



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Ecologie, Biodiversité et Evolution

Présentée et soutenue par :

Pierre-Jean Malé

le : jeudi 3 février 2011

Titre :

Stabilité évolutive des mutualismes et mécanismes de contrôle :
le cas d'une relation plante-fourmis

JURY

Dr. Jacqui Shykoff	Directeur de Recherche, Université Paris Sud	Rapporteur
Pr. Doyle McKey	Professeur, Université Montpellier II	Rapporteur
Pr. Brigitte Crouau-Roy	Professeur, Université Toulouse III	Examineur
Pr. Jean-Baptiste Ferdy	Professeur, Université Toulouse III	Examineur
Dr. Michael Hochberg	Directeur de Recherche, Université Montpellier II	Examineur

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire EDB (Evolution & Diversité Biologique)

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Jérôme Orivel & Dr. Angélique Quilichini

Rapporteurs :

Dr. Jacqui Shykoff & Pr. Doyle McKey

« Mes doigts en ce moment sont encore gourds des douloureuses onglées de cette journée et, à côté de moi, flegmatique, Colin frotte ses orteils livides de gel.

Cela, et bien d'autres obstacles surmontés, pour apprendre quoi ? La proportion du chlore, du fluor, du carbone et du soufre dans les gaz d'un volcan perdu au milieu des glaces ? Quelle importance ? en vérité, celle de toute la recherche scientifique : comprendre quelque chose. C'est sa vraie raison d'être, fondamentalement humaine. Ses justifications modernes, d'économie, de stratégie, de politique, et la sempiternelle question, commune au P-DG comme au contribuable moyen : « A quoi ça sert ? », sont la négation même de la passionnante enquête du savoir : savoir, comprendre notre étonnant univers, notre univers immense et notre univers ultra-microscopique, notre univers minéral et le fabuleux, le miraculeux univers de la vie. »

Haroun Tazieff, L'Aventure et la science et la poésie



à Gabriel...

REMERCIEMENTS

Le lundi 13 juin 2005, je gravissais les trois étages menant au bureau, alors que j'intégrais pour la première fois un laboratoire de recherches. J'étais alors en troisième année de Licence et je m'apprêtais à compter des fourmis pendant tout l'été. Dix-sept mille trois cent trente-et-une fourmis et cinq ans plus tard, me voici au terme de ma thèse. Il est donc temps, aujourd'hui, de remercier tous ceux qui m'ont aidé, m'ont soutenu, m'ont encouragé, ont partagé ma vie et se sont tenus à mes côtés plus ou moins longtemps sur ce petit bout de chemin.

Bien évidemment, je remercie mes directeurs de thèse, Angélique Quilichini et Jérôme Orivel. L'océan qui nous séparait n'a jamais entamé leur disponibilité et leur réactivité exemplaires. J'ai beaucoup gagné en maturité scientifique à leur contact et je les remercie très sincèrement pour leur enseignement.

Il m'aurait été impossible d'effectuer ce travail sans une équipe volontaire et dynamique à mes côtés, sur le terrain comme lors de la rédaction des manuscrits : je remercie donc très chaleureusement Alain Dejean (en quelques sortes, le professeur Edward Challenger), Andréa Yockey-Dejean pour sa patience, sa gentillesse et ses commentaires si pertinents, Julien Grangier qui a effectué un débroussaillage efficace de la jungle de Petit-Saut, Céline Leroy et Olivier Roux pour les innombrables mesures récoltées sur le terrain tandis que j'étais en métropole, Isabelle Henry pour le joyeux coup de main (ces longues nuits en forêts resteront inoubliables !) et Mario Ruiz-Gonzalez, Jérémie Lauth et Laurie Esparza (Kitt) pour les fous rires à une heure du mat' au labo de Petit-Saut, au carbet cuisine ou au bord du Sinnamary... Un grand merci va également aux deux étudiants que j'ai eu la chance de coencadrer : Stéphanie Montembault et l'incalculable Pierre Humblot. Bon vent à tous les deux.

Ce travail a été grandement enrichi par les interventions ponctuelles fort opportunes de quatre personnes formidables qui méritent toute ma gratitude : Jean-Baptiste Ferdy dont la grande maîtrise des modèles mixtes alliée à des qualités pédagogiques à toute épreuve lui a

valu de me voir débarquer dans son bureau plus d'une fois, Thibaut Malausa et Jean-François Martin dont le projet providentiel a sauvé un pan entier de ma thèse et Gabriel Debout dont les conseils avisés en matière de génét des pops alternaient avantageusement avec de grandes discussions sur notre passion commune qu'est la bande-dessinée.

Nombre de réflexions passionnantes ont été initiées lors de mes comités de thèse et certaines d'entre elles ont donné lieu à des manuscrits intégrés dans ce travail. Je remercie donc très sincèrement Isabelle Dajoz, Carole Kerdelhué, Bernard Godelle et à nouveau Jean-Baptiste.

Toutes ces rencontres et les recherches qui les accompagnent ont été effectuées dans ces lieux très particuliers, un peu hors du temps, que sont les laboratoires de recherche. Il y eut tout d'abord mon laboratoire d'accueil principal et ses membres aux personnalités si marquantes : EDB. Merci de m'avoir permis de rester à Toulouse alors même que j'y étais le dernier représentant de mon équipe. A Petit-Saut, il y eut le laboratoire HYDRECO et sa joyeuse équipe, Philippe, Cécile, Régis, Roland et tous les autres, qui m'ont hébergé pendant les longs mois de terrain. Non loin de là, se trouve la station scientifique des Nouragues où j'ai passé les deux moi les plus exaltants de ma vie de scientifique. La magie des lieux alliée au cadre de vie exceptionnel en font une station privilégiée pour entrer en contact avec la nature guyanaise. Et toutes ces qualités n'ont été que magnifiée par la présence bienveillante de Patrick, Wémo et Philippe ; merci beaucoup pour cette incroyable aventure ! Et enfin, comment ne pas remercier le CBGP, ce laboratoire unique où j'ai fait mes premiers pas de moléculiste parmi des personnes aux qualités humaines et scientifiques exceptionnelles. J'y remercie notamment Nath et Max qui m'ont tant appris et à qui je serai éternellement redevable. Vous vous en êtes déjà aperçu, je trouverai toujours de bonnes raisons de vous rendre visite ! Un grand merci également à toute l'équipe de la Génopole pour leur disponibilité et leur professionnalisme remarquables.

Merci enfin à Brigitte Crouau-Roy, Jacqui Shykoff, Doyle McKey, Michael Hochberg et Jean-Baptiste (pour la troisième et dernière fois) d'avoir accepté de lire et évaluer ce travail.

Une thèse ne repose pas que sur l'environnement scientifique et un bon équilibre de vie pendant ces années dépend également de l'entourage affectif. Et puisque le chemin est long et semé d'embûches avant même de commencer, il n'est que justice de remercier très chaleureusement Ben, mon brother in arms. Pendant quatre ans nous nous sommes battus ensemble, serré les coudes et notre collaboration a été riche en enseignements et en réussites.

Même si nos trajectoire ont quelque peu divergé, tu restes une personne de premier plan dans mon parcours et dans ma vie.

Parfois ont lieu quelques rares rencontres marquantes qui font grandir, évoluer et envisager son cheminement sous un jour nouveau. Francky fait pour moi partie de ces gens-là. Il a représenté un soutien humain et scientifique inestimable. Et par association d'idée, j'en viens à un clin d'œil aux deux autres membres de la Lloret de Mar team : Abel et André, deux vrais amis avec qui je passerai volontiers de nouveaux étés à Biarritz. Ajoutons ce cher Jéjé, mon compagnon de piscine, de Bar de la Lune et de Café Pop ; c'est « aaaahhh »...

Je remercie également Benoît qui a su me supporter (dans tous les sens du terme), notamment au cours de la rédaction... et ce n'est que le début !

Voilà de nombreuses années qu'Anaïs et moi évoluons en parallèle et collaborons sur des projets aussi divers que variés. Mais c'est autour de la vulgarisation que nous avons eu nos plus belles victoires et aussi nos plus grands coups de gueule ! J'espère très sincèrement que nous continuerons longtemps sur cette lancée.

De longs mails en grandes discussions téléphoniques, je remercie Stéphane, probablement celui parmi mes amis que j'ai le moins souvent vu en chair et en os !

Viennent ensuite tous ceux qui ont eu le courage de partager mon bureau à Toulouse, de s'abriter sous mon arbre en carton et de subir sans jamais se plaindre (avouez que ça vous a plu) mes nombreuses excentricités : Marion, Juliane, Flo et plus récemment Staffan. Plus que de simples collègues de bureaux, vous êtes de vrais potes ! Et il en va de même pour tous mes autres comparses eudébiens : Jorès (lo meu compatriòt occitan), Yann (la plus belle réussite de ma thèse), Joss (il eut fallut qu'il n'existât point pour que nous eussions à l'inventer), Claire, Juliette, Mailyn, Aurélie, Chloé, Charlotte, Maxime, Pauline, Kyle et Oskar (les proofreaders les plus rapides de la galaxie), Olivier, Emeline, Pierrick, Jérôme, Christophe (les deux), Sergine, Manue, Brigitte, Etienne, Peggy (qui a subi plus que personne mes rushes administratifs de dernière minute), Nicole et tous ceux sans qui EDB ne serait pas aussi accueillant et agréable à vivre. J'associe enfin à ces remerciements Antoine, Gérard, Fabien (I wanna walk upside of the mountain), Audrey et Raphaël (les collègues de la Fashion Week) : vous n'êtes pas d'EDB, mais je vous aime quand même.

Une autre partie de la famille est actuellement dispersée aux quatre coins du monde (surtout à Montpellier, il est vrai) mais ce n'est pas pour autant que je vous oublie ! Il s'agit des acolytes du BEE : Delphine, So, Cath, Lucie ; de tous les amis du Cébège : Fab (copilote d'hélico), Gaël, Laurent, Philippe, Anne, Arnaud, Denis, Manue, Armelle, Marie, Ricou, Adri, Carine, etc ; mais aussi tous les autres : Virginie, Nico, BenJ, Maxime, Antho, Thomas...

Etrangement, bien qu'elle fasse partie intégrante de la mission du chercheur, la vulgarisation scientifique est le parent pauvre de la formation doctorale. Pourtant, dans le cadre de la recherche fondamentale, elle est le seul bénéfice immédiat qu'apporte le scientifique à la société. C'est pourquoi je suis extrêmement fier d'avoir vice-présidé pendant trois ans le réseau de vulgarisation scientifique Plume! et d'avoir participé à la fondation de l'antenne toulousaine. J'ai rencontré au sein de cette association des personnes passionnées et engagées, qui partagent mes convictions et sont prêtes à lutter contre les obscurantismes de tous bords. Je remercie donc Vincent de m'avoir motivé au premier abord, ainsi que Vio, Carol-Ann, Aurélie, François (je n'oublie pas l'ami Rico-Gray), Romain, Gaël, Mél, Gooheg, Fatou, Valéria, Anaïs, Juliane, et toutes les petites mains de Plume! pour l'édifice formidable que nous avons bâti ensemble.

Comme promis, j'adresse également mes remerciements à Bruno, Fatou et Christophe pour la citation, à Mezzo di Pasta qui m'a plus d'une fois nourri tard dans la nuit, en sortant du labo, ainsi qu'à Otis Redding, Bensé, Gush, Ella Fitzgerald, Archimède, Dire Straits, Puggy, Jil is Lucky et Kasabian pour le soutien moral.

Enfin, je remercie toute ma famille qui a su comprendre mon absence et m'a gentiment encouragé au cours des dernières années. Bien entendu, je remercie tout particulièrement mes parents qui, chacun à leur manière, m'ont appris à me battre et à surmonter les obstacles coûte que coûte.

Vous tous qui avez croisé mon chemin et fait partie de ma vie, je vous remercie très sincèrement pour votre participation, consciente ou non, à cette thèse.

Maintenant, passons aux choses sérieuses !

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	11
1 Contexte général.....	13
2 Mutualisme ou mutualismes ? Une définition dynamique pour des interactions dynamiques.....	17
3 L'apparente ubiquité des conflits : comment s'en accommoder ?.....	21
3.1 Du conflit à la tricherie.....	21
3.2 S'assurer la coopération du partenaire	25
3.2.1 La fidélité au partenaire et les modes de transmission de l'association.....	25
3.2.2 Les sanctions, les récompenses et la tolérance	27
3.2.3 Le choix du partenaire	28
3.3 Approche synthétique du maintien de la coopération.....	28
4 Les mutualismes plantes-fourmis : l'intérêt du modèle réside dans sa diversité.....	31
4.1 Historique des interactions plantes-fourmis	31
4.2 Les services échangés.....	31
4.2.1 La pollinisation.....	32
4.2.2 La dissémination.....	32
4.2.3 La nutrition	32
4.2.4 La protection.....	33
4.3 Intérêt des relations plantes-fourmis pour l'étude des mutualismes.....	34
5 Modèles et sites d'étude.....	36
5.1 <i>Hirtella physophora</i> , la plante (encadré 1).....	36
5.2 <i>Allomerus decemarticulatus</i> , la fourmi (encadré 2)	39
5.3 Quels sont les services autour desquels peut naître un conflit ?.....	42
5.3.1 La protection de la plante par les fourmis	42
5.3.2 La fourniture du couvert et du logis par la plante-hôte.....	43
5.4 La zone d'étude : la Guyane française	43
6 Objectifs de l'étude.....	46
CHAPITRE 1 : Conflits et contrôle, coûts et bénéfices à court terme.....	49
1 Les fourmis ont-elles théoriquement un intérêt à tricher ?.....	51
2 Le comportement castrateur comme manifestation du conflit.....	52
3 Le rôle des sanctions dans le contrôle du conflit.....	55
4 Conclusion.....	57
4.1 Pourquoi <i>H. physophora</i> ne sanctionne-t-elle pas systématiquement tout comportement castrateur quel que soit son intensité ?.....	58
4.2 Pourquoi <i>A. decemarticulatus</i> ne s'accommode-t-elle pas des sanctions imposées par sa plante-hôte ?	59
5 Articles.....	61
5.1 Article 1 : Dynamics of the association between a long-lived understory myrmecophyte and its specific associated ants.....	61
5.2 Article 2 : An ant symbiont directly and indirectly limits its host plant's reproductive success... ..	70
5.3 Article 3 : The importance of host responses in maintaining a low level of parasitic castration behaviour in an ant-plant mutualism	82

CHAPITRE 2 : Stabilité de l'association à l'échelle évolutive	95
1 <i>La reproduction de la plante-hôte</i>	98
2 <i>La structuration géographique de l'information génétique et le mode de transmission de l'association 103</i>	
3 <i>Conclusion.....</i>	105
4 <i>Articles.....</i>	107
4.1 Article 4 : Floral biology and breeding system in the myrmecophyte <i>Hirtella physophora</i> (Chrysobalanaceae) in French Guiana.....	107
4.2 Article 5 : Characterization of polymorphic microsatellite loci in the neotropical plant-ant <i>Allomerus decemarticulatus</i> (Formicidae: Myrmicinae) and multiplexing with other microsatellites from the ant subfamily Myrmicinae	125
4.3 Article 6 : Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the ant-plant <i>Hirtella physophora</i> (Chrysobalanaceae) using pyrosequencing technology.....	129
4.4 Article 7 : Multiscale spatial genetic structure and geographically limited gene dispersal increase the stability of an ant-plant mutualism	139
CHAPITRE 3 : Multiplicité des partenaires et variabilité des coûts et bénéfices	155
1 <i>Le rôle du troisième partenaire</i>	158
2 <i>La compétition entre espèces de fourmis</i>	160
2.1 Quels sont les coûts et bénéfices associés à l'une ou l'autre espèce de fourmis ?.....	160
2.2 Comment expliquer la coexistence des deux espèces de fourmis en sympatrie ?	162
3 <i>Conclusion.....</i>	166
4 <i>Articles.....</i>	169
4.1 Article 8 : Specific, non-nutritional association between an ascomycete fungus and <i>Allomerus</i> plant-ants.	169
4.2 Article 9 : Interspecific variation in the foraging behaviour of two obligate plant-ants: long term consequence for host plant performance.	178
CONCLUSION GENERALE	193
1 <i>Synthèse.....</i>	196
2 <i>L'apport à la théorie des mutualismes.....</i>	200
2.1 L'absence de lexique adapté à l'étude des interactions	200
2.2 L'importance relative des différents facteurs théoriques dans le maintien des relations mutualistes 201	
3 <i>Perspectives.....</i>	204
3.1 Affiner la compréhension du système à une échelle locale	204
3.2 Explorer les variations du système à grande échelle	205
3.3 Explorer les variations du système à l'échelle évolutive.....	206
3.4 Explorer les variations du mutualisme tripartite.....	207
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	209
ANNEXE	231
Article 10 : High throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries.....	231

INTRODUCTION

GENERALE

1 Contexte général

La coopération est à l'origine de transitions évolutives majeures et de l'apparition de nouveautés morphologiques importantes. Elle se manifeste sous diverses formes au cours de l'histoire du vivant. La plus ancienne est la transition de l'unicellularité vers la pluricellularité. Elle s'est produite au moins 25 fois, aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes, pour la première fois il y a 3 à 3,5 milliards d'années et se produit encore à l'heure actuelle (Schopf 1993; Boraas *et al.* 1998; Grosberg & Strathman 2007). Par la suite, l'endosymbiose a donné naissance aux premières cellules eucaryotes pourvues de mitochondries il y a 1,45 à 2 milliards d'années (Embley & Martin 2006). La transition vers la socialité, quant à elle, a entraîné l'émergence de groupes d'individus de la même espèce en tant qu'entité autonome, capable d'engendrer d'autres groupes aux caractéristiques similaires. Il existe différents niveaux de socialité, depuis le grégarisme qui repose sur l'interattraction entre individus de la même espèce, jusqu'à l'eusocialité, c'est-à-dire la constitution de groupes d'individus montrant à la fois une division du travail, des générations chevauchantes et l'élevage coopératif des jeunes (Wilson 1971). La socialité se manifeste principalement chez les Métazoaires et les Protozoaires, mais également chez certaines Chlorophytes basales (Nedelcu & Michod 2006). Enfin, la possibilité d'établir des relations mutualistes a mené à l'association, à plus ou moins long terme, d'espèces différentes qui bénéficient de leur présence réciproque.

Ces quatre phénomènes correspondent à l'émergence de nouveaux niveaux d'organisation composés d'unités précédemment indépendantes. Les organismes concernés ont ainsi obtenu l'accès à des niches écologiques jusque là vacantes. Par ailleurs, il existe une différence majeure entre la transition vers la pluricellularité et vers la socialité d'une part, et l'endosymbiose et les relations mutualistes d'autre part. D'un côté, les individus qui s'associent appartiennent à la même espèce, tandis que de l'autre, ils proviennent d'espèces différentes, souvent phylogénétiquement éloignées, voire de phylums différents. Dans ce second cas, une espèce donnée peut non seulement acquérir de nouvelles fonctions, mais également, et en une seule fois, l'intégralité d'un package génétique, moléculaire, protéique, cellulaire et comportemental correctement régulé et exprimé. C'est par exemple le cas de

l'acquisition de capacités photosynthétiques par des cellules eucaryotes, via l'internalisation de cyanobactéries primitives.

Si l'importance de la coopération dans le façonnement de la diversité et de l'environnement est indiscutable, tant d'un point de vue évolutif qu'écologique, son apparition revêt un caractère tout aussi central dans les thématiques scientifiques développées depuis quelques décennies. Ainsi, le corpus scientifique traitant de l'émergence de la coopération, intra- et/ou interspécifique, ne cesse de croître. Car au-delà de la simple interrogation portant sur sa mise en place, l'existence même de la coopération représente un challenge pour les théoriciens de l'évolution. Dès l'élaboration des bases de la sélection naturelle au XIX^{ème} siècle, Charles Darwin désignait déjà l'eusocialité comme « une difficulté toute spéciale [...] assez insurmontable pour renverser [la théorie de l'évolution] », et considérait l'altruisme comme un potentiel cul-de-sac évolutif (Darwin 1871, 1895). Ces quelques phrases sont par ailleurs utilisées comme pivots dans l'argumentaire de certains discours créationnistes modernes.

Au premier coup d'œil, il semble en effet que l'existence de relations entre individus basées sur l'échange de services soit en désaccord avec la vision stricte et naïve de la « lutte pour la survie ». Un individu est censé devoir maximiser sa valeur sélective en soutirant le plus de ressources possible à son environnement, biotique comme abiotique, tout en payant le moindre coût. Ainsi, la notion même de réciprocité inhérente à la coopération semble illusoire. La recherche du bénéfice individuel maximum mène en effet à des conflits quel que soit le type de coopération que l'on examine. Par exemple, le cancer est un indice de conflit entre unicellulaires au sein d'organismes pluricellulaires, de même que la persistance d'un stade zygotique unicellulaire chez des organismes dont la majorité du cycle de vie se déroule sous forme pluricellulaire (Grosberg & Strathman 1998). Dans la même veine, la stérilité mâle chez certaines plantes conduisant à la gynodioécie est une manifestation du conflit entre les génomes nucléaires et cytoplasmiques autour de la production de gamètes mâles (Frank 1989).

Pourtant, l'abondance des relations à bénéfices réciproques, dans tous les écosystèmes quels qu'ils soient, contredit cette conclusion trop rapide. Angela E. Douglas, dans le premier chapitre de son livre « The symbiotic habit », invite le lecteur circonspect à regarder par la fenêtre et à dresser une liste de tous les organismes qu'il voit. La grande majorité de ces organismes – probablement tous – sont le produit d'au moins un événement de symbiose (Douglas 2010), lecteur compris puisque 10% du poids sec d'un être humain provient de ses bactéries symbiotiques (Margulis & Schwartz 1998) ! Et c'est bien à cette conclusion qu'en sont arrivés les biologistes depuis fort longtemps : la fragilité des relations de coopération

n'est qu'apparente. Comme l'avait pressenti Charles Darwin avec la sélection de parentèle (1895), il existe forcément un ou, plus vraisemblablement, plusieurs mécanismes qui jouent à la fois le rôle d'étais et de garde-fous, permettant ainsi l'établissement et la consolidation de relations basées sur la coopération. De l'action de ces mécanismes résulterait une valeur sélective augmentée à plus ou moins long terme pour les acteurs engagés dans une telle relation et/ou une diminution de la valeur sélective en cas de défection ou de tentative d'exploitation du partenaire.

De nombreuses théories ont ainsi vu le jour, apportant chacune une vision différente de l'origine et du maintien des relations non-antagonistes. La sélection de parentèle, l'extension de la notion de valeur sélective aux individus apparentés, l'application de la théorie des jeux dans un cadre biologique sont autant d'avancées majeures dans notre compréhension de la coopération (Hamilton 1964a, b; Axelrod & Hamilton 1981). Plus récemment, avec les avancées techniques de ces dernières décennies, notamment dans les domaines de la génétique moléculaire et de la cytogénomique, nous avons eu accès à des informations cruciales sur l'histoire phylogénétique de l'apparition des comportements d'entraide ou encore sur l'interaction entre individus, au niveau moléculaire. Ainsi, il a été possible de faire la part des choses entre l'influence de l'environnement et l'héritage phylogénétique dans l'apparition de la socialité chez divers taxons, tels que les guêpes ou les primates ou de décrypter les mécanismes de communication cellulaire entre plantes mycorrhiziennes et bactéries (Di Fiore & Rendall 1994; Schmitz & Moritz 1998; Gherbi *et al.* 2008).

C'est dans ce cadre conceptuel que se place ce travail de thèse. Je me suis intéressé à un type particulier de relations basées sur la coopération que sont les mutualismes. Alors que de nombreuses études théoriques, ou *in silico*, proposent différents scénarios expliquant le maintien des mutualismes à long terme, j'ai choisi de tester empiriquement quelques unes de ces hypothèses, *in natura*. En concentrant mes recherches sur une relation mutualiste entre une espèce de plante et son espèce de fourmis associée, je me suis attaché à comprendre l'importance relative des différents mécanismes impliqués dans le maintien d'une telle association. L'absence d'effets de certains d'entre eux et l'impact crucial des autres sur la trajectoire évolutive de cette relation donnent un aperçu de la complexité et de l'intrication des interactions qui sous-tendent la stabilité des stratégies de coopération. Comme le soulignent Herre *et al.* (1999), il n'est pas possible d'élaborer des principes généraux qui caractérisent l'ensemble des mutualismes si les cas isolés ne sont pas compris correctement. Par ce travail, nous espérons présenter un cadre expérimental permettant, d'après le cas

particulier des espèces étudiées, de progresser dans l'établissement d'une généralisation de la théorie des mutualismes.

2 Mutualisme ou mutualismes ? Une définition dynamique pour des interactions dynamiques.

C'est en 1873 que le mot « mutualisme » a été prononcé pour la première fois dans un contexte biologique. Le paléontologiste et zoologiste Pierre-Joseph van Beneden le sort alors de son contexte politique pour désigner ainsi devant l'Académie Royale de Belgique des relations à bénéfices réciproques entre espèces. Il distinguera par la suite le mutualisme des deux autres grands types d'interactions connus alors que sont le commensalisme et le parasitisme (van Beneden 1875). Cependant, le concept était connu depuis fort longtemps, sans toutefois avoir de nom. Au V^{ème} siècle av. JC, Hérodote écrit à propos du crocodile : « Tous les oiseaux et les animaux se tiennent à bonne distance mais il maintient avec le *Trochilus* de bonnes relations parce qu'il profite de cet oiseau. [...] le *Trochilus* entre dans sa gueule et dévore les sangsues. Le crocodile est tellement content de ce service qu'il ne fait jamais aucun mal à cet oiseau. » Il s'agit de la plus ancienne description d'une relation mutualiste, tout à fait représentative de l'idée d'équilibre naturel alors prédominante. Durant tout le Moyen-âge et jusqu'à la Révolution Industrielle, l'héritage platonicien perpétua cette vision fixiste des interactions à travers le postulat selon lequel les plantes ont été créées pour nourrir les animaux qui eux-mêmes servent les hommes : la Nature est bien faite. Mais à partir du XIX^{ème} siècle, la compétition sociale revêt une valeur de progrès. Dans le même temps, Darwin publie « De l'origine des espèces du fait de la sélection naturelle » (1859) et la vision commune de l'Ordre des Choses vacille. Par ailleurs, dans cet ouvrage, Darwin pose les bases de la définition que nous avons aujourd'hui du mutualisme en montrant qu'il s'agit de relations issues d'actes égoïstes, limitées par des coûts et dirigées par les conflits d'intérêts entre partenaires.

Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, seuls les naturalistes s'intéressent aux mutualismes et l'intérêt écologique ou évolutif qu'ils représentent n'est que peu évoqué. C'est notamment sous l'impulsion donnée par les travaux de Daniel H. Janzen sur la coévolution entre plantes et fourmis que la communauté des évolutionnistes se tourne vers les mutualismes avant que le sujet ne connaisse un essor fulgurant depuis les années 80 (Janzen 1966; Axelrod & Hamilton

1981; Ewald 1987; Bronstein 1994). Les interactions entre espèces sont alors séparées en six grandes catégories étanches, définies sur la base des coûts et bénéfices nets pour chacun des partenaires (Fig. 1 ; Bronstein 1994).

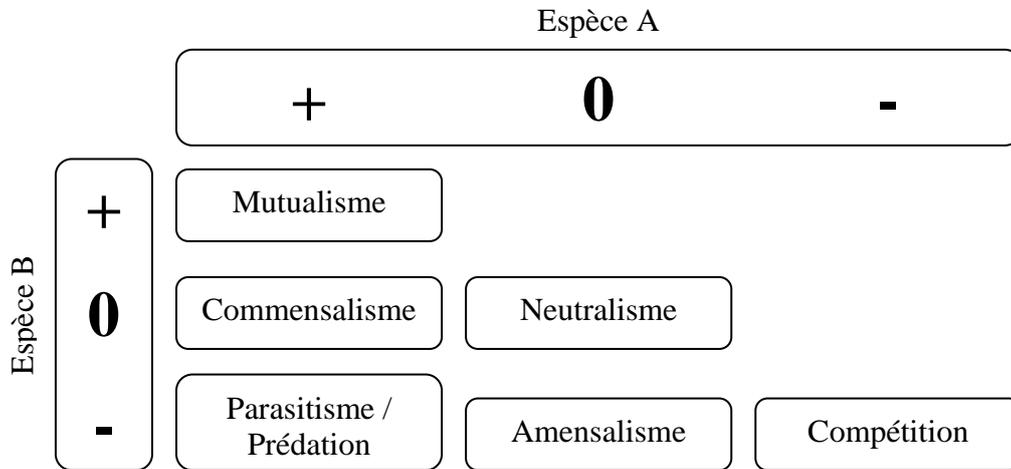


Figure 1 : Représentation classique des interactions entre espèces, sous forme de grille. Les interactions sont groupées en fonction des effets nets pour chacune des espèces impliquées. Adapté d'après Bronstein (1994).

Quasiment toutes les études menées jusque dans les années 90 ne se concentraient que sur un seul partenaire, généralement une espèce d'intérêt, et avaient seulement pour but d'identifier les mutualistes associés à cette espèce (voir Bronstein 1994 pour une synthèse). Cette vision fragmentaire des associations mutualistes a eu pour conséquence d'entretenir l'image statique des interactions entre espèces.

C'est au milieu des années 90 que la définition du mutualisme évolue pour intégrer une notion dynamique. Dans son article de synthèse de 1994, Judith L. Bronstein formule huit questions selon elle fondamentales pour la recherche sur l'évolution et l'écologie des mutualismes. Parmi ces huit questions, quatre d'entre elles font mention de l'instabilité des relations mutualistes à différentes échelles de temps écologique et/ou évolutive, et d'espace. Une attention particulière peut être portée à la quatrième : « Quand les coûts et bénéfices au sein des mutualismes sont-ils contexte-dépendants ? » Cette question s'appuie sur celle posée un peu plus tôt par J. Hall Cushman & John F. Addicott (1991) : « Quels facteurs influencent la force, la symétrie et le résultat de cette interaction ? » Les interactions mutualistes sont dorénavant définies sur la base des coûts et bénéfices qu'elles engendrent pour les acteurs, mais aussi par la dépendance des partenaires l'un envers l'autre, les frontières entre les différents types d'interactions étant donc poreuses. Une espèce peut se déplacer le long d'un axe représentant l'effet net de sa présence sur son partenaire. Cet axe représente un continuum

entre un effet net très négatif qui correspond à un caractère parasite jusqu'à un effet net très positif qui correspond à un caractère mutualiste. Dans le même temps, cette espèce peut également se déplacer le long d'un second axe représentant sa dépendance vis-à-vis du partenaire ; un autre continuum depuis une relation facultative jusqu'à une relation obligatoire. Ces deux axes définissent donc un plan dans lequel évolue l'espèce en fonction des conditions environnementales et de leurs variations spatiotemporelles (voir Fig. 4 pour un exemple).

La Théorie de la Mosaïque Géographique de la Coévolution prédit que les résultats d'interactions entre deux espèces données peuvent donner lieu à des trajectoires coévolutives variées en fonction des contextes écologiques dans lesquels évoluent les espèces en interaction (Thompson 2005). Ces différentes trajectoires représentent des déplacements différents des espèces, chacune dans un plan tel que décrit plus haut. Les facteurs pouvant influencer le déplacement d'une espèce et donc le résultat final de l'interaction sont multiples, de même que leurs effets potentiels. Les propriétés physico-chimiques des sols pèsent ainsi sur le bilan net des coûts et bénéfices retirés par une plante lors d'interactions mycorhiziennes (Johnson *et al.* 1997). Le contexte biotique est aussi d'une grande importance pour déterminer l'équilibre de la balance coûts-bénéfices entre partenaires. Par exemple, l'identité de l'hémiptère élevé par la fourmi *Aphomomyrmex afer* influence-t-elle le degré de protection que les fourmis offrent à leur plante-hôte, le coût que paye celle-ci à héberger des fourmis associées à des hémiptères et enfin les facteurs limitant la croissance de la colonie de fourmis (Gaume *et al.* 1998).

La Théorie de la Mosaïque Géographique de la Coévolution peut être étendue à des variations temporelles dans les conditions du milieu. Le changement du niveau de la mer associé au réchauffement climatique joue un rôle considérable dans la stabilité des associations entre communautés de coraux et communautés de zooxanthelles, des algues dinoflagellées (Baker 2001). A hauteur de colonne d'eau constante, les zooxanthelles fournissent des dérivés photosynthétiques et des acides aminés aux coraux et profitent de la production de substances azotées et phosphorées par ces derniers. Mais si le niveau de l'eau vient à monter, l'efficacité photosynthétique des zooxanthelles diminue et les coraux expulsent leur symbiote devenu inefficace. Des travaux récents suggèrent que cette expulsion permettrait aux coraux de se rendre disponibles pour une association avec d'autres dinoflagellés adaptés à des profondeurs plus importantes (Baker 2001; Baird *et al.* 2009). Dans cet exemple, une relation mutualiste obligatoire devient neutre et facultative pour l'hôte du fait de la variation temporelle d'un facteur abiotique.

L'ensemble de ces exemples illustre l'utilité de ne plus considérer les mutualismes comme des relations à bénéfices réciproques mais comme des relations impliquant également des coûts réciproques. Ainsi, la définition la plus large et dynamique qui est acceptée à l'heure actuelle est-elle celle de relations basées sur l'exploitation réciproque entre protagonistes (Herre *et al.* 1999). La somme de ces coûts et bénéfices peut être positive à un moment donné et dans un environnement donné, mais est susceptible de fluctuer, en réponse aux fluctuations de l'environnement. Cependant, la trajectoire évolutive d'une association n'est pas seulement influencée par des facteurs externes, et des modifications de la balance coûts-bénéfices peuvent trouver leur origine au sein même des partenaires en interaction.

3 L'apparente ubiquité des conflits : comment s'en accommoder ?

3.1 Du conflit à la tricherie

La réciprocité veut que les coûts liés à la prestation d'un service soient compensés par les bénéfices retirés de l'association (Fig. 2a). Par conséquent, la sélection naturelle devrait favoriser les individus tricheurs, c'est-à-dire ceux qui sont capables de minimiser leurs coûts et/ou maximiser leurs bénéfices, aux dépens de leur partenaire, transformant ainsi systématiquement toute relation mutualiste en relation parasitaire (Fig. 2b et 2c, Bronstein 2001a). La divergence d'intérêts entre partenaires engagés dans une relation mutualiste peut être simplement formalisée comme un conflit d'allocation des ressources. Il existe deux voies possibles, non exclusives, que peut emprunter un tricheur : la défection et la surexploitation. La défection consiste à profiter du service fourni par le partenaire sans faire preuve de réciprocité. Il s'agit donc d'une stratégie visant à minimiser les coûts (Fig. 2b). La surexploitation consiste à manipuler le partenaire afin d'augmenter son investissement dans la relation. Cette stratégie a donc pour résultat la maximisation des bénéfices pour le tricheur (Fig. 2c).

Deux types de tricheurs peuvent être discriminés, en fonction de leur constance dans la tricherie. Certains organismes peuvent se comporter alternativement comme des mutualistes efficaces qui apportent un important bénéfice net à leur partenaire ou comme des tricheurs, en fonction de leur environnement, tandis que d'autres présentent uniquement le comportement de tricherie. Les premiers sont désignés sous le nom de « tricheurs opportunistes », les seconds sous le nom de « tricheurs professionnels. » Les espèces de tricheurs opportunistes ont souvent un passé mutualiste et sont elles-mêmes engagées dans des relations durables avec d'autres espèces. La plupart du temps, c'est l'identité du partenaire qui va conditionner la stratégie adoptée. C'est ce type de tricheur qui a été modélisé lors l'application du Dilemme du Prisonnier aux interactions biologiques (Axelrod & Hamilton 1981). Les tricheurs professionnels, quant à eux, ont rarement des ancêtres mutualistes. Ils sont parasites de

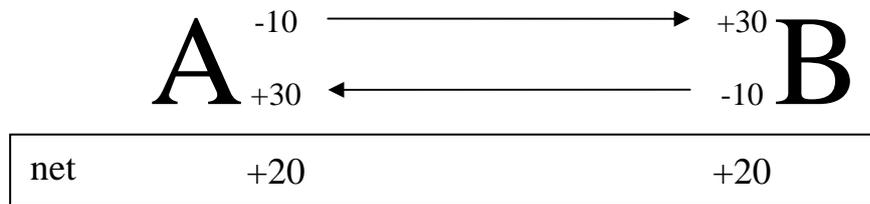
systèmes mutualistes déjà en place et la persistance du système dépend de l'existence d'une autre espèce, celle-ci mutualiste (Debout *et al.* 2009). Cependant, ce type de classification ne permet pas de qualifier de manière claire les espèces au sein desquelles les individus sont soit systématiquement mutualistes, soit systématiquement tricheurs (Bao & Addicott 1998).

Un autre système de classification des tricheurs se base sur leur appartenance ou non à l'une des espèces impliquées dans la relation mutualiste. Si le tricheur appartient à l'une des deux espèces, il sera qualifié d'exploiteur « interne » de la relation. En revanche, s'il s'immisce dans une relation mutualiste déjà existante, il sera désigné sous le terme d'exploiteur « externe ». Cette terminologie recoupe partiellement la précédente : un tricheur opportuniste est un exploitateur interne et un tricheur professionnel est un exploitateur externe, c'est-à-dire un parasite de mutualisme. Cependant, dans le cas litigieux d'individus mutualistes et d'individus tricheurs, conspécifiques, l'application stricte de la définition voudrait que cette espèce soit qualifiée d'exploiteur interne. La pertinence de ce dernier point pourrait néanmoins être remise en cause dans le cas d'entités génétiques distinctes au sein de la même espèce.

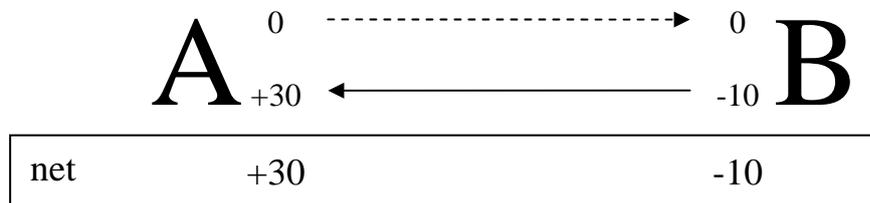
La condition primordiale pour que la fourniture d'un service soit soumise à un conflit est qu'elle fasse appel à un trait coûteux pour le prestataire. Certains services ne sont pas coûteux pour le prestataire car ils dérivent du fonctionnement basal de l'organisme et l'on parle alors de sous-produits (Connor 1995). Ils ne nécessitent donc pas d'investissement susceptible d'être minimisé ou manipulé (Fig. 3a ; Bshary 2010). Le cas opposé concerne la production de ressources uniquement et spécifiquement destinée au partenaire.

La deuxième condition est que les intérêts des partenaires ne soient pas complètement alignés autour de la fourniture de ce service. Si, à l'inverse, la production d'une ressource est positivement corrélée au bénéfice net que reçoit le prestataire en retour, il est de l'intérêt des deux partenaires d'optimiser la production de cette ressource. Cette situation correspond au cadre d'application de la fidélité au partenaire (voir plus loin et Fig. 3b et c).

a) le coût individuel du bénéfice réciproque



b) la tricherie par défection



c) la tricherie par surexploitation

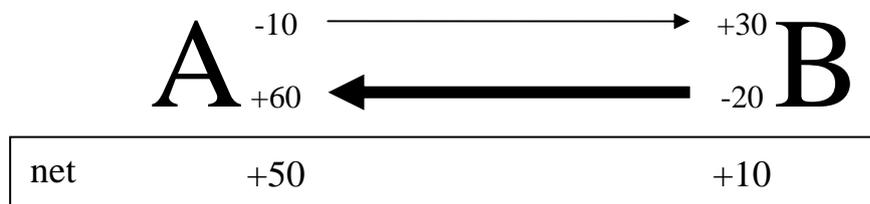


Figure 2 : Coût du mutualisme entre deux organismes (A et B). (a) Le coût individuel du bénéfice réciproque : chaque organisme fournit un service qui lui coûte 10 unités arbitraires, et rapporte 30 unités au partenaire, menant ainsi à un bénéfice net de 20 unités par partenaire. (b) La tricherie par défection : l'organisme A ne fournit pas le service et reçoit un bénéfice net de 30 unités au détriment de l'organisme B qui écope d'un coût net de 10 unités. (c) La tricherie par surexploitation : l'organisme A fournit un service qui lui coûte 10 unités et en rapporte 30 à son partenaire, mais manipule celui-ci de façon à ce qu'il fournisse un service double coûtant à celui-ci 20 unités mais rapportant à l'organisme A 60 unités. L'organisme A perçoit ainsi un bénéfice net de 50 unités tandis que l'organisme B n'en perçoit que 10. Adapté d'après Douglas (2008, 2010).

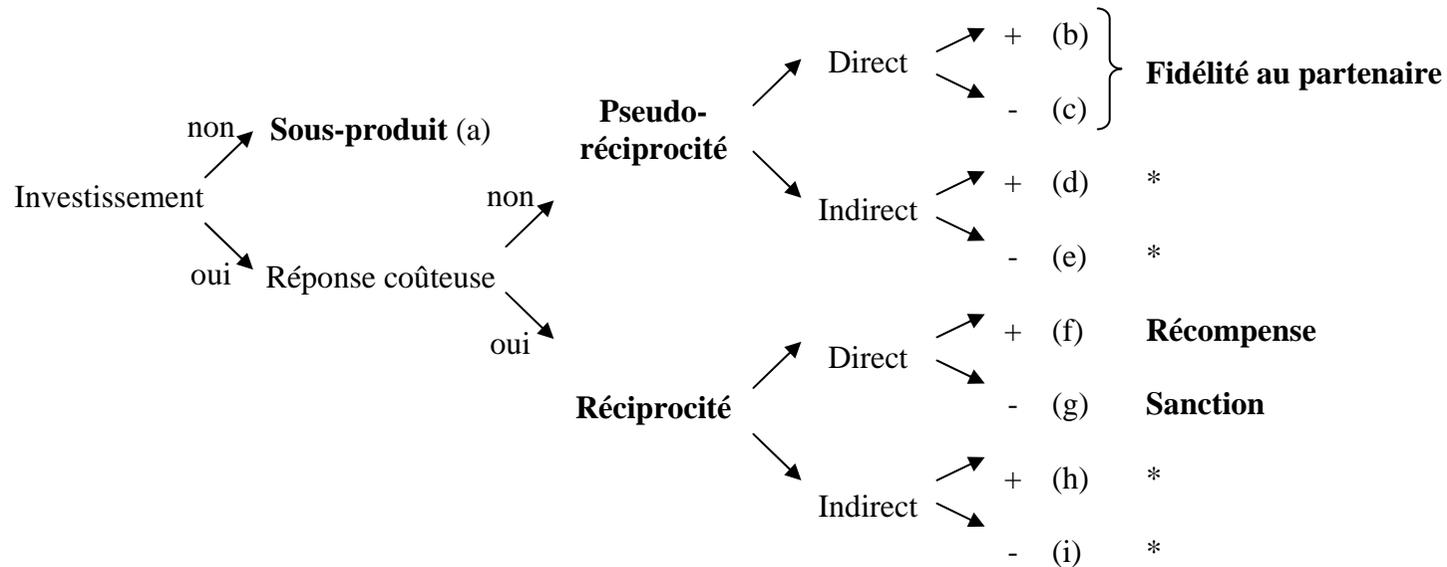


Figure 3 : Les mécanismes de contrôle aidant à maintenir les comportements coopératifs – que l’on parle de mutualisme ou de socialité – peuvent être discriminés de manière dichotomique en répondant à quatre questions successives : (1), existe-t-il un investissement à la base de l’interaction ? (2), la réponse du partenaire est-elle coûteuse ? (3), se fait-elle directement ou par un organisme intermédiaire ? (4), est-elle la récompense d’un comportement coopératif ou la réduction de la rétribution de l’investisseur suite à comportement de tricherie ? Les notions utilisées ici correspondent aux situations suivantes : le **sous-produit** (a), le mutualisme est basé sur un trait non coûteux pour le prestataire ; la **fidélité au partenaire** (b et c), le prestataire tire un bénéfice/paye un coût direct sans que cela ne nécessite d’investissement de la part du receveur ; la **récompense** (f), le prestataire tire un bénéfice de la réponse directe et coûteuse du récepteur à un investissement ; la **sanction** (g), le récepteur sanctionne directement un comportement de tricherie qui représente un investissement de la part du prestataire.

* Seules les situations abordées dans le contexte de l’étude sont mentionnées ici ; pour plus de détails sur les autres situations, dans le contexte des interactions intraspécifiques, voir Bshary (2010)

Adapté d’après Bshary & Bergmüller (2008) et Bshary (2010).

3.2 S'assurer la coopération du partenaire

Face à un partenaire tricheur (ou à un mauvais mutualiste), la solution la plus simple semble être d'interrompre la relation et de tenter sa chance avec un nouveau partenaire (Sachs & Simms 2006). Cependant, cette solution n'est pas toujours envisageable notamment dans le cadre de relations symbiotiques. En effet, en cas d'addiction, c'est-à-dire de dépendance sans bénéfice à la présence du partenaire, le retour à la vie libre ne peut se faire car il nécessite de traverser une importante vallée dans un paysage adaptatif. On peut cependant trouver dans la littérature trois grands types de mécanismes de contrôle permettant de s'assurer la coopération du partenaire ou de s'associer avec un partenaire coopératif. Il s'agit de la fidélité au partenaire, l'existence de sanctions et/ou le choix du partenaire.

3.2.1 La fidélité au partenaire et les modes de transmission de l'association

La fidélité au partenaire est la réponse automatique et non coûteuse que produit le receveur d'un investissement à l'intention du prestataire de cet investissement (Fig. 3b et 3c). Ce mécanisme a été mis en évidence lors d'études visant à expliquer la coopération intraspécifique. Il repose sur la possibilité d'interactions répétées entre les partenaires (Axelrod & Hamilton 1981). Puisqu'il induit une relation positive directe entre les valeurs sélectives des partenaires, il favorise les investissements élevés et n'encourage pas à la tricherie (Weyl *et al.* 2010). Dans le cadre d'interactions interspécifiques, la tricherie peut conduire à la mort du partenaire, imposant ainsi un coup important au tricheur (Bull & Rice 1991). En contre-sélectionnant les individus tricheurs, la fidélité au partenaire mène à la diminution de la virulence des exploiters. En ce sens, on peut considérer qu'elle se manifeste au travers de la reproduction, lorsque les succès reproducteurs des partenaires sont liés par un mode de transmission particulier de l'association. Trois modes de transmission d'une association peuvent être évoqués dans ce contexte : la transmission verticale, la transmission pseudo-verticale et la transmission locale.

La transmission verticale d'une association est un facteur-clé dans la régulation de la tricherie. Premièrement, elle est le moyen le plus efficace de barrer la route à des exploiters externes (Wilkinson & Sherratt 2001). Lorsque la relation est héritée directement des parents, au moment même de la naissance, voire lors de la conception dans le cas des endosymbioses, il n'y a pas de place laissée à un exploiteur externe pour s'insinuer entre les partenaires. Deuxièmement, elle aligne les bénéfices des partenaires dans la reproduction (Herre *et al.*

1999). Si la valeur sélective d'un individu dépend directement de celle de son partenaire, la sélection naturelle promouvra les individus dont l'activité porte le moins atteinte à l'intégrité de leur partenaire, on parle alors d'amélioration. Par conséquent, non seulement la transmission verticale permet le maintien de relations non antagonistes entre associés, mais elle est également génératrice de relations mutualistes à partir de relations parasitaires (Ewald 1987). L'amélioration et l'addiction sont les deux composantes principales de la mise en place de symbioses mutualistes (Fig. 4).

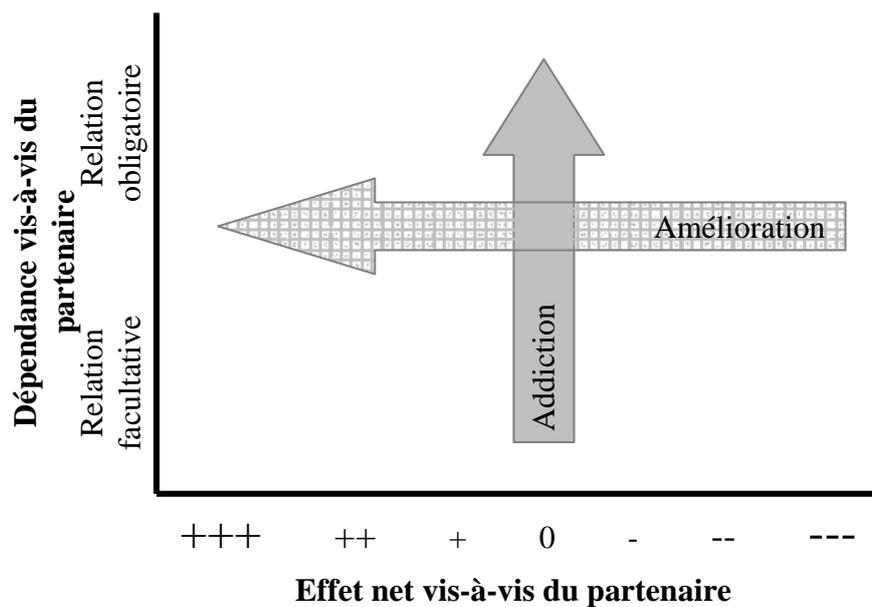


Figure 4 : Plan théorique dans lequel évolue une espèce en interaction avec un partenaire. L'axe des abscisses représente les effets de la présence de cette espèce sur son partenaire sur un continuum variant de très positif (mutualiste) à très négatif (parasite). L'axe des ordonnées représente la dépendance de cette espèce vis-à-vis de son partenaire sur un continuum variant de la relation facultative à la relation obligatoire. Le phénomène d'amélioration entraîne l'augmentation du bénéfice net pour le partenaire, le phénomène d'addiction rend la relation obligatoire pour cette espèce et la combinaison des deux contribue à la mise en place de relations symbiotiques mutualistes.

Bien qu'étant un mode de transmission horizontal, la transmission pseudo-verticale conduit à l'association de lignées de partenaires sur plusieurs générations chez certains couples d'organismes pour lesquels des contraintes physiologiques imposent une asynchronie des épisodes de reproduction. La transmission pseudo-verticale n'est pas une caractéristique intrinsèque du système mais est la résultante de contraintes extérieures (généralement topologiques et/ou géographiques) qui s'exercent de la même façon sur les deux partenaires (Kiers & van der Heijden 2006). Ce mécanisme n'est pas aussi exclusif qu'une transmission

strictement verticale et laisse donc la possibilité à un exploitateur externe de s’immiscer dans l’association.

Enfin, la transmission locale de l’association permet à des individus apparentés d’être associés à des partenaires apparentés. Encore moins stricte que la transmission pseudo-verticale, la transmission locale encourage l’adaptation locale réciproque des partenaires (Thompson 2005). De plus, la ressource « partenaire » est partagée entre individus apparentés comme s’il s’agissait d’un bien public. Le fait de ne pas endommager son partenaire ou sa descendance est donc assimilable à de la coopération avec sa propre famille voire avec ses propres descendants. La sélection va donc favoriser les « familles » les moins virulentes qui échappent ainsi à l’extinction locale résultant de la Tragédie des Communs (Rankin *et al.* 2007).

3.2.2 Les sanctions, les récompenses et la tolérance

Sanctionner un comportement tricheur et récompenser un comportement mutualiste semblent être les solutions les plus évidentes pour encourager la coopération. Les sanctions sont d’ailleurs considérées comme quasiment indispensables au maintien d’une relation mutualiste (Edwards *et al.* 2010). Formellement, une sanction est un mécanisme qui impose un coût en termes de valeur sélective à un partenaire antagoniste (Fig. 3g). A l’inverse une récompense correspond à l’offre d’un surplus de ressources à un partenaire bon mutualiste (Fig. 3f). Ces définitions impliquent que l’un des deux partenaires exerce un contrôle sur l’autre. Il s’agit généralement de l’organisme qui a le moins tendance à tricher, c’est-à-dire celui qui a le plus d’intérêt à conserver l’association ou qui paye le moindre coût ; en somme, celui qui perçoit le bénéfice net le plus important (Douglas 2008).

Les sanctions peuvent être plus ou moins sélectives quant à leur application. Ainsi, les plantes peuvent sanctionner un champignon mycorhizien à différents niveaux : à l’échelle cellulaire, elles peuvent empêcher la colonisation ou réduire l’afflux de nutriments carbonés ; à l’échelle d’un organe, elles peuvent avorter une portion de racine qui contient moins de mutualistes ; à l’échelle de l’organisme, elles peuvent contrôler l’intensité de la colonisation de l’ensemble de leur appareil racinaire par des champignons mycorhiziens (Kiers & van der Heijden 2006). En fonction de l’échelle à laquelle est appliquée la sanction (ou la récompense), son effet sera plus ou moins discriminant au niveau de la communauté de champignons mycorhiziens associés à la plante.

Des études récentes basées sur des modèles informatiques ont montré que, bien que fondamentales, les sanctions ne suffisent pas à elles seules à garantir le maintien d’une

relation mutualiste à une échelle de temps évolutive (Best *et al.* 2009; Weyl *et al.* 2010). En effet, elles sont susceptibles d'entraîner les partenaires dans une course aux armements de type Reine Rouge où le « sanctionné » développera une virulence accrue afin de compenser/surpasser les effets des sanctions. A l'inverse, le mécanisme de tolérance est évolutivement stable. Les stratégies de tolérance correspondent à des mécanismes de réduction des coûts qui permettent à un organisme de surmonter la perte de valeur sélective due à la virulence du partenaire, tout en lui imposant un coût limité, voire nul (Edwards 2009). Ces mécanismes n'alimentent donc pas d'éventuelle course aux armements et ils sont même supposés faciliter la transition de l'état antagoniste à l'état mutualiste (Best *et al.* 2009; Edwards 2009; Oliver *et al.* 2009).

3.2.3 Le choix du partenaire

Le terme de choix du partenaire, issu de la Théorie des Marchés Biologiques, englobe tous les mécanismes visant à empêcher l'association avec un mauvais mutualiste (Noë & Hammerstein 1994). Envisager un mécanisme de choix du partenaire implique de distribuer des rôles asymétriques entre partenaires. Encore une fois, celui qui choisit est celui qui a le plus à perdre à s'associer avec un tricheur. La différence fondamentale entre les mécanismes de choix du partenaire et tous les mécanismes présentés jusqu'à présent est qu'il intervient avant toute possibilité d'exploitation (Bull & Rice 1991). En effet, le but du choix est de minimiser les conflits en s'associant avec le « bon » partenaire.

Le choix du partenaire fait appel à des filtres sélectifs visant à restreindre l'accès à l'hôte (Palmer *et al.* 2003). Les filtres décrits dans la littérature peuvent être de nature physique, moléculaire ou autre. On peut penser par exemple à l'adéquation entre la taille et la forme de certaines espèces de fourmis et l'entrée de loges mises à disposition par une espèce de plante décrite par Brouat *et al.* (2001), ou encore à la voie de signalisation SYM permettant à certaines plantes d'établir des relations mycorhiziennes avec la bactérie *Frankia* (Gherbi *et al.* 2008). Ces filtres impliquent une coévolution étroite entre partenaires permettant ainsi d'ajuster correctement le choix.

3.3 Approche synthétique du maintien de la coopération

Si l'on considère toujours que chaque espèce évolue dans un plan défini par un axe représentant la dépendance de l'espèce vis-à-vis de son partenaire et un axe représentant l'effet net de la relation pour son partenaire, alors on peut considérer que chaque couple

d'espèces en interaction évolue dans un hypervolume à quatre dimensions défini par deux paires d'axes telles que décrites plus haut. Ces deux paires d'axes définissent donc six plans différents. Par exemple, le plan défini par les axes représentant les effets de l'association pour chaque partenaire est celui dans lequel est contenue la grille de la Figure 1. Le plan dans lequel se déroule la majorité des phénomènes abordés ici est défini par l'axe représentant la dépendance d'un partenaire A vis-à-vis du tricheur potentiel B et l'axe représentant l'effet pour A de l'association avec le tricheur potentiel B (Fig. 5). Les phénomènes de défection et de surexploitation tendent à déplacer le couple le long de l'axe X, d'un effet net positif vers un effet net négatif pour A (flèche 1). Les mécanismes de contrôle en revanche visent à empêcher ce déplacement ou, dans le cas d'amélioration, à déplacer la relation le long de l'axe X, d'un effet net négatif vers un effet net positif pour A (flèche 2 ou 3).

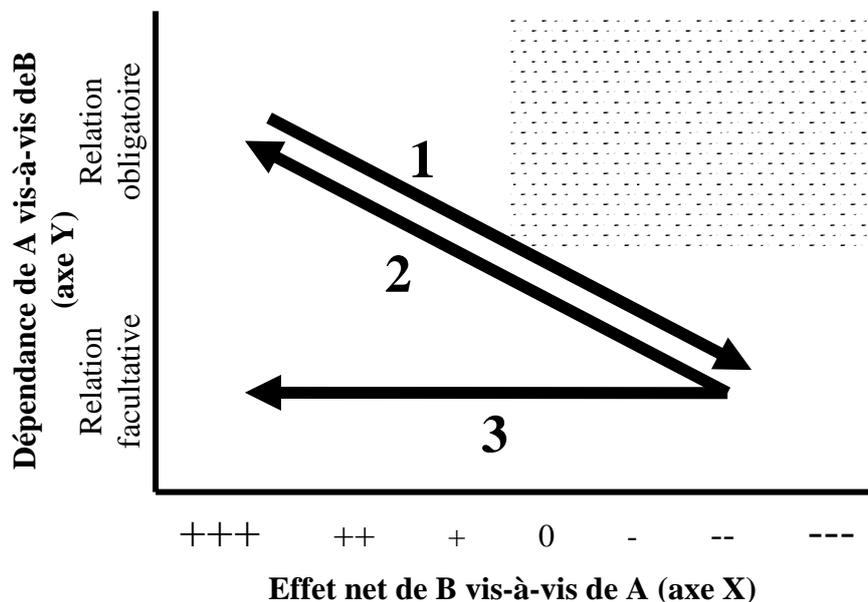


Figure 5 : Plan théorique dans lequel évolue l'association entre l'organisme A et le tricheur potentiel B, défini par l'axe représentant la dépendance de A vis-à-vis de B et l'axe représentant l'effet pour A de l'association avec B. La région hachurée correspond à une région du plan qui n'a pas de sens. En effet, une relation obligatoire pour A est définie comme une relation sans laquelle A aurait une valeur sélective nulle ou quasi-nulle. Dans ce cadre-là, l'effet de la relation pour A ne peut être que positif. La flèche 1 représente la trajectoire suivie par l'association dans le cas de tricherie par B. Les flèches 2 et 3 représentent les trajectoires potentielles suivies par l'association des suites de l'application de mécanismes de contrôle en faveur de A.

Chacun de ces mécanismes favorise le maintien de la coopération au sein des relations mutualistes. Ils interviennent à des moments différents de la relation. Le choix du partenaire intervient au moment même de l'établissement de la relation, tandis que les mécanismes de

fidélité au partenaire ou de sanction/récompense se manifestent pendant la relation, parfois après exploitation de la relation par un tricheur. Par ailleurs, les coûts pour chacun des partenaires ainsi que leur efficacité à entretenir la relation à long terme varient. Si la plupart de ces mécanismes n'a reçu que récemment une définition formelle, ils ont en grande majorité été éprouvés isolément à la fois *in vivo* et *in silico* et les importances relatives de quelques uns d'entre eux ont parfois été comparées. Il n'existe cependant que de très rares études de terrain qui établissent formellement les coûts et bénéfices de chacun des partenaires en fonction de chacune des hypothèses correspondant à ces mécanismes. Les modèles les plus adaptés à ce type d'études sont les symbioses mycorhiziennes et les symbioses plantes-fourmis.

4 Les mutualismes plantes-fourmis : l'intérêt du modèle réside dans sa diversité

4.1 Historique des interactions plantes-fourmis

Fourmis et angiospermes sont ubiquistes. L'apparition et la diversification des angiospermes datent du Crétacé, il y a 90 à 130 millions d'années (Crane *et al.* 1995). Elle est supposée avoir fortement influencé et conditionné l'évolution des insectes et notamment des hyménoptères, le groupe d'insectes le plus représenté parmi les insectes pollinisateurs. Les fourmis (Formicidae) quant à elles sont apparues il y a 140 à 168 millions d'années mais leur diversification s'est produite plus tard, il y a environ 100 millions d'années (Moreau *et al.* 2006). Les histoires de ces deux groupes apparaissent liées et certains auteurs n'hésitent pas à considérer que l'apparition des angiospermes a favorisé la diversification des fourmis (Wilson & Hölldobler 2005; Moreau *et al.* 2006). La facilitation de la diversification des fourmis par celle des angiospermes provient de la mise à disposition de nouvelles niches écologiques caractérisées par des ressources alimentaires nouvelles soit constituées directement de substances végétales (nectar, pollen, etc.), soit associées aux végétaux comme le miellat produit par certains insectes phytophages ou bien ces phytophages eux-mêmes, voire des écosystèmes nouveaux liés à la vie arboricole ou à la présence de litière (Wilson & Hölldobler 2005).

Aujourd'hui, plantes et fourmis entretiennent un large éventail d'interactions. S'il existe seulement deux exemples d'interactions antagonistes entre plantes et fourmis : la défoliation due à l'activité des fourmis coupeuses de feuilles et la prédation par les fourmis granivores (Rico-Gray & Oliveira 2007), les relations dont le résultat est bénéfique pour les deux partenaires sont beaucoup plus diversifiées.

4.2 Les services échangés

Les interactions mutualistes entre plantes et fourmis se concentrent autour de quatre principaux effets positifs pour les plantes associées : la dispersion des graines, la protection

contre les phytophages, la nutrition et de manière anecdotique, la pollinisation. Dans la suite du manuscrit, une plante entretenant des relations positives avec des fourmis sera qualifiée de myrmécophile.

4.2.1 La pollinisation

Il existe très peu de systèmes dans lesquels les fourmis jouent le rôle de pollinisateurs. De nombreuses raisons ont été avancées pour expliquer la rareté de ce type de fonction chez les fourmis. La plus plausible fait référence aux dommages causés aux grains de pollen par les substances antibiotiques sécrétées par les glandes métapleurales des fourmis. Ces antibiotiques ont un rôle prophylactique notamment lié au fait que les œufs et larves de fourmis sont déposés au contact du sol à l'intérieur du nid, exposés à de nombreuses infections fongiques ou bactériennes, contrairement aux abeilles et aux bourdons (Beattie *et al.* 1984).

4.2.2 La dissémination

Le phénomène de dispersion des graines par les fourmis est tellement répandu qu'il existe un mot pour le décrire : on parle de myrmécochorie. Les fourmis peuvent jouer le rôle de disperseurs primaires ou secondaires. Dans les deux cas, elles en retirent un bénéfice alimentaire via des structures présentes sur les graines, dédiées à la dispersion, destinées ou non directement aux fourmis (Lanza *et al.* 1992). Victor Rico-Gray & Paulo S. Oliveira (2007) ont dressé une liste des avantages pour une plante à voir ses graines dispersées par des fourmis. Ils recensent ainsi la protection contre les prédateurs et les incendies, l'évitement de la compétition interspécifique et entre apparentés, le dépôt des graines dans l'environnement du nid généralement riche en nutriment et la dispersion *per se*.

4.2.3 La nutrition

La nutrition de la plante hôte par les fourmis est un raffinement dérivé des mutualismes de protection (voir plus loin). Ce phénomène est appelé myrmécotrophie. Il découle de la capacité des plantes à absorber des nutriments provenant des déchets produits par les fourmis et stockés au contact des tissus de la plante (Janzen 1974; Solano & Dejean 2004). Il existe par ailleurs des relations basées sur la myrmécotrophie au cours desquelles les plantes profitent également d'un service de dispersion de la part des fourmis. Il s'agit des jardins de fourmis. Les espèces de plantes sont aussi diverses que les espèces de fourmis impliquées.

Les fourmis récoltent les graines de plantes épiphytes et les placent dans des lieux propices à leur germination. Puis elles construisent leur nid en carton entre les racines de ces plantes qui servent de soutènement. Les plantes profitent ainsi d'un substrat collecté par les fourmis, ainsi que de leur protection. Elles peuvent elles-mêmes fournir aux fourmis une ou plusieurs des ressources décrites précédemment (Orivel & Leroy 2010).

4.2.4 La protection

Les mutualismes de protection comptent parmi les interactions les plus riches et complexes entre plantes et fourmis. Ce sont historiquement les premiers à avoir reçu l'attention des biologistes et ils sont à l'origine de l'intérêt que porte la communauté scientifique aux relations mutualistes depuis une cinquantaine d'années (Janzen 1966, 1972; Bronstein 1998). Ils reposent tous sur un schéma commun : les fourmis patrouillent à la surface de la plante à la recherche d'une ressource (mise ou non à leur disposition par la plante elle-même) et ce faisant interfèrent avec les organismes antagonistes de la plante. Ce type d'interaction peut aussi bien être facultatif qu'obligatoire, et ce pour les deux partenaires (Heil & McKey 2003).

