sedis* species (*F. cuspidata*, *F. chiisanensis* and *F. spaethiana*) (PP of 0.99) with *F. platypoda* grouping with *F. spaethiana* (PP of 1.0). In this group, *F. cuspidata* was in basal position (PP of 1.0). The section *Melioides* was split in two groups (PP of 1.0 for both groups), including one represented by a large polytomy [*F. americana*, *F. pennsylvanica*, *F. velutina*, *F. berlanderiana* and a group (PP of 0.94) comprising *F. berlanderiana*, *F. caroliniana* and *F. texensis*] (PP of 1.0).

When considering only the nodes well supported (PP of 0.70 and over), the cpDNA tree did not show much conflict with the trees resulting from the analysis of nuclear loci. Very few minor incongruences were found in the placement of some sequences in the cpDNA tree. For example, *F. papillosa* grouped with some outgroups, and *Chionanthus* sp. and *Jasminum* sp. were found associated to the genus *Fraxinus*. Whether these few anachronic placements were

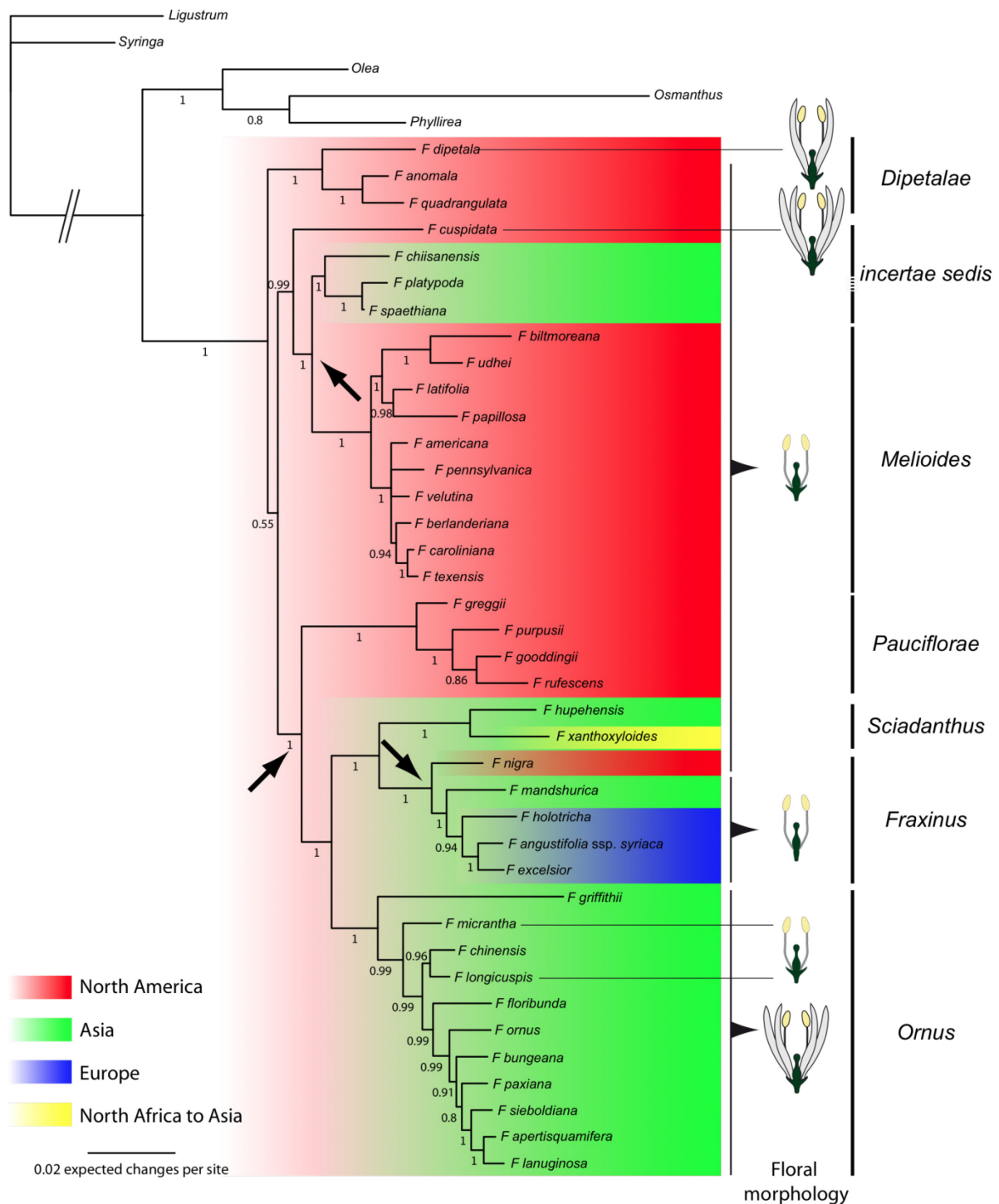


Figure 3.5. Tree resulting from Bayesian (BIM) analysis of combined dataset (with nITS). Posterior probabilities > 0.50 are indicated below the branches. Sections according to Wallander (2008) are indicated by vertical bars. Arrows correspond to the trans-oceanic dispersal events. Geographic areas indicated by colours. Schematic floral morphologies are shown at the tip of branches.

due to incomplete lineage sorting, convergence or very low levels of sequence divergence among cpDNA sequences of Oleaceae, it is likely that they represent aberrations.

3.2.6 Discussion

3.2.6.1 *The phylogeny of the genus Fraxinus*

The tree emerging from the combined dataset had more resolution than the previous nITS trees of Wallander (2008) and Jeandroz *et al.* (1997), It was especially helpful in better delineating the relationships among the different sections of the genus. The section *Dipetalae* was at a basal position in the phylogeny obtained, similarly as in Wallander (2008) and Jeandroz *et al.* (1997), and in agreement with the basal variability of the floral and foliar morphologies in this particular group (Wallander, 2008). Contrary to Jeandroz *et al.* (1997) however, we did not find a close relationship between the sections presently known as *Fraxinus* and *Melioides*, the section *Fraxinus* being closely related to the section *Sciadhanthus* (that formed a polytomy with the section *Melioides* and *Fraxinus* in Jeandroz *et al.* 1997), and then to the section *Ornus*. This placement is quite in agreement with geographical proximity, minimizing the number and distance of each oceanic dispersal event. Our results agree with the placement of the section *Pauciflorae* as the sister taxa to the old world sections, noting that this section was absent in Jeandroz *et al.* (1997) as well as the three *incertae sedis* species. The close relationship observed between these species and the section *Melioides* did not disagree with the results of Wallander (2008), where a large polytomy was obtained at this level.

3.2.6.2 *The evolution of floral morphology*

When tracing floral characters onto the present phylogeny, mixed patterns are observed where floral morphology varies within taxonomic groups. For example, even if the section *Ornus* comprised almost only species with complete flowers, *F. micrantha* and *F. longicuspis* showed flowers without corolla (Fig. 3.5). In the same way, *F. cuspidata* displayed complete flowers in the section *Melioides sensu lato*, characterised by flowers without corolla, and *F. dipetala* showed a flower with only two petals, a feature unique in the genus (Fig. 3.5). Moreover, the sectional boundaries does not represent boundaries for flower morphology, with incomplete flower (lacking corolla but with calyx) encompassing the sections *Dipetalae*, *Melioides sensu lato*, *Pauciflorae* and *Sciadhanthus*, showing no clear trend in the genus (see Fig. 3.5). Jeandroz *et al.* (1997) reported a pattern of sequential simplification, from flowers with calyx and corolla in the subgenus *Ornus* (*sensu* Nikolaev, 1981), then loss of the corolla

in the section *Melioides*, followed by the loss of the calyx in the section *Bumelioides* (*sensu* Nikolaev, 1981), except at the base of the genus, where *F. quadrangulata* has neither calyx nor corolla. This view was not confirmed by Wallander (2008), which presented a more complete and different phylogeny of the genus with a different geographical origin and different group at the base of the tree. She showed that morphological characters had evolved many times in the history of the genus, especially floral morphology, which was reconstructed as a flower with calyx and corolla at the origin of the genus, followed by the loss of the corolla after the split between the section *Dipetalae* and the rest of the genus, then reversal to calyx and corolla in the section *Ornus* (except for *F. micrantha*, *F. longicuspis* and *F. chinensis* that secondarily lost the corolla). In the section *Dipetalae*, only *F. dipetala* had conserved a flower with corolla, *F. quadrangulata* and *F. anomala* having lost the corolla, but kept the calyx (Wallander, 2008). With regard to the Eurasian species of the section *Fraxinus*, which harbor flowers without calyx, our results show clearly that floral morphology cannot be simply linked to the phylogenese of the genus and that floral morphology has been more likely affected by ecological factors such as the pollination system and climatic pressures. Elucidating these relations will need more ecological and biological studies of the genus.

3.2.6.3 New insights about the placement of *F. platypoda* and the *incertae sedis* species

F. platypoda, previously transferred in the section *Fraxinus* by Wallander (2008), appeared to be closely related in all the present analyses to *F. spaethiana*, previously considered as an *incertae sedis* species (Wallander, 2008). This close relationship has been initially suggested by Nakaike (1972) and then by Wei and Green (1996). Wallander (2008) observed that nITS sequences placed *F. platypoda* in the section *Fraxinus*, but the tree derived from nITS sequences produced in the present study did not agree with these results. Regarding the nearly identical sequences of *F. platypoda* and *F. mandshurica* reported in the study of Wallander (2008), and because both species share a common geographic area in Japan, it is possible that these individuals have been misidentified and were from the same species. To avoid this potential problem, we used many (n=10) individuals sampled in natural populations from Japan. They all grouped together and with an arboretum specimen according to the different datasets and methods of phylogenetic reconstruction used in the present study.

F. spaethiana was associated closely to *F. platypoda* in all analyses and with high support values. *F. chiisanensis* was closely related to this species pair, with moderate to high support with all datasets, suggesting that these species found in Asia should be grouped in a

unique section. Due to its well supported relationship with taxa from the section *Melioides*, another solution could be to place *F. chiisanensis*, *F. platypoda*, and *F. spaethiana* in the *Melioides* section, in agreement with the previous placement of *F. platypoda* in this section (Wei and Green, 1996). Due to the close relationship between these three species and this section, even in the less resolved datasets (*phantastica* and the cpDNA dataset), we proposed that these species should be preferentially placed in the section *Melioides*.

3.2.6.4 The biogeography of the genus *Fraxinus*

The study of biogeography needs knowledge about three major types of events, the origin of the group, the speciation events that lead to the diversification of the taxa and the dispersal events leading to the present distributions of the taxa. Of course, both the dispersion and speciation could be inter-connected, in the case of geographical or allopatric speciation for instance. From previous studies, only the oldest one (Jeandroz *et al.*, 1997) made some hypotheses regarding the origin and the dispersal events in the genus *Fraxinus*. Based on both parsimony and neighbor-joining analysis of nITS sequences, it was concluded that the genus originated in North America, with two dispersion events towards Asia, one resulting in the section *Ornus*, the other resulting to the section *Fraxinus* (except the lineage leading to *F. nigra*, which was hypothetised as the North American ancestor of this section). These results are in agreement with those of Wallander (2008) also based on nITS sequences, who proposed an origin of the genus in America.

Our results agree more with the hypothesis of a North American origin for the genus, as indicated by the basal position of the species or groups of species found in North America. A North American origin of the *Fraxinus* genus is consistent with fossils datations. Both oldest fossils that can be reliably attributed to the genus were found in South-eastern North America from the Eocene Claiborne Formation (Call and Dilcher, 1992; Magallon-Puebla *et al.*, 1999; Manchester, 1999).

The number of speciation events in *Fraxinus* appeared to be linked to each section, each section being found mostly in only one of the great areas of endemism worldwide: Europe (ER), Eastern Asia (EA), Western North America (WNA) and Eastern North America (ENA) (Donoghue and Smith, 2004) (except for the section *Fraxinus* which is quite cosmopolitan, being found in ER, EA and ENA). A greater species diversity was observed in the section *Ornus* and *Melioides sensu lato*, according to the view that the ENA and EA conserved more species diversity than other areas of endemism, probably because of a reduced influence of

the drying climate and glaciations that affected WNA and Europe, respectively (Donoghue and Smith, 2004). These conclusions appeared to particularly fit with the section *Ornus*, that comprises 11 EA species, whereas only three (*F. excelsior*, *F. angustifolia*, and *F. xanthoxyloides*) or four (depending to the taxonomic status of *F. holotricha*) species were found in Europe and North Africa in the sister group formed by the sections *Fraxinus* and *Sciadhanthus*.

Contrary to previously published hypotheses based on a narrower taxon sampling (Jeandroz *et al.*, 1997), at least three (instead of two) dispersal events between North America and Eurasia could be deduced from the present phylogeny based on total evidence if we assume that the ancestor of the genus *Fraxinus* was North American: one that explains the occurrence in Asia of the sections *Ornus* and *Fraxinus*, one additional event that explains the North American geographic area of *F. nigra* in the section *Fraxinus*, and the last one accounting for the Asian repartition of the group formed by *F. chiisanensis*, *F. platypoda*, and *F. spaethiana*. These three last species were not included (except *F. platypoda* that was probably misidentified, see above) in the study of Jeandroz *et al.* (1997), explaining the greater number of dispersion events from North American to Eurasia (three *vs.* two) needed to explain the trans-oceanic patterns of the genus.

Such a pattern with several dispersion events at the inter-continental scale is common in temperate forest plants genera, which are usually found in several areas of endemism. To disperse from North America to Eurasia, two ways could have been used, the Atlantic track or the Pacific track, through a North-Atlantic bridge or through Beringia, respectively (Donoghue *et al.*, 2001). Major phylogeographic patterns have been found according to the dispersion ways the species used (Donoghue *et al.*, 2001). Our results suggest that only the Pacific track has been used in all trans-oceanic dispersion events during the evolution of *Fraxinus*. Dispersal from North America (NA) to EA followed by speciation is the most likely scenario to explain the split between the *incertae sedis* species and the rest of the section *Melioides*, and the origin of the group comprising the sections *Sciadhanthus*, *Fraxinus*, and *Ornus*. The geographic area of ENA *F. nigra*, disjunct from those of the other species of the section *Fraxinus*, would have also resulted from a EA to ENA dispersal, followed by allopatric speciation.

A transcontinental dispersal event followed by geographic speciation could also be inferred in the section *Fraxinus*, with *F. mandshurica* being found in EA and the closely related *F. excelsior* and *F. angustifolia* found in Western Europe. These sequential dispersal and speciation events were shown to be driven by climatic and geological changes (such as

the contraction of the boreotropical forest found in the northern hemisphere during the Tertiary, see Wolfe, 1975; Donoghue *et al.*, 2001), allowing reticulate evolution during the early divergence of these slow-evolving tree taxa (Hinsinger *et al.*, submitted). The repetitive observation of dispersal events followed by speciation in the section *Fraxinus* brings strong support for the importance of allopatric speciation as a central mechanism to support diversification in the genus *Fraxinus*. Such a central place of allopatric speciation in driving the emergence of new lineages and species is also being reported in other anemophilous tree genera (Bouillé *et al.*, submitted).

3.2.6.5 Radiation of the section *Melioides*?

The section *Melioides*, comprising ten recognized species (but more than 28 described, Wallander, 2008), was poorly resolved in the “total evidence” analysis, as evidenced by the polytomy involving *F. americana*, *F. velutina*, and *F. berlanderiana*. Moreover, this polytomy affecting different species in different datasets in this species-rich section (the second section in number of species, the first one being *Ornus* with 15 recognized species), we could reasonably conclude that these species experienced a radiation, or that they have recently exchanged genes. These results are congruent with those of early morphological studies, that successively treated *F. uhdei*, *F. texensis*, *F. americana*, *F. pennsylvanica*, *F. velutina*, *F. latifolia*, *F. caroliniana*, and *F. berlanderiana* as synonyms for one or more species (Miller, 1955; Santamour, 1962). Molecular phylogenies had outlined the polytomy involving *F. pennsylvanica*, *F. velutina* and *F. tomentosa* (corresponding to the red-ash complex) (Jeandroz *et al.*, 1997), or *F. caroliniana*, *F. pennsylvanica*, *F. texensis*, *F. velutina*, *F. profunda* and *F. berlanderiana* (Wallander, 2008). It is thus difficult, in absence of clear evidences regarding the species status of American taxa from the section *Melioides* and if they are reproductively isolated or not (see Wallander, 2008 for a review concerning the different species), to conclude about how genetic diversity is delineated among species in this large group. Further studies involving the sampling of potential contact zones could indicate if some of these taxons are actively exchanging genes. Lack of reproductive isolation has been shown among European taxa of the section *Fraxinus* (Hinsinger *et al.*, submitted). In such conditions, the correct delineation of phylogenetic relationships among species within sections would represent a significant challenge, even if additional regions of the genome are sequenced.

3.2.7 Conclusions

In summary, using multiple regions from different genomes for inferring phylogenies, we confirm the delineation of the sections of *Fraxinus* previously recognized (Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008), and clarify the relationships among the sections and the phylogeography of the genus as a whole. We inquired also the placement of *F. platypoda* in the section *Fraxinus*, showing for the first time its close relationship with species previously classified as *incertae sedis*, and further proposed their placement in the section *Melioides*.

The nuclear region *phantastica* have been proved to be useful to robustly distinguish sections in the genus *Fraxinus* that are characterised by different morphological features. Because this region is involved in the leaf morphology (Kim *et al.*, 2003), the comparison of divergent sequences with morphological data may offer insight into whether nucleotide substitutions in the gene may have been responsible for the observed phenotypic changes.

The robust phylogeny presented here offer a useful starting point to explore issues related to dating the phylogeny and correlating lineage diversification with major geological and climatic events during the history of *Fraxinus*. Combining the present multi-locus phylogeny and a more exhaustive characterization of morphological, ecological and life-history traits in the genus should also result in a better knowledge of the evolution of phenotypic characters of potentially important adaptive significance. This knowledge should be useful for better managing *Fraxinus* genetic resources worldwide in the face of environmental changes.

3.2.8 Acknowledgments

We are grateful to the staff at all arboreta listed in Appendix 3.1 who kindly provided samples, Paola Bertolino for her very useful help in the laboratory and field collections, Jerome Laroche at the Bioinformatic Platform, Université Laval for access to computer facilities and program, and Mariangela Arca for generating some cpDNA sequences.

This work was supported by the “Consortium National de Recherche en Génomique”, and the “Service de Systématique Moléculaire” of the Muséum National d’Histoire Naturelle (IFR 101). It is part of agreement no. 2005/67 between Genoscope and the Muséum National d’Histoire Naturelle on the project “Macrophylogeny of Life”, directed by Guillaume Lecointre. D.D. Hinsinger is the recipient of a fellowship grant from the Ministère des Affaires Etrangères (Bourse Lavoisier) and received financial support from the French Ministry of Education and the Université Paris-Sud 11.

3.2.9 Literature cited

- Arca, M., Hinsinger, D.D., Cruaud, C., Gaudeul, M., Bousquet, J., Frascaria-Lacoste, N., submitted. Limitations of a standardised protocol for DNA barcoding in the *Fraxinus* genus.
- Bouillé, M., Bousquet, J., 2005. Trans-species shared polymorphisms at orthologous nuclear gene loci among distant species in the conifer *Picea* (Pinaceae): implications for the long-term maintenance of genetic diversity in trees. *American Journal of Botany* 92, 63-73.
- Bouillé, M., Senneville, S., Bousquet, J., submitted. Discordant mtDNA and cpDNA phylogenies indicate geographic speciation and reticulation as driving factors for the diversification of the genus *Picea*. *Tree Genetics and Genomes*.
- Call, V.B., Dilcher, D.L., 1992. Investigations of angiosperms from the Eocene of southeastern North America: samaras of *Fraxinus wilcoxiana* Berry. *Review of Palaeobotanic and Palynology* 74, 249-266.
- Donoghue, M.J., Bell, C.D., Li, J., 2001. Phylogenetic patterns in Northern hemisphere plant geography. *International Journal of Plant Sciences* 162, S41-S52.
- Donoghue, M.J., Smith, S.A., 2004. Patterns in the assembly of temperate forests around the Northern Hemisphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359, 1633-1644.
- Gielly, L., Taberlet, P., 1994. Chloroplast DNA polymorphism at the intrageneric level and plant phylogenie. *Comptes Rendus Biologies* 317, 685-692.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52, 696-704.
- Hamzeh, M., Dayanandan, S., 2004. Phylogeny of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of chloroplast *trnT-trnF* region and nuclear rDNA. *American Journal of Botany* 91, 1398-1408.
- Hinsinger, D.D., Gaudeul, M., Couloux, A., Bousquet, J., Frascaria-Lacoste, N., submitted. The phylogeography of Eurasian *Fraxinus* species reveals ancient transcontinental reticulation.
- Huelsenbeck, J.P., Rannala, B., 2004. Frequentist properties of bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic Biology* 53, 904-913.
- Jeandroz, S., Roy, A., Bousquet, J., 1997. Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7, 241-251.
- Kim, M., McCormick, S., Timmermans, M., Sinha, N., 2003. The expression domain of *phantastica* determines leaflet placement in compound leaves. *Nature* 424, 438-443.
- Li, J., Alexander, J.H., Zhang, D., 2002. Paraphyletic *Syringa* (Oleaceae): evidence from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS and ETS regions. *Systematic Botany* 27, 592-597.
- Magallon-Puebla, S., Crane, P.R., Herendeen, P.S., 1999. Phylogenetic pattern, diversity, and diversification of eudicots. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86, 297-372.
- Manchester, S.R., 1999. Biogeographical relationships of North American Tertiary floras. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86, 472-522.
- Miller, G.N., 1955. The genus *Fraxinus*, the ashes, in North America, North of Mexico., Cornell University Agricultural Experiment Station Memoire, pp. 1-64.

- Nakaike, T., 1972. A synoptical study on the genus *Fraxinus* from Japan, Korea and Formosa. Bulletin of the National Science Museum 15, 475-512.
- Nickrent, D.L., Schuette, K.P., Starr, E.M., 1994. A molecular phylogeny of *Arceuthobium* (Viscaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. American Journal of Botany 81, 1149-1160.
- Nikolaev, E.V., 1981. The genus *Fraxinus* (Oleaceae) in the flora of the USSR. Botanicheskii Zhurnal 66, 1419-1432.
- Rieseberg, L.H., Brouillet, L., 1994. Are many plant species paraphyletic? Taxon 43, 21-32.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19, 1572-1574.
- Santamour, F.S.J., 1962. The relation between polyploidy and morphology in white and biltmore ashes. Bulletin of the Torrey Botanical Club 89, 228-232.
- Sullivan, J., Joyce, P., 2005. Model selection in phylogenetics. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 36, 445-466.
- Waites, R., Selvadurai, H.R., Oliver, I.R., Hudson, A., 1998. The *phantastica* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. Cell 93, 779-789.
- Wallander, E., 2008. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. Plant Systematics and Evolution 273, 25-49.
- Wallander, E., Albert, V.A., 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. American Journal of Botany 87, 1827-1841.
- Wei, Z., Green, P.S., 1996. *Fraxinus*. In: Wu, Z., Raven, P.H. (Eds.), Flora of China. Science Press, Missouri Botanical Garden, Missouri, pp. 273-279.
- Willyard, A., Cronn, R., Liston, A., 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. Molecular Phylogenetics and Evolution 52, 498-511.
- Wojciechowski, M.F., Sanderson, M.J., Baldwin, B.G., Donoghue, M.J., 1993. Monophyly of aneuploid *Astragalus* (Fabaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. American Journal of Botany 80, 711-722.
- Wolfe, J.A., 1975. Some aspects of plant geography of the northern hemisphere during the late Cretaceous and Tertiary. Annals of the Missouri Botanical Garden 62, 264-279.

Appendix 3.1. Samples used in this study and newly published sequences. ID: Botanical garden identifier; tree ID: identifier for samples in the tree reconstruction figures.

