Profil de diversité génétique neutre chez Rumex scutatus L. (Polygonaceae) dans le contexte pyrénéen français

Béatrice Lauga, S. Malaval-Cassan, Myriam Dayre, Regnault-Roger Catherine, Gérard Largier

▶ **To cite this version:**

Béatrice Lauga, S. Malaval-Cassan, Myriam Dayre, Regnault-Roger Catherine, Gérard Largier. Profil de diversité génétique neutre chez Rumex scutatus L. (Polygonaceae) dans le contexte pyrénéen français. Bulletin de la société d'histoire naturelle de Toulouse, 2005. hal-03648729

HAL Id: hal-03648729
https://univ-pau.hal.science/hal-03648729

Submitted on 4 May 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Profil de diversité génétique neutre chez Rumex scutatus L. (Polygonaceae) dans le contexte pyrénéen français

Béatrice Lauga, S. Malaval-Cassan, Myriam Dayre, Regnault-Roger Catherine, Gérard Largier

▶ **To cite this version:**

Béatrice Lauga, S. Malaval-Cassan, Myriam Dayre, Regnault-Roger Catherine, Gérard Largier. Profil de diversité génétique neutre chez Rumex scutatus L. (Polygonaceae) dans le contexte pyrénéen français. Bulletin de la société d'histoire naturelle de Toulouse, Université Toulouse, 2005. hal-03648729

HAL Id: hal-03648729

https://hal-univ-pau.archives-ouvertes.fr/hal-03648729

Submitted on 4 May 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Profil de diversité génétique neutre chez *Rumex scutatus* L. *(Polygonaceae)* dans le contexte pyrénéen français

Par B. Lauga[1,2], S. Malaval-Cassan[2], M. Dayre[1]*, C. Regnault-Roger[1] et G. Largier[2]

[1] Université de Pau et des Pays de l'Adour, Laboratoire d'Ecologie Moléculaire, IBEAS, UFR Sciences et Techniques, BP1155, 64013 Pau Cedex

[2] Conservatoire botanique pyrénéen/ Conservatoire Botanique National de Midi-Pyrénées, Vallon de Salut, BP 315, 65203 Bagnères-de-Bigorre Cedex

** Adresse actuelle : UMR CNRS GEPEA 6144/ERT CBAC,Campus de la Courtaisière, IUT de La Roche sur Yon, Département Génie Biologique, 18, Bd Gaston Defferre , 85035 La Roche sur Yon Cedex*

Auteur pour la correspondance :
LAUGA Béatrice - EA3525- Laboratoire d'Ecologie Moléculaire - Université de Pau et des Pays de l'Adour - CURS BP 1155 - 64013 Pau cedex - France. Tel : 33 (0)5 59 40 74 68 - adresse électronique : Beatrice.Lauga@univ-pau.fr

RÉSUMÉ

La distribution de la variabilité génétique et les relations phylogénétiques entre trente-cinq populations *de Rumex scutatus* échantillonnées dans le massif nord-pyrénéen ont été étudiées par des marqueurs neutres RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Les indices de diversité génétique révèlent une hétérogénéité entre les sites. L'effectif actuel des populations ne permet pas d'expliquer ce résultat. Ainsi des processus démographiques plus anciens, par exemple liés au caractère pionnier de *R. scutatus,* auraient pu contribuer à modeler ce profil. L'analyse de la variance moléculaire a révélé que 96 % de la variabilité génétique était trouvé à l'intérieur des populations. Ce schéma de répartition de la variabilité s'explique par les caractères allogame (ou autogame optionnel) et pérenne de *R. scutatus.* La fragmentation de l'habitat de *R. scutatus* et l'effet antagoniste de la dispersion aléatoire des graines par le vent (anémochorie) pourrait expliquer la faible différenciation observée entre les populations (F_{ST}=0,045) ainsi que l'absence de profil phylogéographique évident dans le massif nord pyrénéen.

Mots-clés : marqueurs RAPD, phylogéographie, différenciation génétique, flux de gènes, revégétalisation.

ABSTRACT

Pattern of neutral genetic diversity in *Rumex scutatus* L. (Polygonaceae) in the French Pyrenees

The distribution of genetic variation and phylogenetic relationships between 35 populations of *Rumex scutatus* sampled in the north Pyrenees were analysed with neutral RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. The indices of genetic diversity revealed heterogeneity among sites. The current population size does not allow to explain this result. Also, other factors such as demographic processes, for instance linked to pioneer trait of *R. scutatus,* could have contributed to model this pattern. The analysis of molecular variance showed that 96 % of the genetic variation was found within population. This finding is congruent with the allogamous (or optional autogamous) type of propagation and the perennial trait of *R. scutatus.* Finally, the fragmentation of the habitat of *R. scutatus* and the antagonist effect of anemochory (dispersion of seed by wind) could explain the low level of differentiation observed (F_{ST}=0.045) as well as the lack of a clear phylogeographic pattern in the northern Pyrenees.

Key words : RAPD markers, phylogeography, genetic differentiation, gene flow, land reclamation.