Le nectar extra-floral est l'une des ressources qui peut être produite pour des fourmis par une plante afin de s'assurer leur protection (Blüthgen *et al.* 2000). Il s'agit de substances riches en sucres et/ou acides aminés, distinctes du nectar destiné aux pollinisateurs. Elles sont produites par des structures glandulaires dont la position sur la plante est extrêmement variée (Elias 1983). Une même espèce de plante peut être visitée par un grand nombre d'espèces de fourmis dont la stratégie opportuniste les amène à récolter son nectar extra-floral (Rico-Gray & Oliveira 2007). Ainsi, les relations entre plantes et fourmis basées uniquement sur cette ressource sont-elles principalement des interactions facultatives.

La protection d'une plante par des fourmis peut être générée par la présence d'un troisième partenaire dit trophobionte. Celui-ci est en général un hémiptère parasite de la plante et producteur de miellat. Les fourmis récoltent ce miellat et protègent les hémiptères contre leurs ennemis naturels. Bien que la présence des hémiptères soit délétère pour la plante, elle lui confère la plupart du temps une protection efficace contre les phytophages (Blüthgen *et al.* 2000).

Les plantes qui entretiennent des relations obligatoires et spécialisées avec des fourmis mettent à disposition de leur partenaire des ressources parfois très complexes. Ainsi, la composition du nectar extra-floral de certaines d'entre elles est-elle adaptée au régime alimentaire de ses fourmis, et sa sécrétion maximisée sur les organes les plus sensibles et

induite par des blessures sur les feuilles (Heil *et al.* 2000). Les corps nourriciers sont un autre type de produits végétaux spécifiquement destinés aux fourmis (Beattie 1985). Ce sont des structures épidermiques riches en lipides, protéines et/ou sucres complexes tels que le glycogène, dont la composition est elle aussi adaptée au régime alimentaire des fourmis associées (Rico-Gray & Oliveira 2007).

L'exemple le plus frappant de ressources végétales spécifiquement produites pour les fourmis est le logis par des plantes dites myrmécophytes. En effet, certaines plantes possèdent des organes creux appelés domaties (tiges, pétioles, épines ou poches foliaires) dans lesquelles peuvent nicher les fourmis (Davidson & McKey 1993). Ces structures sont produites par la plante, même en l'absence de fourmis (mais voir Blüthgen & Wesenberg 2001). La présence de domaties est souvent associée à la production de ressources d'ordre alimentaire.

Lorsqu'une plante fournit elle-même une ou plusieurs ressources destinées exclusivement aux fourmis, la protection qu'elle reçoit de la part des fourmis n'est plus forcément un sous-produit de leurs activités de fourragement mais peut être parfois envisagée comme un investissement dirigé. C'est souvent le cas lorsque les fourmis ont développé une addiction forte vis-à-vis de leur plante-hôte ne pouvant ainsi boucler leur cycle de vie sans la ressource apportée par celle-ci. Cet investissement peut alors se manifester sous la forme de comportements de nettoyage où les fourmis débarrassent la surface de la plante de tout objet étranger (débris provenant de la canopée, organismes épiphylls, etc.). Dans les cas les plus extrêmes, certaines fourmis peuvent aller jusqu'à détruire systématiquement toutes les plantes proches susceptibles d'entrer en compétition avec leur hôte, créant ainsi des clairières monospécifiques appelées « jardin du diable » (Frederickson *et al.* 2005).

4.3 Intérêt des relations plantes-fourmis pour l'étude des mutualismes

Comme dans tout type de relation mutualiste, on peut distinguer des tricheurs par défection qui ne fournissent pas de service et des tricheurs sur-exploiteurs. Dans le cadre des mutualismes de protection, les tricheurs par défection sont des tricheurs professionnels et donc des exploiters externes d'associations mutualistes en place. Il y a donc coexistence du mutualiste et du tricheur en sympatrie sur la même espèce de plante-hôte (Gaume & McKey 1999).

Les sur-exploiteurs représentent un cas plus complexe. Le comportement castrateur de la plante-hôte par les fourmis associées a été décrit plusieurs fois (Yu & Pierce 1998; Izzo & Vasconcelos 2002; Gaume *et al.* 2005). Ce comportement trouve son origine dans la réallocation de l'énergie prévue pour la floraison vers la croissance de la plante (Frederickson 2009). Il s'agit donc d'un cas de castration parasitaire (Kover 2000). Or, les fourmis associées à ce comportement fournissent tout de même un service de protection à leur plante-hôte, ce qui rend la balance des coûts et bénéfices moins instable. Dans certains systèmes, le maintien de la relation entre la plante et ces fourmis castratrices est permis par l'existence d'une autre espèce de fourmis, vraie mutualiste, qui ne castré pas la plante et lui permet donc de se reproduire (Debout *et al.* 2009). L'espèce de fourmis castratrice est donc ici aussi un exploiteur externe du système. Dans d'autres systèmes, la relation est maintenue parce que la présence de la fourmi n'est pas obligatoire ou parce que la castration de la plante n'est pas systématique (Izzo & Vasconcelos 2002; Gaume *et al.* 2005).

La question du maintien des relations mutualistes entre plantes et fourmis peut donc être abordée sous différents aspects ; du fait de la grande diversité d'interactions qu'elles arborent, les associations plantes-fourmis représentent des modèles de choix pour l'étude des mutualismes (Bronstein 1998; Heil & McKey 2003). Ainsi, on peut observer des relations facultatives à obligatoires, mutualistes à antagonistes, mettant en jeu une grande variété de traits morphologiques, physiologiques ou de traits d'histoire de vie. A une espèce de plante myrmécophyte est rarement associée une seule espèce de fourmi et vice-versa. De ce fait, il est possible de comparer les bénéfices et les coûts au sein de différentes relations qu'une espèce peut établir avec ses partenaires potentiels (Yu & Pierce 1998; Debout *et al.* 2009). Il est également possible de retracer l'histoire de l'apparition ou de la perte du caractère mutualiste au cours de l'histoire évolutive de certains groupes (Blattner *et al.* 2001). Enfin, la diversité dans les acteurs et les interactions offerte par les associations plantes-fourmis permet de généraliser les résultats obtenus à d'autres systèmes d'interactions.

Nous avons décidé d'examiner la question du maintien d'un mutualisme de protection malgré la présence potentielle d'exploiteurs internes de la relation. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur deux espèces en interaction, présentes dans le sous-bois guyanais : la fourmi arboricole *A. decemarticulatus* et sa plante-hôte myrmécophyte *H. physophora*.

5 Modèles et sites d'étude

5.1 *Hirtella physophora*, la plante (encadré 1)

Le genre *Hirtella* appartient à l'ordre des Malpighiales et à la famille des Chrysobalanaceae. La majorité des espèces du genre se trouve en Amérique du Sud : sur les 107 espèces décrites, seulement deux se développent en Afrique et à Madagascar (Prance & Sothers 2003). Ce sont en général des arbustes de sous-bois. Au sein du genre, la section *Myrmecophila* est différenciée sur la seule présence de domaties foliaires et regroupe les sept espèces d'*Hirtella* myrmécophytes, toutes néotropicales (Prance & White 1988).

Parmi elles, se trouve *Hirtella physophora* Mart. & Zucc. (Chrysobalanaceae), un arbuste myrmécophyte du sous-bois amazonien. Son aire de répartition est remarquablement vaste puisque sa présence est notée depuis le plateau des Guyanes jusqu'au Pérou, et du Venezuela jusqu'au Brésil (Prance & Sothers 2003). *Hirtella physophora* est la seule Chrysobalanaceae myrmécophyte recensée en Guyane française (Funk *et al.* 2007). Les populations d'*H. physophora* sont constituées d'individus répartis en patches au sommet des collines. Entre les patches se trouvent des zones plus humides, où ne pousse aucun *H. physophora* (Solano *et al.* 2003).

Hirtella physophora présente des feuilles oblongues portant une paire de domaties foliaires issues de l'enroulement de la partie proximale du limbe (Leroy *et al.* 2008). Ces domaties sont des structures complexes qui diffèrent considérablement du limbe d'un point de vue morpho-anatomique. Elles sont mises en place très tôt dans la vie des *H. physophora* (Leroy *et al.* 2010). Par ailleurs, leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles sont extrêmement proches de celles des domaties foliaires des Melastomataceae myrmécophytes sympatriques. Cette similarité résulte certainement d'une convergence entre espèces phylogénétiquement distantes, dues à l'importance d'une pression de sélection partagée : la présence de fourmis (Leroy *et al.* 2010).

Une trentaine de nectaires extra-floraux sont répartis le long de lignes submarginales sur la face inférieure des feuilles, puis à l'intérieur des domaties le long d'une spirale, dans la continuité de l'alignement du limbe. Les nectaires qui se trouvent à l'intérieur des domaties

sont trois fois plus grands que ceux du limbe (Leroy *et al.* 2008). L'intégralité de la plante est couverte de trichomes. La protection des plants d'*H. physophora* repose exclusivement sur l'activité de ses fourmis associées. La plante ne semble en effet pas posséder de protection chimique puisqu'elle souffre d'important dégâts liés à la phytophagie en absence de fourmis (Grangier *et al.* 2008).

Hirtella physophora connaît deux périodes principales de reproduction par an : de décembre à février et de juin à septembre. Ces périodes alternent avec des périodes de croissance végétative (Grangier 2008). La plante possède de petites fleurs de couleur blanche à rose pâle, regroupées en inflorescences fasciculées. Elle produit des drupes, elles aussi de petite taille, de couleur pourpre à noire. Rien n'est connu de la reproduction d'*H. physophora*. Toutefois, les syndromes de pollinisation et de dispersion laissent penser que la plante dépend de papillons nocturnes pour la dispersion du pollen et d'oiseaux pour la dispersion des graines (Prance & White 1988).

En tant qu'espèce myrmécophyte, *H. physophora* est associé avec des fourmis de manière obligatoire. Sa survie dépend étroitement de la présence d'une colonie de fourmis en l'absence de laquelle les dégâts résultant de la phytophagie peuvent lui être fatals. Chaque individu héberge une et une seule colonie de fourmis mature à la fois. Cinq espèces de fourmis ont été recensées comme des habitantes régulières des *H. physophora*. Parmi elles, trois espèces appartiennent au genre *Allomerus* (Izzo & Vasconcelos 2002; Solano *et al.* 2003; Romero & Izzo 2004; Bruna *et al.* 2005; Fernandez 2007; Grangier *et al.* 2009). Jusqu'à présent, en Guyane française, *H. physophora* n'a été observée qu'en association avec *A. decemarticulatus* (Solano *et al.* 2003; mais voir Grangier *et al.* 2009).

Encadré 1 : *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae)



Un plant d'*H. physophora* de taille moyenne tels qu'on peut les observer en forêt guyanaise.



Une inflorescence en fleurs et en boutons (ci-dessus) et un fruit (ci-dessous).



Une paire de domaties (en haut) et des gouttes de nectar accumulées au niveau des nectaires extra-floraux d'une plante inoccupée (en bas).

5.2 *Allomerus decemarticulatus*, la fourmi (encadré 2)

Allomerus decemarticulatus Mayr (Myrmicinae) est l'associé le plus souvent répertorié d'*H. physophora*. Le genre *Allomerus* appartient à la sous-famille des Myrmicinae et à la tribu des Solenopsidini. Les huit espèces qui le composent sont toutes exclusivement arboricoles. Son étude taxonomique est particulièrement complexe et l'homogénéité phylogénétique de certaines de ces espèces reste pour l'instant incertaine (Fernandez 2007). L'un des critères principaux de détermination des espèces d'*Allomerus* repose sur le nombre d'articles que comptent les antennes des ouvrières (d'où le nom attribué à certaines de ces espèces).

L'espèce *A. decemarticulatus* (qui présente donc des antennes à 10 articles) n'est connue que de quelques échantillons récoltés en Guyane française et au Brésil. Elle est principalement associée à des plantes du genre *Hirtella* mais a été aussi observée, de manière anecdotique, sur des Rubiaceae et des Melastomataceae (Fernandez 2007). Ces dernières observations sont toutefois sujettes à caution, entre autres du fait de la similitude entre *A. decemarticulatus* et *A. brevipilosus*.

Les colonies d'*A. decemarticulatus* sont monogynes (Grangier *et al.* 2009). On ne trouve qu'une seule colonie mature par plant d'*H. physophora*. Les ouvrières fourragent exclusivement à la surface de leur plante hôte qu'elles ne quittent absolument jamais. Elles récoltent le nectar extra-floral produit par *H. physophora* au niveau des domaties et du limbe. Ce nectar est vraisemblablement leur source principale de carbohydrates. Par ailleurs, elles patrouillent à la surface de l'intégralité de leur plante-hôte. Ce faisant, elles la protègent contre les phytophages en capturant tout insecte qui s'y aventure. Ce comportement de prédation est différent en fonction de l'organe sur lequel il est exercé (tige ou feuille).

Le long des tiges, les ouvrières construisent des galeries qu'elles utilisent comme piège pour capturer des proies. Elles agencent des voies dégagées, le long de la face inférieure des tiges en y coupant les trichomes de la plante. Elles arrangent ensuite ces trichomes de manière à former des tunnels dont les piliers de soutènement sont constitués par les trichomes intacts qui bordent les voies. L'intégralité de la structure est consolidée par le mycélium d'un champignon Ascomycète, potentiellement manipulé à cet effet par les fourmis. Les parois de ces tunnels restent toutefois percées de nombreuses fenêtres dans lesquelles des ouvrières se tiennent en embuscade, mandibules ouvertes dirigées vers l'extérieur. Un intrus posant une patte à proximité d'une de ces fenêtres se trouve immédiatement saisi, immobilisé contre le piège par plusieurs ouvrières, paralysé par de multiples piqûres et ramené aux domaties les plus proches afin d'y être consommé (Dejean *et al.* 2005). Cette stratégie d'affût permet aux

fourmis de capturer des proies de taille considérable et ainsi de subvenir à une partie de leurs besoins en substances azotées.

Sur les feuilles, le comportement de chasse est caractérisé par des patrouilles dont l'intensité varie au cours de la journée (Dejean *et al.* 2001). Conformément à la Théorie de la Défense Optimale qui prédit que les organes les plus sensibles et précieux doivent être les mieux protégés, le nombre d'ouvrières en patrouille est extrêmement élevé sur les très jeunes feuilles puis diminue avec l'âge de la feuille (McKey 1974). En plus de ce niveau basal de protection contre les phytophages, *H. physophora* dispose d'un mécanisme de défense inductible puisque les ouvrières d'*A. decemarticulatus* répondent à la découverte de blessures infligées au limbe des feuilles par un recrutement massif sur le lieu de ces blessures (Grangier *et al.* 2008). Tout insecte découvert lors des patrouilles ou des épisodes de recrutement sera lui aussi attaqué, capturé, piqué, immobilisé et ramené aux domaties, à moins qu'il ne réussisse à s'échapper, abandonnant parfois derrière lui une patte par autotomie (Dejean *et al.* 2001). Cette stratégie de patrouille autorise également un apport en substances azotées pour les fourmis.

En résumé, une colonie d'*A. decemarticulatus* trouve l'ensemble des ressources que nécessitent sa survie, son développement et sa reproduction sur la plante *H. physophora*. Ainsi, le seul moment du cycle de vie d'*A. decemarticulatus* où elle quitte la plante-hôte est le moment de la production où les femelles ailées partent à la recherche d'un nouvel *H. physophora* à coloniser. La reproduction d'*A. decemarticulatus* ne comporte vraisemblablement pas d'essaimage (Grangier 2008). La production et l'envol continu des sexués, tout au long de l'année est en effet une stratégie qui permet une colonisation rapide des plants d'*H. physophora* disponibles (Grangier *et al.* 2009).

Encadré 2 : *Allomerus decemarticulatus* (Myrmicinae)



Les ouvrières d'*A. decemarticulatus* mesurent un peu moins de 2 mm de long.



Elles patrouillent sur l'intégralité de la plante : les jeunes feuilles (en haut à droite), les feuilles complètement déroulées (à gauche) et les fleurs (en bas à droite)



Lorsqu'un intrus est découvert, leur comportement de recrutement leur permet de le capturer même s'il est beaucoup plus volumineux qu'elles, qu'il se trouve sur les feuilles...



... ou sur le piège qu'elles construisent le long des tiges.

5.3 Quels sont les services autour desquels peut naître un conflit ?

Rappelons qu'il existe deux conditions pour que la fourniture d'un service soit soumise à un conflit : il faut qu'elle fasse appel à un trait coûteux pour le prestataire et les intérêts des partenaires ne doivent pas être complètement alignés autour de la fourniture de ce service. Partant de ces postulats, examinons maintenant les services échangés dans le cadre de l'association entre *A. decemarticulatus* et *H. physophora*.

5.3.1 La protection de la plante par les fourmis

Les patrouilles des feuilles peuvent théoriquement représenter un coût pour *A. decemarticulatus*. En effet, les ouvrières occupées à patrouiller ne remplissent pendant ce temps-là pas d'autres tâches telles que le soin au couvain ou l'entretien du piège. Or, il a été démontré qu'une faible fraction des ouvrières d'une colonie d'*A. decemarticulatus* participe aux patrouilles (moins de 5% ; Grangier 2008). De plus, le comportement de patrouille et de recrutement en cas de découverte d'une proie que montrent les *A. decemarticulatus* est comparable à un comportement de fourrage caractéristique d'une espèce de fourmis non arboricole. Il apparaît donc que le service de protection apporté à *H. physophora* n'est pas ou peu coûteux pour les fourmis et ne représente pas un investissement dirigé vers la plante-hôte.

De plus, la protection de la plante-hôte est également comparable à la protection du territoire chez d'autres espèces, que ce territoire se résume ou non à la surface d'une plante-hôte. Ainsi, toute diminution des patrouilles aurait des conséquences négatives pour le nid des fourmis (Grangier *et al.* 2008). Enfin, le service de protection qui est fourni à *H. physophora* est optimal, c'est-à-dire que les parties les plus vulnérables de la plante sont celles qui sont les mieux protégées et en présence des fourmis, la plante ne subit pas ou peu de dommages liés à la phytophagie (McKey 1974; Grangier *et al.* 2008). La plante n'a donc quasiment aucun intérêt à manipuler ses fourmis associées afin que celles-ci intensifient leurs patrouilles.

En résumé, du fait que les comportements qui mènent à la protection de la plante-hôte reposent sur un sous-produit des activités de chasse et d'entretien du nid que montrent beaucoup d'espèces de fourmis, arboricoles ou non, et du fait que les intérêts des partenaires sont liés dans le maintien de l'intégrité physique de la plante-hôte, le service de protection ne peut pas être donné lieu à des phénomènes de tricherie et donc être l'objet de conflits d'allocation des ressources.

5.3.2 La fourniture du couvert et du logis par la plante-hôte

La plante *H. physophora* fournit deux services à ses associées : le logement et un complément de ressources alimentaires. La production de nectar extrafloral, probablement riche en sucres et/ou acides aminés, représente un investissement pour la plante, bien que celui-ci soit impossible à évaluer dans l'état actuel de nos connaissances. De même, les domaties étant constitués de tissus spécialisés, différenciés et aux capacités photosynthétiques réduites, leur mise en place au cours de l'ontogénie de la plante est indiscutablement coûteuse (Leroy *et al.* 2008; Leroy *et al.* 2010). De plus, les domaties et le nectar extrafloral sont réservés à l'usage quasi-exclusif des fourmis *A. decemarticulatus*.

La diminution de son investissement dans la production de nectaires extrafloraux et de domaties permettrait ainsi de diminuer les coûts de l'association pour la plante, la plaçant ainsi en position de tricheur par défection. Or, une diminution des ressources alimentaires des fourmis est susceptible de se traduire à plus ou moins court terme par une diminution de leur nombre et de leur activité et donc par une diminution de la protection qu'elles apportent à leur plante-hôte. De même, la production de feuilles dépourvues de domaties aurait pour conséquence l'amointrissement de la protection de telles feuilles, puisque, en cas de découverte d'une blessure ou d'une proie sur une feuille, les ouvrières recrutées proviennent des domaties mêmes de la feuille attaquée (Grangier *et al.* 2008). Un phénomène de fidélité au partenaire empêche donc *H. physophora* de tricher par défection.

Les domaties et le nectar extrafloral représentent des ressources-clés pour les fourmis *A. decemarticulatus*. Le logement du couvain nécessite des domaties disponibles et le nectar extrafloral est potentiellement la source la plus importante de carbohydrates dont elles disposent. Recevoir plus de ressources alimentaires et plus d'espace afin de loger et entretenir un plus grand nombre d'ouvrières et potentiellement un plus grand nombre de reproducteurs paraît donc particulièrement intéressant pour les fourmis. Selon cette hypothèse, les fourmis *A. decemarticulatus* auraient donc tout intérêt à devenir tricheuses par surexploitation de leur plante-hôte.

5.4 La zone d'étude : la Guyane française

La Guyane française est un département d'outre-mer situé sur la côte ouest de l'Amérique du Sud. Elle partage des frontières avec le Brésil au sud et le Surinam au nord-ouest. Située à proximité de l'équateur, les températures et le taux d'humidité y sont élevés toute l'année (26.5°C en moyenne et de 80 à 90% respectivement). On peut toutefois

distinguer deux saisons sèches (au mois de mars et de septembre à octobre) alternant avec deux saisons des pluies (d'avril à août et de novembre à février).

Le plateau des Guyanes présente une richesse spécifique extraordinairement élevée. Il compte par exemple plus de 13000 espèces de plantes vasculaires, dont plus de 5000 recensées en Guyane française (Funk *et al.* 2007). Seulement 2% de ces espèces sont des espèces introduites, témoignant ainsi de l'intégrité de la couverture végétale dans cette région. En Guyane française, la forêt primaire couvre en effet plus de 90% du territoire.

Les travaux présentés dans ce document ont été menés dans cinq localités de Guyane française, regroupant au total 14 collines (Fig. 6). La végétation de l'ensemble de ces localités est caractéristique des zones de forêt primaire guyanaise. (1) La région de Petit-Saut, la plus à l'ouest, se trouve à proximité du fleuve Sinnamary. La construction d'un barrage hydroélectrique à la fin des années 80 y a concouru avec l'établissement sur place du Laboratoire Environnement HYDRECO, offrant ainsi une base avancée pour des études longues menées sur les collines alentours. (2) La Montagne des Singes, plus proche de Kourou, est une région plus touristique car elle offre, à l'issue d'un sentier de promenade, une vision panoramique sur la canopée. (3) Entre Kourou et Cayenne, le Bagne des Annamites est ainsi nommé car il abritait des prisonniers politiques indochinois dans les années 30. C'est également un lieu touristique, quoique bien moins fréquenté. (4) Les Chutes de Fourgassié représentent l'une des régions de forêt primaire les plus à l'est de la zone côtière. Elles se trouvent à proximité des Marais de Kaw. Enfin (5), la Station Scientifique des Nouragues est la zone la plus au sud où nous avons travaillé. Elle se trouve au cœur de la réserve naturelle des Nouragues, au pied d'une formation granitique appelée inselberg. Elle compte deux collines, présentant des configurations géologiques différentes, séparées par une faille dans laquelle coule un petit cours d'eau.



Figure 6 : Carte des localités échantillonnées.

6 Objectifs de l'étude

L'objectif principal de cette étude est de comprendre comment un mutualisme obligatoire et spécifique peut perdurer malgré l'existence supposée de conflits entre les partenaires. Le modèle *H. physophora* / *A. decemarticulatus* est particulièrement adapté à cet objectif. La relation montre un très fort degré de spécificité qui empêche vraisemblablement les partenaires de revenir à la vie libre en cas d'association avec un mauvais mutualiste. La présence de domaties et de nectaires extra-floraux, et l'absence de protection chimique du feuillage sont les indices chez *H. physophora* d'une longue histoire partagée avec des fourmis. De même, l'utilisation des trichomes, des nectaires extra-floraux et des domaties indiquent une mise en place ancienne de la vie arboricole chez *A. decemarticulatus*. Ces hypothèses sont par ailleurs étayées par la présence au sein des genres *Hirtella* et *Allomerus* d'espèces aux caractéristiques similaires. Une si longue histoire commune est vraisemblablement l'indice soit de l'absence totale et peu probable de conflits entre partenaires, soit de l'existence de mécanismes de contrôles des conflits.

Nous l'avons vu, les mécanismes de contrôle des conflits, empêchant une relation mutualiste de dériver vers une relation parasitaire peuvent être regroupés en trois grands ensembles : les sanctions et récompenses, la fidélité au partenaire et le choix du partenaire. Ces mécanismes ont des effets à plus ou moins long terme sur la trajectoire évolutive d'une association. Nous suivrons donc un plan chronologique basé sur la latence inhérente à ces mécanismes.

Dans une première partie nous examinerons les services qu'échangent les partenaires afin d'identifier ceux qui sont susceptibles d'être soumis à la tricherie. De ce fait, nous caractériserons les conflits directs qui existent entre eux, qu'ils résultent de la défection ou de la surexploitation, de la part de l'un ou l'autre des partenaires. Ainsi, nous pourrions déterminer comment le phénomène de sanction peut intervenir pour stabiliser l'association à court terme.

Dans une seconde partie, le phénomène de fidélité au partenaire sera abordé via l'étude du mode de transmission de l'association. Pour cela, le mode de reproduction de la plante sera

étudié en détail, et ce pour la première fois. Puis, à la lumière des informations obtenues, nous pourrions examiner la structure géographique de l'information génétique au sein des populations des deux partenaires afin de déterminer comment celle-ci peut influencer les mécanismes de contrôle jusque là évoqués.

La troisième partie de ce manuscrit explique comment le contexte biotique de l'association peut influencer et moduler les effets des conflits et des mécanismes de contrôle sur la stabilité de la relation. Nous examinerons ainsi le cas du troisième partenaire obligatoire de l'association qu'est le champignon Ascomycète présent dans le piège construit par les fourmis puis celui d'une autre espèce de fourmis, compétitrice potentielle capable de s'immiscer dans le système.

Enfin, la synthèse des résultats concernant notre modèle d'étude sera mise en perspective dans le cadre global de la compréhension des mutualismes en général.

CHAPITRE 1 :

***Conflits et contrôle, coûts et
bénéfices à court terme***

1 Les fourmis ont-elles théoriquement un intérêt à tricher ?

Le seul service susceptible de générer de la tricherie est lié à la production de domaties et de nectaires extrafloraux par *H. physophora*. Or, pour que le comportement de tricherie soit avantageux pour *A. decemarticulatus*, il faut que la ressource concernée soit limitante d'une façon ou d'une autre.

Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle la croissance des colonies de fourmis est contrainte par la place disponible, c'est-à-dire par le nombre de domaties. L'espace est souvent un facteur limitant important dans la croissance des colonies de fourmis arboricoles (Fonseca 1993; Fonseca 1999). Une alternative à cette hypothèse serait que *H. physophora* ait un taux de croissance supérieur à celui de ses fourmis associées.

Afin de clarifier cette situation, nous nous sommes intéressé aux cycles de vie des deux partenaires (Article 1). Grâce des mesures de carbone isotopique, nous avons estimé que la durée de vie d'un *H. physophora* est de plusieurs centaines d'années. Dans le même temps, des suivis de mortalité de colonies d'*A. decemarticulatus* ont montré que leur durée de vie moyenne est autour d'une vingtaine d'année. Par ailleurs, nous avons compté le nombre de larves, de nymphes, d'ouvrières, de femelles ailées et de mâles ailés au sein de 35 colonies d'*A. decemarticulatus* et nous avons mis en relation les résultats obtenus avec le nombre de domaties portées par les plantes qui les hébergeaient. Nous avons ainsi mis en évidence des relations linéaires hautement significatives entre le nombre total d'individus et le nombre de domaties, de même qu'entre le nombre total d'individus reproducteurs et le nombre de domaties. Le fait que le nombre de domaties soit un bon prédicteur du nombre d'individus de la colonie de fourmis, quelle que soit leur caste, indique que la taille et la reproduction des colonies d'*A. decemarticulatus* est fortement limitée par la taille de la plante-hôte.

Puisque la production de nouvelles feuilles par *H. physophora* est le seul moyen pour une colonie d'*A. decemarticulatus* de voir son territoire s'accroître, il est dans son intérêt de favoriser la croissance végétative de sa plante-hôte et ainsi d'accroître sa valeur sélective.

2 Le comportement castrateur comme manifestation du conflit

Afin d'augmenter son espace vital, *A. decemarticulatus* est susceptible d'exploiter un éventuel compromis entre la croissance végétative et la reproduction de sa plante-hôte. En effet, du fait que la relation qu'elle entretient avec *H. physophora* montre un mode de transmission horizontal, les intérêts des partenaires ne sont pas alignés dans la reproduction. Toute l'énergie qu'*H. physophora* investit dans sa floraison est donc perdue pour *A. decemarticulatus*. Mais si *A. decemarticulatus* pouvait manipuler sa plante-hôte afin qu'elle investisse cette énergie non pas dans sa reproduction mais dans sa croissance végétative, elle maximiserait son bénéfice en termes d'espace de nidification.

Une telle manipulation se manifeste chez certaines espèces de fourmis arboricoles sous la forme d'un comportement castrateur de la plante-hôte (Yu & Pierce 1998; Izzo & Vasconcelos 2002; Gaume *et al.* 2005). Il s'agit de la destruction directe des fleurs en boutons. Il a été montré qu'un tel comportement a bien pour conséquence une plus importante croissance de la plante cible (Frederickson 2009).

Nous avons donc recherché des preuves éventuelles d'un tel comportement chez *A. decemarticulatus* (Article 2). Pour cela, nous avons suivi, pendant toute la période de floraison de 23 plantes, deux inflorescences par individu. L'accès à l'une des inflorescences était expérimentalement interdit aux fourmis tandis que l'accès à l'autre était laissé libre. Ainsi, nous avons pu noter une chute drastique du nombre de boutons portés par les inflorescences parcourues par les fourmis. Cette diminution n'a pas été observée sur les inflorescences dépourvues de fourmis. Par ailleurs, nous avons pu observer les ouvrières d'*A. decemarticulatus* en train de mordre et découper les pièces stériles et fertiles de ces boutons (Fig. 7). De plus, il s'est avéré que les fleurs au sein desquelles les fourmis patrouillaient ont montré un taux de fructification plus faible que les fleurs dont les fourmis étaient absentes. Finalement, les inflorescences dépourvues de fourmis ont produit significativement plus de fruits que les inflorescences parcourues par les fourmis. Notons toutefois qu'environ un tiers des boutons exposés aux fourmis a échappé à la destruction, nous en reparlerons plus loin.



Figure 7 : Une inflorescence en cours de destruction par les fourmis.

Un tel comportement castrateur de la part d'*A. decemarticulatus* est donc l'indice d'un conflit d'allocation des ressources mettant en jeu la reproduction d'*H. physophora*. Cependant, pour que la destruction des inflorescences mène à une plus importante croissance végétative, il faut qu'*H. physophora* soit soumis à un compromis entre sa reproduction et sa croissance. Or, comme tout organisme à croissance modulaire, chaque module est susceptible de pouvoir payer le coût de sa propre édification, via des capacités photosynthétiques localement améliorées, par exemple (Watson 1984; Obeso 2002). Nous sommes donc en droit de nous demander si le comportement de castration a bien pour conséquence d'augmenter l'investissement de la plante dans sa croissance.

Pour répondre à cette question, nous avons comparé la production de feuilles de trois lots de plantes : l'un voyait ses inflorescences systématiquement détruites par nos soins, l'accès aux inflorescences d'un autre était interdit expérimentalement aux fourmis et le dernier, non manipulé, était exposé au comportement castrateur des fourmis (Article 3). Au bout d'un an et demi, les deux lots de plantes soumis à la castration (expérimentale ou par les fourmis) avaient produit plus de feuilles que le lot de plantes qui avait fleuri à son maximum. Ce résultat met donc bien en lumière à la fois le compromis qui est imposé à *H. physophora* entre sa reproduction et sa croissance végétative mais également l'intérêt qu'ont les fourmis à empêcher leur plante-hôte de fleurir. Ce compromis s'exprime également au cours du cycle annuel de reproduction de la plante puisque les périodes de production d'inflorescences alternent avec les périodes de production de feuilles. Par ailleurs, le comportement castrateur

des fourmis peut être désigné sous le terme de « castration parasitaire » puisqu'il induit le gigantisme de l'hôte (Hall *et al.* 2007).

Or, nous avons vu que la destruction des boutons par *A. decemarticulatus* n'est pas systématique puisqu'environ un tiers d'entre eux y échappent et fleurissent. Cette observation est surprenante compte tenu du fait que toutes les ressources qu'*H. physophora* investit dans sa reproductions sont perdues pour *A. decemarticulatus*. Par conséquent, la sélection aurait dû favoriser les colonies de fourmis qui empêchent toute reproduction de la part de leur plante-hôte, récupérant ainsi le maximum de ressources pour leur profit. Cependant, il existe d'autres systèmes proches auxquels participe une espèce congénérique d'*A. decemarticulatus* et qui montrent des caractéristiques similaires (Izzo & Vasconcelos 2002; Edwards & Yu 2008). En effet, lorsqu'elle est associée à *Cordia nodosa* (Boraginaceae), *A. octoarticulatus* ne montre pas toujours une virulence maximale à l'encontre des inflorescences de sa plante-hôte (Izzo & Vasconcelos 2002; Edwards & Yu 2008). Les auteurs de l'étude en question interprètent ce résultat comme le signe d'une stratégie de tolérance de la part de la plante qui « cache » ses inflorescences au plus près des dernières feuilles produites et qui ne sont donc pas encore patrouillées par les fourmis. De même, *Hirtella myrmecophila*, dont les feuilles perdent leurs domaties à l'issue de leur développement, produit plus d'inflorescences à proximité de vieilles feuilles qui ne sont donc plus parcourues par les fourmis *A. octoarticulatus* (Izzo & Vasconcelos 2002). Un phénomène similaire pourrait être à l'origine de nos observations puisque la majorité des inflorescences sont localisées aux extrémités des branches d'*H. physophora*. Cependant, nous pouvons également envisager que ce comportement de castration partielle résulte d'un phénomène évolutif et donc d'une éventuelle pression de sélection exercée par *H. physophora* sur les colonies de fourmis trop virulentes.

3 Le rôle des sanctions dans le contrôle du conflit

En réponse à la destruction de ses inflorescences, *H. physophora* est susceptible d'imposer des sanctions à son partenaire. Il se poserait ainsi dans le rôle de l'organisme qui dispose du contrôle de l'association, ce qui serait cohérent avec les prédictions théoriques puisque *H. physophora* est le partenaire qui investit le plus dans l'association. Il est donc susceptible de diminuer cet investissement dans la relation privant ainsi des colonies trop virulentes d'une part de leurs ressources. Une telle réponse au comportement castrateur que montrent les fourmis pourrait conditionner l'intensité de la virulence de ces dernières.

La diminution de l'investissement d'*H. physophora* dirigé vers ses partenaires peut se manifester à travers ses deux traits caractéristiques des myrmécophytes : la production de domaties et la production de nectar extrafloral. L'effet négatif de la diminution de l'investissement d'*H. physophora* dans ces traits phénotypiques serait d'autant plus important pour les fourmis qu'ils constituent pour elles des ressources essentielles qu'elles ne peuvent se procurer autrement que par l'entremise de leur plante-hôte. S'il existe un tel mécanisme de sanction, on peut s'attendre à ce qu'une plante souffrant de la destruction d'un trop grand nombre de ses inflorescences produise des feuilles comptant un nombre réduit de nectaires, des nectaires et des domaties de petites tailles, voire ni nectaires ni domaties.

Nous avons donc recherché de tels phénomènes sur les feuilles produites par les trois lots de plantes décrits précédemment (pour mémoire : toutes les inflorescences d'un lot étaient détruites par nos soins, toutes les inflorescences d'un autre lot étaient protégées de l'action des fourmis et le troisième lot était soumis au comportement de castration partielle des fourmis, le tout pendant un an et demi ; Article 3). La première information importante est qu'aucune plante n'a produit de feuilles dépourvues de nectaires ou de domaties ; les feuilles produites comportaient par ailleurs un nombre équivalent de nectaires. Cependant, les feuilles issues des plantes dont aucun bouton n'a jamais fleuri du fait de notre action montraient des domaties et des nectaires plus petits que les autres feuilles, y compris celles issues de plantes soumises au comportement de castration partielle par les fourmis. Des domaties de petite taille sont susceptibles de pouvoir accueillir une plus faible quantité de couvain et donc

d'héberger un plus petit nombre de reproducteurs que des domaties de taille « classique ». de même, puisque la quantité de nectar produite est directement proportionnelle au volume de parenchyme des nectaires, de plus petits nectaires impliquent une plus faible production de nectar (Pacini *et al.* 2003).

Il apparaît donc qu'*H. physophora* diminue son investissement dans ses traits liés au mutualisme avec les fourmis, en réponse à la destruction totale de toutes ses inflorescences. Cette diminution a très probablement un effet négatif sur les ressources que reçoivent les fourmis de leur plante-hôte. En revanche, une telle diminution n'a pas lieu lorsque seulement deux tiers de ses inflorescences sont détruites, comme semblent le faire les fourmis. Cette observation permet donc de conclure qu'*H. physophora* tolère un certain niveau de castration, mais sanctionne un comportement castrateur systématique. Il est tout à fait plausible que la production de feuilles sans domaties ni nectaires aurait un impact négatif beaucoup plus important sur les fourmis que la seule diminution de taille des structures. Or, nous l'avons vu, la protection de chaque feuille dépend indirectement de la présence de ces structures. *H. physophora* doit donc faire face à un phénomène de fidélité au partenaire qui engendre un compromis entre la sanction d'un partenaire trop virulent et la protection de ses feuilles. Ceci explique vraisemblablement pourquoi, bien que leur taille soit diminuée en réponse à la destruction des inflorescences, la présence des domaties et des nectaires sur les feuilles n'est jamais remise en cause.

4 Conclusion

Nous avons vu qu'au sein de l'association entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus*, seule la mise à disposition de domaties et de nectar extrafloral pour les fourmis de la part de la plante-hôte peut donner lieu à de la tricherie. Cette tricherie est un phénomène de surexploitation de la plante par ses fourmis associées et provient du conflit d'allocation des ressources qui oppose la reproduction de la plante et la croissance de la colonie de fourmis. Ce conflit se manifeste via le comportement castrateur que montrent les fourmis et a pour résultat la destruction d'une partie des inflorescences de la plante. Ce comportement permet aux fourmis de manipuler à leur avantage le compromis qui existe pour la plante entre sa croissance et sa reproduction. En effet, en réponse à la destruction de ses inflorescences, la plante voit son taux de croissance augmenter, probablement du fait de la réallocation de son énergie. Cependant, la plante a la capacité de sanctionner une colonie de fourmis trop virulente qui détruirait la totalité de ses inflorescences en diminuant son investissement dans ses traits de myrmécophytes. De ces sanctions résulte la contre-sélection des partenaires potentiels au comportement castrateur systématique et explique la virulence suboptimale des *A. decemarticulatus*. Ainsi, en montrant un comportement de castration partielle de la plante-hôte, les fourmis peuvent profiter d'un accroissement optimisé de leur espace vital et *H. physophora* peut produire quelques fruits à chaque épisode de reproduction.

Nous avons démontré que des mécanismes tels que les sanctions peuvent participer à contrôler la virulence d'un partenaire au sein d'un mutualisme. En ce sens, les sanctions favorisent la stabilité de ce type d'associations. Par ailleurs, leur influence sur le niveau de virulence des organismes associés peut avoir deux conséquences évolutives majeures. Premièrement, elles peuvent être génératrices de relations mutualistes à partir de relations parasitaires. En contre-sélectionnant les individus générateurs de coûts élevés et favorisant ceux qui sauront tirer avantage de l'association en minimisant leur poids pour leur partenaire, elles augmentent la qualité mutualiste des populations de partenaires potentiels. Deuxièmement, et pour les mêmes raisons, elles peuvent participer à la mise en place de symbioses mutualistes à partir de relations mutualistes moins étroites. En effet, elles

concourent à l'amélioration des partenaires déjà mutualistes. Or, l'amélioration est l'un des deux facteurs indispensables à la mise en place de symbioses mutualistes.

Cependant, l'apparence d'un système équilibré par les sanctions entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus* est trompeuse. En effet, des suites des interactions décrites dans ce chapitre, la plante paye un coût très élevé et les fourmis n'obtiennent pas le bénéfice maximum escompté. Cet état de fait pose deux questions : pourquoi *H. physophora* ne sanctionne-t-elle pas systématiquement tout comportement castrateur quel que soit son intensité ? et pourquoi *A. decemarticulatus* ne s'accommode-t-elle pas des sanctions imposées par sa plante-hôte ?

4.1 Pourquoi *H. physophora* ne sanctionne-t-elle pas systématiquement tout comportement castrateur quel que soit son intensité ?

Il ressort des résultats présentés jusqu'à présent qu'*H. physophora* ne sanctionne son partenaire que lorsque la destruction de ses inflorescences est complète et non lorsqu'un tiers d'entre elles sont épargnées. Cette situation ne semble pas optimale pour la plante puisque son taux de reproduction effectif n'est pas égal à son taux de reproduction maximum théorique. De ce constat naît la question suivante : serait-il possible qu'*H. physophora* tire un bénéfice du comportement castrateur des fourmis ? Afin de répondre à cette question, il faut considérer le succès reproducteur d'un individu, non pas à l'échelle d'un épisode de reproduction, comme nous l'avons fait jusqu'à présent, mais à l'échelle de toute sa vie.

Nous avons vu qu'un individu d'*H. physophora* peut vivre 10 fois plus longtemps qu'une colonie d'*A. decemarticulatus*. Un individu d'*H. physophora* héberge donc plusieurs colonies d'*A. decemarticulatus* au cours de sa vie, mais surtout, dispose d'autant de périodes où il est dépourvu de fourmis. Ces périodes ne peuvent pas voir de croissance végétative efficace puisque les nouvelles feuilles produites qui sont la cible privilégiée des phytophages se trouveraient alors sans défense (Grangier *et al.* 2008). En revanche, débarrassé de fourmis, il ne subirait plus leur effet négatif sur sa floraison. Ainsi, les périodes où les *H. physophora* sont habités par des fourmis seraient principalement dévolues à la croissance végétative. Le réinvestissement de l'énergie prévue pour la floraison dans la croissance végétative permettrait par la suite de disposer d'un appareil végétatif plus développé, et donc de produire plus d'énergie pour les épisodes de reproduction. Du fait de la compétition entre ovules produits simultanément pour l'accès aux ressources limitées de la plante il existe un

compromis entre qualité et quantité des descendants (Stephenson 1981). Donc, plus d'énergie serait synonyme de plus de descendants, de meilleure qualité. De plus, il existe un compromis pour tout être vivant entre sa reproduction et sa survie, ce qui amène à un compromis entre le succès reproducteur actuel et le nombre d'épisodes de reproduction futur (Obeso 2002).

En résumé, le comportement de castration des fourmis pourrait être bénéfique pour le succès reproducteur de la plante à long terme puisqu'il permettrait de produire plus de descendants de bonne qualité, à chaque épisode de reproduction, et au cours d'évènements de reproduction plus nombreux. Cependant, cette hypothèse n'a pas été vérifiée chez *H. physophora* et paraît difficilement testable du fait de sa très longue durée de vie.

4.2 Pourquoi *A. decemarticulatus* ne s'accommode-t-elle pas des sanctions imposées par sa plante-hôte ?

Bien qu'étant une explication convaincante au maintien d'une virulence suboptimale à court terme, les sanctions ne peuvent l'expliquer à long terme. En effet, de même qu'elles favorisent l'expansion dans la population d'individus peu virulents, elles favorisent également les individus qui arrivent à maintenir un niveau élevé de virulence tout en contournant ou tolérant leur effet négatif. C'est pourquoi un nombre croissant d'études théoriques démontrent que la stratégie de sanctions n'est pas évolutivement stable et n'est pas un mécanisme de contrôle de la virulence suffisant puisqu'elle induit une course aux armements entre les partenaires (Best *et al.* 2009; Weyl *et al.* 2010).

Nous pouvons noter que, dans le cas qui nous préoccupe, une stratégie de tolérance de la part de la plante aurait exactement le même effet, contrairement à ce que prédit la théorie (Best *et al.* 2009). En effet, les colonies de fourmis qui parviennent à contourner le mécanisme de tolérance mis en place par *H. physophora*, détruisent donc systématiquement l'intégralité de ses inflorescences. Elles gagnent ainsi un service plus important que ce que reçoivent les colonies incapables du même comportement et seront avantagées d'un point de vue sélectif. Ainsi, quelle que soit la stratégie mise en place par *H. physophora*, les fourmis *A. decemarticulatus* devraient finir par la contourner, à condition qu'elles y aient un avantage.

Cependant, nous avons vu que, au terme d'un an et demi de destruction systématique des inflorescences, les plantes montraient un taux de croissance qui n'était pas plus important que celui des plantes incomplètement castrées par les fourmis. Il n'existe donc peut-être aucun avantage pour *A. decemarticulatus* à détruire toutes les inflorescences de sa plante-hôte. Cependant, la durée de l'expérience ne représente qu'une fraction minime de la durée de vie

d'une colonie de fourmi et *a fortiori* de la durée de vie d'une plante. L'échelle de temps à laquelle a été effectuée l'expérimentation n'est donc peut-être pas la bonne pour déceler une telle différence.

Enfin, l'absence d'avantage pour *A. decemarticulatus* à empêcher complètement la reproduction d'*H. physophora* peut provenir du fait que celle-ci profite à la fourmi d'une façon ou d'une autre. Nous parlons donc ici d'un mécanisme de fidélité au partenaire qui consisterait au couplage partiel des succès reproducteurs des deux protagonistes. Un tel mécanisme, où une colonie de fourmis aurait un avantage dans la reproduction de sa plante-hôte, pourrait potentiellement provenir du mode transmission de l'association entre les partenaires.

5 Articles

5.1 Article 1 : Dynamics of the association between a long-lived understory myrmecophyte and its specific associated ants

Oecologia (2010) sous presse

Jérôme Orivel^{1,2,3}, Luc Lambs^{1,4}, Pierre-Jean G. Malé^{1,2}, Céline Leroy³, Julien Grangier^{1,2}, Thierry Otto^{1,4}, Angélique Quilichini^{3,5} & Alain Dejean³

¹Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

²CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

³CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France

⁴CNRS, EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle), 29 rue Jeanne Marvig, 31055 Toulouse, France

⁵Jardin Botanique Henri Gaussen, 39 allées Jules Guesde, F-31062 Toulouse, France

Dynamics of the association between a long-lived understory myrmecophyte and its specific associated ants

Jérôme Orivel · Luc Lambs · Pierre-Jean G. Malé ·
Céline Leroy · Julien Grangier · Thierry Otto ·
Angélique Quilichini · Alain Dejean

Received: 25 June 2009 / Accepted: 17 July 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Myrmecophytic symbioses are widespread in tropical ecosystems and their diversity makes them useful tools for understanding the origin and evolution of mutualisms. Obligate ant–plants, or myrmecophytes, provide a nesting place, and, often, food to a limited number of plant–ant species. In exchange, plant–ants protect their host plants from herbivores, competitors and pathogens, and can provide them with nutrients. Although most

studies to date have highlighted a similar global pattern of interactions in these systems, little is known about the temporal structuring and dynamics of most of these associations. In this study we focused on the association between the understory myrmecophyte *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae) and its obligate ant partner *Allomerus decemarticulatus* (Myrmicinae). An examination of the life histories and growth rates of both partners demonstrated that this plant species has a much longer lifespan (up to about 350 years) than its associated ant colonies (up to about 21 years). The size of the ant colonies and their reproductive success were strongly limited by the available nesting space provided by the host plants. Moreover, the resident ants positively affected the vegetative growth of their host plant, but had a negative effect on its reproduction by reducing the number of flowers and fruits by more than 50%. Altogether our results are important to understanding the evolutionary dynamics of ant–plant symbioses. The highly specialized interaction between long-lived plants and ants with a shorter lifespan produces an asymmetry in the evolutionary rates of the interaction which, in return, can affect the degree to which the interests of the two partners converge.

Communicated by Joshua Tewksbury.

J. Orivel (✉) · C. Leroy · A. Quilichini · A. Dejean
CNRS, UMR Ecologie des Forêts de Guyane,
Campus Agronomique, BP 316, 97379 Kourou Cedex, France
e-mail: jerome.orivel@ecofog.gf

L. Lambs · T. Otto
Université de Toulouse, UPS, INPT,
EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle),
29 rue Jeanne Marvig, 31055 Toulouse, France

L. Lambs · T. Otto
CNRS, EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle),
31055 Toulouse, France

P.-J. G. Malé · J. Grangier
Université de Toulouse, UPS, EDB (Laboratoire Evolution
et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne,
31062 Toulouse, France

P.-J. G. Malé · J. Grangier
CNRS, EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique),
31062 Toulouse, France

A. Quilichini
Jardin Botanique Henri Gaussen,
39 allées Jules Guesde, 31062 Toulouse, France

Keywords *Allomerus decemarticulatus* · *Hirtella physophora* · Lifespan · Mutualism · Myrmecophyte

Introduction

The evolutionary persistence of mutualisms depends on the alignment of the reproductive interests of the interacting partners. If each partner gains from the association, the costs and benefits involved in maintaining the interaction can vary in both space and time. Such

variability is the primary source of conflicts of interest between the partners—especially if it is associated with a horizontal mode of transmission—and promotes cheating. Hence, the challenge is to identify the mechanisms that maintain evolutionarily stable, interspecific mutualisms in spite of the ubiquity of cheating (Bronstein et al. 2003; Herre et al. 1999; Sachs et al. 2004). Several factors, such as partner choice (i.e., filtering), partner fidelity or spatial structure (i.e., limited dispersal) have been identified as fostering the alignment of the mutualists' interests (Foster and Wenseleers 2006; Herre et al. 1999; Szilágyi et al. 2009). Consequently, both the spatial and temporal dynamics of the interactions are important features in understanding mutualistic associations between species.

Mutualistic ant–plant associations, which are widespread in tropical ecosystems, offer a suitable model for exploring this issue. Obligate ant–plants, or myrmecophytes, provide a nesting space, and, often, food to a limited number of plant–ant species. In exchange, plant–ants protect their host plants from phytophagous animals, competitors and pathogens, and can provide them with nutrients (Beattie and Hughes 2002; Heil and McKey 2003; Solano and Dejean 2004). Ant–plants and plant–ants share a common interest in growth, but not necessarily in reproduction. For both parties, the reproductive investments of the other are useless to the interaction. Winged sexuals are not involved in protecting the plant foliage and the energy invested by plants in producing flowers does not increase the nesting space for the ant colony. Consequently, natural selection should favor cheating to maximize each species' own benefits. Indeed castrating parasites have been identified in several ant–plant mutualisms (Edwards and Yu 2008; Gaume et al. 2005; Izzo and Vasconcelos 2002; Stanton et al. 1999; Yu and Pierce 1998). If castration can clearly reduce or even prevent plant reproductive success, it has, nevertheless, to be balanced against the overall reproductive activity of the plant throughout its lifetime.

In this study we concentrated on a one-to-one mutualism between the Neotropical understory myrmecophyte *Hirtella physophora* Martius & Zuccharini (Chrysobalanaceae) and its obligate and specific ant-partner *Allomerus decemarticulatus* Mayr (Myrmicinae). Due to the highly specialized nature of the *H. physophora*–*A. decemarticulatus* association, we focused on the temporal structuring and dynamics of this association by studying the life histories and growth rates of both partners. Through field inventories and using an experimental approach, we investigated the lifespan of both the plants and their associated ant colonies, and the beneficial or detrimental effects they can have on the reproductive growth of the other.

Materials and methods

Study site and model

This study was conducted between 2000 and 2009 in the pristine forest situated around the field station at Petit Saut, Sinnamary, French Guiana (05°03'30.0"N, 52°58'34.6"W).

Hirtella physophora grows strictly in the understory of pristine Amazonian forests and mostly in patches located on the upper slopes of hillsides (Solano et al. 2003). These treelets have long-lived leaves that bear extrafloral nectaries and a pair of pouches at the base of each lamina. The leaf pouches that shelter ant colonies, differ both morphologically and anatomically from the lamina (Leroy et al. 2008). Each *H. physophora* is almost always associated with *A. decemarticulatus* (99% of the inhabited plants, the remaining being inhabited by *Crematogaster* sp. aff. *crucis*), with a single colony per plant. Moreover, *A. decemarticulatus* has never been found in association with another myrmecophyte species in the study area (Solano et al. 2003). The *A. decemarticulatus* workers protect their host plants through their predatory behavior, including by building a gallery-shaped trap along the stems to capture prey (Dejean et al. 2005).

Peak flowering periods in *H. physophora* in French Guiana occur from December to February and June to August. Inflorescences arise at axillary fasciculate racemes and they comprise three to six flowers (Prance 1972).

Life history and growth rate of *H. physophora*

A total of 1,320 *H. physophora* individuals were tagged, and their height and trunk diameters were measured. The measurements of trunk diameters were taken with calipers on the lowest part of the base of the trunk, closest to the ground.

The growth rate of *H. physophora* was estimated by recording changes in the trunk diameters of 36 tagged *Hirtella* trees over 6 years (2000–2006). We also monitored 257 individuals for 3 years (2003–2006), and recorded the number of trees that were heavily damaged by falling trees or branches plus those that had dried out after the formation of a tree-fall gap in their vicinity.

Radiocarbon dating the trees

Due to the lack of true annual growth rings in many tropical species, the estimation of the age of such plant individuals cannot be made dendrometrically. We therefore used radiocarbon (^{14}C) dating together with estimations of diametrical increments of the trunk to address this question. Four wood samples from *H. physophora* trees were analyzed along with samples taken from *Pinus caribaea* Morelet and

Table 1 Sample information, accelerator mass spectrometry ^{14}C measurements, and minimum AD age (relative to 2005) for the wood samples of *Hirtella physophora*, *Pinus Caribaea* and *Avicennia germinans*

Sample name	Laboratory code	Trunk diameter (cm)	Density	Sample weight (g)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Error $\delta^{13}\text{C}$	PMC	Error PMC	Minimum age	Age ^{14}C BP	Growth rate (cm/years)
<i>P. caribaea</i>	Poz 13575	14.9	0.69	0.65	-26.1	0.1	118.00	0.39	17	-	0.876
<i>A. germinans</i>	Poz 13574	14.3	0.66	0.26	-23.8	0.8	114.30	0.40	14	-	1.021
<i>H. physophora</i> sample A	Poz 13595	1.9	0.95	0.30	-37.7	0.1	103.05	0.36	48	-	0.040
<i>H. physophora</i> sample B	Poz 13594	2.2	0.95	0.40	-34.3	0.4	101.44	0.35	50	-	0.044
<i>H. physophora</i> sample C	Poz 13598	2.9	0.93	0.40	-36.7	1.4	98.12	0.35	-	150 ± 30	-
<i>H. physophora</i> sample D	Poz 13592	3.2	0.93	0.24	-32.8	0.5	98.67	0.34	-	110 ± 30	-

PMC percentage of modern C

Avicennia germinans (L.) L. of known ages growing in neighboring areas and that served as references (see Table 1 for details on trunk diameters, wood density and weight of samples). The pine sample was taken from a plantation whose age is known, while the mangrove tree is a natural pioneer species whose age was deduced from aerial photographs.

Plants assimilate ^{14}C during photosynthesis, and once trapped in the wood, the amount of ^{14}C decreases according to the exponential law of radioactive decay ($T_{1/2} = 5,730$ years), so that the ^{14}C content can permit us to date the age of the wood. However, concentrations of atmospheric ^{14}C doubled between 1950 and 1965 due to the aboveground explosions of atomic bombs; and then declined (Nydal and Lövseth 1983). Consequently, radiocarbon-dating wood formed before or after the detonation of the atomic bombs requires different methods of calculation. For trees formed after 1950, these changes in atmospheric ^{14}C are directly detectable by measuring radiocarbon. Dating older wood is complicated by the temporal variation in atmospheric ^{14}C resulting from massive emissions of CO_2 containing million-year-old ^{14}C that can trigger an overestimation of the age of the wood (Nydal and Lövseth 1983; Stuiver and Becker 1986). The age of wood samples is usually expressed after calibration as a percentage of modern C (PMC) for periods following the explosion of the bombs, or in the years before the present for trees that date from before the explosion of the bombs (BP years; where the present is arbitrarily defined as 1950).

We used the Calibomb program (<http://calib.qub.ac.uk/CALIBomb>) and the Wellington data set programmed for the Southern Hemisphere to estimate the age of the wood samples displaying a PMC value greater than 100, or wood formed after 1950. For the samples displaying a PMC value less than 100, or wood formed before 1950, we used the Calib 5.02 program (<http://calib.qub.ac.uk/calib/calib.html>) with the calibration curve *shcal04.14c* proposed by McCormac et al. (2004).

Evaluating the lifespan of *A. decemarticulatus* colonies

To evaluate the lifespan of *A. decemarticulatus* colonies, 193 *H. physophora* individuals were monitored twice each year between 2002 and 2005 (800 days). Each time, we recorded the presence or absence of an ant colony and its developmental status according to the quality of the galleries interconnecting the leaf pouches. Indeed the building of the gallery-shaped trap by *A. decemarticulatus* enables us to estimate the development of the colony and its death as the fungus they use in the galleries dies soon after the death of the ant colony. Consequently, the death of a given colony and the recolonization of the plant between two censuses can be easily determined as the trap is built after the colony develops (i.e., the length of the galleries is linked to the increase in the number of inhabited domatia on the plant). We hypothesized that all ages were represented in the ant colonies at the first census and that the death of the colonies was directly related to their age. This permitted us to establish a linear regression of the number of surviving colonies as a function of time, and the rate of colony extinction was used to estimate the half-life and maximum age of the colonies.

Ants' effect on plant growth and reproduction

To assess both the short- and long-term effects of the ants on the plants, each month for 16 months we monitored the vegetative and reproductive growth rates of individuals from which the ants were removed ($n = 25$) as well as control plants ($n = 22$). Both groups of plants were similar in size expressed as the number of leaves (mean \pm SE = 17.04 ± 3.6 vs. 16.5 ± 5.3 for ant-excluded and control plants, respectively, two-sample *t*-test: $t = 0.335$, $df = 45$, $P = 0.74$). We eliminated the ants by injecting an aqueous solution (2%) of pyrethrum 25% inside all of the domatia. The rapid knockdown effect of the pyrethrum immediately killed all of the resident ants, and its photolability prevented

any residual effects on phytophagous insects. As founding queens re-colonized certain plants during the course of the experiment, we re-injected the pyrethrum solution into the domatia occupied by new queens 3 times over the 16 months. We recorded the total number of leaves, the number of new leaves as well as the number of floral buds, flowers and fruits on each plant individual monthly. Control and ant-excluded plants were compared according to either their total vegetative or reproductive investments during the 16-month period. We started the census 2 months after removing the ants because Grangier et al. (2008) demonstrated that excluding the ants has no effect on the rate of herbivory after 40 days.

To investigate the potential castrating virulence of *A. decemarticulatus*, 23 *H. physophora* bearing at least two early stage inflorescences were selected. Ant workers were removed from one inflorescence and their access to the floral buds was prevented using Tanglefoot; while the other inflorescence was used as a control. The numbers of flowers as well as the number of fruits produced were counted each week after treatment.

Size and structure of the ant colonies

We collected the ant colonies inhabiting 35 *H. physophora*, which ranged in size from having 7–96 domatia, and we investigated the relationship between colony size and the number of domatia on the host plant. All of the leaves and stems on each plant individual were cut off and placed into a plastic bag, and then preserved in 70% ethanol. Each domatium was then dissected and the number of workers, pupae, larvae, queens, and alate males and females was recorded. The number of workers that were in the galleries built under the stems of the plant was also recorded.

Results

Diameter and height distribution of *H. physophora* trees

The frequency distributions for height and stem diameter of the 1,320 plants measured were in both cases unimodal with a mean diameter of 1.6 ± 0.94 cm and a mean height of 1.31 ± 1.0 m (Fig. 1; data not shown for height distribution). The structure of the distributions showed that most of the trees were in the middle of the size range for both diameter and height, with a relatively small number of seedlings and a constant decrease toward the tallest individuals.

Even if tree height and diameter showed a positive correlation, the variance between groups of individuals was not homogeneous [14 groups from 0.1 to 0.3 cm in diameter to >4 cm; Fig. 1; Levene test $F_{(13,1306)} = 61.24$, $P < 0.01$], highlighting the large variation observed in tree height as

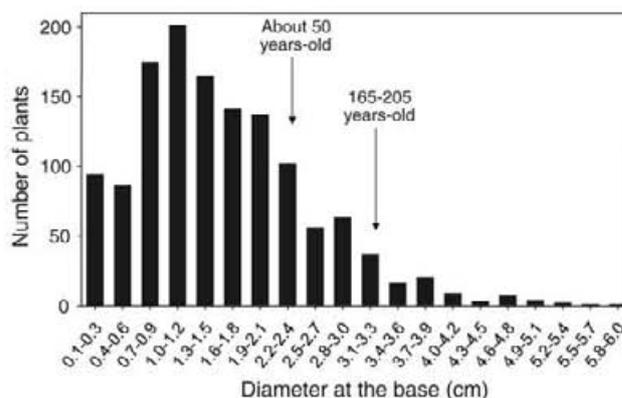


Fig. 1 Distribution of the trunk base diameters of a population of 1,320 *Hirtella physophora*. The age of the plants is indicated based on radiocarbon dating

the trees age and, consequently, the amount of damage they can sustain during their lifetime. Indeed, during the 3-year-long monitoring period, a total of 29 trees out of 257 were affected in some way, resulting in 4% of the trees affected each year.

Determining the age of the trees

The ^{14}C analyses conducted using the Calibomb program for wood with PMC values greater than 100 generally resulted in one single date (Table 1). The Calibomb program estimated the ages of two trees of known ages (*P. caribaea* and *A. germinans*) to within 1–2 years of their real ages. The evaluation of the ages of the two of *H. physophora* tree samples with 1.9- and 2.2-cm-wide trunks corresponded to 48 and 50 years, respectively (Table 1). Thus, the corresponding mean growth rate from seedlings of such trees was about 0.042 cm/year [0.040 (1.9/48) and 0.044 (2.2/50) for the 1.9- and the 2.2-cm-wide trees, respectively]. Note that the differences in age and trunk diameter reflect possible variations in environmental conditions for these two individuals, but their growth rate was quite similar.

The ^{14}C analyses concerning the two largest *H. physophora* trees (2.9- and 3.2-cm-wide trunks) resulted in PMC values lower than 100, and thus had to be recalibrated using the Calib 5.02 program. This recalibration resulted in three theoretically possible dendro-ages for each sample (*H. physophora* sample C, 73 ± 75 BP, 150 ± 30 BP and 244 ± 25 BP; *H. physophora* sample D, 36 ± 30 BP, 110 ± 30 BP and 240 ± 20 BP). This multi-age result originates from the very low rate of decrease in atmospheric ^{14}C and from the fact that this logarithmic curve is not smooth: it has many small peaks, which can be matched with the measured PMC value. To select the right age, we used the growth rate of adult trees determined in the field by measuring the increase in trunk diameters between

2000 and 2006: (mean \pm SE) 2.078 ± 0.755 to 2.181 ± 0.776 cm. The mean difference (0.103 ± 0.070 cm) corresponds to a mean growth of 0.0171 cm/year over this period for *H. physophora* trees whose trunk diameters were already about 2 cm, so about half from early growth, knowing that these 2-cm-wide trees are around 50 years old. Consequently, a tree with a 3-cm-wide trunk is theoretically approximately 108 years old [$50 + (1/0.0171)$], permitting us to estimate that *H. physophora* samples C and D were 150 and 110 BP-years old, respectively (Table 1). These BP values correspond to real ages of about 205 and 165 years, respectively.

To evaluate the age of the individual in our dataset with the widest trunk (6 cm), we based our calculations on the ages of the ^{14}C -dated trees with trunk diameters of about 3 cm (see above). We thus estimated that this tree was between approximately 340 [$165 + (2.8/0.0171)$] and 385 [$205 + (3.1/0.0171)$] years old.

Evaluating the lifespan of *A. decemarticulatus* colonies

The linear regression of the number of surviving ant colonies as a function of time resulted in $r^2 = 0.97$, permitting us to estimate a colony half-life (i.e., the point in time at which 50% of the initial number of colonies would have survived) at 10.13 years. As it takes about 1 year for a colony to reach maturity (J.O., personal observation), a better estimate of the half-life of the colonies would be closer, therefore, to 11 years. The estimated maximum age of the colonies is 20.36 years (a minimum of 21 years starting from foundation), and, thus, by far shorter than that of the host *H. physophora* individuals.