Taxa	Bot. Gard. ID	tree ID	Origin	Regions of the genome				
				<i>trnH-psbA</i>	<i>rpl32-trnL</i>	ITS	ETS	<i>phantastica</i>
<i>Fraxinus americana</i>	15	2	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus americana</i>	1137	35	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	
<i>Fraxinus americana</i>		117	Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus americana</i> 'Autumn purple'	2793 Kipling Street	261	Canopy	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus americana</i> 'Autumn purple'	598 Loma Verde Avenue	262	Canopy	Yes		Yes		Yes
<i>Fraxinus americana</i> var. <i>biltmoreana</i> (<i>biltmoreana</i>)	3826	45	Arb. Barres		Yes	Yes	Yes	
<i>Fraxinus angustifolia</i> (origin : Iran)	1991.0384*A	215	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus angustifolia</i> (<i>rotundifolia</i>)	1877	17	Arb. Barres	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus angustifolia</i> (<i>rotundifolia</i>)	1929	20	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus angustifolia</i> (<i>syn</i> : <i>oxycarpa</i>)	1987.1215*A	214	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus angustifolia</i> ssp. <i>oxycarpa</i>	1731-1991	251	Jardin botanique de Montréal	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus angustifolia</i> var. <i>monophylla</i>	1979.0263*A	233	Sir Harold Hillier Garden		Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus anomala</i>	B0702	284	Orsay (Christian)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus anomala</i>	B0703	285	Orsay (Christian)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	1	aperti1	Utsunomiya University	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	2	aperti2	Utsunomiya University	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	3	aperti3	Utsunomiya University	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	4	aperti4	Utsunomiya University	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	5	aperti5	Utsunomiya University	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	6	aperti6	Utsunomiya University		Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	7	aperti7	Utsunomiya University	Yes				
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	8	aperti8	Utsunomiya University	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	9	aperti9	Utsunomiya University	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus berlanderiana</i>	1638	14	Arb. Barres		Yes		Yes	
<i>Fraxinus berlanderiana</i>	3617	48	Arb. Barres		Yes	Yes	Yes	
<i>Fraxinus berlanderiana</i>	1977.1152*Y	225	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

<i>Fraxinus berlanderiana</i>	1158611	17	MEXU	Yes			Yes	
<i>Fraxinus berlanderiana</i>	991880	19	MEXU	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus biltmoreana (americana var. biltmoreana)</i>		121	Arb. Bayreuth	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus biltmoreana (americana)</i>		101	Pépinière Adeline	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus biltmoreana (americana)</i>	1977.2370*Q	226	Sir Harold Hillier Garden			Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus bungeana</i>	3811	41	Arb. Barres	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus bungeana</i>		69	Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus bungeana</i>		106	Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus caroliniana</i>		53	Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus caroliniana</i>	1980.0206*A	202	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chiisanensis</i>	8994	21	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chiisanensis</i>	8907	24	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chiisanensis</i>	2006.0536*A	230	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chinensis</i>	1992	31	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chinensis</i>		108	Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chinensis</i>	1982.2663*A	210	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chinensis</i>	1966.2754*A	219	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chinensis ssp. rhyncophylla</i>	2140	26	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chinensis ssp. rhyncophylla</i>	3815	42	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chinensis ssp. rhyncophylla</i>		109	Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus chinensis ssp. rhyncophylla</i>	2001.0366*A	229	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus cuspidata</i>		288	Peckerwood Garden	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus cuspidata</i>		289	Peckerwood Garden	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus cuspidata</i>		290	Orsay (Christian)	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus cuspidata</i>	758471	2	MEXU	Yes	Yes			
<i>Fraxinus cuspidata</i>	658827	9	MEXU	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus cuspidata</i>	955683	10	MEXU				Yes	Yes
<i>Fraxinus dipetala</i>		56	Arb. Chèvreloup			Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus dipetala</i>		65	Arb. Chèvreloup	Yes	Yes			Yes
<i>Fraxinus dipetala</i>	13476*D2	243	Rancho Santa Anna Bot. Garden			Yes		Yes
<i>Fraxinus dipetala</i>	10303*A6	245	Rancho Santa Anna Bot. Garden	Yes	Yes			Yes
<i>Fraxinus excelsior (NON: section Ornus)</i>	1977.0646	232	Sir Harold Hillier Garden	Yes			Yes	
<i>Fraxinus excelsior à 3 bourgeons</i>		228	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus excelsior monophylla</i>	3263	50	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

<i>Fraxinus excelsior monophylla</i> ??		221	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus excelsior</i> var. <i>nana</i>	3337	49	Arb. Barres	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus excelsior</i> var. <i>pendula</i>	350	11	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus floribunda</i>	1977.0718*S	222	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus floribunda</i>	1977.0702*Y	223	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus floribunda</i> (retusa var. <i>henryana</i>)	2162	27	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus floribunda</i> (retusus)	1739	16	Arb. Barres		Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus formosana</i>	OSN84-00-0285-60	248	Botanic Garden Osnabrück	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus gooddingii</i>	1214941	5	MEXU University of Arizona Campus	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus greggii</i>	801	281	Arboretum	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus greggii</i>		294	Peckerwood Garden	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus greggii</i>		295	Peckerwood Garden	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus greggii</i>		296	Peckerwood Garden	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus greggii</i>	1153309	12	MEXU				Yes	
<i>Fraxinus greggii</i>	779176	13	MEXU					Yes
<i>Fraxinus greggii</i>	529898	14	MEXU	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus greggii</i>	19860253	246	Cambridge University Botanic Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus griffithii</i>	1977.2517*T	234	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus griffithii</i>	783-01	276	Parc botanique du Launay (Christian)	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus griffithii</i>	783-10	277	Parc botanique du Launay (Christian)	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus griffithii</i>	783-03	278	Parc botanique du Launay (Christian)				Yes	Yes
<i>Fraxinus guiliniensis</i>		68	Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus holotricha</i>	3819	43	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus holotricha</i>	3820	44	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus holotricha</i>		102	Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus holotricha</i>	1982.0066*A	209	Sir Harold Hillier Garden	Yes		Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus hoopiensis</i>	19990031	283	Arboretum Kalmthout (NL)		Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus incana</i>		122	Arb. Bayreuth	Yes			Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	107	137	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	108	138	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	107	164	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	108	165	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes

<i>Fraxinus lanuginosa</i>	274	188	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	275	189	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	276	190	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa</i>		272	Colvos Creek Nursery (Seattle)				Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	52	131	Forestry and Forest Products Research Institute				Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	55	132	Forestry and Forest Products Research Institute				Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	60	133	Forestry and Forest Products Research Institute				Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	78	134	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	83	135	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	97	136	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	113	139	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	132	140	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	139	141	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	165	142	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	170	143	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	176	144	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	181	145	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	185	146	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	188	147	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	191	148	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	192	149	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	194	150	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	218	152	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus lanuginosa var. serrata</i>	238	153	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus latifolia</i>	408	3	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus latifolia</i>	3808	40	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus latifolia</i>		66	Arb. Chèvreleoup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus latifolia</i>	10501*C1	237	Rancho Santa Anna Bot. Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus latifolia</i>	8669*A4	238	Rancho Santa Anna Bot. Garden		Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus latifolia</i>	10521*A3	244	Rancho Santa Anna Bot. Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus longicuspis</i>	2083	25	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus longicuspis</i>		110	Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes		Yes
<i>Fraxinus longicuspis</i>		123	Arb. Bayreuth	Yes			Yes	

<i>Fraxinus longicuspis</i>	1	154	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus longicuspis</i>	2	155	Forestry and Forest Products Research Institute				Yes	Yes
<i>Fraxinus longicuspis</i>	3	156	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus longicuspis</i>	4	157	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	
<i>Fraxinus longicuspis</i>	5	158	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus longicuspis</i>	6	159	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus longicuspis</i>	7	160	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus longicuspis</i>	8	161	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus longicuspis</i>	9	162	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus longicuspis</i>	10	163	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus longicuspis</i> var. <i>latifolia</i>	1438-1972	256	Jardin botanique de Montréal	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus malacophylla</i>		273	Colvos Creek Nursery (Seattle)	Yes				Yes
<i>Fraxinus malacophylla</i>	1969-1384-P	264	Los Angeles County Arboretum and Botanic Garden	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus mandshurica</i>	2456	22	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	
<i>Fraxinus mandshurica</i>	2500	23	Arb. Barres	Yes	Yes			
<i>Fraxinus mandshurica</i>		105	Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus mandshurica</i>	1982.2662*A	212	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	263	184	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	264	185	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	265	186	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	296	192	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	297	193	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	298	194	Forestry and Forest Products Research Institute				Yes	Yes
<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	299	195	Forestry and Forest Products Research Institute				Yes	
<i>Fraxinus mariesii</i>	1883	18	Arb. Barres		Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus mariesii</i>		124	Arb. Bayreuth			Yes	Yes	
<i>Fraxinus micrantha</i>		292	Orsay (Christian)		Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus micrantha</i>		293	Orsay (Christian)	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus nigra</i>	1994	33	Arb. Barres	Yes	Yes			
<i>Fraxinus nigra</i>	3828	47	Arb. Barres				Yes	Yes
<i>Fraxinus nigra</i>		100	Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus obliqua</i>	1982.3212*A	207	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus ornus</i>	741	1	Arb. Barres		Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus ornus</i>	1597	12	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

<i>Fraxinus ornus</i>	1887	19 Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus ornus</i>		58 Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus ornus</i>	1896-1991	258 Jardin botanique de Montréal				Yes	Yes
<i>Fraxinus ornus</i>		274 Colvos Creek Nursery (Seattle)	Yes		Yes		Yes
<i>Fraxinus ornus</i>	MOSOR1	286 Leg Yakovlev	Yes		Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus ornus</i>	MOSOR2	287 Leg Yakovlev	Yes				Yes
<i>Fraxinus oxycarpa (angustifolia)</i>	BOCH - 0000-RE0-1535	270 Botanic Garden Bochum			Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus pallisiae (angustifolia)</i>		103 Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus pallisiae (angustifolia)</i>	1982.0951*A	217 Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus pallisiae (angustifolia)</i>	1982.0951*B	218 Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus pallisiae (angustifolia)</i>	1034-1976	252 Jardin botanique de Montréal	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus papillosa</i>	1541	280 University of Arizona Campus Arboretum	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus papillosa</i>	1193510	1 MEXU				Yes	Yes
<i>Fraxinus papillosa</i>	1205968	21 MEXU				Yes	Yes
<i>Fraxinus papillosa</i>	714886	22 MEXU		Yes		Yes	
<i>Fraxinus paxiana</i>		59 Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus paxiana</i>		60 Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus paxiana</i>		112 Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>		104 Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus pennsylvanica ssp. pennsylvanica</i>	1609	13 Arb. Barres		Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus pennsylvanica ssp. pennsylvanica</i>	1639	15 Arb. Barres		Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus pennsylvanica ssp. pennsylvanica</i>	3806	38 Arb. Barres	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus platypoda</i>		55 Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>		107 Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>	253	174 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>	254	175 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>	255	176 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>	256	177 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>	257	178 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>	258	179 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>	259	180 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>	260	181 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus platypoda</i>	261	182 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	
<i>Fraxinus platypoda</i>	262	183 Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes

<i>Fraxinus platypoda</i>	19810042	250	Jard. Bot. Nat. de Belgique		Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus potamophila (angustifolia)</i>		52	Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus profunda</i>	2003	30	Arb. Barres	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus profunda</i>		125	Arb. Bayreuth	Yes	Yes	Yes	Yes	
<i>Fraxinus profunda</i>	1993.1156*A	216	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus profunda</i>	OSN93-12-0041-10	249	Botanic Garden Osnabrück	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus profunda</i>	1251-2001	254	Jardin botanique de Montréal	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus profunda (tomentosa)</i>	2001	32	Arb. Barres	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus profunda (tomentosa)</i>	5525	34	Arb. Barres	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus purpusii</i>	904442	3	MEXU				Yes	Yes
<i>Fraxinus purpusii</i>	967925	16	MEXU				Yes	
<i>Fraxinus purpusii</i>	833610	18	MEXU	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus quadrangulata</i>	518	4	Arb. Barres	Yes	Yes			Yes
<i>Fraxinus quadrangulata</i>	519	5	Arb. Barres		Yes			Yes
<i>Fraxinus quadrangulata</i>		54	Arb. Chèvreloup					
<i>Fraxinus quadrangulata</i>		111	Pépinière Adeline	Yes	Yes			Yes
<i>Fraxinus raibocarpa</i>		126	Arb. Bayreuth	Yes			Yes	
<i>Fraxinus retusa var. henryana (floribunda)</i>		119	Pépinière Adeline	Yes		Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus richardii (pennsylvanica)</i>		127	Arb. Bayreuth	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus rufescens</i>	738146	7	MEXU				Yes	
<i>Fraxinus rufescens</i>	928691	8	MEXU				Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>		114	Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	145	166	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	146	167	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	147	168	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	148	169	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	150	170	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	151	171	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes			Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	152	172	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	153	173	Forestry and Forest Products Research Institute	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	272	187	Forestry and Forest Products Research Institute				Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	1977.5390*Q	205	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	880-1988	253	Jardin botanique de Montréal	Yes	Yes			Yes
<i>Fraxinus sikkimensis (paxiana)</i>		120	Arb. Frankfurt	Yes		Yes	Yes	Yes

<i>Fraxinus</i>	<i>sogdiana</i>	1977.1184*W	224	Sir Harold Hillier Garden			Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>sogdiana</i>	1002-2003	259	Jardin botanique de Montréal		Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	sp.		211	Sir Harold Hillier Garden	Yes		Yes		Yes
<i>Fraxinus</i>	sp.		70	Arb. Chèvreloup	Yes	Yes			Yes
<i>Fraxinus</i>	sp.		71	Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	sp.	1977.5154	235	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	sp.	1977.5155	236	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Jasminum</i>	sp.	batiment 350	995	Parc botanique du Launay			Yes	Yes	
<i>Fraxinus</i>	<i>spaethiana</i>	3825	46	Arb. Barres	Yes	Yes		Yes	
<i>Fraxinus</i>	<i>spaethiana</i>	1977.5659*R	203	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>spaethiana</i>	1977.5614*W	204	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>spaethiana</i>	1977.5400*Q	208	Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>syriaca</i>		116	Pépinière Adeline		Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>syriaca</i>		128	Arb. Bayreuth			Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>syriaca (angustifolia)</i>		57	Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>syriaca/sogdiana</i>	2020	28	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>syriaca/sogdiana</i>	2019	29	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>syriaca/sogdiana</i>	3804	39	Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>texensis</i>		267	Fort Worth	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>texensis</i>	19980148	268	Fort Worth				Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>texensis</i>		269	Fort Worth	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>tomentosa (profunda)</i>		118	Pépinière Adeline	Yes		Yes		Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>tomentosa (profunda)</i>		129	Arb. Bayreuth	Yes			Yes	
<i>Fraxinus</i>	<i>tomentosa (profunda)</i>	2298-1961	255	Jardin botanique de Montréal	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>trifoliata (dipetala)</i>	17232*C2	241	Rancho Santa Anna Bot. Garden	Yes		Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>trifoliata (dipetala)</i>	14849*B2	242	Rancho Santa Anna Bot. Garden		Yes		Yes	
<i>Fraxinus</i>	<i>turkestanica</i>		130	Arb. Bayreuth	Yes	Yes	Yes	Yes	
<i>Fraxinus</i>	<i>uhdei</i>	19890759	247	Cambridge University Botanic Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>uhdei</i>	3825 Fabian Way	260	Canopy	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>uhdei</i>	1636 Edgewood Drive	263	Canopy Los Angeles County Arboretum and Botanic	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>uhdei</i>	1963-0485-P	265	Garden		Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>uhdei</i>	1967-1367-P	266	Los Angeles County Arboretum and Botanic Garden	Yes	Yes		Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>uhdei</i>		275	Colvos Creek Nursery (Seattle)		Yes		Yes	Yes

<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i>	242	6 Arb. Barres		Yes		Yes		
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i>	241	7 Arb. Barres	Yes	Yes		Yes		
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i>	219	10 Arb. Barres		Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i>		63 Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i>		115 Pépinière Adeline		Yes	Yes	Yes		
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i> var. <i>coriacea</i>		64 Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i> var. <i>coriacea</i>	5942*B3	239 Rancho Santa Anna Bot. Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i> var. <i>coriacea</i>	15292*C2	240 Rancho Santa Anna Bot. Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i> var. <i>glabra</i>	1149	36 Arb. Barres	Yes	Yes		Yes		
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i> var. <i>glabra</i>	1150	37 Arb. Barres	Yes	Yes		Yes		Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i> var. <i>glabra</i>	1977.7018*S	201 Sir Harold Hillier Garden						Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i> var. <i>toumeyii</i>	1977.5304*W	206 Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>velutina</i> var. <i>toumeyii</i>	1977.0656*U	227 Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>xanthoxyloides</i>		61 Arb. Chèvreloup				Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>xanthoxyloides</i>		62 Arb. Chèvreloup	Yes	Yes				Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>xanthoxyloides</i>		113 Pépinière Adeline	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>xanthoxyloides</i>	1986.2709*A	220 Sir Harold Hillier Garden	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>xanthoxyloides</i> var. <i>dimorpha</i>	229	8 Arb. Barres	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>xanthoxyloides</i> var. <i>dimorpha</i>	259	9 Arb. Barres			Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>xanthoxyloides</i> var. <i>dimorpha</i>	3018	51 Arb. Barres	Yes	Yes	Yes			Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>xanthoxyloides</i> var. <i>dumosa</i>		67 Arb. Chèvreloup	Yes	Yes	Yes			Yes
<i>Fraxinus</i>	<i>xanthoxyloides</i> var. <i>dumosa</i>	1978.1290*Q	200 Sir Harold Hillier Garden	Yes			Yes		Yes
Outgroups									
<i>Chionanthus</i>	sp.		996 Parc botanique du Launay		Yes	Yes	Yes		
<i>Forsythia</i>	sp.		8 Parc Botanique du Launay					Yes	
<i>Jasminum</i>	sp.		998 Parc botanique du Launay				Yes	Yes	
<i>Ligustrum</i>	<i>vulgare</i>		2 Parc Botanique du Launay	Yes	Yes		Yes	Yes	Yes
<i>Ligustrum</i>	<i>vulgarum</i>		999 Wild collected				Yes	Yes	Yes
<i>Olea</i>	<i>europaea</i>		3 Parc Botanique du Launay	Yes					Yes
<i>Osmanthus</i>	sp.		4 Parc Botanique du Launay	Yes	Yes		Yes		Yes
<i>Phyllirea</i>	<i>angustifolia</i>		1 Parc Botanique du Launay	Yes	Yes		Yes		
<i>Syringa</i>	sp.		5 Parc Botanique du Launay	Yes			Yes		
<i>Syringa</i>	sp.		997 Parc botanique du Launay	Yes	Yes	Yes	Yes		

3.3 Conclusions

L'analyse des jeux de données produits permet de confirmer l'origine nord-américaine du genre *Fraxinus*, avec le placement de la section *Dipetalae* en position basale dans le genre. Nous avons aussi clarifié la position des sections *Melioides* et *Ornus*, en montrant la séparation du genre en deux groupes, l'un principalement Américain (section *Melioides* et *incertae sedis*), l'autre principalement distribué en Eurasie (sections *Pauciflorae*, *Sciadhanthus*, *Ornus* et *Fraxinus*). Compte-tenu du tri incomplet de lignées potentiellement observé dans la section *Melioides* et aboutissant à des relations intrasectionnelles différentes suivant les jeux de données considérés, nous recommandons d'étudier plus précisément le statut spécifique de ces taxons, plusieurs auteurs ayant précédemment conclu à la synonymie de plusieurs espèces (Dayton, 1954; Miller, 1955).

La nouvelle topologie présentée ici pour le genre *Fraxinus* et plus particulièrement le placement des espèces précédemment classées comme *incertae sedis* apporte un nouvel éclairage sur les événements de dispersions dans le genre, en les réduisant à deux événements majeurs de dispersion de l'Amérique du Nord vers l'Eurasie, le premier à la base du groupe des espèces classées comme *incertae sedis*, le deuxième à la base du groupe contenant les sections *Sciadhanthus*, *Fraxinus* et *Ornus*. Il est intéressant de noter l'orientation de ces événements, différente de celle de la plupart des dispersions connues actuellement (Donoghue et Smith, 2004). Dater les événements de spéciation dans le genre permettrait de confirmer ou d'infirmer le statut spécifique des taxons de la section *Melioides*, et de vérifier s'il y a corrélation entre les grands événements climatiques et géologiques survenus dans l'hémisphère nord et les événements de dispersion et de spéciation.

Maintenant qu'une phylogénie robuste et fiable du genre *Fraxinus* est établie, l'étude de l'évolution de caractères phénotypiques particuliers dans le genre pourra être réalisée de manière fiable et sans équivoque. Considérant les expérimentations d'hybridations contrôlées réalisées précédemment au laboratoire (Raquin, C. comm. pers.) ayant abouti à des hybrides intersectionnels (*F. pennsylvanica* x *F. excelsior*) viables mais stériles (stérilité post-zygotique des graines issues des F1xF1), il semble clair que les barrières reproductrices à l'intérieur du genre sont relativement faibles. Il serait donc intéressant de réaliser des tests exhaustifs de fécondations croisées entre – dans un premier temps – les différentes sections, puis entre l'ensemble des espèces du genre, afin de clarifier le nombre d'espèces « biologiques » dans le cadre de la phylogénie que nous avons établie, et représentant donc des lignées évolutives

(Evolutionarily Significant Units, voir Moritz, 2002) à prendre en compte dans les éventuelles politiques de conservation.

Le développement de ressources génomiques tel que la banque d'EST (Expressed Sequences Tags) produite dans le cadre du réseau d'excellence Européen EVOLTREE, permettra certainement l'émergence de nouvelles voies de recherches sur le genre *Fraxinus*, d'abord par la possibilité d'avoir la séquence de nombreux gènes disponibles pour une espèce du genre, permettant d'élaborer plus facilement des amorces, mais aussi parce que l'analyse de la banque d'EST devrait permettre d'identifier de nouveaux gènes et marqueurs pour la délimitation des espèces du genre. Il est en effet envisageable de « redévelopper » des gènes qui ont posé des problèmes techniques (amplification, séquençage) pour améliorer la résolution dans certains groupes d'espèces ou de confirmer le tri incomplet de lignées dans certaines sections.

Le développement de microsatellites peu actifs et donc conservés entre espèces, par exemple ceux de régions codantes pouvant être repêchées à partir de banques d'ESTs, pourrait permettre d'utiliser des méthodes de coalescence afin d'estimer l'histoire démographique à l'échelle de certaines sections (notamment la section *Melioides* dans laquelle les « espèces » sont bien différenciées morphologiquement, mais très peu biologiquement et génétiquement), pour déterminer si les différenciations observées sont la conséquence d'évènements démographiques tels que des goulots d'étranglements ou des expansions rapides de certaines populations. Une fois l'histoire démographique connue, il serait possible d'explorer plus précisément les pressions de sélection pouvant s'appliquer sur ces taxons.

3.4 Références de l'introduction et des conclusions

- Acevedo-Rosas, R., Cameron, K., Sosa, V., Pell, S., 2004. A molecular phylogenetic study of *Graptopetalum* (Crassulaceae) based on ETS, ITS, *rpl16*, and *trnL-F* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 91, 1099-1104.
- Álvarez, I., Cronn, R., Wendel, J.F., 2005. Phylogeny of the New World diploid cottons (*Gossypium* L., Malvaceae) based on sequences of three low-copy nuclear genes. *Plant Systematics and Evolution* 252, 199-214.
- Andreasen, K., Baldwin, B.G., 2003. Nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism and hybridization in checker mallows (*Sidalcea*, Malvaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29, 563-581.
- Baldwin, B.G., Markos, S., 1998. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10, 449-463.
- Becerra, J.X., 2003. Evolution of mexican *Bursera* (Burseraceae) inferred from ITS, ETS, and 5S nuclear ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26, 300-309.
- Bousquet, J., Strauss, S.H., Li, P., 1992. Complete congruence between morphological and *rbcL*-based molecular phylogenies in birches and related species (Betulaceae). *Molecular Biology and Evolution* 9, 1076-1088.
- Brocchieri, L., 2001. Phylogenetic inferences from molecular sequences: review and critique. *Theoretical population biology* 59, 27-40.
- Campbell, C.S., A.Wright, W., Cox, M., Vining, T.F., Major, C.S., Arsenault, M.P., 2005. Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) in *Picea* (Pinaceae): sequence divergence and structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35, 165-185.
- Chaw, S.M., Walters, T.W., Chang, C.C., Hu, S.H., Chen, S.H., 2005. A phylogeny of cycads (Cycadales) inferred from chloroplast *matK* gene, *trnK* intron, and nuclear rDNA ITS region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37, 214-234.
- Clevinger, J.A., Panero, J.L., 2000. Phylogenetic analysis of *Silphium* and subtribe *Engelmanniinae* (Asteraceae: Heliantheae) based on ITS and ETS sequence data. *American Journal of Botany* 87, 565-572.
- Dayton, W.A., 1954. Some more notes on United States ashes (*Fraxinus*). *Journal of the Washington Academy of Science* 44, 885-390.
- De Bry, R.W., Sagel, R.M., 2001. Phylogeny of rodentia (Mammalia) inferred from the nuclear-encoded gene *irbp*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19, 290-301.
- Denk, T., Grimm, G.W., 2005. Phylogeny and biogeography of *Zelkova* (Ulmaceae *sensu stricto*) as inferred from leaf morphology, ITS sequence data and the fossil record. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147, 129-157.
- Donoghue, M.J., Smith, S.A., 2004. Patterns in the assembly of temperate forests around the Northern Hemisphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359, 1633-1644.
- Douady, C.J., Delsuc, F., Boucher, Y., Ford Doolittle, W., Douzery, E.J.P., 2003. Comparison of bayesian and maximum likelihood measures of phylogenetic reliability. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 248-254.
- Eckardt, N.A., 2004. The role of *phantastica* in leaf development. *Plant Cell* 16, 1073-1075.
- ranzke, A., Mummenhoff, K., 1999. Recent hybrid speciation in Cardamine (Brassicaceae) – conversion of nuclear ribosomal ITS sequences in *statu nascendi*. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 831-834.

- Ritz, U., Hundsdorfer, A.K., Iroko, Pavel, Auer, M., Kami, H., Lehmann, J., Mazanaeva, L.F., Krkozan, O., Wink, M., 2007. Phenotypic plasticity leads to incongruence between morphology-based taxonomy and genetic differentiation in western Palearctic tortoises (*Testudo graeca* complex; Testudines, Testudinidae). *Amphibia-Reptilia* 28, 97-121.
- Grob, G.B.J., Gravendeel, B., Eurlings, M.C.M., 2004. Potential phylogenetic utility of the nuclear *floricaula/leafy* second intron: comparison with three chloroplast DNA regions in *Amorphophallus* (Araceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30, 13-23.
- Havill, N.P., Campbell, C.S., Vining, T.F., LePage, B., Bayer, R.J., Donoghue, M.J., 2009. Phylogeny and biogeography of *Tsuga* (Pinaceae) inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany* 33, 478-789.
- Hundsdoerfer, A.K., Kitching, I.J., Wink, M., 2005. A molecular phylogeny of the hawkmoth genus *Hyles* (Lepidoptera: Sphingidae, Macroglossinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35, 442-458.
- Ishida, K., Green, B.R., 2002. Second- and third-hand chloroplasts in dinoflagellates: phylogeny of oxygen-evolving enhancer 1 (*PsbO*) protein reveals replacement of a nuclear-encoded plastid gene by that of a haptophyte tertiary endosymbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9294-9299.
- Jabbour, F., Damerval, C., Nadot, S., 2008. Evolutionary trends in the flowers of asteridae: is polyandry an alternative to zygomorphy? *Annals of Botany* 102, 153-165.
- Kim, M., McCormick, S., Timmermans, M., Sinha, N., 2003. The expression domain of *phantastica* determines leaflet placement in compound leaves. *Nature* 424, 438-443.
- Laroche, J., Li, P., Maggia, L., Bousquet, J., 1997. Molecular evolution of angiosperm mitochondrial introns and exons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5722-5727.
- Li, J., Alexander, J.H., Zhang, D., 2002. Paraphyletic *Syringa* (Oleaceae): evidence from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS and ETS regions. *Systematic Botany* 27, 592-597.
- Lihova, J., Shimizu, K.K., Marhold, K., 2006. Allopolyploid origin of *Cardamine asarifolia* (Brassicaceae): incongruence between plastid and nuclear ribosomal DNA sequences solved by a single-copy nuclear gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39, 759-786.
- Miller, G.N., 1955. The genus *Fraxinus*, the ashes, in North America, North of Mexico., Cornell University Agricultural Experiment Station Memoire, pp. 1-64.
- Morand-Prieur, M.E., Vedel, F., Raquin, C., Brachet, S., Sihachakr, D., Frascaria-Lacoste, N., 2002. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. *Molecular Ecology* 11, 613-617.
- Moritz, C., 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic biology* 51, 238-254.
- Patterson, C., Williams, D.M., Humphries, C.J., 1993. Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24, 153-188.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Soltis, D.E., Mavrodiev, E.V., Doyle, J.J., Rauscher, J., Soltis, P.S., 2009. ITS and ETS sequence data and phylogeny reconstruction in allopolyploids and hybrids. *Systematic Botany* 33, 7-20.
- Takishita, K., Ishida, K., Maruyama, T., 2004. Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted *gapdh* gene supports separate origins for the peridinin- and the fucoxanthin derivative-containing plastids of dinoflagellates. *Protist* 155, 447-458.