INTRODUCTION

Dans tout écosystème, l'environnement physique est un des facteurs qui contribue à façonner la diversité des êtres vivants qui le peuple. Les écosystèmes pyrénéens, comme les autres milieux de montagne, sont caractérisés par une forte hétérogénéité environnementale (TILL-BOTRAUD et GAUDEUL, 2002). De concert avec l'histoire de la chaîne,

influencée par la complexité géologique du continent européen et par les épisodes climatiques du tertiaire et du quaternaire, ces conditions ont modelé au cours d'un long processus évolutif la diversité de la flore que le massif héberge (VARGAS, 2003). Ainsi, GÓMEZ et al (2003) suggèrent que l'ensemble de ces fortes contraintes pourrait expliquer le fort taux d'endémisme constaté dans les milieux d'altitude de la région. Aussi, selon le même principe, nous pourrions nous interroger avec TILL-BOTRAUD et GAUDEUL (2002) de l'influence qu'auraient, au niveau intra-spécifique, ces facteurs sur la structuration de la diversité génétique chez les plantes d'altitude.

En conséquence, l'interaction entre les plantes et leur environnement dans ces conditions d'altitude constitue un équilibre fragile, mis en péril par les activités humaines ou les catastrophes naturelles. Après des travaux d'aménagement en montagne, il est souhaitable de restaurer la couverture herbacée par une action de revégétalisation, le milieu ne pouvant que très lentement et difficilement se restaurer de lui-même. Jusqu'à assez récemment, ce type d'action n'était pas encore systématique alors qu'il le devient de plus en plus aujourd'hui. Cependant, des semences allochtones sont utilisées pour recréer un couvert herbacé, incluant un risque pour la flore locale lié à la compétition, la dépression d'hybridation ou l'introgression (LUMARET et BARRE, 1993 ; RHYMER et SIMBERLOFF, 1996 ; MONTALVO et ELLSTRAND, 2001). Pour parvenir à de véritables opérations de restauration écologique, il serait nécessaire d'utiliser des plantes d'origine locale, en définissant alors la notion de " local " et l'échelle spatiale concernée (MOORE, 2000 ; SACKVILLE HAMILTON, 2001). De plus, la diversité génétique des espèces concernées, gage de leur capacité d'évolution et d'adaptation, doit être maintenue (MILLAR et LIBBY, 1991).

L'Oseille à écussons (*Rumex scutatus* L.), a été ciblée comme une espèce intéressante à utiliser dans les programmes de revégétalisation avec des espèces locales en Pyrénées (CASSAN *et al.*, 2003). Espèce à répartition eurosibérienne, l'Oseille à écussons est ubiquiste et largement présente sur l'ensemble de la chaîne pyrénéenne, jusqu'à l'étage alpin. Elle possède une dynamique pionnière, colonisant les milieux perturbés et les éboulis en participant à leur stabilisation (SAULE, 1991).

Dans le cadre de son utilisation en revégétalisation, la diversité génétique de cette oseille sur l'ensemble de la chaîne pyrénéenne française a été étudiée en utilisant des marqueurs RAPD neutres afin de préciser la structuration de l'espèce sur ce critère et de connaître les flux de gènes entre les populations. Cette démarche complètera nos connaissances afin de déterminer les limites géographiques de récolte de ces dernières pour leur future mise en production et leur utilisation pour la restauration de sites perturbés dans les Pyrénées.

Au-delà de cette application, cette étude contribue à élargir la connaissance sur les plantes pyrénéennes, alors que la plupart des investigations de ce type ont plutôt été menées dans les Alpes (BAUERT *et al.*, 1998 ; GUGERLI *et al.*, 1999 ; HOLDEREGGER *et al.*, 2002 ; STEHLIK *et al.*, 2002 ; SCHONSWETTER *et al.*, 2004). Contrairement à de nombreuses recherches axées sur les plantes rares ou menacées, notre étude s'intéresse à la flore commune, dans une problématique de conservation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Echantillonnage

La chaîne des Pyrénées a été divisée en dix régions entre le pic d'Anie et le Canigou. Ce découpage correspond à dix bassins versants afin d'intégrer les principales contraintes topographiques d'altitude (Fig. 1). Dans chaque région, vingt échantillons de *R. scutatus* ont été prélevés sur quatre