Ants' effect on plant growth and reproduction

Removing the ants over a long period of time affected the vegetative growth of the plants, and the *H. physophora* leaves produced after the ants were removed suffered from herbivory (Fig. 2). Indeed, the plants devoid of ants produced a significantly lower number of new leaves than the control plants (mean number per plant \pm SE = 17.4 ± 7.4 vs. 24.9 ± 6.7 for ant-excluded and control plants, respectively; Mann–Whitney *U* test: $U = 134.5$, $P < 0.01$), which resulted in a lower vegetative growth rate over the course of the experiment for plants devoid of ants (Fig. 2; Table 2). However, no significant differences in reproductive growth rates could be discerned. Reproductive investment occurred in most of the plants (21/25 vs. 19/22 for ant-excluded and control plants, respectively; Fisher's exact test $P = 0.57$) and the reproductive effort of those plants did not differ between the two groups (floral buds, mean number per plant \pm SE = 21.4 ± 13.0 vs. 22.9 ± 12.9 for ant-excluded and control plants, respectively; Mann–Whitney *U* test,

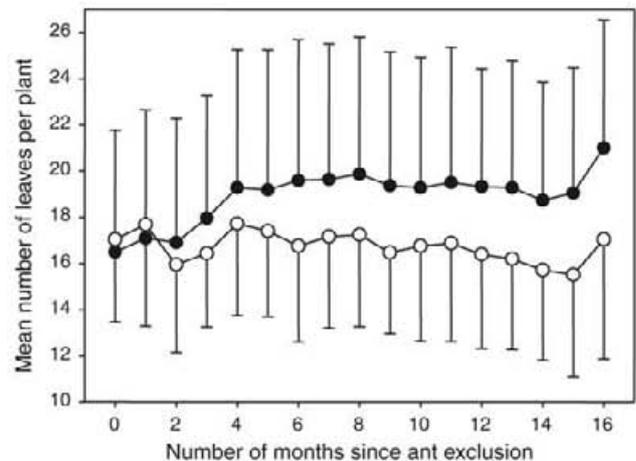


Fig. 2 Vegetative growth expressed as the mean number \pm SE of leaves in ant-removed (empty circles) and control (filled circles) *H. physophora* plants during a 16-month field experiment

Table 2 Repeated-measures ANOVA examining the impact of ant removal from the plant on the number of *H. physophora* leaves over time

	df	MS	F	P value	G–G ^a
Treatment	1	947.47	1.531	0.222	
Error	45	618.98			
Time	16	22.10	5.530	<0.001	<0.001
Time \times treatment	16	19.08	4.775	<0.001	0.001
Error	720	3.99			

MS mean square

^a Probabilities corrected for sphericity are provided using the Greenhouse–Geisser correction (G–G)

$U = 40.5$, $P = 0.29$; flowers, 4.6 ± 2.8 vs. 5.6 ± 3.1 , $U = 51.5$, $P = 0.64$). The percentage of plants that produced fruits did not differ between both groups (5/25 vs. 7/22 for ant-excluded and control plants, respectively; Fisher's exact test $P = 0.28$). Moreover, and as usually observed in *H. physophora*, fruit production was very low and the difference between plants that produced fruits was not significant between the two groups (mean number per plant \pm SE = 1.4 ± 0.5 vs. 2.3 ± 1.3 for ant-excluded and control plants, respectively, Mann–Whitney *U* test: $U = 12.5$, $P = 0.42$).

Nevertheless, the presence of the ants had a negative effect on the reproduction of their host plants that was demonstrated when the ants were selectively removed from the inflorescences of their host (Fig. 3). The inflorescences to which the ants had access indeed produced significantly fewer flowers than the ant-excluded ones (mean percentage of flowers per inflorescence compared to the initial number of buds \pm SE = 24.5 ± 32.3 vs. 76.9 ± 24.8 for control and ant-excluded inflorescences, respectively; Wilcoxon test: $W = 193$, $P < 0.0001$). This negative effect was also reflected

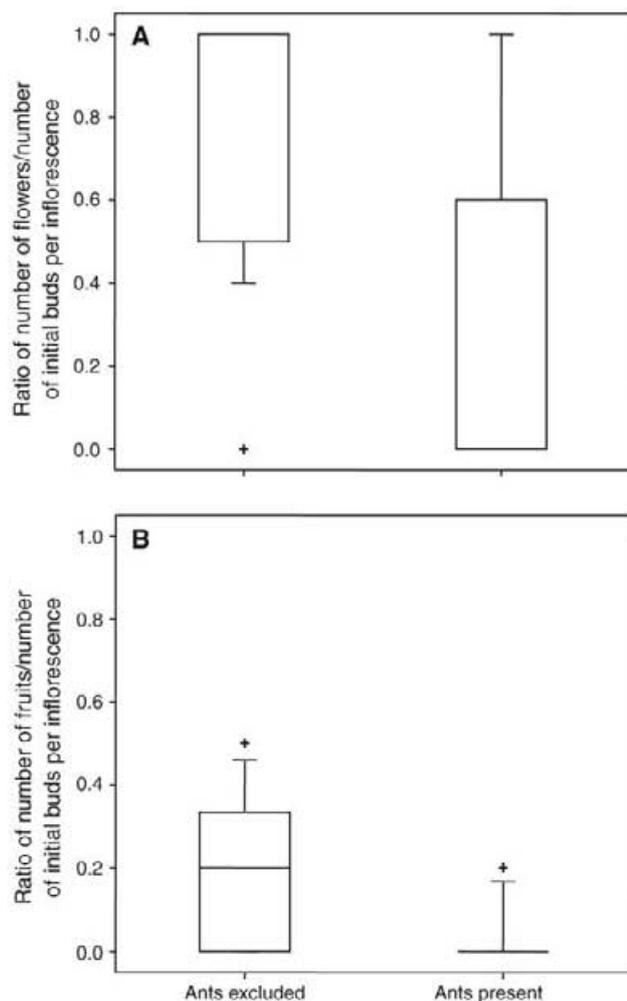


Fig. 3 *Allomerus decemarticulatus*' impact on the reproduction of *H. physophora* expressed as the number of flowers (a) or fruits (b) produced according to the initial number of buds per inflorescences in ant-excluded or control inflorescences. Error bars above and below the boxes indicate the 90th and 10th percentiles, the ends of the boxes indicate the 25th and 75th percentiles and crosses indicate outliers

in the number of plants that produced fruits (12/23 vs. 3/23 for control and ant-excluded inflorescences, respectively; Fisher's exact test $P = 0.005$) and in the number of fruits produced (mean percentage of fruits per inflorescence compared to the initial number of buds \pm SE = 2.3 ± 1.3 vs. 17.1 ± 3.8 for control and ant-excluded inflorescences, respectively; Wilcoxon test: $W = 78$, $P < 0.0025$).

Size and structure of the ant colonies

There was a positive and linear relationship between the size of the ant colony and the number of domatia on the host plant (Fig. 4; $r^2 = 0.8356$). This relationship accounts for most of the variation in colony size and strongly suggests that for all plant sizes, the amount of available nesting space is an important limiting factor for colony growth. The

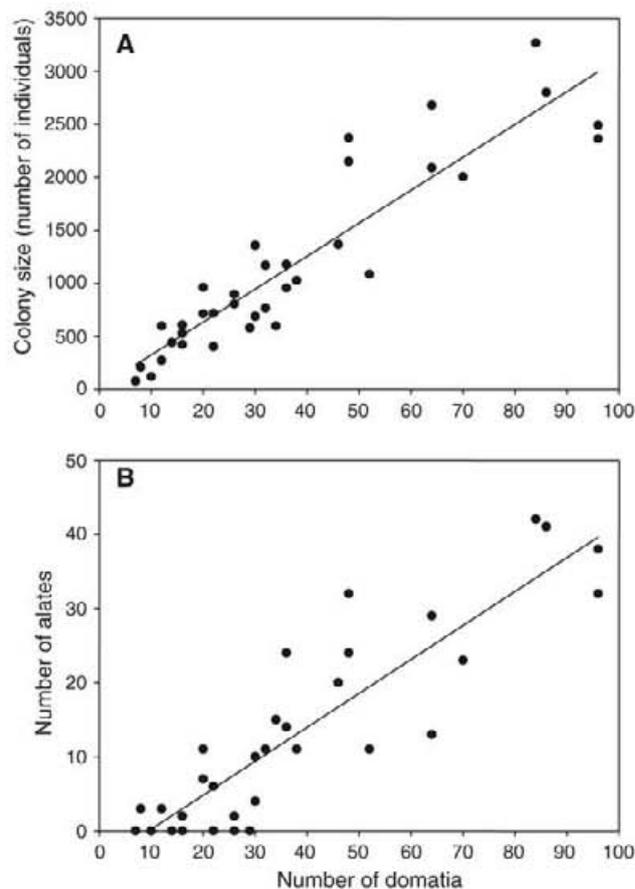


Fig. 4 Linear regression of the number of domatia on *H. physophora* by a the size of the colony expressed as the total number of individuals ($r^2 = 0.8356$, $P < 0.001$) and b the number of alates among the resident ants, *A. decemarticulatus* ($r^2 = 0.7984$, $P < 0.001$)

lack of curvilinearity in the relationship (test of significance for domatia²: $F = 0.109$, $P = 0.80$) also showed that the amount of available nesting space is probably one of the most important limiting factors in colony development.

The onset of alate production begins early in colony development (e.g., when there are fewer than 300 workers), but most of the alate individuals are produced in colonies containing more than 600 workers. Moreover, the number of alates (brood and adult males and females), and thus the rate of alate production is also strongly correlated with the amount of nesting space offered by the host plant (Fig. 4; $r^2 = 0.7984$). The same relationship exists when colony size rather than the number of domatia is taken into account. Then, the amount of available nesting space not only limits colony size, but also its rate of reproduction.

Discussion

Altogether our results highlight some important features that can deeply influence the evolutionary dynamics of

ant–plant symbioses. As in most ant–plant mutualisms, the myrmecophytism in *H. physophora* clearly enhances the growth of individuals, but *A. decemarticulatus* also negatively affects its host's reproduction by reducing by two-thirds the number of flowers and thus the number of fruits. However, such a negative effect has to be balanced over the entire lifetime of the plant individuals and it appears that the overall effect of the ants on their host plant is clearly positive. Indeed, even if the reproductive effort does not differ between ant-inhabited plants and plants devoid of ants, the latter nevertheless suffer from herbivory. Thus, over the long term, this can be detrimental to their growth and survival.

Functioning and importance of myrmecophytism

Through their predatory behavior, which includes the constant patrolling of their host tree foliage and their induced response to foliar wounds (Grangier et al. 2008), resident ants protect the foliage of their host plant. This also benefits the ants as the production of new leaves is the only means by which their nesting space can increase. The limitation in colony growth and reproduction induced by the amount of available nesting space highlights the importance of this limiting factor for the ants (Fonseca 1993, 1999). According to these results, it is in *A. decemarticulatus*' best interest to favor the vegetative growth of their host plant, like in any protective ant–plant symbioses, not only in terms of the production of more food rewards or domatia, but also to maximize their own reproductive success.

Moreover, castration also enables host-plant resources to be reallocated from reproduction to vegetative growth (Frederickson 2009; Yu 2001). Castrating parasites have been identified in several systems and especially in all of those involving the *Allomerus* ant species studied so far (Izzo and Vasconcelos 2002; Yu and Pierce 1998). *Allomerus decemarticulatus* is no different in this matter than the other *Allomerus* species. But, *A. decemarticulatus* destroy about two-thirds of the floral buds whereas the other *Allomerus* species generally destroy 100% of the floral buds, reducing their host reproduction to zero (but see Edwards and Yu 2008). In the present case, the combination of both the positive effect of the *Allomerus* on the vegetative growth of *H. physophora* and the much longer longevity of the host plants than their specific plant–ants are important factors favoring the persistence of the interaction. The loss of ant inhabitation by the plant can be considered as a fitness valley as the loss of biotic protection would affect the survival of the plants. In absence of alternative solution for *H. physophora*, this system could be thus considered as an example of a local adaptive peak.

Beside its myrmecophytism, *H. physophora* also shares several biological traits with many plant species from the

understory that enables its survival in this environment, such as shade tolerance and slow growth, mortality, and recruitment rates (Easdale et al. 2007; Gourlet-Fleury et al. 2005; Nascimento et al. 2005; Vieira et al. 2005). Moreover, like for any plant species in the understory, the impact and consequences of the physical damage caused by debris falling from the canopy are of importance. The frequency of the damage suffered by *H. physophora* is of the same magnitude as that recorded in other studies, with around 4% of the trees affected per year (Clark and Clark 1989, 1991; Gartner 1989). However, the ability of this plant species to develop reiterations from its lower part reflects its adaptation to these frequent disturbances.

Evolutionary consequences of the asymmetry in the partners' lifespan

Because the plants are colonized early in their development, they will host several successive ant colonies during their lifetime. Neither the ontogenetic successions of different partners nor the secondary polygyny of *A. decemarticulatus* colonies have been noted in *H. physophora*, thus requiring the de novo colonization of the plant by founding queens (Djiéto-Lordon et al. 2005; Feldhaar et al. 2000, 2003; Young et al. 1997). The temporal succession of colonies induces periods of time during which the plants are not protected by their associated plant–ants and, thus these periods are unfavorable to their growth and survival. However, given that the re-colonization process is rapid and continuous throughout the year, these unfavorable periods of time are generally kept to a minimum. Moreover, the evolutionary persistence of this association is favored by the highly specialized nature of the interaction that ensures the constant re-colonization of the plants by *A. decemarticulatus* queens (Grangier et al. 2009).

Altogether these results demonstrate that the specialized interaction between long-lived plants and ants with a shorter lifespan produces an asymmetry in the generational turnover and the evolutionary rates of the two partners. On the one hand, such an asymmetry could be seen as a destabilizing factor for the association because the populations of the long-lived mutualist can only respond slowly to increases in densities among the shorter-lived partner. Thus, when members of this shorter-lived guild of mutualists compete for access to their host, asymmetries in the generational turnover may increase the intensity of this competition (Stanton 2003). However, in the present case interspecific competition for the occupancy of *H. physophora* individuals is extremely weak (Grangier et al. 2009). Thus, the evolutionary persistence of the *H. physophora*–*A. decemarticulatus* association seems possible due to the absence of an alternative partner for the plant combined with the dynamics of the interaction

which enables *H. physophora* to still produce offspring during their lifetime.

Acknowledgments We are grateful to T. Goslar from the Poznan Radiocarbon Laboratory, Poland and M. Paterné from the LSCE CNRS-CEA, France, for their help in the determination of the ^{14}C age, to C. Trontin for her valuable assistance in the lab and to Andrea Dejean for proofreading the manuscript. We would like to thank V. Rico-Gray and two anonymous reviewers for their valuable comments on the manuscript. We would also like to thank the Laboratoire Environnement de Petit Saut for furnishing logistical assistance. Financial support for this study was provided by the Programme Amazonie II (project 2ID) of the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), by the Programme Convergence 2007–2013 Région Guyane (project DEGA) from the European Community, by a research program of the French Agence Nationale de la Recherche (research agreement no. ANR-06-JCJC-0109-01), and by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program. The experiments comply with the current laws of France.

References

- Beattie AJ, Hughes L (2002) Ant–plant interactions. In: Herrera CM, Pellmyr O (eds) Plant–animal interactions: an evolutionary approach. Blackwell, Oxford, pp 211–235
- Bronstein JL, Wilson WG, Morris WE (2003) Ecological dynamics of mutualist/antagonist communities. *Am Nat* 162:24–39
- Clark DB, Clark DA (1989) The role of physical damage in the seedling mortality regime of a Neotropical rain forest. *Oikos* 55:225–230
- Clark DB, Clark DA (1991) The impact of physical damage on canopy tree regeneration in tropical rain forest. *J Ecol* 79:447–457
- Dejean A, Solano PJ, Ayrolles J, Corbara B, Orivel J (2005) Arboreal ants build traps to capture prey. *Nature* 434:973
- Djiéto-Lordon C, Dejean A, Ring RA, Nkongmeneck BA, Lauga J, McKey D (2005) Ecology of an improbable association: the pseudomyrmecine plant–ant *Tetraponera tessmanni* and the myrmecophytic liana *Vitex thyriflora* (Lamiaceae) in Cameroon. *Biotropica* 37:421–430
- Easdale TA, Healey JR, Grau HR, Malizia A (2007) Tree life histories in a montane subtropical forest: species differ independently by shade-tolerance, turnover rate and substrate preference. *J Ecol* 95:1234–1249
- Edwards DP, Yu DW (2008) Tolerating castration by hiding flowers in plain sight. *Behav Ecol Sociobiol* 63:95–102
- Feldhaar H, Fiala B, bin Hashim R, Maschwitz U (2000) Maintaining an ant–plant symbiosis: secondary polygyny in the *Macaranga triloba*–*Crematogaster* sp. association. *Naturwissenschaften* 87:408–411
- Feldhaar H, Fiala B, Hashim RB, Maschwitz U (2003) Patterns of the *Crematogaster*–*Macaranga* association: the ant partner makes the difference. *Insect Soc* 50:9–19
- Fonseca CR (1993) Nesting space limits colony size of the plant–ant *Pseudomyrmex concolor*. *Oikos* 67:473–482
- Fonseca CR (1999) Amazonian ant–plant interactions and the nesting space limitation hypothesis. *J Trop Ecol* 15:807–825
- Foster KR, Wenseleers T (2006) A general model for the evolution of mutualisms. *J Evol Biol* 19:1283–1293
- Frederickson ME (2009) Conflict over reproduction in an ant–plant symbiosis: why *Allomerus octoarticulatus* ants sterilize *Cordia nodosa* trees. *Am Nat* 173:675–681
- Gartner BL (1989) Breakage and regrowth of *Piper* species in rain forest understory. *Biotropica* 21:303–307
- Gaume L, Zacharias M, Borges RM (2005) Ant–plant conflicts and a novel case of castration parasitism in a myrmecophyte. *Evol Ecol Res* 7:435–452
- Gourlet-Fleury S, Blanc L, Picard N, Sist P, Dick J, Nasi R, Swaine MD, Forni E (2005) Grouping species for predicting mixed tropical forest dynamics: looking for a strategy. *Ann For Sci* 62:785–796
- Grangier J, Dejean A, Malé PJG, Orivel J (2008) Indirect defense in a highly specific ant–plant mutualism. *Naturwissenschaften* 96:57–63
- Grangier J, Dejean A, Malé PJG, Solano PJ, Orivel J (2009) Mechanisms driving the specificity of a myrmecophyte–ant association. *Biol J Linn Soc* 97:90–97
- Heil M, McKey D (2003) Protective ant–plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annu Rev Ecol Syst* 34:425–453
- Herre EA, Knowlton N, Mueller UG, Rehner SA (1999) The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol Evol* 14:49–53
- Izzo TJ, Vasconcelos HL (2002) Cheating the cheater: domatia loss minimizes the effects of ant castration in an Amazonian ant–plant. *Oecologia* 133:200–205
- Leroy C, Jauneau A, Quilichini A, Dejean A, Orivel J (2008) Comparison between the anatomical and morphological structure of leaf blades and foliar domatia in the ant–plant *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae). *Ann Bot* 101:501–507
- McCormac FG, Hogg AG, Blackwell PG, Buck CE, Higham TFG, Reimer PJ (2004) SHCal04 Southern Hemisphere calibration 0–11.0 cal kyr BP. *Radiocarbon* 46:1087–1092
- Nascimento HEM, Laurance WF, Condit R, Laurance SG, D’Angelo S, Andrade AC (2005) Demographic and life-history correlates for Amazonian trees. *J Veg Sci* 16:625–634
- Nydal R, Lövsæth K (1983) Tracing bomb ^{14}C in the atmosphere 1962–1980. *J Geophys Res* 88:3621–3642
- Prance GT (1972) Monograph of the Chrysobalanaceae. *Flora Neotropica* 9:1–410
- Sachs JL, Mueller UG, Wilcox TP, Bull JJ (2004) The evolution of cooperation. *Q Rev Biol* 79:135–160
- Solano PJ, Dejean A (2004) Ant-fed plants: comparison between three geophytic myrmecophytes. *Biol J Linn Soc* 83:433–439
- Solano PJ, Durou S, Corbara B, Quilichini A, Cerdan P, Belin Depoux M, Delabie JHC, Dejean A (2003) Myrmecophytes of the understory of French Guianian rainforests: their distribution and their associated ants. *Sociobiology* 41:605–614
- Stanton ML (2003) Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *Am Nat* 162:10–23
- Stanton ML, Palmer TM, Young TP, Evans A, Turner ML (1999) Sterilization and canopy modification of a swollen thorn acacia tree by a plant–ant. *Nature* 401:578–581
- Stuiver M, Becker B (1986) High-precision decadal calibration of the radiocarbon time scale, AD 1950–2500 BC. *Radiocarbon* 28:863–910
- Szilágyi A, Scheuring I, Edwards DP, Orivel J, Yu DW (2009) The evolution of intermediate castration virulence and ant coexistence in a spatially structured environment. *Ecol Lett* 12:1–11
- Vieira S, Trumbore S, Camargo PB, Selhorst D, Chambers JQ, Higuchi N, Martinelli LA (2005) Slow growth rates of Amazonian trees: consequences for carbon cycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18502–18507
- Young TP, Stubblefield CH, Isbell LA (1997) Ants on swollen-thorn acacias: species coexistence in a simple system. *Oecologia* 109:98–107
- Yu DW (2001) Parasites of mutualisms. *Biol J Linn Soc* 72:529–546
- Yu DW, Pierce NE (1998) A castration parasite of an ant–plant mutualism. *Proc R Soc Lond* 265:375–382

5.2 Article 2 : An ant symbiont directly and indirectly limits its host plant's reproductive success

Soumis à *Evolutionary Ecology*

Pierre-Jean G. Malé^{1,2}, Céline Leroy³, Alain Dejean³, Angélique Quilichini^{3,4} and Jérôme Orivel^{1,2,3}

¹Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

²CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

³CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France

⁴Jardin Botanique Henri Gaussen, 39 allées Jules Guesde, F-31062 Toulouse, France

Abstract

In theory, mutualisms are intrinsically unstable, and the search for the maximum profit at the minimum cost should lead every mutualist to become a parasite. From an empirical point of view, mutualisms are ubiquitous and of major importance to ecosystems, suggesting the existence of mechanisms that enhance the maintenance of such relationships. We focused on the obligatory myrmecophytic association between the Neotropical plant *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae) and the ant *Allomerus decemarticulatus* (Myrmicineae). The plant shelters the ants in leaf pouches in exchange for protection from phytophagous insects. We experimentally demonstrated that the ants partially castrate their host plant by destroying almost two-thirds of its buds. The ants also limit fertilization through their presence and interactions with pollinators. These results reveal that ant activity negatively affects the plant's reproduction both directly and indirectly. This dual negative effect does not result in the complete castration of the plant, most probably because of a tolerance strategy by the plant. We also highlight major limitations to plant reproduction due to the spontaneous abscission of flowers and to the limited quantity and/or poor quality of the pollen. These limitations must not be neglected since they can alter the global outcome of *H. physophora*'s association with its ant partner. We therefore conclude that the evolutionary fate of the relationship depends on both ant castration virulence and obstacles to plant fertilization not related to the presence of ants.

Keywords: Evolutionary conflict; cheater; pollination; mutualism breakdown; myrmecophyte.

Introduction

Although reciprocally beneficial to both of the partners, mutualisms are best viewed as balanced, antagonistic interactions and mutual exploitation. This definition implies both costs and benefits for each partner that are context-dependent and that vary over space and time, influencing the evolutionary fate of a mutualistic relationship (Sachs & Simms 2006). Natural selection might also favour cheating individuals that are able to lower their costs and/or increase their benefits and shift the relationship from a mutualism to parasitism (Bronstein 2001b). As a consequence, mutualisms are thought to be intrinsically unstable because of their extreme sensitivity to conflicts between partners, and to invasion by cheaters and parasites.

Ant-plant relationships are interesting models for studying conflicts and breakdowns within mutualisms. They are ubiquitous and highly diverse, going from facultative and non-specific interactions to obligate interactions (Rico-Gray & Oliveira 2007). They present a similar global pattern; i.e. food rewards and/or housing in exchange for biotic protection, dispersal and/or nutrition. Whereas ants can increase plant fitness by deterring phytophagous insects and anecdotally acting as pollinators (Beattie *et al.* 1984; Oliveira 1997), they are known to engender reproductive costs for their host plants. Such costs are the result either of the damage caused directly to the plants' reproductive organs – i.e. 'castration' according to Bonds' definition (2006) – or of the ants' predatory behaviour towards effective pollinators (Young *et al.* 1997; Yu & Pierce 1998; Izzo & Vasconcelos 2002; Gaume *et al.* 2005; Ness 2006). Understanding the durability of such seemingly fragile relationships despite these conflicts is becoming critical (Edwards *et al.* 2006; Debout *et al.* 2009; Szilágyi *et al.* 2009).

In this study, we focus on the specific interaction between the Neotropical myrmecophyte *Hirtella physophora* Mart. & Zucc. (Chrysobalanaceae) and its obligatory ant partner *Allomerus decemarticulatus* Mayr (Myrmicinae). *Hirtella physophora* is known to have a very low level of fruit production (Leroy C and Quilichini A, unpublished data). *Allomerus decemarticulatus* is a congeneric species of *A. octoarticulatus* which has been shown to castrate its own host plants, *Cordia nodosa* Lam. (Boraginaceae) and *H. myrmecophila* Pilg. (Yu & Pierce 1998; Izzo & Vasconcelos 2002). This association is thus a good model for addressing questions dealing with conflicts between ant activity (i.e. patrolling and predation) and host plant reproduction. We set out to determine whether some limitations to *H. physophora* reproduction are actually related to ant activity, and discriminated between those effects and those not related to ant activity on both open-flower and fruit sets. Finally,

we discuss the implications of the overall impact of ant presence on *H. physophora* reproduction and the evolutionary consequences of limitations to that reproduction for the continuance of the relationship.

Materials and methods

Study site and model

This study was conducted in French Guiana between January and May 2009 in *Petit Saut*, Sinnamary (05°03'30"N; 52°58'34"W) and *La Montagne des Singes*, Kourou (05° 04' 20"N; 52° 41' 43"W).

Hirtella physophora is an understory treelet that strictly occurs in pristine Amazonian rainforest. It has long-lived leaves that bear extra-floral nectaries and a pair of pouches (called 'domatia') at the base of each lamina (Leroy *et al.* 2008). Flowering periods occur mainly from December to February and June to August. *Hirtella physophora* is a self-incompatible and entomogamous species. The flowers carry two ovules whereas the fleshy fruits carry only one seed. Fruits mature about 3 months after fertilization (Leroy C and Quilichini A, unpublished data). Plant individuals are almost exclusively inhabited by the arboreal ant *A. decemarticulatus* with a single colony per plant (Solano *et al.* 2003). Moreover, *A. decemarticulatus* has never been found in association with another myrmecophyte species in the study area (Grangier *et al.* 2009). As in any other protective mutualism between ants and plants, *A. decemarticulatus* workers protect their host plant from defoliators through their predatory behaviour (Dejean *et al.* 2001; Dejean *et al.* 2005; Grangier *et al.* 2008).

Ants' impact on inflorescence development

We selected 23 *H. physophora* individuals with at least two young inflorescences in bud. Ants were excluded from one inflorescence per plant by applying, on either side of the peduncle, rings of Tanglefoot[®]. The shoots bearing these inflorescences had previously been covered with a piece of aluminium foil to keep them from being damaged by coming into direct contact with the glue. The other inflorescence was left untouched. All of the units (i.e. buds and flowers) present on the inflorescence were monitored once a week during the entire flowering season: from the last week of January to the penultimate week of March. After fertilization, fruit development was recorded each month until maturation, which usually occurs in May. The effect of ant activity on anthesis was assessed by i) estimating the probability per unit of time, depending on the presence/absence of the ants, that the buds

would remain on the plant, using Cox's proportional hazards model (Cox 1972), and ii) by comparing the flowering successes of ant-patrolled and ant-excluded inflorescences, using Generalized Linear Mixed Modelling (GLMM). The abscission of buds caused by intrinsic and environmental factors other than ants was quantified by comparing the number of flowers to the initial number of buds on ant-excluded inflorescences using the Wilcoxon rank test for paired data.

We addressed whether the castrating behaviour of the ants was directed towards all of the inflorescences equally or preferentially towards some inflorescences while others were spared. We compared the flowering success of ant-patrolled inflorescences bearing at least one flower in bloom to the flowering success of ant-excluded inflorescences also using GLMM. Eight additional untreated plants were used in this latter analysis because of the low number of flowers produced by *H. physophora* when ants are present. They bore at least one inflorescence and were located at *La Montagne des Singes*, ca. 35 km east of *Petit Saut*.

Ants' impact on fruit production

As *H. physophora* produces one seed per fruit, the fruit set is equivalent to the seed set. We thus considered the fruit set as a proxy for reproductive success. The impact of ant activity on fruit production was assessed by comparing the fruit-to-flower ratios between ant-patrolled and ant-excluded inflorescences, using GLMM. Additional untreated plants from *La Montagne des Singes* were also included in this statistical analysis. The fruit set failure caused by factors other than ants was quantified on flowers from ant-excluded inflorescences. We compared the number of fruits to the initial number of flowers using the Wilcoxon rank test for paired data.

Controlled pollination experiments were carried out on 24 *H. physophora* individuals located at *Petit Saut*. For each plant, the flowers of one inflorescence were emasculated when in bud by cutting off the stamen, and the stigmas were hand-saturated with pollen from a different individual by rubbing dehisced anthers on them. The entire inflorescence was then enclosed in a nylon mesh to keep any additional pollen from the stigmas. After fertilization, the number of fruits produced per treatment was recorded. The number of fruits from pollen-saturated inflorescences was compared to the number of fruits from ant-excluded inflorescences using the Mann & Whitney rank test for unpaired data.

Statistical analyses

All statistical analyses were conducted using R (R Development Core Team 2009). The Cox survival analysis was run using the `coxme` function in the *kinship* package (Atkinson & Therneau 2009). We used the `survfit` function and additional graphical options in the *survival* package (Therneau & Lumley 2009) to compute the Kaplan–Meier survival functions (Kalbfleish & Prentice 1980). Generalized Linear Mixed Modelling was conducted with the `lmer` function in the *lme4* package (Bates & Maechler 2009). The number of flowers/fruits per inflorescence was considered as the ‘successes’ and the initial number of buds/flowers minus the number of flowers/fruits as the ‘failures’ in a binomial distribution. The influence of individual effects was taken into account as a random effect.

Results

Limitations to flowering success

We noted a drop in the number of buds on ant-patrolled inflorescences, but not on ant-excluded inflorescences during the three weeks preceding blooming (Cox’s model, Treatment (ant-patrolled): $\beta = 3.91$, $\exp(\beta) = 50.05$, $SE(\beta) = 0.43$, $p < 0.001$; Fig. 1). Indeed, *A. decemarticulatus* workers were observed cutting and chewing both the sterile and the fertile parts of the buds. The drop in the number of buds resulted in ant-patrolled inflorescences showing significantly less flowering success than ant-excluded inflorescences ($n_{\text{ant-excluded}} = 23$ vs. $n_{\text{ant-patrolled}} = 23$; Generalized Linear Mixed Model, Treatment (ant-patrolled): Estimate = -4.01, SE = 0.54, z-value = -7.42, $p < 0.001$). A significantly lower number of ant-patrolled inflorescences bore at least one flower compared to ant-excluded inflorescences (8 vs. 22 out of 23, respectively; Fisher’s exact test, $p < 0.0001$). The probability for a bud to bloom was more than two-fold higher when located on an ant-excluded inflorescence than on an ant-patrolled inflorescence (Fig. 2). For ant-excluded inflorescences, the number of flowers produced was significantly lower than the initial number of buds (mean number of initial buds per inflorescence \pm SD vs. mean number of flowers per inflorescence \pm SD = 3.78 ± 1.20 vs. 3.26 ± 1.48 ; Wilcoxon paired test: $V = 36$, $p = 0.012$; Fig. 2).

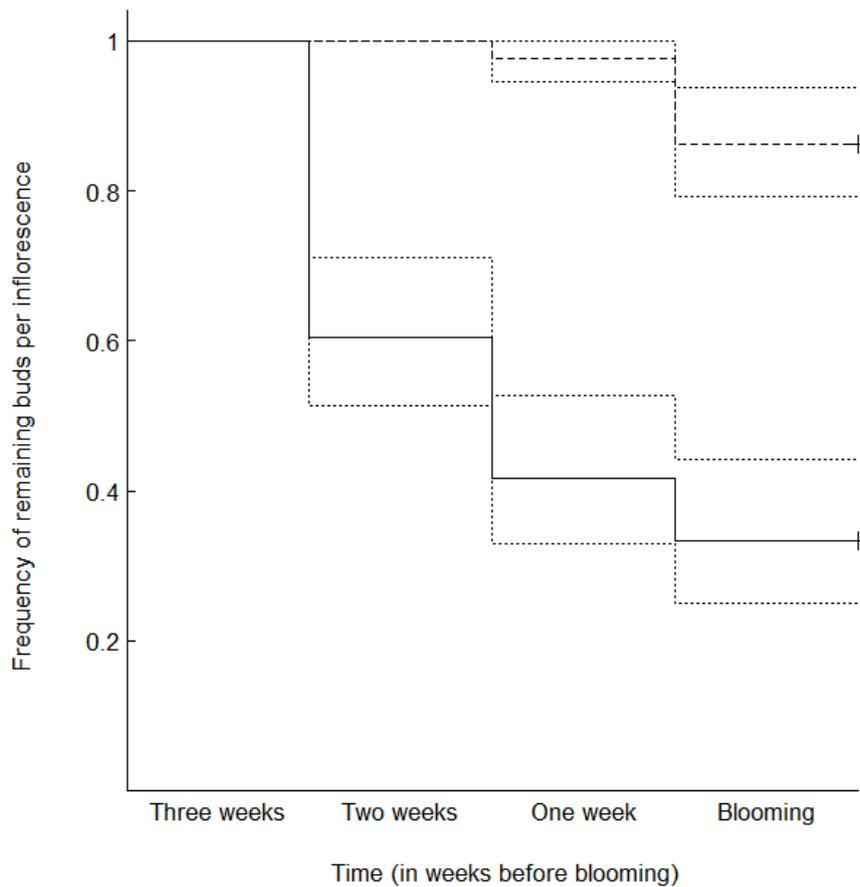


Figure 1. Kaplan-Meier survival plot for *H. physophora* buds during their maturation until blooming based on the presence/absence of *A. decemarticulatus* ants on inflorescences. The dashed line represents the survival of buds from ant-excluded inflorescences, and the solid line represents the survival of buds from ant-patrolled inflorescences. Dotted lines represent 95% CI of the survival frequencies.

Ant-excluded inflorescences that bore at least one flower in bloom bore as many flowers in bloom as ant-excluded ones ($n_{\text{ant-excluded}} = 23$ vs. $n_{\text{ant-patrolled}} = 33$; Generalized Linear Mixed Model, Treatment (ant-patrolled): Estimate = -0.89, SE = 0.49, z-value = -1.81, $p = 0.070$; Fig. 2). Although marginally non-significant, this result suggests that when ants damage part of an inflorescence, the entire inflorescence might likely be affected.

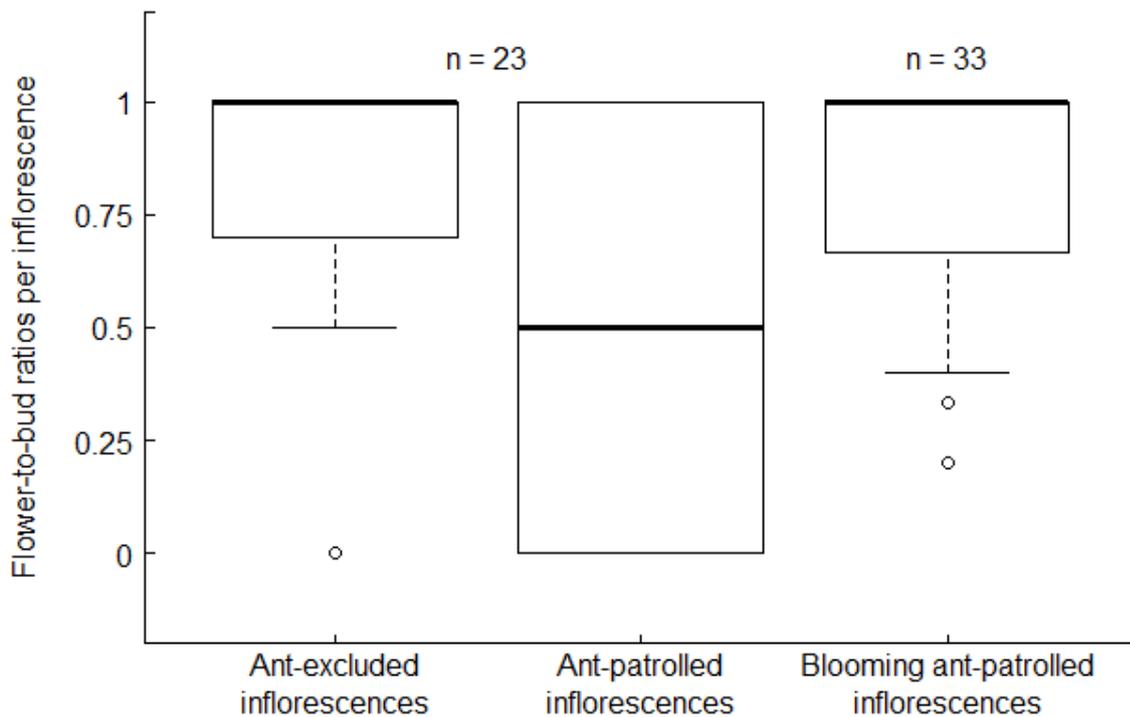


Figure 2. Boxplot of the frequencies of the flower-to-bud ratios per inflorescence on *H. physophora* based on the presence/absence of *A. decemarticulatus* ants. Bold lines represent the medians, and the whiskers account for 95% of the data. Outliers appear as circles.

Limitations to fruit formation

Ant-patrolled inflorescences showed a significantly lower fruit-to-flower ratio than ant-excluded inflorescences ($n_{\text{ant-excluded}} = 22$ vs. $n_{\text{ant-patrolled}} = 33$; Generalized Linear Mixed Model, Treatment (ant-patrolled): Estimate = -0.96, SE = 0.43, z-value = -2.24, $p = 0.025$; Fig. 3). This indicates that ant presence had a negative impact on fruit production.

Ant-excluded inflorescences produced significantly fewer fruits than expected based on the initial number of flowers (mean number of flowers per inflorescence \pm SD vs. mean number of fruits per inflorescence \pm SD = 3.41 ± 1.33 vs. 0.73 ± 0.77 ; Wilcoxon paired test: $V = 253$, $p < 0.001$; Fig. 3). Such a difference highlights limitations to the fertilization of flowers that are not related to the presence of ants. One of these limitations might be related to pollination and/or fertilization efficiency, since hand-pollinated inflorescences produced more fruits than ant-excluded inflorescences (mean number of fruits per hand-pollinated inflorescence \pm SD vs. mean number of fruits per ant-excluded inflorescence \pm SD = 1.54 ± 1.22 vs. 0.49 ± 0.74 ; Mann & Whitney test: $W = 314$, $p < 0.001$; Fig. 3).

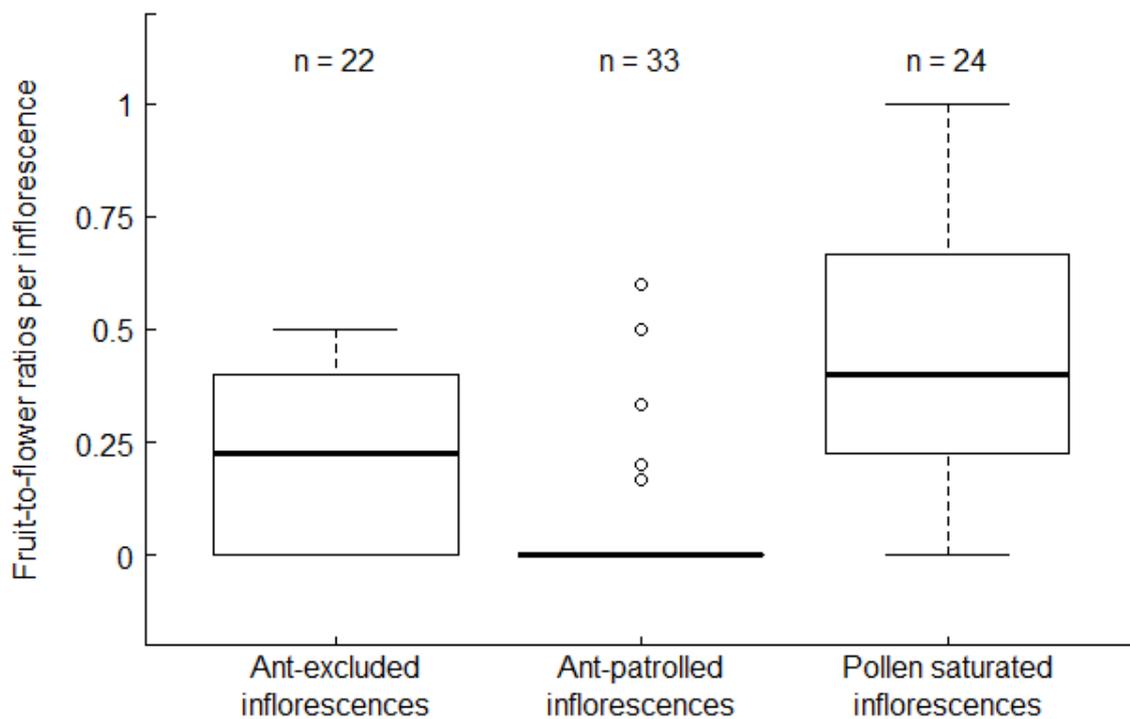


Figure 3. Boxplot of the frequencies of the fruit-to-flower ratios per inflorescence on *H. physophora* based on the experimental treatment of the inflorescences. Bold lines represent the medians, and the whiskers account for 95% of the data. Outliers appear as circles.

Discussion

Our results show that *A. decemarticulatus*' presence has two kinds of negative impact – direct and indirect – on the reproductive success of its host plant. First, the physical destruction of buds (i.e., castration) reduces the flowering intensity of the plant. Second, when buds were left unharmed and opened into flowers, the presence of ants during the pollination process resulted in a very low number of fruits. Unlike what has been observed in other model systems, the castration of the plant is partial, leading to the production of flowers even in the presence of ants. Ant activity is the main limiting factor to plant reproductive success, but intrinsic factors such as abortion and extrinsic factors related to the limited availability and/or poor quality of pollen also play a role in the low number of fruit produced.

Direct negative impact of ant presence on plant reproduction

The castration behaviour of *A. decemarticulatus* represents the most direct negative impact of ant activity on its host plant's reproduction. In this sense, *A. decemarticulatus*' behaviour does not differ from that observed for congeneric species on their respective host

plants (Yu & Pierce 1998; Izzo & Vasconcelos 2002). The ultimate cause of this castration behaviour has been demonstrated to be related to the reallocation of plant energy from reproduction to growth (Yu 2001; Frederickson 2009). Since *A. decemarticulatus* colony size greatly depends on the number of domatia (Orivel *et al.* 2010), the ants should directly benefit from having more living space in which to expand their colony.

The novelty of this system lies in the survival of almost one third of the buds after the partial castration of the plant (but see Edwards & Yu 2008). This observation is surprising since all of the resources that the plant invests in its reproduction are lost for *A. decemarticulatus*. Consequently, natural selection should have favoured ant colonies that completely castrate their host plant. Nevertheless, our observations suggest that the rare fruits produced on ant-patrolled inflorescences originate from intact inflorescences rather than from isolated flowers. This might indicate that *A. decemarticulatus* tends to exercise total castration virulence and that the less-than-total castration observed could likely be the result of a strategy by the host plant. Most of the inflorescences that produced flowers are located at the distal ends of the stems, where new leaves form (Leroy C and Quilichini A, unpublished data). This could be considered a tolerance strategy analogous to the *A. octoarticulatus*/*C. nodosa* system (Edwards & Yu 2008) where hiding flowers on new shoots that are not already ant-patrolled confers a reproductive advantage to growing plants. On the other hand, our data cannot exclude the existence of retaliation mechanisms by the plant such as a decrease in the plant's investment in traits related to myrmecophytism (i.e. domatia and extra-floral production) in response to highly virulent *A. decemarticulatus* colonies.

Prevention of fertilization as a by-product of ant activity

The presence of *Allomerus decemarticulatus* has an indirect negative effect on its host plant's fertilization and/or fruit maturation. This negative effect can result from (i) the destruction of fertilized flowers and young fruits by ants, (ii) reduced pollen vigour caused by ants and/or (iii) the decreased presence of effective pollinators due to ant patrolling and predatory activity. Given that neither *A. decemarticulatus* workers damaging flowers in bloom nor damaged fruit were observed, the first hypothesis can be ruled out. The negative impact of ants on pollen viability has been documented in several species (Beattie *et al.* 1984; Beattie *et al.* 1985; Hull & Beattie 1988; Wagner 2000), but *A. decemarticulatus* does not fit into this scheme. Workers have never been found on the anthers, and the long filaments in *H. physophora* flowers seem to prevent any contact between the ants and pollen when flowers

are open. On the other hand, cases of ants diminishing the flowers' attractiveness to pollinators by robbing nectar (Wyatt 1980; Ghazoul 2001) or deterring visits by pollinators solely by their presence have been reported in the literature (Gaume *et al.* 2005; Ness 2006), and *A. decemarticulatus* workers have commonly been observed patrolling flowers in bloom. It is very likely that such negative interactions between pollinators and *A. decemarticulatus* workers partly explain the lower fruit production of *H. physophora* in the presence of ants.

Limitations to plant reproduction not related to the presence of ants

Ants are not solely responsible for the small fruit set produced by *H. physophora*. The hand-pollinated inflorescences produced more fruits than the ant-excluded ones, suggesting that fertilization is not optimum under natural conditions. The limited quantity of pollen deposited on the stigmas during open pollinations – resulting from the scarcity and/or the low efficiency of pollinators – can account for this difference. A lower pollen quality, linked to self-incompatibility or early-acting inbreeding depression (Charlesworth & Charlesworth 1987; Husband & Schemske 1996; Sage *et al.* 2001), is another explanation. Even when the stigmas were saturated with allopollen, thus compensating both the quantitative deficiencies and qualitative limitations, there were never as many fruits as pollinated flowers. More data are needed to determine the role of the abortion of fruits as an adaptive strategy to counteract competition between ovaries for limited resources (Stephenson 1981) or as a response to inbreeding (Seavey & Bawa 2006). The putative high abortion rate in *H. physophora* could also be the consequence of a flower-overproduction strategy. Clustered flowers could indeed enhance the attractiveness of inflorescences, thus partly compensating the potential negative effect of ant presence on the flowers.

Conclusion

In conclusion, this study demonstrates that ant activity has negative effects on plant reproduction that are both direct and indirect. Moreover, *H. physophora* must surpass reproductive limitations that are not related to ant activity, but which can alter the global outcome of the relationship. The reproductive success of *H. physophora* should also be examined over the entire lifespan of individuals and not considered to be tantamount to one reproductive event. As a woody flowering plant, *H. physophora* has a modular growth and can produce several reproductive units per individual during each flowering season. *Hirtella physophora* has been proven to have a lifespan 10 times superior to that of *A. decemarticulatus* colonies (Orivel *et al.* 2010), which can count in the determination of the

overall fitness of the individuals.

Acknowledgements

We are grateful to the *Laboratoire Environnement de Petit Saut* for furnishing logistical help, to Isabelle Henry for her help in the field, to Jean-Baptiste Ferdy for statistical help and to Andrea Yockey-Dejean for editing the manuscript. Financial support for this study was provided by a research program of the French *Agence Nationale de la Recherche* (research agreement n°ANR-06-JCJC-0109-01), by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program, by the *Programme Convergence 2007-2013 Région Guyane* from the European Community (Project DEGA), and by the *Programme Amazonie II* of the French *Centre National de la Recherche Scientifique* (Project 2ID).

5.3 Article 3 : The importance of host responses in maintaining a low level of parasitic castration behaviour in an ant-plant mutualism

Soumis à Proceedings B

Pierre-Jean G. Malé^{1,2}, Céline Leroy³, Olivier Roux³, Jérémie Lauth³, Alain Dejean³, Jérôme Orivel^{1,2,3} and Angélique Quilichini³

¹Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

²CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

³CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France

Abstract

The diversion of a host's energy by a symbiont for its own benefit is a major source of instability in horizontally-transmitted mutualisms if not counter-balanced by host retaliation against exploiters. Such host responses are crucial to the continuance of the relationship. We focused on the obligatory association between the ant-plant *Hirtella physophora* and the ant *Allomerus decemarticulatus*. The plant provides the ants with shelter in leaf pouches and with extrafloral nectar in exchange for protection, yet the ants are known to partially castrate their host plant. We studied plant responses to various levels of castration in terms of (i) global vegetative investment and (ii) investment in myrmecophytic traits. Castration led to a greater plant growth rate, highlighting a novel case of gigantism induced by parasitic castration. Moreover, totally castrated plants produced significantly smaller domatia and extrafloral nectaries than partially castrated and non-castrated plants. Such a decrease in the investment in myrmecophytic traits demonstrates the existence of threshold-inducible sanctions for the first time within the framework of ant-plant interactions. Over time, this mechanism promotes an intermediate level of castration and enhances the stability of the mutualistic relationship by providing the ants with more living space while allowing the plant to reproduce.

Keywords: Evolutionary conflict; cheater; mutualism breakdown; sanction.

Introduction

Mutualisms are defined as reciprocally beneficial interactions between organisms, but they can also be viewed as ‘reciprocal exploitation’ (Herre *et al.* 1999). Since the resources invested by one partner in its own reproduction are lost for the other partner, any horizontally-transmitted mutualism should be subject to a trade-off between the host’s and the symbiont’s own reproduction. Such a trade-off is thus a major source of instability, and would turn every mutualist into parasite if not counterbalanced by the local dispersion of both partners as well as host partner choice and retaliation against exploiters (Wilkinson & Sherratt 2001). As a consequence, over time symbionts would completely sterilize their hosts and incomplete sterilization is considered ‘suboptimal virulence’ (Jaenike 1996; O’Keefe & Antonovics 2002).

Ant-plant mutualisms provide an interesting framework for studying this trade-off. Because of the horizontal transmission of these relationships, ants should tend to become parasites. Moreover, because of the obligatory nature of most of these relationships, the plant cannot escape such exploitation by ending the interaction without drastically reducing its level of fitness. The growth of the ant colony is constrained by the nesting space provided by the plant (Fonseca 1993; Orivel *et al.* 2010). Such a conflict between plant reproduction and ant-colony growth might likely explain the castration behaviour exhibited by several plant-ants (Yu & Pierce 1998; Izzo & Vasconcelos 2002; Gaume *et al.* 2005; Malé *et al.* submitted-a). This hypothesis, however, is based on the major assumption that there is a trade-off between vegetative growth and reproduction in myrmecophytes. On the other hand, given the modular growth and autotrophy of plants, each module could theoretically be able to pay its own resource costs, for example, through greater photosynthesis in nearby leaves and in some of its floral structures (Watson 1984; Obeso 2002).

Despite the ant-induced limitations to their reproduction, myrmecophytes manage to reproduce even in the presence of ants. An intermediate level of castration has indeed been observed in several *Allomerus* plant-ants (Izzo & Vasconcelos 2002; Edwards & Yu 2008; Malé *et al.* submitted-a). It probably results from tolerance mechanisms that have been highlighted in two of these systems. *Hirtella myrmecophila* mostly produces flowers close to old leaves whose leaf pouches have abscised, while *Cordia nodosa* produces significantly more flowers on new shoots when inhabited by castrating *Allomerus* ants (Izzo & Vasconcelos 2002; Edwards & Yu 2008). However, although never studied in these systems, resistance mechanisms are thought to result in the same pattern of intermediate virulence.

Indeed, sanctions have recently been pointed out as a key factor in preventing cheating in ant-plant mutualisms (Edwards *et al.* 2010). But tolerance and resistance mechanisms lead to very different evolutionary paths (Best *et al.* 2009). As a consequence, proving the presence/absence of resistance mechanisms in ant-plants is critical to our understanding of the maintenance of such relationships.

In this study, we focus on one of these plant-*Allomerus* systems involving *H. physophora* and *A. decemarticulatus* and for which an intermediate level of castration virulence has been found (Malé *et al.* submitted-a). We aim to quantify (i) the increase in the vegetative growth of the plant that is thought to result in a net benefit for the resident ants, and (ii) the plant's investment in its myrmecophytic traits in response to the castration behaviour. We experimentally address the issue of intermediate castration virulence by assessing the plant's investment in myrmecophytic traits when castration is partial, complete or non-existent. We then discuss the implications of the different plant responses (i.e. gigantism and sanctions) on the continuance of the mutualistic relationship.

Materials and methods

Study site and model

This study was conducted in French Guiana between August 2008 and January 2010 on two populations of *H. physophora* less than one kilometre apart in the area of *Petit Saut*, Sinnamary (05°03'30"N; 52°58'34"W).

Hirtella physophora is an understory treelet that occurs strictly in pristine Amazonian rainforest. Plant individuals have long-lived leaves that bear a pair of pouches, called 'domatia', at the base of each lamina (Leroy *et al.* 2008). Circular extra-floral nectaries (EFNs) occur on the abaxial surface of the lamina and inside the domatia. They differ morphologically, with the EFNs in the domatia being three times larger than the ones on the lamina (Leroy *et al.* 2008). *Hirtella physophora* is a self-incompatible, entomogamous species and two flowering periods can be distinguished annually: from December to February, and June to August (P-J. G. Malé, C. Leroy & A. Quilichini, pers. obs.).

In the study area, plant individuals are almost exclusively inhabited by *A. decemarticulatus* with a single colony per plant (Solano *et al.* 2003). Moreover, *A. decemarticulatus* has never been found in association with another myrmecophyte (Grangier *et al.* 2009). Like in any other protective mutualism between ants and plants, *A. decemarticulatus* workers protect their host plant from defoliators (Grangier *et al.* 2008).

However, *A. decemarticulatus* also destroys almost two-thirds of the buds of its host plant, resulting in very low fruit production (Orivel *et al.* 2010; Malé *et al.* submitted-a).

Experimental protocol

A total of 54 flowering *H. physophora* were selected and the last leaf of every branch marked. We first inspected the plants for the presence of patrolling *A. decemarticulatus* workers, and then assigned them randomly to three groups of 18 individuals. These groups were similar in terms of size, base diameter, and number of branches, leaves and inflorescences. Each group was submitted to one of the three following experimental treatments: (1) all of the inflorescences were cut off at an early stage in their development ('total castration'); (2) untreated plants underwent an ant-induced, partial castration ('intermediate castration'); and (3) ants were excluded from all of the inflorescences by applying rings of Tanglefoot[®] on either side of the peduncles on shoots previously protected by aluminium foil ('no castration'). Each month, the number of new leaves and inflorescences was recorded, and the plants were subject to the same experimental treatment again when necessary (i.e. cutting off the inflorescences or excluding ants at an early stage of inflorescence development).

The experiment ended 17 months later, i.e. at beginning of the fourth flowering period. Nine individuals were not taken into account because of the death of their guest ant colony or of the plant itself over the course of the experiment. We recorded the number of remaining pre-experimental leaves. When possible, the two youngest pre-experimental leaves and two leaves that had reached maturity during the experiment were collected. For each leaf collected, we estimated its surface using ImageJ v1.34 software, and quantified the volumes of the two domatia. Domatium volume was estimated based on the volume of an ellipsoid for which the three elliptic radii were equal to the length, width and height of the domatium. We also counted the number of EFNs and measured the surface areas of four of them on the lamina, and four others in the domatia.

We then assessed the effect of the experimental treatment on myrmecophytic characteristics by comparing (i) the domatium volumes, (ii) the number of EFNs per leaf, and (iii) the surface areas of domatium EFNs and laminal EFNs based on the experimental treatment and with pre-experimental leaves. The plants' investment in vegetative parts was assessed by comparing the number of newly-produced leaves and the abscission rate of old leaves between the three groups. We also compared the surface of the leaves based on the three experimental treatments and with the pre-experimental leaves. The effect of the

experimental treatments on plant investment in reproduction was quantified by comparing the final number of inflorescences between the three experimental groups.

Statistical analyses

All statistical analyses were conducted using R (R Development Core Team 2009). The data were analyzed using Generalized Linear Mixed-effect Models (GLMM), most of them conducted with the `lme` function in the *nlme* package (Pinheiro *et al.* 2009). Population ID was fitted as a random effect in all analyses, and, when appropriate, plant ID was nested in population ID. The abscission rate of old leaves was assessed using the `lmer` function in the *lme4* package (Bates & Maechler 2009). The final number of leaves was considered as the ‘successes’ and the initial number of leaves minus the final number of leaves as the ‘failures’ in a binomial distribution. We assessed model fit through the visual evaluation of residual plots and by using the Shapiro-Wilk normality test. We tested for the autocorrelation and heteroskedasticity of the residuals by conducting the Durbin-Watson and Breusch-Pagan tests using, respectively, the `dwtest` and the `bptest` functions in the *lmtest* package (Zeileis & Hothorn 2002).

Results

Non-castrated plants produced fewer new leaves than totally or partially castrated ones (Table 1, Fig. 1), but bore as many remaining pre-experimental leaves (GLMM: $df = 2$; $\chi^2 = 0.067$; $p = 0.9672$). However, there was no significant difference in new-leaf production between totally and partially castrated plants (Table 1, Fig. 1). Nor was there any significant difference in leaf surface based on the treatment or for pre-experimental leaves (GLMM: $df = 3$; $F = 1.074$, $p = 0.3628$). At the end of the experiment, the three groups produced the same number of inflorescences (GLMM: $df = 2$; $F = 1.697$, $p = 0.1965$), which showed that the plant's investment in reproduction was not affected by the outcome of previous flowering periods.

New leaves on totally castrated plants bore significantly smaller domatia than did pre-experimental ones (GLMM: $df = 3$; $F = 4.585$, $p = 0.0037$; Table 2a, Fig. 2a). Although the experimental treatment did not affect the total number of EFNs per leaf (GLMM: $df = 3$; $F = 0.449$, $p = 0.7188$), totally castrated plants had significantly smaller laminal and domatial EFNs than both pre-experimental leaves and new leaves on non-castrated plants (GLMM, lamina EFN: $df = 3$; $F = 3.157$, $p = 0.0197$; domatia EFN: $df = 3$; $F = 4.706$, $p = 0.0029$;

Tables 2b-c, Fig. 2b-c).

Table 1 Number of leaves produced during the experiment as a function of the treatment ('No castration', plants with inflorescences from which ants were excluded; 'Intermediate castration', plants that were left untreated and with some inflorescences destroyed by ants; 'Total castration', plants with all of their inflorescences experimentally removed at an early stage) and base diameter. DF, number of degrees of freedom; SE, standard error.

a) Significance of the variables

	DF	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value	
Treatment	2	7.530	0.0017	**
Base diameter	1	37.490	<0.0001	***

b) Coefficients estimated by the model

	Estimate	SE	DF	<i>t</i> -value	<i>p</i> -value	
Treatment						
No castration.	0.000	0.000				
Intermediate castration	3.366	1.558	39	2.160	0.0370	*
Total castration	5.802	1.562	39	3.714	0.0006	***
Base diameter	5.862	0.957	39	6.123	<0.0001	***

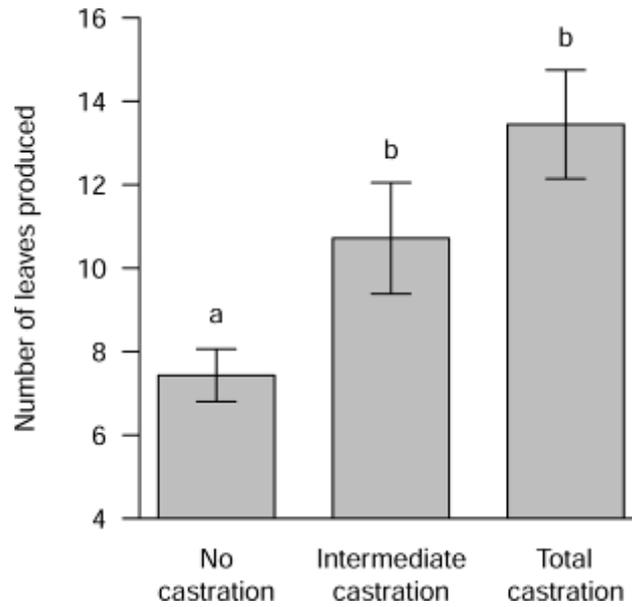


Figure 1. Barplot of the mean (\pm SE) numbers of leaves produced during the experiment as a function of the treatment ('No castration', plants with inflorescences from which ants were excluded; 'Intermediate castration', leaves produced during the experiment by untreated plants (i.e. plants with some inflorescences destroyed by ants); 'Total castration', plants with all of their inflorescences experimentally removed at an early stage). Population ID has been taken into account as a random effect. Letters indicate significant differences in the number of leaves (GLMM, p -values < 0.05).

Table 2 Effect of Treatment ('Pre-experiment', leaves produced prior to the beginning of the experiment; 'No castration', leaves produced during the experiment by plants with inflorescences from which ants were excluded; 'Intermediate castration', plants that were left untreated and with some inflorescences destroyed by ants; 'Total castration', leaves produced during the experiment by plants with all of their inflorescences experimentally removed at an early stage) on (a) domatia volume, (b) diameter of extra-floral nectaries located on the laminas, and (c) diameter of extra-floral nectaries located inside of domatia. DF, number of degrees of freedom; SE, standard error.

	Estimate	SE	DF	t-value	p-value
a) Volume of domatia					
Treatment					
Pre-experiment	0.000	0.000			
No castration	-9.772	5.794	288	-1.686	0.0928
Intermediate castration	-4.175	6.246	288	-0.668	0.5044
Total castration	-20.286	6.068	288	-3.343	0.0009 ***
b) Diameter of extra-floral nectaries on laminas					
Treatment					
Pre-experiment	0.000	0.000			
No castration	0.003	0.003	537	1.068	0.2861
Intermediate castration	-0.002	0.004	537	-0.531	0.5954
Total castration	-0.010	0.004	537	-2.900	0.0039 **
c) Diameter of extra-floral nectaries inside of domatia					
Treatment					
Pre-experiment	0.000	0.000			
No castration	-0.001	0.006	605	-0.083	0.9338
Intermediate castration	-0.014	0.007	605	-1.937	0.0533
Total castration	-0.022	0.007	605	-3.271	0.0011 **

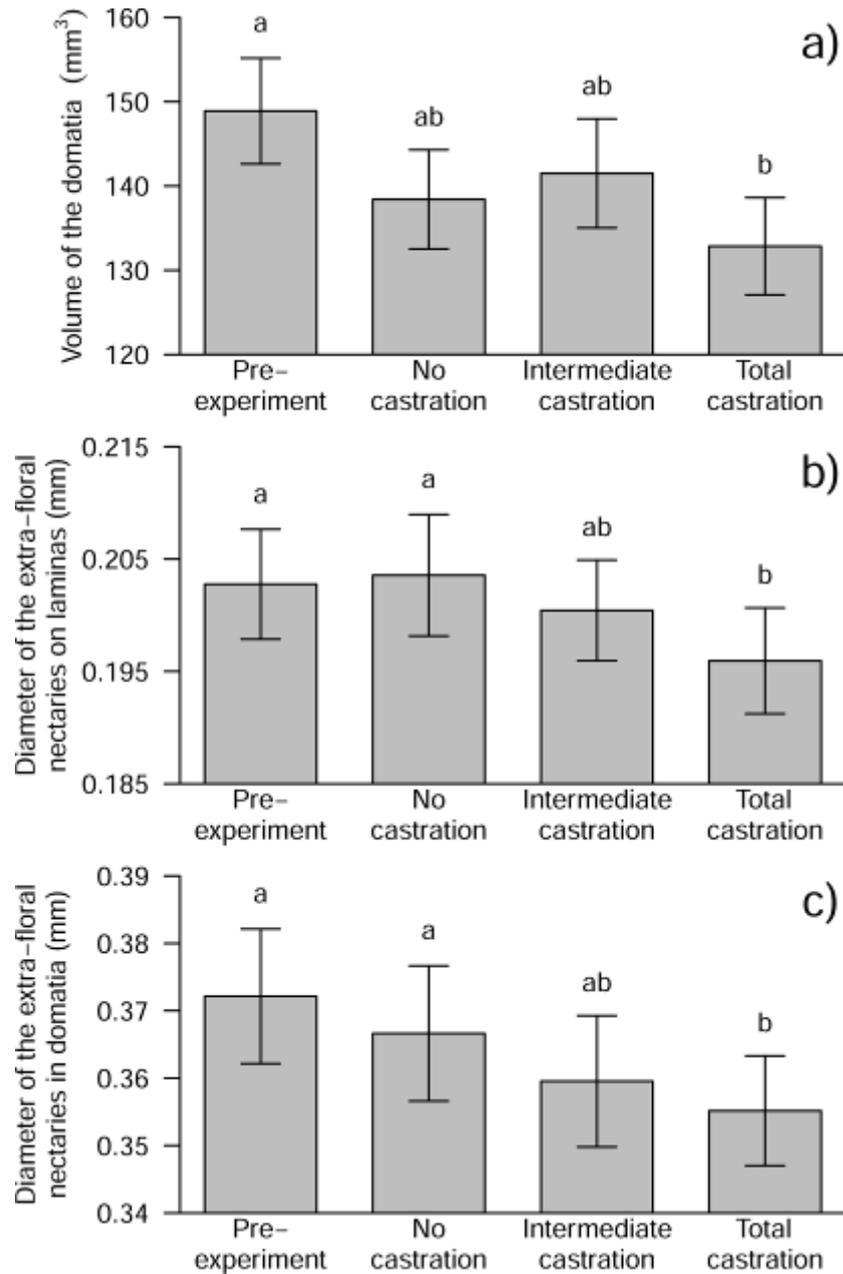


Figure 2. Barplot of the mean (\pm SE) of three morphological traits [‘a’], volume of domatia; ‘b’], diameter of the extra-floral nectaries located on the laminas; ‘c’], diameter of the extra-floral nectaries located inside of domatia] as a function of the treatment (‘Pre-experiment’, leaves produced before the beginning of the experiment; ‘No castration’, leaves produced during the experiment by plants with inflorescences from which ants were excluded; ‘Intermediate castration’, leaves produced during the experiment by untreated plants (i.e. plants with some inflorescences destroyed by ants); ‘Total castration’, leaves produced during the experiment by plants with all of their inflorescences experimentally removed at an early stage). Plant ID has been taken into account as a random effect. Letters indicate significant differences (GLMM, p-values < 0.05).