- Urbatsch, L.E., Baldwin, B.G., Donoghue, M.J., 2009. Phylogeny of the coneflowers and relatives (Heliantheae: Asteraceae) based on nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences and chloroplast DNA restriction site data. *Systematic Botany* 25, 539-565.
- Wallander, E., 2008. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution* 273, 25-49.
- Winkworth, R.C., Donoghue, M.J., 2004. *Viburnum* phylogeny: evidence from the duplicated nuclear gene *gbssi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33, 109-126.
- Wilcox, T.P., Zwickl, D.J., Heath, T.A., Hillis, D.M., 2002. Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 361-371.
- Wolfe, K.H., Li, W.H., Sharp, P.M., 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9054-9058.
- Zhang, J., 1999. Performance of likelihood ratio tests of evolutionary hypotheses under inadequate substitution models. *Molecular Biology and Evolution* 16, 868-875.

4 Phylogéographie des espèces de la section *Fraxinus*

4.1 Introduction

La phylogéographie est l'étude des principes et processus qui gouvernent la distribution des lignées généalogiques, spécialement celle de niveau intraspécifique. Elle étudie les phénomènes génétiques et démographiques, en particulier les phénomènes de spéciation, ayant conduit à la distribution et à la structuration actuelle des populations (Avice, 2002).

En accord avec cette définition, la plupart des études phylogéographiques concernent une seule espèce, voire même une seule sous-espèce, et ont souvent pour but l'éclaircissement des patrons de colonisation postglaciaire du Quaternaire. Dans ce cas, elles font souvent appel à des marqueurs hautement variables comme les microsatellites de l'ADN mitochondrial, (Jaramillo-Correa *et al.*, 2004), de l'ADN chloroplastique (Heuertz *et al.*, 2006), les minisatellites (Godbout *et al.*, 2005), ou à des polymorphisme de restriction (RAPD, AFLP, etc.) (Schonswetter *et al.*, 2007).

Toutefois, la phylogéographie peut aussi s'étudier à un niveau taxonomique plus élevé, comme un genre, ou un groupe d'espèces au sein d'un genre. Certains utilisent alors le terme de biogéographie, qui est un terme plus général où la notion de lien généalogique (le préfixe « *phyllo* », feuille) n'est pas prise en compte. La phylogéographie peut également être élargie temporellement au patron de colonisation primaire durant les temps géologiques. C'est cette approche que nous utiliserons dans ce chapitre.

Nous avons étudié les deux espèces les plus étudiées du genre, *F. angustifolia* Vahl (le frêne à feuilles étroites) et *F. excelsior* L. (le frêne commun). *F. excelsior* est distribué dans toute l'Europe sauf le pourtour méditerranéen, où *F. angustifolia* fut initialement décrit. En France, *F. angustifolia* est désormais très commun dans l'aire méditerranéenne, commun dans le sud-ouest, mais rare plus au nord, où il peut être observé le long des grandes vallées fluviales: Loire, Saône et Seine. *F. angustifolia* présente un pic de floraison en décembre/janvier, alors que *F. excelsior* fleurit entre mars et avril. Les deux espèces sont post-pionnières, ont des aires de répartitions disjointes mais se trouvent en sympatrie dans plusieurs régions (par exemple le long des vallées de la Loire et de la Saône, qui représentent la limite nord de *F. angustifolia*). Fernandez-Manjarres *et al.* (2006), dans une étude de marqueurs microsatellites, ont démontré l'hybridation récurrente entre ces deux espèces et les mécanismes impliqués. A une échelle locale, un continuum phénologique a été observé entre *F. angustifolia* et *F. excelsior* (Gérard *et al.*, 2006a), avec une floraison maximale en février,

suggérant la présence d'hybrides introgressés (Gérard *et al.*, 2006a). À une échelle plus large, une diminution nette du nombre d'allèles chez *F. angustifolia* a été démontrée, en comparant la diversité génétique des deux espèces (Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006; Gérard *et al.*, 2006a). Morphologiquement, les deux espèces peuvent être discriminées par la taille de l'embryon (plus grande chez *F. angustifolia*) et le nombre de folioles chez l'adulte, réduit chez *F. angustifolia* et important chez *F. excelsior*. En combinant des données morphologiques et génétiques de type microsatellites, Fernandez *et al.* (2006) a montré l'absence de *F. angustifolia* au dessus de 200 mètres, et des simulations montrent que son aire de répartition est écologiquement plus restreinte que celle de *F. excelsior* (Fernandez *et al.* soumis).

La phylogéographie de ces deux espèces a révélé la présence d'haplotypes largement partagés entre *F. excelsior* et *F. angustifolia*. Toutefois, les haplotypes trouvés en Turquie s'avèrent uniques à *F. angustifolia*, ce qui a été expliqué par la présence putative d'un refuge au sud-est de la Turquie (Heuertz *et al.*, 2006). Ces deux espèces sont systématiquement proches des autres espèces appartenant à la section *Fraxinus*, *F. mandshurica* Rupr. et *F. nigra* Marsh. (Lingelsheim, 1907; Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008).

F. mandshurica est une espèce tempérée dioïque à étamines rudimentaires dans les fleurs femelles (Wallander, 2008), que l'on trouve en Asie orientale, de 30° à 53°N et de 100° (Chine) à 146°E (extrémité orientale de la Russie, Nord du Japon et nord de la Corée) (Yihong, 1995). Il est considéré comme une relique du Tertiaire, favorisé par les climats chauds et humides (Yihong, 1995).

F. nigra forme un arbre de taille moyenne (12 à 20m de haut), avec des feuilles de 25 à 40 cm portant 7 à 11 folioles. Les fleurs peuvent être mâles, femelles ou hermaphrodites, habituellement portées par des arbres différents, mais parfois sur le même (polygamodioécie). L'inflorescence allongée et branchée contient des fleurs apétales de couleur violacée. On le trouve habituellement dans les bois humides, les marais, plaines inondables et autres sites mésiques (The vPlants Project). Les phylogénies nITS identifient *F. mandshurica* comme espèce sœur des espèces européennes, et *F. nigra* comme extra-groupe pour les espèces eurasiatiques de la section *Fraxinus* (Jeandroz *et al.*, 1997; Wallander, 2008). La proximité phylogénétique et la similitude morphologique de *F. mandshurica* et *F. nigra* ont conduit certains auteurs à faire l'hypothèse d'une seule et même espèce (Sun, 1985; Yihong, 1995; Wei et Green, 1996).

Le but du présent chapitre est donc de clarifier les relations de parenté fines entre les espèces de la section *Fraxinus* et la chronologie de mise en place de ces relations, en lien avec les évènements climatiques et géologiques majeurs du Tertiaire et du Quaternaire.

4.2 The phylogeography of Eurasian *Fraxinus* species reveals ancient transcontinental reticulation

Hinsinger D.D.^{1,2,3,4}, Gaudeul, M.⁵, Couloux, A.⁶, Bousquet, J.⁴, and Frascaria-Lacoste, N.^{1,2,3}.

¹ AgroParisTech, UMR 8079, 91405 Orsay, France

² Centre national de la recherche scientifique, UMR 8079, 910405 Orsay, France

³ Université de Paris XI, UMR 8079, F-91000 Orsay, France Orsay, France

⁴ Chaire de recherche du Canada en génomique forestière et environnementale, Centre d'étude de la forêt, Université Laval, Québec, Québec, Canada G1V 0A6

⁵ Genoscope, Centre national de séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, C.P. 5706, 91057 Evry Cedex, France

⁶ Département systématique et évolution et Service de systématique moléculaire, Muséum national d'histoire naturelle, 43 rue Cuvier, 75231 Paris, France

Correspondence: Damien D. Hinsinger. Fax: +33 01 69 15 73 53;

E-mail: damien.hinsinger@u-psud.fr

Cet article sera soumis à la revue *Evolution*. Damien D. Hinsinger a collecté les échantillons, réalisé le travail de laboratoire, les analyses, et la rédaction de l'article, Myriam Gaudeul a participé à la production et à l'analyse des AFLP ainsi qu'à la rédaction de l'article, Arnaud Couloux a réalisé le séquençage des résultats d'amplification, Nathalie Frascaria-Lacoste et Jean Bousquet ont initié le projet et participé au choix des stratégies d'analyse, ainsi qu'à la rédaction de l'article.

4.2.1 Résumé

En Europe, les frênes appartiennent principalement à deux espèces, *F. excelsior* et *F. angustifolia*, connus pour s'hybrider lorsqu'ils sont présents dans le même environnement, par exemple les grandes vallées fluviales. Ces espèces ont été attribuées à la section *Fraxinus* du genre, mais leurs relations phylogénétiques avec les autres taxons Eurasiens de la section restent mal connues. Pour étudier l'histoire biogéographique de ces taxons et une possible relation avec les événements historiques majeurs en Eurasie, nous avons utilisé les espaceurs externes et internes transcrits des gènes de l'ARN ribosomique 18S-26S (respectivement les nETS et nITS) et des données de polymorphisme de fragment de restrictions amplifiés (AFLP) obtenues de populations échantillonnées à travers l'Europe et l'Asie. Contrairement à la phylogénie nITS où *F. angustifolia* et *F. excelsior* était monophylétique, la phylogénie nETS indiquait une séparation insoupçonnée de *F. angustifolia* en deux groupes paraphylétiques, un dans le Sud-Est de l'Europe, qui était proche de *F. excelsior*, et le second regroupant les populations de *F. angustifolia* d'Europe de l'Ouest et des Balkans, qui était plus apparenté à *F. mandshurica*. Cette incongruence implique que les populations d'Europe de l'Ouest et des Balkans ont pu être affectées par un transfert latéral ancien de *F. mandshurica* qui est aujourd'hui restreint au Nord-Est de l'Asie. L'estimation des temps de divergence basée sur les séquences et la topologie nITS indiquent qu'un tel transfert latéral aurait eu lieu durant l'Optimum Climatique du Miocène, il y a environ 15 millions d'années. Même si en se basant sur les nITS et les nETS, les individus de *F. angustifolia* des Balkans sont regroupés avec ceux d'Europe de l'Ouest, les données AFLP montraient que ces populations formaient un groupe distinct des autres populations de *F. angustifolia*. Ces résultats suggèrent que le statut subsppécifique de *F. angustifolia* ssp. *oxycarpa* (M.Bieb. ex Willd.) Franco & Rocha Afonso dans la Péninsule balkanique, est valide. En tenant compte de la paraphylie observée de *F. angustifolia* (à la fois vis-à-vis de *F. excelsior* et de *F. mandshurica*) et du fait que des individus de *F. excelsior* étaient mélangés avec des individus de *F. angustifolia*, nous avons conclu que *F. angustifolia* et *F. excelsior* devraient être considérés comme des taxons consppécifiques, avec un statut subsppécifique pour certains groupes. Par conséquent, les résultats de la présente étude ont des implications importantes pour la systématique des espèces eurasiatiques du genre *Fraxinus*, et apportent des preuves d'un cas rare de réticulation ancienne entre des espèces d'arbres tempérés avec des distributions actuelles séparées en Europe et en Asie.

4.2.2 Abstract

In Europe, ashes belong to two main species, *F. excelsior* and *F. angustifolia*, which are known to hybridise when they are present in the same environment, like in large fluvial valleys. These species have been ascribed to the *Fraxinus* section of the genus, but their phylogenetic relationships with other Eurasian taxa of the section remain poorly understood. To investigate the biogeographical history of these taxa and possible relationships with major historical events in Eurasia, we used nuclear external and internal transcribed spacer sequences of 18S–26S ribosomal RNA genes (nETS and nITS, respectively) as well as amplified fragment length polymorphisms (AFLP) data obtained from populations sampled throughout Europe and Asia. Contrary to the nITS phylogeny where *F. angustifolia* and *F. excelsior* were monophyletic, the nETS phylogeny indicated an unexpected separation of *F. angustifolia* in two paraphyletic groups, one from South-eastern Europe, which was closely related to *F. excelsior*, and the second one gathering Western Europe and the Balkans populations of *F. angustifolia*, which was more closely related to *F. mandshurica*. This incongruence implicated that *F. angustifolia* populations from Western Europe and from the Balkans might have been affected by ancient lateral transfer from *F. mandshurica*, which is restricted to North-eastern Asia nowadays. The estimates of divergence times based on nITS sequences and topology indicated that such a lateral transfer would have occurred during the Miocene Climatic Optimum, approximately 15 millions years ago. Even if *F. angustifolia* from the Balkans were regrouped with those from Western Europe based on both nITS and nETS, AFLP data showed that these Balkans populations formed a distinct group from other *F. angustifolia* populations. These results suggest that the subtaxon status of *F. angustifolia* ssp. *oxycarpa* (M.Bieb. ex Willd.) Franco & Rocha Afonso in the Balkan Peninsula, is valid. Considering the observed parphyly of *F. angustifolia* (relative to both *F. excelsior* and *F. mandshurica*) and the fact that *F. excelsior* trees were intermingled with trees from *F. angustifolia*, we concluded that *F. angustifolia* and *F. excelsior* should be considered as conspecific taxa, with subspecies status for some groups. Therefore, the results of the present study have important implications for the systematics of Eurasian *Fraxinus*, and provide evidence of a rare case of ancient reticulation among temperate tree taxa with modern disjunct distributions in Europe and Asia.

4.2.3 Introduction

Ancient reticulate evolution and contemporary introgressive hybridization between species play dual roles in the dynamics of biodiversity. On the one hand, these phenomena might contribute to an increase in the number of species through the formation of novel gene combinations, with potentially enhanced evolutionary potential and the emergence of new lineages (Arnold 2006). On the other hand, if introgressive hybridization is maintained on the long run, it might result in a decrease of the number of species by genetic assimilation (Rhymer and Simberloff 1996).

Reticulate evolution is likely to be a common phenomenon among closely related species, because the continuum of genetic variation from the individual to the species level often tends to blur species boundaries (Mallet 2008). Moreover, because speciation is a continuous process, newly divergent species can exchange genes during a period called the “grey zone”, during which the number of species differs depending on the exact species concept or definition that is used (De Queiroz 2007).

The majority of tree species are outcrossed and closely-related ones may experience high levels of interspecific gene flow, implicating potentially large and fuzzy delimited hybrid zones (Perron and Bousquet 1997; Petit and Hampe 2006). Therefore, they should represent good models for investigating present and ancient reticulate evolution. The effects of including hybrid taxa on the topology of inferred phylogenetic trees have been studied (McDade 1992; Rieseberg 1995; McDade 1997; Soltis *et al.* 2009) and some test cases have been published (e.g. Koontz *et al.* 2009). However, very few studies have focused on tree species with large natural distributions.

Two ash species are present in Europe: *Fraxinus excelsior* L. (common ash) is found throughout the continent except in the Mediterranean region, where *F. angustifolia* Vahl (narrow-leaf ash) is very common. *F. angustifolia* is subdivided in three subspecies: *F. angustifolia* ssp. *angustifolia* is found in South-western Europe, *F. angustifolia* ssp. *oxycarpa* is observed in the Balkans, and *F. angustifolia* ssp. *syriaca* is distributed from Turkey in the south-west to Pakistan in the south-east and Russia in the north (Wallander 2008). Therefore, both species have mostly disjunct geographic and ecological ranges, but they are in sympatry at the northern limit of the range of *F. angustifolia*, such as in France, in the Loire, Sône and Seine river valleys. In these regions, natural introgressive hybridization has been demonstrated at both local (Gérard *et al.* 2006a) and regional scales (Fernandez-Manjarres *et al.* 2006) by using morphological and molecular data. *F. angustifolia* and *F. excelsior* can be

distinguished morphologically by embryo size (larger in *F. angustifolia*) (Raquin *et al.* 2002) and number of leaflets in adults (higher in *F. excelsior* than in *F. angustifolia*). Based on six chloroplast microsatellites, a phylogeographic study of these two species has shown that they share some chlorotypes, probably due to ancient hybridization in Pleistocene refugia (Heuertz *et al.* 2006). However, the chlorotypes found in South-eastern Europe were unique to *F. angustifolia*, an indication for the existence of a genetically distinct southern refugium during Pleistocene glaciations (Heuertz *et al.* 2006).

The two European ash taxa are closely related to the two other *Fraxinus* species that belong to the *Fraxinus* section of the genus, *F. mandshurica* Rupr. and *F. nigra* Marsh. (Lingelsheim 1907; Wallander 2008). *F. mandshurica* is a temperate dioecious species found in regions of Eastern Asia including China, the Russian Far East, North of Japan, and North of the Korean peninsula (Yihong 1995). It is well suited to warm and moist climates, similarly to other Tertiary relicts (Yihong 1995). *F. nigra* is found in moist woods, swamps, flood plains, and other mesic sites in North America (The vPlants Project, 2009). Within the *Fraxinus* section, the delineation of several independent species has even been questioned by morphological investigations (Sun 1985; Yihong 1995; Wei and Green 1996). Phylogenies based on nITS sequencing (Jeandroz *et al.* 1997; Wallander 2008) identified *F. mandshurica* as the sister taxon of the European species *F. angustifolia* and *F. excelsior*, and *F. nigra* as the sister species of the three Eurasian species *F. mandshurica*, *F. angustifolia*, and *F. excelsior*. This may suggest an east-west expansion of the section, from America to Europe through Asia, as suggested by Jeandroz *et al.* (1997). While the time of this dispersion has not been estimated, it was likely affected by Tertiary geological and climatic events in Eurasia during early diversification and colonisation, as it has been shown for *Quercus suber* in the Mediterranean region (Magri *et al.* 2007).

While sequence information from the nuclear genome is increasingly obtained from low-copy-number regions such as *FLO/LFY* and *AG* (Nishimoto *et al.* 2003), nuclear ribosomal transcribed spacers have been shown frequently to be informative phylogenetic markers at the genus level (Soltis and Kuzoff 1995; Alice and Campbell 1999; Franzke and Mummenhoff 1999; Rauscher *et al.* 2002). Recently, the nuclear external transcribed spacer (nETS) of rRNA genes has been used successfully in low-level phylogenetic studies since it exhibits a higher mutation rate than the nuclear internal transcribed spacers (nITS) (Baldwin and Markos 1998; Andreasen and Baldwin 2001; Markos and Baldwin 2002; Acevedo-Rosas *et al.* 2004). Congruence between the nITS and nETS regions has usually been observed as a result of the concerted evolution affecting rRNA nuclear gene loci (Baldwin and Markos

1998; Bena *et al.* 1998; Li *et al.* 2002; Becerra 2003). However, incongruence has been detected in a few cases, probably due to the occurrence of nonuniform concerted evolution [i.e. differential level of gene conversion between two part of the rDNA repeat, see Okuyama *et al.* (2005) for details] following reticulate evolution. Therefore, nuclear ribosomal DNA regions can be useful to detect reticulation (Soltis *et al.* 2009) and study the consequences on phylogeny reconstruction, such as the placement of hybrids in phylogenies (Rieseberg 1995; McDade 1997).

AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphisms) markers were developed originally for linkage mapping purposes (Alter and Fehlh Haber 2003; Julier *et al.* 2003; Lacape *et al.* 2003). However, they are now used to estimate phylogenies (Despres *et al.* 2003), in phylogeographic studies (Despres *et al.* 2002; Alter and Fehlh Haber 2003; Campbell *et al.* 2003), and for the detection of hybrids (Gobert *et al.* 2002). Though being dominant markers, one main advantage of AFLPs is to provide a large amount of mostly neutral markers, that are reproducible and spread throughout the genome (Meudt and Clarke 2007; Holland *et al.* 2008).

Given that recent (Morand-Prieur *et al.* 2002; Fernandez-Manjarres *et al.* 2006; Gérard *et al.* 2006b) and potentially ancient hybridization occurs in the section *Fraxinus* and that crossability data are available only for the *F. excelsior* and *F. angustifolia* pair of species, we used nITS and nETS sequences of nuclear RNA genes and AFLP markers to examine the phylogenetic relationships among species of the *Fraxinus* section and to estimate divergence times.

In estimating these phylogenies, we wanted to address the following questions:

- (i) Can we identify genetically homogeneous groups within the *Fraxinus* section and do they correspond to the delineation of species?
- (ii) What is the molecular paleo-biogeography of the group?
- (iii) Can we track potential ancient reticulation in this group?

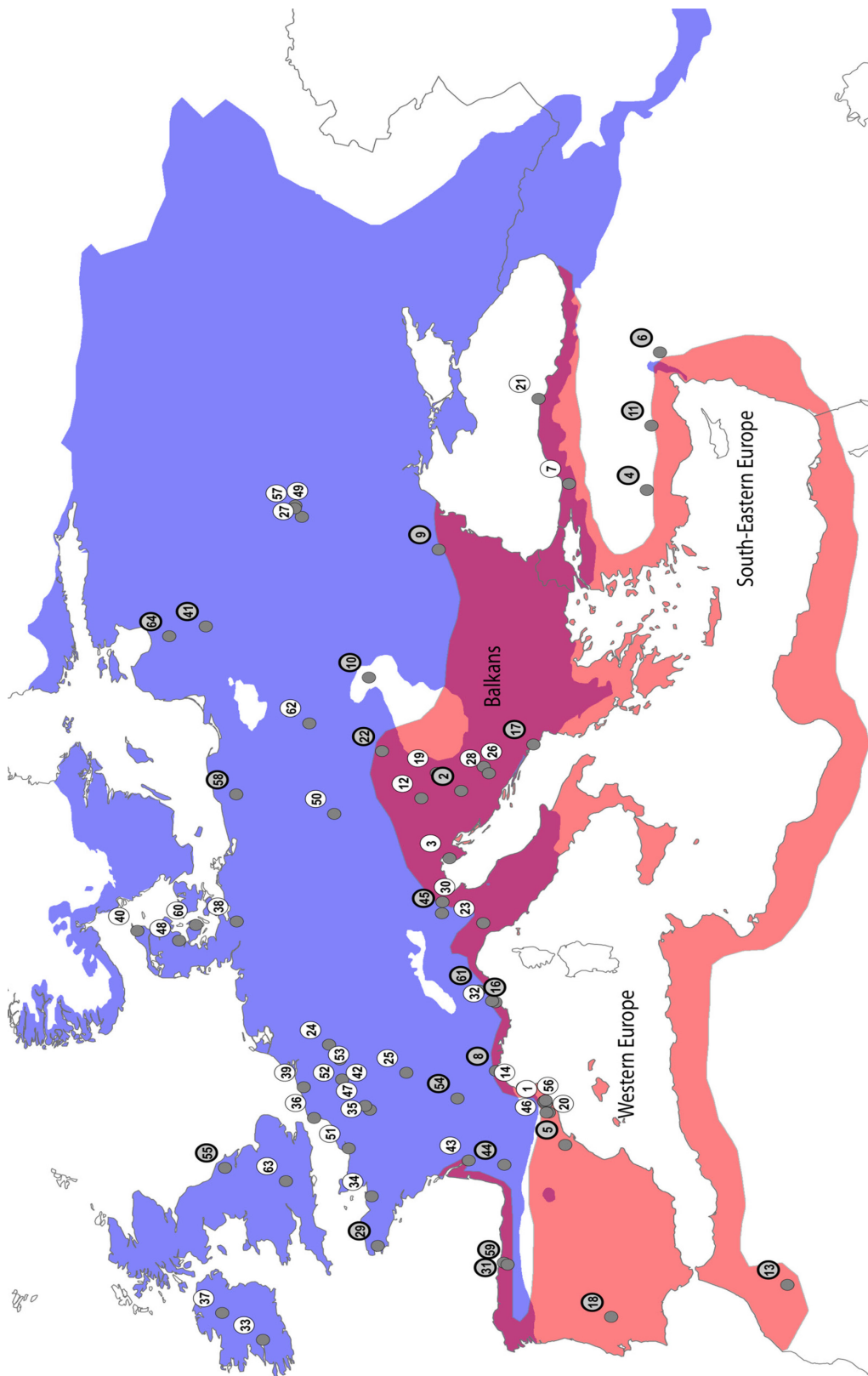


Figure 4.1. Location of sampled populations of *F. angustifolia* and *F. excelsior*. Additional accession information is provided in Table 4.1 and Appendix 4.1. The range of *F. angustifolia* is shown in red and that of *F. excelsior* is shown in blue ; pink is the overlapping of the both ranges. Populations used for AFLP analysis are indicated by grey bold circles.

4.2.4 Materials and Methods

4.2.4.1 Plant material

A total of 515 *F. excelsior* and *F. angustifolia* individuals from 66 populations were sampled throughout Europe (Table 4.1 and Fig. 4.1). Due to the close relationship of *F. mandshurica* with European species in the *Fraxinus* section (Jeandroz *et al.* 1997; Wallander 2008), 13 samples of *F. mandshurica* from arboreta and from wild populations in Japan were also included in the study, and *F. nigra* (a North-American species) was used as an outgroup (Jeandroz *et al.* 1997; Wallander 2008). For each sample, 50 mg of fresh leaves were dehydrated in an alcohol/acetone (70:30) solution and stored once they were dried fully. DNA extraction was carried out using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) following the manufacturer's instructions.

4.2.4.2 Molecular methods

Because no phylogenetically informative variation was found in the nucleotide sequences of five cpDNA regions among the taxa investigated herein (Gielly and Taberlet 1994; Arca *et al.* submitted), and for reasons mentioned above, we used sequences of nETS and nITS, two fast-evolving nuclear regions, to estimate phylogenetic trees.

4.2.4.2.1 Amplification and sequencing of the nETS and nITS

The 3' region of the nETS was amplified from the DNA samples using the primers SST-ETS (GGC WTG TKT GGG TAT GTT GGA T) and 18S-ETS (ACT TAC ACA TGC ATG GCT TAA TCT), which had been used previously in *Syringa* (Oleaceae) (Li *et al.* 2002). New internal primers, ETS-F1 (ATG CCT GTT CAT TGG ATG) and ETS-R1 (AAG YCC AVV ACR AGG ARG), were designed and used for some individuals. The PCR reaction mix contained 2 U of Taq DNA polymerase (MP-Biomedicals, Solon, Ohio, USA), 1× buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 1 μM of each primer, 0.1 mg/ml DMSO, and 30 ng of genomic DNA in a final volume of 25 μl. PCR was carried out in a Mastercycler® ep gradient S thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) under the following thermal cycling program: 2 min at 94°C; 5 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 57°C, and 30 s at 72°C, with a touchdown of -1°C per cycle; followed by 50 cycles of 15 s at 94°C, 30s

Table 4.1. Populations data for samples of the *Fraxinus* section included in this study. Species: Morphological identification of populations at the species level (see text for details).