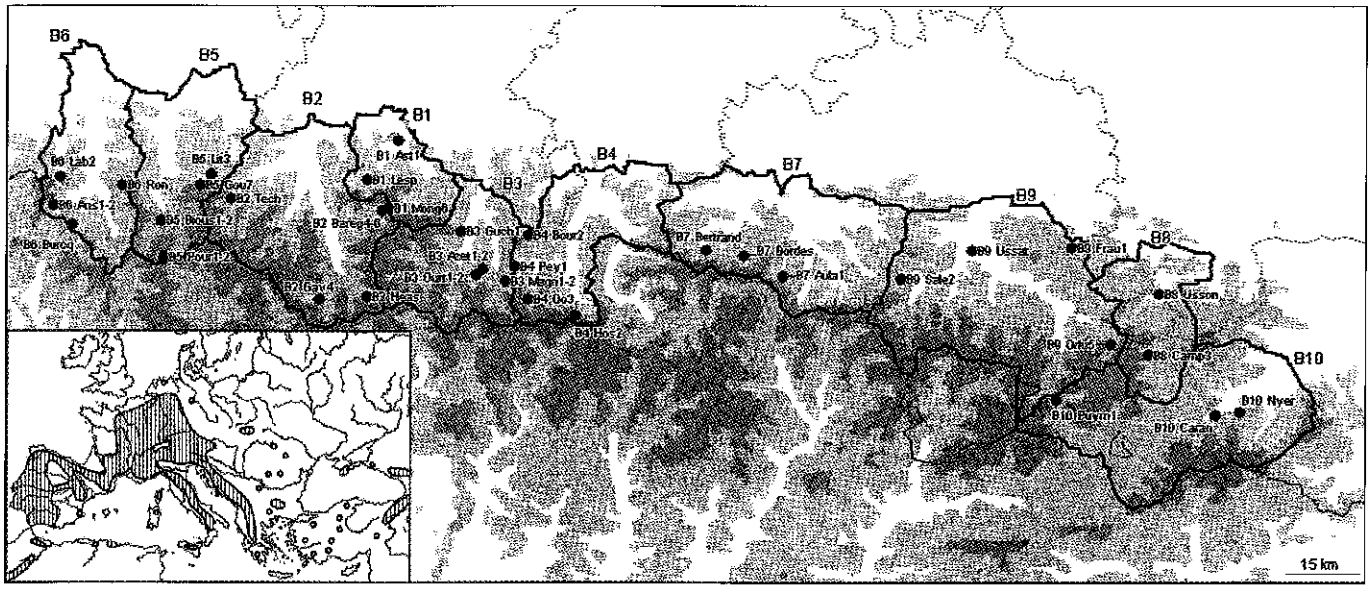

Fig. 1 : Dans l'encart, répartition de *R. scutatus* ; dans la carte principale, sites de prélèvements des échantillons de l'espèce dans le massif nord-pyrénéen et découpage régional adopté dans l'étude.

Region - Population	Localisation	Coordonnées géographiques N	E	Altitude	Taille de population	P_F
B1-Mong6	La Mongie	42,90877	0,146186	2000 m	A	31,03
B1-Astl	Asté	43,03518	0,170411	620 m	A	27,59
B1-Lesp	Lesponne	42,96147	0,089274	1060 m	A	34,48
B2-Bareg4	Barèges	42,90352	0,128755	1830 m	A	37,93
B2-Heas	Héas	42,74523	0,091623	1600 m	D	44,83
B2-Gav4	Gavarnie	42,73774	-0,02859	1650-1700	D	20,69
B2-Tech	Lac du Tech	42,92373	-0,25159	1150 m	D	27,59
B3-Azet2	Col d'Azet	42,79537	0,384282	1490 m	B	44,83
B3-Magn2	Pène de Magnéras	42,77525	0,441961	1860-1900	C	34,48
B3-Ourt2	Ourtigué	42,7855	0,364837	1280 m	B	51,72
B3-Guch	Guchen	42,8656	0,330319	830 m	C	27,59
B4-Hos2	Hospice de France	42,71067	0,617194	1650 m	C	10,34
B4-Oo3	Lac d'Oo	42,74201	0,496737	1566 m	A	24,14
B4-Pey1	Peyragudes	42,80171	0,464849	1569 m	A	20,69
B4-Bour2	Bourg d'Oueil	42,86037	0,4976	1400 m	Nc	17,24
B5-Pourt1	Pourtalet	42,81349	-0,42129	1710 m	B	51,72
B5-Bious1	Bious Artigues	42,87989	-0,43037	1100 m	A	37,93
B5-Lit3	Litor	42,96739	-0,30292	1410 m	A	41,38
B5-Gou7	Gourette	42,94744	-0,33235	1720 m	A	31,03
B6-Ansl	Ansabère	42,9043	-0,70277	1280-1350	D	27,59
B6-Burcq	Burcq	42,87018	-0,65368	1600-1650	A	34,48
B6-Ron	Ronglet	42,94558	-0,52956	1830 m	A	20,69
B6-Lab	Labérouat	42,95788	-0,68609	1460 m	A	20,69
B7-	Bertrand	42,8323	0,947591	1150 m	A	31,03
B7-Bordes	Bordes	42,82279	1,040177	980 m	B	27,59
B7-Aula	Port d'Aula	42,78608	1,140051	1580 m	B	20,69
B8-Usson	Usson les Bains	42.74558	2,085926	780 m	A	31,03
B8-Camp3	Camporells	42,63525	2,054609	1625 m	A	31,03
B9-Frau	Gorges de la Frau	42,83357	1,868662	700-900	C	41,38
B9-Ussat	Ussat les Bains	42,83183	1,619144	520 m	A	48,28
B9-Sale2	Saleix	42,77951	1,435489	1400 m	A	27,59
B9-Orlu5	Orlu	42,6545	1,961489	1500 m	A	34,48
B10-	Puymorens	42,55406	1,824132	1860 m	D	20,69
B10-Caran	Carança	42,52162	2,221904	870-900	A	37,93
B10-Nyer	Réserve de Nyer	42,52571	2,282504	890 m	A	51,72
Alpes	Allos	44,253488	6,6851483	1750 m	A	27,59