Discussion

Our results demonstrate that there is a trade-off between vegetative growth and reproduction in *H. physophora*. Through their castration behaviour, *A. decemarticulatus* colonies enhance the vegetative growth of their host plants, and, in this way, benefit from more living space. Consequently, the destruction of the sexual organs can be assimilated to a parasitic castration inducing gigantism (Hall *et al.* 2007), as has already been observed in another ant-plant interaction (Frederickson 2009).

Under natural conditions, ant-inhabited *H. physophora* are subjected to an intermediate castration virulence, which results in the destruction of two-thirds of the floral buds (Malé *et al.* submitted-a). These plants produce more leaves than those bearing inflorescences from which ants have been excluded, confirming that *A. decemarticulatus* colonies obtain more living space than putative non-castrating ants. However, intermediate and total castration virulence led to the same increase in leaf production, highlighting that there is virtually no advantage for *A. decemarticulatus* to totally castrate its host plant, at least over the short term.

Nevertheless, the total castration of *H. physophora* induces a decrease in its investment in myrmecophytic traits. This reduction affects both housing and food resources with a decrease in the volumes of the domatia and a reduction in the surface areas of the EFNs. As living space is an important limiting factor to the growth and reproduction of the colonies (Orivel *et al.* 2010), any decrease is likely to affect the fitness of too virulent colonies. It is, however, still unclear if the loss of space resulting from the decrease in the volume of the domatia can be compensated by an increase in the number of domatia. Indeed, even if the putative negative effect remains to be proven, any decrease in domatial volume is likely to affect the ants' fitness through the number of alates each domatia can host. The leaves produced by totally castrated *H. physophora* bore smaller EFNs than leaves on partially and non-castrated plants. Since the quantity of nectar produced is proportional to the volume of the nectarial parenchyma (Pacini *et al.* 2003), the smaller the EFNs, the less nectar they are supposed to produce. Ants inhabiting totally castrated plants should thus experience a potentially harmful decrease in their carbohydrate intake (Dussutour & Simpson 2009). By analogy with ant-rhizobia interactions, both a reduction in living space and in the amount of food provided can be considered as sanctions by the plant (West *et al.* 2002). Such retaliation mechanisms are highlighted here for the first time in the framework of ant-plant interactions.

These sanctions are likely to elicit an arms race between hosts and symbionts. It is thought that the symbionts should eventually bypass their host's defences and completely prevent it

from reproducing (Best *et al.* 2009; Weyl *et al.* 2010). Nevertheless, in the present case, the destruction of a fraction of the sexual organs seems to be the best compromise for both partners because it favours the stable persistence of the interaction. Sanctions were only induced above a virulence threshold of total castration, as partially castrated plants did not differ from those from which ants had been excluded from the inflorescences. As a consequence, over the long term, it is unsure that ants that totally castrate their host plant gain a fitness advantage compared to ants with an intermediate level of virulence. Nevertheless, intermediate castration virulence is not an optimum situation for *H. physophora*. Plants with a lower tolerance to castration should get a higher fitness benefit. But the global fitness of an individual has to be considered over its lifespan. As the energy that a plant invests in reproduction is lost for vegetative investment, there is a trade-off between reproduction and survival, leading to a trade-off between current reproductive output and future reproduction (Obeso 2002). The ant-induced reduction in one reproduction event is thus likely to result in an increase in the life expectancy of the plant, and, consequently, in an increase in the plant's subsequent reproductive success.

Acknowledgements

We are grateful to the *Laboratoire Environnement de Petit Saut* for furnishing logistical help, to Jean-Baptiste Ferdy for statistical help and to Andrea Yockey-Dejean for editing the manuscript. Financial support for this study was provided by a research program of the French *Agence Nationale de la Recherche* (research agreement n°ANR-06-JCJC-0109-01), by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program, by the *Programme Convergence 2007-2013 Région Guyane* from the European Community (Project DEGA), and by the *Programme Amazonie II* of the French *Centre National de la Recherche Scientifique* (Project 2ID).

CHAPITRE 2 :

Stabilité de l'association à l'échelle évolutive

La virulence suboptimale dont fait preuve *A. decemarticulatus* au travers de son comportement de castration à l'encontre des inflorescences d'*H. physophora* pourrait être expliquée par un mode de transmission pseudo-vertical de l'association. Ce phénomène permettrait d'aligner les intérêts des partenaires dans leur reproduction réciproque (Kiers & van der Heijden 2006). Un mode de transmission local de la relation, bien que moins strict dans l'association des lignées de chaque partenaire encouragerait également la modération de la virulence des fourmis en défavorisant les colonies prêtes à s'engager dans la Tragédie des Communs (Rankin *et al.* 2007).

Le mode de transmission de la relation et la biologie de la reproduction des partenaires de l'association sont interdépendants. Si le premier est une conséquence directe de la seconde, l'existence même de la relation est susceptible d'influencer grandement le mode de reproduction des individus. Le comportement de castration que montrent les fourmis en est un parfait exemple. La biologie de la reproduction d'*H. physophora* étant totalement méconnue, nous avons utilisé des approches expérimentales à la fois directes et indirectes pour combler ce manque. Par ailleurs, l'utilisation de méthodes moléculaires nous a également permis d'inférer le mode de transmission de l'association entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus*.

1 La reproduction de la plante-hôte

Les seules mentions relatives à la biologie de la reproduction d'*H. physophora* dans la littérature sont des suppositions basées sur des analogies avec des espèces congénériques (Prance & White 1988).

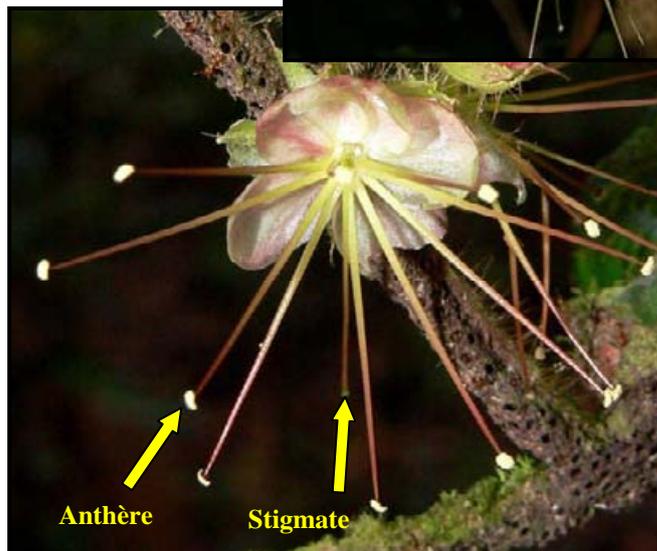
La phénologie de la floraison a été étudiée durant la période de reproduction dans quatre populations (Article 4). Les caractères végétatifs des individus reproducteurs ont été mesurés et comparés à ceux des individus non reproducteurs. Il est apparu que la floraison des individus d'une même population est synchrone et dure moins de deux semaines. La floraison peut être induite chez tous les individus quels que soient leur hauteur ou le diamètre de la base de leur tronc, à condition qu'ils comptent un nombre minimum de feuilles. Le mode de pollinisation de la plante a été déterminé selon une approche indirecte par mesure de traits floraux pouvant être associés à un type de pollinisateurs, et une approche directe à l'aide d'expériences de pollinisations manuelles contrôlées. Dans un premier temps, nous avons étudié les caractères reproducteurs d'*H. physophora* chez afin de préciser la biologie florale de l'espèce (Encadré 3). Pour cela, nous avons suivi 150 individus appartenant à quatre populations au cours de la période de reproduction de la plante. Dans les populations étudiées, l'appareil reproducteur d'*H. physophora* est constitué de fleurs disposées en inflorescences principalement situées en bout de branche. Les inflorescences sont composées de quatre à cinq fleurs qui s'ouvrent simultanément. Les fleurs sont hermaphrodites et hercogames : elles possèdent cinq à sept étamines et un long style séparés dans l'espace ce qui réduit la capacité d'autopollinisation spontanée. Elles comptent deux ovules dont un seul se développe et donne une graine tandis que l'autre avorte. Par ailleurs, elles produisent du nectar grâce à des glandes situées dans l'hypanthium. L'ensemble des traits mesurés semble favoriser l'hypothèse d'une fécondation croisée chez *H. physophora*, dans les populations étudiées. Cette hypothèse est renforcée par la valeur élevée du ratio nombre de grains de pollen / nombre d'ovules que nous avons calculée, compatible avec une reproduction allogame (Cruden 1977).

Encadré 3 : l'appareil reproducteur d'*H. physophora*

Quatre à cinq fleurs qui s'ouvrent simultanément sont portées par des inflorescences racémeuses courtes.



Elles sont généralement issues d'un bourgeon axillaire mais peuvent toutefois se développer sur l'entre-nœud (un synonyme d'*H. physophora* est *H. cauliflora*).



Les fleurs sont zygomorphes et portent cinq sépales verts et cinq pétales blancs à rose pâle alternes avec les sépales. Elles sont hermaphrodites et hercogames : elles possèdent cinq à sept étamines et un long style séparés dans l'espace.

Nous avons également mené des expériences de pollinisations contrôlées afin de déterminer expérimentalement le mode de reproduction d'*H. physophora* (Article 4). Quatre inflorescences par individu, pour un total de 24 plantes, ont été soumises aux traitements suivants : (1) témoin en pollinisation libre, (2) autopollinisation spontanée, i.e. les inflorescences en boutons ont été enveloppées dans une moustiquaire afin d'empêcher la visite d'éventuels pollinisateurs, (3) autopollinisation manuelle, i.e. les fleurs ont été pollinisées par nos soins à l'aide de pollen d'une autre fleur du même individu puis ensachées pour exclure les pollinisateurs et (4) allopollinisation manuelle, i.e. les fleurs étaient pollinisées par nos soins à l'aide de pollen de fleurs d'un autre individu, les pollinisateurs étant également exclus. L'accès des fourmis aux inflorescences était interdit dans les traitements (2), (3) et (4). A l'issue de l'expérience, seules les fleurs ayant reçu du pollen d'autres individus ont produit des fruits. Ce résultat indique qu'*H. physophora* est strictement allogame du fait probablement de mécanismes d'autoincompatibilité ou de dépression de consanguinité précoce. Par ailleurs, les fleurs allopollinisées manuellement ont produit plus de fruits que celles pollinisées librement (témoins), ce qui signifie que la pollinisation en conditions naturelles n'est pas optimale. Or, nous avons vu au cours du chapitre précédent que les fleurs accessibles aux fourmis produisent moins de fruits que les fleurs débarrassées des fourmis. L'effet négatif d'*A. decemarticulatus* sur la fécondation de sa plante-hôte aurait donc lieu au cours du processus de pollinisation.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons effectué le suivi des rythmes d'activité des différents insectes que nous avons observé sur *H. physophora* (Article 4). Ainsi, nous avons pu déterminer que le niveau de patrouille des fourmis à la surface des feuilles de leur plante-hôte varie au cours de la journée avec un maximum en début d'après-midi et deux périodes d'activité réduites à l'aube et au crépuscule. Nous avons obtenu des résultats très similaires en ce qui concerne la présence des fourmis à l'intérieur des fleurs d'*H. physophora*. Très peu d'insectes autres que les fourmis ont été observés sur les fleurs. Ainsi, durant nos périodes d'observations (sur 24h) seules deux espèces de Lépidoptères ont pu être relevées, dont un Geometridae dont le comportement pourrait correspondre à celui d'un pollinisateur (Fig. 8). L'activité des papillons était concentrée sur les quelques heures du crépuscule. Il existerait donc une ségrégation temporelle entre l'activité des fourmis résidentes et celle des pollinisateurs potentiels sur les fleurs de la plante-hôte. Une telle ségrégation réduit les interférences entre *A. decemarticulatus* et les pollinisateurs d'*H. physophora*, indiquant ainsi un possible conflit entre la pollinisation de la plante et sa protection. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une ségrégation spatiale entre l'activité des fourmis et celle des

pollinisateurs : la majorité des inflorescences se trouve en bout de branches, dans des endroits où, le piège des *A. decemarticulatus* n'étant pas encore construit, les fourmis risquent moins d'interférer avec les activités des pollinisateurs.

En somme, l'activité des fourmis a un double effet négatif sur la reproduction de leur plante-hôte : *H. physophora* voit son succès reproducteur réduit par leur présence lors de la maturation de ses boutons, du fait de leur comportement de castration, et lors de sa pollinisation, du fait d'interférences probables avec les pollinisateurs. Cependant, ce dernier effet peut potentiellement se révéler positif. En interférant avec l'activité des pollinisateurs, les ouvrières d'*A. decemarticulatus* favorisent des visites de courtes durée sur chaque fleur, et des déplacements fréquents de fleurs en fleurs, donc d'individus en individus. Par conséquent, la présence des fourmis au sein des fleurs d'*H. physophora* semble être un facteur promoteur de l'allogamie.



Figure 8 : Un papillon crépusculaire pollinisateur d'*H. physophora* filmé à l'aide d'une caméra de surveillance à infrarouges équipée d'un détecteur de mouvements.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que malgré le double effet négatif de l'activité des fourmis sur sa reproduction qui se surajoute aux limitations qui lui sont propres, *H. physophora* est strictement allogame. Il paraît pourtant théoriquement avantageux pour *H. physophora* dans ces conditions de pouvoir s'autoféconder pour assurer la production de descendants malgré la présence de mutualistes potentiellement néfastes pour les visites de

pollinisateurs. Or, un système d'auto-incompatibilité semble avoir été sélectionné chez *H. physophora* pour éviter les conséquences négatives de la consanguinité sur la valeur sélective. Cette pression de sélection repose sur la présence de suffisamment de variabilité génétique au sein des populations pour que la descendance issue de l'autogamie soit significativement différente d'un point de vue génétique de la descendance issue de l'allogamie. Une telle situation est concevable dans le cas de grandes populations panmictiques. Mais *H. physophora* est-il bien dans ce cas-là ? La répartition en patches au sommet des collines des individus d'*H. physophora* est susceptible d'engendrer l'isolement de ces patches les uns des autres et l'activité temporellement réduite des papillons crépusculaires pollinisateurs ne semble pas favorable à des flux de pollen très importants entre collines. Afin de tester cette hypothèse, il convient donc d'examiner la structuration de l'information génétique au sein des populations d'*H. physophora*.

2 La structuration géographique de l'information génétique et le mode de transmission de l'association

La structure de l'information génétique au sein des populations d'*H. physophora* peut influencer les pressions de sélection qui s'exercent sur le mode de reproduction de la plante, nous venons de le voir. De plus, l'intensité de cette structuration chez les deux partenaires peut avoir des conséquences importantes sur la stabilité de l'association entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus*, puisqu'elle et le mode de transmission de la relation sont interdépendants. Afin d'étudier la répartition spatiale de la variabilité génétique au sein des populations des deux partenaires de l'association, nous avons utilisé des marqueurs microsatellites, marqueurs moléculaires hypervariables. Nous avons ainsi développé deux banques de microsatellites.

La première concerne *A. decemarticulatus* (Article 5). Développée sur base de clonage, elle compte cinq nouveaux marqueurs polymorphes multiplexés avec sept marqueurs précédemment développés sur d'autres espèces de fourmis. La seconde concerne *H. physophora* (Article 6). Seize marqueurs polymorphes spécifiques ont été isolés grâce au pyroséquençage d'une banque enrichie en microsatellites. Parmi tous ces marqueurs, nous avons choisi de n'utiliser que ceux dont la lecture était la moins ambiguë parmi les plus informatifs. Quatorze collines réparties dans cinq régions géographiques en Guyane française ont été parcourues, ce qui correspond à 380 *H. physophora* et 363 colonies d'*A. decemarticulatus* échantillonnées et géotypées avec succès (Article 7).

Dans un premier temps, nous avons étudié la structuration génétique des deux espèces à fine échelle. Nous avons donc recherché une éventuelle structuration spatiale de l'information génétique au sein même des collines et avons estimé la distance de dispersion des deux partenaires. Bien que les distances de dispersion estimées des deux partenaires soient faibles, il n'est pas apparu de structuration génétique indiscutable entre individus permettant d'affirmer que les plus proches voisins sont les plus proches parents. Cette observation

invalide donc l'hypothèse de transmission pseudo-verticale de l'association susceptible de lier les succès reproducteurs des partenaires.

A une plus large échelle, il est apparu que les deux partenaires présentent des populations très structurées et consanguines, avec un isolement par la distance entre collines particulièrement marqué. Les structures de populations sont comparables entre *A. decemarticulatus* et *H. physophora*, quoi que la plante montre une structuration moins prononcée que les fourmis. En effet, quasiment chacune des collines échantillonnées a été identifiée comme étant une population à part chez *A. decemarticulatus*, tandis que les populations d'*H. physophora* sont connectées par des flux de gènes plus importants, probablement dus à des événements de dispersion des graines d'une population à l'autre. Ce second ensemble de résultats met en lumière une situation défavorable à une importante virulence de la part des fourmis. En effet, des distances de dispersion d'un même ordre de grandeur que les dimensions des patches étudiés impliquent que des lignées de plantes et des lignées de fourmis interagissent au sein des mêmes zones géographiques au cours de nombreuses générations. De ce fait, une virulence très intense des fourmis à l'encontre des inflorescences de leurs plantes-hôtes serait susceptible de mener à l'extinction locale de patches d'*H. physophora*, donc de patches d'*A. decemarticulatus* au sein desquels les fourmis castratrices seraient issues de mêmes lignées.

3 Conclusion

Nous nous sommes penchés sur le mode de transmission de l'association entre *A. decemarticulatus* et *H. physophora* afin d'expliquer pourquoi les fourmis ne détruisent pas systématiquement toutes les inflorescences de leur plante-hôte. En effet, un mode tel que la transmission pseudo-verticale, corrélant les succès reproducteurs des partenaires, tendrait à limiter la virulence des fourmis du fait d'un effet rétroactif négatif de type fidélité au partenaire. Or, nous avons montré que le mode de transmission de l'association entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus* n'est pas pseudo-vertical. Cependant, notre étude a révélé que les distances de dispersion des deux partenaires sont courtes et mènent à une transmission locale de l'association. Bien que n'entraînant pas l'interdépendance des succès reproducteurs des protagonistes, la transmission locale n'encourage pas non plus les fourmis à atteindre un niveau maximal de virulence. En effet, dans ce cadre-là, sur chaque colline on peut observer des familles d'*H. physophora* plus ou moins proches parents habités par des familles d'*A. decemarticulatus*. La ressource « plante-hôte » peut donc être considérée comme un bien commun partagé entre des colonies de fourmis apparentées. Il en résulte que l'empêchement systématique de toute reproduction pour *H. physophora* mènerait à la Tragédie des Communs les familles d'*A. decemarticulatus* trop virulentes. Ainsi, bien que son effet se fasse sentir à plus long terme que la transmission pseudo-verticale, la transmission locale de l'association que nous avons observée engendre la contre sélection des colonies de fourmis trop virulentes.

La transmission locale de l'association peut également influencer l'efficacité des sanctions mises en jeu par *H. physophora* à l'encontre d'*A. decemarticulatus*. La transmission locale devrait donner lieu à des processus coévolutifs et l'adaptation locale des partenaires l'un à l'autre (Anderson *et al.* 2004). Or, nous avons vu que les fourmis *A. decemarticulatus* possédant un cycle de vie plus court qu'*H. physophora* sont censées évoluer plus vite, s'adapter plus rapidement aux changements qui surviennent chez leur hôte. Elles devraient donc être en mesure de contourner assez rapidement tout mécanisme de contrôle qu'*H. physophora* leur impose, disposant ainsi d'un avantage coévolutif dans la relation

(Dybdahl & Storfer 2003; Best *et al.* 2009; Weyl *et al.* 2010). Cependant, l'asymétrie des flux de gènes que nous avons observée engendre une plus grande diversité génétique locale chez *H. physophora* que chez *A. decemarticulatus*. Ainsi, *H. physophora* peut rattraper son retard dans la course aux armements (Gandon *et al.* 1996; Gandon & Michalakis 2002). Les mécanismes de contrôle tels que les sanctions que nous avons mises en évidence précédemment sont donc localement en meilleure adéquation avec les caractéristiques de chaque de fourmis (Wilkinson 1997; Wilkinson & Sherratt 2001; Kiers & van der Heijden 2006). Etant plus appropriées et donc plus efficaces, les sanctions appliquées par *H. physophora* aux fourmis lui permettent donc très certainement d'exercer un contrôle efficace sur les populations d'*A. decemarticulatus* en leur imposant un taux suboptimal de virulence.

L'avantage coévolutif conféré à *H. physophora* par les flux de gènes importants entre les populations provient de la diversité génétique dont il dispose, permettant aux populations de s'adapter rapidement aux changements de leur environnement. Les pressions de sélection en faveur de la conservation de cet avantage sont donc susceptibles d'expliquer l'existence de facteurs d'autoincompatibilité chez *H. physophora* malgré les importantes restrictions imposées à sa reproduction. En effet, la reproduction autogame au sein des populations de plante aurait pour effet de diminuer la diversité génétique intrapopulationnelle et ralentirait donc *H. physophora* dans la course aux armements avec *A. decemarticulatus*. Dans les populations étudiées, il semblerait que la sélection ait favorisé un mode de croisement avantagant la qualité de la descendance plutôt que la quantité de descendants.

La possibilité que le conflit opposant la reproduction d'*H. physophora* au comportement castrateur d'*A. decemarticulatus* soit sous contrôle est appuyée par la découverte d'un second conflit opposant la pollinisation de la plante et l'activité protectrice des fourmis. En effet, ce conflit semble résolu par une ségrégation spatiale et temporelle des activités des pollinisateurs et des ouvrières d'*A. decemarticulatus*. Bien qu'il soit plausible que les espèces du genre *Hirtella* aient été pollinisées par des papillons nocturnes ou crépusculaires avant l'association de certaines de ces espèces avec des fourmis, le niveau de spécificité requis pour mettre en œuvre de tels mécanismes est important. Leur existence requiert donc une importante histoire coévolutive à trois entités : la plante-hôte, les fourmis associées et les pollinisateurs.

4 Articles

4.1 Article 4 : Floral biology and breeding system in the myrmecophyte *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae) in French Guiana

Soumis à International Journal of Plant Science

Céline Leroy¹, Pierre-Jean G. Malé^{2,3}, Lucie Lusignan¹, Jérôme Orivel^{2,3}, Angélique Quilichini¹

¹CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France

²CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

³Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

Céline Leroy and Pierre-Jean G. Malé contributed equally to this work.

Abstract

Flowering plants display huge ranges of mutualistic interactions with insects for their protection and reproduction. Nevertheless, entomogamous ant-plants can be affected by potential interferences between their pollinators and hosted ants. However, those ant-plants can prevent those interferences either by avoiding ants' access to the flowers or by selfing capacities. In this study, we investigated the floral biology, breeding system and insects' activities on flowers of the myrmecophytic species, *Hirtella physophora*. Hand-pollination experiments showed that *Hirtella physophora* is an obligate outcrosser and relies on insects to transfer pollen while ants still forage on flowers. Inflorescences, composed of white zygomorphic flowers, are preferentially located where ant galleries are less frequent. Pollination is ensured by crepuscular pollinators and when ant activity is at its lowest. *Hirtella physophora* relies on insects for reproduction and defense. Potential interferences between mutualistic insects during pollination seem to be avoided by both the spatial and temporal segregation of ant activities and pollinators through both floral design and display.

Key words: *Allomerus decemarticulatus*, ant-plant pollinator interactions, entomogamy, floral design, floral display, myrmecophyte, pollination, spatial and temporal segregation.

Introduction

Being sessile, flowering plants have developed a variety of interactions with other living organisms to meet some of their essential biological needs. Among them, plant reproduction and defense frequently depend upon flexible mutualistic interactions, mostly involving insects. Most angiosperm species rely on insects for reproduction *via* pollination. The successful transfer of pollen is so important to the fitness that pollinators exert selection pressure on floral traits (see Johnson 2006), and evolutionary specialization in pollination systems has become a central process in the divergence and diversification of the angiosperms (see Kay and Sargent 2009 and references therein). Pollination systems evolve in the context of the ratio of costs to benefits. Plants' investments, or costs, concern the production of floral tissues, volatile attractants, nectar and/or brood sites for insect visitors (Pyke 1991; Galen et al. 1999; Andersson 2000), but are also associated with the actions of antagonists attracted to flowers and floral rewards (*e.g.* Adler and Bronstein 2004; McCall and Irwin 2006).

Besides pollination, plants have also developed interactions with insects, mostly ants, for the protection of their foliage from predators and competitors (Heil and McKey 2003). Among them, myrmecophytic species (*i.e.* ant-plants) are of particular interest as they exhibit vegetative adaptations to host ants (in pre-formed nesting cavities known as domatia) and also, often, to feed them (*via* extra-floral nectar and/or food bodies). Tropical plants from more than 100 genera house specialized ant colonies in domatia (McKey and Davidson 1993) and most of tropical plants are insect-pollinated (see Bawa 1990 and references therein). The impact of ants on plants that rely on animal vectors for pollination can be, however, especially deleterious when ants interfere with pollinator activity on flowers. Currently, ants are known to be potential enemies of pollinators through their predatory behaviour leading to potential interferences (Janzen 1977; Willmer and Stone 1997; Ness 2006). When patrolling on plants, ants can reduce the pollinators' visitation rates through aggressive attacks or simply by their presence in flowers (Willmer and Stone 1997; Altshuler 1999; Tsuji et al. 2004, Junker et al. 2007). Yet, much of our knowledge on ant-plant-pollinator interactions comes from the genus *Acacia* (subfamily, Mimosidae; family, Fabaceae) especially from the swollen-thorn species (see Nicklen and Wagner 2006 and references therein), probably because they are frequent in tropical forests, easy to manipulate and because of Janzen's remarkable works on those species. This author initially described different traits related to ant-acacia mutualism and among the general ones, noted that those plants might probably be insect-pollinated (Janzen 1966). The growing literature on those swollen-thorn species and few other species from

different genera relied on this assumption and authors have investigated ant-plant-pollinator interferences in this context (Nicklen and Wagner 2006). So, if most studies of ant-plant-pollinator interferences focused on the conflicts of interests between the plant's reproduction and ant colony growth (Izzo and Vasconcelos 2002; Raine et al. 2002, Gaume et al. 2005; Willmer et al. 2009, Orivel et al. 2010), only a few have investigated the real breeding ways that myrmecophytes use to assure reproduction and seed-set (e.g. Shenoy and Borges 2008). Yet, the capacity of myrmecophytes to self-pollinate when pollinators are scarce is almost unknown (reproductive assurance, reviewed in Goodwillie et al. 2005). Conversely, when the breeding system is investigated, the ant-plant pollinator interferences are not studied (e.g. Martins 2009). Above all, pollination data are still missing for significant number of well-represented families in the Neotropics, some of them containing myrmecophytes (Ward et al. 2005). In this study we focused on *Hirtella physophora* Martius & Zuccharini (Chrysobalanaceae), a Neotropical understory myrmecophyte almost strictly associated in French Guiana with the ant *Allomerus decemarticulatus* Wheeler (Myrmicinae) (Grangier et al 2009). A previous study of this symbiosis has shown that ants have a negative impact on flower and fruit production (Orivel et al. 2010). Here, we investigate the floral biology and breeding system of *H. physophora* and address the following questions: (1) can this obligate ant-plant self-pollinate or does it rely exclusively on insects to achieve pollination, (2) do ant-guards forage on *H. physophora* flowers during the pollination phase and (3) if so, are there any interferences between ants and potential pollinators?

Flowering phenology was determined at both individual and population levels. As pollination requires important investments from the plant, we estimated the fitness of reproductive individuals through the comparison of vegetative characters between flowering and non-flowering individuals. The floral biology was investigated by determining floral design and floral display, in order to estimate the pollen transfer mechanisms in *Hirtella physophora* through pollination syndrome. *In situ* hand pollinations were carried out to estimate the breeding system by quantifying seed set after fertilization from different pollen donors. Finally, we tried to look for the insect activities on flowers, and the behavior of the resident ants was examined to estimate the patrolling activities on blossoms and vegetative parts.

Material and methods

Study site and species

This study was conducted between 2008 and 2010, when the plants were in bloom, in four different populations of a pristine forest situated around the field station at *Petit Saut*, Sinnamary, French Guiana (05°03'30.0"N; 52°58'34.6"W).

Hirtella physophora are small sympodial trees that can reach 6 m in height and the species occurs strictly in the understory of pristine Amazonian rainforest. The populations consist of patches of individuals located on the upper slopes of hillsides (Solano et al. 2003). Plant individuals have long-lived leaves that bear extra-floral nectaries and a pair of pouches at the base of each lamina (Leroy *et al.*, 2008). Flowering periods occur mainly from December to February and June to August.

Allomerus decemarticulatus ants provide protection to their host plant from herbivorous insects through their predatory behaviour. They forage on their plant's foliage, capturing small insects (Dejean *et al.*, 2001), and workers also build galleried structures on their host-plant's stems to trap larger insects (Dejean *et al.*, 2005).

Reproductive morphology and flowering phenology

Several vegetative and floral traits were measured on a total of 150 flowering and non flowering plants hosting ants, from the four different populations. To estimate the onset of effective reproduction, we measured vegetative characters such as the basal diameter of trunk, the number of branches and the number of leaves per branch, either on flowering and non-flowering individuals in each population.

We estimated the duration of flowering from the first to the last flowering day on 25 individuals of a population by daily recording the status of the flowers. The different stages of flower development, from small buds to fertilization or floral abscission were quantified. We could thus determine (i) the flowering phenology of individual plants and (ii) flowering time, synchrony between plants, and duration and skewness of flowering at the population level.

Floral display and floral design

A total of 76 flowering individuals were studied in the four above-mentioned populations (N=15, 24, 12 and 26). For each individual, the number of inflorescences, their location on the branches relative to the nodes and internodes, as well as the number of flowers per inflorescence were noted. Nodes were counted from the distal to the proximal part of a given branch.

An investigation of the floral design was conducted on a total of 46 mature flowers, randomly collected in the different populations. Flowers were immediately fixed in FAA (85

mL ethanol 70%, 10 mL acetic acid, 5 mL formaldehyde 40%) for at least 24h and then stored in 70% ethanol. For each flower, we recorded the number of stamens, anthers and staminodes, and measured the sepal, petal, stamen, style and hypanthium lengths. Floral diagrams were made from the observations of whole flowers.

For the investigations using scanning electron microscopy (SEM), the samples were dehydrated in 80, 90 and 100% ethanol and then critical-point dried with liquid CO₂. The dried samples were attached on metal stubs with double-sided tape, grounded with conductive silver paint and sputter coated with gold/palladium. Observations were conducted with a scanning electron microscope (Hitachi C450) operated at 15kV. Photographs of the specimens were taken using Illford 125 ISO film.

We also tested stigma receptivity using Quantofix[®] peroxide test sticks on 27 flowers during different periods of time. Once each half-day, a drop of ultrapure water was placed on the stigma for 1 minute before applying a stick test for another minute. We also recorded the dehiscence state of the anthers for three states coded as undehisced, dehisced or no pollen.

Measurements of floral traits related to pollination

Angiosperms exhibit a vast amount of flower diversity. The notion of pollination syndromes, in which flowers are grouped into categories that are associated with particular pollinator types (Faegri and van der Pijl, 1979; Fenster et al. 2004) can help to explain the different floral arrangements regarding to the group of potential pollinators associated (but see Waser *et al.*, 1996 and Ollerton *et al.*, 2009). The distance between the anthers and the stigma was measured on 78 flowers in grouping inflorescences from the different populations studied. Measurements were made using a digital caliper to the nearest 0.1 mm, and consisted in recording the shortest and the longest distances between the stigma and the anthers of the same flower. We also measured whenever possible the shortest distance between the stigma of a flower and the anther of another flower on the same inflorescence.

To examine the pollen to ovule (P:O) ratio, we collected late buds from 15 different individuals from two of the studied populations. Buds examined for P:O ratios were near opened, and, thus, the pollen was mature but anthers had not dehisced. The number of ovules per flower was recorded under a stereomicroscope. To estimate the number of pollen grains per stamen, three anthers per bud were collected. Each anther was digested in 300 μ L of 95% sulphuric acid for 5 days at 24°C. The solution was then homogenized, and 1 μ L was collected and placed carefully onto a microscope slide. The number of pollen grains was counted for three independent replicates of 1 μ L. The total number of pollen grains per

stamen was obtained by multiplying the mean of the triplicate count (N) by 300 and multiplying the result by the average number of stamens (n). Thus, the P:O ratio used is $300 \times N \times n$ divided by the number of ovules counted in the ovary (Cruden 1977).

Hand pollination experiments

Controlled pollinations were carried out on 24 flowering individuals from 2 of the 4 populations studied (N=13 and N=11) during the flowering period in January 2009. On each individual, four inflorescences were randomly selected and allocated to one of the four following treatments: (1): flowers were left untouched for open-pollination (control); (2) flowers were enclosed in a nylon mesh while the flowers were still in bud and left untouched (spontaneous self-pollination); (3) flowers in bud were enclosed as in treatment #2 and experimentally self-pollinated (selfed); and (4) flowers were enclosed as above and experimentally cross-pollinated (outcrossed). Treatments #2, #3 and #4 were conducted after ant-exclusion from the shoots bearing the inflorescences and applying, on either side of the inflorescence peduncle, rings of Tanglefoot® on shoots previously protected by aluminum foil. When the flowers were about to bloom, they were emasculated by gently cutting off the stamen filament and hand-pollinated using self-pollen (from a flower of the same individual) for treatment #3 or pollen from different plant flowers in treatment #4. Pollen was applied by rubbing dehisced anthers on stigmas. After fertilization, the number of fruits produced per treatment was recorded.

Activity rhythm of insects visiting flowers

Insects' visits (ants and potential pollinators) on flowers were monitored during the flowering period in one population for two consecutive years (2009 and 2010). Flowering individuals were monitored all day during this period to record visits (corresponding to 15 inflorescences in 2009 and 58 in 2010).

In order to estimate the general activity of ants on their host-plant, the rhythm of activity of patrolling ants was quantified on leaves and flowers. The rhythm of activity on leaves was assessed by counting the workers on two young and two old leaves per plant for 20 plant individuals in total, every hour, for 24 hours, in January 2009. Ant activity on inflorescences was recorded during the reproductive period, in January 2010.

During the night, an infra-red security camera coupled with a digital video recorder with moving objects detection was used to supply the study of the visitors' behavior.

Data analyses

Most of the data was analyzed using SYSTAT 11 software. Since the presence of traps, inflorescences, floral parts, flowers and fruits are ‘count’ variables, these variables were square root transformed for significance testing to normalize the distributions. The success rates in fruit production were analyzed with Glim 3.77 software using a generalized linear model, with a binomial error (proportion data, *Chi-square* statistics) using the number of treated flowers as denominator vector. Models with all of the four pollination treatments (hand cross-pollination, hand self-pollination, spontaneous self-pollination, and control) were fit to the data (full models). Afterwards, simplified models grouping certain treatments were adjusted to the data and only those that were statistically similar to the full model (*Chi-square* test) were retained (simplified models). The activity rhythms of patrolling ants during the afternoon (between 12 AM and 8 PM) on young and old leaves were compared using a Generalized Linear Mixed Model, taking individual effects into account as random effects, and performed using the lmer function in the lme4 package implemented in R 2.4.1. The number of ants on inflorescence in relation to the time of the day was analyzed using a general linear model with a Poisson error (count data, Chi^2 statistics, Glim 1986). The differences among individuals were taken into account (individual effect added). A full model including the different hours was first fitted to data then simplified models were tested in which hours were grouped. Simplified models were statistically compared to the full model for significant differences (Chi^2 test).

Results

Reproductive morphology and flowering phenology

Flowering individuals did not differ from non-flowering ones for all the recorded parameters but the number of stems. Non-flowering individuals had significantly less number of stems compared to flowering ones (mean \pm SD: 4.7 ± 3.1 versus 7.5 ± 6.8 for flowering and non-flowering individuals, respectively; $F_{1,137} = 11.52$, $p = 0.001$). The non-flowering individuals never shared more than 15 stems. Although flowering and non-flowering individuals display as many leaves per stem during the studied reproductive period (mean \pm SD: 4.3 ± 2.6 , $F_{1,930} = 1.27$, $p = 0.26$), flowering individuals produced more leaves (mean \pm SD: 32.4 ± 26.8) than non-flowering ones (mean \pm SD: 19.4 ± 13.3 , $F_{1,137} = 15.09$, $p < 10^{-5}$) per individual.

Reproduction appears to have a high energetic cost, even though we found that several entire inflorescences abscised before anthesis. Abscised inflorescences occurred indifferently on nodes or internodes ($\chi^2_1 = 2.341$, $p = 0.126$) and on distal or proximal shoot on the stem ($\chi^2_1 = 0.018$, $p = 0.893$).

At the population level, the maximal duration of the flowering period was almost 15 days. Flower lifespan was from 2 to 3 days, and almost all the flowers on the same inflorescence opened at the same time. Thus, the shape of the inflorescence could be more attractive for pollinators. These inflorescence traits could indicate an allogamous reproductive system.

Floral display and floral design

Inflorescences are fasciculate racemes of 1.7 to 3.6 cm-long with an average of 4.16 ± 0.70 flowers (ranging from 1 to 8) (Fig. 1). Most of the inflorescences developed from an axillary bud (85.83% *versus* 14.17% for cauliflory). Half of them (50.39%) were located at the last node at the distal end of the stem and more than 90% were grouped on the last two nodes (Fig. 2) whereas half of the traps never covered the last shoot (named shoot 1 in Fig. 2).



Figure 1: Floral display of *Hirtella physophora*: axillary racemes with few flowers simultaneously in bloom. Note the white colour of the petals and stamens.

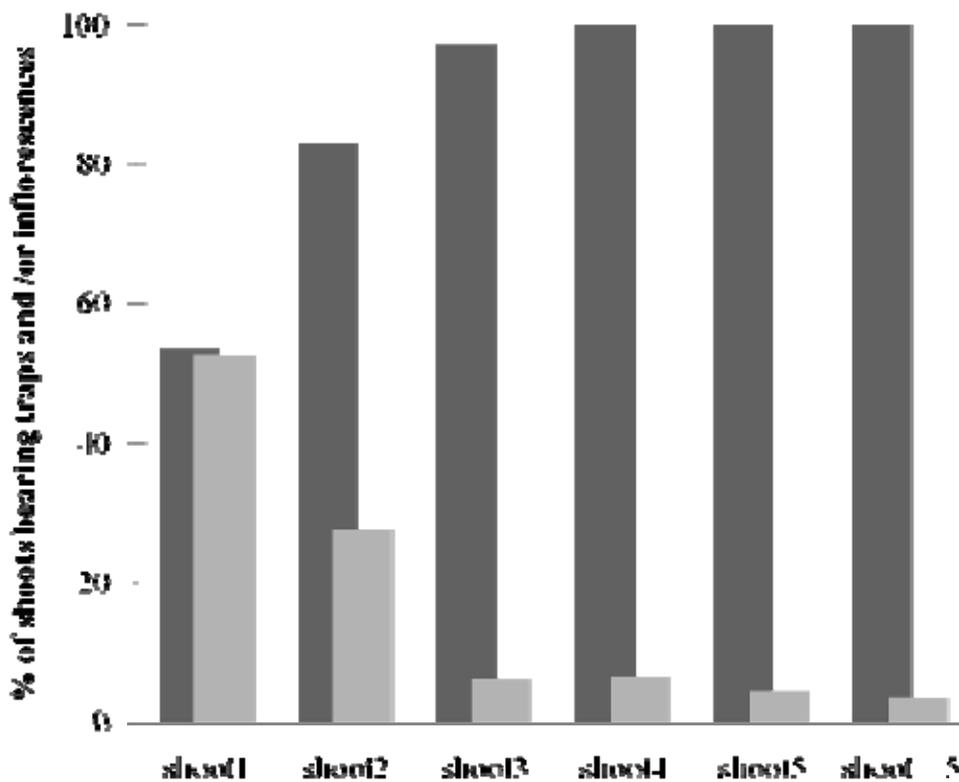


Figure 2: Percentage of shoots (node + internode) of *Hirtella physophora* bearing a complete trap (black bars) and/or an inflorescence (grey bars). Shoots were counted from distal to proximal stem ends.

The perianth is pentamerous, with five green sepals bearing glandular trichomes and five pale pink to white petals in an alternate position. The hypanthium contains a large one-sided floral cup of 3.85 ± 0.25 mm deep from the mouth (Fig. 3). The entire inner side of the hypanthial cavity constitutes a secretory surface with nectary pores. Trichomes, restricted to the upper part of the cup, partially obstruct the entrance at the throat (Fig. 3). The androecium has seven to ten fertile anterior stamens and a group of one to four posterior staminodes (Table 1 and Fig. 4). These staminodes are situated at the side of the hypanthium-cup entrance. Filament sizes (mean \pm SD, 19.51 ± 0.81 mm in average) are 2 to 3 times longer than the calyx and corolla lobes, respectively (Table 1 and Fig. 4). The staminodes are much shorter than the fertile stamens and have a pointed shape without anthers. The filaments are fused together at the base to form an androecial tube together with the staminodes (Fig. 4). The organisation of the androecium expressed a monosymmetric appearance of the flower, which is zygomorphic. This monosymmetry is not in a median plan, but in an oblique plan of the flower (Fig. 4).

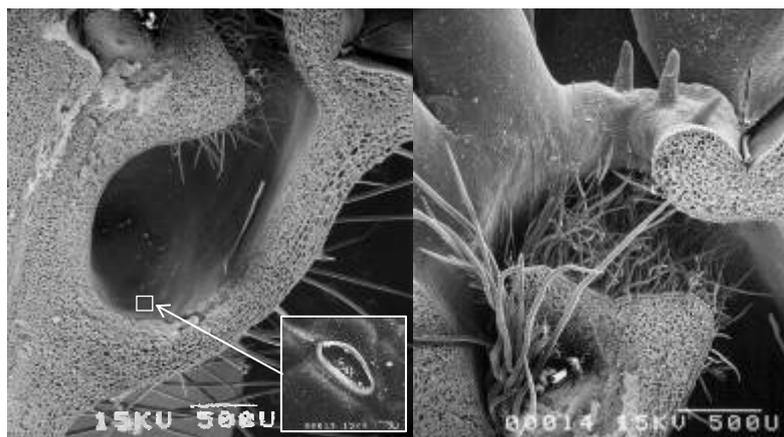


Figure 3: Location of the secretory pores in the floral-cup of *H. physophora*. (A) SEM of the mature hypanthial-cup with a close-up of a stoma-pore. (B) Close-up of the hypanthial entrance with numerous trichomes

The ovary is densely hispid and attached to the mouth of the floral cup. The unicarpellate gynoecium is completely syncarpous up to the stigma. The stigmatic lobes are unicellular papillate. Two collateral anatropous ovules fill the locule, but only one of the two ovules develops into a seed while the other one aborts as the fruit is a fleshy drupe. The dehiscence of the first anthers occurs while the flower is still closed or starting to open. Nevertheless, stigma receptivity and anther dehiscence are quite simultaneous, so that dichogamy cannot occur in this species.

Measurements of floral traits related to pollination

During the flower opening, stamens and style progressively uncoiled. Once full open, the style is significantly longer than the filament with respectively 22.70 ± 0.89 mm and 19.51 ± 0.81 mm (mean \pm SD, t-test= -5.163, $P < 0.0001$). Thus, spatial separation between anther and stigma ranges from 5.57 mm to 39.05 mm within the flowers. The first anthers dehiscence, which append for one to two anthers per flower, were observed while the flower was still close or starting to become open when the stamen start to uncoil. Nevertheless, stigma receptivity and anther dehiscence were quite simultaneous, so that dichogamy can not occur in this species.

The stigma and anthers of two flowers on the same inflorescence can be very close with an average distance of 6.69 ± 2.46 mm (mean \pm SD) (ranging from 1.87 to 18.75 mm), a display that could promote geitonogamy (but see controlled pollination results).

Hirtella physophora produces tricolpate pyramidal pollen grains. Based on Cruden's (1977) P:O categories, *H. physophora* would be obligatorily xenogamous with a ratio of 5894.8 ± 3228.4 (mean \pm SD). The floral stigmatic area was $0.11 \pm 0.01\text{mm}^2$ and the pollen grain area was $0.0011 \pm 0.00001\text{mm}^2$ meaning that one hundred pollen grains could fit the stigmatic zone, although only two are theoretically needed to fertilize the two ovules.

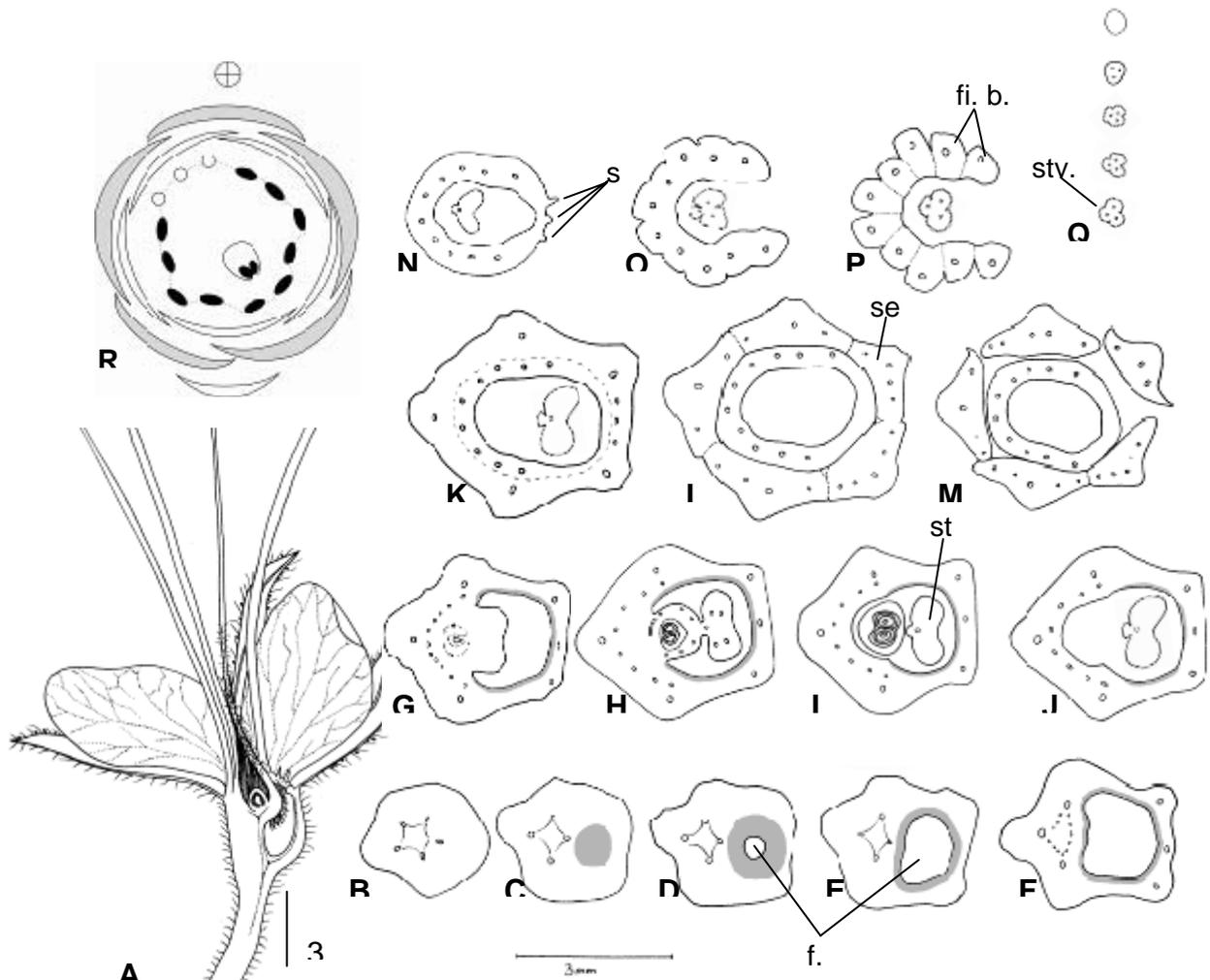


Figure 4: Floral transverse section series. Adaxial side right. (A) Median longitudinal section of the flower. (B-C) Level of the floral base and the pedicel. (D-G) level of the posterior hypanthium cup. (D-E), level of the nectariferous pores. (C-I) level of the hypanthial epithelium. (H-I), level of the gynoecium with two collateral ovules. (K-P) level of the androecium. (L-M) level of the sepals; the petals are not drawn. (N) level of the staminodes. (Q) Transverse section series of the style. (R) Schematic diagram of an oblique monosymmetric flower, adaxial (posterior) side up. Fertile stamens (shaded black); staminodes (open circle); fusion between the organs of the androecium (dotted line). Abbreviations: f.c., floral cup; fi. b., filament base; s, staminode; sep., sepal; sty, style.

Table 1: Floral traits of *Hirtella physophora*, with mean and range values: number of stamens (SN), number of anthers (AN), number of staminodes (SNN), sepal length (SL), petal length (PL), stamen filament length (SFL), style length (STL), and length of hypanthium's cup (HL) ; N represents sample size.

	SN	AN	SNN	SL (mm)	PL (mm)	SFL (mm)	STL (mm)	HL (mm)	P:O ratio
Mean \pm s.e.	9.32 \pm 0.30	8.67 \pm 0.55	2.90 \pm 0.23	11.38 \pm 0.86	8.34 \pm 0.33	19.51 \pm 0.81	22.70 \pm 0.89	3.85 \pm 0.25	5894.8 \pm 3228.4
Range	7-10	6-10	1-4	6.05-16.02	6.43-10.36	15.25-26.2	15.61-26.09	1.77-5.09	447-13410
N	40	40	40	30	30	30	30	30	16

Hand pollination experiments

The proportion of matured fruits varied significantly between treatments (full model: $\chi^2_3 = 92.85$; $P < 10^{-5}$). There were no significant effects of individual ($\chi^2_{23} = 29.1$; $P = 0.18$), population ($\chi^2_1 = 0.9$; $P = 0.34$) or interaction ($\chi^2_3 = 0.2$; $P = 0.97$) on the probability of fruit maturation. Hence, the proportion of fruit produced from hand cross-pollination (mean \pm SD) (45.4 ± 11.3 %), open-pollination (26.3 ± 13.4 %), or hand self-pollination/spontaneous self-pollination (0 %) was significantly different ($P < 0.001$). Hand self-pollinated flowers and spontaneous pollination did not produce any fruit, revealing a self-incompatibility system. Although stigmas and anthers from different flowers of a same inflorescence can be closed enough to allow geitonogamy, those results show that this floral mechanism is unfertile in *H. physophora*.

Activity rhythm of insects visiting flowers

The maximum patrolling intensity on leaves occurred at the beginning of the afternoon (with a mean number (\pm SD) of 1.1 ± 0.7 and 0.3 ± 0.4 patrolling ants at 14:00h on young and old leaves, respectively). There were two periods of less activity coinciding with dusk and dawn (with a mean number (\pm SD) of 0.1 ± 0.1 and 0.05 ± 0.1 patrolling ants at 04:00h and 0.2 ± 0.1 and 0.1 ± 0.1 at 20:00h on young and old leaves, respectively; Fig. 5). The activity was significantly less during the afternoon, both on old and young leaves (Generalized Linear Mixed Model, Time: Estimate = -0.22, SE = 0.03, z-value = -7.79, $p < 0.0001$) and this decrease tended to be greater on young leaves than on old leaves (Generalized Linear Mixed Model, Developmental Stage (old leaves): Estimate = -1.51, SE = 0.89, z-value = -1.69, $p = 0.09$). Unfortunately, we could not have sufficient data in the morning to properly analyze the ants' activity between 5 and 8 AM. However, after 8 AM, the ants patrols on flowers was also following the one on leaves, with a maximum activity at the beginning of the afternoon, followed by a decrease until dusk (Fig. 6). The ant activity in terms of the mean number of ants per flower varied statistically among the different hours of the survey (full model: $\text{Chi}^2_{17} = 76.2$, $p < 10^{-3}$). In fact the ant activity on flowers can be divided in three statistically different categories (simplified model: $\text{Chi}^2_2 = 56.2$, $p < 10^{-3}$). This simplified model of ant activity on flowers is not statistically different from the full model (model difference: $\text{Chi}^2_{15} = 19.36$, $p = 0.20$). Thus three categories of ant activity can be described (mean \pm SE) as almost null (0.05 ± 0.03), intermediate (0.44 ± 0.05) or high (1.12 ± 0.27). In fact, if they are always present on flowers during the period of observation, few ants visit flowers in the morning

(between 8 and 11 AM) and late evening compared to the peak of ant activity on flowers, between 1 and 2 PM (Fig. 6).

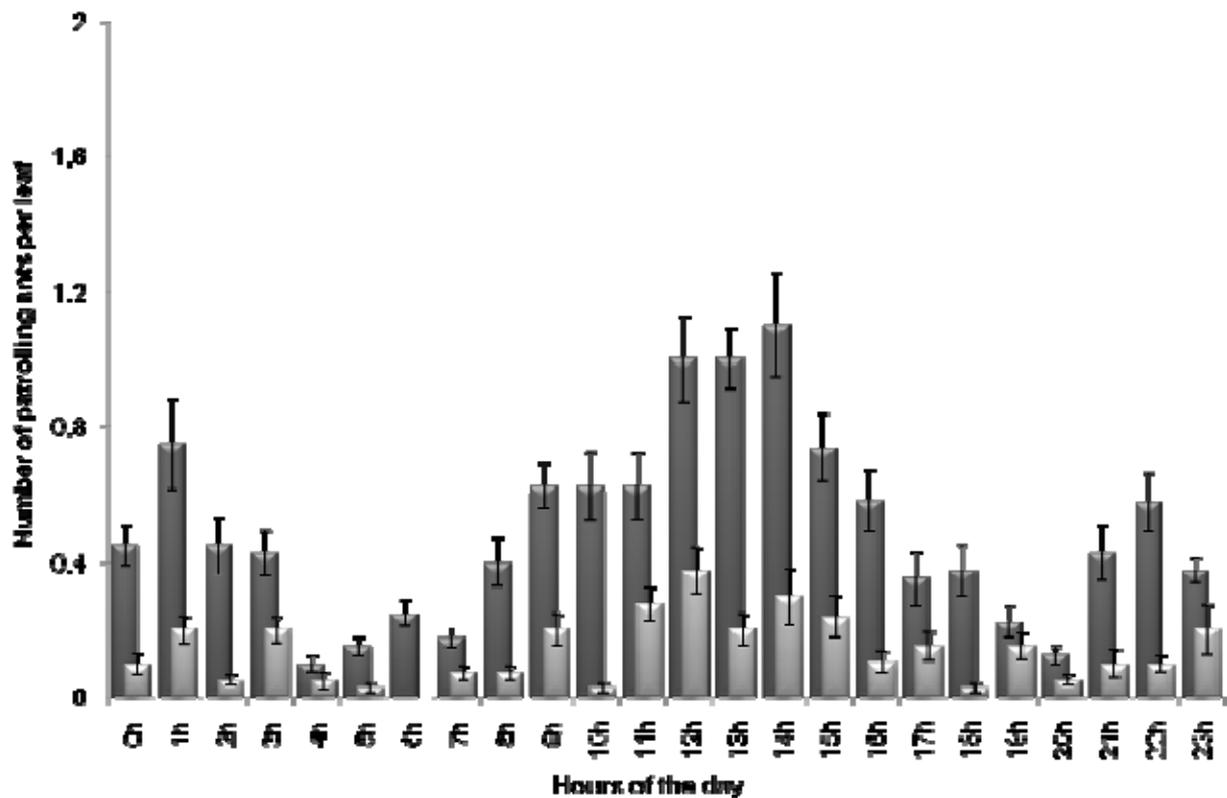


Figure 5: Activity rhythm of *Allomerus decemarticulatus* on the foliage of its host plant expressed as the mean number of ants (\pm SE) patrolling on young (black bars) and old (grey bars) leaves according to the time of day.

Except ants, only a few visiting insects were observed on flowers and two species of moths (a Geometridae and a Pyraloidae) were identified as potential pollinators. These two species were observed on flowers only at dusk when ant activity on the plant is at its minimum.

Discussion

Our results show that *H. physophora* is an obligate outcrosser and a self-incompatible, insect-pollinated species. The flowers contain nectar and are monosymmetric thus providing greater precision in insect-pollinated flowers than in polysymmetry (Neal *et al.*, 1998; Sargent, 2004). *Hirtella physophora* also displays other floral features that favour outcrossing, such as approach herkogamy, a high P:O ratio, and small inflorescences with relatively few flowers, but that bloom simultaneously. This ant-plant cannot self-pollinate, despite the presence of its resident guard-ants on flowers during pollination. Few fruits are produced, whatever the pollen donor, an usual phenomenon recorded on many tropical trees (Bawa and Webb 1984;

Shenoy and Borges 2008). Of greater interest are the spatial and temporal segregations found between the activities of the mutualistic ants and the location of the inflorescences, as (i) the latter are located preferentially in areas mostly devoid of traps and (ii) the potential pollinators visit the flowers when ants activity is at its lowest point.

Floral traits promoting outcrossing and insect-mediated pollen transfer

Among the Chrysobalanaceae, the breeding system of only five species, none associated with ants, has been studied (Lack, 1978; Bullock, 1985; Arista *et al.*, 1997; Paulino-Netto, 2007), and the authors found that they were all insect-pollinated. *Hirtella gracilipes* and *H. glandulosa* are exclusively pollinated by butterflies, although long-tongued flies, bees and hummingbirds can be observed on the flowers. Hand-pollination experiments demonstrated self-incompatibility in *Couepia polyandra* (Bullock, 1985), *C. uiti* (Paulino-Netto, 2007) and *Hirtella glandulosa* (Arista *et al.*, 1997). Our results show that *H. physophora* follows this tendency. As shown by Arista *et al.* (1997) for two other *Hirtella* species, *H. physophora* displays longer styles than staminal filaments. Such a spatial separation of sexual organs in these hermaphroditic flowers can avoid autogamy by approach herkogamy, a floral feature which is quite common in animal-pollinated plants.

The morphological features of *H. physophora* flowers suggest an insect-mediated pollen transfer. First, being small, the flowers are also conspicuous, displaying long stamens so that the raceme can act as a large flower to attract pollinators. Secondly, the presence of nectar inside of the hypanthium's cup, as a food resource, suggests pollination by long-tongued insects, such as the Lepidoptera. Third, the presence of few flowers assembled in an open inflorescence is a display known to decrease geitonogamy. Moreover, synchronous and short periods of flowering in *H. physophora* are two phenological traits consistent with entomophily and the avoidance of selfing. Synchronous flowering helps to attract pollinators by the mass-display effect, and to promote outcrossing by maximizing the number of potential mates (Rathcke and Lacey, 1985; Marquis, 1988; O'Neil, 1997). To maximize efficient pollination, *H. physophora* should produce vast quantities of pollen grains during a short period of time (i) to optimize pollen export and receipt and (ii) to counteract florivory and difficult access to flowers for potential pollinators. Such a trait is shown by the high P:O ratio in this plant species. Above all, the high quantity of pollen production is associated with outcrossing, and ants might increase the rate of outcrossed mates by increasing the movements of pollinators between plants, in response to the threat of predation (Altshuler, 1999). The geometridae observed in flowers appeared to have a pollinator-like behaviour,

intensively probing the flowers, flying between different inflorescences and probably between plants. Unfortunately, the very small number of insects visiting flowers observations did not allow us to confirm those hypotheses. Moreover, no other insects were observed, except for *A. decemarticulatus*; however, the ants never leave their host plant, so they cannot even take part in pollen dispersal between plants. Nevertheless, according to Faegri and van der Pijl (1979), *H. physophora* displays floral traits, such as white to pale pink petals, related to moth pollination, also called phalaenophily. Note also that Fenster *et al.* (2004) also found that a pale colour is associated with pollination by moths.

Segregation of insect activity on flowers

Being an obligate myrmecophyte, *H. physophora* is inhabited by an ant species behaving as a mutualistic symbiont (*sensu* Heil and McKey 2003). Ants are not excluded from reproductive parts of *H. physophora*; in fact, they even patrol on inflorescences, buds and flowers. This symbiotic system, involving *H. physophora* with insectivorous symbionts that potentially deter pollinators, may lead the plant to select strategies for optimal pollen transfer. One may compare this symbiotic system to insectivorous plants that adapt their pollination to avoid digesting pollinating insects. Negative interactions between ants and pollinators are actually likely to explain the low number of fruits resulting from open-pollination compared to hand cross-pollinations where stigmas were saturated with pollen. Consequently, some floral features should be associated with the avoidance of a deleterious impact by the ants on insects that probe flowers on *H. physophora*. First, *H. physophora* displays almost all of its functional inflorescences on the newest part of the branch that bears fewer traps, and where insect visiting flowers have less risk of being captured. This spatial separation between traps and inflorescences allows for the potential spatial segregation between ant activity and pollinator visits on inflorescences. On the contrary, the inflorescences of *Acacia hindsii*, (Raine *et al.*, 2002) and *H. myrmecophila* (Izzo and Vasconcelos, 2002) are located on the old part of the shoots where ant activity is reduced. Secondly, although often associated with reverse-herkogamy, phalaenophily could be the most effective pollination syndrome in relation to ant activity. Our results show that ant patrols decrease significantly at dusk, especially on youngest parts of the stems where most of the inflorescences are located. Crepuscular insects, such as moths, thus have the best adapted activity rhythm for avoiding capture by ants. Actually, our few observations of moths occurred at dusk, when ant activity on leaves and open flowers was low, suggesting a temporal separation of insect activity on the plant. Such a temporal segregation has also been observed for *H. brunonis*, in which the extra-

floral nectar is produced at night for nocturnal ants while pollinators visit flowers diurnally (Gaume *et al.*, 2005). Further investigation, like counting pollen on insects, must still be conducted to conclude whether or not the moths observed are efficient pollinators of *H. physophora*.

This study contributes to broadening the knowledge of the breeding system of ant-plants and to a less extent the prevention of ant-pollinator interactions in myrmecophytic species. Further studies on these interactions should ideally take place in a phylogenetic context, and the genus *Hirtella*, possessing myrmecophytic and non-myrmecophytic species, appears to be a good model for exploring this issue.

Acknowledgements

We thank the staff of the *Laboratoire Hydreco de Petit Saut* for their logistical assistance and Andrea Dejean for proofreading the manuscript. We are grateful to Stéphanie Montembault for her help in the laboratory, to Isabelle Henry and Mathieu Duvignau for field assistance and to Marc Gibernau for statistical help. Financial support for this study was provided by a research program of the French *Agence Nationale de la Recherche* (research agreement n°ANR-06-JCJC-0109-01), by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program, by the *Programme Amazonie II* of the French *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS), by the *Programme Convergence 2007-2013 Région Guyane* from the European Community and by a *Nouragues* research grant from the CNRS.

4.2 Article 5 : Characterization of polymorphic microsatellite loci in the neotropical plant-ant *Allomerus decemarticulatus* (Formicidae: Myrmicinae) and multiplexing with other microsatellites from the ant subfamily Myrmicinae

European Journal of Entomology (2010) 107:673-675

Pierre-Jean G. Malé^{1,2}, Anne Loiseau³, Arnaud Estoup³, Angélique Quilichini^{4,5} & Jérôme Orivel^{1,2,4}

¹ Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

² CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

³ Montpellier SupAgro, INRA, CIRAD, IRD, Centre de Biologie et de Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, CS30016, 34988 Montferrier-sur-Lez, France

⁴ CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France

⁵ Jardin Botanique Henri Gaussen, 39 allées Jules Guesde, F-31062 Toulouse, France

Characterization of polymorphic microsatellite loci in the neotropical plant-ant *Allomerus decemarticulatus* (Formicidae: Myrmicinae) and multiplexing with other microsatellites from the ant subfamily Myrmicinae

PIERRE-JEAN G. MALÉ^{1,2}, ANNE LOISEAU³, ARNAUD ESTOUP³, ANGÉLIQUE QUILICHINI^{4,5} and JÉRÔME ORIVEL^{1,2,4}

¹Université de Toulouse, Laboratoire Evolution & Diversité Biologique (EDB), UMR 5174, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9, France; e-mails: pjmale@cict.fr, orivel@cict.fr

²CNRS, EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

³INRA, UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro), Campus international de Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez cedex, France; e-mails: loiseau@supagro.inra.fr, estoup@supagro.inra.fr

⁴CNRS, UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France; e-mail: Angelique.Quilichini@ecofog.gf

⁵Jardin Botanique Henri Gaussen, 39 allées Jules Guesde, F-31062 Toulouse, France

Key words. Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae, *Allomerus*, ant-plant mutualism, microsatellites, plant-ant

Abstract. Five polymorphic microsatellite loci of the arboreal ant *Allomerus decemarticulatus* (Myrmicinae) were isolated and characterized. The amplification and polymorphism of seven additional microsatellite loci, previously developed for the ant species *A. octoarticulatus* and *Wasmannia auropunctata*, were also tested and the amplification conditions necessary for genotyping the complete set of 12 multiplexed markers in *A. decemarticulatus* determined. The number of alleles per locus ranged from three to 15 and observed heterozygosity varied from 0.09 to 0.95. Cross-species amplification of these loci was also successfully achieved in additional species of the same ant subfamily, Myrmicinae. This set of microsatellite markers will be used in studies on the mating system and population genetic structure of Myrmicinae in general and *A. decemarticulatus* in particular.