	Country	Population	Number of individuals	Latitude	Longitude	
<i>F. angustifolia</i>	Bosnia	Balkans	11	43,2652	17,1991	
	France	Mas Larrieu	2	43,6429	3,7973	
		Opio	3	43,6584	6,9980	
	Hungary	Poroboly	5	42,2000	18,9833	
		Potony	6	45,9333	17,6500	
	Morocco	Zaouhi-Ahamal	14	32,3730	-6,1544	
	Portugal	Portugal	16	39,1928	-7,6478	
	Slovakia	Kapuzansky Luh	6	48,5667	22,0833	
		Zeliezve	6	48,0500	18,6667	
	Dragonja	Dragonja	5	45,4500	13,6833	
		Lendava	6	46,5333	16,4667	
		Aiguafredo	8	41,7339	2,2669	
	Spain	El Canaletes	7	40,9592	0,3559	
		Monistrol	8	41,5947	1,8538	
		San-Vicente	9	41,6872	1,8525	
	Turkey	Egirdir	6	37,8000	30,8000	
		Gazintep	6	37,3000	37,2000	
		Golyaka	3	40,8167	31,1000	
		Igneada	2	45,8667	28,0333	
		Karapinar	4	37,6333	33,8000	
	Sinap	1	42,0000	35,0500		
	Tenerife	EU314813.1 <i>Fangustifolia</i>				
	Italy	EU314815.1 <i>Fangustifolia</i>				
	Uzbekistan	EU314819.1 <i>Fangustifolia</i>				
	<i>F. excelsior</i>	Belgium	Aisances	13	50,0995	5,0086
			HogeBos	13	51,0851	3,0355
		Bosnia	Bimjezwo	1	44,127	17,9511
			Bugojno	1	43,9172	17,6394
		Czech Republic	Rabstejn	10	49,9036	15,7541
		Denmark	JacquiDK	1	57,5132	10,3027
Osterkov			13	55,9085	9,8600	
France		Tuedlykke	11	55,2562	10,5764	
		Aunay en Bazois	10	47,1165	3,6991	
		Cabel Ar Run	8	48,2136	-4,3445	
		Coursegoules	6	43,7924	7,0377	
		Dinan	12	48,4538	-2,0460	
		Dourdan	3	48,5229	1,9858	
		Dune d'Ecault	9	50,6779	1,6119	
		La Romagne	2	49,6854	4,3162	
		Lestiac	23	44,6906	-0,3713	
		Monein	20	43,3222	-0,5799	
		Orsay	1	48,7019	2,1710	
		Saint-Gatien	11	49,3500	0,1833	
		Saint-Gobain	8	49,5940	3,3897	
		Saint-Martin	2	49,0128	3,8596	
		Saint-Paul de Salers	15	45,1399	2,5166	
Germany		Ferchau	10	53,6851	10,7515	
Ireland		Currachase	10	52,6641	-8,7167	
		Enniskillen	14	54,2333	-7,4667	
Italy		Abetone	10	44,1456	10,665	
		Cadore	1	45,7231	11,6591	
		Monti Lessini	14	45,724	11,1298	
Lithuania		Valle Pesio	12	44,2945	7,5424	
		Kasyadoris	15	54,8700	24,4600	
		Zeimelio	11	56,2796	23,9983	
Poland		Szczecintek	15	57,7033	16,6552	
		Wloszczowa	13	50,8711	19,9627	
Spain		Congas	1	43,335	-5,1259	
		Montseny	11	41,7741	2,3888	
		Spain	10	41,7315	2,4149	
		Taranes	5	43,1992	-5,2128	
Ukraine		Bobor	5	51,1547	29,5417	
		Pripiat	2	51,402	30,0702	
		Stran Shepelyn	1	51,4244	29,9514	
United Kingdom		Settrington	8	54,1249	-0,7176	
		Wytham Wood	14	51,7761	-1,3335	
Sweden		EU314848.1				
<i>F. mandshurica</i>		Japan	EU314863.1			
			AH004972.1 and EU314864.1			
China		EU314864.1				
Japan		wild populations		10		
	USA	EU314867.1				
<i>F. nigra</i>						

at 52°C, and 30 s at 72°C; and finally, 7 min at 72°C. The quality of the PCR products was verified on 1.5% agarose gels, and the products were stored at 4°C.

The nITS were sequenced to check that our results agreed with a previously published phylogeny of *Fraxinus* (Wallander 2008). The spacers were amplified using primers ITS4 and ITS5 (Wojciechowski *et al.* 1993; Nickrent *et al.* 1994), in accordance with the reaction protocol of Wallander (2008). For some individuals, ITS1 and ITS2 were amplified separately using the primer pairs ITS1/ITS6 and ITS7/ITS8 (Jeandroz *et al.* 1997). The quality of the PCR products was verified on a 1.5% agarose gel, and the products were stored at 4°C until sequenced.

All sequencing was performed at Genoscope (Centre National de Séquençage, 91000 Evry, France). PCR products were purified using exonuclease I and phosphatase, and sequenced using a BigDyeTerminator V3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and an ABI 3730 XL sequencer. All regions were sequenced in both directions. All new sequences have been deposited in Genbank under Accession numbers ...to ... (nETS) andto.... (nITS; see appendix 4.1).

4.2.4.2.2 Sequence analysis

The quality of sequences and contigs was checked using CodonCode Aligner version 1.6.3 (Codon Code Corporation, Dedham, Massachusetts, USA) and manual alignment was conducted using the alignment editor Se-Al (Rambaut 2002). Sequences of nITS1 and nITS2 that were obtained from separate amplifications were concatenated into complete nITS sequences, and potential recent hybrids, which were identified on the basis of heterozygosity in the sequences, were removed manually from the nETS and nITS sequences. Given that bootstrap values can decrease when the number of individuals that exhibit the same sequences increases (Sanderson and Wojciechowski 2000), a haplotype matrix was constructed using the software package DnaSP (Librado and Rozas 2009). Appendix 4.1 (in Supplementary Material) indicates the haplotypes found in each individual. Aligned haplotype sequences were used to estimate phylogenetic trees based on maximum likelihood (ML) and the Bayesian inference method (BIM). Given that very few indels were present in the datasets, indels were treated as missing values in both methods of reconstruction. ML trees were constructed using PhyML (Guindon and Gascuel 2003), with a GTR substitution model and software-estimated parameters. Bootstrap values were estimated with 1000 pseudo-replicates. BIM trees were constructed using multiple runs in BEAST 1.4.8 (Drummond and Rambaut

2007). We choose to use a GTR + I + Γ model, which have been proved to better estimates the branch length than more complex models (Sullivan and Joyce 2005) and to not influence the nodes probabilities, even in over-parameterized analyses (Huelsenbeck and Rannala 2004). Four chains, 10-25 million generations and sampling every 1000 generations were used for MCMC settings. Sufficient MCMC sampling was checked visually with Tracer v1.4 (Drummond and Rambaut 2007, available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) using the ESS index for convergence of different runs.

Due to reportedly extensive natural hybridization between *F. excelsior* and *F. angustifolia* (Jeandroz *et al.* 1995; Morand-Prieur *et al.* 2002; Fernandez-Manjarres *et al.* 2006; Gérard *et al.* 2006a), it was expected that some samples could be misclassified from morphological identification alone. Indeed, some *F. excelsior* individuals exhibited nuclear ribosomal DNA sequences typical of *F. angustifolia* and *vice versa*, which translated in polyphyletic groups on the various phylogenies obtained (Figs. 2 to 5). Because of this, the species designation of the various groups delineated on phylogenetic trees was based on the majority rule of species assignment based on DNA sequences.

4.2.4.2.3 AFLP markers

To assess the relationships among species of the *Fraxinus* section on the basis of loci that are spread throughout the genome, AFLP genotyping and analysis were performed on 33 individuals from *F. angustifolia*, 22 individuals from *F. excelsior*, seven individuals from *F. mandshurica*, and one individual from *F. nigra* as an outgroup. These individuals were chosen from populations for which nETS identification for each individual was unequivocal.

Digestion, ligation, pre-amplification, and selective amplification using three primer pairs were carried out according to the following protocol. Genomic DNA was digested overnight with EcoR1 and Mse1 (10 μ L of genomic DNA were added to 10 μ L of digestion mix, which contained 1 \times buffer 2, 0.2 μ L of Bovine Serum Albumin 10 mg/ml, 2 U of MseI, and 5 U of EcoR1 [New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA]) and then ligated with EcoRI and MseI adapters (Vos *et al.*, 1995; 20 μ L of reaction mix, which contained 1 \times T4 buffer, 1.44 μ L of Mse1 adapters, 1.44 μ L of EcoR1 adapters (10 μ M), and 1 U of T4 ligase [Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana, USA], were added to the digested DNA and incubated for 3 h at 37°C). Preselective PCR was performed using the primers E-C and M-A (Vos *et al.* 1995) in a total volume of 25 μ L (which contained 3 μ L of

10× diluted digested and ligated DNA, 1× buffer, 1.25 µL each of primers (10 µM) and dNTPs (2 mM), and 1.5 U of Taq), and the following thermal cycling program: 2 min at 94°C; 20 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 56°C, and 1 min at 72°C; followed by 10 min at 72°C. Selective amplification was performed using three pairs of primers (E-AGG/M-CAG, E-AGG/M-CTG, and E-ACG/M-CTG), using E+3 primers labelled with the fluorophore 6-FAM, in a total volume of 20 µL (1× buffer, 1 µL of dNTPs (2 mM), 1 µL of each primer (10 µM), and 1.5 U of Taq added to 5 µL of 50× diluted preamplification template) and the following touchdown program: 2 min at 94°C; 14 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 65°C, and 1 min at 72°C, with a decrease in annealing temperature of -0.7°C per cycle; followed by 23 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 56°C, and 1 min at 72°C; and finally, 5 min at 72°C.

Genotyping was carried out using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer and the GeneScan 600 LIZ Size Standard (Applied Biosystems Inc., Foster City, California, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. Reproducibility was assessed by performing twice the analysis for the first individual in each species.

4.2.4.2.4 AFLP analysis

Genotype reconstruction was done using GeneMapper v3.0 (Applied Biosystems) with automated scoring to avoid scoring bias, using standard parameters designed for AFLP scoring (MFL 50, PHT 50, BW 0.5) (Holland *et al.* 2008). Individuals with aberrant data, such as very low number of alleles for one or more primer pair(s) were considered as missing data for these primer pairs, and the separate genotypes obtained for each primer pair were concatenated to obtain a unique multi-locus genotype for each individual. Loci for which data were not reproducible between both replicates were discarded. Samples with more than 95% of missing data were simply removed. SplitsTree4 (Huson and Bryant 2006) was used to calculate Nei & Li's pairwise genetic distances (Nei and Li 1979) with Jaccard character transformations (Jaccard 1908). The distance matrix was then used to construct a phylogenetic network using the Neighbor-Net algorithm (Bryant and Moulton 2004) implemented in SplitsTree4. Bootstrap values were calculated from 1000 bootstrap replicates.

To detect hybridization among the species determined morphologically in the field, Structure 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000) was used with default parameters (admixture model, no prior population information, $\lambda=1$) for different group numbers ranging from K=1 to K=6. Each Structure run was 1 million iterations long, with the first 100,000 iterations being discarded, and we performed six runs for each K value.

4.2.4.3 *Estimations of molecular divergence times*

To correlate major paleoclimatic or geological transitions with lineage splits or reticulate evolution, we estimated divergence times in the *Fraxinus* section. Because all available methods used a tree to estimate divergence time, it was not possible to date directly the potential reticulation event. It was assumed that the phylogenetic split between the group experiencing the reticulation and the sister taxa was a rough estimator for dating the reticulation event that would follow.

Many molecular dating methods are now available that are based on either a strict or a relaxed molecular clock (see review in Rutschmann 2006). Large variations in substitution rates can be observed between closely related taxa, especially when different life history traits are exhibited (*e.g.* annuals *vs.* perennials; herbaceous plants *vs.* shrubs or trees, (Bousquet *et al.* 1992; Smith and Donoghue 2008)), which highlights the fact that a strict molecular clock cannot be applied to most taxonomic groups (Britten 1986; Smith and Donoghue 2008). The use of a relaxed molecular clock has increased for molecular dating in phylogenetic studies (Wikström *et al.* 2001; Nie *et al.* 2006; Lemmon *et al.* 2007; Weeks and Simpson 2007; Smith and Donoghue 2008; Havill *et al.* 2009). Bayesian methods are being used increasingly, often because they facilitate the estimation of the uncertainty of divergence times better than penalised likelihood or nonparametric rate smoothing, which require a bootstrap procedure to estimate the robustness of the dating of nodes (Knapp *et al.* 2005; Xiang *et al.* 2005; Nie *et al.* 2006; Brown *et al.* 2008; Fiz *et al.* 2009). Despite the fact that the Bayesian methods of estimating divergence time, such as MULTIDIVTIME, require user input and use a fixed tree, they can estimate errors with respect to substitution rates, and can then use this information to infer a standard deviation (SD) value that represents the spread of posterior probability around a mean inferred divergence time. The reliability of the calibration points could represent a major source of error (Rutschmann *et al.* 2007), but the lack of fossil records for many groups can be counterbalanced by the increasing amount of published data regarding estimates of divergence times in phylogenetic studies (*i.e.* Wikström *et al.* 2001; Lee *et al.* 2007).

Given that most of the available Oleaceae fossils have only been classified at the genus level, it was necessary to use sequences from other *Fraxinus* species and from other Oleaceae genera to facilitate molecular dating. Consequently, we used previously published nITS sequences for the genus (Jeandroz *et al.* 1997; Wallander 2008). Using a Bayesian approach, MultiDivTime

analysis was performed on a simplified Bayesian tree that comprised one nITS sequence (from Wallander 2008) from each species recognised in Wallander (2008) and one individual for each subspecific group we found, using the PAML package (Rutschmann 2005). The Bayesian dating analysis was performed using MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). The model relied on six substitution types ("nst=6"), with rate variation across sites modelled using a gamma distribution, with a proportion of sites being invariant (rates="invgamma"). A Markov chain Monte Carlo search was run with four chains for 10 million generations, with trees being sampled every 100 generations (the first 10,000 trees were discarded as "burning"). The standard deviation of the Bayesian posterior probability distribution was calculated. To calibrate the reconstructed phylogeny, we used both the oldest and most reliable fossil that have been assigned to *Fraxinus* (Call and Dilcher 1992; minimum age constraint for *Fraxinus* genus: 39 mya) and previously published dated phylogeny that was based on plastid sequences in Oleaceae (Lee *et al.* 2007), that found 60 mya for the divergence between *Fraxinus* and the other Oleaceae in Oleaceae, and 35 mya for the divergence between *Ligustrum* and *Syringa*.

4.2.5 Results

4.2.5.1 Phylogenies from DNA sequences

The alignment of the nETS was 461 bp long and comprised 275 sequences, which included 68 unique haplotypes characterised by 69 variable sites. The BIM (Fig. 4.2) and ML (Fig. 4.3) trees were congruent at the species level, with four main groups; all but one of the groups corresponded to recognised species (*F. mandshurica*, *F. excelsior*, and *F. angustifolia* without South-east populations, respectively). Individuals from South-east European populations of *F. angustifolia* (denoted as *F. angustifolia* S.E., found in South-east Turkey) formed a separate group. These four groups were strongly supported (all posterior probabilities ≥ 0.95) in the BIM tree (Fig. 4.2). The grouping of *F. excelsior* with *F. angustifolia* S.E. was only moderately supported (posterior probability: 0.52) and that of *F. mandshurica* with the rest of *F. angustifolia* was not supported. In the ML tree (Fig. 4.3), groups corresponding to species were either not supported (*F. excelsior* and *F. angustifolia* S.E.) or well supported (*F. mandshurica* and *F. angustifolia*; bootstrap values of 97% and 98%, respectively). The grouping of *F. excelsior* and *F. angustifolia* S.E. was moderately supported (63%), as well as that of *F. mandshurica* and the rest of *F. angustifolia* (71%).

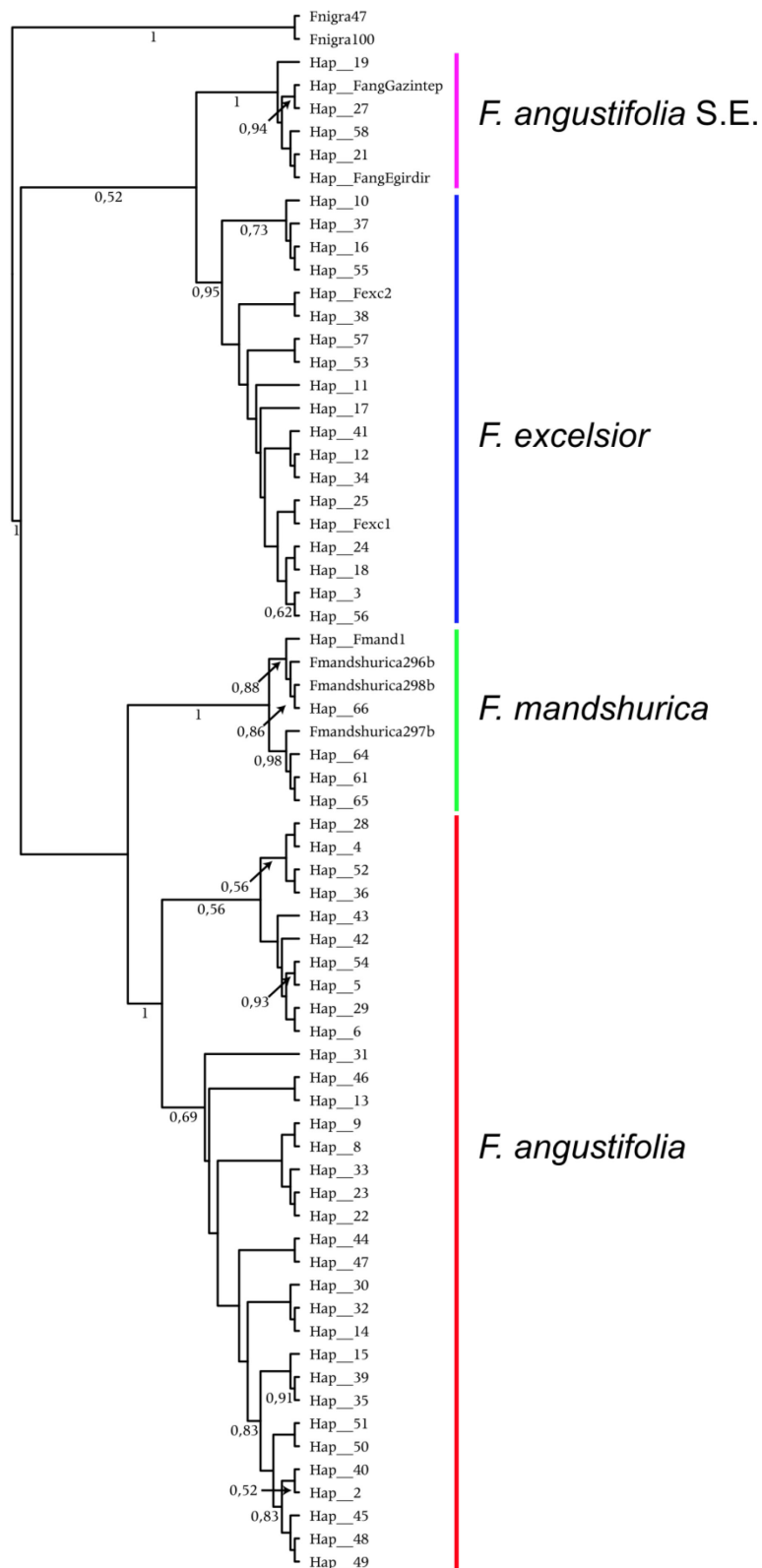


Figure 4.2. Tree from Bayesian analysis of nETS haplotypes. Posterior probabilities are indicated below the branches. Species groups based on the predominant species in each group are indicated by coloured bars. S.E., South-eastern Europe.

With both methods, the monophyly of the groups that comprised *F. excelsior*, *F. angustifolia* SE, the rest of *F. angustifolia*, and *F. mandshurica* was supported strongly (posterior probability of 1 in the BIM tree; bootstrap of 100% in the ML tree).

The nITS alignment was 614 bp long and comprised 462 sequences, which included 128 haplotypes characterised by 84 variable sites. The BIM and ML trees were not congruent for the relationship between the two *F. angustifolia* groups defined above and *F. excelsior*, and none of these groups was supported (50% threshold). In the BIM tree (Fig. 4.4), *F. angustifolia* S.E. appeared as a sister group to *F. excelsior* and other *F. angustifolia* individuals from the rest of the Mediterranean basin, whereas in the ML tree (Fig. 4.5), it formed a basal divergence within *F. angustifolia*. Despite the lack of resolution in the *F. angustifolia*/*F. excelsior* group, the position of *F. mandshurica* as an outgroup to both species and the monophyly of the *F. angustifolia*/*F. excelsior* group was strongly supported in the ML tree (bootstrap value: 86%). The present nITS results were not incompatible with those of previous studies (Jeandroz *et al.* 1997; Wallander 2008), although, the *F. angustifolia* and *F. excelsior* species pair was better resolved. Indeed, previous studies included fewer individuals, sampled only from allopatric areas [the reduced tree limited only to individuals from allopatric populations, not shown, was congruent with those of Jeandroz *et al.* (1997) and Wallander (2008)].

4.2.5.2 AFLP

Reproducibility tests led to the rejection of 25% of the 1125 AFLP loci produced, which resulted in a data matrix that included 63 individuals and 841 loci.

4.2.5.2.1 Neighbor-Net network

F. mandshurica formed a well-supported cluster (99.6% bootstrap value, clade D; Fig. 4.6) and was related closely to *F. nigra* (99.7% bootstrap support for clade E). Clusters A and C contained *F. angustifolia* trees from the western part of the Mediterranean region and all individuals of *F. excelsior*, respectively, whereas *F. angustifolia* individuals from South-eastern Europe were grouped in cluster F, as a sub-cluster of cluster B which otherwise included the individuals from the Balkan region. Cluster A appeared to be intermediate between *F. angustifolia* S.E. and cluster E (Fig. 4.6).

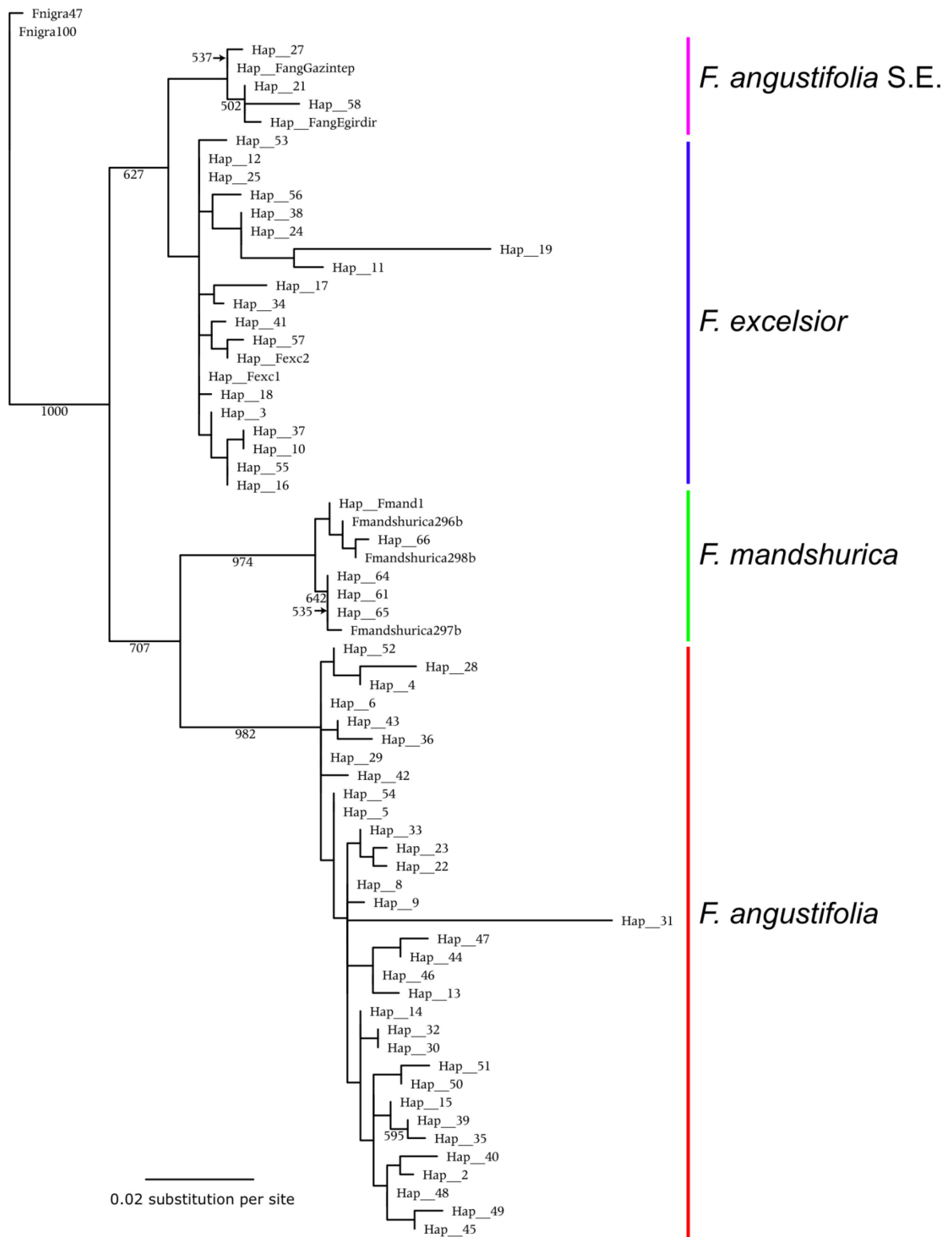


Figure 4.3. Phylogram from maximum likelihood analysis of nETS haplotypes. Bootstrap values are indicated below the branches. Specific groups based on the predominant species in each group are indicated by coloured bars. S.E., South-eastern Europe.