Tab. 1 : Caractéristiques des populations de *R. scutatus* : nom, abréviation, localisation (système de projection longitude-latitude WGS864 (degrés décimaux)), altitude, taille exprimée en classes A : < 100 individus ; B : 100-1000 ; C : 1000-10000 ; D : >10000 ou Nc : non communiquée et diversité génétique (à l'échelle des populations ou des régions) exprimée : en pourcentage de loci polymorphes (P_F) et index de Shannon (I_{SH}).

sites différents sauf en B1, B7, et B10 (seulement trois sites identifiés) et B8 (seulement deux sites identifiés). Ainsi, 175 échantillons ont été récoltés sur 35 sites assurant une couverture continue et dense sur l'aire de répartition de *R. scutatus*. Les sites d'échantillonnage les plus extrêmes sont éloignés de 255 km. Un site alpin constitué de cinq échantillons a été également inclus dans l'étude (Tab. 1). Les jeunes feuilles ont été collectées sur des individus éloignés de cinq à dix mètres et placées dans des sachets en plastique contenant du silica-gel destiné à déshydrater le matériel végétal et conserver les échantillons. Pour chaque collecte, l'altitude des sites d'échantillonnage a été consignée et la taille des populations évaluée et classée en quatre classes de fréquence (A : < 100 individus ; B : entre 100 et 1000 ; C : entre 1000 et 10000 ; D : >10000) (Tab. 1).

Extraction et amplification de l'ADN

Les feuilles déshydratées ont été broyées en fine poudre en présence de billes de tungstène en utilisant un broyeur (Mix miller, Qiagen). L'ADN a été extrait selon la méthode de LEM et LALLEMAND (2003). Sa concentration et sa qualité ont été évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose par comparaison à une gamme standard de concentration d'ADN de phage. Les extraits ont été dilués pour obtenir une concentration de 2 ng par µl par échantillon.

Des oligonucléotides de 10 bases (Operon Technologies, USA) ont été utilisés pour amplifier des séquences d'ADN aléatoires selon la méthode de WILLIAMS *et al.* (1990). Les réactions d'amplifications ont été réalisées dans un volume de 17 µl avec 5 ng d'ADN, 20,2 mM de dNTP (Eppendorf), 15 ng d'amorce, 0,5 unité de Taq ADN polymérase (Eppendorf), 1,7 µl de tampon PCR 10X fourni avec l'ADN polymérase. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur PTC-200 (MJ Research) programmé pour une étape initiale de dénaturation de 5 min à 94° C ; puis pour 40 cycles de 50 s à 94° C, 1 min à 36° C et 2 min à 72° C ; et une étape finale d'élongation de 10 min à 72° C. Les fragments RAPD ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 % puis visualisés par une coloration au bromure d'éthidium.

Choix des amorces

Vingt-six amorces choisies aléatoirement dans les kits A et B d'Operon ont été éprouvées pour la reproductibilité des profils d'amplification en réalisant plusieurs amplifications d'un même individu et pour leur capacité à révéler du polymorphisme sur cinq échantillons provenant de quatre régions différentes. Quatre amorces (B4, B5, B7 et B18) fournissant des profils clairs et reproductibles ont ainsi été retenues pour l'analyse RAPD des 180 individus. Des réplicats étaient également amplifiés simultanément à l'amplification des échantillons afin de veiller à la reproductibilité de notre amplification.

Analyse des données

Les fragments de taille identique ont été considérés comme homologues indépendamment de leur intensité. Chaque fragment correspond à un locus à deux allèles (présence ou absence). Seuls les marqueurs polymorphes sont considérés pour les analyses.

La diversité génétique par population a été évaluée par le pourcentage de locus polymorphes (P%) et l'indice de Shannon (I_S) (LEWONTIN, 1972) en utilisant le logiciel Popgene ver 1.31 (YEH *et al.*, 1997). L'analyse UPGMA par souci de comparaison avec des études similaires (TRIBSCH *et al,* 2002 ; SCHONSWETTER *et al,* 2003 ; DESPRES *et al,* 2002) est basée sur les distances de Nei (NEI, 1972). Elle a été réalisée à l'échelle des populations et à l'échelle des régions pour révéler d'éventuels profils biogéographiques en utilisant le logiciel POPULATION (LANGELLA, 2000) et le logiciel TFPGA (MILLER, 1997), respectivement. Les valeurs de bootstrap ont été obtenues par un reéchantillonnage des locus (2000 permutations).