INTRODUCTION

Allomerus decemarticulatus (Hymenoptera: Myrmicinae) is a neotropical obligate plant-ant. In French Guiana, it is strictly associated with the myrmecophytic understory treelet *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae) via a mutualistic relationship (Solano et al., 2003; Grangier et al., 2009). Its occurrence is thus restricted to areas where *H. physophora* is present. Populations of *H. physophora* are patchily distributed, even at small geographic scales (Solano et al., 2003), and the population genetic structure of *A. decemarticulatus* is expected to reflect that of its host. A set of polymorphic microsatellite loci for *A. decemarticulatus* was developed and characterized that can be multiplexed with microsatellite loci previously developed either in a congeneric species or a species from a different tribe of the same subfamily. This set of microsatellite markers will be used in studies on the mating system and population genetic structure of *A. decemarticulatus*.

MATERIAL AND METHODS

Total genomic DNA was extracted from four adult males using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Extracts were mixed and concentrated using a SpeedVac Concentrator RC1010 (Jouan, Saint-Herblain, France) and re-suspended in ultrapure water to obtain a concentration of 65 ng/μL. *Rsa*I-digested DNA fragments from 600 to 1000 kb in size were extracted from the gel, after electrophoresis, using QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). These fragments were ligated to *Rsa*-21 and *Rsa*-25 linkers [*Rsa*-21 (5' 3') CTCTTGCTTACGCGTGGACTA; *Rsa*-25 (5' 3') phosphate-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAG] for PCR amplification with *Rsa*-21 primers. The PCR products were purified with the

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Enrichment was conducted using Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles Kit (Promega, Carboneières-les-Bains, France) and a mixture of the biotinylated oligonucleotide probes (TC)₁₀ and (TG)₁₀. Enriched DNA was then amplified using *Rsa*-21 primers, purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) and ligated into pGEM-T vectors using the pGEM-T Easy Vector system II kit (Promega) following the manufacturer's protocol. A total of 1152 white transformant clones were PCR screened using (TC)₁₀ or (TG)₁₀ probes with T7 and SP6 primers. One hundred and fifty-two clones gave a positive signal and the inserted DNA fragment was subsequently sequenced. Thirty-six primer pairs were designed using the software Primer Designer v 2.0 (Scientific & Educational Software 1990, 91). PCR amplifications were carried out in a 15 μL final volume containing 1× QIAGEN Multiplex Master Mix, 0.5× Q-Solution, 2 μM of each primer, and 2 μL of genomic DNA. The thermal profile started with an initial denaturation at 95°C (15 min), followed by 35 cycles of denaturation at 94°C (30 s), annealing at 57°C (1 min 30 s) and extension at 72°C (1 min) and ended with a final extension at 60°C for 30 min. PCR products were sized using electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

Loci for which amplifications produced only one DNA band corresponding to the predicted size of the PCR product were then amplified following the protocol described above but with forward primers fluorophore-labelled on the 5' end and non-labelled reverse primers. These loci were finally sized using an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the 500 LIZ™ GeneScan™ size standard and GENEMAPPER™ 4.0 software. Levels of polymorphism were estimated by genotyping one worker per colony from 68 colonies derived from two populations. DNA extractions were per-

TABLE 1. Primer sequences and polymorphism statistics for 12 microsatellite loci in two populations of *Allomerus decemarticulatus* [*Ta* annealing temperature; *n* number of colonies; *Na* number of alleles studied; *Ho* proportion of heterozygous individuals; *He* expected heterozygosity; * significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after correction for multiple tests (Sequential Bonferroni procedure; $P < 0.01$)].

Locus	Repeat motif (cloned allele)	Size range (bp)	5' dye	Petit Saut (<i>n</i> = 46)			Nouragues (<i>n</i> = 22)			<i>Ta</i> (°C)	Primer sequences (5'-3')	Multiplex markers set	Genbank accession numbers	Source
				<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>					
Adec-A21	(AG) ₂₃	356–360	FAM	3	0.54	0.45	3	0.68	0.52	63.8	TACCGGACCGAACTACTTGC ACTCACGCACTCGCCTCAT	2	GU982709	This study
Adec-A23	(GA) ₃₀	289–295	FAM	7	0.23	0.30	6	0.72	0.80	64.2	ACGAACGCTGCACTTCCA AGGAGGTGAGAGAGCTTGAGG	1	GU982710	This study
Adec-A41	(AG) ₁₈	161–167	FAM	3	0.65	0.90*	3	0.41	0.58	62.2	CGTATCCATAAAGGCGCAATC GTCGTCAAGAAGCAGAGGCA	1	GU982711	This study
Adec-A49	(AG) ₃₃	212–226	FAM	8	0.73	0.64	6	0.81	0.74	62.1	CGTGCCATCGCGAGAA CCATTTCTGCCGAGGGT	1	GU982712	This study
Adec-A60	(GA) ₃₈	271–283	NED	4	0.09	0.09	3	0.64	0.55	60.9	TCCGCGGAAATCGT CATCTGCTGTCACCGTAAT	2	GU982713	This study
Waur8Ω	(GA) ₁₅	273–313	PET	7	0.76	0.82	12	0.82	0.89	57	GTAGTTGGCGAGACCGGATG CTCCAGCTGTGGITCCGATG	1	FJ970016	Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al., 2009
Waur872	(GA) ₁₂ AA(GA) ₂₃	357–415	VIC	11	0.55	0.80*	8	0.20	0.87*	57	CGTGCTATCCTCGACGAAGT GCCGACAGTACAACAAACAG	2	FJ970023	Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al., 2009
Waur813	(GA) ₁₇	106–145	NED	15	0.76	0.85	10	0.95	0.89	57	GTCCAAGGATGAATGTATTAC GCCGCTAGAAGAAGAATGAC	2	FJ970021	Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al., 2009
Waur730	(CT) ₁₈	182–209	VIC	7	0.39	0.42	9	0.80	0.87	57	GAATGAGCGAAGCGTGTAC GAGATTCTCGACGCGTATGA	1	AY779642	Fournier et al., 2005
Waur225	(CA) ₁₀	240–290	VIC	5	0.20	0.34*	8	0.67	0.75	63	GTGCGCAGACATAGATAAGG TGAATAGCTGCGACTCTACG	2	AY779634	Fournier et al., 2005
Ad166	(TG) ₁₁	161–176	NED	3	0.32	0.51*	11	0.77	0.85	53.5	GGTCCTTTGAGCAACTTAGC CTGATCGCAATAGAGCAATG	1	DQ139976	Debout et al., 2006
Ad040	(TG) ₁₆ (CG) ₃ (CA) ₃	301–331	VIC	9	0.39	0.85*	14	0.75	0.88	50.4	GAAAGACAGATCGCTTCATC GCCGATATTACTTCATTGAG	2	DQ139967	Debout et al., 2006

formed using 10% Chelex (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) solution. Level of polymorphism and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium were estimated for each locus using GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008). Correction for multiple tests was performed when appropriate (Sequential Bonferroni procedure).

RESULTS AND DISCUSSION

Fourteen PCR products gave discrete bands of the predicted size on agarose gels. All of these loci were unambiguously sized using the sequencer. Among them, five loci were polymorphic. Individual loci had 3 to 8 alleles and observed heterozygosity ranged between 0.09 and 0.95 (Table 1). Five loci departed significantly from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$, Table 1). It is likely this can be accounted for by a high level of

inbreeding in populations of *A. decemarticulatus* due to the clumped distribution of *H. physophora*.

Sequences of the five microsatellite loci are deposited in the GenBank database (see Table 1 for accession numbers). All loci were successfully cross-amplified in at least one species of three in the same genus (*A. octoarticulatus*, *A. septemarticulatus*, and *A. dentatus*), one species of the same tribe (*Monomorium subopacum*), and one species in a different tribe but the same subfamily (*Wasmannia auropunctata*) (Table 2).

To increase the number of loci available for mating system and population genetic studies in *A. decemarticulatus*, the co-amplification of the five above markers plus seven microsatellite loci previously developed for two ant species from the same subfamily (two loci from *A. octoarticulatus* and five from *W. auropunctata*; Fournier et al., 2005; Debout et al., 2006; Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium

TABLE 2. Cross-species PCR tests for five *Allomerus decemarticulatus* microsatellite loci in five ant species (*A. octoarticulatus*, *A. septemarticulatus*, *A. dentatus*, *Monomorium subopacum*, and *Wasmannia auropunctata*). The number of alleles and their size range (in parentheses) are based on genotyping *n* individuals of each species. Amplification failure is indicated by a dash.

Locus	<i>A. octoarticulatus</i> (<i>n</i> = 18)	<i>A. septemarticulatus</i> (<i>n</i> = 3)	<i>A. dentatus</i> (<i>n</i> = 1)	<i>M. subopacum</i> (<i>n</i> = 1)	<i>W. auropunctata</i> (<i>n</i> = 5)
Adec-A21	5 (351 360)	3 (350 358)	1 (358)	1 (358)	3 (356 360)
Adec-A23	6 (275 290)	3 (268 290)	2 (300 304)	1 (289)	3 (291 307)
Adec-A41	44 (161 171)	4 (161 169)	2 (165 175)	2 (161 165)	4 (162 184)
Adec-A49	5 (212-226)	2 (214 222)	2 (214 228)		
Adec-A60	6 (214 226)	4 (271 279)	2 (272 284)	2 (272 284)	4 (273 279)

et al., 2009) was optimized. These seven markers were chosen based on their putative polymorphism in *A. decemarticulatus*. Forward primers were fluorescently labelled according to expected size ranges in order to allow typing of all 12 loci in a single electrophoresis run. Two sets of six primer pairs were each designed according to annealing temperature using Multiplex Manager 1.1 (Holleley & Geerts, 2009). This complete set of markers will be used in studies on the dispersal and mating biology of an ecologically and evolutionarily important ant-plant mutualism.

ACKNOWLEDGEMENTS. We are grateful to R. Boulay for providing the sample of *Monomorium subopacum*, T. Izzo for samples of *Allomerus septemarticulatus* and *A. dentatus*, K.G. Dexter for editing the manuscript and the Laboratoire Environnement de Petit Saut for furnishing logistical help. This study was funded by a research program of the French Agence Nationale de la Recherche (research agreement n° ANR-06-JCJC-0109-01), the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program, the Programme Amazonie II of the French Centre National de la Recherche Scientifique and a Nouragues research grant from CNRS.

REFERENCES

- DEBOUT G.D.G., PEREYRA R., EMERSON B.C. & YU D.W. 2006: Characterization of polymorphic microsatellites in the castration parasite plant-ant *Allomerus octoarticulatus* cf. *demerarae* (Formicidae: Myrmicinae). *Mol. Ecol. Notes* **6**: 182–184.
- FOURNIER D., FOUCAUD J., LOISEAU A., CROS-ARTEIL S., JOURDAN H., ORIVEL J., LE BRETON J., CHAZEAU J., DEJEAN A., KELLER L. & ESTOUP A. 2005: Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the invasive ant *Wasmannia auropunctata*. *Mol. Ecol. Notes* **5**: 239–242.
- GRANGIER J., DEJEAN A., MALÉ P.-J.G., SOLANO P.-J. & ORIVEL J. 2009: Mechanisms driving the specificity of a myrmecophyte-ant association. *Biol. J. Linn. Soc.* **97**: 90–97.
- HOLLELEY C.E. & GEERTS P. 2009: Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques* **46**: 511–517.
- MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM, ALMÁNY G.R., DE ARRUDA M.P., ARTHOFER W., ATALLAH Z.K., BEISSINGER S.R., BERUMEN M.L., BOGDANOWICZ S.M., BROWN S.D., BRUFORD M.W., BURDINE C., BUSCH J.W., CAMPBELL N.R., CAREY D., CARSTENS B.C., CHU K.H., CUBETA M.A., CUDA J.P., CUI Z.X., DATNOFF L.E., DAVILA J.A., DAVIS E.S., DAVIS R.M., DIEKMANN O.E., EIZIRIK E., FARGALLO J.A., FERNANDES F., FUKUDA H., GALE L.R., GALLAGHER E., GAO Y.Q., GIRARD P., GODHE A., GONCALVES E.C., GOUVEIA L., GRAJCZYK A.M., GROSE M.J., GU Z.F., HALLDEN C., HARNSTROM K., HEMMINGSEN A.H., HOLMES G., HUANG C.H., HUANG C.C., HUDMAN S.P., JONES G.P., KANETIS L., KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I., KEYGHOBADI N., KLOSTERMAN S.J., KLUG P.E., KOCH J., KOOPMAN M.M., KOPPLER K., KOSHIMIZU E., KRUMBOCK S., KUBISIAK T., LANDIS J.B., LASTA M.L., LEE C.Y., LI Q.Q., LI S.H., LIN R.C., LIU M., LIU N., LIU W.C., LIU Y., LOISEAU A., LUAN W.S., MARUTHACHALAM K.K., MCCORMICK H.M., MELICK R., MONNAHAN P.J., MORELLE-VERSUTE E., MURRAY T.E., NARUM S.R., NEUFELD K., DE NOVA P.J.G., OJAMBO P.S., OKAMOTO N., OTHMAN A.S., OVERHOLT W.A., PARDINI R., PATERSON I.G., PATTY O.A., PAXTON R.J., PLANES S., PORTER C., PRATCHETT M.S., PUTTKER T., RASIC G., RASOOL B., REY O., RIEGLER M., RIEHL C., ROBERTS J.M.K., ROBERTS P.D., ROCHEL E., ROE K.J., ROSSETTO M., RUZZANTE D.E., SAKAMOTO T., SARAVANAN V., SARTURI C.R., SCHMIDT A., SCHNEIDER M.P.C., SCHULER H., SERB J.M., SERRAO E.T.A., SHI Y.H., SILVA A., SIN Y.W., SOMMER S., STAUFFER C., STRUSSMANN C.A., SUBBARAO K.V., SYMS C., TAN F., TEJEDOR E.D., THORROLD S.R., TRIGIANO R.N., TRUCCO M.I., TSUCHIYA-JEREP M.T.N., VERGARA P., VAN DE VLIET M.S., WADL P.A., WANG A.M., WANG H.X., WANG R.X., WANG X.W., WANG Y., WEEKS A.R., WEI F.W., WERNER W.J., WILEY E.O., WILLIAMS D.A., WILKINS R.J., WISELY S.M., WITH K.A., WU D.H., YAO C.T., YAU C., YEAP B.K., ZHAI B.P., ZHAN X.J., ZHANG G.Y., ZHANG S.Y., ZHAO R. & ZHU L.F. 2009: Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 May 2009–31 July 2009. *Mol. Ecol. Resour.* **9**: 1460–1466.
- RAYMOND M. & ROUSSET F. 1995: GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenism. *J. Hered.* **86**: 248–249.
- ROUSSET F. 2008: Genepop'007: a complete reimplemention of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* **8**: 103–106.
- SOLANO P.-J., DUROU S., CORBARA B., QUILICHINI A., CERDAN P., BELIN-DUPOUX M., DELABIE J.H.C. & DEJEAN A. 2003: Myrmecophytes of the understory of French Guianian rainforests: their distribution and their associated ants. *Sociobiology* **41**: 605–614.

Received March 30, 2010; revised and accepted May 10, 2010

**4.3 Article 6 : Isolation and characterization of polymorphic
microsatellite loci in the ant-plant *Hirtella physophora*
(Chrysobalanaceae) using pyrosequencing technology**

Molecular Ecology Resources (2010) 10:1106-1108

**Pierre-Jean G. Malé^{1,2}, Thibaut Malausa³, Jean-François Martin⁴, Jérôme Orivel^{1,2,5} and
Angélique Quilichini^{5,6}**

¹ Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118
route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

² CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

³ Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1301, INRA/UNSA/CNRS, Equipe
BPI, 400, route des Chappes. BP 167. 06903 Sophia-Antipolis Cedex, France

⁴ Montpellier SupAgro, INRA, CIRAD, IRD, Centre de Biologie et de Gestion des
Populations, Campus International de Baillarguet, CS30016, 34988 Montferrier-sur-Lez,
France

⁵ CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou
cedex, France

⁶ Jardin Botanique Henri Gaussen, 39 allées Jules Guesde, F-31062 Toulouse, France

Abstract

The new generation 454 FLX Titanium pyrosequencing technology was used to isolate 503 novel microsatellite loci in the myrmecophytic plant *Hirtella physophora*. Four multiplex PCR sets were optimized in order to genotype 16 polymorphic microsatellite loci. The level of genetic diversity was assessed in two populations from French Guiana. The number of alleles per locus ranged from two to 13 and observed heterozygosity varied from 0.11 to 0.92. Cross-species amplification of these loci was successfully demonstrated in additional species of the same plant family Chrysobalanaceae. This set of microsatellite markers will be useful in addressing questions dealing with the mating system and population genetic structure of Chrysobalanaceae in general and *H. physophora* in particular.

Keywords: *Hirtella*; mutualism; microsatellites; pyrosequencing; Chrysobalanaceae; ant-plant.

Hirtella physophora (Chrysobalanaceae) is an ant-plant of the neotropics. In French Guiana, it is associated with the arboreal ant *Allomerus decemarticulatus* (Myrmicinae) in an obligatory mutualistic relationship (Solano *et al.* 2003; Grangier *et al.* 2009). Since the species is restricted to hilltops, populations of this understory treelet exhibit patchy distributions (Solano *et al.* 2003). Reproduction and dispersal are key elements in the evolution and maintenance of interspecific and horizontally-transmitted interactions. However, very little is known about the reproductive mode and dispersal of understory plants, particularly among Chrysobalanaceae, even though it is one of the most abundant angiosperm families in neotropical rainforests (Ferreira & Prance 1998; Ward *et al.* 2005). Investigating the spatial genetic structure of populations and estimating dispersal at both intra- and inter-population levels in *H. physophora* would be a first step to filling this knowledge gap. We isolated and tested a set of polymorphic microsatellite loci that will be subsequently used to conduct population genetics studies on *H. physophora*.

Total genomic DNA was extracted from 100mg of lyophilized lamina tissue using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega) following manufacturer's instructions. The extract was purified using a standard phenol/chloroform method, ethanol precipitated and resuspended in ultrapure water to obtain a concentration of 467ng/μl. Ratios of light absorbance at 260 / 280nm and at 260 / 230nm were determined to be 2.11 and 1.65 respectively using the spectrophotometer Nanodrop ND-1000 (Peqlab). Enrichment was carried out using the following procedure. Genomic DNA was digested by *RsaI* (Fermentas) for 1 hour at 37°C, following manufacturer's recommendations and ligated to standard adapters. After purification on a Nucleofast PCR plate (Macherey-Nagel), digested DNA was hybridized to eight Biotin-labelled oligonucleotides corresponding to eight targeted microsatellite motifs [(AG)₁₀, (AC)₁₀, (AAC)₈, (AGG)₈, (ACG)₈, (AAG)₈, (ACAT)₆ and (ATCT)₆]. The resulting enriched DNA was amplified using primers corresponding to adapters. A total of 5 μg of each purified enriched libraries was used in the 454 FLX Titanium (Roche Applied Science), library preparation following the manufacturer's protocols and quality control steps. Emulsion PCR, sequencing, and analytical processing such as base calling were then performed without modifications according to the GS-FLX protocol for Titanium series. Production and pyrosequencing of enriched DNA libraries were carried out by Genoscreen (Lille, France) and are fully described in Malausa *et al.* (submitted). The obtained sequences were subsequently sorted and selected using the open access program QDD (Megléc *et al.* 2010). A total of 503 concatenated sequences longer than 100 bp

contained perfect microsatellite motifs displaying at least five repeats and tandem-repetition-free flanking regions.

Based on the expected sizes of amplification products and annealing temperatures of primers, we tested the amplification of 108 of the 503 sequences. PCR amplifications were carried out in a 15 μ L final volume containing 1x QIAGEN Multiplex Master Mix, 0.5x Q-Solution, 2 μ M of each primer, and 40ng of genomic DNA. The thermal profile began with initial denaturation at 95°C (15 min), was followed by 35 cycles of denaturation at 94°C (30 sec), annealing at 57°C (1.5 min) and extension at 72°C (1 min), and ended with final extension at 60°C for 30 min. Seventy-one primer pairs gave a single DNA band corresponding to the predicted size of the PCR product.

Using Multiplex Manager 1.1 (Holleley & Geerts 2009), we chose a set of 19 markers that minimized differences in annealing temperatures among primers and maximized the range of amplification product sizes. We estimated polymorphism levels by genotyping 71 plants from two populations located in French Guiana: PSBV and PSZ9. For each individual sample, 10mg of lyophilized lamina tissue was frozen at -80°C for two hours and immediately ground with two glass beads (8 mm and 4 mm in diameter respectively) in 2 mL microtubes at 30Hz for 5-10 min using a TissueLyser II (Qiagen). Ground samples were then incubated overnight at 42°C with 30 μ l of Proteinase K solution (Qiagen) and 400 μ l of 2X CTAB solution. DNA extraction was performed on 200 μ l of the obtained lysates using a BioSprint 15 DNA Plant Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. These loci were co-amplified in four independent PCR sets to avoid complementarities of >5 bp among primers within each set (see Table 1). PCR amplifications of these markers were carried out as described above but with forward primers fluorophore-labeled on the 5' end. The fluorescent dyes were chosen so as to detect alleles using only one electrophoresis run (see Table 1). All of these loci were unambiguously sized using an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems) with the 500 LIZTM GeneScanTM size standard and GENEMAPPERTM version 4.0 software.

Table 1: Primer sequences and polymorphism statistics for 16 microsatellite loci in two populations of *Hirtella physophora* [*n*, number of individuals analysed; *N_a*, number of alleles observed; *H_o*, observed proportion of heterozygous individuals; *H_e*, expected heterozygosity (Nei 1987); *, significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after correction for multiple tests (Sequential Bonferroni procedure; *p* < 0.01); PSBV and PSZ9, two geographical regions in French Guiana]

Locus	Repeat motif (pyrosequenced allele)	Size range (bp)	5' dye	PSBV (<i>n</i> = 38)			PSZ9 (<i>n</i> = 33)			Primer sequences (5'-3')	Multiplex markers set	Genbank accession numbers
				<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>			
Hphy-1165	(GAA)7	276-294	Atto550	5	0.50	0.62	6	0.67	0.72	GTCAAGAAGGACCACGGTGT ATTC AATGGTCCCCTTTTCC	3	GU982721
Hphy-383	(CTC)7	270-282	Atto565	4	0.50	0.52	3	0.27	0.40	TCAACTCCTTAACGATCCGC TTGGTTCTTTCTCCCTCCCT	2	GU982716
Hphy-393	(AG)10	121-129	Atto550	4	0.12	0.64*	5	0.23	0.76*	ACCAAGACGGCAAACAATC CCCAGGTTACGATTTCACT	1	GU982723
Hphy-669	(AGA)6	289-295	6FAM	3	0.30	0.57	3	0.35	0.55	CAACCAAACCCTCCGAGTTA GACTTCTCTTCGACGGTTGC	1	GU982719
Hphy-901	(CT)8	129-137	YakimaYellow	3	0.45	0.45	5	0.52	0.57	TGAACTAGTATGAGAAATCCCCG GAGTGCACCACTGCACACAT	1	GU982729
Hphy-G108	(CT)11	138-148	Atto550	5	0.45	0.60*	4	0.60	0.71	TTCTCCTTCAACAATCCCTTCTC CTTCTCCAACATAGCCAGCC	4	GU982714
Hphy-G43Q	(TCT)6	183-186	Atto550	2	0.11	0.51*	2	0.33	0.45	TTAGTAGGGGCTGCTTGCTC AGGAAACAAAACAGAGGGAGA	4	GU982725
Hphy-GGUE	(AAG)8	139-151	6FAM	4	0.37	0.38	4	0.70	0.64	AGCGCTTTCACACTCTGGTC CATTCAAAGCAACAGCAACC	2	GU982726
Hphy-KG8A	(AT)6	173-183	6FAM	6	0.16	0.60*	5	0.25	0.58*	TGTTCCAAACTACTCATCTCGAA GCTAGGTTGGGCAGTGGTTA	4	GU982724
Hphy-M4WK	(AG)10	120-162	Atto565	10	0.55	0.54	9	0.67	0.59	TGAGGTTTCAACCTGTATAATGTG GTGGAGGGAGTGCTGAAGAG	4	GU982728
Hphy-MFOM	(AAC)7	171-177	Atto565	3	0.59	0.55	4	0.48	0.57	GAAAATCCAAATTGACACGCT AACGGGTATGCGAAACTCTG	3	GU982717
Hphy-MVFC	(AGA)5	199-226	Atto565	5	0.47	0.69*	3	0.58	0.56	ACTCAAGGCCGCTCTTCTCT CCATTTCTCGGTTGGATTTG	3	GU982722
Hphy-MYRJ	(AC)15	83-117	YakimaYellow	13	0.92	0.82	13	0.88	0.87	ACCTTCCACTTTTCTCCCCAC TCTACTTTCAGTATCAGACCAACAA	1	GU982727
Hphy-NTVY	(CTT)12	96-111	6FAM	4	0.53	0.53	6	0.64	0.56	ATTGCAAAGGCAGAGGAATG TGACAAGTTCCATGGTGAAGA	4	GU982715
Hphy-O441	(CAA)7	177-183	YakimaYellow	3	0.11	0.10	2	0.12	0.12	GAATTTGGTCAAGCCCTGTC	1	GU982720

Hphy-OINQ	(AAC) ₅	243-264	6FAM	3	0.34	0.36	3	0.36	0.48	CGTCATCCTTATTGGGGCTA CACCTTACCGCCAATCAAAT CGAGGGTGTGGATCTTGTCT	2	GU982718
-----------	--------------------	---------	------	---	------	------	---	------	------	--	---	----------

Table 2: Cross-species PCR tests for 16 *H. physophora* microsatellite loci in six plant species. The tested species include two species of the same genus, *Hirtella bicornis* and *H. glandulosa*, and four species of the same family, *Licania alba*, *L. canescens*, *L. membranacea* and *Couepia guianensis*. The numbers of alleles and the size range of alleles (in parentheses) are based on *n* individuals genotyped for each species. Amplification failure is indicated by a dash.

Locus	<i>H. bicornis</i> (<i>n</i> = 5)	<i>H. glandulosa</i> (<i>n</i> = 7)	<i>L. alba</i> (<i>n</i> = 7)	<i>L. canescens</i> (<i>n</i> = 7)	<i>L. membranacea</i> (<i>n</i> = 9)	<i>C. guianensis</i> (<i>n</i> = 7)
Hphy-1165	6 (276-294)	3 (279-308)	4 (285-294)	7 (282-306)	6 (197-306)	1 (282)
Hphy-383	3 (268-273)	4 (268-273)	1 (295)	5 (273-290)	4 (273-301)	2 (287-288)
Hphy-393	3 (119-131)	-	-	-	-	-
Hphy-669	4 (286-305)	2 (289-299)	1 (285)	4 (283-294)	3 (281-287)	2 (280-281)
Hphy-901	3 (131-141)	4 (129-145)	1 (135)	7 (132-143)	4 (125-143)	2 (135-138)
Hphy-G108	1 (141)	7 (136-152)	-	-	2 (144-158)	1 (138)
Hphy-G43Q	3 (177-186)	4 (178-182)	-	-	1 (186)	-
Hphy-GGUE	3 (136-148)	5 (133-154)	4 (136-151)	7 (132-151)	3 (138-145)	3 (136-142)
Hphy-KG8A	2 (176-178)	5 (175-183)	2 (173-174)	3 (170-186)	1 (173)	1 (175)
Hphy-M4WK	6 (120-140)	5 (124-143)	1 (117)	8 (122-134)	6 (119-145)	6 (125-139)
Hphy-MFOM	4 (165-177)	7 (156-174)	2 (161-162)	5 (150-177)	5 (159-177)	4 (165-177)
Hphy-MVFC	6 (199-229)	8 (207-228)	5 (196-208)	8 (199-226)	6 (202-298)	4 (202-210)
Hphy-MYRJ	5 (79-91)	6 (75-95)	2 (79-81)	3 (79-81)	-	-
Hphy-NTVY	6 (93-106)	7 (92-111)	4 (86-99)	1 (133)	7 (101-122)	1 (96)
Hphy-O441	5 (174-197)	3 (179-190)	2 (173-174)	2 (173-186)	2 (173-182)	1 (175)
Hphy-OINQ	3 (243-264)	4 (243-265)	6 (249-265)	2 (258-259)	4 (255-259)	1 (258)

Of the 19 markers, 16 loci were polymorphic. Levels of polymorphism, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were estimated using GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset 1995). Correction for multiple tests was performed when appropriate (sequential Bonferroni procedure). Allelic diversity varied from 2-13 and observed heterozygosity from 0.11-0.92 (Table 1). Five loci departed significantly from Hardy-Weinberg equilibrium in PSBV and only two in PSZ9 ($p < 0.01$, Table 1). Tests for presence of null alleles using Micro-checker v2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004) were also significant at these loci. There was no evidence of linkage disequilibrium between each pair of markers. The sequences of the 16 microsatellite loci have been deposited in the GenBank database (see Table 1 for their accession numbers).

Cross-species amplifications were tested on individuals from two species of the same genus (*H. bicornis* and *H. glandulosa*) and four species of the same family (*Licania alba*, *L. canescens*, *L. membranacea* and *Couepia guianensis*). Extraction, PCR and genotyping conditions were identical to those described above and results are reported in Table 2. All loci were successfully cross-amplified in at least one species. Twelve loci were amplifiable in all the tested species, suggesting a strong conservation of the flanking regions of these loci. The extent of polymorphism of the markers in the successful cross-species amplifications was similar to that observed in *H. physophora*. Altogether, these results suggest that this set of 16 polymorphic microsatellites will contribute to investigations of dispersal and mating system biology in the Chrysobalanaceae family in general and in *H. physophora* in particular, as well as to understanding an ecologically and evolutionarily important ant-plant mutualism.

Acknowledgements

We are grateful to J. Chave for providing us with samples of Chrysobalanaceae other than *H. physophora* and to K. G. Dexter for editing the manuscript. We would also like to thank the *Laboratoire Environnement de Petit Saut* for furnishing logistical help. Support for this study was provided by a research program of the French *Agence Nationale de la Recherche* (research agreement n°ANR-06-JCJC-0109-01), by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program, by the *Programme Amazonie II* (project 2ID) of the French *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) and by a grant from the French Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), AIP BioRessources EcoMicro.

PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 June 2010 – 31 July 2010

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM, MALVINA ANDRIS,¹ GUDBJORG I. ARADOTTIR,^{2, 3} G. ARNAU,⁴ ASTA AUDZIJONYTE,⁵ EMILIE C. BESS,⁶ FRANCESCO BONADONNA,⁷ G. BOURDEL,⁴ JOËL BRIED,¹ GREGORY J. BUGBEE,⁸ P. A. BURGER,^{9, 10} H. CHAIR,⁴ P. C. CHARRUAU,^{9, 10} A. Y. CIAMPI,¹¹ L. COSTET,¹² PAUL J. DeBARRO,¹³ H. DELATTE,¹² MARIE-PIERRE DUBOIS,⁷ MARK D. B. ELDRIDGE,¹⁴ PHILLIP R. ENGLAND,⁵ D. ENKHBILEG,¹⁵ B. FARTEK,^{12, 16} MICHAEL G. GARDNER,¹⁷ KAREN-ANN GRAY,¹⁴ RASANTHI M. GUNASEKERA,⁵ STEVEN J. HANLEY,² NATHAN HAVIL,¹⁸ JAMES P. HERWARD,¹⁹ SHOTARO HIRASE,²⁰ YAN HONG,²¹ PHILIPPE JARNE,⁷ QI JIANFEI,²¹ REBECCA N. JOHNSON,¹⁴ MANAMI KANNO,²⁰ AKIHIRO KIJIMA,²⁰ HYUN C. KIM,²² KWAN S. KIM,²² WOO-JIN KIM,²³ ELIZABETH LARUE,²⁴ JANG W. LEE,²² JEONG-HO LEE,²² CHUNHONG LI,²¹ MINGHUI LIAO,²¹ NATHAN LO,²⁵ ANDREW J. LOWE,²⁶ THIBAUT MALAUSA,²⁷ PIERRE-JEAN G. MALÉ,^{28, 29} MICHELLE D. MARKO,³⁰ JEAN-FRANÇOIS MARTIN,³¹ RUSSELL MESSING,³² KAREN J. MILLER,³³ BYEONG-WHA MIN,²² JEONG-IN MYEONG,²² S. NIBOUCHE,¹² ANN E. NOACK,^{14, 25} JAE K. NOH,²² JÉRÔME ORIVEL,^{28, 29, 34} CHOUL-JI PARK,²² D. PETRO,³⁵ KITTIPATH PRAPAYOTIN-RIVEROS,⁸ ANGÉLIQUE QUILICHINI,^{34, 36} B. REYNAUD,¹² CYNTHIA RIGINOS,¹⁹ A. M. RISTERUCCI,³⁷ HARLEY A. ROSE,³⁸ I. SAMPAIO,³⁹ K. SILBERMAYR,⁴⁰ M. B. SILVA,³⁹ N. TERO,⁹ RYAN A. THUM,²⁴ C. C. VINSON,³⁹ ADAM VORSINO,³² CHARLES R. VOSSBRINCK,⁸ C. WALZER,¹⁰ JASON C. WHITE,⁸ ANIA WIECZOREK⁴¹ and MARK WRIGHT³²

¹Departamento de Oceanografia e Pescas, Centro do IMAR da Universidade dos Açores, 9901-862 Horta, Açores, Portugal; ²Centre for Bioenergy and Climate Change, Plant & Invertebrate Ecology Department, Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire, AL5 2JQ, UK; ³Imperial College London, Silwood Park Campus, Ascot, Berkshire, SL5 7PY, UK; ⁴CIRAD, UPR Multiplication Végétative, Montpellier, F-34398 France; ⁵CSIRO Marine & Atmospheric Research and Wealth from Oceans National Research Flagship GPO Box 1538, Hobart, TAS 7001, Australia; ⁶Illinois Natural History Survey, Division of Biodiversity and Economic Entomology, University of Illinois, 1816 South Oak Street, Champaign, IL 61820, USA; ⁷CEFE, UMR 5175 CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France; ⁸Department of Environmental Sciences, Connecticut Agricultural Experiment Station, 123 Huntington Street, New Haven, CT 06511, USA; ⁹Institute of Population Genetics, Department of Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria; ¹⁰Research Institute of Wildlife Ecology, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria; ¹¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte Final, Brasília, DF, CEP 70770 900, Po Box 02372, Brazil; ¹²CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, la Réunion, France; ¹³CSIRO Entomology, 120 Meiers Road, Indooroopilly, Qld 4068, Australia; ¹⁴DNA Laboratory, Australian Museum, 6 College Street, Sydney, NSW 2010, Australia; ¹⁵Wild Camel Protection Foundation, Institute of Biology, Mongolian Academy of Science, Ulaanbaatar 210351, Mongolia; ¹⁶Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, la Réunion, France; ¹⁷Flinders University, Sturt Road, Bedford Park, Adelaide, South Australia; ¹⁸USDA Forest Service, Northern Research Station, 51 Mill Pond Road, Hamden, CT 06514, USA; ¹⁹School of Biological Sciences, The University of Queensland, Brisbane, Qld 4072, Australia; ²⁰Integrated Center of Field Sciences, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Onagawa, Miyagi; ²¹Temasek Life Sciences Laboratory, 1 Research Link, National University of Singapore, Singapore City 117604, Singapore; ²²Genetics and Breeding Research Center, National Fisheries Research and Development Institute, Geoje-City 656-842, South Korea; ²³Biotechnology Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, South Korea; ²⁴Grand Valley State University, Annis Water Resources Institute, 224 Lake Michigan Center, 740 West Shoreline Drive, Muskegon, MI 49441, USA; ²⁵School of Biological Sciences, University of Sydney, NSW, Australia; ²⁶Australian Centre for Evolutionary Biology and Biodiversity, School of Earth and Environmental Sciences, University of Adelaide, North Terrace 5005, South Australia; ²⁷Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1301, INRA/UNSA/CNRS, Equipe BPI, 400, route des Chappes, BP 167, 06903 Sophia-Antipolis Cedex, France; ²⁸Université de Toulouse, UPS, EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France; ²⁹CNRS, EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France; ³⁰Concordia College, 901 8th Street, South Moorhead, MN 56562, USA; ³¹Montpellier SupAgro, INRA, CIRAD, IRD,

Centre de Biologie et de Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, CS30016, 34988 Montferrier-sur-Lez, France;³²Department of Plant and Environmental Protection Sciences, University of Hawaii at Manoa, 3050 Maile Way, Gilmore 310, Honolulu, HI 96822, USA;³³Institute of Antarctic and Southern Ocean Studies, University of Tasmania, Hobart, TAS 7001, Australia;³⁴CNRS, UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France;³⁵INRA, UR 1321 Agrosystèmes Tropicaux, Domaine Duclos, F-97170 Petit-Bourg, French West Indies;³⁶Jardin Botanique Henri Gaussen, 39 allées Jules Guesde, F-31062 Toulouse, France;³⁷CIRAD, UMR DAP, F-34398 Montpellier, France;³⁸Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources, McMillan Building, University of Sydney, NSW 2006, Australia;³⁹Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, Alameda Leandro Ribeiro, Aldeia, Bragança, Pará, CEP 68600 000, Brazil;⁴⁰Institute of Animal Breeding and Genetics, Department of Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria;⁴¹Department of Tropical Plant and Soil Sciences, University of Hawaii at Manoa, 3190 Maile Way, St John 117, Honolulu, HI 96822, USA

Abstract

This article documents the addition of 205 microsatellite marker loci to the Molecular Ecology Resources Database. Loci were developed for the following species: *Bagassa guianensis*, *Bulweria bulwerii*, *Camelus bactrianus*, *Chaenogobius annularis*, *Creontiades dilutus*, *Diachasmimorpha tryoni*, *Dioscorea alata*, *Euhrychiopsis lecontei*, *Gmelina arborea*, *Haliotis discus hannai*, *Hirtella physophora*, *Melanaphis sacchari*, *Munida isos*, *Thaumastocoris peregrinus* and *Tuberolachmus salignus*. These loci were cross-tested on the following species: *Halobaena caerulea*, *Procellaria aequinoctialis*, *Oceanodroma monteiroi*, *Camelus ferus*, *Creontiades pacificus*, *Dioscorea rotundata*, *Dioscorea praehensilis*, *Dioscorea abyssinica*, *Dioscorea nummularia*, *Dioscorea transversa*, *Dioscorea esculenta*, *Dioscorea pentaphylla*, *Dioscorea trifida*, *Hirtella bicornis*, *Hirtella glandulosa*, *Licania alba*, *Licania canescens*, *Licania membranacea*, *Couepia guianensis* and 7 undescribed *Thaumastocoris* species.

This article documents the addition of 205 microsatellite marker loci to the Molecular Ecology Resources Database. Table 1 contains information on the focal species, the number of loci developed, any other species the loci were tested in and the accession numbers for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and

GenBank. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column. A full description of the development protocol for the loci presented here can be found on the Molecular Ecology Resources Database (<http://tomato.biol.trinity.edu/>).

Table 1 Information on the focal species, the number of loci developed, any other species the loci were tested in and the accession numbers for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and GenBank. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column

Species	No. primers developed	Other species tested	MER database no.	GenBank accession no.	Authors
<i>Bagassa guianensis</i>	12	n/a	44422–44433	GU969285–GU969296	Vinson, C. C.; Silva, M. B.; Sampaio, I.; Ciampi, A. Y.
<i>Bulweria bulwerii</i>	11	<i>Halobaena caerulea</i> , <i>Procellaria aequinoctialis</i> , <i>Oceanodroma monteiroi</i>	44342–44352	HM171890–HM171899, HM171901	Andris, Malvina; Dubois, Marie-Pierre; Jarne, Philippe; Bonadonna, Francesco; Bried, Joël
<i>Camelus bactrianus</i>	9	<i>Camelus ferus</i>	44321–44330	GU138968–GU138976	Silbermayr, K.; Tero, N.; Charruau, P. C.; Enkhbileg, D.; Walzer, C.; Burger, P. A.
<i>Chaenogobius annularis</i>	15	n/a	44395–44409	AB557719–AB557733	Hirase, Shotaro; Kanno, Manami; Kijima, Akihiro
<i>Creontiades dilutus</i>	12	<i>Creontiades pacificus</i>	44434–44445	GU937077–GU937088	Hereward, James P.; Gardner, Michael G.; Riginos, Cynthia; DeBarro, Paul J.; Lowe, Andrew J.

Table 1 Continued

Species	No. primers developed	Other species tested	MER database no.	GenBank accession no.	Authors
<i>Diachasmimorpha tryoni</i>	12	n/a	44465–44476	HM189680–HM189691	Vorsino, Adam; Wicczorek, Ania; Wright, Mark; Messing, Russell
<i>Dioscorea alata</i>	42	<i>D. rotundata</i> , <i>D. praeheasilis</i> , <i>D. abyssinica</i> , <i>D. nummularia</i> , <i>D. transversa</i> , <i>D. esculenta</i> , <i>D. pentaphylla</i> , <i>D. trifida</i>	44353–44394	FN677762–FN677803	Chair, H.; Bourdel, G.; Petro, D.; Arnau, G.; Risterucci, A.M.
<i>Euhrychiopsis lecontei</i>	12	n/a	44410–44421	GU112241–GU112243, GU112245, GU112249, GU112250, HM237046–HM237051	Vossbrinck, Charles R.; White, Jason C.; Bugbee, Gregory J.; Prapayotin-Riveros, Kittipath; Marko, Michelle D.; Thum, Ryan A.; LaRue, Elizabeth; Havil, Nathan
<i>Gmelina arborea</i>	11	n/a	44491–44501	HM561953–HM561963	Liao, Minghui; Li, Chunhong; Jianfei, Qi; Hong, Yan
<i>Haliotis discus hannai</i>	12	n/a	44255–44266	AB058283–AB058290, AB551426–AB551429	Park, Choul-Ji; Kim, Woo-Jin; Lee, Jeong-Ho; Noh, Jae Koo; Kim, Hyun Chul; Min, Byeong-Wha; Kim, Kwan Seok; Lee, Jang Wook; Myeong, Jeong-In
<i>Hirtella physophora</i>	16	<i>H. bicornis</i> , <i>H. glandulosa</i> , <i>Licania alba</i> , <i>L. canescens</i> , <i>L. membranacea</i> , <i>Couepia guianensis</i>	44227–44242	GU982714–GU982729	Malé, Pierre-Jean G.; Malausa, Thibaut; Martin, Jean-François; Orivel, Jérôme; Quilichini, Angélique
<i>Melanaphis sacchari</i>	14	n/a	44522–44535	GU145080–GU145091, HM104439, HM104440	Fartek, B.; Nibouche, S.; Risterucci, A.M.; Delatte, H.; Reynaud, B.; Costet, L.
<i>Munida isos</i>	8	n/a	44514–44521	HM194717–HM194724	Gunasekera, Rasanthi M.; England, Phillip R.; Miller, Karen J.; Audzijonyte, Asta
<i>Thaumastocoris peregrinus</i>	11	7 undescribed <i>Thaumastocoris</i> spp.	44454–44464	GU174477, GU174479–GU174481, GU174484–GU174487, GU174489–GU174491	Gray, Karen-Ann; Noack, Ann E.; Johnson, Rebecca N.; Eldridge, Mark D. B.; Bess, Emilie C.; Lo, Nathan; Rose, Harley A.
<i>Tuberolachnus salignus</i>	8	n/a	44446–44453	HM137294–HM137301	Aradottir, Gudbjorg L.; Hanley, Steven J.

4.4 Article 7 : Multiscale spatial genetic structure and geographically limited gene dispersal increase the stability of an ant-plant mutualism

En préparation

Pierre-Jean G. Malé^{1,2}, Céline Leroy³, Alain Dejean³, Angélique Quilichini³ and Jérôme Orivel^{1,2,3}

¹Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

²CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

³CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France

Abstract

Comparative population genetic studies are needed to properly understand the evolution of closely associated species. Indeed, the relative intensity of the genetic structures observed in the partners greatly influences the evolutionary fate of the relationship. By affecting the local adaptation of the populations such genetic structure can provide one or another partner with a coevolutionary advantage. In this study, we focused on population genetic structure in a species specific and obligatory mutualism between the neotropical ant-plant, *Hirtella physophora*, and its ant associate, *Allomerus decemarticulatus*. The ants have been shown to get a profit in partially castrating their host plant and the plant is capable to retaliate against too virulent castrating ants. Both species had very structured populations, although the genetic structure was weaker for the plant. This indicated that the plant populations experienced more gene flow than ant populations, potentially providing host plants with more important evolutionary potential than their symbionts. Dispersal distances of the partners were inferred from genetic data, and also experimentally assessed for the ants. These distances allowed local transmission of the association, which resulted in inbred populations where their partners can be considered as public goods that are shared between individuals and their relatives. We conclude that such level of spatial structure in the partners' populations enhances the stability of the mutualistic relationship both by allowing host plants to be more locally adapted than their castrating symbionts and by partially aligning the interests of the partners in their respective reproduction.

Keywords: population genetic; metapopulation; gene flow; local adaptation; myrmecophyte.

Introduction

Spatial structuring in the partners' populations is crucial in determining the evolutionary fate of close relationships. At the metacommunity scale, spatial structuring allows the maintaining of the diversity of interactions and of interacting species (Levins & Culver 1971; Tilman 1994; Yu *et al.* 2001). As an example, the patchy distribution in the plant-ant *Leonardoxa africana africana* allows the coexistence of both mutualistic and parasitic ant species because of the different abilities of the ants to take advantage of the competition/colonization trade-off (Debout *et al.* 2009).

Recent theoretical and empirical studies have provided key insights into the influence of such spatial structuring on the evolution of parasites and hosts. The clustering of populations leads to lower levels of virulence because of the greater risk of local extinction of both host and parasite populations when the transmission of the parasite is local (Claessen & de Roos 1995; Boots & Sasaki 1999; Szilágyi *et al.* 2009). In this case, the prudent exploitation of the host by the parasite is thus supposed to be favored by natural selection (van Baalen 2002; Lion & van Baalen 2008). At the metapopulation scale, spatial structuring is well known to maintain local genetic variations, thus influencing the evolutionary potential of hosts and parasites, and allowing coevolution (Nuismer *et al.* 1999). This way, gene flow influences local adaptation of species. Under high rates of gene flow between populations of a parasite, the local adaptation of the parasite is expected (Kaltz & Shykoff 1998; Greischar & Koskella 2007). Conversely, local parasite maladaptation, or at least the absence of local adaptation (see Greischar & Koskella 2007), is expected when host populations experience a higher rate of gene flow than the parasites (Gandon & Michalakis 2002).

Surprisingly, the influence of spatial structure on the local adaptation of mutualists has rarely been addressed. Despite a growing amount of theoretical literature, very few empirical

studies explored the population structure of the partners engaged in specific mutualisms (Anderson *et al.* 2004; Thompson *et al.* 2005; Léotard *et al.* 2008). Moreover, such local dispersion potentially generates genetic correlation between species and it is one of the key factors enhancing the stability of horizontally-acquired mutualisms (Frank 1994; Wilkinson 1997; Wilkinson & Sherratt 2001; Kiers & van der Heijden 2006).

In this study, we focused on the species-specific mutualism between the ant-plant *Hirtella physophora* Mart. & Zucc. (Chrysobalanaceae) and the plant-ant *Allomerus decemarticulatus* Mayr (Myrmicinae), and compared the population genetic structure of the two partners. Since *H. physophora* populations are restricted to hilltops, both ant and plant individuals exhibit patchy distributions. As a result, the genetic structure of the plant populations might be influenced by the landscape topology and the ant population structure is expected to reflect the one of the plant. Moreover, *A. decemarticulatus* has been demonstrated to destroy most of the buds of its host plant, resulting in a very low fruit production (Orivel *et al.* 2010; Malé *et al.* submitted-a). Although *H. physophora* seems able to retaliate against too virulent castrating ant colonies (Malé *et al.* submitted-b), the levels of gene flow between plant populations and between ant populations is also likely to influence the outcome of the conflict. By increasing local genetic variability, gene flows can indeed enhance the capability of the populations of one partner to respond quickly to changes in the other partner. Thus, the plant would be able to adapt to cheating ants or ants would be able to by-pass sanctions. On the contrary, a very low gene flow between populations is expected to lower the interest of ants to castrate because of the local transmission of the association creating a positive correlation in the reproductive successes of the partners. We examined the genetic structure of the interacting species at two different geographic scales. First, we focused on the genetic differentiation and gene flow between populations at a large regional scale. Second, we defined the prevailing transmission mode of the association at a finer population scale, using

both molecular biology and experimental approaches to assess the dispersal distances of the species.

Materials and methods

Model system

Hirtella physophora is an understory treelet that occurs strictly in pristine Amazonian rainforest. Plant individuals have long-lived leaves that bear a pair of pouches and extra-floral nectaries (Leroy *et al.* 2008). It is a self-incompatible and entomogamous species (Leroy *et al.* submitted). In the study area, plant individuals are almost exclusively inhabited by *A. decemarticulatus* with a single mature colony per plant (Solano *et al.* 2003). *Allomerus decemarticulatus* is a strictly monogynous and monoandrous ant species (Grangier *et al.* 2009; PJG Malé, results not shown). It has never been found in association with another myrmecophyte (Grangier *et al.* 2009). As in any other protective mutualism between ants and plants, *A. decemarticulatus* workers provide protection to their host-plant from defoliators (Grangier *et al.* 2008).

Sampling and genotyping

We collected and successfully genotyped 394 *H. physophora* individuals and 377 *A. decemarticulatus* colonies from 14 different hilltops in French Guiana, hereafter referred to as ‘populations’. The distance between the populations varied from 0.5 km to 117 km (Fig. 1). One leaf per plant and several ant workers were collected. Plant tissues were lyophilized and ant workers were preserved in 96% ethanol. Each individual was also geolocated using a Garmin GPSMAP® 60Cx GPS receiver (Garmin Ltd., Kansas). An exhaustive sampling of all individuals was also performed in four of the censused populations (Table 1).

For each *H. physophora* sample, 10 mg of lyophilized lamina tissue was frozen at -80°C

during one hour and then immediately ground with two glass beads (8 mm and 4 mm in diameter) in 2 mL microtubes at 30 Hz for 5-10 min using a TissueLyser II (Qiagen, Courtaboeuf, France). Ground samples were then incubated overnight at 42°C with 30 µl of Proteinase K solution (Qiagen) and 400 µl of 2X CTAB solution. DNA extraction was performed on 200 µl of the obtained lysates using a BioSprint 15 DNA Plant Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. We subsequently amplified 14 of the 16 specific microsatellite markers in four different PCR sets and using forward primers fluorophore-labeled on the 5' end, as described in Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* (2010). These 14 markers are Hphy-1165, Hphy-383, Hphy-901, Hphy-G108, Hphy-G43Q, Hphy-GGUE, Hphy-KG8A, Hphy-M4WK, Hphy-MFOM, Hphy-MVFC, Hphy-MYRJ, Hphy-NTVY, Hphy-O441 and Hphy-OINQ.

For each *A. decemarticulatus* sample, the total DNA was extracted from one ant worker per colony. Each ant worker was incubated overnight at 55°C in 10 µL of Proteinase K solution (Qiagen) and 150 µL of 10% Chelex solution (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). We used 2 µL of the obtained solution to amplify 10 microsatellite markers in two different PCR sets and using forward primers fluorophore-labeled on the 5' end, as described in Malé *et al.* (2010). These markers are Adec-A21, Adec-A23, Adec-A41, Adec-A49, Adec-A60, Waur8Ω, Waur872, Waur813, Waur225 and Ad166 (Fournier *et al.* 2005; Debout *et al.* 2006; Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* 2009; Malé *et al.* 2010).

All the loci were sized using an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) coupled with the 500 LIZTM GeneScanTM size standard and GENEMAPPERTM 4.0 software.

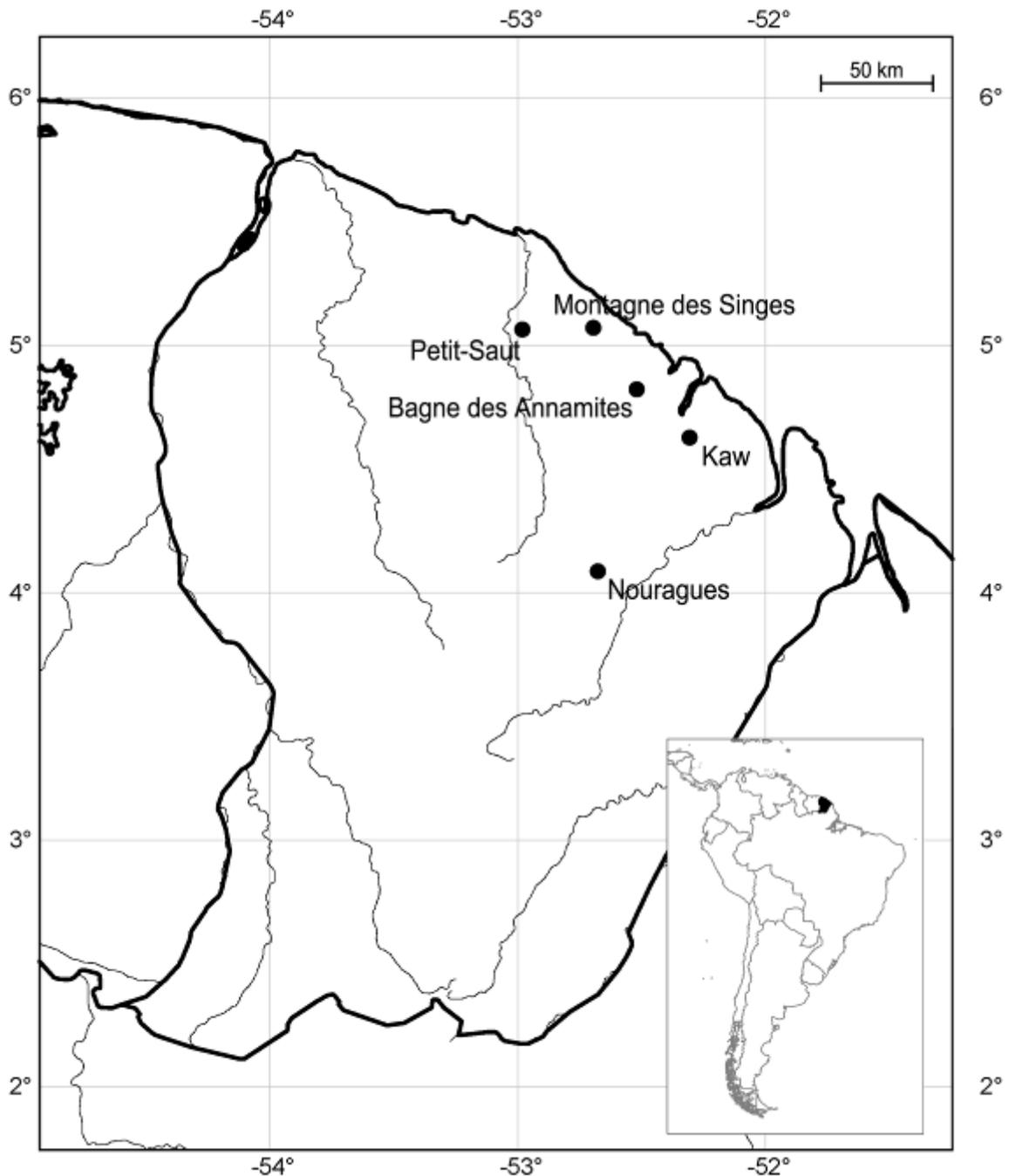


Figure 1. Map of the four sampled regions in French Guiana. One population was sampled in the *Kaw* region (FOU) and in the *Bagne de Annamites* (BA), two populations were sampled in the *Nouragues* region (GP and PP) and in the *Montagne des Singes* (SL and SS) and eight in the *Petit-Saut* region (Z1, Z2, Z6, Z7, Z9, Z11, ZP, and PK24).

Assessment of large-scale spatial genetic structure

All the analyses were performed separately on both *H. physophora* and *A. decemarticulatus* populations.

Wright's fixation indices and Nei's F_{ST} generalization for multiallelic loci G_{ST} were calculated over all the populations considering the 14 populations as independent entities using FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 1995; Goudet 2001). F_{IS} inbreeding coefficients were also calculated for each population independently. Note that positive values of F_{IS} inbreeding coefficients can result from selfing and/or biparental inbreeding because such coefficients are based on heterozygosity deficiencies (i.e. within-individuals within-locus correlations). In order to discriminate between these two possibilities, we assessed the selfing rates of both species in all the populations using estimates that are based on identity disequilibria (i.e. within-individuals among-loci correlations). We used the method implemented in the program RMES which has been proved to not be affected by putative presence of null alleles (David *et al.* 2007).

The isolation by distance between populations was assessed by computing pairwise F_{ST} indexes and calculating the significance of the regression of $F_{ST}/(1-F_{ST})$ as a function of the logarithm of the geographical distances using Mantel's test in SPAGeDi v1.3 (Hardy & Vekemans 2002).

We performed Bayesian clustering analyses to infer spatial structure in the genetic data, using the method implemented in STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003, 2007; Hubisz *et al.* 2009). Each round of STRUCTURE consisted in 10 runs for each of the K genetic groups tested ($K = 1-20$). These runs were performed with the correlated allele frequencies model, the Locprior model and no admixture model, for 100,000 iterations after a burn-in period of 10,000 iterations. This burn-in period was previously determined to be sufficient for the likelihood of the runs to stabilize. The number of genetic groups was determined using the ΔK method of Evanno *et al.* (2005) which consists in assessing the breakpoint in the slope of the distribution of $\ln P(D)$ as a function of K . This approach was performed in a hierarchical way as described by Coulon *et al.* (2008). Briefly, we first used

the clustering method to infer the number of genetic groups among the samples. Then, we assigned each individual to the group for which its inferred ancestry was the highest. Finally, we used the clustering method to infer the number of genetic groups within the defined lower-level groups, and so on until the number of genetic groups inferred or the number of population in a group was equal to one.

Assessment of fine-scale spatial genetic structure

The isolation by distance among individuals within populations was assessed by calculating the significance of the regression of the kinship coefficient described by Loiselle *et al.* (1995) as a function of the logarithm of geographical distances lower than 0.5 km, using Mantel's test in SPAGeDi v1.3 (Hardy & Vekemans 2002). Note that the kinship coefficient used is not supposed to be biased by inbreeding. The slope of this regression can be used to estimate the gene dispersal distance in an iterative approach, provided that the effective density D_e is accurately known. We used SPAGeDi v1.3 to estimate σ , half the mean square of the parent-offspring distance, with a restricted distance range comprised between σ and 20σ . We assessed D_e in the four exhaustively searched populations and used these values in SPAGeDi v1.3 computations.

Experimental assessment of the dispersion distance of *A. decemarticulatus* founding queens

Eight *H. physophora* individuals from which the ant colonies have been removed were successfully transferred and placed randomly within a population in the *Petit-Saut* area. This population was exhaustively censused and workers from each of the 54 colonies recorded were collected. After eight weeks, we opened every domatia of the transferred plants and collected every foundress queen ($n = 48$, from one to 18 per plant). These queens and at least four workers per resident colony were genotyped at 10 microsatellite markers as described

above. Note that the founding queen abdomens were not used in DNA extraction to avoid amplification of sperm DNA.

We assessed the probability of ants from sibling colonies to have the same multilocus genotype and the number of ants from sibling colonies expected to have the same multilocus genotype based on the previous probability using GENALEX v6.4 (Peakall & Smouse 2006). We tried to assign each founding queen to full sib families constituted of workers from resident ant colonies using the software COLONY v2.0.1.1 (Wang 2004). The procedure consisted in four ‘long runs’ in which all workers coming from a given resident colony were considered as full sibs (i.e. known paternal and maternal sibships) whereas no a priori assumption was made on founding queens sibship. The mating system was set as ‘female monogamy’ and ‘male monogamy’, with the ‘inbreeding model’. The frequencies of genotyping errors were assessed for each marker by genotyping several ants twice. At the end of the procedure, the founding queens were considered to be assigned to their native colony when grouped in a full-sib family with workers from only one resident colony with an exclusion probability greater than 0.99.

Results

Assessment of large-scale spatial genetic structure

Most of the genetic variation occurred at the individual level as shown by Wright’s fixation indexes (Table 2). Global F_{ST} and G_{ST} values indicated a low to moderate genetic differentiation among populations. However, this result must be interpreted carefully because of the very short distances between populations (mostly lower than 50 km). Positive global F_{IS} values indicated a heterozygote deficiency both at the global and at the population levels (Table 1, Table 2). This deficiency was more likely to result from inbreeding rather than from selfing since the unbiased selfing rate s estimated value was equal or almost equal to 0 (Table

2).

Table 1. Number of individuals (n), pairwise distance between individuals, inbreeding coefficient (F_{IS}) and assignment to genetic clusters using STRUCTURE v2.3.3 in the 14 sampled populations of *Hirtella physophora* and *Allomerus decemarticulatus*. Regions correspond to groups of closed sampled areas (see Fig. 1), stars indicate populations that have been exhaustively sampled and letters represent the different genetic clusters.

Regions	Populations	d_{\min}/d_{\max} (in m)	<i>H. physophora</i>			<i>A. decemarticulatus</i>		
			n	F_{IS}	cluster	n	F_{IS}	cluster
Kaw	FOU	0.9 / 139.2	21	0.227	A	20	0.004	a
Bagne des Annamites	BA	2.5 / 43.2	12	0.330	B	12	0.200	b
Nouragues	GP*	0.3 / 318.5	58	0.152	C	56	0.124	c
	PP	0.1 / 376.5	49	0.166	D	34	0.116	d
Montagne des Singes	SL	2.5 / 105.8	11	0.287	E	13	0.160	e
	SS	4.0 / 199.1	10	0.095	E	17	0.134	e
	Z1*	0.1 / 362.3	45	0.173	F	44	0.008	f
	Z9*	1.4 / 324.5	41	0.125	G	42	-0.010	g
Petit-Saut	Z6	4.1 / 441.9	17	0.209	H	16	0.179	g
	ZP	3.6 / 220	12	0.178	H	12	0.099	g
	Z11	4.1 / 61.9	9	0.165	H	9	-0.040	h
	Z7	11.0 / 223.3	20	0.214	H	21	0.073	h
	Z2	1.8 / 208.6	20	0.086	H	19	0.049	i
	PK24*	0.6 / 245.1	69	0.137	H	62	0.021	j

Isolations by distance were highly significant for both *A. decemarticulatus* and *H. physophora* with coefficients of determination r^2 remarkably high (Table 2) indicating an important population genetic structure. Moreover, the results obtained using the clustering method implemented in STRUCTURE v2.3.3 highlighted a high number of genetic clusters with almost the same partitioning in *H. physophora* and *A. decemarticulatus* (except for the *Petit-Saut* area, see Table 1).

Table 2: Parameters of the global genetic differentiation for *H. physophora* and *A. decemarticulatus*. ' F_{IT} ', ' F_{ST} ', ' G_{ST} ' and ' F_{IS} ' are the fixation indexes; ' s (CI 95)' represent the selfing rate and 95% confidence interval; ' IBD ' is the statistic inherent to isolation by distance (i.e. regression of pairwise $F_{ST}/(1-F_{ST})$ with the logarithm of pairwise geographical distances).

Species	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}	F_{IS}	s (CI 95)	IBD	
						slope	r^2
<i>H. physophora</i>	0.197	0.038	0.035	0.1647	0.018 (0, 0.053)	0.015***	0.284
<i>A. decemarticulatus</i>	0.206	0.148	0.135	0.0686	0.000 (0, 0.014)	0.058***	0.557

Assessment of fine-scale spatial genetic structure

Isolations by distance at the individual level, within populations, were highly significant for both *H. physophora* and *A. decemarticulatus*, indicating a significant fine-scale population genetic structure, with closely related individuals being spatially close to each other. However, the coefficients of determination r^2 were surprisingly low which reflects the huge variability in the kinship coefficient values (Table 3).

Table 3: Estimates of σ (i.e. half the mean square parent-offspring distance \pm standard error) for the four exhaustively sampled populations, and isolation by distance parameters between individuals within populations. ' D_e ' is the effective density of individuals measured in the field; '*IBD*' the statistics inherent to isolation by distance (i.e. regression of pairwise Loiselle *et al.*'s kinship coefficients (1995) with the logarithm of pairwise geographical distances). Dashes indicates that the estimation procedure did not succeed.