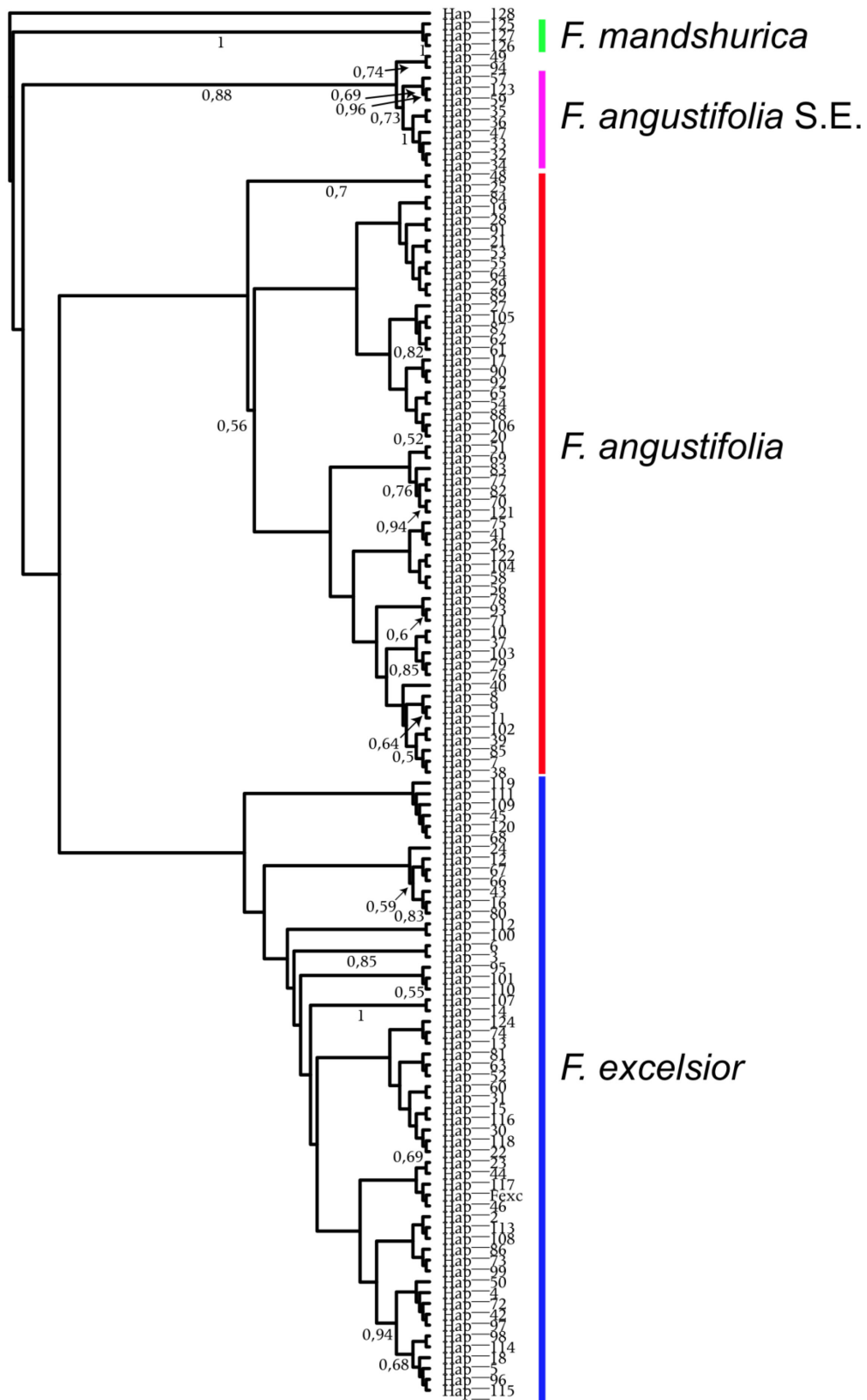


Figure 4.4. Tree from Bayesian analysis of nITS haplotypes. Posterior probabilities are indicated below the branches. Species groups based on the predominant species in each group are indicated by coloured bars. S.E., South-eastern Europe.

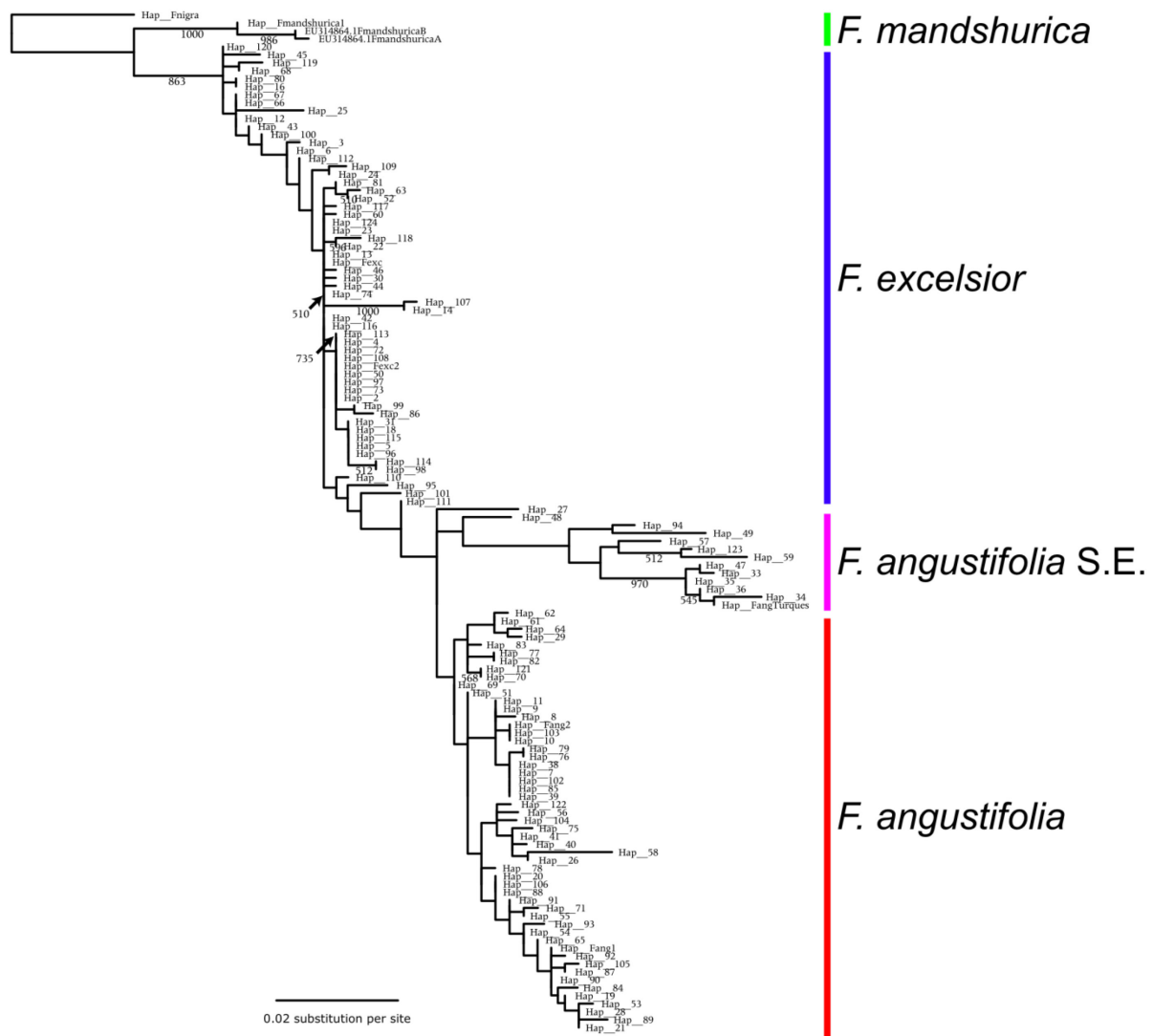


Figure 4.5. Phylogram from maximum likelihood analysis of nITS haplotypes. Bootstrap values are indicated below the branches. Species groups based on the predominant species in each group are indicated by colored bars. S.E., South-eastern Europe.

4.2.5.2.2 Structure

The Structure bar-plot graph, which shows the percentage of assignment of individuals to the different clusters identified by the Structure software (Fig. 4.7), confirmed the close relationship between *F. angustifolia*, *F. mandshurica*, and *F. nigra*. For $K = 2$ (Fig. 4.7A), which exhibited the highest probability (estimated \ln probability of data = -16137.5), the graph did not show any strong species-specific structure for AFLP data, with the exception that cluster 1 represented an average of $6.3 \pm 6.5\%$ of the assignment in *F. excelsior*, a value significantly different (t -tests: $P < 0.05$) than that for *F. angustifolia* ($10.4 \pm 7.8\%$), and for

F. mandshurica ($25.8 \pm 5.5\%$). All assignment means were significantly different ($P < 0.01$) between *F. mandshurica* and both *F. excelsior* and *F. angustifolia*. Although $K = 6$ was only the second most probable number of clusters (estimated ln probability of data = -16249.2), it was the most biologically coherent according to the groups delineated in the nITS and nETS phylogenetic trees. For this K -value, *F. angustifolia* did not show clear evidence of parphyly. The bar-plot (Fig. 4.7B) showed that two clusters (clusters 1 and 4) contributed little to the assignment in our dataset (4.1, 2.4, and 0.5% in *F. angustifolia*, *F. excelsior*, and *F. mandshurica*, respectively). Cluster 5 was mostly present among *F. excelsior* individuals ($71.6 \pm 17.1\%$), whereas cluster 2 was the main cluster characterising *F. angustifolia* ($85.8 \pm 7.4\%$) and *F. mandshurica* ($79.5 \pm 4.5\%$). Cluster 3 was present in all species, and was found at statistically similar levels in *F. angustifolia* ($8.6 \pm 5.7\%$) and *F. excelsior* ($8.4 \pm 1.1\%$) ($P = 0.46$), but was significantly more represented in *F. mandshurica* ($16.6 \pm 4.4\%$) ($P < 0.01$). The graph shows that cluster 6 contributed less to *F. excelsior* ($1.0 \pm 1.0\%$) than to *F. angustifolia* ($2.2 \pm 2.5\%$), and even less to *F. mandshurica* (0.2%, SD not available). All assignment means for the cluster 6 were significantly different between species (t -tests : $P < 0.05$), except between *F. excelsior* and *F. mandshurica*. Nucleotide distance between clusters, as indicated by the Structure results output, showed that cluster 3 was closer to cluster 6 (net nucleotide distance: 14.8) than to cluster 2 (179.6) and cluster 5 (184.7). Clusters 2 and 5 appeared to be closer to each other (39.7) than to cluster 6 (162.0 and 169.9).

4.2.5.3 *Incongruence between nuclear datasets*

nITS and nETS tree reconstructions showed a major incongruence in the placement of *F. mandshurica* (Fig. 4.8). In the nITS tree (Fig. 4.8a), this species was placed in a basal position relative to the European species *F. excelsior* and *F. angustifolia*, in accordance with taxonomical expectations. Whereas in the nETS tree, *F. mandshurica* was closely related to *F. angustifolia* haplotypes from Western Europe. Therefore, ancient reticulation was inferred, as shown in Fig. 4.8c.

4.2.5.4 *Estimations of molecular divergence times*

Bayesian dating estimated the minimum divergence time between *F. nigra* and Eurasian species of the section *Fraxinus* as 27.0 ± 7.1 mya (node 64 in Table 4.2 and Fig. 4.9), which corresponds to the middle Oligocene period (34 to 23 mya). The split between

Figure 4.6. AFLP Neighbor-Net network. Groups discussed in the text are marked by arcs and letters. *F. angustifolia* S.E.: individuals from South-eastern populations of *F. angustifolia*. Scale according to Nei & Li's (1979) genetic distance.

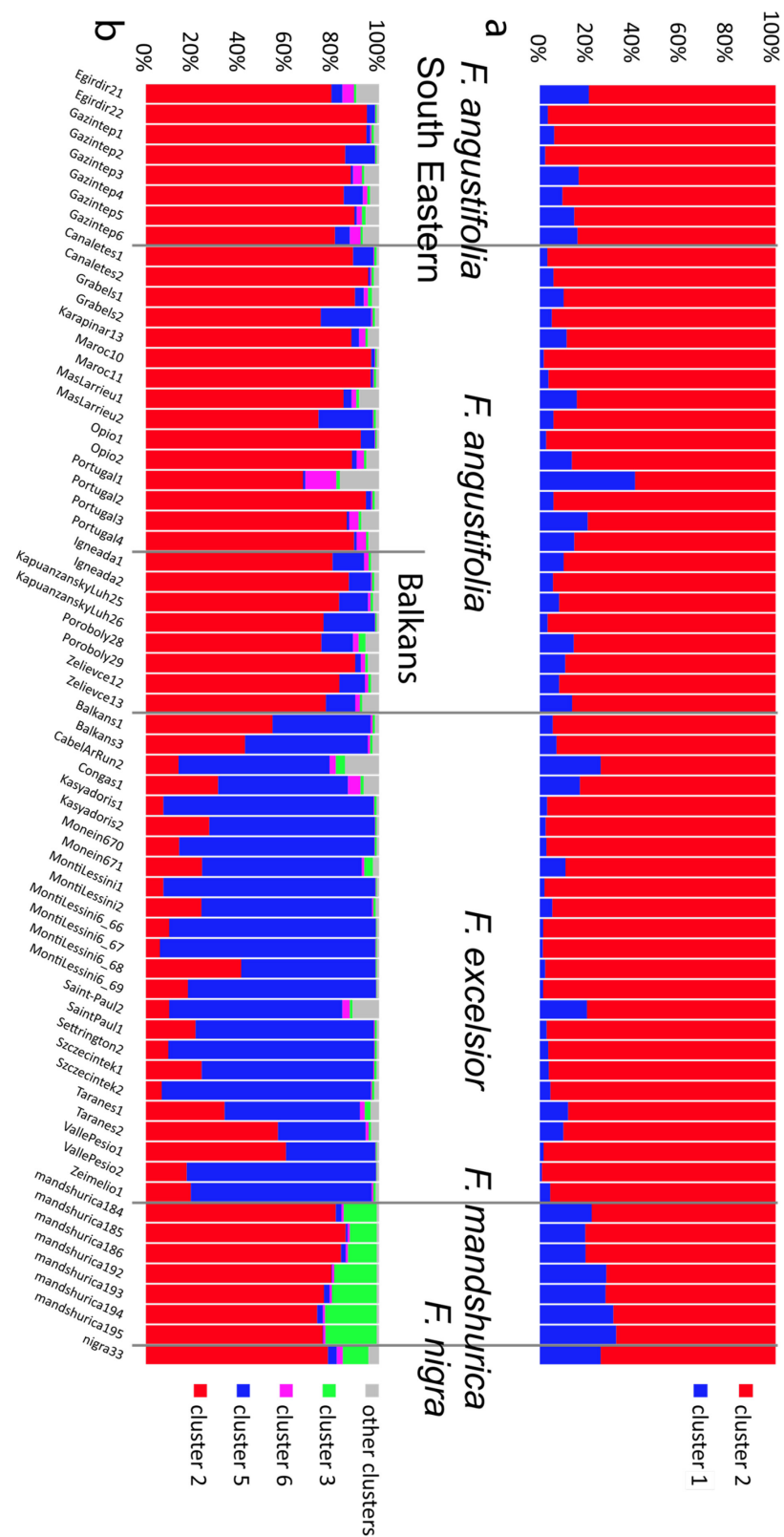


Figure 4.7. Bar-plot of Structure analysis of AFLP data: a for K=2, and b for K=6. Clusters are represented by colours, and individuals are represented as columns. Within each column, the extent of the component colour indicates the magnitude of the assignment of the individual to a particular cluster. The colours used are red for *F. angustifolia*, blue for *F. excelsior* and green for *F. mandshurica*.

Table 4.2. Estimations of divergence times from the nITS dataset (Wallander 2008 ; this study) using the MultiDivTime/PAML package (Rutschmann 2005). SD: standard deviation calculated for the posterior probability distribution.

Diversification event	Age (MYA)	Standard deviation (MYA)
Split between <i>F. nigra</i> and Eurasian ashes	26.9	7.1
Split between <i>F. mandshurica</i> and European ashes	22.8	6.8
Split between <i>F. excelsior</i> and <i>F. angustifolia</i>	18.4	6.2
Split between <i>F. angustifolia</i> from the South-east of Europe and other <i>F. angustifolia</i> populations	15.0	5.7

European ashes (*F. excelsior* and *F. angustifolia*) and the sister species *F. mandshurica* was estimated to have occurred at least 22.8 ± 6.8 mya (node 63 in Table 4.2 and Fig. 4.9). *F. excelsior* and *F. angustifolia* were estimated to have diverged at least 18.4 ± 6.2 mya (node 61 in Table 4.2 and Fig. 4.9), and the minimum divergence time between *F. angustifolia* from the South-east and other populations of *F. angustifolia*, resulting in the possibility of a reticulate event with *F. mandshurica*, was estimated at 15.0 ± 5.7 mya (node 58 in Table 4.2 and Fig. 4.9).

4.2.6 Discussion

4.2.6.1 Methodological considerations

It has been shown that the inclusion of identical sequences in a nucleotide dataset could result in an inferred tree globally less supported than another one in which each sequence was different from the other (Sanderson and Wojciechowski 2000). Despite the fact that we reduced the influence of similar sequences on the estimation of bootstrap through the use of a haplotypes matrix in phylogenetic reconstructions, support values were only moderate for some nodes. In most cases, we observed that BIM retrieved higher support values than ML, in agreement with a more general study (Alfaro *et al.* 2003). Both reconstruction methods produced congruent topologies at the species level. A better resolution but lower support values was obtained with the AFLP data compared to the nETS and nITS sequences, both between and within species. Theoretical and empirical evidences have shown that the inclusion of hybrids taxa in tree reconstruction should result in (i) observed low posterior probabilities or bootstrap values for the nodes involving putative reticulation events on the DNA tree, and

(ii) the placement of some groups of individuals at an intermediate position between both parental species group, or at a basal position of the lineage that includes the putative parental species group (Soltis *et al.* 2008). These effects also depend on the relatedness of the taxa involved (McDade 1992; Rieseberg 1995; McDade 1997; Posada and Crandall 2002). The low support values for many nodes on our phylogenies were therefore expected given the reported introgressive hybridisation between some of the taxa included in this study. These low support values are indicative of both hybridization between closely related species (such as between *F. excelsior* and *F. angustifolia*) and reticulate evolution between more distantly related species (such as between *F. angustifolia* and *F. mandshurica*) (McDade 1992; Rieseberg 1995). The placement of some individuals as sister groups to the most apomorphic parental species was also likely an indication of hybridization between the closely related species *F. excelsior* and *F. angustifolia* (McDade 1992; Posada and Crandall 2002). Such a

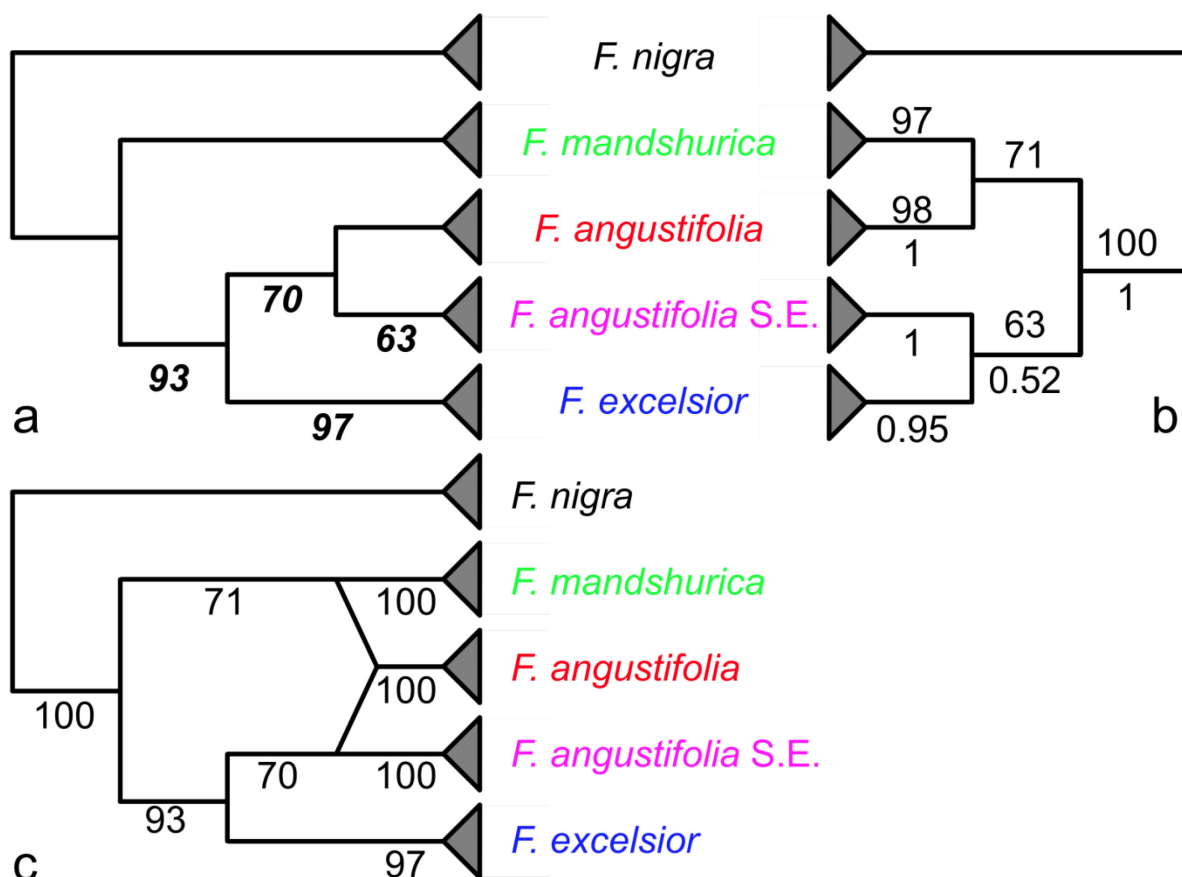


Figure 4.8. Schematic representation showing incongruence between nITS and nETS phylogenies. Bootstrap values from Wallander (2008) are shown in bold italics below branches for the nITS tree. a. nITS tree reproduced from Wallander (2008) ; b. nETS tree; c. consensus network showing reticulate evolution. Support values above the branches represent the highest support values for the clades considered in a and b. S.E., South-eastern Europe.

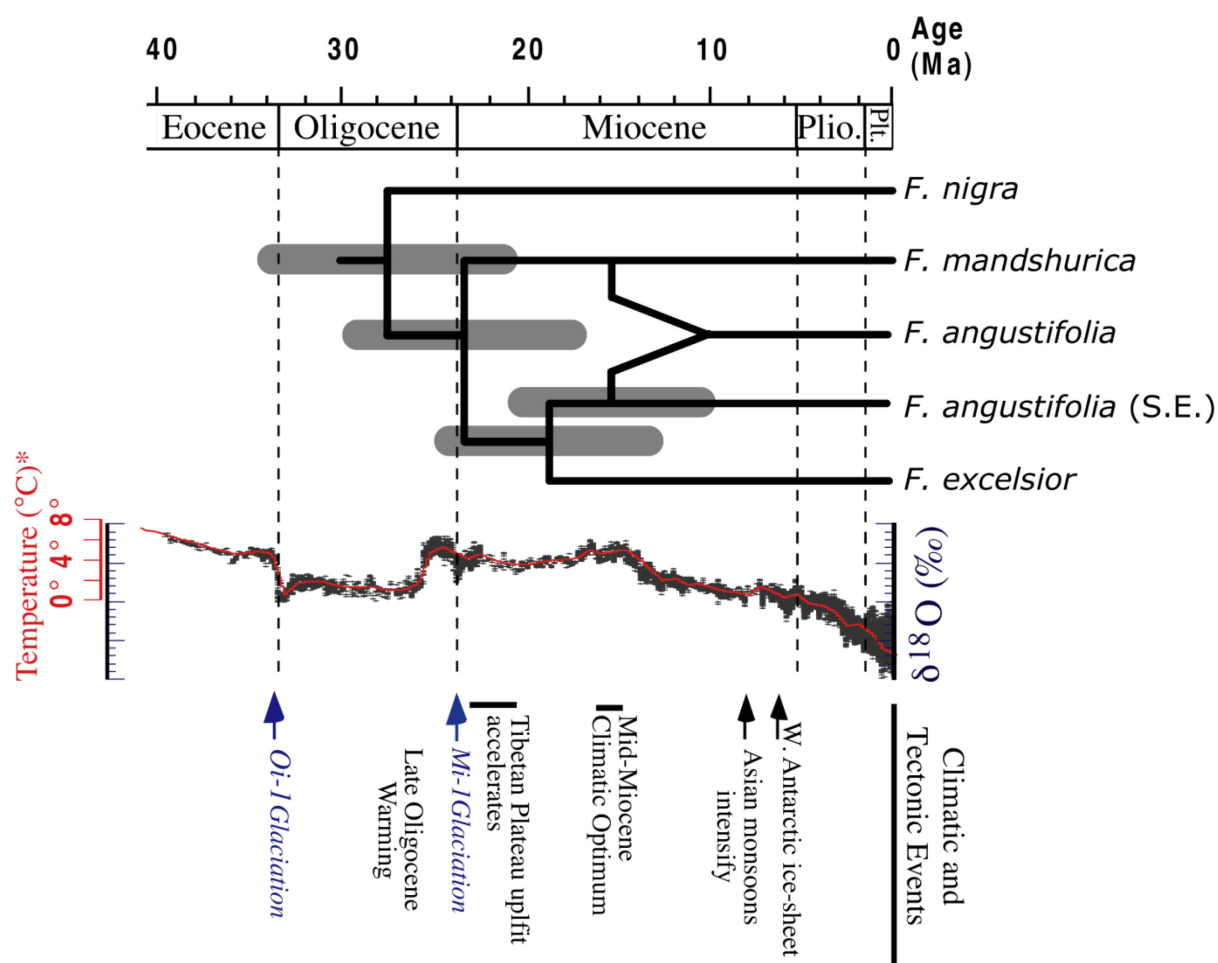


Figure 4.9. Chronogram of *Fraxinus* section based on Bayesian analysis of nITS data. The grey bars represent the standard deviation (SD) for the divergence times. The red temperature curve and the black points refer to ^{18}O variations. Climatic curves and climatic and tectonic events are reproduced from Zachos *et al.* (2001).

loss of resolution and support in some parts of the phylogenetic tree was also observed by Jeandroz *et al.* (1997) and Wallander (2008) for the *Fraxinus* section, despite the existence of well-supported nodes in other parts of their phylogenetic trees.

4.2.6.2 Molecular paleo-biogeography

4.2.6.2.1 Ancient reticulate evolution in Eurasian ashes

Ancient reticulation between *F. mandshurica* and *F. angustifolia* was inferred from the analysis of nETS phylogenies, which separated *F. angustifolia* in two groups, one from the South-east of Europe closely associated to *F. excelsior* and the rest of *F. angustifolia* (mostly from Western Europe) regrouped with *F. mandshurica*. On the contrary, in the nITS

phylogenies, *F. angustifolia* was monophyletic and *F. mandshurica* branched out early, in agreement with expectations from taxonomy. This incongruence and the results from the software Structure suggest that reticulate evolution has likely occurred between *F. angustifolia* from Western Europe and *F. mandshurica*, perhaps at a time where the natural distributions of both species could have come into contact.

The genetic differentiation between *F. angustifolia* from South-east of Europe and *F. angustifolia* from the Western part of the Mediterranean basin has been already emphasised in a previous study (Heuertz *et al.* 2006), but for cpDNA only. Indeed, in their study, Heuertz *et al.* (2006) found very divergent cpSSRs haplotypes in South-eastern Europe, most of these haplotypes being exclusive to this area. They interpreted the presence of these unique haplotypes as an indication of the existence of a genetically distinct southern refugium during Pleistocene glaciations (Heuertz *et al.* 2006). However, it is possible that these cpDNA haplotypes actually reflect the genetic composition of ancestral *F. angustifolia* chloroplasts, since they were found in a region where hybridization with *F. mandshurica* was thought to not occur. Such a reticulation with lateral transfer of the chloroplast from one species to the other (called “chloroplast capture”) has been suggested to be very frequent (Rieseberg 1995), especially when hybrids have the morphology of one parent and the chloroplasts of the other, as with *Gossypium bickii* (Wendel *et al.* 1991). Nuclear microsatellite markers from *F. excelsior* and *F. angustifolia* have been successfully transferred to *F. mandshurica* (Goto *et al.* 2006; Hu *et al.* 2008), but no such transfer does exist yet for cpDNA markers. Moreover, no studies have investigated the possible similarities of cpSSRs or other cpDNA features among the various groups implicated in this possible ancient event of reticulation. Such studies would therefore allow to identify shared ancestral features and help to resolve this issue of ancient lateral transfer. Although the evidence for reticulate evolution between two geographically distant taxa is rare, it is being inferred in an increasing number of plant species thanks to the sequencing of regions from the nuclear genome (Sang *et al.* 1997; Terry *et al.* 2000; Despres *et al.* 2003; Franzke *et al.* 2004; Wei and Wang 2004; Blattner 2006).

Eurasia has been particularly affected by past climatic changes and geological events. Accordingly, species geographic ranges have been strongly affected in this region over long periods of time (Comes and Kadereit 1998; Walther *et al.* 2002; Pennington *et al.* 2004). In trees, *Quercus suber* in the Mediterranean region has been shown to be affected by Tertiary geological and climatic events in Eurasia associated to the early divergence of intraspecific lineages (Magri *et al.* 2007). These events have sometimes lead to once separated taxa to grow in sympatry for a given period of time, thus allowing opportunities for reticulate

evolution when they are not completely isolated reproductively. Such a phenomenon, although rarely reported, has been shown both in conifers and angiosperms. In the conifer genus *Tsuga*, *T. dumosa* (found in the Himalayas) has been shown to be a hybrid taxa between another Asian taxon and a taxon from European background, diverging from its sister taxa about 17 mya (Havill *et al.* 2009). Other taxa originating from hybridization from European and Asian ancestors have been showed in angiosperms. In poplars (*Populus* spp.), the central Asia species *P. tristis* is thought to be an introgressant hybrid of *P. nigra* and an Asian unknown species (Hamzeh and Dayanandan 2004). In *Paeonia*, it has been shown that the European populations of an Asian species have been replaced by their hybrids, probably due to differential selection during the Pleistocene climatic changes (Sang *et al.* 1997). In the present study, a highly similar situation has been observed in the *Fraxinus* section, where hybrid populations of *F. angustifolia* x *F. mandshurica* were observed in most parts of the Mediterranean basin.

4.2.6.2.2 The split between *F. nigra* and *F. mandshurica*

In the literature, it has often been argued that geological and climatic factors have been the main drivers of speciation and determining the distribution of animal and plant taxa (e.g. Lemmon *et al.* 2007; Havill *et al.* 2009). This hypothesis is congruent with numerous cases of Eastern Asia (EA)–Eastern North America (ENA) disjunctions reported in animals and plants (i.e. Nie *et al.* 2006). The estimate of divergence time between the North American *F. nigra* and the Eurasian species (such as *F. mandshurica*) is consistent with the hypothesis that these EA-ENA disjunct taxa are relicts of the temperate forests of the Northern hemisphere, which reached their maximum development during the warm period characterizing the Tertiary (Axelrod, 1975 in Nie *et al.* 2006). These forests would have declined during the last 30 mya (Donoghue and Smith 2004).

4.2.6.2.3 Speciation among Eurasian species

The estimate of divergence time between *F. mandshurica* and related European species (around 23 mya) suggests that the concomitant uplift of the Himalayan plateau (Zachos *et al.* 2001) played a major role in the transcontinental diversification of the section *Fraxinus* in Eurasia. Given that *F. mandshurica* is reported to be well suited to warm and moist climates (Yihong 1995), it is likely that desertification following the Himalayan uplift (22 mya, Zhang

et al. 2006) promoted a split between populations located on the western and eastern foothills of the rising Himalayan plateau (Fig. 4.8), giving rise progressively to differentiated lineages. Animals that are restricted to a warm and moist climate, such as salamanders, experienced a similar split due to uplift of the Himalayan plateau and desertification (Zhang *et al.* 2006). However, the split between *F. angustifolia* and *F. excelsior*, about 18 mya, did not appear to be correlated with any major geological or climatic event, which suggests that ecological speciation may be involved, with *F. excelsior* widespread in a temperate climate and *F. angustifolia* restricted to a more Mediterranean climate (Schluter 2001).

4.2.6.2.4 Reticulation between *F. angustifolia* and *F. mandshurica*

The split between South-eastern populations and other European populations of *F. angustifolia*, about 15 mya, and which lead to the presumed reticulate evolution with *F. mandshurica*, occurred shortly after a period characterized by a peak in humidity (18–16.5 mya), followed by a marked seasonality in precipitation with dry periods of up to six months in Eastern Europe (Bohme 2003). During these climatic oscillations, *F. mandshurica* and *F. angustifolia* could have successively extend their geographic ranges and come into contact. Following increased levels of precipitation in the Southern Himalayan foothills, *F. mandshurica*, which is well suited to a warm and moist climate, could have extended its geographic range westward to the region that has become Northern India and Afghanistan. Similarly, *F. angustifolia* could have taken advantage of the favourable dry conditions in the Zagros and Alborz Mountains in Iran, where relict populations are currently found (Akhani and Salimian 2003), to extend its range eastwards to Afghanistan where range overlap with *F. mandshurica* could have been possible. Subsequently, the Himalayan uplift during the Tertiary period and global cooling during the late Tertiary and Quaternary likely triggered the presently observed geographical disjunction between the two species (Mediterranean Europe vs. Eastern Asia). Such a scenario has been recently hypothesised to explain the ancient Eurasian reticulation in the conifer genus *Tsuga* (Havill *et al.* 2009). Today, the dry Himalayan plateau surrounded by wet tropical foothills probably prevents the spread of the temperate *F. mandshurica* westwards and that of the Mediterranean *F. angustifolia* eastwards. The extension of *F. angustifolia* from South-east of Europe was reduced and did not allow to the reticulation to occur, likely due to the topography of the Asia Minor, or possible adaptations to drier climate compared to *F. angustifolia* from western part of the Mediterranean basin.

4.2.6.3 Taxonomic implications

According to the phylogenetic species concept, a species should represent a monophyletic group that contains all conspecific individuals (Donoghue 1985). With respect to the section *Fraxinus*, such a concept leads us to discuss the taxonomic status of each species of the section, *F. nigra*, *F. mandshurica*, *F. excelsior*, and *F. angustifolia*.

All analyses showed that *F. nigra* could be well recognized from *F. mandshurica*, despite the fact that they have been considered in the past to be conspecific, due to their very similar vegetatives and reproductive morphologies (Sun 1985; Wei and Green 1996). Such a morphological stasis has been observed in other pairs of disjunct tree taxa found in EA and ENA, such as *Liriodendron*, *Liquidambar*, and *Magnolia* (review in Nie *et al.* 2006). With regard to the present results, *F. nigra* should therefore be considered as a valid species (*sensu De Queiroz 2007*).

The status of *F. mandshurica* is more problematic. On one hand, the reticulate evolution observed between *F. mandshurica* and *F. angustifolia* should represent a valuable argument for considering these two species as conspecific. On the other hand, the present disjunct geographic areas of these two species as well as differential phenology (Hinsinger, pers. obs) seem to prevent potential new hybridization. More studies on the intensity of reticulate evolution and crossability data are needed to formally conclude about the specific status of *F. mandshurica*.

The polyphyletic groups observed in *F. excelsior* and *F. angustifolia* should be considered as a consequence of the extensive and well-studied recurrent hybridisation between these species (Fernandez-Manjarres *et al.* 2006; Gérard *et al.* 2006a; Heuertz *et al.* 2006). *F. angustifolia* and *F. excelsior* should therefore be considered as subspecies, probably differing by some ecological traits such as flooding or cold tolerances (Fernandez-Manjarres *et al.* 2006). Considering the split of *F. angustifolia* in two subgroups in both nDNA and AFLP, two separate entities should further be delimited within this taxon, one found only in South-eastern Europe, the other one found in the western part of the Mediterranean basin. The AFLP data yielded an additional cluster that grouped *F. angustifolia* individuals from the Balkan Peninsula. This additional cluster could correspond to *F. angustifolia* ssp. *oxycarpa*, present in central Europe, in the Balkans and Caucasia. Nevertheless, the absence of adequate bootstrap support in the AFLP analysis prevents a formal taxonomic recommendation.

4.2.7 Conclusions

Based on three molecular datasets (nITS, nETS and AFLPs) and the associated estimations of molecular divergence times, we show that ancient reticulation occurred between *F. angustifolia* and *F. mandshurica*, most likely during the Miocene Climatic Optimum (≈ 15 mya). To our knowledge, this is the first study to document ancient reticulate evolution in a temperate angiosperm tree genus spanning Europe and Asia. Our data does not suggest any recent gene flow between Asian and European species in the section *Fraxinus*, but suggests that nowadays, introgressive hybridization is taking place between *F. excelsior* and *F. angustifolia*.

New technological advances should soon allow to study the consequences of introgressive hybridization at the genome level, such as the predicted increase in genetic diversity, quantitative trait loci potentially involved in heterosis, and to identify regions under divergent selection. These informations will be crucial to better understand speciation in trees species (Ashton 1969; Petit and Hampe 2006). An AFLP study involving more individuals could also help to identify and delineate genetically homogeneous groups within certain geographic areas such as lineages from refugia areas, and determine more precisely the intensity of recent hybridisation or introgression in areas of sympatry between *F. angustifolia* and *F. excelsior*.

Some information on the cross-compatibility of *Fraxinus* species would also be useful in support of a more reliable taxonomic treatment of the genus, in combination with genetic, ecological and morphological data (Wright 1955; Mayr 1963; De Queiroz 2007). A clear and reliable taxonomy is a prerequisite to the estimation of biological and genetic diversity of the section *Fraxinus* in Eurasia. Finally, given the economic and patrimonial value of *F. excelsior* and *F. angustifolia* in Europe, our results should provide useful information to help develop a coherent gene conservation program for these species, considering both the positive (emergence of novel gene combinations and the increase of adaptive potential) and negative (genetic swamping) potential consequences of natural introgressive hybridization in a context of climate change.

4.2.8 Acknowledgements

We are grateful to Jean Dufour (INRA Orléans) for his help in population sampling under the European research contract RAP-QLK-52001-00631, to Paola Bertolino for helping with the laboratory and field collections, and to Jerome Laroche for access to phylogenetic programs and the bioinformatic platform of the Institute for Systems and Integrative Biology at Université Laval, Québec, and to Naoko Miyamoto at the Forest Tree Breeding Center, Japan, for providing wild *F. mandshurica* samples. D.D. Hinsinger is the recipient of a fellowship grant from the Ministère des Affaires Etrangères (Bourse Lavoisier) and received financial support from the French Ministry of Education and the Université Paris-Sud 11. This work was supported by the “Consortium National de Recherche en Génomique”, and the “Service de Systématique Moléculaire” of the Muséum National d’Histoire Naturelle (IFR 101). It is part of agreement No. 2005/67 between Génoscope and the Muséum National d’Histoire Naturelle on the project “Macrophylogeny of Life”, which is directed by Guillaume Lecointre.

4.2.9 Literature cited

- Acevedo-Rosas, R., K. Cameron, V. Sosa, and S. Pell. 2004. A molecular phylogenetic study of *Graptopetalum* (Crassulaceae) based on ETS, ITS, *rpl16*, and *trnL-F* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 91:1099-1104.
- Akhani, H., and M. Salimian. 2003. An extant disjunct stand of *Pterocarya fraxinifolia* (Juglandaceae) in the central Zagros Mountains, W Iran. *Willdenowia - Annals of the Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem* 33:113-120.
- Alfaro, M. E., S. Zoller, and F. Lutzoni. 2003. Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Molecular Biology and Evolution* 20:255-266.
- Alice, L. A., and C. S. Campbell. 1999. Phylogeny of *Rubus* (rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany* 86:81-97.
- Alter, T., and K. Fehlhaber. 2003. [Use of AFLP analysis for the molecular biological fine typing of *Campylobacter jejuni* strains from turkey flocks]. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 116:454-459.
- Andreasen, K., and B. G. Baldwin. 2001. Unequal evolutionary rates between annual and perennial lineages of checker mallows (*Sidalcea*, Malvaceae): evidence from 18S-26S rDNA internal and external transcribed spacers. *Molecular Biology and Evolution* 18:936-944.
- Arca, M., D. D. Hinsinger, C. Cruaud, M. Gaudeul, J. Bousquet, and N. Frascaria-Lacoste. submitted. Limitations of a standardised protocol for DNA barcoding in the *Fraxinus* genus.
- Arnold, M. L. 2006. *Evolution through genetic exchange*. Oxford University Press.
- Ashton, P. S. 1969. Speciation among tropical forest trees:some deductions in the light of recent evidence. *Biological Journal of the Linnean Society* 1:155-196.
- Baldwin, B. G., and S. Markos. 1998. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10:449-463.
- Becerra, J. X. 2003. Evolution of mexican *Bursera* (Burseraceae) inferred from ITS, ETS, and 5S nuclear ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26:300-309.
- Bena, G., M.-F. Jubier, I. Olivieri, and B. Lejeune. 1998. Ribosomal external and internal transcribed spacers: combined use in the phylogenetic analysis of *Medicago* (Leguminosae). *Journal of Molecular Evolution* 46:299-306.
- Blattner, F. R. 2006. Multiple intercontinental dispersals shaped the distribution area of *Hordeum* (Poaceae). *New Phytologist* 169:603-614.
- Bohme, M. 2003. The Miocene Climatic Optimum: evidence from ectothermic vertebrates of Central Europe. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 195:389-401.
- Bousquet, J., S. H. Strauss, A. H. Doerksen, and R. A. Price. 1992. Extensive variation in evolutionary rate of *rbcL* gene sequences among seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:7844-7848.
- Britten, R. J. 1986. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* 231:1393-1398.
- Brown, J. W., J. S. Rest, J. Garcia-Moreno, M. D. Sorenson, and D. P. Mindell. 2008. Strong mitochondrial DNA support for a Cretaceous origin of modern avian lineages. *BMC Biology* 6:6 DOI 10.1186/1741-7007-6-6.

- Bryant, D., and V. Moulton. 2004. Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution* 21:255-265.
- Call, V. B., and D. L. Dilcher. 1992. Investigations of angiosperms from the Eocene of southeastern North America: samaras of *Fraxinus wilcoxiana* Berry. *Review of Palaeobotanic and Palynology* 74:249-266.
- Campbell, D., P. Duchesne, and L. Bernatchez. 2003. AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. *Molecular Ecology* 12:1979-1991.
- Comes, H. P., and J. W. Kadereit. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* 3:432-438.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56:879 - 886.
- Despres, L., L. Gielly, B. Redoutet, and P. Taberlet. 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:185-196.
- Despres, L., S. Lorient, and M. Gaudeul. 2002. Geographic pattern of genetic variation in the European globeflower *Trollius europaeus* L. (Ranunculaceae) inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* 11:2337-2347.
- Donoghue, M. J. 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist* 88:172– 181.
- Donoghue, M. J., and S. A. Smith. 2004. Patterns in the assembly of temperate forests around the Northern Hemisphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359:1633-1644.
- Drummond, A. J., and A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214 DOI 10.1186/1471-2148-7-214.
- Fernandez-Manjarres, J. F., P. R. Gérard, J. Dufour, C. Raquin, and N. Frascaria-Lacoste. 2006. Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl (Oleaceae) in eastern and western France. *Molecular Ecology* 15:3245-3257.
- Fiz, O., P. Vargas, M. Alarcon, C. Aedo, J. L. Garcia, and J. J. Aldasoro. 2009. Phylogeny and historical biogeography of geraniaceae in relation to climate changes and pollination ecology. *Systematic Botany* 33:326-342.
- Franzke, A., H. Hurka, D. Janssen, B. Neuffer, N. Friesen, M. Markov, and K. Mummenhoff. 2004. Molecular signals for late Tertiary/early Quaternary range splits of an Eurasian steppe plant: *Clausia aprica* (Brassicaceae). *Molecular Ecology* 13:2789-2795.
- Franzke, A., and K. Mummenhoff. 1999. Recent hybrid speciation in Cardamine (Brassicaceae) – conversion of nuclear ribosomal ITS sequences in *statu nascendi*. *Theoretical and Applied Genetics* 98:831-834.
- Gérard, P., E. Klein, F. Austerlitz, J. Fernandez-Manjarres, and N. Frascaria-Lacoste. 2006a. Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. *BMC Evolutionary Biology* 6:96.
- Gérard, P. R., J. F. Fernandez-Manjarres, and N. Frascaria-Lacoste. 2006b. Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Molecular Ecology* 15:3655-3667.
- Gielly, L., and P. Taberlet. 1994. Chloroplast DNA polymorphism at the intrageneric level and plant phylogeny. *Comptes Rendus Biologies* 317:685-692.
- Gobert, V., S. Moja, M. Colson, and P. Taberlet. 2002. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *American Journal of Botany* 89:2017-2023.

- Goto, S., K. Shimatani, H. Yoshimaru, and Y. Takahashi. 2006. Fat-tailed gene flow in the dioecious canopy tree species *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* 15:2985-2996.
- Guindon, S., and O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52:696-704.
- Hamzeh, M., and S. Dayanandan. 2004. Phylogeny of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of chloroplast *trnT-trnF* region and nuclear rDNA. *American Journal of Botany* 91:1398-1408.
- Havill, N. P., C. S. Campbell, T. F. Vining, B. LePage, R. J. Bayer, and M. J. Donoghue. 2009. Phylogeny and biogeography of *Tsuga* (Pinaceae) inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany* 33:478-789.
- Heuertz, M., S. Carnevale, S. Fineschi, F. Sebastiani, J. F. Hausman, L. Paule, and G. G. Vendramin. 2006. Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp. (Oleaceae): roles of hybridization and life history traits. *Molecular Ecology* 15:2131-2140.
- Holland, B., A. Clarke, and H. Meudt. 2008. Optimizing automated AFLP scoring parameters to improve phylogenetic resolution. *Systematic Biology* 57:347-366.
- Hu, L. J., K. Uchiyama, H. L. Shen, Y. Saito, Y. Tsuda, and Y. Ide. 2008. Nuclear DNA microsatellites reveal genetic variation but a lack of phylogeographical structure in an endangered species, *Fraxinus mandshurica*, across North-east China. *Annals of Botany (Lond)* 102:195-205.
- Huelsenbeck, J. P., and B. Rannala. 2004. Frequentist properties of bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic Biology* 53:904-913.
- Huson, D. H., and D. Bryant. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23:254-267.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société vaudoise de Sciences Naturelles* 44:223-270.
- Jeandroz, G., F. Faivre-Rampant, A. Pugin, J. Bousquet, and A. Bervillé. 1995. Organization of nuclear ribosomal DNA and species-specific polymorphism in closely related *Fraxinus excelsior* and *F. oxyphylla*. *Theoretical and Applied Genetics* 91:885-892.
- Jeandroz, S., A. Roy, and J. Bousquet. 1997. Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:241-251.
- Julier, B., S. Flajoulot, P. Barre, G. Cardinet, S. Santoni, T. Huguet, and C. Huyghe. 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology* 3:9 DOI 10.1186/1471-2229-3-9.
- Knapp, M., K. Stockler, D. Havell, F. Delsuc, F. Sebastiani, and P. J. Lockhart. 2005. Relaxed molecular clock provides evidence for long-distance dispersal of *Nothofagus* (southern beech). *PLoS Biology* 3:e14.
- Koontz, J. A., P. S. Soltis, and D. E. Soltis. 2009. Using phylogeny reconstruction to test hypotheses of hybrid origin in *Delphinium* section *Diedropetala* (Ranunculaceae). *Systematic Botany* 29:345-357.
- Lacape, J. M., T. B. Nguyen, S. Thibivilliers, B. Bojinov, B. Courtois, R. G. Cantrell, B. Burr, and B. Hau. 2003. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome* 46:612-626.

- Lee, H. L., R. K. Jansen, T. W. Chumley, and K. J. Kim. 2007. Gene relocations within chloroplast genomes of *Jasminum* and *Menodora* (Oleaceae) are due to multiple, overlapping inversions. *Molecular Biology and Evolution* 24:1161-1180.
- Lemmon, E. M., A. R. Lemmon, and D. C. Cannatella. 2007. Geological and climatic forces driving speciation in the continentally distributed trilling chorus frogs (*Pseudacris*). *Evolution* 61:2086-2103.
- Li, J., J. H. Alexander, and D. Zhang. 2002. Paraphyletic *Syringa* (Oleaceae): evidence from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS and ETS regions. *Systematic Botany* 27:592-597.
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Lingelsheim, A. 1907. Vorarbeiten zu einer monographie der gattung *Fraxinus*. *Engler's Bot Jahrb* 40:185-223.
- Magri, D., S. Fineschi, R. Bellarosa, A. Buonamici, F. Sebastiani, B. Schirone, M. C. Simeone, and G. G. Vendramin. 2007. The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology* 16:5259-5266.
- Mallet, J. 2008. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 363:2971-2986.
- Markos, S., and B. G. Baldwin. 2002. Structure, molecular evolution, and phylogenetic utility of the 5' region of the external transcribed spacer of 18S-26S rDNA in *Lessingia* (Compositae, Astereae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23:214-228.
- Mayr, E. 1963. *Animals Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- McDade, L. A. 1992. Hybrids and phylogenetic systematics II. The impact of hybrids on cladistic analysis. *Evolution* 46:1329-1346.
- McDade, L. A. 1997. Hybrids and phylogenetic systematics III. Comparison with distance methods. *Systematic Botany* 22:669-683.
- Meudt, H. M., and A. C. Clarke. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12:106-117.
- Morand-Prieur, M. E., F. Vedel, C. Raquin, S. Brachet, D. Sihachakr, and N. Frascaria-Lacoste. 2002. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. *Molecular Ecology* 11:613-617.
- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:5269-5273.
- Nickrent, D. L., K. P. Schuette, and E. M. Starr. 1994. A molecular phylogeny of *Arceuthobium* (Viscaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany* 81:1149-1160.
- Nie, Z.-L., H. Sun, P. M. Beardsley, R. G. Olmstead, and J. Wen. 2006. Evolution of biogeographic disjunction between eastern Asia and eastern North America in *Phryma* (Phrymaceae). *American Journal of Botany* 93:1343-1356.
- Nishimoto, Y., O. Ohnishi, and M. Hasegawa. 2003. Topological incongruence between nuclear and chloroplast DNA trees suggesting hybridization in the urophyllum group of the genus *Fagopyrum* (Polygonaceae). *Genes & Genetic Systems* 78:139-153.
- Okuyama, Y., N. Fujii, M. Wakabayashi, A. Kawakita, M. Ito, M. Watanabe, N. Murakami, and M. Kato. 2005. Nonuniform concerted evolution and chloroplast capture: heterogeneity of observed introgression patterns in three molecular data partition

- phylogenies of Asian *Mitella* (saxifragaceae). *Molecular Biology and Evolution* 22:285-296.
- Pennington, R. T., M. Lavin, D. n. E. Prado, C. A. Pendry, S. K. Pell, and C. A. Butterworth. 2004. Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359:515-538.
- Perron, M., and J. Bousquet. 1997. Natural hybridization between black spruce and red spruce. *Molecular Ecology* 6:725-734.
- Petit, R. J., and A. Hampe. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37:187-214.
- Posada, D., and K. A. Crandall. 2002. The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *Journal of Molecular Evolution* 54:396-402.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Rambaut, A. 2002. Se-Al : sequence alignment editor. Department of Zoology.
- Raquin, C., B. Jung-Muller, J. Dufour, and N. Frascaria-Lacoste. 2002. Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* (L.) and *Fraxinus angustifolia* (Vahl.). *Annals of Forest Science* 59:219-224.
- Rauscher, J. T., J. J. Doyle, and A. H. D. Brown. 2002. Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex. *Molecular Ecology* 11:2691-2702.
- Rhymer, J. M., and D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:83-109.
- Rieseberg, L. H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* 82:944-953.
- Ronquist, F., and J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rutschmann, F. 2005. Bayesian molecular dating using PAML/multidivtime. A step-by-step manual. University of Zurich, Zurich, Switzerland.
- Rutschmann, F. 2006. Molecular dating of phylogenetic trees: A brief review of current methods that estimate divergence times. *Diversity & Distributions* 12:35-48.
- Rutschmann, F., T. Eriksson, K. A. Salim, and E. Conti. 2007. Assessing calibration uncertainty in molecular dating: the assignment of fossils to alternative calibration points. *Systematic Biology* 56:591-608.
- Sanderson, M. J., and M. F. Wojciechowski. 2000. Improved bootstrap confidence limits in large-scale phylogenies, with an example from *Neo-Astragalus* (Leguminosae). *Systematic Biology* 49:671-685.
- Sang, T., D. Crawford, and T. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84:1120-1136.
- Schluter, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution* 16:372-380.
- Smith, S. A., and M. J. Donoghue. 2008. Rates of molecular evolution are linked to life history in flowering plants. *Science* 322:86-89.
- Soltis, D. E., and R. K. Kuzoff. 1995. Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the *Heuchera* group (Saxifragaceae). *Evolution* 49:727-742.
- Soltis, D. E., E. V. Mavrodiev, J. J. Doyle, J. Rauscher, and P. S. Soltis. 2008. ITS and ETS sequence data and phylogeny reconstruction in allopolyploids and hybrids. *Systematic Botany* 33:7-20.

- Sullivan, J., and P. Joyce. 2005. Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36:445-466.
- Sun, S. S. 1985. Study on the genus *Fraxinus* L. (Oleaceae) in China (I). *Bulletin of Botanical Research* 5:37-67.
- Terry, R. G., R. S. Nowak, and R. J. Tausch. 2000. Genetic variation in chloroplast and nuclear ribosomal DNA in Utah juniper (*Juniperus osteosperma*, Cupressaceae): evidence for interspecific gene flow. *American Journal of Botany* 87:250-258.
- The vPlants Project. 2009. vPlants: A Virtual Herbarium of the Chicago Region. <http://www.vplants.org>.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and *et al.* 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Wallander, E. 2008. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution* 273:25-49.
- Walther, G.-R., E. Post, P. Convey, A. Menzel, C. Parmesan, T. J. C. Beebee, J.-M. Fromentin, O. Hoegh-Guldberg, and F. Bairlein. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416:389-395.
- Weeks, A., and B. B. Simpson. 2007. Molecular phylogenetic analysis of *Commiphora* (Burseraceae) yields insight on the evolution and historical biogeography of an "impossible" genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42:62-79.
- Wei, X. X., and X. Q. Wang. 2004. Recolonization and radiation in *Larix* (Pinaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA paralogues. *Molecular Ecology* 13:3115-3123.
- Wei, Z., and P. S. Green. 1996. *Fraxinus*. Pp. 273-279 in Z. Wu, and P. H. Raven, eds. *Flora of China*. Science Press, Missouri Botanical Garden, Missouri.
- Wendel, J. F., J. Stewart, and J. H. Rettig. 1991. Molecular evidence for homoploid reticulate evolution among Australian species of *Gossypium*. *Evolution* 45:694-711.
- Wikström, N., V. Savolainen, and M. W. Chase. 2001. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 268:2211-2220.
- Wojciechowski, M. F., M. J. Sanderson, B. G. Baldwin, and M. J. Donoghue. 1993. Monophyly of aneuploid *Astragalus* (Fabaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany* 80:711-722.
- Wright, J. W. 1955. Species crossability in spruce in relation to distribution and taxonomy. *Forest Science* 1:319-349.
- Xiang, Q. Y., S. R. Manchester, D. T. Thomas, W. Zhang, and C. Fan. 2005. Phylogeny, biogeography, and molecular dating of cornelian cherries (*Cornus*, Cornaceae): tracking Tertiary plant migration. *Evolution* 59:1685-1700.
- Yihong, W. 1995. Study on ecology of *Fraxinus mandshurica*. *Journal of Forestry Research* 6:61-64.
- Zachos, J., M. Pagani, L. Sloan, E. Thomas, and K. Billups. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292:686-693.
- Zhang, P., Y. Q. Chen, H. Zhou, Y. F. Liu, X. L. Wang, T. J. Papenfuss, D. B. Wake, and L. H. Qu. 2006. Phylogeny, evolution, and biogeography of Asiatic Salamanders (Hynobiidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:7360-7365.

Appendix 4.1. Accession data for samples of the *Fraxinus* section included in this study. Species: Morphological identification of populations at the species level (see text for details). Population numbers correspond to those in Figure 1. NA: Haplotype not available.

Country	Population	Pop. number	Individual ID	nITS haplotype	nETS haplotype
<i>F. angustifolia</i>					
Spain	Aiguafredo	1	Aiguafredo28	Hap_007	Hap_02
Spain	Aiguafredo	1	Aiguafredo29	NA	Hap_02
Spain	Aiguafredo	1	Aiguafredo31	Hap_008	NA
Spain	Aiguafredo	1	Aiguafredo32	Hap_007	NA
Spain	Aiguafredo	1	Aiguafredo33	Hap_Fexc	Hap_03
Spain	Aiguafredo	1	Aiguafredo35	Hap_009	NA
Spain	Aiguafredo	1	Aiguafredo36	Hap_010	Hap_04
Spain	Aiguafredo	1	Aiguafredo37	Hap_011	NA
Bosnia	Balkans	2	Balkans10	Hap_017	Hap_05
Bosnia	Balkans	2	Balkans11	Hap_017	Hap_06
Bosnia	Balkans	2	Balkans12	NA	Hap_Fexc2
Bosnia	Balkans	2	Balkans4	Hap_018	NA
Bosnia	Balkans	2	Balkans5	Hap_Fexc	NA
Bosnia	Balkans	2	Balkans6	Hap_019	Hap_08
Bosnia	Balkans	2	Balkans7	Hap_020	NA
Bosnia	Balkans	2	Balkans8	Hap_020	Hap_09
Bosnia	Balkans	2	Balkans9	Hap_021	NA
Slovenia	Dragonja	3	Dragonja16	Hap_027	Hap_Fexc1
Slovenia	Dragonja	3	Dragonja17	Hap_028	Hap_18
Slovenia	Dragonja	3	Dragonja18	Hap_017	Hap_Fexc1
Slovenia	Dragonja	3	Dragonja19	Hap_017	Hap_Fexc1
Slovenia	Dragonja	3	Dragonja20	Hap_029	NA
Turkey	Egirdir	4	Egirdir21	Hap_032	Hap_19
Turkey	Egirdir	4	Egirdir22	Hap_033	NA
Turkey	Egirdir	4	Egirdir23	Hap_034	Hap_FangEgirdir
Turkey	Egirdir	4	Egirdir24	Hap_032	Hap_FangEgirdir
Turkey	Egirdir	4	Egirdir25	Hap_035	Hap_FangEgirdir
Turkey	Egirdir	4	Egirdir26	Hap_036	Hap_21
Spain	El Canaletes	5	Canaletes1	NA	Hap_14
Spain	El Canaletes	5	Canaletes2	Hap_007	NA
Spain	El Canaletes	5	Canaletes3	Hap_037	NA
Spain	El Canaletes	5	Canaletes4	Hap_038	NA
Spain	El Canaletes	5	Canaletes5	Hap_039	NA
Spain	El Canaletes	5	Canaletes6	Hap_040	Hap_22
Spain	El Canaletes	5	Canaletes7	Hap_041	Hap_23
Turkey	Gazintep	6	Gazintep1	Hap_032	Hap_FangGazintep
Turkey	Gazintep	6	Gazintep2	Hap_047	Hap_FangGazintep
Turkey	Gazintep	6	Gazintep3	Hap_032	Hap_FangGazintep
Turkey	Gazintep	6	Gazintep4	Hap_032	Hap_FangGazintep
Turkey	Gazintep	6	Gazintep5	Hap_032	NA
Turkey	Gazintep	6	Gazintep6	Hap_032	NA
Turkey	Golyaka	7	Golyaka10	NA	Hap_Fexc1
Turkey	Golyaka	7	Golyaka7	Hap_048	NA
Turkey	Golyaka	7	Golyaka8	Hap_049	Hap_27
France	Grabels	8	Grabels1	NA	Hap_29
France	Grabels	8	Grabels2	NA	Hap_28
Turkey	Igneada	9	Igneada1	NA	Hap_32

Turkey	Igneada	9	Igneada2	NA	Hap_31
Slovakia	Kapuanzansky Luh	10	Kapuanzansky Luh25	Hap_051	Hap_Fexcl
Slovakia	Kapuanzansky Luh	10	Kapuanzansky Luh26	Hap_052	Hap_Fexcl
Slovakia	Kapuanzansky Luh	10	Kapuanzansky Luh27	Hap_053	NA
Slovakia	Kapuanzansky Luh	10	Kapuanzansky Luh28	Hap_054	NA
Slovakia	Kapuanzansky Luh	10	Kapuanzansky Luh29	Hap_055	NA
Slovakia	Kapuanzansky Luh	10	Kapuanzansky Luh30	Hap_017	NA
Turkey	Karapinar	11	Karapinar13	Hap_056	NA
Turkey	Karapinar	11	Karapinar14	Hap_057	NA
Turkey	Karapinar	11	Karapinar16	Hap_058	NA
Turkey	Karapinar	11	Karapinar17	Hap_059	NA
Slovenia	Lendava	12	Lendava4	Hap_061	NA
Slovenia	Lendava	12	Lendava5	NA	Hap_Fexcl
Slovenia	Lendava	12	Lendava7	Hap_062	NA
Slovenia	Lendava	12	Lendava8a	Hap_Fexc	Hap_33
Slovenia	Lendava	12	Lendava8b	Hap_Fexc	Hap_Fexcl
Slovenia	Lendava	12	Lendava9	Hap_063	NA
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc1	Hap_Fexc	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc2	Hap_Fexc	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc3	Hap_015	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc4	Hap_Fexc	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc5	Hap_Fexc	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc6	Hap_Fexc	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc7	Hap_Fexc	NA
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc8	Hap_067	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc10	Hap_073	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc11	Hap_073	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc13	Hap_073	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc14	Hap_Fexc	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc15	NA	Hap_Fexcl
Morocco	Zaouhi-Ahamal	13	Maroc17	Hap_009	NA
France	Mas Larrieu	14	MasLarrieu1	NA	Hap_28
France	Mas Larrieu	14	MasLarrieu2	NA	Hap_28
Spain	Monistrol	15	Monistrol38	Hap_075	Hap_39
Spain	Monistrol	15	Monistrol39	Hap_076	Hap_40
Spain	Monistrol	15	Monistrol40	Hap_037	NA
Spain	Monistrol	15	Monistrol41	Hap_077	NA
Spain	Monistrol	15	Monistrol42	Hap_009	NA
Spain	Monistrol	15	Monistrol43	Hap_078	NA
Spain	Monistrol	15	Monistrol44	Hap_009	NA
Spain	Monistrol	15	Monistrol45	Hap_079	NA
France	Opio	16	Opio1	Hap_082	Hap_Fexcl
France	Opio	16	Opio2	Hap_055	Hap_42
France	Opio	16	Opio8	Hap_083	NA
Hungary	Poroboly	17	Poroboly27	Hap_087	NA
Hungary	Poroboly	17	Poroboly28	Hap_Fexc	NA
Hungary	Poroboly	17	Poroboly29	Hap_088	Hap_13
Hungary	Poroboly	17	Poroboly31	Hap_089	Hap_43
Hungary	Poroboly	17	Poroboly32	Hap_090	NA
Portugal	Portugal	18	Portugal11	NA	Hap_44
Portugal	Portugal	18	Portugal12	NA	Hap_45

Portugal	Portugal	18	Portugal13	NA	Hap_46
Portugal	Portugal	18	Portugal14	NA	Hap_47
Portugal	Portugal	18	Portugal15	NA	Hap_48
Portugal	Portugal	18	Portugal16	NA	Hap_48
Portugal	Portugal	18	Portugal18	NA	Hap_49
Portugal	Portugal	18	Portugal19	NA	Hap_50
Portugal	Portugal	18	Portugal1	NA	Hap_48
Portugal	Portugal	18	Portugal2	NA	Hap_49
Portugal	Portugal	18	Portugal3	NA	Hap_48
Portugal	Portugal	18	Portugal4	NA	Hap_50
Portugal	Portugal	18	Portugal6	NA	Hap_48
Portugal	Portugal	18	Portugal7	NA	Hap_49
Portugal	Portugal	18	Portugal8	NA	Hap_50
Portugal	Portugal	18	Portugal9	NA	Hap_51
Hungary	Potony	19	Potony31	Hap_091	NA
Hungary	Potony	19	Potony32	Hap_017	NA
Hungary	Potony	19	Potony33	Hap_017	NA
Hungary	Potony	19	Potony34	Hap_092	NA
Hungary	Potony	19	Potony35	Hap_017	NA
Hungary	Potony	19	Potony36	Hap_093	NA
Spain	San-Vicente	20	StVicence46	Hap_037	NA
Spain	San-Vicente	20	StVicence47	Hap_103	NA
Spain	San-Vicente	20	StVicence48	Hap_104	NA
Spain	San-Vicente	20	StVicence49	Hap_021	NA
Spain	San-Vicente	20	StVicence50	Hap_105	NA
Spain	San-Vicente	20	StVicence52	Hap_106	NA
Spain	San-Vicente	20	StVicence53	Hap_103	NA
Spain	San-Vicente	20	StVicence54	Hap_102	NA
Spain	San-Vicente	20	StVicence55	Hap_076	NA
Turkey	Sinap	21	Sinap3	NA	Hap_54
Slovakia	Zeliezvce	22	Zeliezvce11	Hap_119	NA
Slovakia	Zeliezvce	22	Zeliezvce12	Hap_120	NA
Slovakia	Zeliezvce	22	Zeliezvce13	Hap_017	NA
Slovakia	Zeliezvce	22	Zeliezvce14	Hap_055	NA
Slovakia	Zeliezvce	22	Zeliezvce15	Hap_091	NA
Slovakia	Zeliezvce	22	Zeliezvce16	Hap_019	NA
	Tenerife		EU314813.1Fangustifolia	Hap_121	NA
	Italy		EU314815.1Fangustifolia	Hap_122	NA
	Uzbekistan		EU314819.1Fangustifolia	Hap_123	NA
<i>F. excelsior</i>					
Italy	Abetone	23	Abetone1	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Italy	Abetone	23	Abetone10	Hap_Fexc	NA
Italy	Abetone	23	Abetone11	Hap_Fexc	NA
Italy	Abetone	23	Abetone12	Hap_002	NA
Italy	Abetone	23	Abetone2	Hap_003	Hap_Fexc1
Italy	Abetone	23	Abetone3	Hap_004	Hap_Fexc1
Italy	Abetone	23	Abetone4	Hap_005	Hap_Fexc1
Italy	Abetone	23	Abetone5	Hap_Fexc	NA
Italy	Abetone	23	Abetone8	Hap_Fexc	NA
Italy	Abetone	23	Abetone9	Hap_006	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances1	Hap_Fexc	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances10	Hap_Fexc	NA

Belgium	Aisances	24	Aisances11	Hap_Fexc	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances13	Hap_012	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances14	Hap_Fexc	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances15	Hap_Fexc	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances2	Hap_Fexc	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances3	Hap_013	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances4	Hap_Fexc	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances5	Hap_Fexc	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances6	Hap_Fexc	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances7	Hap_Fexc	NA
Belgium	Aisances	24	Aisances9	Hap_Fexc	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay10	Hap_Fexc	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay11	Hap_Fexc	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay12	Hap_014	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay2	Hap_Fexc	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay3	Hap_Fexc	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay4	Hap_015	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay5	Hap_Fexc	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay6	Hap_Fexc	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay7	Hap_Fexc	NA
France	Aunay en Bazois	25	Aunay9	Hap_016	NA
Bosnia	Balkans	2	Balkans1	Hap_Fexc	NA
Bosnia	Balkans	2	Balkans3	Hap_Fexc	NA
Bosnia	Bimjezwo	26	Bimjezwo4	NA	Hap_Fexc1
Ukraine	Bobor	27	Bobor1	NA	Hap_10
Ukraine	Bobor	27	Bobor11	NA	Hap_Fexc1
Ukraine	Bobor	27	Bobor2	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Ukraine	Bobor	27	Bobor3	Hap_Fexc	NA
Ukraine	Bobor	27	Bobor4	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Bosnia	Bugojno	28	Bugojno4	NA	Hap_11
France	Cabel Ar Run	29	CabelArRun10	Hap_015	NA
France	Cabel Ar Run	29	CabelArRun2	Hap_Fexc	NA
France	Cabel Ar Run	29	CabelArRun3	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Cabel Ar Run	29	CabelArRun4	NA	Hap_03
France	Cabel Ar Run	29	CabelArRun5	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Cabel Ar Run	29	CabelArRun6	Hap_Fexc	Hap_03
France	Cabel Ar Run	29	CabelArRun8	Hap_022	Hap_Fexc1
France	Cabel Ar Run	29	CabelArRun9	Hap_Fexc	NA
Italy	Cadore	30	Cadore1	NA	Hap_12
Spain	Congas	31	Congas1	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Coursegoules	32	Coursegoules1	NA	Hap_Fexc2
France	Coursegoules	32	Coursegoules10	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Coursegoules	32	Coursegoules4	Hap_Fexc	NA
France	Coursegoules	32	Coursegoules5	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Coursegoules	32	Coursegoules7	Hap_Fexc	Hap_13
France	Coursegoules	32	Coursegoules8	Hap_023	Hap_Fexc2
Ireland	Currachase	33	Currachase1	Hap_024	Hap_14
Ireland	Currachase	33	Currachase11	Hap_Fexc	NA
Ireland	Currachase	33	Currachase12	Hap_Fexc	NA
Ireland	Currachase	33	Currachase2	Hap_Fexc	NA
Ireland	Currachase	33	Currachase3	Hap_Fexc	NA
Ireland	Currachase	33	Currachase4	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
Ireland	Currachase	33	Currachase5	Hap_Fexc	NA

Ireland	Currachase	33	Currachase6	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
Ireland	Currachase	33	Currachase8	Hap_Fexc	NA
Ireland	Currachase	33	Currachase9	Hap_Fexc	NA
France	Dinan	34	Dinan1	Hap_Fexc	NA
France	Dinan	34	Dinan11	Hap_Fexc	Hap_15
France	Dinan	34	Dinan12	Hap_Fexc	NA
France	Dinan	34	Dinan13	Hap_Fexc	Hap_16
France	Dinan	34	Dinan14	Hap_007	NA
France	Dinan	34	Dinan16	Hap_Fexc	Hap_16
France	Dinan	34	Dinan2	Hap_Fexc	NA
France	Dinan	34	Dinan4	Hap_015	NA
France	Dinan	34	Dinan5	Hap_025	Hap_13
France	Dinan	34	Dinan7	Hap_026	Hap_14
France	Dinan	34	Dinan8	Hap_Fexc	NA
France	Dinan	34	Dinan9	Hap_015	NA
France	Dourdan	35	Dourdan1	NA	Hap_12
France	Dourdan	35	Dourdan3	NA	Hap_12
France	Dourdan	35	Dourdan4	NA	Hap_17
France	Dune d'Ecault	36	DunedEcault1	Hap_Fexc	Hap_16
France	Dune d'Ecault	36	DunedEcault11	NA	Hap_Fexc1
France	Dune d'Ecault	36	DunedEcault2	Hap_030	Hap_Fexc1
France	Dune d'Ecault	36	DunedEcault3	Hap_015	NA
France	Dune d'Ecault	36	DunedEcault4	Hap_Fexc	Hap_03
France	Dune d'Ecault	36	DunedEcault5	Hap_Fexc	NA
France	Dune d'Ecault	36	DunedEcault7	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Dune d'Ecault	36	DunedEcault8	Hap_031	NA
France	Dune d'Ecault	36	DunedEcault9	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen1	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen10	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen11	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen12	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen13	Hap_042	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen14	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen2	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen3	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen4	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen5	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen6	Hap_043	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen7	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen8	Hap_Fexc	NA
Ireland	Enninskillen	37	Enninskillen9	Hap_044	NA
Germany	Ferchau	38	Ferchau1	Hap_031	Hap_24
Germany	Ferchau	38	Ferchau10	Hap_Fexc	NA
Germany	Ferchau	38	Ferchau2	NA	Hap_25
Germany	Ferchau	38	Ferchau3	Hap_Fexc	NA
Germany	Ferchau	38	Ferchau4	Hap_045	NA
Germany	Ferchau	38	Ferchau5	Hap_Fexc	NA
Germany	Ferchau	38	Ferchau6	Hap_Fexc	NA
Germany	Ferchau	38	Ferchau7	Hap_046	NA
Germany	Ferchau	38	Ferchau8	Hap_Fexc	NA
Germany	Ferchau	38	Ferchau9	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos1	Hap_Fexc	Hap_03
Belgium	HogeBos	39	HogeBos10	Hap_Fexc	Hap_Fexc2

Belgium	HogeBos	39	HogeBos11	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos12	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos13	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos2	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos3	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos4	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos5	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos6	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos7	Hap_Fexc	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos8	Hap_005	NA
Belgium	HogeBos	39	HogeBos9	Hap_Fexc	Hap_30
Denmark	JacquiDK	40	JacquiDK1	Hap_050	Hap_03
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris1	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris10	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris11	Hap_060	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris12	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris13	Hap_023	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris14	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris15	Hap_060	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris2	Hap_Fexc	Hap_03
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris3	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris4	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris5	Hap_060	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris6	Hap_Fexc	NA
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris7	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris8	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Kasyadoris	41	Kasyadoris9	NA	Hap_Fexc1
France	La Romagne	42	LaRomagne244	Hap_Fexc	NA
France	La Romagne	42	LaRomagne245	Hap_Fexc	NA
France	Lestiac	43	Lestiac650	Hap_Fexc	Hap_34
France	Lestiac	43	Lestiac651	Hap_064	NA
France	Lestiac	43	Lestiac652	Hap_065	NA
France	Lestiac	43	Lestiac653	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Lestiac	43	Lestiac654a	NA	Hap_Fexc1
France	Lestiac	43	Lestiac654b	NA	Hap_35
France	Lestiac	43	Lestiac655	Hap_066	Hap_Fexc1
France	Lestiac	43	Lestiac656	Hap_017	NA
France	Lestiac	43	Lestiac657a	Hap_067	Hap_16
France	Lestiac	43	Lestiac657b	Hap_068	Hap_Fexc1
France	Lestiac	43	Lestiac658	NA	Hap_Fexc1
France	Lestiac	43	Lestiac659a	Hap_Fexc	Hap_16
France	Lestiac	43	Lestiac659b	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Lestiac	43	Lestiac660	NA	Hap_03
France	Lestiac	43	Lestiac661	Hap_068	NA
France	Lestiac	43	Lestiac662	Hap_069	Hap_13
France	Lestiac	43	Lestiac663	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Lestiac	43	Lestiac664	NA	Hap_Fexc1
France	Lestiac	43	Lestiac665	Hap_070	NA
France	Lestiac	43	Lestiac666	Hap_Fexc	NA
France	Lestiac	43	Lestiac667	Hap_071	NA
France	Lestiac	43	Lestiac668	NA	Hap_36
France	Lestiac	43	Lestiac669	Hap_072	NA
France	Monein	44	Monein670	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein671	Hap_Fexc	NA

France	Monein	44	Monein672	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein673	Hap_Fexc	Hap_16
France	Monein	44	Monein674	Hap_074	NA
France	Monein	44	Monein675	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein676	Hap_Fexc	Hap_37
France	Monein	44	Monein677	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein678	Hap_022	NA
France	Monein	44	Monein679	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein680	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein681	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein682	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein683	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein684	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein685	Hap_Fexc	Hap_16
France	Monein	44	Monein686	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein687	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein688	Hap_Fexc	NA
France	Monein	44	Monein689	Hap_Fexc	Hap_38
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini1	Hap_Fexc	NA
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini10	Hap_015	NA
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini11	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini12	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini13	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini1	NA	Hap_Fexc1
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini2	Hap_043	NA
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini3	Hap_Fexc	NA
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini6_66	Hap_022	NA
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini6_67	Hap_Fexc	NA
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini6_68	Hap_Fexc	NA
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini6_69	Hap_Fexc	NA
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini8	Hap_Fexc	NA
Italy	Monti Lessini	45	MontiLessini9	Hap_080	NA
Spain	Montseny	46	Montseny17	Hap_081	NA
Spain	Montseny	46	Montseny18	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Montseny	46	Montseny19	Hap_Fexc	Hap_03
Spain	Montseny	46	Montseny20	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Montseny	46	Montseny21	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Montseny	46	Montseny22	Hap_Fexc	Hap_41
Spain	Montseny	46	Montseny23	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Montseny	46	Montseny24	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Montseny	46	Montseny25	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Montseny	46	Montseny26	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Montseny	46	Montseny27	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Orsay	47	TF	NA	Hap_12
Denmark	Osterkov	48	Osterkov1	Hap_Fexc	NA
Denmark	Osterkov	48	Osterkov10	Hap_044	Hap_Fexc1
Denmark	Osterkov	48	Osterkov11	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Denmark	Osterkov	48	Osterkov12	Hap_044	Hap_Fexc1
Denmark	Osterkov	48	Osterkov13	Hap_084	NA
Denmark	Osterkov	48	Osterkov15	Hap_085	NA
Denmark	Osterkov	48	Osterkov2	Hap_Fexc	NA
Denmark	Osterkov	48	Osterkov4	Hap_Fexc	NA
Denmark	Osterkov	48	Osterkov5	Hap_Fexc	Hap_Fexc1

Denmark	Osterkov	48	Osterkov6	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Denmark	Osterkov	48	Osterkov7	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Denmark	Osterkov	48	Osterkov8	Hap_086	Hap_Fexc1
Denmark	Osterkov	48	Osterkov9	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Ukraine	Pripiat	49	Pripiat1	Hap_094	NA
Ukraine	Pripiat	49	Pripiat2	Hap_095	Hap_Fexc1
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn1	Hap_Fexc	NA
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn10	Hap_Fexc	NA
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn11	Hap_Fexc	NA
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn2	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn3a	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn3b	NA	Hap_52
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn4	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn6	Hap_Fexc	NA
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn7	Hap_Fexc	NA
Czech Republic	Rabstejn	50	Rabstejn9	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien1	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien10	Hap_096	NA
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien11	Hap_097	NA
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien12	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien3	Hap_044	Hap_53
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien4	Hap_098	Hap_12
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien5	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien6	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien7	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien8	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Gatien	51	SaintGatien9	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Gobain	52	SaintGobain164	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Gobain	52	SaintGobain165	NA	Hap_Fexc2
France	Saint-Gobain	52	SaintGobain165	Hap_099	NA
France	Saint-Gobain	52	SaintGobain166	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Gobain	52	SaintGobain167	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Gobain	52	SaintGobain168	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Gobain	52	SaintGobain169	Hap_081	NA
France	Saint-Gobain	52	SaintGobain170	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Martin	53	SaintMartin186	Hap_067	NA
France	Saint-Martin	53	SaintMartin187	Hap_100	NA
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul1	Hap_050	NA
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul13	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul14	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul15	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul16	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul2	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul3	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul4	Hap_Fexc	NA
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul10	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul12	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul5	Hap_005	Hap_Fexc2
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul6	Hap_Fexc	Hap_Fexc2

	Salers				
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul7	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul8	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
France	Saint-Paul de Salers	54	SaintPaul9	Hap_015	Hap_Fexc2
United Kingdom	Settrington	55	Settrington1	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
United Kingdom	Settrington	55	Settrington13	Hap_Fexc	NA
United Kingdom	Settrington	55	Settrington14	Hap_Fexc	NA
United Kingdom	Settrington	55	Settrington2	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
United Kingdom	Settrington	55	Settrington3	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
United Kingdom	Settrington	55	Settrington4	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
United Kingdom	Settrington	55	Settrington5	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
United Kingdom	Settrington	55	Settrington6	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
Spain	Spain	56	Spain10	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Spain	56	Spain11	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Spain	56	Spain12	Hap_Fexc	Hap_03
Spain	Spain	56	Spain13	Hap_101	Hap_03
Spain	Spain	56	Spain14	Hap_Fexc	NA
Spain	Spain	56	Spain15	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Spain	56	Spain16	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Spain	Spain	56	Spain25	NA	Hap_55
Spain	Spain	56	Spain8	Hap_102	NA
Spain	Spain	56	Spain9	Hap_031	Hap_Fexc1
Ukraine	Stran Shepelyn	57	StranShepelyn1	Hap_107	NA
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek1	Hap_Fexc	NA
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek10	Hap_Fexc	NA
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek11	Hap_023	NA
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek12	Hap_Fexc	NA
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek13	Hap_Fexc	NA
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek14	Hap_023	NA
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek15	Hap_108	NA
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek2	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek3	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek4	Hap_Fexc	Hap_03
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek5	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek6	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek7	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek8	Hap_Fexc	Hap_56
Poland	Szczecintek	58	Szczecintek9	Hap_Fexc	NA
Spain	Taranas	59	Curuena2	Hap_Fexc	NA
Spain	Taranas	59	MestasdeCon3	Hap_Fexc	NA
Spain	Taranas	59	Taranas1	Hap_015	NA
Spain	Taranas	59	Taranas2	Hap_005	Hap_Fexc1
Spain	Taranas	59	Torestio1	Hap_Fexc	NA
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke1	Hap_Fexc	NA
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke10	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke11	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke12	Hap_Fexc	NA
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke2	Hap_Fexc	NA
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke4	Hap_109	Hap_Fexc1
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke5	Hap_110	Hap_04
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke6	NA	Hap_Fexc1
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke7	Hap_Fexc	Hap_Fexc1

Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke8	Hap_111	Hap_03
Denmark	Tuedlykke	60	Tuedlykke9	Hap_112	Hap_Fexc1
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio1	Hap_113	Hap_Fexc1
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio10	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio11	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio12	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio13	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio2	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio3	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio4	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio6	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio7	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio8	Hap_Fexc	NA
Italy	Valle Pesio	61	VallePesio9	Hap_114	NA
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa1	Hap_Fexc	NA
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa10	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa11	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa12	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa13	Hap_Fexc	NA
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa2	Hap_Fexc	NA
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa3	Hap_115	NA
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa4	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa5	Hap_Fexc	Hap_03
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa6	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa7	Hap_Fexc	Hap_03
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa8	NA	Hap_Fexc1
Poland	Wloszczowa	62	Wloszczowa9	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood1	NA	Hap_Fexc1
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood10	Hap_116	Hap_Fexc2
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood11	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood12	NA	Hap_Fexc2
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood13	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood14	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood2	Hap_Fexc	NA
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood3	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood4	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood5	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood6	Hap_015	Hap_Fexc1
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood7	Hap_015	Hap_Fexc2
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood8	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
United Kingdom	Wytham Wood	63	WythamWood9	Hap_Fexc	Hap_Fexc2
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio1	Hap_Fexc	NA
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio10	Hap_060	Hap_Fexc1
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio11	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio2	Hap_117	Hap_57
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio3	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio4	NA	Hap_Fexc1
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio5	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio6	Hap_094	Hap_Fexc1
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio7	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio8	Hap_118	Hap_Fexc1
Lithuania	Zeimelio	64	Zeimelio9	Hap_Fexc	Hap_Fexc1
	Sweden		GenBank	EU314848.1 (Hap_124)	Hap_58

F. mandshurica

Japan	EU314863.1	Hap_125	NA
	AH004972.1 and U82875.1	Hap_126	NA
China	EU314864.1	Hap_127	NA
Japan	mandjaponica192	NA	Hap_Fmand1
Japan	mandjaponica192b	NA	Fmandshurica296b
Japan	mandjaponica193	NA	Hap_61
Japan	mandjaponica193b	NA	Fmandshurica297b
Japan	mandjaponica194	NA	Fmandshurica298b
Japan	mandjaponica195	NA	Hap_61
Japan	mandshurica105	NA	Hap_61
Japan	mandshurica184	NA	Hap_64
Japan	mandshurica185	NA	Hap_65
Japan	mandshurica186	NA	Hap_66

F. nigra

USA	EU314867.1	Hap_128	NA
USA	EU314868.1	Hap_128	NA
	Nigra_33	NA	Fnigra47
	Nigra_47	NA	Fnigra47
	Nigra_100	NA	Fnigra100

4.3 Conclusions

Nous avons montré que l'évolution réticulée des espèces de la section *Fraxinus* s'étend sur l'ensemble du continent eurasiatique, malgré la barrière climatique et géologique que représente l'Himalaya.

Nos résultats démontrent l'intérêt d'inclure des espèces proches phylogénétiquement afin d'accroître la précision des inférences. En effet, sans inclure *F. mandshurica* dans notre échantillonnage, il aurait été impossible de détecter l'hybridation passée entre cette espèce asiatique et *F. angustifolia*, seule la paraphylie de *F. angustifolia* pouvant être détectée dans une analyse limitée aux espèces européennes de la section.

Par ailleurs, grâce aux datations moléculaires réalisées, nous avons pu mettre en évidence l'ancienneté des phénomènes observés. En effet, la plupart des études de phylogéographie sont réalisées en tenant pour acquis que le signal présent dans les jeux de données représente la trace des événements climatiques majeurs du Quaternaire. Même si désormais quelques études, principalement phylogénétiques (par exemple, Havill *et al.*, 2009), mais aussi phylogéographiques (Magri *et al.*, 2007) interprètent les résultats obtenus (principalement les incongruences profondes entre régions génétiques utilisées) comme le résultat de transferts génétiques anciens, peu d'études tentent d'expliquer les raisons sous-jacentes à ces transferts génétiques, comme des événements géologiques ou climatiques aussi anciens que les phénomènes d'orogénèse observés au Tertiaire.

De plus, l'hybridation récente entre *F. excelsior* et *F. angustifolia*, déjà largement démontrée (Morand-Prieur *et al.*, 2002; Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006; Gérard *et al.*, 2006a; Gérard *et al.*, 2006b) est confirmé ici à l'échelle européenne par le placement de certains individus d'une espèce dans l'autre espèce, soit pour l'un des deux espaceurs transcrits, soit pour à la fois pour les nETS et nITS. Les introgressions de *F. angustifolia* dans *F. excelsior* sont plus fréquentes que les introgressions de *F. excelsior* dans *F. angustifolia*, spécialement le long des côtes atlantiques, de la Normandie en remontant jusqu'au Danemark. Cette répartition suggère l'existence d'une composante écologique liée au climat océanique dans le phénomène d'hybridation comme l'ont observé Fernandez *et al.* (2006) et Gérard *et al.* (2006b). Toutefois, des études portant plus spécifiquement sur les aspects écologiques de l'hybridation entre *F. excelsior* et *F. angustifolia* à l'échelle de l'Europe, et à l'aide de marqueurs plus adaptés (par exemple de type microsatellites) seront nécessaires pour conclure.

Enfin, dans un contexte de changements climatiques globaux, la connaissance plus fine des deux espèces largement réparties en Europe, *F. excelsior* et *F. angustifolia*, pourrait permettre de développer des politiques de conservation, notamment pour les populations de *F. angustifolia* du sud-est de l'Europe, qui sont apparues fortement différenciées des autres populations méditerranéennes de cette espèce. Les politiques de conservation qui pourraient être mises en place pour faire face aux changements climatiques globaux devront tenir compte de cette différenciation.

4.4 Références de l'introduction et des conclusions

- Avise, J.C., 2002. The history and purview of phylogeography : a personal reflection. *Molecular Ecology* 7, 371-379.
- Fernandez-Manjarres, J.F., Gérard, P.R., Dufour, J., Raquin, C., Frascaria-Lacoste, N., 2006. Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl (Oleaceae) in eastern and western France. *Molecular Ecology* 15, 3245-3257.
- Gérard, P., Klein, E., Austerlitz, F., Fernandez-Manjarres, J., Frascaria-Lacoste, N., 2006a. Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. *BMC Evolutionary Biology* 6, 96.
- Gérard, P.R., Fernandez-Manjarres, J.F., Frascaria-Lacoste, N., 2006b. Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Molecular Ecology* 15, 3655-3667.
- Godbout, J., Jaramillo-Correa, J.P., Beaulieu, J., Bousquet, J., 2005. A mitochondrial DNA minisatellite reveals the postglacial history of jack pine (*Pinus banksiana*), a broad-range North American conifer. *Molecular Ecology* 14, 3497-3512.
- Havill, N.P., Campbell, C.S., Vining, T.F., LePage, B., Bayer, R.J., Donoghue, M.J., 2009. Phylogeny and biogeography of *Tsuga* (Pinaceae) inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany* 33, 478-789.
- Heuertz, M., Carnevale, S., Fineschi, S., Sebastiani, F., Hausman, J.F., Paule, L., Vendramin, G.G., 2006. Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp. (Oleaceae): roles of hybridization and life history traits. *Molecular Ecology* 15, 2131-2140.
- Jaramillo-Correa, J.P., Beaulieu, J., Bousquet, J., 2004. Variation in mitochondrial DNA reveals multiple distant glacial refugia in black spruce (*Picea mariana*), a transcontinental North American conifer. *Molecular Ecology* 13, 2735-2747.
- Jeandroz, S., Roy, A., Bousquet, J., 1997. Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7, 241-251.
- Lingelsheim, A., 1907. Vorarbeiten zu einer monographie der gattung *Fraxinus*. *Engler's Bot Jahrb* 40, 185-223.
- Magri, D., Fineschi, S., Bellarosa, R., Buonamici, A., Sebastiani, F., Schirone, B., Simeone, M.C., Vendramin, G.G., 2007. The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology* 16, 5259-5266.
- Morand-Prieur, M.E., Vedel, F., Raquin, C., Brachet, S., Sihachakr, D., Frascaria-Lacoste, N., 2002. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. *Molecular Ecology* 11, 613-617.
- Schonswetter, P., Suda, J., Popp, M., Weiss-Schneeweiss, H., Brochmann, C., 2007. Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42, 92-103.
- Sun, S.S., 1985. Study on the genus *Fraxinus* L. (Oleaceae) in China (I). *Bulletin of Botanical Research* 5, 37-67.
- The vPlants Project, vPlants: A Virtual Herbarium of the Chicago Region. <http://www.vplants.org>.
- Wallander, E., 2008. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution* 273, 25-49.

- Wei, Z., Green, P.S., 1996. *Fraxinus*. In: Wu, Z., Raven, P.H. (Eds.), Flora of China. Science Press, Missouri Botanical Garden, Missouri, pp. 273-279.
- Yihong, W., 1995. Study on ecology of *Fraxinus mandshurica*. Journal of Forestry Research 6, 61-64.

5 Conclusions générales et perspectives

5.1 Conclusions générales

5.1.1 Aspects généraux

L'ensemble de ces travaux apporte un éclairage nouveau sur l'évolution et la diversité du genre *Fraxinus*, aussi bien à l'échelle du genre qu'à celle des populations européennes des espèces de la section *Fraxinus*.

Même si le protocole code-barre proposé n'est pas efficace pour la délimitation d'espèces, les régions de l'ADN chloroplastique peuvent être informatives, malgré le manque de robustesse de l'information qu'elles contiennent, dans la délimitation des sections du genre, et contribuer à renforcer certains nœuds de la phylogénie générique. Nos résultats soulignent également la probabilité qu'aucune région de l'ADN chloroplastique ne soit suffisamment variable pour délimiter les espèces proches dans le genre, que ce soit seule ou en combinaison avec d'autres régions chloroplastiques. Cela est probablement dû à des taux de substitutions beaucoup plus faibles chez les espèces arborescentes que chez les herbacées. Les taux de spéciation particulièrement bas observés chez les arbres (Bouillé et Bousquet, 2005) seront sans aucun doute un handicap au développement du code-barre moléculaire dans certains groupes contenant des espèces arborescentes. Une comparaison fine des génomes chloroplastiques entre des espèces plutôt arbustives (par exemple *F. anomala*) et des espèces réellement arborescentes (par exemple *F. excelsior*), présentant des temps de génération généralement différents aurait pu confirmer ou infirmer la différence des taux de substitution entre ces deux types architecturaux. Toutefois, la prise en compte de la proximité phylogénétique est nécessaire, et sans doute délicate dans certaines sections. Les hybridations potentielles ont sans doute suffisamment homogénéisé les génomes chloroplastiques à l'intérieur des sections taxonomiques pour que l'on ne puisse que rarement récupérer des génotypes chloroplastiques exclusifs à une espèce. Ceci est probable à l'intérieur d'un genre où les barrières d'isolement reproducteur sont particulièrement fragiles, tel qu'en témoignent les essais d'hybridation intersection de C. Raquin (Univ. de Paris à Orsay, données non publiées). De plus, au niveau du génome nucléaire, certaines régions très variables mais soumises à une forte évolution concertée homogénéisante (par exemple les nETS) ne permettent pas non plus de délimiter les espèces morphologiques décrites, mais uniquement

les sections taxonomiques. Ces sections taxonomiques pourraient donc représenter les limites réelles de lignées évolutives qui ont échangé des gènes récemment ou en échangeant encore.

Ces lignées évolutives se retrouvent dans les analyses phylogénétiques du genre, la section *Melioides* présentant une polytomie comprenant plusieurs espèces, qui probablement échangent encore des gènes à l'heure actuelle. L'ensemble de la phylogénie du genre déterminée durant ce doctorat est plus robuste (les nœuds sont en moyenne plus soutenus) et plus résolue (le nombre de dichotomies est plus élevé) que celles de Jeandroz *et al.* (1997) et de Wallander (2008). Cette robustesse accrue nous permet de mieux conclure sur les limites des sections dans le genre, mais également sur les relations intersectionnelles, afin d'inférer une histoire biogéographique complète et cohérente. Le nombre d'évènements de dispersion est relativement faible, alors que le nombre d'espèces est assez élevé dans le genre, ce qui est généralement considéré comme le résultat de dispersions anciennes, probablement suivies de spéciation à l'intérieur des aires géographiques, puis extinctions de certaines espèces. Ces extinctions peuvent être dues aux variations climatiques du Tertiaire et du Quaternaire, qui ont eu, en général, une influence plus négative en Europe et dans l'Ouest de l'Amérique du Nord qu'en Asie et dans l'Est de l'Amérique du Nord. La datation des différents nœuds des arbres phylogénétiques permettra de préciser ces époques.

5.1.2 Aspects biogéographiques et systématiques

Le genre *Fraxinus* serait apparu en Amérique du Nord (section *Dipetalae*), puis deux groupes seraient apparus, l'un globalement américain (section *Melioides*) mais dont une partie des taxons serait issue d'un évènement de dispersion (*incertae sedis*) ; l'autre groupe est principalement rencontré dans l'ancien monde (sections *Sciadhanthus*, *Fraxinus* et *Ornus*), avec un groupe basal réparti encore actuellement en Amérique du Nord (section *Pauciflorae*).

En Europe, à l'intérieur de la section *Fraxinus*, plusieurs espèces montrent des patrons d'hybridation anciens, alors même que *F. angustifolia* présente des signes de paraphylie et nécessiterait donc d'être séparé en deux espèces ou sous-espèces distinctes pour satisfaire à la définition de l'espèce en tant que lignée évolutive distincte (De Queiroz, 2007). D'autres études sont toutefois nécessaires afin de clarifier les patrons génétiques discordants observés. Cette évolution réticulée apparaît comme datant de l'optimum climatique du Miocène, confirmant l'influence majeure des variations climatiques dans l'évolution des espèces de frênes. La présence de deux lignées évolutives de *F. angustifolia*, relativement indépendantes l'une de l'autre, nous amène à recommander une étude plus approfondie de ces populations

pour comprendre comment deux lignées distinctes ont pu coexister depuis la fin du Tertiaire en Europe, alors même qu'ailleurs en Europe, l'hybridation entre *F. excelsior* et *F. angustifolia* a quasiment homogénéisé la diversité chloroplastique des deux espèces (Heuertz *et al.*, 2006). Il convient également d'examiner les pressions anthropiques pesant sur les populations du sud-est de l'Europe, afin de développer des politiques de conservation prenant en compte cette diversité.

Nos travaux confirment donc que les espèces du genre *Fraxinus* présentent des divergences peu marquées, comme observé chez de nombreux arbres. Ces divergences faibles favorisent l'hybridation actuelle entre espèces taxonomiquement proches (*F. excelsior* x *F. angustifolia*), mais ont aussi favorisé l'évolution réticulée entre taxons plus éloignés (*F. angustifolia* x *F. mandshurica*). Considérant la distance géographique observée entre espèces ayant eu la possibilité de s'hybrider, les facteurs climatiques et géologiques ont joué un rôle majeur dans la mise en contact d'espèces compatibles, et la géographie ne devrait être prise en considération qu'avec prudence dans la délimitation spécifique des taxons du genre. L'hybridation, qu'elle soit ancienne ou actuelle, apparaît donc comme un élément structurant important dans le genre *Fraxinus*.

5.2 Perspectives

De nombreuses perspectives sont envisageables, certaines plus techniques, d'autres plus fondamentales. Les nouvelles techniques de séquençage haut-débit permettront d'obtenir, à défaut de la séquence complète du génome (environ 950 Mb chez *F. excelsior*), des données à l'échelle du génome entier dans le genre, comme cela a commencé avec la production d'une banque d'EST par EVOLTREE. Cela pourrait donc être utile pour étudier plus finement la réticulation ancienne observée en Eurasie. Il serait notamment possible de rechercher les portions du génome de *F. mandshurica* introgressés dans *F. angustifolia*, ce qui permettrait de préciser l'ampleur de l'hybridation (introgression ou contribution équivalente des deux espèces ?) ancienne, mais également de développer des « marqueurs d'hybridations » de type microsatellites, SNP ou indels différenciant avec une fiabilité suffisante les deux espèces européennes (Rieseberg *et al.*, 1999; Rieseberg *et al.*, 2004). Certains des marqueurs rejetés à l'échelle eurasiatique en raison d'un manque de variabilité pourraient être testés à l'échelle du genre afin de confirmer et d'affiner les patrons que nous observons, notamment dans la section *Melioides*, où le caractère artefactuel de la polytomie observée (« soft polytomy ») ne

peut être totalement infirmé (voir chapitre 2). De plus, un séquençage total des chloroplastes de certaines espèces du genre permettrait sans doute de renforcer les nœuds profonds à l'échelle du genre, et pourrait permettre, dans une approche de type code-barre moléculaire, de déterminer si, une fois que l'appartenance au genre *Fraxinus* est confirmée, l'usage de régions du génome chloroplastique permettrait de différencier les espèces, même proches. Je doute de cela car les espèces taxonomiquement proches semblent encore échanger activement des gènes par l'hybridation spontanée. Enfin, le séquençage des génomes chloroplastiques entiers des différentes lignées évolutives significatives (ESU, Moritz, 2002) de frênes trouvés en Europe permettrait de confirmer le phénomène de capture de génomes chloroplastiques, et le cas échéant, de dater à partir d'une autre « histoire évolutive » l'évènement de réticulation.

Dans un contexte d'érosion de la biodiversité, le développement de l'approche de code-barre moléculaire pour une identification taxonomique facilitée est essentiel, combiné avec des approches taxonomiques plus classiques tels que la phylogénie et les approches de « clustering » basées sur des régions du génome nucléaire plus polymorphes à l'intérieur du genre *Fraxinus*. Qu'elles soient basées sur une approche en aveugle (séquençage haut-débit au niveau génomique) ou sur des approches de gènes candidats, l'analyse et le test de nouvelles régions du génome chloroplastique, particulièrement les régions intergéniques, semblent inévitables afin que les outils à notre disposition permettent réellement de différencier les espèces proches dans le genre *Fraxinus*. Une autre possibilité serait le développement de régions nucléaires pour le code-barre moléculaire, même si des difficultés d'amplification, de reconnaissance d'homologues et d'alignement pourraient apparaître (par exemple avec les nITS).

Une solution consistant à associer une région du génome chloroplastique pour atteindre un niveau taxonomique aussi bas que possible, comme la famille ou le genre, puis une région du génome nucléaire choisie en fonction du genre, pourrait avoir une efficacité proche de 100% dans toutes les familles d'Angiospermes. Il est vrai que l'on perdrait alors l'universalité à la base de la méthode du code-barre moléculaire, mais avec une efficacité bien meilleure en contrepartie. L'utilisation des nITS, et plus récemment des nETS, étant largement répandue dans les études phylogénétiques, ces régions pourraient être utilisées dans le contexte du code-barre moléculaire. Il est même envisageable de combiner les matrices publiées afin de déterminer des amorces consensus à des niveaux taxonomiques plus élevés (par exemple les familles, voire même certains ordres), afin de se rapprocher de l'universalité originelle du code-barre. L'ensemble de cette démarche peut être appliquée au niveau générique, afin d'améliorer encore la résolution et la fiabilité de la phylogénie du genre.

Toutefois, en attendant l'arrivée des techniques de séquençage haut-débit dans l'étude des frênes (il faut souligner un début d'intérêt de la génomique, avec le projet européen EVOLTREE qui a fourni des EST de *F. excelsior* en cours d'analyse au laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution), un moyen pour accéder à des données au niveau génomique pourrait être l'usage des AFLP qui ont montré leur intérêt durant la présente thèse, ayant pu différencier *F. excelsior* et *F. angustifolia*, mais également des groupes géographiques à l'intérieur de ces espèces. Les AFLP générant une grande quantité de marqueurs dispersés dans l'ensemble du génome, ils pourraient permettre de préciser les limites géographiques de certains groupes retrouvés, voire d'en déterminer de nouveaux. Ils pourraient également répondre à la question de l'intensité de l'hybridation, et déterminer définitivement si le signal que l'on observe correspond à une introgression (suite à un événement asymétrique) ou si la ressemblance morphologique observée entre les individus occidentaux et orientaux de *F. angustifolia* suit le patron observé entre *F. excelsior* et *F. angustifolia* en France, c'est-à-dire hybridation différenciée entre la morphologie et la génétique (Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006). De plus, les AFLP semblent avoir le potentiel nécessaire pour permettre la reconnaissance simple, rapide et fiable des hybrides (résultats observés, non montrés), et des espèces parentales. Dans cette perspective, ce protocole pourrait être un bon candidat dans le cadre du code-barre moléculaire (voir ci-haut), ou pour identifier des régions introgressées du génome, ou impliquer dans la spéciation (Rieseberg *et al.*, 2000). Enfin, plusieurs études utilisent maintenant les AFLP au niveau générique, particulièrement dans les groupes où les taux d'évolution sont faibles. Toutefois, il a été récemment mis en évidence une sensibilité des AFLP à la structure des spéciations, des topologies très déséquilibrées étant très rarement retrouvées correctement par leur analyse (Garcia-Pereira *et al.*, 2009). Il convient donc de rester prudent en cas d'utilisation des AFLP à grande échelle, surtout si une topologie déséquilibrée est soupçonnée, et de tenir compte des limitations dû à la reproductibilité limitée d'analyses de marqueurs anonymes.

En prenant en compte le fait que le manque de données biologiques nous a empêché de conclure sur l'existence de lignées indépendantes de frênes en Eurasie, et considérant les réticulations anciennes et les zones hybrides actuelles, il serait utile d'obtenir des données d'hybridations contrôlées sur le genre *Fraxinus*, et plus spécifiquement entre espèces de la section eurasiatique *Fraxinus*.

L'adaptation est certainement une des clefs permettant de comprendre l'évolution du genre et de certaines espèces en particulier, notamment les espèces eurasiatiques, qui ont subi de nombreuses variations climatiques et géologiques. La recherche de marqueurs de sélection

à l'échelle du genre ou de la section *Fraxinus* pourrait apporter un éclairage précieux sur les processus de spéciation à l'œuvre. La banque d'EST d'EVOLTREE servirait ici aussi de point de départ, facilitant grandement le dessin d'amorces pour des régions potentiellement sous sélection purifiante ou divergente, recherchées soit *in silico* soit *in biblio*. L'étude de ces régions impliquées dans divers mécanismes physiologiques (réponses à la sécheresse, au froid, etc.) permettrait de mieux comprendre les réponses futures des espèces du genre *Fraxinus* face aux changements climatiques globaux. Grâce à la thèse en cours de Romain Joseph (Univ. Paris Sud 11, Orsay) sur les relations entre diversité physiologique et génétique, des réponses devraient émerger concernant les bases génétiques de l'adaptation au sein du complexe d'espèces européennes *F. excelsior* / *F. angustifolia* et leurs hybrides.

La délimitation précise des espèces de frênes, et la prise en compte de leurs hybrides en foresterie ouvrirait de nouvelles perspectives face aux changements climatiques globaux. En effet, il est pour le moment légalement impossible de reboiser des espaces perturbés avec des populations hybrides, même si les populations initiales en contenaient, par exemple dans les vallées de la Loire et de la Saône. Un travail de Maitrise (M2) est actuellement en cours afin de proposer des modifications de la réglementation sur les MRF (Matériels Reproducteurs Forestiers) en fonction des nouvelles connaissances sur les limites taxonomiques de *F. excelsior* et *F. angustifolia*.

Ainsi, pour conclure, la combinaison de ces données biologiques avec les données écologiques (simulations de Juan Fernandez, Université Paris-Sud 11, Orsay) génétiques (ce manuscrit) et morphologiques (Fernandez-Manjarres *et al.*, 2006) permettrait sans doute de clarifier définitivement le statut des espèces morphologiques reconnues aujourd'hui (Wallander, 2008), notamment celui des espèces eurasiatiques à l'histoire complexe. Ceci permettrait également de préciser l'histoire des espèces grâce à des datations moléculaires, afin d'étudier les possibles corrélations entre l'histoire des espèces du genre *Fraxinus* et les événements géologiques et climatiques majeurs de l'hémisphère nord.

Enfin, les données acquises dans le cadre de ce doctorat pourraient être utiles, dans un contexte d'érosion de la biodiversité et de changements climatiques globaux, à l'élaboration de politiques de gestion et de conservation prenant en compte la diversité génétique et l'évolution d'espèces communes dans les écosystèmes européens. Les travaux pluridisciplinaires liés à la transcription de ces résultats en termes de politiques de conservation aideraient à intégrer un peu plus l'expertise scientifique au cœur de la société civile. Par exemple, la prise en compte de la différenciation génétique des populations de *F. angustifolia* du Sud-est de l'Europe dans les politiques de conservation permettrait de réduire

les pressions anthropiques jusqu'à un niveau suffisamment bas pour maintenir durablement une diversité génétique élevée dans ces populations, leur permettant de répondre aux changements climatiques futurs.

5.3 Références

- Bouillé, M., Bousquet, J., 2005. Trans-species shared polymorphisms at orthologous nuclear gene loci among distant species in the conifer *Picea* (Pinaceae): implications for the long-term maintenance of genetic diversity in trees. *American Journal of Botany* 92, 63-73.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56, 879 - 886.
- Fernandez-Manjarres, J.F., Gérard, P.R., Dufour, J., Raquin, C., Frascaria-Lacoste, N., 2006. Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl (Oleaceae) in eastern and western France. *Molecular Ecology* 15, 3245-3257.
- Garcia-Pereira, M.J., Caballero, A., Quesada, H., 2009. Evaluating the relationship between evolutionary divergence and phylogenetic accuracy in AFLP data sets. *Molecular biology and evolution*. DOI 10.1093/molbev/msp315.
- Heuertz, M., Carnevale, S., Fineschi, S., Sebastiani, F., Hausman, J.F., Paule, L., Vendramin, G.G., 2006. Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp. (Oleaceae): roles of hybridization and life history traits. *Molecular Ecology* 15, 2131-2140.
- Jeandroz, S., Roy, A., Bousquet, J., 1997. Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7, 241-251.
- Moritz, C., 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51, 238-254.
- Rieseberg, L.H., Baird, S.J.E., Gardner, K.A., 2000. Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant Molecular Biology* 42, 205-224.
- Rieseberg, L.H., Church, S.A., Morjan, C.L., 2004. Integration of populations and differentiation of species. *New Phytologist* 161, 59-69.
- Rieseberg, L.H., Whitton, J., Gardner, K., 1999. Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics* 152, 713-727.
- Wallander, E., 2008. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution* 273, 25-49.