La variation des profils RAPD a été étudiée dans une analyse de la variance moléculaire (AMOVA) basée sur les car-

rés des distances euclidiennes entre toutes les paires de phénotypes RAPD en utilisant Arlequin ver 2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000). L'AMOVA permet d'évaluer la différenciation entre population et entre régions et de calculer les composants de la variance ainsi que leur significativité. Trois niveaux ont été considérés : entre régions, entre populations à l'intérieur des régions et intra-populations. Dans toutes les analyses, la significativité des résultats a été éprouvée par 1000 permutations. Les statistiques de F_{ST} et leur niveau de significativité ont aussi été obtenues par Arlequin ver 2.000 afin d'estimer la différenciation génétique entre les populations. De plus un test exact de différenciation (RAYMOND et ROUSSET, 1995) a été réalisé pour révéler une éventuelle différence dans la fréquence des marqueurs entre les régions.

Afin d'éprouver l'existence d'une corrélation entre distances génétiques (NEI, 1972) et distances géographiques (en km) entre les populations pyrénéennes, nous avons réalisé un test de Mantel (MANTEL, 1967) en utilisant le programme IBD (BOHONAK, 2002).

Régions	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	Alpes
B1		ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	ns
B2	0,016		ns	ns	ns	ns	**	**	***	ns	ns
B3	0,016	0,011		ns	ns	ns	**	*	**	ns	ns
B4	0,046	0,035	0,041		ns	**	***	**	***	**	ns
B5	0,020	0,013	0,009	0,035		ns	***	**	**	ns	ns
B6	0,057	0,025	0,032	0,064	0,042		**	ns	ns	ns	ns
B7	0,046	0,051	0,053	0,091	0,071	0,100		ns	**	ns	ns
B8	0,078	0,068	0,074	0,079	0,092	0,087	0,084		ns	ns	ns
B9	0,062	0,045	0,050	0,089	0,065	0,037	0,074	0,064		ns	ns
B10	0,031	0,033	0,038	0,065	0,044	0,059	0,059	0,056	0,036		ns
Alpes	0,122	0,094	0,112	0,099	0,123	0,083	0,172	0,091	0,085	0,103	

Test de différenciation (au dessus de la diagonale) et distance génétique (sous la diagonale)

Tab. 2 : Distances génétiques établies selon Nei (1972) et test de différenciation des fréquences haplotypiques selon Raymond et Rousset (1995) entre les 35 populations pyrénéennes regroupées à l'échelle des régions (B1 à B10) et la population alpine de *R. scutatus*.

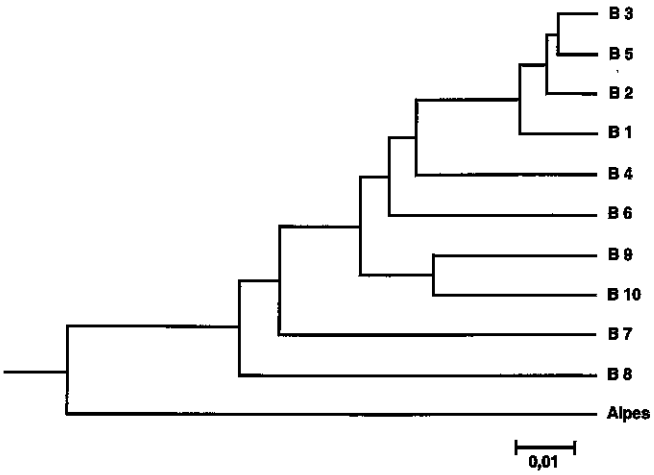

Fig. 2 : Dendrogramme basé sur les distances de Nei (1972) et construit selon la méthode UPGMA incluant les 35 populations pyrénéennes regroupées au niveau régional et la population alpine de *R. scutatus*.

RÉSULTATS

Polymorphisme RAPD et diversité génétique

L'amplification PCR des 180 individus de *R. scutatus* en utilisant les quatre amorces RAPD a permis de générer 29 fragments polymorphes reproductibles. Les valeurs de diversité génétique sont répertoriées dans le Tableau 1. Elles sont comprises pour les populations entre 0,084 et 0,311 et entre 0,242 et 0,360 pour les régions (Index de Shannon). Les indices révèlent un niveau de diversité homogène sur l'ensemble des populations hormis pour B4-Hos2 et B5-Pour1 qui possèdent les valeurs les plus extrêmes (minimale et maximale, respectivement). Aucune relation entre la taille des populations et le niveau de diversité n'a été mise en évidence comme le suggèrent les indices de diversité des populations à grands et à petits effectifs (Tableau 1).

Analyse des distances génétiques

Les distances génétiques entre paires de populations pyrénéennes varient de 0,028 (B1-Lesp *vs.* B2-Héas) à 0,538 (B4-Bour2 *vs.* B10-Puym1) et celles avec la population alpine de 0,065 (B1-Lesp) à 0.472 (B10-Puym1) (données non présentées). Les relations entre les populations de *R. scutatus* établies à partir des distances génétiques de Nei entre toutes les paires de populations et représentées dans l'arbre UPGMA ne font pas apparaître d'organisation géographique nette (données non montrées). Le dendrogramme réalisé en regroupant les populations au niveau régional révèle que seules les régions B1, B2, B3 et B5, qui appartiennent à la partie centrale de la chaîne, s'organisent en un groupe statistiquement robuste (Fig. 2).

Le Tableau 2 montre que la population alpine affiche des distances génétiques comparables à celles de certaines comparaisons intra-pyrénéennes.