	Populations				<i>IBD</i>	
	Z1 ($D_e = 255$)	Z9 ($D_e = 28$)	PK24 ($D_e = 70$)	GP ($D_e = 124$)	slope	r^2
<i>H. physophora</i>	-	79.76 (± 59.86)	37.66 (± 5.29)	29.80 (± 5.52)	-0.014***	0.024
<i>A. decemarticulatus</i>	22.42 (-)	40.38 (-)	27.38 (-)	33.61 (-)	-0.010***	0.010

The four effective densities D_e in the populations z1, z9, pk24 and gp were estimated to be 255, 28, 70 and 124 individuals per hectare. Based on these effective densities, σ (half the mean square parent-offspring distance) was estimated to be very short, i.e. mostly lower than 100 meters. It should be noted, however, that the standard errors could not be computed for *A. decemarticulatus* due to the lack of convergence of the algorithm; Table 3).

Experimental assessment of the dispersion distance of *A. decemarticulatus* founding queens

The assignment algorithm implemented in COLONY v2.0.1.1 successfully assigned 26 founding queens to a resident ant colony. The probability of ants from sibling colonies to have the same multilocus genotype was 0.002; the number of ants from sibling colonies that are expected to have the same multipocus genotype was 0.363. The distance between successfully-assigned founding queens and their native colony ranged from 2 to 232 m with

an average value of 85 m (Fig. 2). This result demonstrates that more than half of the colonization events occurred locally. All of the plants but one were occupied by at least one founding queen from a resident colony. Successfully-assigned founding queens originated from 18 resident colonies. The number of full-sister founding queens ranged from one to five. We never found more than two full-sister foundress queens per experimental plant.

Discussion

Our results demonstrate a more important gene flow between *H. physophora* populations than between *A. decemarticulatus* populations. For the ants, most of the genetic clusters contained only one population, highlighting an important genetic structure at the regional scale. This differentiation between ant populations resulted in a strong isolation by distance. The population genetic structure was weaker in *H. physophora* and the genetic clusters were less numerous in *H. physophora* than in *A. decemarticulatus*. Although significant, the isolation by distance was less strong than in ants.

At the local scale, no selfing nor clonality occurred in both *H. physophora* and *A. decemarticulatus* as shown by the estimated selfing rates. F_{IS} values were, however, positive, especially in *H. physophora*, reflecting biparental inbreeding. Inbred populations can be the result of short dispersal distances and/or small effective population sizes. Estimated dispersal distances were indeed very short, allowing a dispersal within the population boundaries, but far longer than the minimum observed distance between two individuals. Under the local transmission hypothesis, it is thus more probable for related ants to interact with related plants. In this case, the plant offspring can be considered as a public good that is shared by related symbionts. Such result allows the local dispersion of both partners and is likely to increase the stability of the relationship between *H. physophora* and *A. decemarticulatus* by leading to a lower virulence in castration (see below).

Coevolutionary processes and local adaptation of mutualistic and parasitic interactions may arise from the same patterns (Anderson *et al.* 2004). Only few studies, however, focused on this question in non-antagonistic relationships. The asymmetry we highlighted between the gene flows in both ants and plants populations is likely to provide the plants with more local genetic diversity than the ants. This phenomenon is known to allow a faster adaptation of the most genetically diverse partner to the local behavior of the other (Wilkinson 1997; Wilkinson & Sherratt 2001; Kiers & van der Heijden 2006). In the *A. decemarticulatus* / *H. physophora* interaction, the ants exhibit a castration behavior that can be assimilated to a parasitic behavior (Malé *et al.* submitted-a). However, host plants are able to retaliate, thus potentially engaging the relationship in an arms race (Malé *et al.* submitted-b). Because of shorter life cycles, ants are supposed to evolve more rapidly than their host plant (Hamilton *et al.* 1990). They are thus expected to be locally adapted to their host and to keep being ahead in the host-parasite arms race (Dybdahl & Storfer 2003). However, this advantage can be counterbalanced when host populations are connected by a higher gene flow than parasite populations (Gandon *et al.* 1996; Gandon & Michalakis 2002). The lack of structure observed in *H. physophora*, compared to *A. decemarticulatus*, resulting from a higher genetic connectivity between populations, is very likely to result in more stability in the association. It should balance the asymmetry in evolutionary rates and thus prevent the ants to overexploit their host plants and thus to overcome host sanctions.

Acknowledgements

We are grateful to the *Laboratoire Environnement de Petit Saut* and the *Nouragues scientific station* for furnishing logistical help, to Gabriel Debout and Arnaud Estoup for their insightful comments and to Andrea Yockey-Dejean for editing the manuscript. Financial support for this study was provided by a research program of the French *Agence Nationale de*

la Recherche (research agreement n°ANR-06-JCJC-0109-01), by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT program, by a Nouragues grant funded by PIR Amazonie (CNRS), by the *Programme Convergence 2007-2013 Région Guyane* from the European Community and by the *Programme Amazonie II* of the French *Centre National de la Recherche Scientifique*.

CHAPITRE 3 :

***Multiplicité des partenaires et
variabilité des coûts et bénéfices***

L'environnement biotique dans lequel évoluent les espèces en interactions est susceptible d'influencer le résultat global de ces interactions. Dans le cas présent, c'est l'action néfaste des phytophages sur le feuillage d'*H. physophora* qui est à l'origine du bénéfice principal que la plante retire de la présence des fourmis *A. decemarticulatus*. A l'inverse, nous venons de voir que la présence des fourmis engendre également des coûts via de potentielles interactions avec les pollinisateurs. L'équilibre de la balance coûts-bénéfices qui permet le maintien de la relation entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus* est donc grandement influencé par les interactions qu'entretiennent les deux espèces avec d'autres entités biologiques présentes dans leur environnement.

Au cours de ce chapitre nous examinerons plus en détail l'influence que peuvent avoir les interactions avec d'autres partenaires sur la trajectoire évolutive de la relation entre *A. decemarticulatus* / *H. physophora*. Dans un premier temps, nous nous pencherons sur le cas du troisième partenaire obligatoire de l'association, le champignon Ascomycète qu'utilisent les fourmis pour consolider leur piège. Par la suite, nous examinerons les conséquences de la présence occasionnelle d'une espèce de fourmi compétitrice d'*A. decemarticulatus*.

1 Le rôle du troisième partenaire

La fourmi *A. decemarticulatus* utilise un champignon Ascomycète pour consolider les galeries dont elle édifie la structure à l'aide des trichomes de sa plante-hôte. Ces galeries constituent un piège permettant aux ouvrières à l'affût de capturer des arthropodes de taille conséquente et d'ainsi subvenir à une partie de leurs besoins en substances azotées (Dejean *et al.* 2005). La présence de ce champignon conditionne donc à la fois les apports nutritionnels nécessaires au maintien des colonies d'*A. decemarticulatus* et la protection de la plante-hôte contre les insectes phytophages via le comportement prédateur qui en découle. De sa présence pourrait aussi résulter un effet négatif sur la reproduction d'*H. physophora* du fait de captures potentielles de pollinisateurs, mais ce conflit semble être sous contrôle grâce à la production d'inflorescences à des endroits de la plante où le piège n'est pas encore construit. Ainsi son influence sur le maintien de la relation entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus*, tant à une échelle de temps écologique qu'évolutive, s'avère centrale.

Afin de déterminer le niveau de spécificité de l'association entre le champignon et *A. decemarticulatus*, nous avons étudié le comportement des fourmis vis-à-vis du champignon ainsi que la structuration génétique des populations des deux espèces (Article 8). Il est apparu que le rôle central du champignon dans le cycle de vie d'*A. decemarticulatus* se manifeste dès l'établissement d'une nouvelle colonie de fourmis sur une plante vide, puisqu'il est utilisé pour obstruer l'entrée de la domatie dans laquelle s'installe la reine fondatrice. Par ailleurs, les fourmis montrent un comportement de culture dirigé vers le champignon puisqu'elles lui fournissent un substrat à base de tissus végétaux prélevés dans les domaties d'*H. physophora* et empêchent la croissance des nombreux spores d'autres espèces fongiques, voire des parasites. Ces résultats démontrent l'interdépendance du champignon et des fourmis *A. decemarticulatus* qui partagent probablement une histoire coévolutive commune du fait des pratiques agricoles de la fourmi (Beja-Pereira *et al.* 2003). Les analyses de biologie moléculaire confirment cette hypothèse puisque la même espèce de champignon, appartenant à l'ordre des Chaetothyriales, est retrouvée en association avec *A. decemarticulatus* sur *H. physophora* et avec *A. octoarticulatus* sur *C. nodosa*. Il est intéressant de noter que les

champignons de l'ordre des Chaetothyriales ont été observés en association avec d'autres espèces de fourmis, phylogénétiquement éloignées des *Allomerus*, et remplissant le même rôle de consolidation de structures construites par les fourmis (Mayer & Voglmayr 2009). Il est donc possible que ce groupe présente des préadaptations favorisant son utilisation par les fourmis.

Différentes souches de cette espèce de champignon ont pu être discriminées, mais jamais plus d'une par colonie de fourmi. Toutefois, dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que, bien qu'une colonie de fourmis utilise une seule souche de champignon pour construire le piège, la transmission de l'association fourmis-champignon soit verticale. L'établissement du mode de transmission de cette relation nécessiterait la capture de reines fondatrices venant juste de prendre leur envol afin de comparer l'hypothétique souche de champignon qu'elles transportent avec celle de la colonie dont elles sont issues.

Par ailleurs, 75% des colonies de fourmis échantillonnées possédaient la même souche de champignon quelle que soit leur origine géographique ou leur espèce, tandis que les autres souches n'étaient associées qu'avec une ou deux colonies différentes. Ce résultat montre qu'il existe au moins deux stratégies différentes au sein de cette espèce de champignon : une stratégie généraliste associée à un grand nombre de partenaires possibles, et une stratégie spécialiste associée à un seul partenaire. Cette différence de stratégie devrait influencer l'adaptation des partenaires l'un à l'autre et donc l'efficacité de la culture du champignon par les ouvrières d'*A. decemarticulatus*.

Dans une étude récente, Leroy *et al.* (in press) ont démontré que le champignon joue le rôle de médiateur trophique dans la relation entre *A. decemarticulatus* et *H. physophora* assurant un transfert de matière depuis les proies des fourmis vers la plante-hôte via des contacts intracellulaires entre cette dernière et les hyphes mycéliens. Il s'agit donc d'un exemple de myrmécotrophie indirecte : la présence des fourmis bénéficie indirectement à la plante en lui fournissant un complément de ressources azotées provenant des restes des proies capturées à l'aide du piège. Or, nous venons de voir que l'efficacité de l'utilisation du champignon par *A. decemarticulatus* peut vraisemblablement varier en fonction de la souche de champignon à laquelle les fourmis ont à faire. Il en résulte donc que l'ampleur du bénéfice nutritionnel pour *H. physophora* devrait aussi varier en fonction de l'intensité de la spécialisation du champignon vis-à-vis de ses partenaires.

2 La compétition entre espèces de fourmis

La relation entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus* est très spécialisée du fait de l'existence de filtres sélectifs restreignant l'accès à l'hôte (Grangier *et al.* 2009). Ces filtres sont d'ordre chimique, physique et comportemental. En effet, les reines d'*A. decemarticulatus* sont capables de discriminer à distance un plant d'*H. physophora* d'une autre espèce de plante myrmécophyte ou non, des trichomes de la plante bouchent l'entrée des domaties et l'établissement d'une nouvelle reine de fourmi sur un plant d'*H. physophora* nécessite une séquence comportementale bien précise qui débute par le fait d'enlever ces trichomes. Ces filtres ont pour résultat une grande spécificité d'association entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus*.

Cependant, nous avons découvert deux populations d'*H. physophora* habités par deux espèces de fourmis sympatriques : *Allomerus octoarticulatus* et *A. decemarticulatus*. Comme cela est habituel chez *H. physophora*, un individu n'héberge qu'une seule colonie et donc une seule espèce de fourmi à la fois. Dans sa revue taxonomique du genre *Allomerus*, Fernandez (2007) précise que le taxon *A. octoarticulatus* cache potentiellement un complexe d'espèce. Cette fourmi est elle aussi arboricole et montre elle aussi un comportement castrateur de ses hôtes *C. nodosa* et *H. myrmecophila* (Yu & Pierce 1998; Izzo & Vasconcelos 2002). Cette observation pose la question de la coexistence de ces deux espèces en compétition pour l'accès à l'hôte. Par ailleurs, quelles peuvent être les conséquences de la compétition entre espèces de fourmis sur le maintien de la relation mutualiste entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus* ?

2.1 Quels sont les coûts et bénéfices associés à l'une ou l'autre espèce de fourmis ?

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à la quantification des coûts et bénéfices induits par chacune des espèces de fourmis (Article 9). Afin de déterminer si les deux espèces étaient autant susceptibles l'une que l'autre de montrer un comportement castrateur à l'encontre de leur plante-hôte, nous avons recherché une relation linéaire entre le

nombre d'ouvrières abritées par une trentaine d'*H. physophora* pour chacune des deux espèces de fourmis et le nombre de domaties de ces plantes. Ainsi, nous avons pu établir que la croissance des colonies des deux espèces de fourmis est limitée par la taille de la plante. Les deux espèces ont donc intérêt à empêcher leur plante-hôte de se reproduire afin qu'elle réinvestisse son énergie dans sa croissance. Effectivement, quelle que soit l'identité des fourmis qui les habitent, les plants d'*H. physophora* observés ne diffèrent pas en terme de nombre de boutons, de fleurs ou de fruits produits ; les deux espèces de fourmis montrent un comportement de castration de virulence équivalente.

Nous avons ensuite recherché une éventuelle différence entre les taux de croissance végétative des plantes hébergeant *A. decemarticulatus* et ceux des plantes hébergeant *A. octoarticulatus*. Au cours des huit mois qu'a duré la période d'observation, les plantes habitées par *A. octoarticulatus* ont produit plus de feuilles que les plantes habitées par *A. decemarticulatus*. Cette différence provient vraisemblablement du fait que le feuillage des premières plantes a subi moins de dégâts liés à la phytophagie que le feuillage des secondes.

Afin d'expliquer cette différence dans la phytophagie, nous nous sommes intéressés de plus près aux stratégies de chasse des deux espèces de fourmis. Il est apparu que les fourmis *A. octoarticulatus* investissent moins qu'*A. decemarticulatus* dans la construction du piège. En revanche, leurs patrouilles à la surface des feuilles sont plus intenses et la découverte d'intrus s'en trouve accélérée. Les fourmis *A. octoarticulatus* semblent donc être de meilleurs associés mutualistes pour la plante *H. physophora* que les fourmis *A. decemarticulatus* puisqu'elles lui confèrent une meilleure protection, engendrant ainsi une croissance végétative plus importante.

Or, le surcroît d'énergie produite par un appareil végétatif plus développé ne se traduit pas en termes de reproduction. L'une des hypothèses pour expliquer ce fait met en jeu le rôle de médiateur trophique du champignon du piège. En effet, le piège construit par *A. decemarticulatus* couvre près de trois fois plus de longueur de tiges que le piège construit par *A. octoarticulatus*. Il existe donc plus de surface sur laquelle peuvent être abandonnés des débris de proies et plus de contacts entre le champignon et la plante. Au final, les bénéfices que retire la plante de la présence de l'une ou l'autre espèce de fourmis en termes de reproduction semblent équivalents : *A. decemarticulatus* apporterait un grand bénéfice trophique indirect et une protection relativement efficace tandis qu'*A. octoarticulatus* apporterait un moindre bénéfice trophique mais une meilleure protection ce qui correspondrait à des bénéfices nets similaires pour *H. physophora* et donc à des taux de reproduction comparables.



Figure 9 : Une ouvrière d'*A. octoarticulatus* transportant un termite capturé sur une feuille d'*H. physophora*.

2.2 Comment expliquer la coexistence des deux espèces de fourmis en sympatrie ?

L'une des pistes pouvant expliquer la coexistence des deux espèces de fourmis, en sympatrie, et en compétition pour la même espèce de plante-hôte, est le compromis entre spécialiste et généraliste. Il n'est pas possible d'être parfaitement adapté à tous ses partenaires en même temps. En effet, la spécialisation à un milieu est contrebalancée par une diminution des performances dans un autre, d'où l'utilisation de l'expression « touche-à-tout mais bon à rien » (traduction de « jack-of-all-trades but master of none » ; Gilchrist 1996; Poulin 1998). De ce constat résulte un compromis entre deux stratégies possibles : la spécialisation avec des performances très élevées sur son hôte de prédilection et des performances médiocres sur tous les autres, et la stratégie généraliste avec des performances moyennes quelle que soit l'identité de l'hôte. Un tel compromis peut permettre à deux espèces sympatriques de coexister sur un même hôte : l'une étant spécialiste montre de bonnes performances sur cet hôte et l'autre étant

généraliste montre des performances moindres sur cet hôte mais possède des populations réservoirs sous la forme d'associations avec d'autres hôtes. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la coexistence entre *A. decemarticulatus* et *A. octoarticulatus* est autorisée par le compromis spécialiste-généraliste. Pour cela, nous avons construit une phylogénie partielle du genre *Allomerus* afin de savoir si les fourmis *A. octoarticulatus* présentes sur *H. physophora* était ou non génétiquement différenciées des fourmis *A. octoarticulatus* présentes sur d'autres espèces de plantes myrmécophytes. L'échantillonnage comprenait quatre espèces du genre *Allomerus* : *A. decemarticulatus*, *A. octoarticulatus*, *A. septemarticulatus* et *A. dentatus*. Les échantillons d'*A. decemarticulatus* provenaient tous de Guyane française où l'espèce n'est associée qu'avec *H. physophora*. Les échantillons d'*A. octoarticulatus*, en revanche provenaient également de Guyane française mais aussi du Brésil et du Pérou. Ainsi, les ouvrières génotypées ont-elles été échantillonnées sur une grande variété de plantes-hôtes : *H. physophora* et *C. nodosa* en Guyane française, *C. nodosa* au Pérou et *H. myrmecophila* et *Tococa guianensis* (Melastomataceae) au Brésil. Nous avons séquencé les gènes de la première sous-unité de la *cytochrome oxydase* (COI) et du *cytochrome b* (*cyt b*), soit un total de 1060 paires de bases suivant le protocole décrit par Ruiz-González *et al.* (2010). La reconstruction phylogénétique a été effectuée à l'aide du logiciel MrBayes v3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Huelsenbeck *et al.* 2001). Les pourcentages de différences entre clades et au sein de chaque clade ont été calculés à l'aide du logiciel MEGA v4 (Tamura *et al.* 2007).

Il apparaît que l'espèce *A. octoarticulatus* est composée de deux clades principaux : (1) l'un associé à la plante-hôte *C. nodosa*, (2) l'autre associé à diverses plantes à domaties foliaires, dont *H. physophora* (Fig. 9). Ces deux clades semblent bien différenciés génétiquement puisque le pourcentage de différence au sein des clades est très inférieur au pourcentage de différence entre clades (Tableau 1). La différence entre la diversité au sein des clades d'*A. octoarticulatus* et la diversité au sein du clade d'*A. decemarticulatus* résulte certainement de l'hétérogénéité géographique de l'échantillonnage : les échantillons d'*A. octoarticulatus* proviennent de pays répartis aux extrémités du bassin amazonien tandis que les échantillons d'*A. decemarticulatus* ne proviennent que de Guyane française.

L'espèce *A. octoarticulatus* est donc vraisemblablement composée de deux sous-espèces (potentiellement deux espèces différentes). La sous-espèce d'*A. octoarticulatus* 2 qui habite *H. physophora* est donc une espèce généraliste tandis qu'*A. decemarticulatus* est une espèce spécialisée sur *H. physophora*. Il est donc plausible que le compromis généraliste-spécialiste aide au maintien de la diversité des fourmis associées à *H. physophora* dans certaines régions.

Or, la sous-espèce *A. octoarticulatus 2* associée à *H. physophora* n'a pas encore été observée dans ces régions en association avec une autre plante-hôte susceptible de constituer un réservoir. Des prospections plus poussées sont donc potentiellement nécessaires dans les deux régions abritant des *H. physophora* associés à *A. octoarticulatus 2* pour confirmer ou infirmer cette dernière hypothèse.

Tableau 1 : Proportions de nucléotides différents entre espèces de fourmis du genre *Allomerus* calculé sur la base de séquences du *cytochrome b* et de la première sous-unité de la *cytochrome oxydase* (1060 paires de bases au total) à l'aide du logiciel MEGA v4 (Tamura *et al.* 2007). Les valeurs indiquées dans les diagonales représentant les proportions de nucléotides différents au sein des espèces observées. La dénomination « *A. octoarticulatus 1* » correspond à la sous-espèce d'*A. octoarticulatus* associée à la plante myrmécophyte *C. nodosa* et la dénomination « *A. octoarticulatus 2* » correspond à la sous-espèce d'*A. octoarticulatus* associée à différents myrmécophytes à domaties foliaires.

	Espèces de fourmis		
	<i>A. decemarticulatus</i>	<i>A. octoarticulatus 1</i>	<i>A. octoarticulatus 2</i>
<i>A. decemarticulatus</i>	0.012		
<i>A. octoarticulatus 1</i>	0.164	0.027	
<i>A. octoarticulatus 2</i>	0.176	0.075	0.028

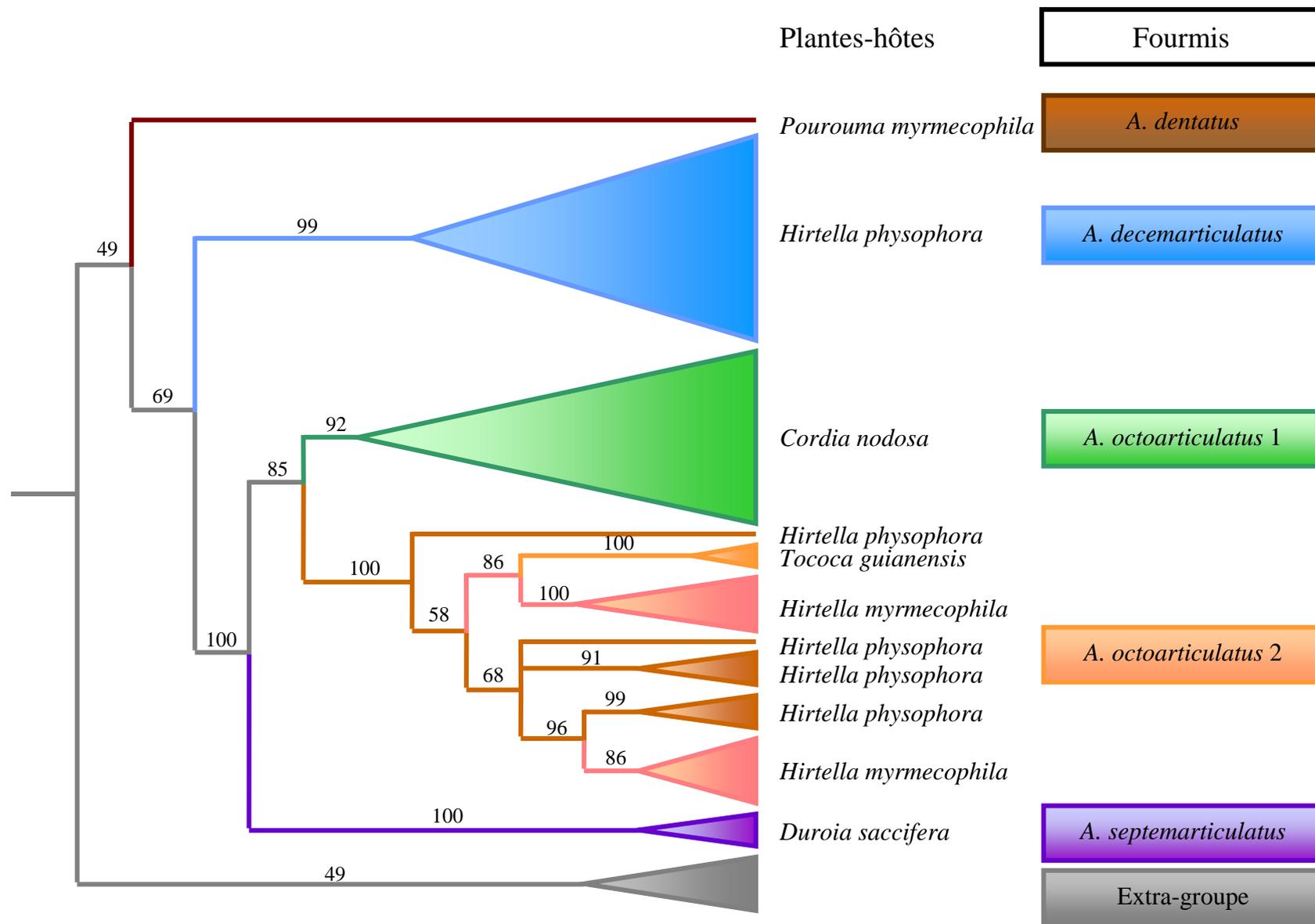


Figure 9 : La phylogénie d'une partie du genre *Allomerus* construite sur la base de séquences du *cytochrome b* et de la première sous-unité de la *cytochrome oxydase* (1060 paires de bases au total) à l'aide de méthodes Bayésiennes de reconstruction phylogénétiques. Les valeurs de support associées aux nœuds correspondent aux *posterior probabilities* fournies par Mr Bayes v3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Huelsenbeck *et al.* 2001). Les couleurs des clades correspondent aux espèces de fourmis représentées dans les cadres (l'extra-groupe est composé de quatre espèces de fourmis non arboricoles : *Monomorium subopacum*, *Diploroptrum* sp., *Solenopsis saevissima* and *Wasmannia auropunctata*). Les différentes nuances d'orange correspondent aux plantes-hôtes auxquelles sont associées les *A. octoarticulatus*. *Pourouma myrmecophila* appartient à la famille des Urticaceae, les plantes du genre *Hirtella* à celle des Chrysobalanaceae, *C. nodosa* à celle des Boraginaceae, *Tococa guianensis* à celle des Melastomataceae et *Duroia saccifera* à celle des Rubiaceae.

3 Conclusion

Le champignon Ascomycète cultivé par les fourmis pour consolider leur piège est un partenaire à part entière du système. Il apporte des bénéfices à la fois à *A. decemarticulatus* en lui offrant l'accès à une source de nourriture complémentaire et à *H. physophora* en lui permettant de profiter de cette source de nutriments. Lui-même semble bénéficier de l'action des fourmis puisque sans elles il dépérit au profit de dizaines d'autres espèces de champignons compétitrices dont la croissance est régulée par *A. decemarticulatus*. Cette relation entre *A. decemarticulatus* et son champignon associé est comparable à celle qu'entretiennent les fourmis coupeuses de feuilles et leur propre champignon en ce sens qu'elle s'apparente à de l'agriculture. Mueller *et al.* (2005) donnent une définition de la notion complexe d'agriculture adaptée aux insectes. Cette définition repose sur quatre points essentiels : (1) le fait de planter/semer/inoculer un organisme sessile dans un habitat particulier, (2) la culture active de cet organisme visant à favoriser sa croissance, (3) la récolte du produit de la culture dans un but alimentaire et (4) le caractère obligatoire de cette pratique agricole pour la survie de l'organisme qui y a recours. Nous l'avons vu, les points 1, 2 et 4 s'appliquent directement à l'association entre *A. decemarticulatus* et son champignon. Cependant, les fourmis *A. decemarticulatus* ne semblent pas consommer le champignon de leur piège, réfutant ainsi l'application du point 3 à ce système. Or, elles retirent un bénéfice alimentaire indirect de la culture de ce champignon du fait de la capture de proies. Il est ainsi tout à fait envisageable de considérer que ce système représente un cas nouveau d'agriculture au sein des invertébrés, qui peut être qualifiée de structurale puisque son fondement repose sur la consolidation des galeries des fourmis. Jusqu'à présent, seul l'homme est connu pour pratiquer ce type d'agriculture avec, par exemple, la culture du coton (Dillehay *et al.* 2007). Il s'agit donc d'une deuxième apparition de l'agriculture au sein des Formicidae, phylogénétiquement indépendante de celle observée au sein du groupe monophylétique des fourmis coupeuses de feuilles (voir Schultz & Brady 2008). Ainsi la relation peut et doit être envisagée sous la forme d'un mutualisme tripartite entre *A. decemarticulatus*, *H. physophora* et leur partenaire fongique.

Sa présence dans l'association a pour conséquence d'augmenter de manière indirecte le bénéfice que reçoit *H. physophora* de son interaction avec *A. decemarticulatus*. La nutrition indirecte d'*H. physophora* est désormais à porter au crédit des fourmis. Puisque le caractère mutualiste ou parasite d'un organisme se mesure à la balance entre les coûts et les bénéfices qu'il induit chez son partenaire, nous pouvons considérer que ce bénéfice supplémentaire pour *H. physophora* éloigne les fourmis de la dérive parasitaire. Le champignon participe donc au maintien d'une relation mutualiste entre les fourmis et leur plante-hôte.

Ce rôle de consolidation de l'association est à pondérer en fonction de différents facteurs. En premier lieu, le champignon montre différents degrés de spécificité dans son association avec les fourmis. On peut donc s'attendre à ce que la culture du champignon soit plus ou moins efficace en fonction de cette spécificité, impactant finalement l'ampleur des transferts de matières en faveur d'*H. physophora*. Il existerait donc des colonies d'*A. decemarticulatus* associées à leur souche spécifique conférant ainsi un bénéfice nutritionnel maximal à leur plante-hôte, et des colonies d'*A. decemarticulatus* associées à une souche généraliste et donc moins efficaces en termes de myrmécotrophie. Ce phénomène crée de la diversité entre les colonies d'*A. decemarticulatus* dans leurs capacités mutualistes.

En second lieu, l'utilisation du champignon peut permettre à *A. decemarticulatus* d'être une associée mutualiste compétitive en comparaison à *A. octoarticulatus* qui protège sa plante de manière plus efficace. Les deux espèces de fourmis faisant un usage différent du champignon confèrent un bénéfice nutritionnel différent à leur plante-hôte. Ainsi, *A. decemarticulatus* entretient-elle un piège plus développé et donc une quantité plus importante de champignon que sa compétitrice *A. octoarticulatus*. En résumé, la fourmi *A. octoarticulatus* protège bien sa plante-hôte mais la nourrit peu, tandis que *A. decemarticulatus* la protège moins bien mais lui apporte plus de nutriments. La présence du champignon en tant qu'interface entre la plante et la fourmi autorise donc deux espèces de fourmis à coexister en sympatrie, bien qu'en compétition pour la même ressource « plante-hôte », en nivelant leurs performances de mutualistes.

Même s'il semble alors que les effets de la présence d'*A. octoarticulatus* et d'*A. decemarticulatus* soient équivalents de manière ponctuelle, il faut les envisager sur une durée de temps de même ordre que la durée de vie d'*H. physophora*. Ainsi, le bénéfice conféré par *A. octoarticulatus* s'exprimant en termes de taille d'appareil végétatif sera-t-il durable tandis que celui conféré par *A. decemarticulatus* a un impact plutôt instantané. Il devient alors possible d'imaginer des successions d'évènements de colonisation qui seraient optimaux pour la valeur sélective d'une plante (pour un exemple similaire, voir Palmer *et al.*

2010). Dans un premier temps, des colonies d'*A. octoarticulatus* permettraient à une jeune plante de produire rapidement un appareil végétatif d'une taille importante. Dans un second temps, des colonies d'*A. decemarticulatus* permettraient à la plante de disposer de plus d'énergie utilisable instantanément pour produire ponctuellement plus d'inflorescences. Ce cycle serait susceptible de se répéter à chaque fois qu'une branche tombant de la canopée vient briser la plante et que celle-ci produit un rejet.

L'ensemble de ces résultats met en lumière deux conclusions capitales pour notre compréhension du fonctionnement de l'association entre *A. decemarticulatus* et *H. physophora*. Premièrement, les deux espèces impliquées ne sont pas isolées et leur environnement biotique immédiat influence de manière cruciale le résultat de l'association. Deuxièmement, les résultats de ces interactions multiples peuvent varier dans le temps et l'espace du fait, entre autres, de la présence ou non d'autres espèces.

4 Articles

4.1 Article 8 : Specific, non-nutritional association between an ascomycete fungus and *Allomerus* plant-ants.

Biology Letters (2010) sous presse

Mario-Xavier Ruiz-González^{1,2}, Pierre-Jean G. Malé^{1,2}, Céline Leroy³, Alain Dejean³, Hervé Gryta^{1,2}, Patricia Jargeat^{1,2}, Angélique Quilichini³ & Jérôme Orivel^{1,2,3}

¹Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

²CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

³CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France

Specific, non-nutritional association between an ascomycete fungus and *Allomerus* plant-ants

Mario X. Ruiz-González^{1,2,†}, Pierre-Jean G. Malé^{1,2}, Céline Leroy³, Alain Dejean³, Hervé Gryta^{1,2}, Patricia Jargeat^{1,2}, Angélique Quilichini³ and Jérôme Orivel^{3,*}

¹UPS; Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

²CNRS; Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, 31062 Toulouse, France

³CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane (UMR-CNRS 8172), Campus Agronomique, 97379 Kourou cedex, France

*Author for correspondence (jerome.orivel@ecofog.gf).

[†]Present address: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, C.S.I.C.—U.P.V. C/ Ingeniero Fausto Elio s/n. 46022 Valencia, Spain.

Ant–fungus associations are well known from attine ants, whose nutrition is based on a symbiosis with basidiomycete fungi. Otherwise, only a few non-nutritional ant–fungus associations have been recorded to date. Here we focus on one of these associations involving *Allomerus* plant-ants that build galleried structures on their myrmecophytic hosts in order to ambush prey. We show that this association is not opportunistic because the ants select from a monophyletic group of closely related fungal haplotypes of an ascomycete species from the order Chaetothyriales that consistently grows on and has been isolated from the galleries. Both the ants' behaviour and an analysis of the genetic population structure of the ants and the fungus argue for host specificity in this interaction. The ants' behaviour reveals a major investment in manipulating, growing and cleaning the fungus. A molecular analysis of the fungus demonstrates the widespread occurrence of one haplotype and many other haplotypes with a lower occurrence, as well as significant variation in the presence of these fungal haplotypes between areas and ant species. Altogether, these results suggest that such an interaction might represent an as-yet undescribed type of specific association between ants and fungus in which the ants cultivate fungal mycelia to strengthen their hunting galleries.

Keywords: ant–fungus association; *Cordia nodosa*; Chaetothyriales; *Hirtella physophora*; myrmecophyte; population structure

1. INTRODUCTION

Insect fungiculture has evolved independently in four orders of insects; i.e. ants, termites, ambrosia beetles and gall midges [1–3]. In ants, species of the Attini tribe are engaged in a highly coevolved nutritional

Electronic supplementary material is available at <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2010.0920> or via <http://rsbl.royalsocietypublishing.org>.

Received 1 October 2010
Accepted 28 October 2010

symbiosis with basidiomycetes in which both partners are codependent, and that shows their reciprocal specializations and codispersal [4–6]. Besides such cultivation of fungal crops, few non-food associations between ants and fungi have been reported to date in which fungi occur in ant constructions or inside the domatia of ant-plants [7–12]. These occurrences of fungi in the constructions or inside the domatia are not the result of the growth of opportunistic species, but of specific interactions [9,12]. These studies also suggest that the active maintenance and management of fungi by ants for non-nutritional purposes may be more widespread than currently assumed [13].

Here we address this issue in Neotropical plant-ants of the genus *Allomerus*, associated with the myrmecophytes *Hirtella physophora* Martius & Zuccharini and *Cordia nodosa* Lamarck. To ambush prey, these ants build galleries under the stems of their host plants using trichomes that they assemble into a frame on which then grows a fungal mycelium that reinforces the structure [8]. It has not yet been demonstrated, however, whether the ants cultivate the fungi or if the fungi are opportunistic species. We studied unknown aspects of the biology of this ant–fungus association, and both characterized and analysed the genetic population structure of the fungi from the galleries and of their associated ants (*Allomerus decemarticulatus* Mayr and *Allomerus octoarticulatus* Mayr), sampled from geographically distant areas within French Guiana.

2. MATERIAL AND METHODS

(a) Sampling ants and traps

Workers from 197 *A. decemarticulatus* and 43 *A. octoarticulatus* colonies were sampled along with parts of their corresponding galleries from four areas in French Guiana between 2008 and 2009: Petit Saut, Sinnamary (05804°27'N, 53803°21'W; n = 133/19 *A. decemarticulatus*/*A. octoarticulatus* colonies, respectively), Montagne des Singes (05804°20'N, 52841°43'W; n = 26/6), Montagne de Kaw (04832°34'N, 52809°14'W; n = 29/18) and Nouragues (04805°16'N, 52840°49'W; n = 9/0). In addition, 18 domatia recently occupied by founding queens were dissected. Such domatia were recognizable from the outside because the queen's wings remained at the entrance and because the queen had built a stockade to close the entrance.

Fungal samples were precultured in wet cotton and 15–30 single hyphae from the new mycelium were then cultured in solid yeast and malt extract with glucose medium for 6–20 days (see details in the electronic supplementary material).

(b) Molecular and phylogenetic analysis of the fungi and the ants

The total DNA from all of the fungal and ant samples was extracted using a 10 per cent Chelex (BioRad) solution. A phylogenetic analysis was conducted on the entire internal transcribed spacer (ITS) region and the EF1a segment of the fungi, as well as the cytochrome c-oxidase (COI) and a segment of the cytochrome b gene of the ants. In total, 114 fungal samples out of the 240 collected were successfully sequenced for both the ITS and EF1a segment (fungal isolation success of about 50%), and 91 ant colonies (69 *A. decemarticulatus* and 22 *A. octoarticulatus*) were successfully sequenced for both the COI and cytochrome b. *Capronia pilosella* and *Exophiala pisciphila* were used as the fungal outgroup, and *Monomorium subopacum*, *Diplorhoptrum* sp., *Solenopsis saevissima* and *Wasmannia auropunctata* were used as the ant outgroup. Phylogenetic inferences were made using different criteria: maximum parsimony (MP), neighbour-joining (NJ), maximum-likelihood (ML) and Bayes. The genetic structure of the fungal variants detected in the cladograms was analysed using ARLEQUIN v. 3.1 [14] and the AMOVA values for the F_{ST} were calculated after 10 000 permutations (see the electronic supplementary material).

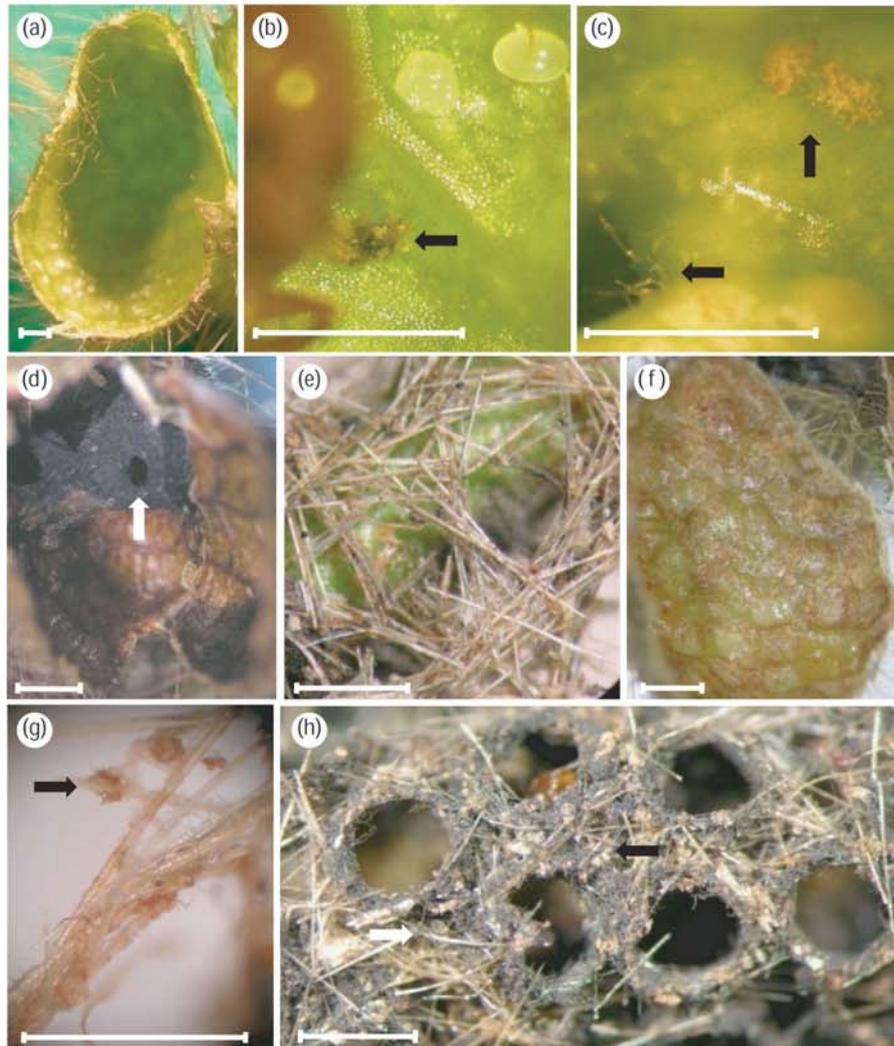


Figure 1. Culture of the fungus and construction of the galleries. (a) Trichomes inside and outside a recently colonized domatium; (b) pellet made from plant material from the domatium close to the first eggs laid in the newly colonized domatium (arrow); (c) the founding queen scarifies the domatia wall (vertical arrow) where the first hyphae will grow in the suberous crust (horizontal arrow); (d) the growing fungus seals the entrance of the domatium until the first workers make an exit hole (arrow); (e) scaffold of trichomes; (f) highly scarified domatium; (g) the workers paste pellets made from the suberous crust of the domatia (arrows) on the frame of trichomes; and (h) the fungus grows from each of the pellets strengthening the galleries that the ants use as a trap (white arrow, trichomes; black arrow, pellets). Scale bar, 1 mm.

3. RESULTS

Eleven out of the 18 founding queens recorded in the dissected domatia had only been installed for a very short time, as they had laid few or no eggs. In all of these 11 cases, a black pellet was clearly visible in the domatium wall or already pasted to the trichomes that the queen had cut and piled at the entrance to the domatium to close it (figure 1a). The pellet is made from plant material and the first hyphae grow in the suberous crust. It remains, however, unknown whether the queen brings the pellet and the fungus from its mother colony or if it is already present in the new host plant (figure 1b–d). The seven remaining queens had already bred some larvae and pupae and the hyphae had entirely covered the domatia entrances. The first workers produced must excavate a tunnel through this barrier to leave the domatia (figure 1d). They then cut the trichomes along the stem, creating a path to new domatia and use the cut trichomes to build the frame of a vault above the path (figure 1e).

The workers scarify the epidermis and mesophyll of the inner walls of the domatia to prepare pellets of vegetal dough. These pellets are carried out of the domatia and pasted along the trichomes that form the future gallery (figure 1f–h).

Forty-four fungal species present as spores were isolated directly from the galleries (table 1), but none of them grow on these galleries unless the ants have been removed. Moreover, an examination of the infra-buccal pellets of the workers demonstrated the active removal of fungal spores and contaminant hyphae (M. X. Ruiz-Gonzalez 2009, unpublished results). By contrast, the mycelium of only one fungal species, a sooty mould, was repeatedly noted in both the galleries covering the plant stems and the domatia occupied by the founding queens. This melanized fungus, with elongated hyphae of 4.5–9 mm in diameter, consistently grew from the multi-replicated cultures (108 and 31 different colonies of *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus*, respectively). Also, separate cultures

Table 1. Fungi present in the galleries as spores and their closest TAXID from GenBank.

phylum	class	order	species	closest TAXID from GenBank
Ascomycota	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	5 spp, 4 genera	AJ938005, FJ799942, EU687005, FJ904913, FJ904840
		Capnodiales	5 spp, 5 genera	AF502837, EU019265, EU167591, AJ582964, EU707900
		Pleosporales	5 spp, at least 3 genera	DQ914713, EU686970, EU489931, GQ179976, FJ904919
		Chaetothyriales	4 spp, at least 3 genera	FJ475797, FJ475797, EU520597, AJ244263
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Penicillium sp.	AF510496
	Sordariomycetes	Hypocreales	11 spp., 7 genera	EU552110, FJ037741, AM410612, FJ612897, FJ612897, FJ605099, AJ301990, FJ487919, FJ808013, AY746002, AB067714
			Microascales Xylariales	Scopulariopsis sp. 6 spp, at least 1 genus
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	1 Coprinellus sp.	AY461838
		Auriculariales	1 Exidiosis sp.	AF395309
	Tremellomycetes	Tremellales	2 spp., 2 genera	AF314985, FJ882009
	Ustilaginomycetes		1 Pseudozyma sp.	DQ008954
Incertae sedis		Mucorales	1 Rhizomucor sp.	EF583637

sampled from the same colonies were genetically identical, highlighting the monoculture of one fungal strain per colony.

BLAST search and the phylogenetic analyses of the ITS region in 124 samples revealed that a clade with seven monophyletic taxa was the closest (85–91% identity) to our sequences. Three out of the seven taxa are uncultured, environmental samples (GenBank accession nos: FJ820738, AJ582964, AY969659); three others are fungi found on the carton galleries of *Azteca brevis* (FJ538958, FJ538959, FJ538960) and the seventh is an ascomycete species described as *Trimmatostroma cordae* Sharma & Singh (GenBank accession nos: AJ244263). All of the sequences are grouped within the order Chaetothyriales.

An analysis of the concatenated fungal ITS and EF1a regions revealed the presence of 16 haplotypes belonging to a monophyletic clade (figure 2). More than 75 per cent of the samples had the same haplotype. Haplotypes 1–5 and 7 were exclusive to *A. decemarticulatus* and haplotypes 6, 8–12 and 14 were exclusive to *A. octoarticulatus*. Finally, haplotypes 13, 15 and 16 were present in the constructions of both ant species. The haplotype composition varied significantly between the different areas ($F_{ST} = 0.131$, p -value = 0.0004) and between host ant species ($F_{ST} = 0.108$, p -value = 0.0016).

An analysis of the concatenated ant COI and cytochrome b regions revealed the presence of 57 haplotypes. Two main clades corresponding to *A. octoarticulatus* and *A. decemarticulatus*, respectively, were strongly supported in all cases (figure 2). *Allomerus octoarticulatus* (20 haplotypes) comprises two subpopulations: one from the east of French Guiana (Montagne de Kaw), and the other from the west (Petit Saut and Montagne des Singes). For *A. decemarticulatus* (37 haplotypes), five clades were statistically supported; two of them were noted both at Nouragues and the Montagne de Kaw, the three others at Petit Saut and the Montagne des Singes.

4. DISCUSSION

Although the spores of many fungal species were present in the galleries, the *Allomerus* workers' behaviour favours the growth of only one species, corresponding to a monophyletic group of closely related haplotypes from the order Chaetothyriales. The occurrence of a single fungal species associated with the *Allomerus* galleries and of a single haplotype per colony argue for a specific association between *Allomerus* ants and this fungus, and thus towards host specificity. Furthermore, the ants provide the fungus with a substrate, control for potential invasions by alien fungi and the association with the ants is obligate for the survival of the fungus [8].

Such host-specificity is common in nutritional associations between ants and fungi in which fungal cultivars are mainly transmitted vertically across generations [5,6]. On the contrary, in fungus-growing termites, the fungus can reproduce and the interaction is transmitted horizontally resulting in a low specificity [15]. Note that nutritional associations involve basidiomycetes, while the non-nutritional ant–fungi interactions identified so far, including the present study, are associated with ascomycetes. Moreover, a striking parallel can be drawn between the *Allomerus* species studied here and *Az. brevis* [11]. Both build galleries pierced with holes and three of the fungi associated with *Az. brevis* are also relatives of *T. cordae*, suggesting the possible specialization of this group of fungi with arboreal ants.

In contrast to the specificity in the *Allomerus*-fungus association, the fungal community associated with the building material from *Az. brevis* galleries is composed of at least six distantly related species, while that associated with four European *Lasius* species is composed of five fungal species (three related species occur invariably; the two others, distantly related, only occasionally) [11,12]. These examples might represent different degrees of coevolutionary interdependence between ants and the fungi they use as

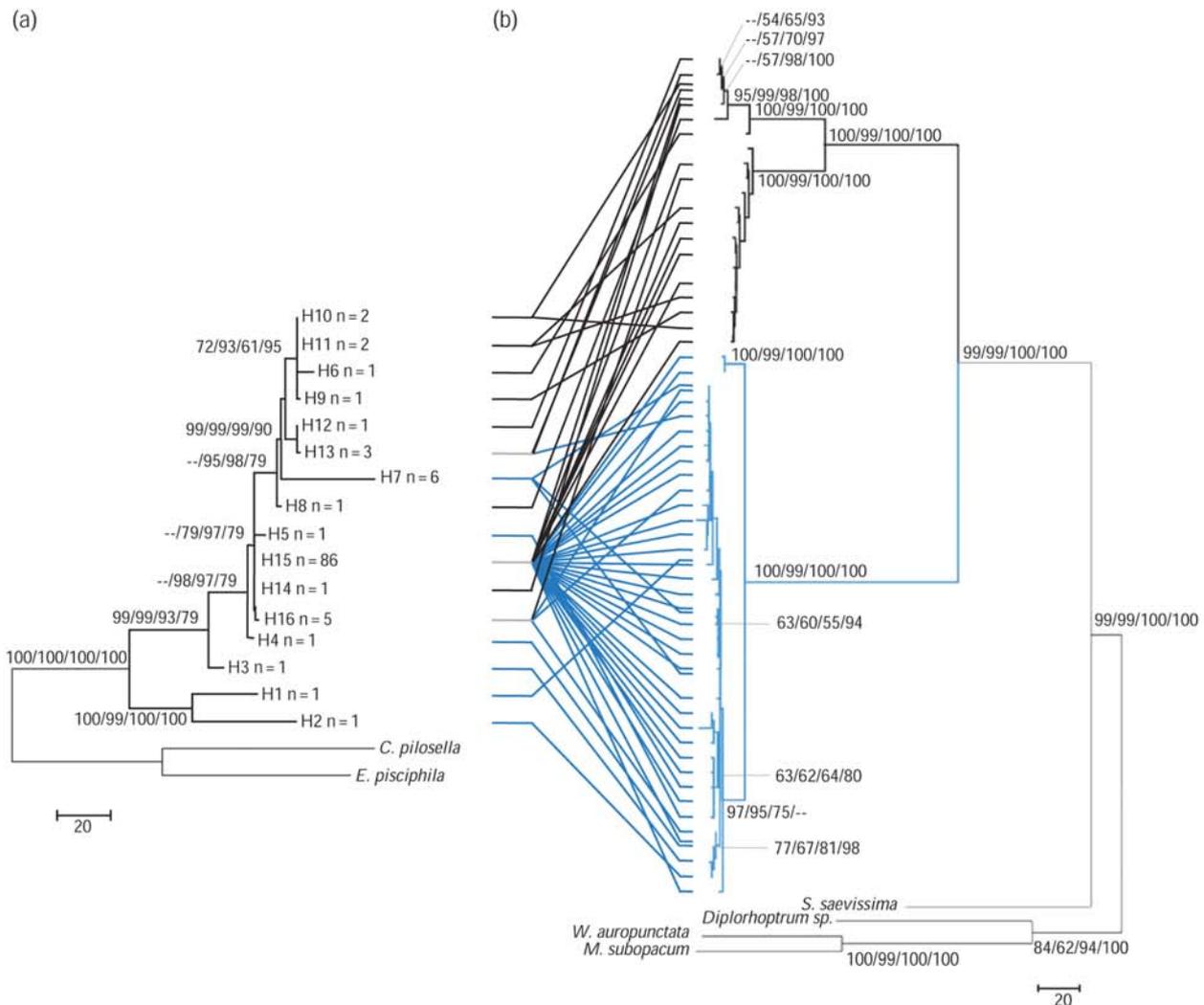


Figure 2. Phylograms of the ITS–EF1a fungal and COI–cytochrome b ant haplotypes. Bootstrap values above 50% for each branch are shown as NJ/MP/ML/BY. (a) The 16 haplotypes of fungal cultivars isolated from *Allomerus decemarticulatus* (grey) or *A. octoarticulatus* (black) colonies. (b) The 57 ant haplotypes.

building material. According to the geographical mosaic theory of coevolution [16], the higher the strictness of the interaction, the lower the number of species involved. The presence of one widespread haplotype and many haplotypes with a lower occurrence suggests the emergence of generalist and specialist strains that might be the product of the evolutionary dynamics of the fungus with each *Allomerus* species.

We are grateful to D. Reynolds for his help with the determination of the fungus; to R. Boulay for providing us with the *Monomorium subopacum* sample; and to A. Yockey-Dejean, K. G. Dexter and M. A. Fares for proofreading the manuscript. We would also like to thank the Laboratoire Environnement de Petit Saut for furnishing logistical help. Financial support for this study was provided by a research programme of the French Agence Nationale de la Recherche (research agreement no. ANR-06-JCJC-0109-01), by the ESF-EUROCORES/TECT/BIOCONTRACT programme, by the Programme Amazonie II of the French Center National de la Recherche Scientifique (CNRS), by the Programme interdisciplinaire 'Interface Physique Chimie Biologie: soutien à la prise de risque' of the CNRS, and by a Nouragues research grant from the CNRS.

- 1 Farrell, B. D., Sequeira, A. S., O'Meara, B. C., Normark, B. B., Chung, J. H. & Jordal, B. H. 2001 The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution* 55, 2011–2027.
- 2 Mueller, U. G., Gerardo, N. M., Aanen, D. K., Six, D. L. & Schultz, T. R. 2005 The evolution of agriculture in insects. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 563–595. (doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152626)
- 3 Rohfritsch, O. 2008 Plants, gall midges, and fungi: a three component system. *Entomol. Exp. Appl.* 128, 208–216. (doi:10.1111/j.1570-7458.2008.00726.x)
- 4 Mikheyev, A. S., Mueller, U. G. & Abbot, P. 2010 Comparative dating of Attine ant and Lepiotaceous cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord. *Am. Nat.* 175, E126–E133. (doi:10.1086/652472)
- 5 Mueller, U. G., Rehner, S. A. & Schultz, T. R. 1998 The evolution of agriculture in ants. *Science* 281, 2034–2038. (doi:10.1126/science.281.5385.2034)
- 6 Weber, N. A. 1966 Fungus-growing ants. *Science* 153, 587–604. (doi:10.1126/science.153.3736.587)
- 7 Bailey, I. W. 1920 Relations between ants and fungi. *Ecology* 1, 174–189. (doi:10.2307/1929134)
- 8 Dejean, A., Solano, P. J., Ayroles, J., Corbara, B. & Orivel, J. 2005 Arboreal ants build traps to capture prey. *Nature* 434, 973. (doi:10.1038/434973a)

- 9 Defosse, E., Selosse, M. A., Dubois, M. P., Mondolot, L., Faccio, A., Djieto-Lordon, C., McKey, D. & Blatrix, R. 2009 Ants-plants and fungi: a new threeway symbiosis. *New Phytol.* 182, 942–949. (doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02793.x)
- 10 Maschwitz, U. & Hölldobler, B. 1970 Der kartonnestbau bei *Lasius filiginosus* Latr. (Hym. Formicidae). *Z. vergl. Physiol.* 66, 176–189. (doi:10.1007/BF00297777)
- 11 Mayer, V. E. & Voglmayr, H. 2009 Mycelial carton galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) as a multi-species network. *Proc. R. Soc. B* 276, 3265–3273. (doi:10.1098/rspb.2009.0768)
- 12 Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Konrad, H., Seifert, B., Christian, E., Moder, K., Stauffer, C. & Crozier, R. H. 2008 Specificity and transmission mosaic of ant nest-wall fungi. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 940–943. (doi:10.1073/pnas.0708320105)
- 13 Poulsen, M. & Currie, C. R. 2009 On ants, plants and fungi. *New Phytol.* 182, 785–788. (doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02863.x)
- 14 Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005 ARLEQUIN v. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47–50.
- 15 Aanen, D. K., Ross, V. I. D., de Fine Licht, H. H., Mitchell, J., de Beer, Z. W., Slippers, B., Rouland-Lefèvre, C. & Boomsma, J. J. 2007 Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and *Termitomyces* symbionts in South Africa. *BMC Evol. Biol.* 7, 115. (doi:10.1186/1471-2148-7-115)
- 16 Thompson, J. N. 2005 *The geographic mosaic of coevolution*. Chicago, IL: The University of Chicago Press.

Biol. Lett.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Fungal cultures

To maximise the isolation success of the mutualistic fungi and to minimise the risk of opportunistic fungi, we sampled the traps from areas under construction where we expected to find the fungal cultivars having fewer contaminant spores than in older parts of the trap. We immersed pieces of the traps in sterile water, where we broke them into smaller pieces under a stereoscopic microscope, and thoroughly washed them to rid them of as many exogenous and highly prevalent spores as possible. Then, we pre-cultured these small pieces of loose mycelium by placing them in wet cotton where fast-growing contaminants were easily detected. Under these conditions, the melanised hyphae present in the trap expanded, leaving behind the old mycelia with all of the persistent contaminant spores attached to their walls as well.

Then, single hyphae from the new, expanding mycelium were collected with a glass filament and were cultured in solid YMG medium, including a cocktail of five antibiotics (100 mg/L Na-Ampicillin, 120 mg/L SO₄-Streptomycin, 15 mg/L Tetracycline, 30 mg/L Chloramphenicol, and 30 mg/L SO₄-Kanamycin) at 25 °C.

Fungal and ant molecular genetics and phylogenetic analysis

We extracted the total DNA from all fungal and ant samples using a 10% Chelex (BioRad) solution. We amplified the entire internal transcribed spacer region of the fungi with primers ITS1-F (Gardes and Bruns 1993) and ITS4 (White *et al.* 1990). For a more reliable phylogenetic analysis, we amplified the EF1 α segment with primers EF595F (Kausserud and Schumacher 2001) and EF1160R (ccratyttgtagacatcctg). All of the products were sequenced by Genoscreen (Lille, France). We amplified a segment of 626 bp of the cytochrome oxidase subunit I (COI) of the ants with primers LCO1490 and HCO2198 (Folmer *et al.* 1994) and a segment of 681 bp of the cytochrome *b* (cyt *b*) gene with primers CB1 and tR^S or CB2 (Crozier *et al.* 1991, Jermin and Crozier 1994). PCR products were sequenced by Millegen (Labège, France). In addition, individuals from four Solenopsidini species were used as outgroups: *Monomorium subopacum* collected in *El Puerto de Santa María*, Cádiz (Spain), *Diplorhoptrum* sp., *Solenopsis saevissima* and *Wasmannia auropunctata* collected in *Petit Saut* (French Guiana). Ants were preserved in 96% ethanol.

Each fungal sequence was identified through BLAST (Altschul *et al.* 1997) matches optimized for highly similar sequences performed on all of the databases available at the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). We used Clustal X v. 2.6.11 (Larkin *et al.* 2007, Thompson *et al.* 1997) to align the fungal sequences and BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.2 (Hall 1999) using ClustalX 1.83 to align the ant sequences. We manually corrected the alignments of the fungal sequences with GeneDoc v. 2.6.002 (Nicholas *et al.* 1997). The concatenated ant or fungal sequences were collapsed into haplotypes using Collapse 1.2 (Posada, available from <http://darwin.uvigo.es>). We used ModelTest 3.7 (Posada 2002, Posada and Crandall 1998) as in PAUP 4.0b10 (Swofford 2000) using the PaupUp graphical interface (Calendini and Martin 2005) to determine the most suitable models of DNA substitution for COI, cyt *b*, the ITS, the EF1 α , and the two concatenated regions COI-Cyt *b* and ITS-EF1 α .

We obtained the same qualitative results for both the ITS and the concatenated ITS-EF1 α regions. The ITS-EF1 α regions of the outgroups were obtained after concatenating sequences from the same isolates (GenBank: DQ826737 and DQ840565 for the *Capronia pilosella*; DQ826739 and DQ840567 for the *Exophiala pisciphila*).

Phylogenetic inferences were made using different criteria: maximum parsimony (MP), Neighbor joining (NJ), Maximum likelihood (ML) and Bayes. MEGA 4.02 (Tamura *et al.* 2007) was used for MP and NJ inference with correction for multiple hits. The reliability of the tree was assessed with bootstrap using 10,000 pseudo-replicates. For ML inferences, we used PhyML (Guindon and Gascuel 2003) as implemented in Phylemon (Tárraga *et al.* 2007)

using the best model as estimated by ModelTest. This model was GTR + Gamma distribution + I (proportion of invariable sites) and was the best model inferred for both the ITS-EF1 α and the COI-Cyt *b* regions. Finally, we ran a Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes v3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Fungal sequences were divided into three partitions and ant sequences into four. Analyses consisted of four independent runs of 1.5 and 3.5 million generations for the fungus and for the ants, respectively, each distributed over five chains with trees sampled every 100 generations and with a burn-in of 1 and 3 million generations for the fungus and for the ants, respectively. Burn-in and run convergences were assessed as recommended (Gelman and Rubin 1992).

The population genetic structure of the fungal variants detected in the cladograms for each sequenced region was further analyzed in Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) and the AMOVA values for the F_{ST} statistics were calculated after 10,000 permutations.

GenBank accession numbers of the 16 fungal haplotypes (ITS-EF1 α) found in this study.

Haplotype	ITS	EF1 α
H1	GU055952	GU055968
H2	GU055953	GU055969
H3	GU055951	GU055967
H4	GU055942	GU055958
H5	GU055941	GU055957
H6	GU055945	GU055961
H7	GU055950	GU055966
H8	GU055949	GU055965
H9	GU055946	GU055962
H10	GU055943	GU055959
H11	GU055944	GU055960
H12	GU055947	GU055963
H13	GU055948	GU055964
H14	GU055938	GU055954
H15	GU055939	GU055955
H16	GU055940	GU055956

GenBank accession numbers of the 57 ant haplotypes (COI-Cyt b) found in this study.

	Haplotype	COI	Cyt b		Haplotype	COI	Cyt b
01	1_35	GU013688	GU013741	32	HP7_23	GU013694	GU013725
02	24_Cor28	GU013704	GU013751	33	HP7_48	GU013687	GU013736
03	24_Cor50	GU013702	GU013751	34	HP7_C23	GU013688	GU013747
04	9C10	GU013706	GU013752	35	HP9_13	GU013692	GU013738
05	BVC50	GU013710	GU013751	36	HP9_31	GU013699	GU013724
06	BVC52	GU013712	GU013751	37	HP9_40	GU013697	GU013724
07	BVC53	GU013711	GU013751	38	HP9_9C2	GU013703	GU013751
08	BVC54	GU013705	GU013751	39	HP9_M13	GU013695	GU013724
09	CO4	GU013709	GU013751	40	HP9_M7	GU013694	GU013729
10	CO6_1	GU013708	GU013751	41	HPCP1	GU013714	GU013754
11	<i>Diplorhoptrum</i> sp.	GU013722	GU013756	42	HPCP12	GU013715	GU013754
12	HP1_23	GU013688	GU013736	43	HPCP16	GU013716	GU013754
13	HP1_39	GU013688	GU013746	44	HPCP2_2	GU013718	GU013754
14	HP1_43	GU013688	GU013739	45	HPCP5	GU013717	GU013754
15	HP2_16	GU013694	GU013724	46	HPdef10	GU013688	GU013748
16	HP2_18	GU013691	GU013742	47	HPF11	GU013689	GU013732
17	HP2_35	GU013688	GU013730	48	HPF14	GU013690	GU013733
18	HP2_73	GU013694	GU013726	49	HPF15	GU013690	GU013732
19	HP2_87	GU013688	GU013731	50	HPF5	GU013719	GU013754
20	HP24_15	GU013694	GU013727	51	HPF6	GU013689	GU013734
21	HP24_18	GU013694	GU013740	52	<i>M. subopacum</i>	GU013721	GU013758
22	HP24_19	GU013688	GU013742	53	MSB5	GU013693	GU013747
23	HP24_2	GU013686	GU013727	54	MSCnAo1	GU013707	GU013751
24	HP24_21	GU013688	GU013737	55	MSCnAo2	GU013713	GU013751
25	HP24_3	GU013688	GU013744	56	MSCnAo5	GU013708	GU013753
26	HP24_33	GU013688	GU013745	57	MSCnAo7	GU013706	GU013751
27	HP24_8	GU013688	GU013735	58	n058	GU013701	GU013749
28	HP6_11	GU013696	GU013724	59	n241	GU013701	GU013750
29	HP6_40	GU013698	GU013728	60	<i>S. saevissima</i>	GU013723	GU013755
30	HP6_51	GU013700	GU013724	61	<i>W. auropunctata</i>	GU013720	GU013757
31	HP6_70	GU013698	GU013724				

4.2 Article 9 : Interspecific variation in the foraging behaviour of two obligate plant-ants: long term consequence for host plant performance.