Différenciation génétique

Les populations de *R. scutatus* sont faiblement différenciées comme en atteste la valeur de F_{ST} globale (0,045, P<0,01). La répartition de la variance moléculaire au sein de notre échantillon nord-pyrénéen de *R. scutatus* obtenue par l'AMOVA (Tab. 3) montre qu'une part très importante de la variation se concentre dans les populations (95,52%). La variation entre les populations à l'intérieur des régions est faible (4,02%) indiquant une faible différenciation génétique des populations au sein d'un même bassin versant. Une pro-

Source de variation	ddl	Somme des carrés	Composante de la variance	% de la variance totale
Entre les 10 régions	9	5,39	0,002	0,46 ns
Entre les populations à l'intérieur des régions	23	12,95	0,020	4,02 ***
Intra-populations	113	53,7	0,475	95,52 ***
Total	145	72,03	0,498	

ns, non significatif ; ***, P<0.001.

Tab. 3 : Analyse moléculaire de la variance (AMOVA) des 35 populations de *R. scutatus*.

portion non significative de la variance est attribuée entre les régions (0,46%). Le découpage géographique qui considère les bassins versants ne constitue donc pas un caractère de discrimination régionale des populations de *R. scutatus*. Les tests de différenciation haplotypique entre les régions nous indiquent que seules les régions B7, B8 et B9 se différencient pour leur fréquence haplotypique (Tableau 2).

Corrélation entre distances génétiques et distances géographiques.

L'analyse globale révèle qu'il n'existe pas de relation entre distances génétiques et distances géographiques (r= 0,1298, P= 0,064).

Au niveau régional seul le test de Mantel réalisé pour la région B3 montre une corrélation significative (r= 0,9584, P= 0,039). D'autres tests considérant par exemple les regroupements de régions suggérés par le dendrogramme de la Figure 2 (B2, B3 et B5 ou B1, B2, B3 et B5) n'indiquent pas non plus de corrélations.

DISCUSSION

Diversité et différenciation génétiques

Les indices de diversité de *R. scutatus* présentent une variabilité assez importante alors qu'aucune relation évidente avec la taille des populations n'est révélée. Cette absence de relation n'est cependant pas singulière chez les plantes (COLAS *et al.*, 1997), des processus démographiques plus ou moins anciens, comme par exemple ceux liés au caractère pionnier de *R. scutatus,* pouvant être mieux adaptés que la taille actuelle des populations pour expliquer la diversité génétique des espèces (LANDERGOTT *et al.*, 2001). La comparaison avec des études similaires utilisant des marqueurs RAPD ou des marqueurs de même type comme les AFLPs , est délicate de part l'hétérogénéité entre les études, des effectifs analysés, des stratégies retenues pour le criblage des amorces, des critères retenus lors de la lecture des profils et l'utilisation d'estimateurs variés (TILL-BOTRAUD et GAUDEUL, 2002). Nous pouvons toutefois noter que la diversité observée correspond aux valeurs généralement obtenues pour d'autres espèces communes en altitude [*Trollius europaeus,* (DESPRES *et al.*, 2002) ; *Phyteuma globulariifolium,* (SCHONSWETTER *et al.*, 2002)].

L'analyse de la variance moléculaire a révélé qu'une forte proportion de la variation est concentrée à l'intérieur des populations (environ 96%). Ce haut niveau de variation intrapopulation s'explique en partie par le fait que *R. scutatus* est une espèce pérenne et probablement allogame comme l'espèce alpine *R. nivalis* (Stehlik, 2002) ou autogame optionnelle comme *R. crispus*. Le système de reproduction est, en effet, un des principaux facteurs déterminant la structuration génétique chez les végétaux. Ces espèces présentent une variabilité intrapopulation importante alors que la variation interpopulation est faible. Les espèces autogames au contraire montrent plus de variabilité entre les populations alors que la diversité génétique intrapopulation est réduite (HAMRICK et GODT, 1996). Ainsi bien que sensiblement plus élevée au niveau intrapopulationnel, la répartition de la variabilité génétique est cohérente avec celle constatée pour d'autres espèces d'altitude au mode de reproduction identique [*Trollius europaeus,* (DESPRES *et al.*, 2002) ; *Saxifraga oppositifolia,* (HOLDEREGGER *et al.*, 2002)]. D'autres paramètres peuvent également, en synergie avec le système de reproduction, contribuer à structurer la variabilité génétique. Ainsi, l'existence d'une faible différenciation génétique pourrait s'expliquer par la particularité de l'habitat de *R. scutatus*. Cette espèce possède effectivement une niche écologique étroite puisqu'elle est principalement rencontrée dans les éboulis calcaires ou schisteux (SAULE, 1991). Les populations de *R. scutatus* sont donc généralement des populations éparses d'effectif modéré comme en témoigne notre échantillonnage (Tableau 1). L'extension des populations et les flux de gènes pourraient donc être sensiblement contraints par la fragmentation de l'habitat d'altitude. Cette contrainte pourrait cependant être modérée par l'aptitude de l'espèce à coloniser de nouveaux biotopes à partir d'individus de diverses origines, les graines de *R. scutatus* étant essentiellement transportées par le vent.

Corrélation entre distances génétiques et distances géographiques

En dépit de la faible différenciation génétique observée entre populations au sein des régions et entre l'ensemble des populations, aucune relation simple entre distances génétiques et distances géographiques n'a été révélée. De façon similaire, aucune correspondance n'a été détectée chez le Trolle d'Europe pour les populations pyrénéennes et les populations alpines alors que cette relation est apparente dans les populations de Fennoscandinavie (DESPRES *et al.*, 2002). Ce résultat signifie donc que l'hypothèse d'un isolement par la distance dû à une réduction du flux de gènes ne peut pas être avancée pour *R. scutatus*. Ainsi la faible différenciation observée pourrait résulter de la dérive génétique s'exerçant au sein de chaque population. Cette hypothèse est en accord avec nos observations de terrain montrant que les populations de *R. scutatus* sont fréquemment des populations d'effectifs modérés (=1000 individus). Ces populations seraient donc plus sensibles à la dérive génétique c'est à dire à l'échantillonnage aléatoire des allèles au cours des générations contrairement aux populations dont les effectifs sont plus importants. Alternativement, *R. scutatus* pourrait refléter une situation mixte où plusieurs foyers de recolonisation pyrénéens post-glaciaires entretenant des échanges génétiques alterneraient avec des zones dans lesquelles les populations dériveraient les unes des autres, la distance conduisant dans cette hypothèse à interrompre les flux de gènes.

Implications pour la revégétalisation

Dans un objectif de revégétalisation selon un principe de restauration écologique des milieux, l'utilisation de semences de *R. scutatus* après récolte et multiplication sera

raisonnée en intégrant à nos connaissances les résultats de cette étude génétique. Ainsi la faible structuration génétique révélée et l'absence de profil géographique clair autorisent une certaine latitude pour définir les zones de récolte-utilisation des semences pour les secteurs nord-pyrénéens concernés. En effet, l'établissement des populations de *R. scutatus* s'expliquerait plutôt par une dispersion aléatoire des graines par le vent, les échanges de gènes par le pollen n'apparaissant pas comme un paramètre essentiel dans le profil révélé. De plus, du fait du caractère pionnier de l'espèce nous pouvons penser que l'incidence d'une introduction de nouveaux génotypes pourrait être limitée, l'espèce n'étant qu'un des premiers acteurs dans les successions végétales qui vont s'établir sur les éboulis. Les recommandations générales viseront notamment à utiliser des populations issues de zones d'altitude pour des opérations de revégétalisation pratiquées elles-mêmes en altitude afin de conserver d'éventuels caractères adaptatifs en relation avec les contraintes de ce milieu.

Remerciements

Nous remercions les personnes qui ont contribué à la collecte des échantillons dans les Pyrénées : Jean-Claude Abadie Christophe Bergès, Jocelyne Cambecèdes, Gilles Corriol, Julien Fautoux, Lionel Gire, Nicolas Leblond, Sébastien Lay et David Penin, pour le Conservatoire botanique pyrénéen, Estelle Arricau (UPPA), Michel Barracetti (Réserve d'Eyne), André Baudière, Tatiana Guionnet (Réserve de Nohèdes), Claude Guisset (Réserves de Py et Mantet), Laurent Hazard (INRA de Toulouse), et dans les Alpes : Jérémie Van-Es et Laurent Vinciguerra (Conservatoire Botanique National alpin).

Nous exprimons toute notre gratitude à Sébastien Lay pour la réalisation des cartes ainsi qu'à Estelle Arricau et Julien Fautoux pour leur contribution technique.

Cette étude a été financée par la DATAR-Massif des Pyrénées et par l'Union Européenne.

Références

Bauert (M.R.), Kalin (M.), Baltisberger (M.), Edwards (P.J.), 1998. — No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers. Mol. Ecol., 7, 1519-1527.

Bohonak (A.J.), 2002. — IBD (isolation by distance) : a program for analyses of isolation by distance. J. Hered., 93, 153-154.

Cassan (S.), Cambecèdes (J.), Largier (G.), 2003. — Revégétaliser autrement en montagne pyrénéenne. Acta Bot. Barc., 49, 393-400.

Colas (B.), Olivieri (I.), Riba (M.), 1997. — *Centaurea corymbosa,* a cliff-dwelling species tottering on the brink of extinction : A demographic and genetic study. Proc. Nat. Acad. Sc. (USA), 94, 3471-3476.

Despres (L.), Loriot (S.), Gaudeul (M.), 2002. — Geographic pattern of genetic variation in the European globeflower *Trollius europaeus* L. (Ranunculaceae) inferred from amplified fragment length polymorphism markers. Mol. Ecol., 11, 2337-2347.

Gómez (D.), Sesé (J.A.), Villar (L.), 2003. — The vegetation of the alpine zone in the Pyrenees. In Alpine Biodiversity in Europe, vol. 167, eds. Nagy (L.), Grabherr (G.), Körner (C.) & Thompson (D.B.A.), Berlin Heidelberg : Springer-Verlag 85-92.