En préparation

Jérémie Lauth¹, Pierre-Jean G. Malé^{2,3}, Céline Leroy¹, Olivier Roux¹, Alain Dejean¹ and Jérôme Orivel^{1,2,3}

¹CNRS; UMR Ecologie des Forêts de Guyane, Campus Agronomique, F-97379 Kourou cedex, France

²Université de Toulouse; UPS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

³CNRS; EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), F-31062 Toulouse, France

Jérémie Lauth and Pierre-Jean Malé have equally contributed to the production of this publication

Abstract

Because ant-plant mutualisms are horizontally transmitted, these interactions are prone to invasion to newly interacting species. Although less beneficial partners should be excluded, many mechanisms have highlighted how coexistence may last between partners that confer different benefits. A first step toward understanding which mechanisms may explain coexistence between guilds of interacting species is to examine costs and benefits provided by each associates. Here, we examined costs and benefits provided by two *Allomerus* ant species to their myrmecophyte host *Hirtella physophora* in term of vegetative growth and reproductive success. *Allomerus octoarticulatus* inhabited plant experienced significantly higher vegetative growth than *Allomerus decemarticulatus* inhabited ones. We demonstrated that these differences arise from differences in foraging behavior between the two species. We found that *A. octoarticulatus* workers patrolling activity were mostly concentrated on host plant leaves, allowing a better plant protection; whereas *A. decemarticulatus* activity focused preferentially on the galleries they built on host plant stem. Our results show that the tradeoffs that experience both ant species between these two activities do not affect differently plant reproductive success and finally suggest that the better protection provided by *A. octoarticulatus* might be counter balanced by the association of *A. decemarticulatus* with a third fungal partner.

Keywords: mutualisms, tradeoffs, coexistence, behavioural trait, *Hirtella physophora*, *Allomerus* ants

Introduction

Ant plant protective interactions involve more than 100 genera of plants and at least 40 species of ants. The diversity of these associations cover all the spectrum of possible mutualisms: from labile to obligate and from generalist to highly specific(Heil & McKey 2003). In obligate associations, myrmecophytic plants provide ants with nesting cavities (named domatias) and/or food. In return, the ants, through their aggressiveness and predatory behaviors, protect their host plant from herbivores, competitors and/or pathogens. Characterized by a horizontal transmission between each generation, host plants can be prone to invasion by newly interacting species. When all species are beneficial to the myrmecophytes, selection should not favor trait enhancing specificity with a particular partner, maintaining a guild of interacting species(Palmer *et al.* 2003). Inversely, when the benefits offered by the ants are variables, selection should promote traits and mechanisms that exclude less beneficial partners. These mechanisms include selective filters, host sanctions and/or partner fidelity feedback (Yu 2001). Coexistence of different partners should ultimately be reduced, leading to a tight association between only one species of ant and one species of plant.

However, examples of coexisting ant partners that differ in the quality of their rendered services are frequent. Particularly, a plant can host conjointly true mutualists and parasitic species that reap the plant benefits without conferring any(Yu 2001). This paradoxical stability has been explained by different tradeoff mechanisms. The competition/colonization tradeoffs explain for example how the interaction between *Acacia*, *Acacia* ants and the parasitic ant *Pseudomyrmex nigropilosa* can persist (Janzen 1975; Yu *et al.* 2001). As better competitors, *Acacia* ants can exclude *Pseudomyrmex* from host plants. But because the parasite ant produces new queens earlier after colony establishment, it can coexist by being a better colonizer of new saplings and of adult plants where the colony has died. In the association between *Cordia nodosa* and the two ants *Allomerus* and *Azteca*, both ants protect their host from phytophagous insects. However, *Allomerus* ants act as parasites by destructing *Cordia*'s floral buds, reducing its chance of reproduction to nearly zero (Frederickson 2009). Persistence of the system can here be explained by a tradeoff between colony fecundity, foundress queen dispersal ability and host spatial heterogeneity (Yu *et al.* 2001). The more fecund *Allomerus* will dominate sites characterized by a high host plant density whereas the better dispersal ability of *Azteca*'s queen will allow them to occupy low density sites.

Recently, Palmer *et al.* (2010) emphasized the asymmetrical lifespan of ants and plants as a key factor in the coexistence of four ant species inhabiting the plant *Acacia drepanolobium*. They demonstrated that, previously though as parasites, some ant species were in fact beneficial to their host plant if we integrated succession of ant species along the ontogeny of the plant. Hence, a first step toward understanding mechanisms that restrict or maintain diversity is the study of costs and benefits proffered by the different ant species, their particular behaviors as well as their life history strategies.

Here, we investigated the interaction between the ant plant *Hirtella physophora* and its two ant occupants: *Allomerus decemarticulatus* and *Allomerus octoarticulatus*. We compared costs and benefits provided by each associated ant in term of plant reproduction and vegetative growth. We linked these observed differences to ant behaviors to finally discuss consequences in term of coexistence between *H.physophora* and its symbionts.

Materials & Methods

Study site and model

H. physophora is an understory treelet that occurs strictly in pristine Amazonian rainforest. Plant individuals have long-lived leaves that bear extra-floral nectaries and a pair of pouches at the base of each lamina (Leroy *et al.* 2008) that are called ‘domatia’. Flowering periods occur mainly from December to February and June to August. *Hirtella physophora* is a self-incompatible and entomogamous species. The flowers carry two ovules, whereas the fleshy fruits carry only one seed and mature about three months after fertilization (Leroy *et al.* submitted). Plant individuals are almost exclusively inhabited by the arboreal ant *A. decemarticulatus* with a single colony per plant and *A. decemarticulatus* has never been found in association with another myrmecophyte species in the study area (Solano *et al.* 2003; Grangier *et al.* 2009). As in any other protective mutualism between ants and plants, *A. decemarticulatus* workers protect their host plant from defoliators through their predatory behaviour (Dejean *et al.* 2001; Dejean *et al.* 2005; Grangier *et al.* 2008). *A. decemarticulatus* destroys almost two thirds of the buds of *H. physophora* at each flowering periods, by biting and chewing sterile parts of buds (Malé *et al.* submitted-a). This behaviour results in a very low fruit set and in an increase in new leaves production (Orivel *et al.* 2010; Malé *et al.* submitted-a; Malé *et al.* submitted-b). In some rare areas, *H. physophora* inhabited by *A. decemarticulatus* are sympatric with *H. physophora* inhabited by *A. octoarticulatus*.

A. octoarticulatus is also known to protect his host plants, *C. nodosa* (Boraginaceae) and *Hirtella myrmecophila*, and to partially destroy its reproductive parts (Izzo & Vasconcelos 2002; Edwards & Yu 2008). This study was conducted in French Guiana between November 2008 and April 2010 in *La Montagne des Singes*, Kourou (05° 04' 20"N; 52° 41' 43"W), on 26 *Hirtella physophora* – 13 inhabited by *A. decemarticulatus*, 13 inhabited by *A. octoarticulatus*.

Host plant performance

Vegetative growth

Each month from November 2008 to July 2009, we marked every new leaf produced by each plant. At the end of the experiment, we compared the number of newly produced leaves between *A. decemarticulatus* inhabited and *A. octoarticulatus* inhabited plants using the Mann & Whitney rank test for unpaired data.

Herbivory

Each month between November 2008 and July 2009, we scored all the newly produced leaves for presence/absence of phytophagy-related damage. Since Grangier *et al.* (2008) demonstrated that developmental ‘stage 2’ of the expansion of the leaf was the most prone to phytophagy, we focused on leaves older than one month and younger than two months, i.e. young ‘stage 3’ leaves. To assess putative differences in protection efficiency of the host plant between the two ant species, we compared the level of damage on leaves between *A. decemarticulatus* inhabited and *A. octoarticulatus* inhabited plants using Generalized Linear Mixed Modeling (GLMM) – the presence of damage was considered as the ‘successes’ and the absence of damage as the ‘failures’ in a binomial distribution.

Reproduction

Each week from January 2009 to March 2009, we counted the number of inflorescences, flowers in buds, flowers in bloom and fruits per plant. Then, since the flowering period was over, we counted the number of fruits per plant every month until June 2009. We compared the number of inflorescences, flowers in buds, flowers in bloom and fruits between the *A. decemarticulatus* inhabited and *A. octoarticulatus* inhabited plants, using the Mann & Whitney rank test for unpaired data. We assessed the difference of intensity in the castration behaviour between the two ant species by comparing the flower-to-bud ratios in the two groups of plants. The impact of ant activity on fruit production was also compared between the two ant species by comparing the fruit-to-flower ratios. These comparisons were performed by using Generalized Linear Modeling (GLM) – the number of flowers/fruits per

inflorescence was considered as the ‘successes’ and the initial number of buds/flowers minus the number of flowers/fruits as the ‘failures’ in a binomial distribution.

Ant behaviors

Activity rhythms in galleries and on leaves

In January 2010, the activity rhythms of the two ant species were assessed on five *H. physophora* per species, both on leaves and in the ant-constructed galleries. Because it rained several times each day, greatly reducing or stopping ant activity on the leaves, this survey lasted for three weeks in order to get at least one measure per hour over a 24 hours period. Each hour, we counted workers on the adaxial and abaxial sides of two young expanded leaves and two old leaves per plant and we took two pictures of the galleries per colony: one at the base of the plant, right before the first node, and the other one at the extremity of a stem, between two leaves. We randomly chose 20 holes per 24-pictures sets. Gallery occupancy was then calculated by scoring these for ant presence. Positive counts were attributed when ants were occupying holes. We compared activity rhythms of ants on leaves, depending on ant species, leaf age and leaf side using a generalized linear mixed model (GLMM). The activity rhythms of ants in galleries were also compared between the two ant species using a GLMM. The individuals and the time were considered as random effects.

Alien arthropod discovery

We tested for differences in the time needed for ants to discover the presence of alien arthropod on the host plant leaves. We chose two ‘stage 3’ leaves on each plant. We put a termite soldier (*Cavitermes tuberosus*) on the lamina of the experimental leaf and compared the time needed for ant workers to discover the termite using a Mann & Whitney rank test for unpaired data.

Investment in gallery construction

We compared the proportion of plant stems covered by ant-built galleries between the ant species. We measured the total length of stems (TLS) and the total length of galleries (TLG) of 12 plants hosting *A. decemarticulatus* and 12 plants hosting *A. octoarticulatus*. Comparisons of the ratio of TLG on TLS between ant species were performed using a Mann & Whitney rank test for unpaired data.

Colony sizes

We assessed ant colony size in 30 *A. octoarticulatus* and 35 *A. decemarticulatus* inhabited plants. The total number of domatias bored by host plants was used as a measure of plant size. Plants were selected to fulfil the whole range of possible sizes (i.e. from 7 to 178 domatias). Plants were collected in plastic bags that were subsequently put in a freezer to kill

the ants, thus minimizing the loss of workers during the collection. Then, we dissected each domatium and counted all individuals, whatever their caste was. Workers present on leaves and stems were also counted. The relation between the total number of workers and plant size was assessed using linear regressions. Linear models were forced to the origin in order to fit biological assumptions, (i.e. when plants bore no domatium, the number of workers was supposed to be null). Interspecific differences in the number of workers per colony were determined by ANCOVA, using the domatia number as the covariate.

Results

Host plant performance

Vegetative growth

Plants associated with *A. octoarticulatus* produced significantly more leaves than plants associated with *A. decemarticulatus* (mean number of newly produced leaves \pm SD in plants with *A. decemarticulatus* vs. plants with *A. octoarticulatus* = 3.15 ± 2.11 vs. 6.23 ± 4.13 ; Mann & Whitney rank test: $W = 41$, $p = 0.026$; Fig. 1).

Herbivory

Plants associated with *A. octoarticulatus* experienced significantly less phytophagy-related damage than plants associated with *A. decemarticulatus* (Generalized Linear Mixed Model, Ant species (*A. octoarticulatus*): Estimate = -1.41, SE = 0.45, z-value = -3.18, $p = 0.001$; Fig. 2) meaning that *A. octoarticulatus* better protects *H. physophora* leaves against phytophagous insects.

Reproduction

We observed no difference between *A. decemarticulatus*-inhabited and *A. octoarticulatus*-inhabited plants in terms of inflorescences number (mean number of inflorescence \pm SD in plants with *A. decemarticulatus* vs. plants with *A. octoarticulatus* = 2.85 ± 2.97 vs. 5.23 ± 4.40 ; Mann & Whitney rank test: $W = 60$, $p = 0.214$), number of flowers in bud (mean number of flowers in bud \pm SD in plants with *A. decemarticulatus* vs. plants with *A. octoarticulatus* = 10 ± 12.51 vs. 23.46 ± 20.62 ; Mann & Whitney rank test: $W = 51$, $p = 0.086$), number of blooming flowers (mean number of blooming flowers \pm SD in plants with *A. decemarticulatus* vs. plants with *A. octoarticulatus* = 5.23 ± 8.24 vs. 12.77 ± 15.02 ; Mann & Whitney rank test: $W = 53.5$, $p = 0.107$) and number of fruits produced (mean number of fruits \pm SD in plants with *A. decemarticulatus* vs. plants with *A. octoarticulatus* = 0.62 ± 1.45 vs. 0.62 ± 0.77 ; Mann & Whitney rank test: $W = 69$, $p = 0.362$). Plants also did

not differ in terms of flowering success (Generalized Linear Model, Ant species (*A. octoarticulatus*): Estimate = -0.04, SE = 0.18, z-value = -0.223, $p = 0.824$) nor in terms of fertilization efficiency (Generalized Linear Model, Ant species (*A. octoarticulatus*): Estimate = 0.89, SE = 0.52, z-value = 1.715, $p = 0.086$) meaning that castration behaviour and activities in blooming flowers of *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* affect the plant reproduction in the same way.

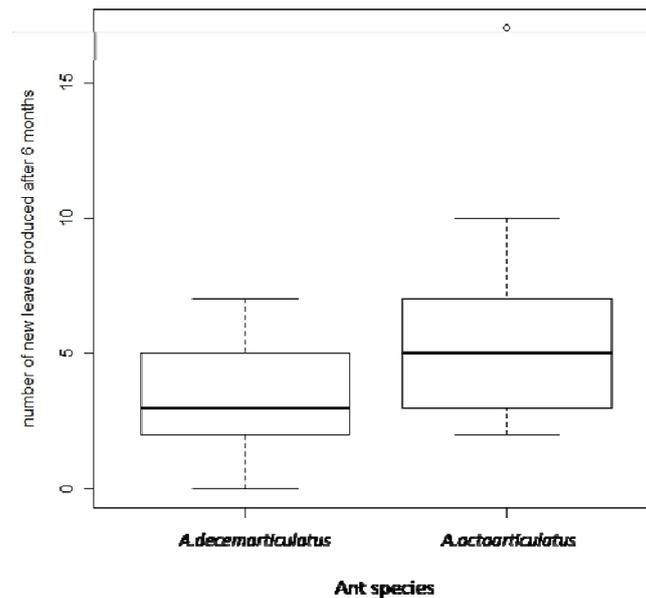


Figure 1: Boxplot of the number of new leaves produced by *H. physophora* individuals as a function of their ant species associated.

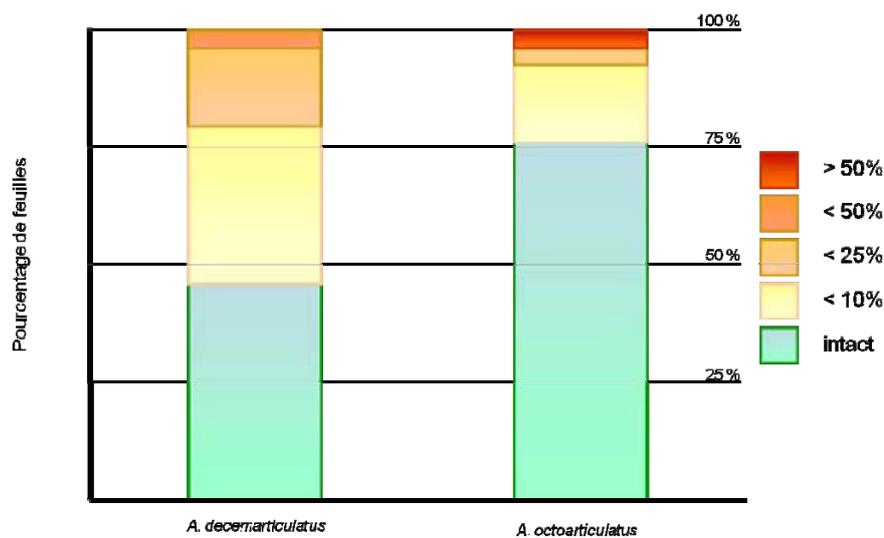


Figure 2: Cumulative barplot of the percentage of young leaves damaged by phytophagous insects as a function of the ant species inhabiting *H. physophora*

Ant behaviour

Activity rhythms in galleries and on leaves

Gallery holes at the base of *A. decemarticulatus* inhabited plants were significantly more occupied by workers than *A. octoarticulatus* inhabited ones (GLMM, Ant species (*A. octoarticulatus*): Estimate= -1.13, SE=-6.02, z-value= -6.02, $p < 0.0001$). There were however no effect of time nor of the interaction between time and ant species (GLMM, hour: Estimate=-0.003, SE=0.004, z-value=-0.61, $p = 0.416$ and Interaction: Estimate=-0.01, SE=0.009, z-value=1.33, $p = 0.183$; Fig.3). Because *A. octoarticulatus* workers were not building real galleries on branches, comparison between the two ants species on that part of the plant was not possible.

The overall activity of *A. octoarticulatus* workers on leaves was higher than that of *A. decemarticulatus*. Differences were more or less important on young and old leaves (GLMM, Ant species * leaf age (octo * young); Estimate = -0.63, SE = 0.11, z-value = -5.72, $p < 0.0001$; Fig.4).

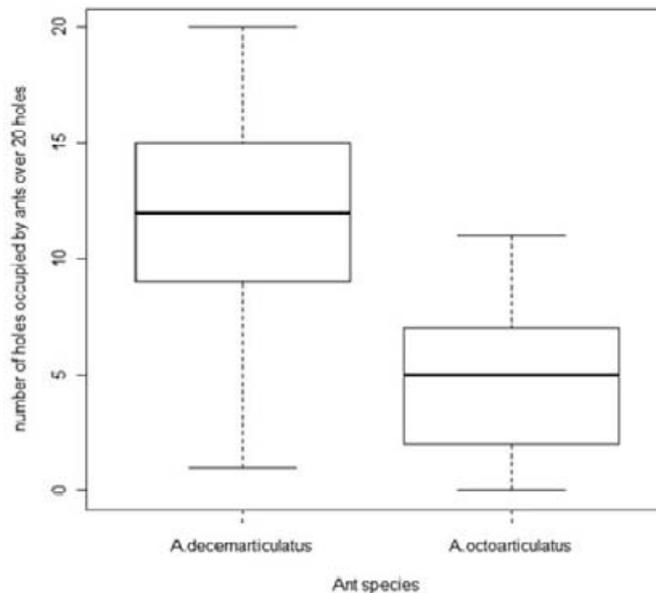


Figure 3: Boxplot of the number of ant workers that lie and wait per unit of surface area.

Workers recruitment

A. octoarticulatus found termite soldiers on the leaf of its host plant significantly more rapidly than *A. decemarticulatus* (Mann & Whitney rank test: $W = 118$, p -value = 0.03164, fig.5).

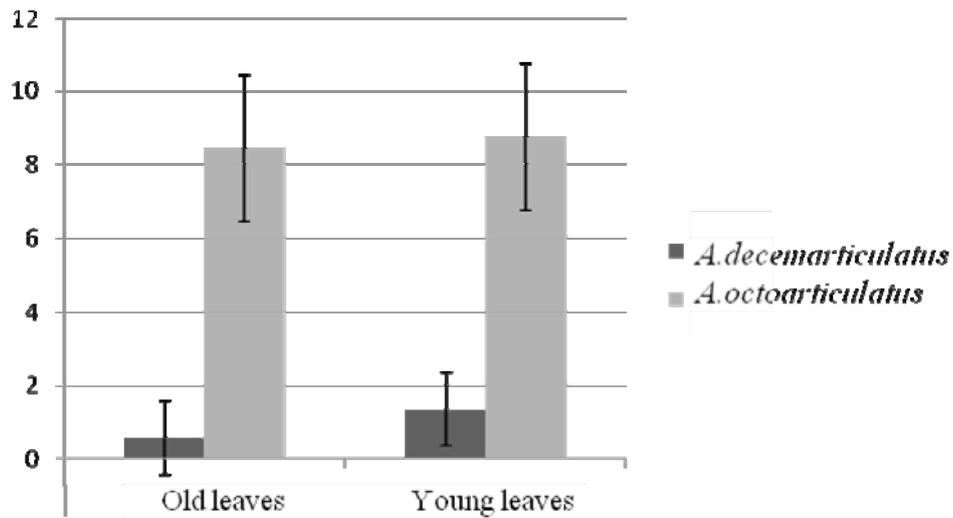


Figure 4: Histogram of the number of workers patrolling young and old leaves of *H. Physophora*. Boxplots are regrouping data collected during a 24 hour period

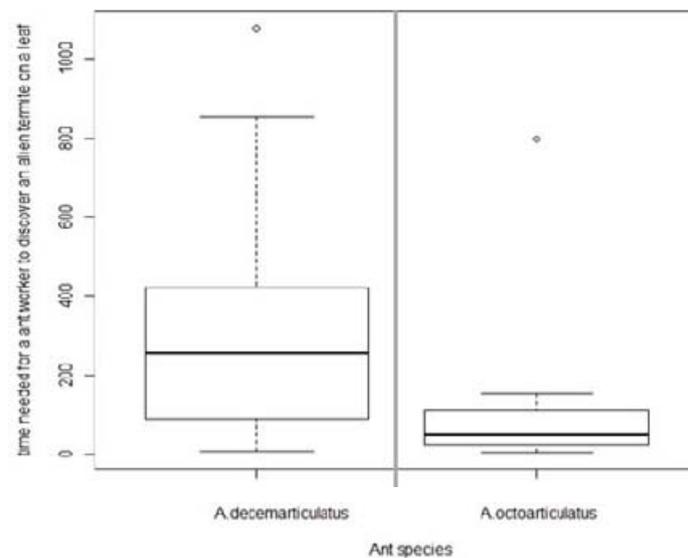


Figure 5: Box plot of the time needed for an ant worker to discover an alien insect on the leaf lamina of its host plant as a function of the ant species.

Investment in Gallery construction

The gallery length-to-stem length ratio was significantly higher in *A. decemarticulatus* inhabited plants than in *A. octoarticulatus* inhabited ones (Mann & Whitney rank test, $W=147$, $p<0.0001$, Fig.6). Galleries built by *A. decemarticulatus* colonies covered on average 65.25% (SD: 15.60) of stems of *H. physophora*. Galleries-free stems were generally restricted to the very base of the trunk, new flushes and terminal parts of branches, between the last two leaves (JL, personal observations). *Allomeurs octoarticulatus*-built galleries covered on average on

24.66% (SD: 20.42) of host plant stems, mainly occurring around nodes between the trunk and branches.

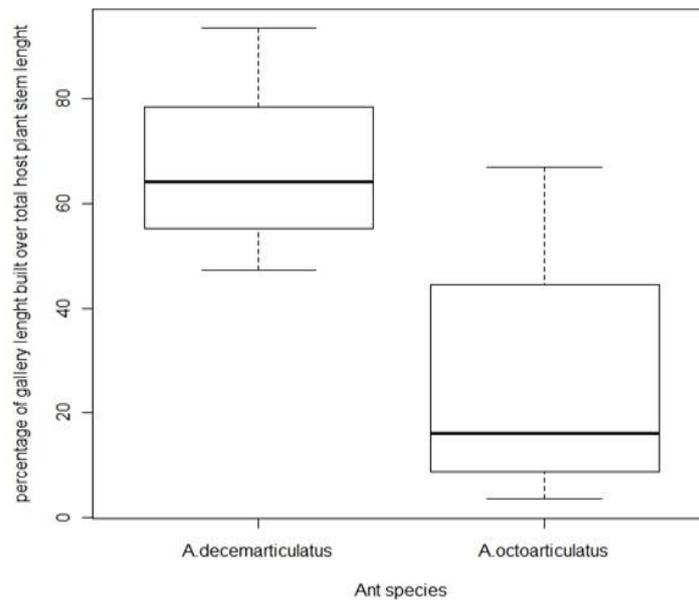


Figure 6: Boxplot of the percentage of host plant stem recovered by ant galleries

Life history

Colony sizes

For each ant species, the total number of workers per colony significantly increased with plant size (*A. octoarticulatus*: $y=12.82x$, $R^2=0.95$, $F=510$, $p<0.0001$; *A. decemarticulatus*: $y=25.66x$, $R^2=0.94$, $F=497.3$, $p<0.0001$, Fig. 7). The estimated regression slopes significantly differed between ant species (ANCOVA, of plant size/ant species $F=134.70$, $p<0.0001$). These results indicate that, for a given plant size, the total number of workers per colony is twofold greater in *A. decemarticulatus* than *A. octoarticulatus*.

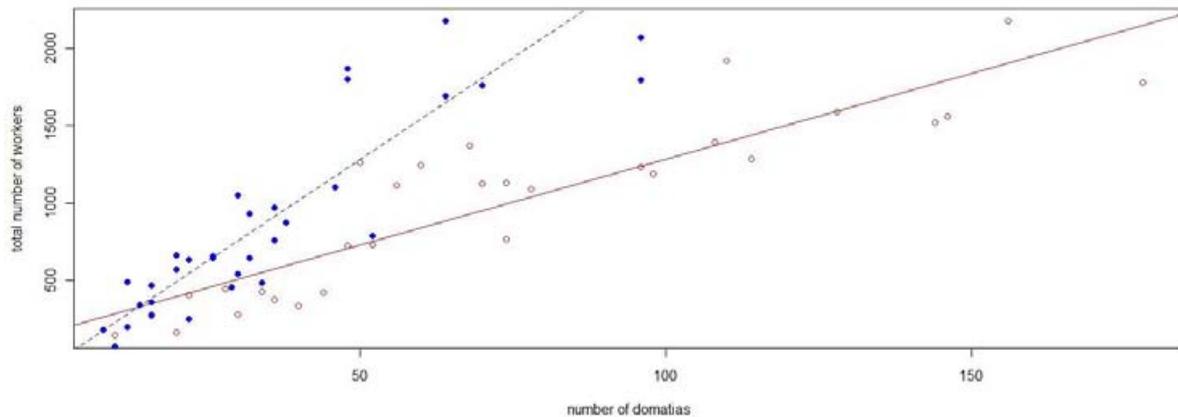


Figure 7. Linear regression of the ant numbers in *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* colonies as a function of host plant domatia numbers. Domatia number was positively related to the total number of workers in the colony of *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* size (*A. octoarticulatus*: $y=12.82x$, $R^2=0.95$, $F=510$, $p<0.0001$; *A. decemarticulatus*: $y= 25.66x$, $R^2=0.94$, $F=497.3$, $p<0.0001$). *A. octoarticulatus* linear regression is represented in a full red line and *A. decemarticulatus* linear regression is represented in a blue dashed line.

Discussion

Hirtella physophora individuals occupied by *A. octoarticulatus* experienced higher vegetative growth than plants occupied by *A. decemarticulatus*. Two mechanisms may account for such differences: differences in the protection behaviours efficiency and difference in castration behaviours between the ant partners (Yu & Pierce 1998; Vasconcelos & Davidson 2000; Heil & McKey 2003; Frederickson 2009). In horizontally transmitted ant-plant relationships, ants are prone to castrate their host plant in order to induce an increase in its growth rate, i.e. an increase in the ant living space (Frederickson 2009; Malé *et al.* submitted-b). But such a behavior is expected only when ant colony sizes are limited by the plant size (Fonseca 1999). The strong relationship between ant numbers (whatever their caste was) and the domatia number highlighted such a limitation in both *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus*. However, we found no significant difference in the castration behaviour between *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus*. Moreover, although both of the ant species protected their host plant, protection dispensed by *A. octoarticulatus* was more effective. Plants occupied by *A. octoarticulatus* were characterized by a smaller proportion of young leaves attacked by phytophagous insects (75% of young leaves were intact) compared to plants occupied by *A. decemarticulatus*. Differences in vegetative growth are thus mostly due to differences in levels of phytophagy experienced by plants as a function of their ant

species associated. Such differences in protection of the host plant are likely to be explained by behavioral differences in ants.

Number of ant workers patrolling *H. physophora* leaves was always higher when plants were associated with *A. octoarticulatus*. Patrolling *A. octoarticulatus* workers were more numerous on leaves, independently of the time of the day or the age of leaves. Consequently, the time needed for *A. octoarticulatus* to discover an alien insect on host plant leaf was shorter and less variable than *A. decemarticulatus* workers, explaining why *A. octoarticulatus* inhabited plants experienced less phytophagy-related damage than *A. decemarticulatus* occupied ones. Conversely, *A. decemarticulatus* activity in galleries was much higher than *A. octoarticulatus* activity. Actually, *A. decemarticulatus* investment was much more important both in ambushing activities and in gallery construction. A higher percentage of stem was covered by galleries in *A. decemarticulatus* inhabited plants than in *A. octoarticulatus* ones, which means that more fungus was present on the first ones than on the second ones.

The greater amount of fungus covering the plant is likely to explain the absence of differences in reproductive investment between plants. Indeed, differences in phytophagy-related damage between plants did not translate into differences in inflorescences number. However, the fungus associated with ant-built galleries is known to play a role of trophic mediator by transferring nutrients from ant preys to the host plant. The greater is the ant investment in gallery-ambushing preys, the greater the transfer of nutrients is supposed to be. The loss of resources through the loss of leaf surface in *A. decemarticulatus* associated plants may this way be compensated by a greater intake of nutrients through the fungus.

The fact that the two ant species neither receive nitrogen from food bodies nor tented hemipterans (JL personal observation) may indicate that income of nitrogen may solely be acquired by captured preys. Although the extent to which *A. octoarticulatus* and *A. decemarticulatus* will forage and the fraction of preys caught in traps or onto leaves is not known, our results allow some predictions on the way each ant species will acquire the nitrogen necessary for the production of alates. Since ant workers cannot be patrolling on leaves and ambushing preys in galleries at the same time, there is a trade-off between these two activities. This trade-off may have led to different hunting strategies in the two ant species associated with *H. physophora*. Thus a lower investment in plant protection and vegetative growth may be counterbalanced by a higher investment in gallery eventually leading to the same amount of fructification. Coexistence of sympatric *A. decemarticulatus* and *A. octoarticulatus* associated with *H. physophora* individuals may also be allowed by the

asymmetry of lifespans between the plant and the ants. The plant lifespan is tenfold longer than the ants one. During its lifetime, an *H. physophora* individual is thus likely to host both of the ant species consecutively.

CONCLUSION

GENERALE

Au terme de ce travail, nous avons acquis une perception précise et intégrée des coûts et bénéfices inhérents à l'association entre *A. decemarticulatus* et *H. physophora*. Nous savons désormais comment ils s'agencent entre eux, induisant ainsi des conflits ou au contraire permettant de les contenir. En guise de conclusion générale, nous allons dans un premier temps récapituler l'ensemble des interactions qui sous-tendent la relation, rappelant les coûts et bénéfices intrinsèques de chacun, les conflits engendrés ainsi que les mécanismes de contrôle qui s'y appliquent. Nous nous attarderons ensuite sur les facteurs externes à l'association et qui en influencent la stabilité. Enfin, nous verrons comment les résultats particuliers obtenus dans cette étude s'intègrent dans une vision plus large de la théorie des mutualismes en général.

1 Synthèse

L'association entre *H. physophora*, les fourmis du genre *Allomerus* et le champignon Ascomycète repose sur des échanges de services. Chacun des trois partenaires bénéficie de la présence des deux autres mais cette relation engendre également des coûts. La balance de ces coûts et bénéfices détermine le caractère mutualiste ou parasite de chacun des protagonistes vis-à-vis de ses associés. Notre étude a montré qu'il est fondamental de bien évaluer l'ensemble des interactions entre tous les partenaires afin d'appréhender correctement la trajectoire évolutive de l'association. En effet, chaque action de la part de l'un d'entre eux est susceptible d'engendrer une réponse chez les autres, soit par des effets directs soit par des effets indirects (Fig. 10).

Nous avons vu que le comportement castrateur d'*A. decemarticulatus* s'apparente à la castration parasitaire, influençant fortement la relation et pouvant potentiellement mener les partenaires à l'extinction. Le conflit entre la protection et la reproduction d'*H. physophora* est au centre des interrogations quant au maintien à long terme de l'association. Il tend à faire d'*A. decemarticulatus* un parasite de sa plante-hôte, malgré la protection qu'elle lui apporte. La balance coûts-bénéfices semble donc pouvoir aisément pencher en faveur du caractère parasite de la fourmi. Or, lorsque l'on considère le système dans son ensemble, de nouveaux éléments apparaissent. Tout d'abord, la virulence des fourmis est soumise au contrôle qu'exerce la plante via l'application de sanctions. La possibilité de l'augmentation des coûts imposés par la fourmi est donc peu plausible. Par ailleurs, du fait de la présence obligatoire du champignon, un bénéfice trophique indirect pour *H. physophora* doit être ajouté au crédit d'*A. decemarticulatus*, faisant ainsi pencher un plus la balance du côté mutualiste. De plus, l'observation du système à une échelle de temps cohérente avec la durée de vie des individus révèle que le comportement castrateur des fourmis a un effet bénéfique sur la croissance de la plante et donc sur les ressources mises en place pour les épisodes de reproduction futurs. L'interférence possible entre les activités des fourmis et celle des pollinisateurs semble également négative pour la plante, si l'on se cantonne à la dimension quantitative de sa reproduction alors qu'elle favorise l'allogamie et est donc positive en termes de qualité de la

descendance produite. Enfin, l'introduction dans l'étude de la dimension spatiale compatible avec les distances de dispersion/dissémination des partenaires a permis d'observer une association indirecte et à long terme entre la survie de lignées de plantes et de fourmis associées.

Ces résultats indiquent que la compréhension d'un système passe par la vision intégrée de ce système de manière écologique : les dimensions temporelles, spatiales et environnementales doivent être toutes prises en compte, et à une échelle adaptée au mode de vie des individus étudiés. Ici, nous nous sommes intéressés à un mutualisme tripartite et avons déterminé les coûts et bénéfices liés à chacune des interactions mises à jour.

Bien sûr, la situation décrite n'est pas immuable dans le temps et l'espace, et la vision écologique du système doit être envisagée à de nouvelles échelles spatio-temporelles compatibles avec une appréhension évolutive du système. Ainsi, l'observation du système à une échelle spatiale plusieurs fois supérieure aux distances naturellement parcourues par les individus au cours de leur cycle de vie a révélé une asymétrie de flux de gènes entre les populations de plantes et les populations de fourmis. Cet état de fait renforce la capacité d'*H. physophora* à exercer son contrôle sur l'association, équilibrant ainsi de manière durable la balance coûts-bénéfices en sa faveur. Par ailleurs, notre étude a également révélé une très grande spécificité d'association entre les fourmis *Allomerus* et le champignon utilisé pour la construction du piège, impliquant donc des bénéfices réciproques importants issus de la coévolution liée à la pratique de l'agriculture.

L'étude de la variabilité spatiale des relations entre les partenaires a engendré l'examen de la présence d'un quatrième partenaire potentiel sous la forme d'une fourmi compétitrice d'*A. decemarticulatus*. Il s'agit en réalité d'une nouvelle association tripartite entre *A. octoarticulatus*, *H. physophora* et le champignon Ascomycète, où la ressource « plante-hôte » est partagée avec la première association décrite. La coexistence entre ces deux systèmes en sympatrie est encore une fois expliquée grâce l'intégration de toutes les dimensions de chacun des systèmes : les fourmis ne sont pas équivalentes en termes de coûts et bénéfices qu'elles apportent de manière directe à *H. physophora*, mais la prise en compte des interactions indirectes via des utilisations différentes du champignon rétablit l'équilibre et nivelle les bénéfices nets que retire *H. physophora* de l'association avec l'une ou l'autre des espèces. De plus, à une échelle temporelle plus large, la forme sous laquelle sont prodigués les différents services à la plante-hôte rendent les deux espèces de fourmis complémentaires dans leur action mutualiste au cours du cycle de vie d'un individu d'*H. physophora*.

En résumé, notre étude démontre comment la compréhension d'un système apparemment simple bénéficie de la richesse des informations apportées par l'intégration de l'ensemble des interactions auxquelles prennent part les protagonistes, au sein du système et avec leur environnement, et à différentes échelles spatio-temporelles écologiques et évolutives.

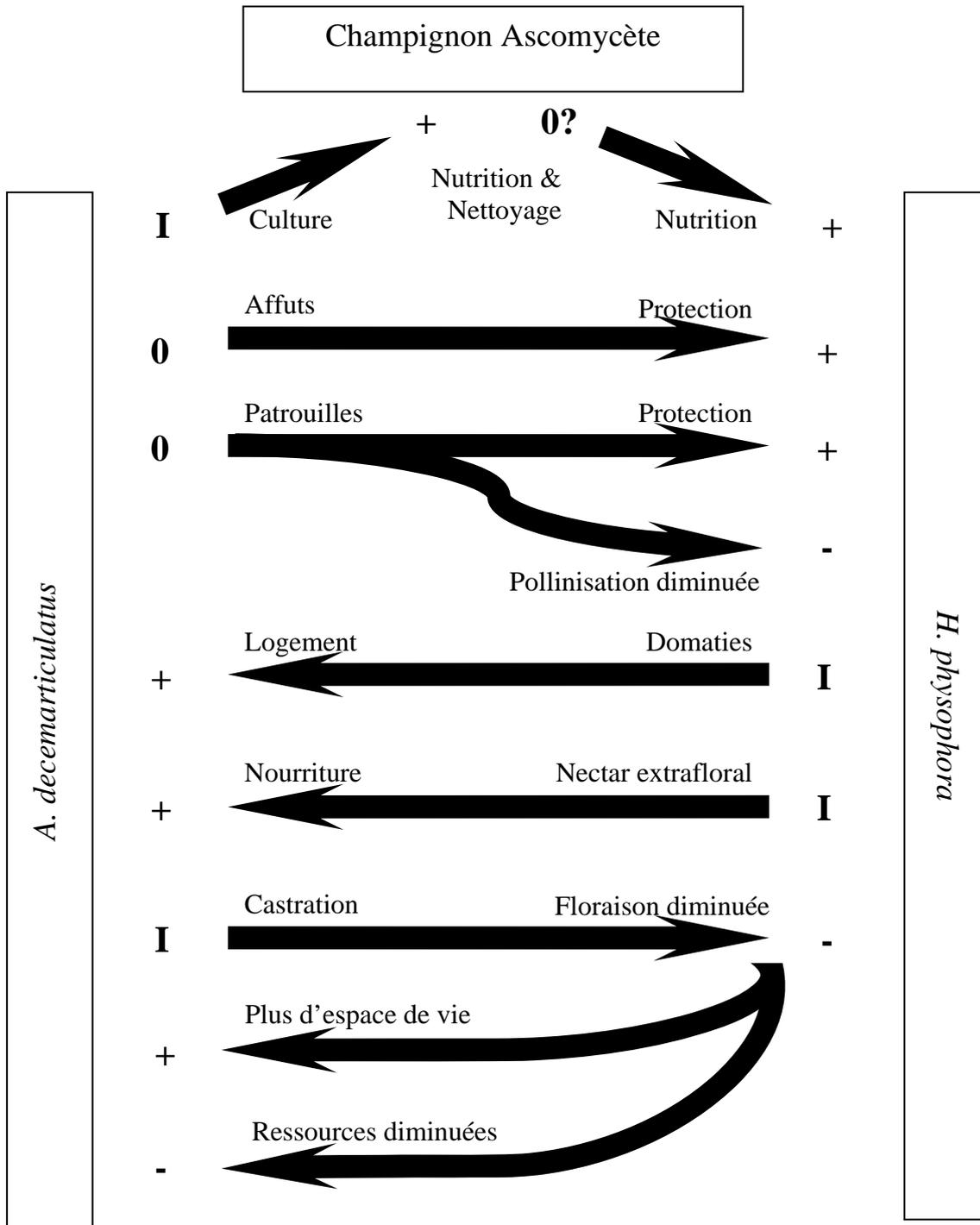


Figure 10 : Résumé des différentes interactions entre *H. physophora*, *A. decemarticulatus* et le partenaire fongique dans le cadre de la relation mutualiste qui les lie. Les « 0 » représentent une absence d'investissement tandis que les « I » désignent une activité coûteuse qui nécessite un investissement de la part du prestataire. Les « + » représentent les effets positifs de cette activité pour le receveur, tandis que les « - » représentent les effets négatifs. On peut noter que seul *H. physophora* procède à des investissements directs dans la relation avec les fourmis – ce qui le place en position d'organisme exerçant le contrôle – tandis que les seuls investissements effectués par *A. decemarticulatus* concernent son activité de tricherie par surexploitation et la culture du champignon.

2 L'apport à la théorie des mutualismes

En 1999, Herre *et al.* concluaient leur article de révision de la littérature concernant le maintien des mutualismes par ces quelques phrases : « Nous ne pouvons déterminer s'il existe des principes généraux ou des patrons cohérents qui caractérisent les mutualismes tant que nous ne comprenons pas les cas d'études isolés. Dans l'idéal, pour un certain nombre de cas, nous devons identifier et quantifier les coûts et bénéfices pour chaque partenaire, nous devons comprendre les conflits d'intérêts et nous devons tenter d'identifier les facteurs qui maintiennent l'alignement des intérêts des partenaires. Si l'alignement n'est pas suffisant, qu'est-ce qui empêche le système de s'effondrer ? Il est donc crucial d'identifier les mutualistes et comprendre leur diversité, leurs patrons de transmission et leur structuration à différentes échelles spatiales, temporelles et évolutives. Tout cela représente un challenge, celui de documenter l'histoire naturelle de nombreux systèmes distincts et de coupler ces résultats avec les informations souvent indispensables qui sont obtenues par des approches moléculaires. » Le travail présenté ici s'inscrit dans ces recommandations.

2.1 L'absence de lexique adapté à l'étude des interactions

Il nous est apparu crucial de réévaluer la définition du phénomène de castration à la lumière de nos observations. La castration désigne la destruction directe des tissus reproducteurs d'un hôte par son partenaire afin d'augmenter la valeur sélective du second. Cette notion est employée très fréquemment dans le cadre des relations hôtes-parasites dans la locution « castration parasitaire » et mène au gigantisme de l'hôte (Bonds 2006). Cependant, ce mot est également employé pour désigner uniquement la destruction des organes mâles et n'est donc pas adapté aux organismes hermaphrodites (Frederickson 2009). De plus, il est souvent associé à des modèles animaux, pour lesquels la castration est synonyme de perte totale et définitive des fonctions reproductrices, et ne correspond pas à la réalité des organismes à croissance modulaire.

Le mot « stérilisation » est parfois observé comme alternative du fait qu'il implique différents niveaux d'intensité. Toutefois, dans les études traitant des relations hôtes-parasites, la stérilisation correspond à une action indirecte du parasite qui prive son hôte de ressources qui ne peuvent ainsi plus être utilisées pour sa reproduction. Il n'y a donc pas destruction des organes reproducteurs et ce phénomène est souvent associé à un nanisme de l'hôte, des suites du détournement de ses ressources au bénéfice exclusif du parasite (Bonds 2006). Enfin, le

terme de « phytophagie » ne convient pas non plus à notre propos puisqu'il implique une cause alimentaire non spécifique des tissus reproducteurs. Il n'existe donc aucun vocable pour désigner de manière satisfaisante un phénomène graduel et temporaire de destruction des organes reproducteurs d'un organisme engendrant son gigantisme.

Dans cette étude, nous avons pris le parti d'utiliser la locution « comportement castrateur » car, en plus de faire écho au vocable habituel, elle autorise différents degrés d'aboutissement de la destruction des organes reproducteurs. Un comportement castrateur peut être exercé par un individu sans pour autant être totalement abouti ; il n'a pas obligatoirement pour conséquence la stérilité complète et définitive de la cible.

De manière plus large, le phénomène observé peut être désigné comme une manipulation de la fécondité. Ce terme permet de n'imposer aucune contrainte sur le résultat à court ou long terme du comportement castrateur sur reproduction de sa cible. Il serait donc bien adapté à des systèmes comparables à notre modèle d'étude puisque nous avons vu que l'empêchement de la reproduction actuelle d'un individu à croissance modulaire peut conduire à une meilleure reproduction future.

2.2 L'importance relative des différents facteurs théoriques dans le maintien des relations mutualistes

Nous avançons un nouvel exemple de mutualisme déstabilisé par un phénomène de castration parasitaire menant au gigantisme de l'hôte (Ebert *et al.* 2004; Hall *et al.* 2007). Ce type d'exemples est crucial dans notre vision des relations mutualistes car il démontre clairement que mutualismes et parasitismes sont le théâtre des mêmes phénomènes, issus des mêmes causes et provoquant les mêmes conséquences. Nous ne faisons que confirmer qu'il s'agit de deux états différents du même ensemble de systèmes.

Par ailleurs, nous avons apporté la confirmation que certains des mécanismes avancés par la littérature pour expliquer le maintien des relations mutualistes étaient bien mis en jeu dans notre modèle d'étude. Wilkinson & Sherratt (2001) proposent que les mutualismes à transmission horizontale peuvent persister (1) grâce à la possibilité pour l'hôte de procéder à un choix entre ses associés, (2) grâce à la mise en jeu de punitions des mauvais mutualistes, et (3) grâce à la dispersion locale des partenaires. La présence de filtres sélectifs permettant à *H. physophora* d'effectuer un choix entre ses partenaires avait déjà été mise en évidence lors de travaux précédents (Grangier 2008; Grangier *et al.* 2009). Ici, nous montrons qu'il existe toujours de la variabilité chez les associés d'*H. physophora* et que les filtres sélectifs ne sont

pas strictement exclusifs d'autres espèces qui par ailleurs, montrent elles aussi des capacités mutualistes.

Notre étude renforce les conclusions récentes d'Edwards *et al.* (2010) quant au rôle prépondérant des sanctions dans la prévention de l'invasion d'un système par des parasites. Par ailleurs, les mécanismes de type fidélité au partenaire jouent également un rôle central dans la prévention de l'apparition de parasites au sein du système. Dans l'étude que nous présentons, la différence entre sanctions et fidélité au partenaire est tenue et repose essentiellement sur le fait que dans les cas de fidélité au partenaire, le caractère punitif de la réponse de l'hôte est une fonction du bénéfice/coût subi par l'hôte, tandis que le phénomène de sanction décrit semble être induit à partir d'un certain niveau de tricherie. Dans la littérature, la différence qui existe entre ces deux phénomènes provient de l'histoire évolutive des mécanismes : la fidélité au partenaire est une exaptation de compromis antérieurs à la mise en place d'associations mutualistes, tandis que les sanctions ont été sélectionnées dans le cadre de l'association (Foster & Wenseelers 2006; Leigh Jr 2010; Weyl *et al.* 2010). Cette définition pose de nombreux problèmes, notamment celui de retracer d'un point de vue pratique la chronologie de l'apparition de phénomènes dont on n'observe que la manifestation actuelle. Si un phénomène de punition est coûteux pour l'organisme qui le met en œuvre, alors il y a de fortes chances qu'il s'agisse de sanctions. Mais qu'en est-il d'un phénomène non coûteux ? S'agit-il forcément de fidélité au partenaire ? Et surtout, comment considérer un phénomène de fidélité au partenaire dont l'effet serait renforcé par la sélection ?

Nous avons également pu affiner la compréhension du mode d'action de la transmission locale de l'association. La transmission pseudo-verticale a été mise en avant comme l'un des facteurs principaux dans le maintien des relations mutualistes à transmission obligatoirement horizontale, du fait qu'elle aligne les bénéfices des partenaires dans la reproduction (Wilkinson & Sherratt 2001). Or, nous avons démontré qu'elle n'intervient pas dans notre modèle d'étude. Si son rôle est important dans certains systèmes (Kiers & van der Heijden 2006), il n'est pas indispensable et son absence peut être compensée par d'autres mécanismes. En revanche, le mode de transmission local de l'association a deux conséquences jusqu'ici peu envisagées dans le cadre des relations mutualistes. Premièrement, il contre sélectionne des lignées trop virulentes du fait de l'application de la Tragédie des Communs (Rankin *et al.* 2007). Deuxièmement, il autorise l'adaptation locale de lignées de partenaires l'une à l'autre (Anderson *et al.* 2004). Les conséquences de ce deuxième point sont fondamentales pour le maintien ou l'effondrement de la relation : du fait de cette adaptation, le partenaire qui évolue le plus vite dispose d'un avantage coévolutif et peut

manipuler la relation à son avantage, devenant ainsi parasite ou contraignant son associé à demeurer mutualiste (Dybdahl & Storfer 2003). La vitesse d'évolution locale des populations dépend de la durée du cycle de vie des organismes mais aussi de l'intensité des flux de gènes qui connectent les populations. Si ces phénomènes ont largement été décrits dans le cadre de relations exclusivement parasitaires, c'est à notre connaissance la première fois qu'ils sont abordés dans le contexte du maintien de relations mutualistes autres que les symbioses mycorrhiziennes (Gandon *et al.* 1996; Wilkinson 1997; Gandon & Michalakis 2002; Kiers & van der Heijden 2006).

Notre étude met également en lumière la modulation très importante des coûts et bénéfices attribués à chaque partenaire, du fait de l'environnement biotique immédiat de l'association. La stabilité d'interactions mutualistes a rarement été envisagée dans le cadre de mutualismes tripartites et c'est pourtant bien la démarche qu'il faut employer afin d'évaluer précisément ce que retire chaque partenaire de l'interaction (Currie 2001; Currie *et al.* 2003; Poulsen & Currie 2010). Plus encore, lorsque comme ici la présence des trois partenaires est obligatoire pour la survie de tous, l'omission de l'un d'entre eux peut mener à d'importantes erreurs d'appréciation quant à la trajectoire évolutive que suit la relation.

3 Perspectives

Ce travail ouvre différentes perspectives permettant d'approfondir notre compréhension de ce système mais également de porter son étude à une autre échelle spatio-temporelle rarement envisagée dans le cadre des relations mutualistes.

3.1 Affiner la compréhension du système à une échelle locale

Le décryptage des interactions entre *A. decemarticulatus* et *H. physophora* autour du conflit générant la destruction des inflorescences de la plante ne fait que commencer. Nous avons vu qu'un tiers environ des inflorescences échappent à la destruction par les ouvrières d'*A. decemarticulatus*. Qu'est-ce qui différencie les inflorescences rescapées des autres ? Dans d'autres systèmes mettant en jeu *A. octoarticulatus*, les inflorescences qui ne sont pas détruites se trouvent dans des régions particulières de la plante, où les fourmis patrouillent peu (Izzo & Vasconcelos 2002; Edwards & Yu 2008). Dans le cas qui nous préoccupe, les inflorescences, détruites ou non, se trouvent quasiment toutes en bout de branche et sont toutes intensément visitées par les ouvrières d'*A. decemarticulatus*. Cela signifie donc qu'elles ne sont pas cachées physiquement. Peut-être les fourmis ne les reconnaissent-elles pas, d'un point de vue chimique, en tant qu'inflorescences. Dans ce cas-là, pourquoi toutes les inflorescences ne possèdent-elles pas les mêmes caractéristiques chimiques qui permettent d'échapper à la vigilance des fourmis ? Et si les fourmis sont capables de reconnaître toutes les inflorescences en tant que telles, qu'est-ce qui fait qu'elles choisissent d'en détruire certaines et pas les autres ? Comment s'effectue ce choix et comment peut-il être cohérent et maintenu entre les différentes ouvrières qui parcourent la surface des inflorescences non détruites pendant toute la durée de leur développement ?

La reproduction d'*H. physophora* ne bénéficie pas directement à *A. decemarticulatus* puisqu'il n'existe pas de transmission pseudo-verticale de l'association. Cependant, les populations observées montrent des tailles et des apparentements moyens entre individus variables. Se pourrait-il que ces facteurs influencent l'intensité de la virulence des colonies de fourmis ? Des phénomènes d'adaptation locale pourraient-ils conduire les colonies

appartenant à des zones où plantes et fourmis montrent un important taux d'apparement à être moins virulentes ?

L'intensité des sanctions à l'encontre des fourmis trop virulentes mérite également plus d'attention. Nous avons vu que pour une virulence maximale, la plante *H. physophora* diminuait son investissement dans ses caractères myrmécophytes, ce qu'elle ne fait pas dans le cas de la virulence modérée que montrent les fourmis. La manifestation des sanctions est-elle abrupte au-delà d'un certain seuil ou bien est-elle progressive ? La réponse à cette question permettrait d'en apprendre plus sur l'origine évolutive de ce mécanisme : s'agit-il bien de sanctions ou bien sommes-nous en présence d'un cas particulier de fidélité au partenaire ? La recherche d'un tel phénomène chez des espèces proches non myrmécophytes apporterait également des éléments de réponse.

Par ailleurs, et de même que précédemment, existe-t-il de la variabilité entre individus d'*H. physophora* dans l'intensité des sanctions ? Cette potentielle variabilité peut-elle être corrélée aux variations du taux d'apparement entre plantes et entre fourmis au sein des zones auxquelles observées ?

Enfin, la compréhension de la dispersion des partenaires reste partielle. Nous avons pu évaluer la distance de dispersion des gènes, mais nous manquons encore de connaissances sur le système biologique ne lui-même. Ainsi, des informations sur les distances de dispersion de chaque sexe permettrait-il d'expliquer les flux de gènes entre populations. Par exemple, une dissémination à grande échelle du pollen couplée avec une dispersion locale des graines encouragerait-elle l'adaptation locale de lignées maternelles de plantes tout en assurant une diversité génétique locale élevée. Il en va de même pour des flux de gènes asymétriques entre mâles et femelles de fourmis.

3.2 Explorer les variations du système à grande échelle

La Théorie de la Mosaïque Géographique de la Coévolution prédit que les différentes populations d'une espèce suivront des trajectoires évolutives différentes du fait d'adaptations locales à des environnements différents (Thompson 2005). Une extrapolation de cette prédiction aux relations mutualistes engendre des trajectoires différentes pour l'ensemble des protagonistes de l'association. Ainsi, on peut s'attendre à observer différents types de conflits, contenus ou non par différents types de mécanismes de contrôle.

Le modèle *H. physophora-A. decemarticulatus* se prête bien à ce type d'analyses. En effet, ces espèces montrent des adaptations importantes à la vie en association, qu'il s'agisse

d'adaptations d'ordres morphologique, physiologique ou comportemental à la présence de leur partenaire ou des adaptations plus subtiles à la résolution de conflits inhérents à ce type de relations. Or, certains de ces traits sont étroitement liés aux conditions du milieu. Par exemple, la dispersion locale des partenaires au sein des sommets des collines résulte de la structuration topologique du milieu. Que se passerait-il si, au lieu d'un milieu vallonné, les espèces fréquentaient un milieu plan, sans discontinuité physique entre les populations, comme c'est le cas pour *A. octoarticulatus* et *C. nodosa* au Pérou (Yu *et al.* 2001). La structure en patches serait-elle conservée malgré tout du fait des courtes distances de dispersion d'*H. physophora* ? Si elle ne l'était pas, la structure en métapopulations serait perdue et le brassage génétique chez les fourmis serait beaucoup plus important. L'une des prédictions qui résulte de ce travail serait qu'*A. decemarticulatus* serait plus prompt à réagir aux changements qui apparaissent chez *H. physophora* et donc que les mécanismes de sanction seraient efficaces moins longtemps. S'il existe de telles régions, l'intensité de la tricherie par *A. decemarticulatus* y est-elle plus élevée ?

Par ailleurs, nous avons vu qu'au sein même de la Guyane française, la spécificité d'association entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus* est remise en cause. Dans ce cas-là, les capacités mutualistes des deux partenaires semblent équivalentes, mais peut-on trouver des régions dans lesquelles il existe une asymétrie entre *A. decemarticulatus* et une autre espèce de fourmis nichant dans *H. physophora* quant au bénéfice net qu'ils apportent à leur plante-hôte ? Dans de tels endroits, quel est l'impact de la présence de cette troisième espèce sur le maintien de la relation entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus* ?

3.3 Explorer les variations du système à l'échelle évolutive

La plante *H. physophora* est associée à *A. decemarticulatus* en Guyane française, localement à *A. octoarticulatus*, mais également à *A. septemarticulatus* au Brésil, voire à d'autres espèce n'appartenant pas au genre *Allomerus*. De même, *A. decemarticulatus* est répertoriée sur *H. myrmecophila* au Brésil (Bruna *et al.* 2005). Il a par ailleurs été démontré que d'autres espèces des mêmes genres, impliquées dans des relations comparables étaient exposées aux mêmes types de conflits. Par exemple, la fourmi *A. octoarticulatus* (quelle que soit la sous-espèce incriminée) castre ses partenaires *C. nodosa*, *Hirtella myrmecophila* et *H. physophora* (Izzo & Vasconcelos 2002; Edwards & Yu 2008; cette étude). Cependant, le maintien de l'association entre *A. octoarticulatus* et ses différents partenaires est autorisé à chaque fois par différents mécanismes. Elle se maintient sur *C. nodosa* grâce à la présence

d'une autre espèce de fourmis non castratrice et à une stratégie de tolérance de la part de la plante. C'est également une stratégie de tolérance de la part d'*H. myrmecophila* qui permet d'empêcher la castration totale de la plante. Enfin, il est possible que sa présence sur *H. physophora* soit autorisée par sa stratégie généraliste et par l'existence de plantes réservoirs.

Ainsi, à un genre de plantes dont quelques-unes sont myrmécophytes et un genre de fourmis toutes arboricoles – deux groupes par ailleurs peu divers – peuvent être associées des caractéristiques écologiques et évolutives très diverses, en fonction de la dynamique locale des écosystèmes. L'étude phylogénétique et biogéographique à l'échelle de l'aire de répartition des genres permettrait d'en apprendre plus sur l'apparition des adaptations au mutualisme au sein de ces genres, sur l'apparition des conflits et sur l'histoire de la gestion de ces conflits au sein des différentes associations. Il serait ainsi probable de mettre à jour des conflits propres à certaines associations et des mécanismes de contrôle originaux mais également d'éprouver sur d'autres systèmes les conclusions que nous avons tirées de cette étude sur *H. physophora* et *A. decemarticulatus*.

3.4 Explorer les variations du mutualisme tripartite

Nous avons vu que le champignon Ascomycète joue un rôle important dans l'équilibre de la balance coûts-bénéfices entre *H. physophora* et *A. decemarticulatus* et plus largement dans la survie des deux espèces via son utilisation pour la construction du piège des fourmis. Or il semble que ce champignon, ou une espèce proche soit utilisé par toutes les espèces de fourmis du genre *Allomerus* pour construire des pièges similaires (Fernandez 2007). Cependant, il existe des différences interspécifiques dans l'élaboration et l'utilisation du piège, comme nous l'avons mis en évidence entre *A. decemarticulatus* et *A. octoarticulatus*. Quelle utilisation les autres espèces font-elles du champignon ?

Il existe deux stratégies principales d'association avec les fourmis. Elles donnent naissance à différentes souches de champignon : des souches généralistes et des souches spécialistes. Les souches généralistes sont associées à différentes colonies de fourmis, voire différentes espèces, tandis que les souches spécialistes ne se retrouvent qu'au sein de quelques colonies. Par ailleurs, le champignon entretient des relations étroites avec les plantes sur lesquelles le cultivent les fourmis via des contacts intracellulaires et des échanges trophiques. L'étude génétique des champignons entre différents systèmes permettrait de savoir si le degré de spécificité de l'association avec les fourmis influence ou non les relations du champignon

avec les plantes-hôtes. De plus, il serait possible d'explorer l'éventualité de différents degrés d'association avec les plantes-hôtes.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aanen D.K., Ross V.I.D., de Fine Licht H.H., Mitchell J., de Beer Z.W., Slippers B., Rouland-Lefèvre C. & Boomsma J.J. (2007). Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and *Termitomyces* symbionts in South Africa. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 115.
- Adler L.S. & Bronstein J.L. (2004). Attracting antagonists: does floral nectar increase leaf herbivory? *Ecology*, 85, 1519-1526.
- Altshuler D.L. (1999). Novel interactions of non-pollinating ants with pollinators and fruit consumers on a tropical forest. *Oecologia*, 119, 600-606.
- Anderson B., Olivieri I., Lourmas M. & Stewart B.A. (2004). Comparative population genetic structures and local adaptation of two mutualists. *Evolution*, 58, 1730-1747.
- Andersson S. (2000). The cost of flowers in *Nigella degenii* inferred from flower and perianth removal experiments. *International Journal of Plant Sciences*, 161, 903-908.
- Arista M., Oliveira P.E., Gibbs P.E. & Talavera S. (1997). Pollination and breeding system of two co-occurring *Hirtella* species (Chrysobalanaceae) in Central Brazil. *Botanica Acta*, 110, 496-502.
- Atkinson B. & Therneau T. (2009). kinship: mixed-effects Cox models, sparse matrices, and modeling data from large pedigrees. In.
- Axelrod R. & Hamilton W.D. (1981). The evolution of cooperation. *Science*, 211, 1390-196.
- Baird A.H., Bhagooli R., Ralph P.J. & Takahashi S. (2009). Coral bleaching: the role of the host. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 16-20.
- Baker A.C. (2001). Reef corals bleach to survive change. *Nature*, 411, 765-766.
- Bao T. & Addicott J.F. (1998). Cheating in mutualism: defection of *Yucca baccata* against its yucca moths. *Ecology Letters*, 1, 155-159.
- Bates D. & Maechler M. (2009). lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. In.
- Bawa K.S. (1990). Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21, 399-422.
- Bawa K.S. & Webb C.J. (1984). Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees - implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *American Journal of Botany*, 71, 736-751.
- Beattie A.J. (1985). *The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Beattie A.J. & Hughes L. (2002). Ant-plant interactions. In: *Plant-animal interactions: an evolutionary approach* (eds. Herrera CM & O P). Blackwell. Oxford, UK. pp. 211-235.

- Beattie A.J., Turnbull C., Hough T., Jobson S. & Knox R.B. (1985). The vulnerability of pollen and fungal spores to ant secretions: evidence and some evolutionary implications. *American Journal of Botany*, 72, 606-614.
- Beattie A.J., Turnbull C., Knox R.B. & Williams E.G. (1984). Ant inhibition of pollen function: a possible reason why ant pollination is rare. *American Journal of Botany*, 71, 421-426.
- Beja-Pereira A., Luikart G., England P.R., Bradley D.G., Oliver C.J., Bertorelle G., Chamberlain A.T., Nunes T.P., Metodiev S., Ferrand N., *et al.* (2003). Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nature Genetics*, 35, 311-313.
- Best A., White A. & Boots M. (2009). Resistance is futile but tolerance can explain why parasites do not always castrate their hosts. *Evolution*, 64, 348-357.
- Blattner F.R., Weising K., Bänfer G., Maschwitz U. & Fiala B. (2001). Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19, 331-344.
- Blüthgen N., Verhaagh M., Goitia W., Jaffé K., Morawetz W. & Barthlott W. (2000). How plants shape the ant community in the Amazonian rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. *Oecologia*, 125, 229.
- Blüthgen N. & Wesenberg J. (2001). Ants induce domatia in a rian forest tree (*Vochysia vismiaefolia*). *Biotropica*, 33, 637-642.
- Bonds M.H. (2006). Host life-history strategy explains pathogen-induced sterility. *American Naturalist*, 168, 281-293.
- Boots M. & Sasaki A. (1999). 'Small worlds' and the evolution of virulence: infection occurs locally and at a distance. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 266, 1933-1938.
- Boraas M.E., Seale D.B. & Boxhorn J.E. (1998). Phagotrophy by a flagellate selects for colonial prey: a possible origin of multicellularity. *Evolutionary Ecology*, 12, 153-164.
- Bronstein J.L. (1994). Our current understanding of mutualism. *Quarterly Review of Biology*, 69, 31-51.
- Bronstein J.L. (1998). The contribution of ant-plant protection studies to our understanding of mutualism. *Biotropica*, 30, 150-161.
- Bronstein J.L. (2001a). The costs of mutualism. *American Zoologist*, 41, 825-839.
- Bronstein J.L. (2001b). The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters*, 4, 277-287.

- Bronstein J.L., Wilson W.G. & Morris W.F. (2003). Ecological Dynamics of Mutualist/Antagonist Communities. *American Naturalist*, 162, S24-S39.
- Brouat C., Garcia N., Andary C. & McKey D. (2001). Plant lock and ant key: pairwise coevolution of an exclusion filter in an ant-plant mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London*, 268, 2131-2141.
- Bruna E.M., Vasconcelos H.L. & Heredia S. (2005). The effect of habitat fragmentation on communities of mutualists: Amazonian ants and their host plants. *Biological Conservation*, 124, 209-216.
- Bshary R. (2010). Cooperation between unrelated individuals - a game theoretic approach. In: *Animal behaviour: evolution and mechanisms* (ed. Kappeler P). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp. 213-240.
- Bshary R. & Bergmüller R. (2008). Distinguishing four fundamental approaches to the evolution of helping. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 405-420.
- Bull J.J. & Rice W.R. (1991). Distinguishing mechanisms for the evolution of co-operation. *Journal of Theoretical Biology*, 149, 63-74.
- Bullock S.H. (1985). Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica*, 17, 287-301.
- Charlesworth D. & Charlesworth B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 237-268.
- Claessen D. & de Roos A.M. (1995). Evolution of virulence in a host-pathogen system with local pathogen transmission. *Oikos*, 74, 401-403.
- Clark D.B. & Clark D.A. (1989). The role of physical damage in the seedling mortality regime of a Neotropical rain forest. *Oikos*, 55, 225-230.
- Clark D.B. & Clark D.A. (1991). The impact of physical damage on canopy tree regeneration in tropical rain forest. *Journal of Ecology*, 79, 447-457.
- Connor R. (1995). The benefits of mutualism: a conceptual framework. *Biological reviews*, 70, 427-457.
- Coulon A., Fitzpatrick J.W., Bowman R., Stith B.M., Makarewicz A., Stenzler L.M. & Lovette I.J. (2008). Congruent population structure inferred from dispersal behaviour and intensive genetic surveys of the threatened Florida scrub-jay (*Aphelocoma coerulescens*). *Molecular Ecology*, 17, 1685-1701.
- Cox D.R. (1972). Regression models and life-tables. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 34, 187-220.

- Crane P.R., Friis E.M. & Pedersen K.R. (1995). The origin and early diversification of angiosperms. *Nature*, 374, 27-33.
- Cruden R.W. (1977). Pollen-Ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31, 32-46.
- Currie C.R. (2001). Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia*, 128, 99-106.
- Currie C.R., Bot A.N.M. & Boomsma J.J. (2003). Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos*, 101, 91-102.
- Cushman J.H. & Addicott J.F. (1991). Conditional interactions in ant-plant-herbivore mutualisms. In: *Ant-plant interactions* (eds. Huxley CR & Cutler DF). Oxford University Press. Oxford, UK. pp. 92-103.
- Darwin C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray. London, UK.
- Darwin C. (1871). *The descent of man and selection in relation to sex*. John Murray. London, UK.
- Darwin C. (1895). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray. London, UK.
- David P., Pujol B., Viard F., Castella V. & Goudet J. (2007). Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, 16, 2474-2487.
- Davidson D.W. & McKey D. (1993). The evolutionary ecology of symbiotic ant-plant relationships. *Journal of Hymenoptera Research*, 2, 13-83.
- Debout G.D.G., Dalecky A., Ngomi A. & McKey D. (2009). Dynamics of species coexistence: maintenance of a plant-ant competitive metacommunity. *Oikos*, 118, 873-884.
- Debout G.D.G., Pereyra R., Emerson B.C. & Yu D.W. (2006). Characterization of polymorphic microsatellites in the castration parasite plant-ant *Allomerus octoarticulatus* cf. *demerarae* (Formicidae: Myrmicinae). *Molecular Ecology Notes*, 6, 182-184.
- Defosse E., Selosse M.-A., Dubois M.-P., Mondolot L., Faccio A., Djieto-Lordon C., McKey D. & Blatrix R. (2009). Ants-plants and fungi: a new threeway symbiosis. *New Phytologist*, 182, 942-949.
- Dejean A., Solano P.-J., Ayroles J., Corbara B. & Orivel J. (2005). Arboreal ants build traps to capture prey. *Nature*, 434, 973.

- Dejean A., Solano P.-J., Belin-Depoux M., Cerdan P. & Corbara B. (2001). Predatory behavior of patrolling *Allomerus decemarticulatus* workers (Formicidae; Myrmicinae) on their host plant. *Sociobiology*, 37, 571-578.
- Di Fiore A. & Rendall D. (1994). Evolution of social organization: a reappraisal for primates by using phylogenetic methods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 9941-9945.
- Dillehay T.D., Rossen J., Andres T.C. & Williams D.E. (2007). Preceramic adoption of peanut, squash, and cotton in northern Peru. *Science*, 316, 1890-1893.
- Djieto-Lordon C., Dejean A., Ring R.A., Nkongmeneck B.A., Lauga J. & McKey D. (2005). Ecology of an improbable association: the pseudomyrmecine plant-ant *Tertaponera tessmanni* and the myrmecophytic liana *Vitex thyriflora* (Lamiaceae) in Cameroon. *Biotropica*, 37, 421-430.
- Douglas A.E. (2008). Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist*, 177, 849-858.
- Douglas A.E. (2010). *The symbiotic habit*. Princeton University Press. Princeton and Oxford.
- Dussutour A. & Simpson S.J. (2009). Communal nutrition in ants. *Current Biology*, 19, 740-744.
- Dybdahl M.F. & Storfer A. (2003). Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 523-530.
- Easdale T.A., Healey J.R., Gray H.R. & Malizia A. (2007). Tree life histories in a montane subtropical forest: species differ independently by shade-tolerance, turnover rate and substrate preference. *Journal of Ecology*, 95, 1234-1249.
- Ebert D., Carius H.J., Little T. & Decaestecker E. (2004). The evolution of virulence when parasites cause host castration and gigantism. *American Naturalist*, 164, S19-S32.
- Edwards D.P. (2009). The roles of tolerance in the evolution, maintenance and breakdown of mutualism. *Naturwissenschaften*, 96, 1137-1145.
- Edwards D.P., Ansell F.A., Woodcock P., Fayle T.M., Chey V.K. & Hamer K.C. (2010). Can the failure to punish promote cheating in mutualism? *Oikos*, 119, 45-52.
- Edwards D.P., Hassall M., Sutherland W.J. & Yu D.W. (2006). Selection for protection in an ant-plant mutualism: host sanctions, host modularity, and the principal-agent game. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 273, 595-602.
- Edwards D.P. & Yu D.W. (2008). Tolerating castration by hiding flowers in plain sight. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63, 95-102.

- Elias T.S. (1983). Extra-floral nectaries: their structure and distribution. In: *The biology of nectaries* (eds. Bentley B & Elias TS). Columbia University Press. New York. pp. 174-203.
- Embley T.M. & Martin W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*, 440, 623-630.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- Ewald P.W. (1987). Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 506, 295-306.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005). ARLEQUIN v. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Faegri K. & van der Pijl L. (1979). *The principles of pollination ecology*. 3rd edn. Pergamon Press. New York, USA.
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567.
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7, 574-578.
- Farrell B.D., Sequeira A.S., O'Meara B.C., Normark B.B., Chung J.H. & Jordal B.H. (2001). The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scotylinae and Platypodinae). *Evolution*, 55, 2011-2027.
- Feldhaar H., Fiala B., bin Hashim R. & Maschwitz U. (2000). Maintaining an ant-plant symbiosis: secondary polygyny in the *Macaranga triloba*-*Crematogaster* sp. association. *Naturwissenschaften*, 87, 408-411.
- Feldhaar H., Fiala B., Hashim R.B. & Maschwitz U. (2003). Patterns of the *Crematogaster*-*Macaranga* sp. association: the ant partner makes the difference. *Insectes Sociaux*, 50, 9-19.
- Fenster C.B., Ambruster W.S., Wilson P., Dudash M.R. & Thompson J.D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 35, 375-403.

- Fernandez F. (2007). The myrmicine ant genus *Allomerus* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). *Caldasia*, 29, 159-175.
- Ferreira L.V. & Prance G.T. (1998). Species richness and floristic composition in four hectares in the Jaú National Park in upland forests in Central Amazonia. *Biodiversity and Conservation*, 7, 1349-1364.
- Fonseca C.R. (1993). Nesting space limits colony size of the plant-ant *Pseudomyrmex concolor*. *Oikos*, 67, 473-482.
- Fonseca C.R. (1999). Amazonian ant-plant interactions and the nesting space limitation hypothesis. *J. Trop. Ecol.*, 15, 807-825.
- Foster K.R. & Wenseelers T. (2006). A general model for the evolution of mutualisms. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1283-1293.
- Fournier D., Foucaud J., Loiseau A., Cros-Arteil S., Jourdan H., Orivel J., Le Breton J., Chazeau J., Dejean A., Keller L., *et al.* (2005). Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the invasive ant *Wasmannia auropunctata*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 239-242.
- Frank S. (1994). Genetics of mutualism: the evolution of altruism between species. *Journal of Theoretical Biology*, 170, 393-400.
- Frank S.A. (1989). The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist*, 133, 345-376.
- Frederickson M.E. (2009). Conflict over Reproduction in an Ant-Plant Symbiosis: Why *Allomerus octoarticulatus* Ants Sterilize *Cordia nodosa* Trees. *American Naturalist*, 173, 675-681.
- Frederickson M.E., Greene M.J. & Gordon D.M. (2005). Ecology: 'Devil's gardens' bedevilled by ants. *Nature*, 437, 495-496.
- Funk V., Hollowell T., Berry P., Kelloff C. & Alexander S.N. (2007). Checklist of the plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolivar, Delta Amacuro; Guyana, Surinam, French Guiana). *Contributions from the United States National Herbarium*, 55, 1-584.
- Galen C., Sherry R.A. & Carroll A.B. (1999). Are flowers physiological sinks or faucets? Costs and correlates of water use by flowers of *Polemonium viscosum*. *Oecologia*, 118, 461-470.
- Gandon S., Capowiez Y., Dubois Y., Michalakis Y. & Olivieri I. (1996). Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 263, 1003-1009.

- Gandon S. & Michalakis Y. (2002). Local adaptation, evolutionary potential and host–parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 451-462.
- Gartner B.L. (1989). Breakage and regrowth of *Piper* species in rain forest understory. *Biotropica*, 21, 303-307.
- Gaume L. & McKey D. (1999). An ant-plant mutualism and its host-specific parasite: activity rhythms, young leaf patrolling, and effects on herbivores of two specialist plant-ants inhabiting the same myrmecophyte. *Oikos*, 84, 130-144.
- Gaume L., McKey D. & Terrin S. (1998). Ant-plant-homopteran mutualism: how the third partner affects the interaction between a plant-specialist ant and its myrmecophyte host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 265, 569-575.
- Gaume L., Zacharias M. & Borges R.M. (2005). Ant–plant conflicts and a novel case of castration parasitism in a myrmecophyte. *Evolutionary Ecology Research*, 7, 435-452.
- Ghazoul J. (2001). Can floral repellents pre-empt potential ant–plant conflicts? *Ecology Letters*, 4, 295-299.
- Gherbi H., Markmann K., Svistoonoff S., Estevan J., Autran D., Giczey G., Auguy F., Péret B., Laplaze L., Franche C., *et al.* (2008). SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 4928-4932.
- Gilchrist G. (1996). A quantitative genetic analysis of thermal sensitivity in the locomotor performance curve of *Aphidius ervi*. *Evolution*, 50, 1560-1572.
- Goodwillie C., Kalisz S. & Eckert C.G. (2005). The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 36, 47-79.
- Goudet J. (1995). FSTAT Version 1.2.: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.
- Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. In.
- Gourlet-Fleury S., Blanc L., Picard N., Sist P., Dick J., Nasi R., Swaine M.D. & Forni E. (2005). Grouping species for predicting mixed tropical forest dynamics: looking for a strategy. *Annals of Forest Science*, 62, 785-796.
- Grangier J. (2008). Stabilité évolutive d'un mutualisme plante/fourmis obligatoire et spécifique. In. Université de Toulouse Toulouse, France, p. 188.

- Grangier J., Dejean A., Malé P.-J.G. & Orivel J. (2008). Indirect defense in a highly specific ant-plant mutualism. *Naturwissenschaften*, 95, 909-916.
- Grangier J., Dejean A., Malé P.-J.G., Solano P.-J. & Orivel J. (2009). Mechanisms driving the specificity of a myrmecophyte-ant association. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97, 90-97.
- Greischar M.A. & Koskella B. (2007). A synthesis of experimental work on parasite local adaptation. *Ecology Letters*, 10, 418-434.
- Grosberg R.K. & Strathman R.R. (1998). One cell, two cell, red cell, blue cell: the persistence of a unicellular stage in multicellular life histories. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 112-116.
- Grosberg R.K. & Strathman R.R. (2007). The evolution of multicellularity: a minor major transition? *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 38, 621-654.
- Hall S.R., Becker C. & Cáceres C.E. (2007). Parasitic castration: a perspective from a model of dynamic energy budgets. *Integrative and Comparative Biology*, 47, 295-309.
- Hamilton W.D. (1964a). The genetical evolution of social behavior I. *Journal of Theoretical Biology*, 7, 1-16.
- Hamilton W.D. (1964b). The genetical evolution of social behavior II. *Journal of Theoretical Biology*, 7, 17-52.
- Hamilton W.D., Axelrod R. & Tanese R. (1990). Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 3566-3573.
- Hardy O.J. & Vekemans X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618-620.
- Heil M., Fiala B., Baumann B. & Linsenmair K.E. (2000). Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology*, 14, 749-757.
- Heil M. & McKey D. (2003). Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 425-53.
- Herre E.A., Knowlton N., Mueller U.G. & Rehner S.A. (1999). The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 49-53.

- Holleley C.E. & Geerts P. (2009). Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques*, 46, 511-517.
- Hubisz M.J., Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1322-1332.
- Huelsenbeck J.P. & Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R. & Bollback J.P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310.
- Hull D.A. & Beattie A.J. (1988). Adverse effects on pollen exposed to *Atta texana* and other North American ants: implications for ant pollination. *Oecologia*, 75, 153-155.
- Husband B.C. & Schemske D.W. (1996). Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, 50, 54-70.
- Izzo T.J. & Vasconcelos H.L. (2002). Cheating the cheater: domatia loss minimizes the effects of ant castration in an Amazonian ant-plant. *Oecologia*, 133, 200-205.
- Jaenike J. (1996). Suboptimal virulence of an insect-parasitic nematode. *Evolution*, 50, 2241-2247.
- Janzen D.H. (1966). Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution*, 20, 249-275.
- Janzen D.H. (1972). Protection of *Barteria* (Passifloraceae) by *Pachysima* ants (Pseudomyrmecinae) in a Nigerian rain forest. *Ecology*, 53 (5), 885-892.
- Janzen D.H. (1974). Epiphytic myrmecophytes in Sarawak: mutualism through the feeding of plants by ants. *Biotropica*, 6, 237-259.
- Janzen D.H. (1975). *Pseudomyrmex nigripilosa*: a parasite of a mutualism. *Science*, 188, 936-937.
- Janzen D.H. (1977). Why don't ants visit flowers? *Biotropica*, 9, 252.
- Johnson N.C., Graham J.-H. & Smith F.A. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytologist*, 135, 575-585.
- Johnson S.D. (2006). Pollinator-driven speciation in plants. In: *Ecology and evolution of flowers* (eds. Harder LD & Barrett SCH). Oxford University Press. New York, USA. pp. 295-309.
- Junker R., Chung A.Y.C. & Blüthgen N. (2007). Interaction between flowers, ants and pollinators: additional evidence for floral repellence against ants. *Ecological Research*, 22, 665-670.

- Kalbfleish J.D. & Prentice R.L. (1980). *The statistical analysis of failure time data*. John Wiley and Sons. New York, USA.
- Kaltz O. & Shykoff J.A. (1998). Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity*, 81, 361-370.
- Kay K.M. & Sargent R.D. (2009). The role of animal pollination in plant speciation: integrating ecology, geography and genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 40, 637-656.
- Kiers E.T. & van der Heijden M.G.A. (2006). Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology*, 87, 1627-1636.
- Kover P.X. (2000). Effects of parasitic castration on plant resource allocation. *Oecologia*, 123, 48-56.
- Lack A. (1978). The ecology of the flowers of the savanna tree *Maranthes polyandra* and thier visitors, with particular reference to bats. *Journal of Ecology*, 66, 287-295.
- Lanza J., Schmitt M.A. & Awad A., B (1992). Comparative chemistry of elaiosomes of three species of *Trillium*. *Journal of Chemical Ecology*, 18, 209-221.
- Leigh Jr E.G. (2010). The evolution of mutualism. *Journal of Evolutionary Biology*, 23.
- Léotard G., Defosse E., Debain C., McKey D., Kjellberg F. & Blatrix R. (2008). Local genetic co-structuring of the ant *Petalomyrmex phylax* and its host plant *Leonardoxa a. africana*: no role for a sixty meter river width in separating social forms. *Sociobiology*, 51, 363-371.
- Leroy C., Jauneau A., Quilichini A., Dejean A. & Orivel J. (2008). Comparison between the anatomical and morphological structure of leaf blades and foliar domatia in the ant-plant *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae). *Annals of Botany*, 101, 501-507.
- Leroy C., Jauneau A., Quilichini A., Dejean A. & Orivel J. (2010). Comparative structure and ontogeny of the foliar domatia in three neotropical myrmecophytes. *American Journal of Botany*, 97, 557-565.
- Leroy C., Malé P.-J.G., Lusignan L., Orivel J. & Quilichini A. (submitted). Floral biology and breeding system in the myrmecophyte *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae) in French Guiana.
- Leroy C., Sejalon-Delmas N., Jauneau A., Ruiz-González M.X., Gryta H., Jargeat P., Corbara B., Dejean A. & Orivel J. (in press). Trophic mediation by a fungus in an ant-plant mutualism. *Journal of Ecology*.

- Levins R. & Culver D. (1971). Regional coexistence of species and competition between rare species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68, 1246-1248.
- Lion S. & van Baalen M. (2008). Self-structuring in spatial evolutionary ecology. *Ecology Letters*, 11, 277-295.
- Loiselle B.A., Sork V.L., Nason J. & Graham C. (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 82, 1420-1425.
- Malausa T., Gilles A., Megléczy E., Blanquart H., Duthoy S., Costedoat C., Dubut V., Pech N., Castagnone-Sereno P., Délye C., *et al.* (submitted). High throughput microsatellites isolation with 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing.
- Malé P.-J.G., Leroy C., Dejean A., Quilichini A. & Orivel J. (submitted-a). An ant symbiont directly and indirectly limits its host plant's reproductive success.
- Malé P.-J.G., Leroy C., Roux O., Lauth J., Dejean A., Orivel J. & Quilichini A. (submitted-b). The importance of host sanctions in maintaining a low level of parasitic castration in an ant-plant mutualism.
- Malé P.-J.G., Loiseau A., Estoup A., Quilichini A. & Orivel J. (2010). Characterization of polymorphic microsatellite loci in the neotropical plant-ant *Allomerus decemarticulatus* (Formicidae: Myrmicinae) and multiplexing with other microsatellites from the ant subfamily Myrmicinae. *European Journal of Entomology*, 107, 673-675.
- Margulis L. & Schwartz K.V. (1998). *Five kingdoms: an illustrated guide to the Phyla of life on earth*. Freeman. New York, NY (USA).
- Marquis R.J. (1988). Phenological variation in the neotropical understory shrub *Piper arieinum*: causes and consequences. *Ecology*, 69, 1552-1565.
- Martins D.J. (2009). Pollination and facultative ant-association in the African leopard orchid *Ansellia africana*. *Journal of East African Natural History*, 98, 67-77.
- Maschwitz U. & Hölldobler B. (1970). Der kartonnestbau bei *Lasius fuliginosus* Latr. (Hym. Formicidae). *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 66, 176-189.
- Mayer V.E. & Voglmayr H. (2009). Mycelial carton galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) as a multi-species network. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 276, 3265-3273.
- McCall A.C. & Irwin R.E. (2006). Florivory: the intersection of pollination and herbivory. *Ecology Letters*, 9, 1351-1365.

- McCormac F.G., Hogg A.G., Blackwell P.G., Buck C.E., Higham T.F.G. & Reimer P.J. (2004). SHCal04 Southern Hemisphere calibration 0-11.0 cal kyr BP. *Radiocarbon*, 46, 1087-1092.
- McKey D. (1974). Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist*, 108, 305-320.
- McKey D. & Davidson D. (1993). Ant-plant symbioses in Africa and the Neotropics: history, biogeography, and diversity. In: *Biological relationships between Africa and South America* (ed. Goldblatt P). Yale University Press. pp. 568-606.
- Megléczy E., Costedoat C., Dubut V., Gilles A., Malausa T., Pech N. & Martin J.-F. (2010). QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26, 403-404.
- Mikheyev A.S., Mueller U.G. & Abbot P. (2010). Comparative dating of Attine ant and Lepiotaceous cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord. *American Naturalist*, 175, E126-E133.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Almány G.R., De Arruda M.P., Arthofer W., Atallah Z.K., Beissinger S.R., Berumen M.L., Bogdanowicz S.M., Brown S.D., Bruford M.W., *et al.* (2009). Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 May 2009–31 July 2009. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1460-1466.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Andris M., Aradottir G.I., Arnau G., Audzijonyte A., Bess E.C., Bonadonna F., Bourdel G., Bried J., Bugbee G.J., *et al.* (2010). Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 June 2010 – 31 July 2010. *Molecular Ecology Resources*, 10, 1106-1108.
- Moreau C.S., Bell C.D., Vila R., Archibald S.B. & Pierce N.E. (2006). Phylogeny of the ants: diversification in the age of angiosperms. *Science*, 312, 101-104.
- Mueller U.G., Gerardo N.M., Aanen D.K., Six D.L. & Schultz T.R. (2005). The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 36, 563-595.
- Nascimento H.E.M., Laurance W.F., Condit R., Laurance S.G., D'Angelo S. & Andrade A.C. (2005). Demographic and life-history correlates. *Journal of Vegetable Science*, 16, 625-634.

- Neal P.R., Dafni A. & Giurfa M. (1998). Floral symmetry and its role in plant-pollinator system: terminology, distribution, and hypotheses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 345-373.
- Nedelcu A.M. & Michod R.E. (2006). The evolutionary origin of an altruism gene. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 1460-1464.
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. 2nd edn. New York.
- Ness J.H. (2006). A mutualism's indirect costs: the most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos*, 113, 506-514.
- Nicklen E.F. & Wagner D. (2006). Conflict resolution in an ant-plant interaction: *Acacia constricta* traits reduce ant costs to reproduction. *Oikos*, 113, 506-514.
- Noë R. & Hammerstein P. (1994). Biologica markets: supply and demand determine the effect of partner choice in cooperation, mutualism and mating. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 35, 1-11.
- Nuismer S.L., Thompson J.N. & Gomulkiewicz R. (1999). Gene flow and geographically structured coevolution. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 266, 605-609.
- Nydal R. & Lovseth K. (1983). Tracing bomb ^{14}C in the atmosphere 1962-1980. *Journal of Geophysical Research*, 88, 3621-3642.
- O'Keefe K.J. & Antonovics J. (2002). Playing by different rules: the evolution of virulence in sterilizing pathogens. *American Naturalist*, 159, 597-605.
- O'Neil P. (1997). Natural selection on genetically correlated phenological characters in *Lythrium salicaria* (Lythraceae). *Evolution*, 51, 267-274.
- Obeso J.R. (2002). The cost of reproduction in plants. *New Phytologist*, 155, 321-348.
- Oliveira P.S. (1997). The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology*, 11, 323-330.
- Oliver T.H., Leather S.R. & Cook J.M. (2009). Tolerance traits and the stability of mutualism. *Oikos*, 118, 346-352.
- Orivel J., Lamb L., Malé P.-J.G., Leroy C., Grangier J., Otto T., Quilichini A. & Dejean A. (2010). Dynamics of the association between a long-lived understory myrmecophyte and its specific associated ants. *Oecologia*.
- Orivel J. & Leroy C. (2010). The diversity and ecology of ant gardens (Hymenoptera: Formicidae; Spermatophyta: Angiospermae). *Myrmecological News*, 14.

- Pacini E., Nepi M. & Vesprini J.L. (2003). Nectar biodiversity: a short review *Plant Systematics and Evolution*, 238, 7-21.
- Palmer T.M., Doak D.F., Stanton M.L., Bronstein J.L., Kiers E.T., Young T.P., Goheen J.R. & Pringle R.M. (2010). Synergy of multiple partners, including freeloaders, increases host fitness in a multispecies mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 17234-17239.
- Palmer T.M., Stanton M.L. & Young T.P. (2003). Competition and coexistence: exploring mechanisms that restrict and maintain diversity within mutualist guilds. *American Naturalist*, 162.
- Paulino-Netto H.F. (2007). Pollination and breeding system of *Couepia uiti* (Mart. and Zucc.) Benth (Crysobalanaceae) in the Pantanal de Nhecolândia. *Brazil Journal of Biology*, 67, 715-719.
- Peakall R. & Smouse P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Populations genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D. & the R Core Team (2009). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. In.
- Poulin R. (1998). Large-scale patterns of host use by parasites of freshwater fishes. *Ecology Letters*, 1, 118-128.
- Poulsen M. & Currie C.R. (2009). On ants, plants and fungi. *New Phytologist*, 182, 785-788.
- Poulsen M. & Currie C.R. (2010). Symbiont interactions in a tripartite mutualism: exploring the presence and impact of antagonism between two fungus-growing ant mutualists. *PLoS one*, 5, e8748.
- Prance G.T. (1972). Monograph of the Chrysobalanaceae. *Flora Neotropica*, 9, 1-410.
- Prance G.T. & Sothers C.A. (2003). *Species plantarum: flora of the world. Part 9. Chrysobalanaceae I. Chrysobalanus to Parinari*. Australian Biological Resources Study. Canberra, Australia.
- Prance G.T. & White F. (1988). The genera of Chrysobalanaceae: a study in practical and theoretical taxonomy and its relevance to evolutionary biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 320, 1-184.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 164, 1567-1587.
- Pyke G.H. (1991). What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature*, 350, 58-59.
- R Development Core Team (2009). R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: (ed. Computing RfFS) Vienna, Austria.

- Raine N.E., Willmer P. & Stone G.N. (2002). Spatial structuring and floral avoidance behavior prevent ant-pollinators conflict in a mexican ant-acacia. *Ecology*, 83, 3086-3096.
- Rankin D.J., Bargum K. & Kokko H. (2007). The tragedy of the commons in evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 643-651.
- Rathcke B. & Lacey E.P. (1985). Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 179-214.
- Raymond M. & Rousset F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Rico-Gray V. & Oliveira P.S. (2007). *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. The University of Chicago Press. Chicago and London.
- Rohfritsch O. (2008). Plants, gall midges, and fungi: a three component system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128, 208-216.
- Romero G.Q. & Izzo T.J. (2004). Leaf damage induces ant recruitment in the Amazonian ant-plant *Hirtella myrmecophila*. *Journal of Tropical Ecology*, 20, 675-682.
- Rousset F. (2008). Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- Ruiz-González M.X., Malé P.-J.G., Leroy C., Dejean A., Gryta H., Jargeat P., Quilichini A. & Orivel J. (2010). Specific, non-nutritional association between an Ascomycete fungus and *Allomerus* plant-ants. *Biology Letters*.
- Sachs J.L., Mueller U.G., Wilcox T.P. & Bull J.J. (2004). The evolution of cooperation. *The Quarterly Review of Biology*, 79, 135-160.
- Sachs J.L. & Simms E.L. (2006). Pathways to mutualism breakdown. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 585-592.
- Sage T.L., Griffin S.R., Pontieri V., Drobac P., Cole W.W. & Barrett S.C.H. (2001). Stigmatic self-incompatibility and mating patterns in *Trillium grandiflorum* and *Trillium erectum* (Melanthiaceae). *Annals of Botany*, 88, 829-841.
- Sargent R.D. (2004). Floral symmetry affects speciation rates in Angiosperms. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 271, 603-608.
- Schlick-Steiner B.C., Steiner F.M., Konrad H., Seifert B., Christian E., Moder K., Stauffer C. & Crozier R.H. (2008). Specificity and transmission mosaic of ant nest-wall fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 940-943.
- Schmitz J. & Moritz R.F.A. (1998). Molecular phylogeny of Vespidae (Hymenoptera) and the evolution of sociality in wasps. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9, 183-191.

- Schopf J.W. (1993). Microfossils of the early archean apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, 260, 640-646.
- Schultz T.R. & Brady S.G. (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 5435-5440.
- Seavey S.R. & Bawa K.S. (1986). Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *Botanical Review*, 52, 195-219.
- Shenoy M. & Borges R.M. (2008). A novel mutualism between an ant-plant and its resident pollinator. *Naturwissenschaften*, 95, 61-65.
- Solano P.-J. & Dejean A. (2004). Ant-fed plants: comparison between three geophytic myrmecophytes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83, 433-439.
- Solano P.-J., Durou S., Corbara B., Quilichini A., Cerdan P., Belin-Dupoux M., Delabie J.H.C. & Dejean A. (2003). Myrmecophytes of the understory of French Guianian rainforests: their distribution and their associated ants. *Sociobiology*, 41, 605-614.
- Stanton M., Palmer T.M., Young T.P., Evans A. & Turner M.L. (1999). Sterilization and canopy modification of a swollen thorn acacia tree by a plant-ant. *Nature*, 401, 578-581.
- Stanton M.L. (2003). Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *American Naturalist*, 162, 10-23.
- Stephenson A.G. (1981). Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 12, 253-279.
- Stuiver M. & Becker B. (1986). High-precision decadal calibration of the radiocarbon time scale, AD 1950-2500 BC. *Radiocarbon*, 28, 863-910.
- Szilágyi A., Scheuring I., Edwards D.P., Orivel J. & Yu D.W. (2009). The evolution of intermediate castration virulence and ant coexistence in a spatially structured environment. *Ecology Letters*, 12, 1306-1316.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Therneau T. & Lumley T. (2009). survival: Survival analysis, including penalised likelihood. In.
- Thompson A.R., Thacker C.E. & Shaw E.Y. (2005). Phylogeography of marine mutualists: parallel patterns of genetic structure between obligate goby and shrimp partners. *Molecular Ecology*, 14, 3557-3572.

- Thompson J.N. (2005). *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press. Chicago, US.
- Tilman D. (1994). Competition and biodiversity in spatially structured habitats. *Ecology*, 75, 2-16.
- Tsuji K., Hasyim A., Nakamura H. & Nakamura K. (2004). Asian weaver ants, *Oecophylla smaragdina*, and their repelling of pollinators. *Ecological Research*, 19, 669-673.
- van Baalen M. (2002). Contact networks and the evolution of virulence. In: *Adaptive dynamics of infectious diseases: in pursuit of virulence management* (eds. Dieckmann U, Metz JAJ, Sabelis MW & Sigmund K). Cambridge University Press. pp. 85-103.
- van Beneden P.-J. (1875). *Les commensaux et les parasites dans le règne animal*. Baillière, G. Paris, France.
- van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M. & Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- Vasconcelos H.L. & Davidson D.W. (2000). Relationship between plant size and ant associates in two Amazonian ant-plants. *Biotropica*, 32, 100-111.
- Vieira S., Trumbore S., Camargo P.B., Selhorst D., Chambers J.Q., Higuchi N. & Martinelli L.A. (2005). Slow growth rates of Amazonian trees: consequences for carbon cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 18502-18507.
- Wagner D. (2000). Pollen viability reduction as a potential cost of ant association for *Acacia constricta* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 87, 711-715.
- Wang J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*, 166, 1963-1979.
- Ward M., Dick C.W., Gribel R. & Lowe A.J. (2005). To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*, 95, 246-254.
- Watson M.A. (1984). Developmental constraints: effect on population growth and patterns of resource allocation in a clonal plant. *American Naturalist*, 123, 411-426.
- Weber N.A. & 1966 (1966). Fungus-growing ants. *Science*, 153, 587-604.
- West S.A., Kiers E.T., Simms E.L. & Denison R.F. (2002). Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 269, 685-694.
- Weyl E.G., Frederickson M.E., Yu D.W. & Pierce N.E. (2010). Economic contract theory tests models of mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 15712-15716.

- Wilkinson D.M. (1997). The role of seed dispersal in the evolution of mycorrhizae. *Oikos*, 78, 394-396.
- Wilkinson D.M. & Sherratt T.N. (2001). Horizontally acquired mutualisms, an unsolved problem in ecology? *Oikos*, 92, 377-384.
- Willmer P.G., Nuttman C.V., Raine N.E., Stone G.N., Patrick J.G., Henson K., Stillman P., McIlroy L., Potts S.G. & Knudsen J.T. (2009). Floral volatiles controlling ant behavior. *Functional Ecology*, 23, 888-900.
- Willmer P.G. & Stone G.N. (1997). How aggressive ant guards assist seed-set in *Acacia* flowers. *Nature*, 388, 165-167.
- Wilson E.O. (1971). *The insect societies*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Wilson E.O. & Hölldobler B. (2005). The rise of ants: a phylogenetic and ecological explanation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 7411-7414.
- Wyatt R. (1980). The impact of nectar-robbing ants on the pollination system of *Asclepias curassavica*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 107, 24-28.
- Young T.P., Stubblefield C.H. & Isabell L.A. (1997). Ants on swollen-thorn acacias: species coexistence in a simple system. *Oecologia*, 109, 98-107.
- Yu D.W. (2001). Parasites of mutualisms. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72, 529-546.
- Yu D.W. & Pierce N.E. (1998). A castration parasite of an ant-plant mutualism. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 265, 375-382.
- Yu D.W., Wilson H.B. & Pierce N.E. (2001). An empirical model of species coexistence in a spatially structured environment. *Ecology*, 82, 1761-1771.
- Zeileis A. & Hothorn T. (2002). Diagnostic checking in regression relationships. *R News*, 2, 7-10.

ANNEXE

Article 10 : High throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries.

Molecular Ecology Resources (2010) accepté

Thibaut Malausa¹, André Gilles², Emese Megléc², Hélène Blanquart³, Stéphanie Duthoy³, Caroline Costedoat², Vincent Dubut², Nicolas Pech², Philippe Castagnone-Sereno⁴, Christophe Délye⁴, Nicolas Feau⁵, Pascal Frey⁶, Philippe Gauthier⁷, Thomas Guillemaud⁵, Laurent Hazard⁸, Valérie Le Corre⁴, Brigitte Lung-Escarmant⁵, Pierre-Jean G. Malé⁶, Stéphanie Ferreira³ & Jean-François Martin⁷

¹ INRA, UMR 1301 IBSV INRA/UNSA/CNRS, 400 route des Chappes, BP 167, 06903 Sophia-Antipolis Cedex, France.

² Aix-Marseille Université, CNRS, IRD, UMR 6116 – IMEP, Equipe Evolution Génome Environnement, Centre Saint-Charles, Case 36, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille Cedex 3, France

³ Genoscreen, Genomic Platform and R&D, Campus de l'Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, Bâtiment Guérin. 59000 Lille, France.

⁴ INRA, UMR1210 Biologie et Gestion des Adventices, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France

⁵ INRA, UMR 1202 BIOGECO, Equipe de Pathologie forestière, Domaine de Pierroton, 69 route d'Arcachon, 33612 Cestas cedex, France.

⁶ INRA, Nancy-Université, UMR1136, Interactions Arbres - Microorganismes, IFR 110, F-54280 Champenoux, France.

⁷ UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro), Campus international de Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez cedex, France

⁸ INRA - UMR 1248 AGIR. BP 52627. 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

⁹ UMR Evolution et Diversité Biologique (Université Toulouse III; CNRS), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX

Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries

Thibaut Malausa^{1§}, André Gilles², Emese Megléc², Hélène Blanquart³, Stéphanie Duthoy³,
Caroline Costedoat², Vincent Dubut², Nicolas Pech², Philippe Castagnone-Sereno¹,
Christophe Délye⁴, Nicolas Feau⁵, Pascal Frey⁶, Philippe Gauthier⁷, Thomas Guillemaud¹,
Laurent Hazard⁸, Valérie Le Corre⁴, Brigitte Lung-Escarmant⁵, Pierre-Jean G. Malé⁹,
Stéphanie Ferreira³ & Jean-François Martin⁷

¹ INRA, UMR 1301 IBSV INRA/UNSA/CNRS, 400 route des Chappes, BP 167, 06903
Sophia-Antipolis Cedex, France.

² Aix-Marseille Université, CNRS, IRD, UMR 6116 – IMEP, Equipe Evolution Génome
Environnement, Centre Saint-Charles, Case 36, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille
Cedex 3, France

³ Genoscreen, Genomic Platform and R&D, Campus de l'Institut Pasteur, 1 rue du Professeur
Calmette, Bâtiment Guérin. 59000 Lille, France.

⁴ INRA, UMR1210 Biologie et Gestion des Adventices, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France

⁵ INRA, UMR 1202 BIOGECO, Equipe de Pathologie forestière, Domaine de Pierroton, 69
route d'Arcachon, 33612 Cestas cedex, France.

⁶ INRA, Nancy-Université, UMR1136, Interactions Arbres - Microorganismes, IFR 110, F-
54280 Champenoux, France.

⁷ UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro), Campus international de
Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez cedex, France

⁸ INRA - UMR 1248 AGIR. BP 52627. 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

⁹ UMR Evolution et Diversité Biologique (Université Toulouse III; CNRS), 118 route de
Narbonne, F-31062 Toulouse, France

§ Corresponding author

Keywords: microsatellite isolation, genetic marker, enriched library, genotyping, Next-
Generation sequencing, pyrosequencing, primer design

Word count:

Abstract = 173

Text = 4240

59 **Abstract**

60 Microsatellites (or SSR: simple sequence repeat) are among the most frequently used DNA
61 markers in many areas of research. The use of microsatellite markers is limited by the
62 difficulties involved in their de novo isolation from species for which no genomic resources
63 are available. We describe here a high-throughput method for isolating microsatellite markers
64 based on coupling multiplex microsatellite enrichment and Next-Generation Sequencing on
65 454 GS-FLX Titanium platforms. The procedure was calibrated on a model species (*Apis*
66 *mellifera*) and validated on 13 other species from various taxonomic groups (animals, plants,
67 fungi), including taxa for which severe difficulties were previously encountered using
68 traditional methods. We obtained from 11,497 to 34,483 sequences depending on the species
69 and the number of detected microsatellite loci ranged from 199 to 5,791. We thus
70 demonstrated that this procedure can be readily and successfully applied to a large variety of
71 taxonomic groups, at much lower cost than would have been possible with traditional
72 protocols. This method is expected to speed up the acquisition of high-quality genetic markers
73 for non-model organisms.

74

75 **Introduction**

76

77 Microsatellites (or SSR: simple sequence repeat) are among the most frequently used DNA
78 markers in many areas of research (Sunnucks 2000). However, their availability and quality
79 are limited by the difficulties of *de novo* development in species for which no genomic
80 information is available. The most commonly used procedure (enrichment of genomic DNA
81 in microsatellite motifs, cloning and sequencing of the enriched DNA library by the Sanger
82 method) is difficult, time-consuming and costly. Enrichment methods generally use a few
83 specific repeated motifs, generally selected without prior knowledge of their abundance in the
84 genome (Castoe *et al.* 2009), hence introducing potential bias in genome representativeness.
85 Furthermore, only a few hundred sequences are generally obtained because of the high cost of
86 Sanger sequencing. Next-Generation sequencing through 454 GS-FLX technology (Roche
87 Applied Science) has opened up new opportunities for microsatellite isolation. First, large
88 shotgun genomic libraries have proved sufficient to isolate a satisfactory number of markers
89 in a few studies (Abdelkrin *et al.* 2009; Allentoft *et al.* 2009; Castoe *et al.* 2009). Second, 454
90 GS-FLX sequencing can be used to sequence enriched library, thus offering a higher cost-
91 efficiency (Santana *et al.* 2009). However, the use of hypersequencing applied to
92 microsatellite isolation has remained rare. This situation could evolve quickly if new
93 procedures taking profit of last hypersequencing technology updates (sequencing longer and
94 more numerous DNA fragments) and easily accessible for research teams could be set up. We
95 present here a new method for high-throughput microsatellite isolation combining DNA
96 enrichment procedures with the use of multiplexed microsatellite probes and the recent update
97 Titanium of the 454 GS-FLX technology. This method was initially developed in the model
98 species *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) [Insecta: Hymenoptera: Apidae], a species with a
99 genome particularly rich in microsatellites (Solignac *et al.* 2007). Its efficiency was

100 subsequently assessed and validated with 13 other species from various taxonomic groups,
101 including fungi, plants and animals. This procedure is now available on our platform (Lille,
102 France) for any research team interested in rapid and low-cost development of wide SSR
103 libraries..

104 **Methods**

105

106 *Construction and sequencing of multiplex-enriched libraries*

107 An optimisation of classical biotin-enrichment methods (Kijas et al. 1994) was used to
108 prepare the enriched libraries. Genomic DNA was extracted from various tissues (depending
109 on the species), with the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) and the DNeasy Plant Mini Kit
110 (QIAGEN). Enrichment was carried out at Genoscreen (Lille, France), according to the
111 following procedure. Genomic DNA (1 µg) was sonicated or digested with RsaI
112 (FERMENTAS) for 1 hour at 37°C, according to the manufacturer's recommendations, and
113 was then ligated to standard adapters (Adap-F: GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC and
114 Adap-R: GATTCTGCTAGCTAGGCCTT). This step was repeated until the average length of
115 DNA fragment was <1500 bp. Samples were then purified on a Nucleofast PCR plate
116 (MACHEREY-NAGEL). Eight biotin-labelled oligonucleotides, corresponding to eight
117 targeted microsatellite motifs, were hybridised to the ligated DNA at 56°C for 20 minutes,
118 after initial denaturation of the ligated DNA. The choice of the targeted microsatellite motifs
119 was based on the screening of thirteen published genome sequences or whole-genome
120 shotgun (WGS) sequences (insects: *Apis mellifera*, *Anopheles gambiae*, *Drosophila*
121 *melanogaster*, *D. yakuba*, *D. simulans*, *Bombyx mori*, *Tribolium castaneum*; Vertebrates:
122 *Takifugu rubripes*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*).
123 All perfect microsatellites with at least five repetitions for all di-hexa motifs were extracted.
124 We then identified the 12 most frequent motifs for each genome (Supplementary data, Table

125 1). From this pool of 30 motifs, we selected eight. This selection was based on (i) motif
126 frequencies in different genomes, (ii) melting temperature compatibility (56°C). At the same
127 time, we avoided using motifs likely to produce hairpin structures, even if highly frequent
128 (e.g. AT, CG, and AAT). The following eight probes were designed to enrich total DNA in
129 these motifs: (AG)₁₀, (AC)₁₀, (AAC)₈, (AGG)₈, (ACG)₈, (AAG)₈, (ACAT)₆, (ATCT)₆.

130 The enrichment step was completed with Dynabeads (INVITROGEN). The resulting enriched
131 DNA was amplified with primers corresponding to the library adapters, over 25 cycles (20 s
132 at 95°C, 20 s at 60°C and 90 s at 72°C) and a final extension step of 30 min at 72°C. The PCR
133 products were purified with a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN).

134 The sample concentration of purified PCR products was determined by quantifying Picogreen
135 fluorescence (Invitrogen), and the fragment size distribution was determined by running 1 µL
136 of each sample on an Agilent Bioanalyzer 2100, using a DNA 7500 chip (Agilent
137 Technologies). The following manufacturer's protocols were carried out at Genoscreen (Lille,
138 France): fragment end polishing, adaptor ligation, during which specific MIDs (multiplex
139 identifiers) were added, library immobilisation, fill-in reaction and single-stranded DNA
140 library isolation. The Small Fragment Removal step was not included to avoid the loss of any
141 genetic information. The single-strand DNA profile and quantification were determined by
142 running 1 µL of each sample on an Agilent Bioanalyzer 2100 with a RNA Pico 6000 chip.

143 The concentration (pg/µL) obtained was then used to calculate the number of molecules of the
144 final product/µL: [single-strand DNA (pg/µL)]/[MW of nucleotide (325) x base pair length of
145 DNA strand] x [6.02×10²³]. The single-strand templates were subsequently diluted to a
146 normalised concentration of 1×10⁸ molecules/µL and multiplexing by equimolar mixture was
147 performed for the analysis of four samples on a 1/8 GsFLX PTP or eight samples on a 1/4
148 GsFLX PTP. In each GsFLX PTP region, samples were distinguished thanks to their MIDs.

149 Each multiplex library was previously titrated, to determine accurately the number of DNA

150 copies per bead required for maximum sequencing quality. Emulsion PCR and sequencing
151 were then carried out according to the GS-FLX protocol, with no modification.

152 ***Calibration test***

153

154 We set up a calibration test, using DNA samples of *A. mellifera*, to assess the minimum
155 number of 454 loading beads required to obtain sequences of satisfactory quality in sufficient
156 amounts. We loaded calibrated quantities of beads (125,000; 75,000; 50,000 and 25,000
157 beads) onto four regions of a GsFLX plate delimited by a 16-region gasket.

158

159 ***Enriched vs shotgun library***

160 We evaluated the benefits of DNA enrichment in microsatellite motifs, by comparing the data
161 obtained after sequencing DNA libraries of *A. mellifera* with and without enrichment. This
162 comparison was done with 125,000 loading beads as it provided the maximum number of
163 sequences in a given 1/16 GsFLX plate.

164

165 ***Validation on 13 taxa***

166 Enriched libraries, generated as described above, were constructed for 13 additional taxa from
167 various taxonomic groups (Table 1) in order to assess the general value of the method. The
168 loading of 75,000 beads was performed for each species (one species on a 1/16 GsFLx plate,
169 four species on 1/8 plate or eight species on 1/4 plate – using Roche Multiplex Identifiers) as
170 calibration tests revealed that this number provided highest quality and cost-efficiency (see
171 Results).

172 ***Data analysis and automated primer design***

173

174 The QDD pipeline (Meglécz *et al.* 2010) was used to analyse the 454 sequences and design
175 primers for amplification of the detected microsatellite motifs. Sequences were sorted
176 according to their MID (when used) and the MID sequence was subsequently removed.

177 Enrichment adaptors (Adap-F and Adap-R) were then removed from sequences, and
178 sequences with no detected adapter were discarded. Sequences shorter than 80 bp and
179 sequences containing microsatellite motifs shorter than five repeats were discarded. Sequence
180 similarities were detected through an “all against all” BLAST analysis. Sequences with
181 significant BLAST hits (e-value = 1E-40, microsatellites being soft-masked) but with flanking
182 region identity levels below 90% were discarded to avoid potential intragenomic multicopy
183 sequences. Sequences displaying only BLAST hits for which pairwise similarity between the
184 complete overlapping part of the flanking regions was over 90% were grouped into contigs
185 and a 2/3 majority rule was used to build a consensus sequence. These consensus sequences
186 substituted the corresponding single reads.. Unique sequences (with no BLAST hit according
187 to our criteria) and consensus sequences were used to form a validated set of sequences that
188 was used for further analyses. Primers were designed automatically using thePrimer3
189 algorithm (Rozen& Skaletsky 2000) implemented within QDD. PCR primers were designed
190 only if (i) the target microsatellite had at least five repeats, (ii) the resulting PCR product was
191 between 80 and 500 bp long, (iii) the flanking region contained, at most, a five-base
192 mononucleotide stretch, or two repeats of any di-hexa base-pair motif, (iv) the annealing
193 temperature of primers was between 50°C and 64°C and the difference in annealing
194 temperature between the forward and the reverse primer was < 4°C, (v) the self-
195 complementarities of primers and the complementarities between primers matched the quality
196 criteria used as default parameters in Primer3. We deliberately chose stringent criteria, as the
197 number of microsatellite loci identified was large and the most time-consuming and extensive
198 step was the subsequent validation of the designed primers.

199 **Results**

200

201 *Calibration test*

202 The calibration tests revealed strong positive correlation between the numbers of beads and
203 sequences ($R^2=0.851$, $p=0.015$ through permutation test) and, although the quality (as inferred
204 by the percentage of sequences that passed the Roche 454 GsFLX Titanium default quality
205 filters) was not homogeneous among the numbers of loading beads ($\chi^2=142.29$, $p<0.0001$),
206 there was no significant correlation between beads number and quality ($R^2=0.053$, $p>0.05$).
207 Based on this analysis, the loading of 75,000 beads was retained for the final protocol because
208 this number of beads (i) provided sufficient number of sequences (26,428 sequences) with a
209 high quality index (63.35% of the sequences passed the 454 GsFLX Titanium quality filters)
210 and (ii) allows the sequencing of up to four enriched libraries onto a 1/8 GsFLX plate, or eight
211 libraries onto a 1/4 GsFLX plate, using multiplex identifiers (MIDs).

212

213 *Enriched vs Shotgun library*

214 We obtained 37,870 and 39,473 sequences for the *A. mellifera* libraries without and with
215 enrichment (hereafter referred to as the “shotgun” and “enriched” libraries), respectively
216 (Table 1). Short sequences and sequences without microsatellite motifs were discarded and
217 the remaining sequences were filtered for redundancy and checked for multiple copies in the
218 dataset with our bioinformatics pipeline QDD (Meglécz *et al.* 2010). In total, 5,157 and 6,230
219 loci containing microsatellites matching the quality criteria implemented in QDD were
220 detected in the shotgun and enriched libraries, respectively. This high number of loci detected
221 in the shotgun library is not surprising given the high quantities of microsatellites contained in
222 the genome of this organism (Solignac *et al.* 2007). With the shotgun method, 97% of the
223 validated loci corresponded to sequences observed once in the raw dataset, whereas the

224 remaining 3% of the validated loci corresponded to consensus sequences (Table 2). With the
225 enrichment method, 22% of the validated loci corresponded to consensus sequences, taking
226 into account variation between sequences (caused by intraspecific polymorphism and
227 polymerase or 454 sequencing errors). QDD was then used to design primer pairs for each
228 validated locus. The primer design was successful in 2,045 loci from the shotgun library and
229 2,200 loci from the enriched library. The properties of the markers designed from the two
230 libraries differed considerably: the percentage of markers displaying microsatellite motifs
231 consisting exclusively of A/T nucleotides was 39% with the shotgun library and only 8% with
232 the enriched library (Table 2). Interestingly, enrichment allowed isolation of around 3 times
233 more primer pairs (543 vs 186) designed around microsatellite motifs of more than 8 perfect
234 repeats (excluding AT-motifs), i.e. optimal microsatellite markers.

235

236 ***Validation on 13 taxa***

237 The datasets obtained after the validation tests each contained 11,497 to 34,483 sequences
238 depending on the species (Table 1). Mean sequence length was between 150 and 275 bp
239 (Table 1) and maximum sequence length was between 477 and 997 bp (Table 1). The number
240 of validated loci containing microsatellites ranged from 199 to 5,791 (Table 2). We found that
241 3% to 28% of the validated loci corresponded to consensus sequences (Table 2), providing
242 information about the polymorphism of sequences. Despite the heavy constraints imposed on
243 primer design, primers were successfully designed for 94 to 1,162 loci, even for species for
244 which severe difficulties were previously encountered using traditional methods (Dutech *et al.*
245 2007; Meglécz *et al.* 2004, Péténian *et al.* 2005). The primers designed targeted various
246 microsatellite motifs in each species, with the respective proportions of each motif differing
247 among species (Table 2). Both the contrasted numbers and proportions of motifs found in the

248 different organisms are not surprising with regard to the available literature (Lagercrantz *et al.*
249 1993; Meglécz *et al.* 2007; Richard *et al.* 2008; Toth *et al.* 2000).

For Review Only

250 Discussion

251

252 Even with the stringent selection of loci imposed by the analysis parameters chosen, the
253 numbers of microsatellite markers isolated with this new procedure were satisfactory for all
254 the tested species. When compared to traditional isolation techniques, these numbers are
255 much larger and were obtained with a much lower budget and within a shorter length of time.
256 Indeed, whereas the isolation of microsatellites from an enriched library typically involves the
257 screening and Sanger sequencing of a couple of hundred clones over a period of five weeks at
258 a cost of more than US\$ 5,000, the process tested here allows the simultaneous screening of
259 thousands of DNA fragments, over a two-week period, at a cost of less than US\$ 1,500. The
260 sequences produced are shorter than those obtained by Sanger sequencing, but this is not a
261 problem for microsatellite marker development because the PCR products used for
262 genotyping are usually 100 to 400 bp in size. Besides, this read-length constraint should be
263 overcome with subsequent updates of 454 platforms. Comparing our results to the first studies
264 using pyrosequencing to isolate microsatellites is not straightforward because (i) the way
265 microsatellites were defined and the analyses methods used differ substantially, (ii) the
266 organisms used to test the protocols are different and (iii) the total cost to generate a given
267 amount of exploitable microsatellite sequences was generally not provided. However, the
268 efficiency as evaluated from our results (between 1% to 8% of amplifiable markers in the
269 obtained sequences; see methods for the definition of amplifiable markers) appears higher
270 than in Abdelkrin et al. (2009) who reported around 0.1% of amplifiable microsatellites
271 markers in their shotgun library and of the same order of magnitude as in Castoe et al. 2009
272 (~3.5% of amplifiable microsatellites in one species) and Santana et al. 2009 (between ~2 and
273 ~5%).

274 Our tests revealed that the use of the multiplex DNA enrichment of our procedure appears
275 highly advisable to optimize cost-efficiency of microsatellite isolation Comparisons between
276 enriched and shotgun *A. mellifera* libraries revealed two major advantages of enrichment.
277 First, enrichment slightly increased the overall number of microsatellite loci isolated and
278 reduced the proportion of unwanted motifs such as AT-based motifs (39% to 8%) which are
279 likely to generate difficult amplification during genotyping. Counting the numbers of
280 amplifiable optimal microsatellite markers (≥ 8 repetitions of perfect and not AT-rich motifs,
281 i.e. the most valuable markers for the end-users) revealed that enrichment improved marker
282 isolation efficiency by almost 300% (543 vs 186 markers isolated in *A. mellifera* with and
283 without enrichment) for an additional cost of around 10%. Moreover, the benefits of
284 enrichment are likely much underestimated here because *A. mellifera* genome is rich in
285 microsatellites (Solignac et al., 2007). \therefore Second, it increases the number of multiple reads
286 obtained for a given microsatellite locus that enable to design PCR primers targeting non-
287 polymorphic sequences flanking the microsatellite motif. Such an approach should decrease
288 the probability of designing markers with a high percentage of null alleles due to mismatches
289 between primers and polymorphic nucleotides in flanking regions that can occur in some
290 individuals or populations. The analysis of the large datasets obtained, using programs like
291 QDD, also enables to sort and discard loci that are likely to be found at multiple sites in the
292 genome.

293 The validation of our method on 13 taxa did not reveal negative effects of enrichment on
294 microsatellite isolation efficiency. Comparison of motifs frequencies in the libraries generated
295 here and in published genome sequences of closely related taxa (when available) shows that
296 enrichment successfully favoured the most common motifs (Table 2, supplementary Table 1).
297 Second, results do not indicate that lower isolation efficiency could be due to enrichment
298 failure: we found no negative correlation between the percentage of unwanted motifs and the

299 number of detected microsatellite loci ($r=0.16$; $P>0.05$). Lower yields in some species may
300 rather be caused by technical issues (e.g. random manipulation effects or lower DNA quality
301 of available samples) or lower abundances of microsatellites in genomes.

302
303 In conclusion, we demonstrated that our procedure coupling multiplex enrichment,
304 pyrosequencing and sequence selection can be readily and successfully applied to a large
305 variety of taxonomic groups (Table 2). The procedure is particularly cost-efficient as only a
306 small part of a 454 GsFLX plate is needed to isolate high numbers of microsatellite markers.
307 It is expected to speed up the acquisition of high-quality genetic markers for non-model
308 organisms.

310 **Acknowledgments**

311
312 We thank M. Galan for useful comments on previous versions of the manuscript and S.
313 Nielsen for major improvements to English grammar throughout the text. This work was
314 supported by the AIP BioRessources “EcoMicro” grant from the French *Institut National de*
315 *la Recherche Agronomique* (INRA), permanent institutional support from Montpellier
316 SupAgro, University Aix-Marseille I, INRA and the R&D budget of Genoscreen (Lille,
317 France).

320 **References**

321

322 Abdelkrin J, Robertson BC, Stanton JAL, Gemmell NJ (2009) Fast, cost-effective
323 development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing.

324 *Biotechniques* **46**, 185-+.

325 Allentoft ME, Schuster SC, Holdaway RN, *et al.* (2009) Identification of microsatellites from
326 an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *Biotechniques* **46**,

327 195-200.

328 Castoe TA, Poole AW, Gu W, *et al.* (2009) Rapid identification of thousands of copperhead
329 snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454

330 shotgun genome sequence. *Molecular Ecology Resources*.

331 Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, *et al.* (2007) Challenges of microsatellite isolation in fungi.

332 *Fungal Genetics and Biology* **44**, 933-949.

333 Kijas JMH, Fowler JCS, Garbett CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from
334 the Citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-

335 coated magnetic particles. *Biotechniques* **16**, 656-662.

336 Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L (1993) The abundance of various polymorphic

337 microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*

338 **21**, 1111-1115.

339 Meglécz E, Anderson SJ, Bourguet D, *et al.* (2007) Microsatellite flanking region similarities
340 among different loci within insect species. *Insect Molecular Biology* **16**, 175-185.

341 Meglécz E, Costedoat C, Dubut V, *et al.* (2010) QDD: a user-friendly program to select
342 microsatellite markers and design primers from large sequencing projects.

343 *Bioinformatics* **26**, 403-404.

344 Megléc E, Petenian F, Danchin E, *et al.* (2004) High similarity between flanking regions of
345 different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera:
346 *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Molecular Ecology* **13**, 1693-1700.

347 Péténian, F., Megléc, E., Genson, G., Rasplus JY., Faure E. 2005. Isolation and
348 characterization of polymorphic microsatellites in *Parnassius apollo* and *Euphydryas*
349 *aurinia* (Lepidoptera). *Molecular Ecology Notes*, **5**, 243-245.

350 Richard GF, Kerrest A, Dujon B (2008) Comparative Genomics and Molecular Dynamics of
351 DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**, 686-
352 727.

353 Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist
354 programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**, 365–386.

355 Santana QC, Coetzee MPA, Steenkamp ET, *et al.* (2009) Microsatellite discovery by deep
356 sequencing of enriched genomic libraries. *Biotechniques* **46**, 217-223.

357 Solignac M, Mougél F, Vautrin D, Monnerot M, Cornuet J-M (2007) A third-generation
358 microsatellite-based linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, and its comparison
359 with the sequence-based physical map. *Genome Biology* **8**, R66.

360 Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology &*
361 *Evolution* **15**, 199-203.

362 Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey
363 and analysis. *Genome Research* **10**, 967-981.

364

Table 1 – Name and systematic position of the species used to set and test the procedure; number and length of sequences generated

Name	Division	Class	Order	Number of sequences	Length	
					Mean	Maximum
<i>Apis mellifera</i> (shotgun)	Arthropoda	Insecta	Hymenoptera	37870	275	765
<i>A. mellifera</i> (enriched-125K)	Arthropoda	Insecta	Hymenoptera	39473	251	766
<i>A. mellifera</i> (enriched-75K)	Arthropoda	Insecta	Hymenoptera	26428	258	681
<i>A. mellifera</i> (enriched-50K)	Arthropoda	Insecta	Hymenoptera	30041	259	610
<i>A. mellifera</i> (enriched-25K)	Arthropoda	Insecta	Hymenoptera	11571	259	639
<i>Venturia canescens</i>	Arthropoda	Insecta	Hymenoptera	21716	189	539
<i>Euphydryas aurinia</i>	Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	11497	184	562
<i>Pseudococcus viburni</i>	Arthropoda	Insecta	Hemiptera	29528	237	611
<i>Diabrotica virgifera</i>	Arthropoda	Insecta	Coleoptera	15207	259	595
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Nematoda	Secernentea	Aphelenchida	12286	240	615
<i>Barbus meridionalis</i>	Chordata	Actinopterygii	Cypriniformes	13010	150	477
<i>Danio rerio</i>	Chordata	Actinopterygii	Cypriniformes	15833	193	543
<i>Gerbillus nigeriae</i>	Chordata	Mammalia	Rodentia	21740	153	884
<i>Armillaria ostoyae</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	32488	179	809
<i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>uniformis</i>	Heterokontophyta	Oomycetes	Peronosporales	34483	209	997
<i>Festuca eskia</i>	Magnoliophyta	Liliopsida	Poales	25577	246	598
<i>Hirtella physophora</i>	Magnoliophyta	Eudicotyledones	Malpighiales	34316	197	849
<i>Papaver rhoeas</i>	Magnoliophyta	Eudicotyledones	Ranunculales	13825	240	570

Table 2. Description of the microsatellite libraries produced for the 14 tested species: number of microsatellite loci validated by the QDD program; number of perfect (only one repeated motif) and compound (2 or more repeated motifs or interrupted microsatellites) microsatellite motifs among the loci for which PCR primers were designed by QDD; frequencies of the various types of perfect microsatellites. Data are obtained from 454 runs in which 75,000 beads were loaded for each species, except *A. mellifera* Shotgun, enriched-125K, enriched-75K, enriched-50K and enriched-25K, for which 125,000, 125,000, 75,000, 50,000 and 25,000 beads were loaded, respectively.

Name	Validated Loci	% loci identified from several sequences	Design of Primers		Motif Type of perfect ms									
			Perfect ms	Compound	AC	AG	AAC	AAG	ACG	AGG	ACAT	ATCT	AT-based	Others
<i>A. mellifera</i> (shotgun)	5157	3%	1451	594	3%	35%	1%	5%	2%	6%	0%	0%	39%	10%
<i>A. mellifera</i> (enriched-125K)	6230	22%	1516	684	5%	58%	3%	12%	1%	7%	0%	0%	8%	6%
<i>A. mellifera</i> (enriched-75K)	4674	21%	1207	563	5%	54%	2%	13%	1%	9%	0%	0%	10%	5%
<i>A. mellifera</i> (enriched-50K)	5025	21%	1203	540	5%	56%	3%	12%	1%	8%	0%	0%	9%	5%
<i>A. mellifera</i> (enriched-25K)	2519	18%	656	290	5%	55%	3%	12%	1%	8%	0%	0%	11%	5%
<i>V. canescens</i>	2404	23%	483	192	15%	62%	5%	9%	2%	2%	0%	0%	2%	3%
<i>E. aurinia</i>	1627	10%	252	96	41%	17%	7%	11%	0%	0%	6%	4%	6%	8%
<i>P. viburni</i>	1311	23%	315	136	16%	15%	14%	7%	6%	18%	2%	1%	3%	19%
<i>D. virgifera</i>	1731	5%	319	109	14%	11%	1%	60%	1%	3%	2%	2%	2%	5%
<i>B. xylophilus</i>	199	28%	71	23	20%	45%	11%	13%	0%	3%	0%	0%	0%	8%
<i>B. meridionalis</i>	2562	11%	572	229	80%	15%	0%	2%	0%	0%	0%	1%	1%	1%
<i>D. rerio</i>	5791	8%	770	322	73%	8%	5%	1%	0%	1%	0%	1%	1%	11%
<i>G. nigeriae</i>	2048	3%	163	78	36%	19%	10%	1%	0%	3%	3%	9%	2%	17%
<i>A. ostoyae</i>	4015	6%	235	69	20%	10%	22%	10%	4%	6%	0%	1%	6%	20%
<i>P. alni</i>	550	16%	186	53	25%	23%	10%	10%	4%	8%	1%	1%	3%	17%
<i>F. eskia</i>	1474	8%	475	151	31%	35%	8%	10%	1%	6%	0%	1%	4%	4%
<i>H. physophora</i>	3552	24%	809	353	16%	24%	9%	18%	2%	11%	1%	2%	6%	10%
<i>P. rhoeas</i>	1072	4%	334	120	11%	24%	13%	43%	0%	4%	0%	0%	1%	4%

« And then, looking back, [we] took one last long survey of that strange land, soon I fear to be vulgarized, the prey of hunter and prospector, but to each of us a dream-land of glamour and romance, a land where we had dared much, suffered much – *our* land, as we shall ever fondly call it. »

Arthur Conan Doyle, The lost world

ABSTRACT :

The struggle to attain more for less is supposed to transform every mutualist into a cheater. However, mutualisms are ubiquitous and of major importance in ecosystems, suggesting the existence of mechanisms enhancing the maintenance of such relationships.

We focused on the obligatory specific association between the plant *Hirtella physophora* (Chrysobalanaceae) and the ants *Allomerus decemarticulatus* (Myrmecinae). By combining field ecology and molecular biology, we highlighted a conflict that results in the parasitic castration behaviour of ants. This conflict is controlled thanks to sanctions and partner fidelity feedback. The outcome of these mechanism is affected by interactions with other organisms that are involved in the relationship.

This study highlights the importance of investigating the ecological, spatial and temporal dimensions in order to understand the evolutionary fate of a mutualistic relationship.

KEYWORDS : myrmecophytes, protection, transmission mode, partner fidelity feedback, reciprocity, pseudo-reciprocity, by-product.

AUTEUR : Pierre-Jean Malé

TITRE : Stabilité évolutive des mutualismes et mécanismes de contrôle, le cas d'une relation plante-fourmis

DIRECTEURS DE THÈSE : Dr. Jérôme Orivel & Dr. Angélique Quilichini

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : Toulouse, le 3 février 2011

RESUME :

La lutte pour le plus grand bénéfice à moindre coût est supposée transformer tout organisme mutualiste en tricheur. Or l'ubiquité et la diversité des mutualismes contredisent ces prédictions théoriques, suggérant l'existence de mécanismes favorisant la stabilité de ces relations.

Nous avons étudié l'association spécifique et obligatoire entre la plante *Hirtella physophora* et les fourmis *Allomerus decemarticulatus*. Par des approches mêlant écologie de terrain et biologie moléculaire, nous avons mis en évidence un conflit qui se manifeste via le comportement de castration parasitaire des fourmis. Ce conflit est maintenu sous contrôle par des mécanismes de sanctions et de fidélité au partenaire. Le résultat de leur mise en œuvre est modulé par des interactions avec d'autres organismes, eux aussi impliqués dans l'association.

Notre étude met en lumière l'importance de l'appréhension des différentes dimensions écologiques, spatiales et temporelles dans la compréhension de la trajectoire évolutive d'un système d'interactions.

MOTS-CLES : myrmécophytes, protection, mode de transmission, fidélité au partenaire, réciprocité, pseudo-réciprocité, sous-produit.

DISCIPLINE : Ecologie, Biodiversité et Evolution

LABORATOIRE D'ACCUEIL :

Laboratoire EDB (Evolution & Diversité Biologique)

Université Paul Sabatier

118 route de Narbonne

31062 – TOULOUSE cedex 9