Gugerli (F.), Eichenberger (K.), Schneller (J.J.), 1999. — Promiscuity in populations of the cushion plant *Saxifraga oppositifolia* in the Swiss Alps as inferred from random amplified polymorphic DNA (RAPD). Mol. Ecol., 8, 453-461.

Hamrick (J.L.), Godt (M.J.W.), 1996. — Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci., 351, 1291-1298.

Holderegger (R.), Stehlik (I.), Abbott (R.J.), 2002. — Molecular analysis of the Pleistocene history of *Saxifraga oppositifolia* in the Alps. Mol. Ecol., 11, 1409-1418.

Landergott (U.), Holderegger (R.), Kozlowski (G.), Schneller (J.J.), 2001. — Historical bottlenecks, decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris cristata.* Heredity, 87, 344-355.

Langella (O.), 2000. — Population ver 1.2.28, Paris : CNRS.

Lem (P.), Lallemand (J.), 2003. — Grass consensus STS markers : an efficient approach for detecting polymorphism in *Lolium.* Theor.l Appl. Genet., 107, 1113-1122.

Lewontin (R), 1972. — The apportionment of human diversity. Evol. Biol., 381-394.

Lumaret (R.), Barre (V.), 1993. — La variabilité écotypique : une connaissance utile pour la conservation des espèces et le repeuplement des milieux perturbés. Reed, 23-25.

Mantel (N.), 1967. — The detection of disease clustering and generalized regression approach. Cancer Res., 209-220.

Millar (C.I.), Libby (W.J.), 1991. — Strategies for conserving clinal, ecotypic and disjunct population diversity in widespread species. In Genetics and Conservation of Rare Plants, eds. Falk (D.A.) & Holsinger (K.E.), London : Oxford University Press, 149-170.

Miller (M.P.), 1997. — Tools for population genetic analysis (TFPGA) : Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, AZ, USA.

Montalvo (A.M.). Ellstrand (N.C.), 2001. — Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the Subshrub *Lotus scoparius (Fabaceae).* Am. J. Bot. 88, 258-269.

Moore (P.D.), 2000. — Seeds of doubt. Nature, 683-685.

Nei (M.), 1972. — Genetic distance between populations. Am. Nat., 106, 283-292.

Raymond (M.), Rousset (F.), 1995. — An exact test for population differentiation. Evolution, 49, 1280-1283.

Rhymer (J.M.), Simberloff (D.), 1996. — Extinction by hybridization and introgression. Annu. Rev. Ecol. Syst., 27, 83-109.

Sackville Hamilton (N.R.), 2001. — "Is local provenance important in habitat creation? A reply." *Journal of Applied Ecology* **38,** 1374-1376.

Saule (M), 1991. — La grande flore illustrée des Pyrénées. Ed Milan - Randonnées Pyrénéennes, Toulouse.

Schneider (S.), Kuffer (J.), Rossli (D.), Excoffier (L.), 2000. — Arlequin,Version 2.0 : a Software for Population Genetic Data Analysis, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.

Schonswetter (P.), Tribsch (A.), Barfuss (M.), Niklfeld (H.), 2002. — Several Pleistocene refugia detected in the high alpine plant *Phyteuma globulariifolium* Sternb. & Hoppe *(Campanulaceae)* in the European Alps. Mol. Ecol., 11, 2637-2647.

Schonswetter (P.), Tribsch (A.), Schneeweiss (G.M.), Niklfeld, (H.) 2003. — Disjunctions in relict alpine plants : phylogeography of *Androsace brevis* and *A-wulfeniana (Primulaceae).* Bot. J. Linnean Soc., 141, 437-446.

Schonswetter (P.), Tribsch (A.), Stehlik (I.), Niklfeld (H.), 2004. — Glacial history of high alpine *Ranunculus glacialis (Ranunculaceae)* in the European Alps in a comparative phylogeographical context. Biol. J. Linnean Soc., 81, 183-195.

Stehlik (I.), 2002. — Glacial history of the alpine herb *Rumex Nivalis (Polygonaceae)* : a comparison of common phylogeographic methods with nested clade analysis. Am. J. Bot., 89, 2007-2016.

Till-Botraud (I.), Gaudeul (M.), 2002. — Intraspecific genetic diversity in alpine plants. In Mountains biodiversity : a global assessment, eds. Körner (C.) & Spehn (E.), London : CRC PRESS, 23-34.

Tribsch (A.), Schonswetter (P.), Stuessy (T.F.), 2002. — *Saponaria Pumila (Caryophyllaceae)* and the Ice Age in the European Alps. Am. J. Bot., 89, 2024-2033.

Vargas (P.), 2003. — Molecular evidence for multiple diversification patterns of alpine plants in Mediterranean Europe. Taxon, 463-476.

Williams (J.G.K.), Kubelik (A.R.), Livak (K.J.), Rafalski (J.A.), Tingey (S.V.), 1990. — DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic-Markers. Nucl. Ac. Res., 18, 6531-6535.

Yeh (F.), Yang (R.), Boyle (T.), 1997. — POPGENE. The User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis, Molecular and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton.