



Biodiversité/Biodiversity

## Évolution temporelle de la diversité génétique de *Chaerophyllum bulbosum* : conséquences sur la gestion des ressources génétiques



*Temporal evolution of the genetic diversity of Chaerophyllum bulbosum: Consequences on the genetic resources management*

Valérie Le Clerc <sup>a,\*,b,c</sup>, Anita Suel <sup>a,b,c</sup>, Emmanuel Geoffriau <sup>a,b,c</sup>, Sébastien Huet <sup>a,b,c</sup>, Mathilde Briard <sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Agrocampus-Ouest, UMR1345, Institut de recherche en horticulture et semences, SFR 4207 QUASAV, 49045 Angers, France

<sup>b</sup> Université d'Angers, UMR1345, Institut de recherche en horticulture et semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, 49045 Angers, France

<sup>c</sup> Inra, UMR1345, Institut de recherche en horticulture et semences, SFR 4207 QUASAV, 49070 Beaucozéz, France

### INFO ARTICLE

#### Historique de l'article :

Reçu le 30 janvier 2014

Accepté après révision le 26 mars 2014

Disponible sur internet le 2 mai 2014

#### Mots clés :

*Chaerophyllum bulbosum*

Gestion *in situ*

Ressources génétiques

Marqueurs dominants

Dispersion de semences

#### Keywords:

*Chaerophyllum bulbosum*

*In situ* management

Genetic resources

Dominant markers

Seed dispersal

### R É S U M É

Afin d'accroître le pool génétique nécessaire à l'amélioration variétale du cerfeuil tubéreux, apiacée alimentaire en pleine expansion, des prospections de populations sauvages sur deux campagnes successives ont été réalisées dans les bassins du Rhin et de la Weser, en Allemagne. Ces populations, principalement ripariennes, sont susceptibles d'être façonnées par les évolutions des réseaux hydrographiques qui caractérisent leur biotope. L'étude moléculaire de la diversité génétique des populations montre une structuration forte entre ces populations sauvages ( $G_{ST} \sim 32\%$ ), mais ne met pas en évidence d'effet structurant des réseaux hydrographiques sur cette diversité, ni de phénomène d'érosion génétique global. Une discussion sur la stratégie de maintien de la diversité de cette espèce à long terme est proposée.

© 2014 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### A B S T R A C T

To increase the germplasm necessary for varietal improvement of tuberous-rooted chervil, a food apiaceae of increasing importance, two successive surveys of wild populations were carried out in Germany, in the Rhine and the Weser River basins. These mainly riparian populations are likely to be shaped by changes in hydrographic networks that characterize their habitat. Molecular studies have shown a strong structuration between wild populations ( $G_{ST} \sim 32\%$ ), but did not reveal any structuring effect of the hydrographic network on diversity or any global phenomenon of genetic erosion. A discussion about the strategy for maintaining the diversity of this species on a long-term period is proposed.

© 2014 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [valerie.leclerc@agrocampus-ouest.fr](mailto:valerie.leclerc@agrocampus-ouest.fr) (V. Le Clerc).

## Abridged English version

To address the demand for vegetable farmers for diversification, a genetic breeding program undertaken by the INHP (French National Institute of Horticulture and Landscape) in 1982 made it possible to reintroduce a “forgotten vegetable”, tuberous-rooted chervil [1,2]. However, to ensure a sustainable future for this vegetable and to satisfy the new expectations of producers, it is essential to broaden its genetic base. For this purpose, samplings of wild populations were carried out in France and Germany, in the Rhine and the Weser River basins.

Tuberous-rooted chervil grows in dense populations, mainly in habitats along river banks. Different observations in the field have shown that these riparian populations are likely to be shaped by changes in hydrographic networks that characterize their habitat. The way that seeds are dispersed is also a key element in the structuring of the genetic diversity of plant populations and, in particular, hydrochory, which allows seeds to be dispersed over very long distances [3].

We therefore proposed to carry out a study involving two successive surveys of wild populations in order to assess the scope and structuring of the genetic diversity of these populations and to determine whether or not possible modifications of the hydrographic network would have an impact on this diversity.

In 1999 and in 2002, 12 wild populations of tuberous-rooted chervil were collected in Germany, in the Ill/Rhine and Weser River basins (Fig. 1). They were chosen on the basis of their location, either in proximity to or along one or the other of these hydrographic networks, their biotype characteristics, and nearby land-use developments (Table 1). Following a molecular analysis, 53 AFLP markers and 31 ISSR polymorphic markers were obtained. The level of differentiation observed between 12 chervil populations, i.e., ten populations collected in 1999 and two in 2002, was high, with a  $G_{ST}$  value of 0.323 (Table 4). Nevertheless, 64 % of the total variation ( $H_T = 0.332$ ) was due to intrapopulation variation ( $H_S = 0.225$ ).

The average distances between two populations, linked (e.g., 1.1 and 4.1) or not (e.g., 1.1 and 1.3) by a river system are not significantly different, regardless of the physical distance that separates them (Table 5). In fact, populations 1.1 and 1.4, which are geographically very far away from each other, are not more genetically distant than two populations that are closer physically, i.e., 1.1 and 1.3.

When we compared the genetic diversity of the sampled populations in both 1999 and 2002 (Table 3), we observed that the average level of diversity had not considerably changed and that the total level of differentiation of these five populations sampled between 1999 and 2002 was very low, on the order of 3 % ( $G_{ST} = 0.023$ ). Globally, according to Factor Analysis (Fig. 2), some of the individuals sampled in 1999 were the same as those sampled in 2002, but nonetheless, each population appeared to be clearly identified.

The study of the genetic diversity of wild populations of tuberous-rooted chervil reveals that terrestrial populations have a level of diversity similar to that of river populations.

The hypothesis that a structuring effect on hydrographic networks exists was not confirmed by our analysis. The differences in populations sampled on two hydrographic networks are not greater among themselves than the differences between two populations of the same network. In other words, the majority of the total variation is observed between populations of the same network and not between populations of different hydrographic networks. These results do not challenge the hypothesis that chervil seed dispersal can take place via these networks. Our analyses even confirm this hypothesis, since two very geographically distant populations located within the same river system, such as populations 1.1 and 4.1, are no more genetically distant than two very physically close populations, one terrestrial (population 1.2) and the other riparian (population 1.1). The low level of differentiation estimated between five populations sampled in 1999 and in 2002 does not reveal any evidence of overall genetic erosion.

This research made it possible to anticipate an eventual erosion of the available diversity by defining a conservation strategy that takes biotope characteristics and their influence on the genetic diversity observed into account.

## 1. Introduction

Pour répondre à une volonté de diversification des productions de la part des maraîchers, un programme d'amélioration génétique a été entrepris par l'INHP (Institut national de l'horticulture et du paysage) dès 1982, pour assurer la relance du cerfeuil tubéreux (*Chaerophyllum bulbosum*), une apiacée à haute valeur ajoutée [1,2]. Ce programme a permis l'obtention de deux nouvelles variétés qui ont fait chacune l'objet d'un certificat d'obtention variétale et la mise en place d'une filière de production et de valorisation.

Le marché du cerfeuil tubéreux étant en pleine extension, les zones de production se sont élargies, allant désormais du Nord de la France à la pointe de la Bretagne. Parallèlement, la demande des professionnels s'est amplifiée, conduisant à de nouveaux critères de sélection, notamment en termes de résistance aux maladies de conservation. La base génétique sur laquelle a reposé le premier redéploiement de cette espèce, en particulier à l'origine des deux cultivars inscrits au catalogue officiel, est trop étroite pour permettre de répondre à ces nouveaux critères. Il est donc très rapidement apparu nécessaire d'augmenter le niveau de diversité génétique du matériel pouvant servir de base à la sélection, pour ce critère tout autant que pour d'autres à venir.

Le matériel cultivé connu à ce jour ne présente pas cette diversité souhaitée. Il convient donc d'aller prospecter le compartiment sauvage. Aucune étude préalable n'ayant été publiée sur la diversité génétique de cette espèce, plusieurs questions se posent : existe-t-il un réel réservoir d'intérêt dans les populations sauvages de *C. bulbosum* ou, autrement dit, quelle est l'étendue de la diversité génétique des populations sauvages de cette espèce ? Comment cette diversité potentielle est-elle structurée ? Faut-il conserver différents génotypes *ex situ* ou bien la

conservation *in situ* suffira-t-elle dans une optique durable de maintien et d'exploitation de la diversité ? Si un maintien *ex situ* est nécessaire, comment raisonner un échantillonnage pertinent ?

Dans l'optique de répondre à ces questions, des prospections de populations sauvages ont été engagées en 1999.

Le cerfeuil tubéreux se trouve à l'état sauvage en Europe centrale principalement, mais également dans d'autres régions d'Europe, comme l'Est de la France [2]. Cette espèce vit en populations denses dans les plaines au niveau d'orées alluviales constituant des biotopes frais et ombrés. Les populations sauvages se trouvent essentiellement dans des habitats de bords de rivières. Diverses observations sur le terrain ont montré que ces populations ripariennes, sans être en danger immédiat, sont susceptibles d'être façonnées par les évolutions des réseaux hydrographiques qui caractérisent leur biotope. Le mode de dispersion des semences est également un élément potentiellement déterminant dans la structuration de la diversité génétique de populations de plantes et tout particulièrement, l'hydrochorie qui permet la dispersion des semences sur de très longues distances [3].

Nous avons donc proposé de mener une étude sur deux campagnes successives de prospection pour :

- évaluer l'étendue et la structuration de la diversité génétique de ces populations ;
- voir comment cette diversité évolue au cours du temps en fonction d'éventuelles modifications du réseau hydrographique, telles que les aménagements de berge, les crues ou encore les activités économiques ou de loisirs.

Dans cette optique, nous souhaitons évaluer le niveau de diversité génétique présent au sein de populations sauvages de cerfeuil tubéreux prospectées dans les bassins du Rhin et de la Weser, en Allemagne. Ces travaux doivent également permettre d'anticiper une éventuelle érosion de la diversité disponible, en définissant une stratégie de conservation prenant en compte les caractéristiques du biotope et leur influence sur la diversité génétique observée.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Deux prospections ont été effectuées en 1999 et en 2002, dans les bassins de l'Ill/Rhin et de la Weser, en France et en Allemagne (Fig. 1). Des feuilles de 88 individus appartenant à 12 populations ont été collectées pour l'étude. Les populations prospectées ont été choisies en fonction de leur localisation sur l'un ou l'autre des réseaux hydrographiques ou à proximité, de la nature du biotope et des aménagements réalisés à proximité (Tableau 1). Les populations échantillonnées sont, soit terrestres, soit fluviales, c'est-à-dire désignant respectivement des populations isolées de tout cours d'eau ou établies sur les berges directes d'un cours d'eau.

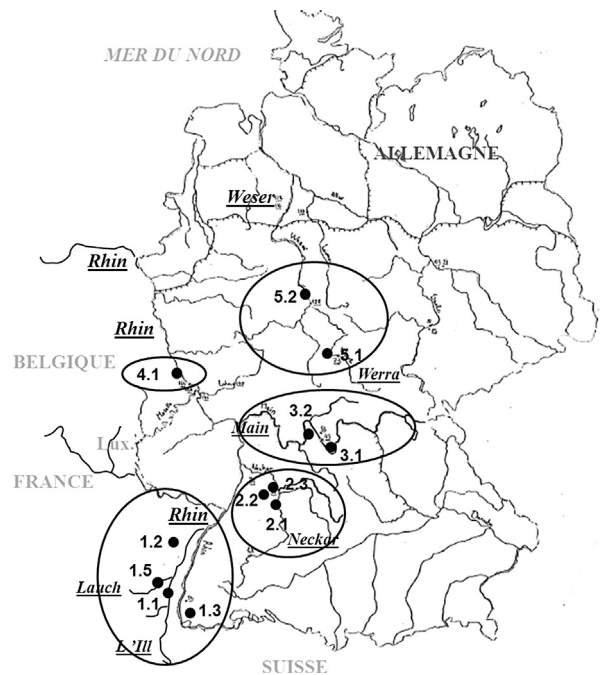


Fig. 1. Carte du réseau hydrographique allemand et répartition des stations prospectées.

Le nom des populations est codé par un premier chiffre qui correspond à différentes zones géographiques sur ou à proximité d'un réseau hydrographique, un deuxième chiffre qui correspond à une population échantillonnée dans la zone en question. Par exemple, 2.1 correspond à la population fluviale 1, qui se situe au bord du Rhin, dans la zone géographique 2, correspondant au Neckar. Le code de la population est suivi de 0,99 ou 0,02 pour faire référence à l'année de prospection, 1999 ou 2002, respectivement.

À chaque point prospecté, la localisation (relevé des coordonnées GPS) et les caractéristiques du biotope ont été enregistrées dans un carnet de prospection. La réserve naturelle de Reguisheim (point de collecte de la population 1.1), visitée aux deux dates, n'ayant subi aucune intervention humaine, est considérée comme la référence de l'étude. Elle se situe près de Mulhouse et sur les bords de l'Ill, rivière affluente du Rhin.

### 2.2. Analyse moléculaire

Les échantillons foliaires collectés ont été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , puis lyophilisés avant d'être broyés dans de l'azote liquide. Les ADN ont été obtenus selon le protocole de Briard et al. [4], auquel nous avons apporté des modifications. En effet, le tampon d'extraction est concentré deux fois et contient du PVP-10 (3 %) et du bisulfite de sodium (2 %). Avant de stocker les ADN extraits au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ , leur qualité a été vérifiée sur gel d'agarose 0,8 %.

Six couples d'amorces AFLP et deux amorces ISSR (Tableau 2) ont été utilisés pour obtenir les matrices de présence (1) ou absence (0) des marqueurs. Le protocole AFLP utilisé est celui décrit par Briard et al. [4] et le protocole ISSR est celui décrit par Le Clerc [5].

**Tableau 1**

Codes et caractéristiques des populations de cerfeuil tubéreux échantillonnées et localisation des stations prospectées.

Code station	Types	Nom et situation géographique de la station	Stations visitées		Taille de la population en 2002
			1999	2002	
1.1	F	<b>Réserve de l'Eiblen-Reguisheim</b> bord de l'III (Rhin)	x	x	> 5000
1.2	T	<b>Finhai-Obernai</b> aucune rivière	x	x	100
1.3	T	<b>Steinestadt-Mulhouse</b> bord du Rhin	x	x	300–500
1.4	F	<b>Rouffach-pont</b> bord du Lauch (III/Rhin)		x	100
1.5	F	<b>Rouffach-grand site</b> bord du Lauch (III/Rhin)		x	1000
2.1	F	<b>Heilbronn-Badwimpfen</b> amont de la centrale nucléaire bord du Neckar (Rhin)		x	1000
2.2	T	<b>Heilbronn-Badwimpfen</b> bord du Neckar (Rhin)	x	x	500
2.3	F	<b>Heilbronn-Badwimpfen</b> bord du Neckar (Rhin)	x	x	> 2000
3.1	F	<b>Margets höchheim-Würzburg</b> bord du Main (Rhin)	x		300
3.2	T	<b>Thüngen-Würzburg</b> bord du Main (Rhin)	x		500
4.1	F	<b>Andernach-Koblenz</b> bord du Rhin	x		> 3000
5.1	F	<b>Tiefenort-Eisenach</b> bord de la Werra (Weser)	x		> 5000
5.2	F	<b>Gimte-Kassel</b> bord de la Weser	x		> 5000

F : fluviale ; T : terrestre.

### 2.3. Analyse statistique

Nous avons évalué la fréquence des marqueurs dans l'ensemble des populations et pour chaque population, le pourcentage de marqueurs présents, leur présence ou non

**Tableau 2**

Liste des amorces utilisées pour l'analyse moléculaire.

Nom des amorces	Extension EcoR I/Mse I pour les amorces AFLP ou séquences nucléotidiques 5'–3' des amorces ISSR
AFLP-P1	AAG/CAG
AFLP-P2	AGG/CTC
AFLP-P5	AAG/CTC
AFLP-P6	AAG/CTA
AFLP-P14	AGC/CAT
AFLP-P15	AAC/CTG
ISSR 5	VHVCTCTCTCTCTCTCT
ISSR 9	HVHTCTCTCTCTCTCTCT

V = G, A – H = A, T, C.

dans chacune d'elles et calculé un indice de diversité génétique moyen ( $H_e$ ) d'après la formule de Nei [6].

Nous avons également calculé différents paramètres de différenciation entre toutes ces populations ou entre groupes de populations. Ces groupes ont été formés en prenant en compte, soit l'année de prospection d'une population, (dans ce cas, par exemple, sont comparées cinq populations prospectées en 1999 et ces mêmes populations prospectées en 2002), soit son appartenance à une zone géographique particulière d'un réseau hydrographique. La diversité totale des groupes comparés ( $H_T$ ) est décomposée en diversité intra-groupes ( $H_S$ ) et diversité intergroupes ( $D_{ST}$ ). Les paramètres de différenciation ( $G_{ST}$ ) sont calculés de telle sorte que  $G_{ST} = D_{ST}/H_T$ . Ce coefficient de différenciation entre populations ou groupe de populations ( $G_{ST}$ ) traduit la proportion de la diversité génétique totale due à la variabilité interpopulations ou intergroupes. Les calculs d'indices de diversité et de paramètre de différenciation ont été obtenus à partir du logiciel POPGENE version 1.32 [7].

Des calculs de distances basés sur l'indice de Sokal et Michener [8] ont été réalisés entre tous les individus de différentes populations, comparées deux à deux. À partir de ces distances, des analyses de variance ont été réalisées entre trois couples de populations appartenant à différentes zones géographiques, l'objectif étant de voir si le réseau hydrographique est structurant ou non pour la diversité. Seules les distances moyennes entre populations sont présentées. Les calculs de distance ont été faits avec le logiciel Darwin 4.0 [9] et l'Anova avec le logiciel STATGRAPHICS Plus for Windows 3.1.

Une analyse factorielle sur tableau de distances (AFTD) a été réalisée sur cinq populations collectées à la fois en 1999 et en 2002, avec le logiciel Darwin 4.0. Afin de faciliter l'analyse visuelle, les individus les plus extérieurs à chaque population sont reliés entre eux sur le graphe.

## 3. Résultats

### 3.1. Niveau de variabilité génétique des populations de cerfeuil tubéreux

Au total, 53 marqueurs AFLP et 31 marqueurs ISSR polymorphes ont été obtenus, ce qui représente respectivement une moyenne de 8,8 et 15,5 marqueurs par amorce AFLP et ISSR.

Les indices  $H_e$  de diversité moyens de chaque population sont compris entre 0,124 pour la population 1.3.99 et 0,299 pour la population 2.3.99, et le pourcentage de marqueurs présents varie de 63 % pour la population terrestre 1.3 à 88 % pour la population fluviale 2.3 et la population terrestre 3.2 (Tableau 3).

Dans l'ensemble des 12 populations échantillonnées en 1999 et 2002, 81 marqueurs sur 84 analysés ont été retrouvés au minimum dans deux populations.

### 3.2. Structuration de la variabilité génétique

Le niveau de différenciation observé entre 12 populations de cerfeuil tubéreux, à savoir dix populations collectées en

**Tableau 3**  
Indices de diversité ( $H_e$ ) et pourcentage de marqueurs présents dans chaque population.

Année de prospection			1999			2002		
Codes	Stations prospectées	Types	$n$	$H_e$	$P$	$n$	$H_e$	$P$
1.1	Eiblen–Reguisheim	F	6	0,246 (0,209)	79	4	0,233 (0,211)	79
1.2	Finhai–Obernai	T	6	0,214 (0,207)	79	5	0,126 (0,178)	81
1.3	SteinStadt–Mulhouse	T	5	0,124 (0,186)	63	4	0,134 (0,195)	70
2.2	Heilbronn–Badwimpfen	T	6	0,244 (0,214)	79	5	0,203 (0,213)	85
2.3	Heilbronn–Badwimpfen	F	6	0,299 (0,202)	88	4	0,206 (0,202)	87
3.1	Margets höchheim–Würzburg	F	6	0,259 (0,216)	81			
3.2	Thüngen–Würzburg	T	5	0,261 (0,199)	88			
4.1	Andernach–Koblenz	F	5	0,253 (0,207)	86			
5.1	Tiefenort–Eisenach	F	5	0,221 (0,200)	81			
5.2	Gimte–Kassel	F	6	0,261 (0,210)	81			
1.5	Rouffach	F				5	0,176 (0,207)	83
2.1	Heilbronn–Badwimpfen	F				5	0,256 (0,213)	87

F : fluviale ; T : terrestre ; S : taille de la population en 2002 ;  $n$  : nombre d'individus échantillonnés ;  $p$  : pourcentage de marqueurs présents.

**Tableau 4**  
Paramètres de différenciation obtenus pour différents groupes de populations.

Différenciation analysée	Populations ou groupes de populations comparés	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$
Entre toutes les populations	12 populations (10 en 1999 et 2 en 2002)	0,346	0,234	0,323
Entre réseaux hydrographiques	(3.1, 4.1)/(5.1,5.2) Rhin/Weser	0,314	0,294	0,064
	(3.1, 3.2)/(2.1, 2.3) Main/Neckar	0,334	0,313	0,064
Entre périodes d'échantillonnage	(1.1, 1.2, 1.3, 2.2, 2.3 en 1999)/2002	0,361	0,353	0,023

$H_T$  : diversité totale ;  $H_S$  : diversité intra-groupes ;  $G_{ST}$  : indice de différenciation.

1999 et deux en 2002, est élevé, avec une valeur de  $G_{ST}$  égale à 0,323 (Tableau 4). Cependant, 64 % de la variation totale ( $H_T = 0,346$ ) est due à la variation intrapopulation ( $H_S = 0,234$ ).

Si l'on s'intéresse à la structuration de la diversité génétique des populations en fonction de leur réseau hydrographique d'appartenance, l'indice de différenciation entre les populations 3.1 et 4.1 situées le long du Rhin et les populations 5.1 et 5.2 situées le long de la Weser est très faible, avec un  $G_{ST}$  de 0,064. Le même niveau de différenciation est observé entre les populations 3.1 et 3.2 échantillonnées le long du Main et les populations 2.1 et 2.3 du Neckar.

Les distances moyennes entre deux populations reliées (par exemple 1.1 et 4.1) ou non (comme 1.1 et 1.3) par l'intermédiaire d'un réseau fluvial ne sont pas significativement différentes, et ce, quelle que soit la distance physique qui les sépare (Tableau 5). En effet, les populations 1.1 et 1.4, très distantes géographiquement l'une de l'autre, ne sont pas plus éloignées que deux populations beaucoup plus proches physiquement, à savoir 1.1 et 1.3.

### 3.3. Érosion de la variabilité génétique dans le temps

Lorsque l'on compare la diversité génétique des populations échantillonnées à la fois en 1999 et en 2002, à savoir les populations 1.1, 1.2, 1.3, 2.2 et 2.3

(Tableau 3), le niveau de diversité moyen évolue peu, excepté pour les populations 1.2 et 2.3, car leur indice  $H_e$  passe respectivement de 0,214 et 0,299 à 0,126 et 0,206. Il faut cependant remarquer que dans tous les cas, les populations de 2002 ont un effectif échantillonné légèrement inférieur à celui de 1999. Le niveau de différenciation totale de ces cinq populations échantillonnées entre 1999 et 2002 est très faible, de l'ordre de 3 % ( $G_{ST} = 0,023$  ; Tableau 4).

Globalement, d'après l'AFTD (Fig. 2), les individus échantillonnés en 1999 se retrouvent confondus avec ceux

**Tableau 5**  
Moyennes des distances de Sokal et Michener calculées entre tous les individus des couples de populations analysées.

Couples de populations analysées	Distances inter-populations	Connexion fluviale
1.1 ; 1.3	0,347	Non
1.1 ; 4.1	0,361	Oui
1.3 ; 4.1	0,382	Non
2.3 ; 2.2	0,330	Non
2.3 ; 2.1	0,324	Oui
2.2 ; 2.1	0,337	Non



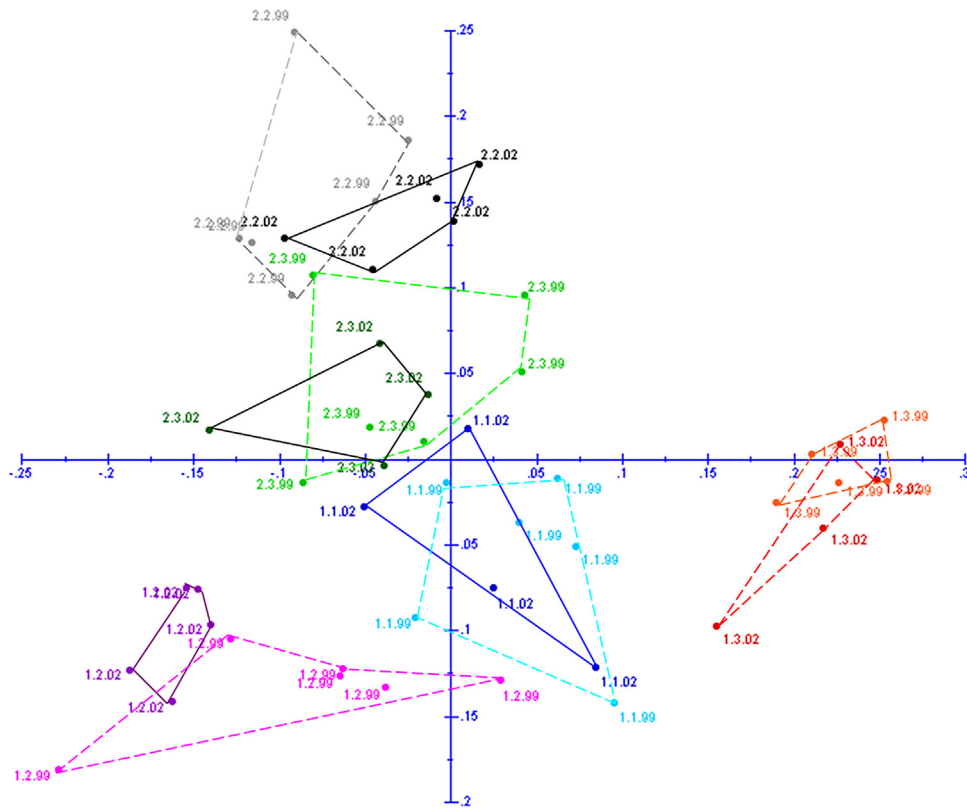


Fig. 2. (Couleur en ligne.). Analyse factorielle sur tableau de distances réalisée sur cinq populations de cerfeuil tubéreux échantillonnées en 1999 et 2002.

échantillonnés en 2002 et seule la population 1.2 montre un net resserrement en 2002, mais, quoi qu'il en soit, chaque population apparaît clairement identifiée.

#### 4. Discussion

L'étude de la diversité génétique de populations sauvages de cerfeuil tubéreux n'avait, à notre connaissance, jamais été réalisée. Nous n'avons par conséquent que peu de recul concernant cette espèce, mais il semble que la diversité rencontrée parmi les populations que nous avons échantillonnées ( $H_e \sim 0,22$ ) soit conforme à ce que l'on peut attendre pour une espèce allogame. Il faut noter que, dans notre cas, nous avons travaillé avec des marqueurs dominants. Or les indices de diversité sont bien évidemment dépendants du type et du nombre de marqueurs analysés, comme en témoignent les études de Wu et al. [10] ou de Gaudeul et al. [11] qui analysent la diversité génétique à l'aide de marqueurs dominants et codominants. Quoi qu'il en soit, des valeurs de diversité similaires aux nôtres ont été obtenues pour des populations d'*Eryngium alpinum*, autre apiacée allogame (valeur moyenne de  $H_e \sim 0,20$ ) analysée à l'aide de marqueurs AFLP [11] ou des populations de chênes rouges californiens, espèce également allogame analysée à l'aide de marqueurs RAPD [12]. Tout comme pour ces derniers auteurs, nos valeurs d'écart types obtenus sur les indices de diversité sont élevées. Des études précédentes ont déjà montré que l'état dominant et bi-allélique des marqueurs

augmente la variance des estimateurs [13]. Notre échantillonnage est aussi probablement insuffisant pour connaître avec précision ces indices de diversité, mais les comparaisons de ces indices entre populations restent néanmoins possibles. Globalement, les populations terrestres présentent un niveau de diversité similaire à celui des populations fluviales.

Bien que la diversité génétique totale de l'espèce soit en grande partie due à la diversité génétique intrapopulation, la différenciation observée entre les 12 populations de cerfeuil est élevée ( $G_{ST} \sim 32\%$ ). L'examen des marqueurs au cas par cas montre que cette structuration repose, soit sur des différences de fréquences de marqueurs entre populations, soit sur le fait que certains marqueurs sont absents dans certaines populations. Cependant, il n'a pas été trouvé de marqueurs qui soient spécifiques d'une population. D'après l'examen de l'AFTD, la seule population qui se détache nettement des autres est la population 1.2. Il est à noter que cette population présente le plus petit effectif ( $N \sim 100$ ) et fait partie des populations terrestres. Cette population isolée probablement sujette à la consanguinité s'homogénéise de plus en plus et se différencie des autres populations. Krutovskii et al. [14] ont montré que l'utilisation de marqueurs dominants peut conduire à surestimer la différenciation lorsque les effectifs échantillonnés sont trop faibles. Dans notre cas, la différenciation observée entre les 12 populations est probablement en partie due à ce problème. Cependant, le réseau hydrographique ayant probablement un rôle important à jouer

en matière de dissémination des semences de cerfeuil tubéreux, nous avons pensé qu'il pourrait être à l'origine de la structuration observée.

L'hypothèse d'un quelconque effet structurant des réseaux hydrographiques n'a pas été confirmée par notre analyse. En effet, des populations échantillonnées sur deux réseaux hydrographiques ne sont pas plus différentes entre elles que deux populations d'un même réseau. En d'autres termes, la majorité de la variation totale est observée entre populations d'un même réseau et non entre populations de réseaux différents. Nos résultats sont préliminaires et seraient à confirmer sur un nombre plus important de populations échantillonnées sur ces différents réseaux hydrographiques. Ces résultats ne remettent pas en cause l'hypothèse selon laquelle la dissémination des semences de cerfeuil tubéreux peut être effectuée par l'intermédiaire de ces réseaux. Nos analyses confortent même cette hypothèse, car deux populations très éloignées géographiquement telles que les populations 1.1 et 4.1, mais situées sur un même cours d'eau, ne sont en fait pas plus distantes génétiquement que deux populations très proches l'une de l'autre, l'une étant terrestre (population 1.2) et l'autre étant fluviale (population 1.1). Seul un échantillonnage plus grand permettrait de voir si la diversité des populations le long d'un cours d'eau représente un continuum et notamment de voir si les populations en amont de ces cours d'eau sont effectivement susceptibles de contribuer à l'établissement des populations en aval.

Le faible niveau de différenciation estimé entre cinq populations échantillonnées en 1999 puis en 2002 ne met pas en évidence de phénomène d'érosion génétique global. Cependant, le niveau de diversité de la population terrestre 1.2 a très nettement diminué. Il ne s'agit pas de perte d'allèles, mais plus exactement d'évolution des fréquences de ces allèles, ce qui est confirmé par un pourcentage de marqueurs présents dans cette population entre 1999 et 2002, qui ne diminue pas. Le niveau de diversité des populations terrestres 1.1 et 1.3 s'est, quant à lui, maintenu. Ces populations sont d'effectif plus important que la population 1.2. Au vu de ces résultats, il semble que le facteur qui agisse prioritairement sur la diversité génétique de ces populations terrestres soit la taille de ces populations, les populations de petit effectif étant le plus sujettes à la dérive génétique. Quant aux populations fluviales, un autre facteur semble capable de façonner la diversité de ces populations. En effet, si la population fluviale 1.1 prospectée dans la réserve de l'Eiblen-Reguisheim et dont l'effectif estimé est supérieur à 5000 n'a montré aucune différence de niveau de diversité génétique entre 1999 et 2002, il n'en est pas de même pour la population fluviale 2.3, d'effectif supérieur à 2000 plantes, pour laquelle on constate une diminution de la diversité génétique. Cette population étant en aval d'une centrale nucléaire, il se peut qu'elle ne bénéficie plus d'un brassage génétique suffisamment important assuré par l'approvisionnement en semences de populations qui seraient en amont de cette centrale et que, par conséquent, elle ait tendance à s'homogénéiser. Ce résultat conforte l'hypothèse du rôle disséminateur joué par le réseau hydrographique.

En conclusion, cette étude a mis en évidence de la diversité ainsi qu'une structuration forte entre populations sauvages de cerfeuil tubéreux. Cette diversité ne semble pas menacée par un phénomène d'érosion qui soit à l'heure actuelle incontrôlable et, par conséquent, il n'apparaît pas indispensable d'intervenir de façon urgente pour sauvegarder une population en particulier. En effet, aucune d'entre elles ne présente de spécificité en matière de richesse allélique. Ces résultats préliminaires sont néanmoins importants pour pouvoir établir une stratégie de maintien de la diversité à long terme.

Il semble que le maintien *in situ* des populations existantes de cerfeuil tubéreux permette de constituer un réservoir de diversité génétique de l'espèce. L'existence de la réserve naturelle de Reguisheim constitue un atout dans ce processus de maintien de la diversité du cerfeuil tubéreux, puisqu'elle héberge au minimum une population qui présente une grande part de la diversité échantillonnée dans notre étude (78,6 % de marqueurs présents). Cette population terrestre d'effectif important est, par conséquent, peu sujette à la dérive génétique, ce que nous avons pu constater pour notre période d'étude. Le maintien des autres populations, et tout particulièrement des populations fluviales qui sont généralement de taille importante, est à surveiller. En effet, nous ne sommes pas à l'abri de la disparition totale et rapide de certaines populations à la suite d'aménagements de berges ou de tout autre aménagement, comme ce fut le cas pour une population que nous avons prospectée à Rouffach en 1996 et qui a totalement disparu en 2002, consécutivement à l'aménagement d'une station d'épuration. Comme le souligne Petit et al. [15], plusieurs généticiens des populations ont déjà montré que le critère qui semble le plus efficace pour mesurer la diversité génétique, et tout particulièrement dans une optique de conservation des ressources génétiques, est la richesse allélique. Marshall et Brown [16] considèrent que la préservation des allèles est plus importante que le maintien des fréquences alléliques. En d'autres termes, il semble préférable de conserver une ou des populations susceptibles de présenter un maximum d'allèles plutôt que de vouloir conserver certains génotypes en particulier. Par conséquent, en complément de la population 1.1 maintenue dans la réserve, il nous semble intéressant de conserver *in situ* une autre population qui soit complémentaire à celle-ci en termes de marqueurs. La population 3.2 nous semble intéressante, car elle se situe dans un parc près du Main donc elle est, a priori, moins susceptible d'extinction qu'une population située sur les berges d'un cours d'eau. Elle pourrait facilement faire l'objet d'une conservation *in situ* pour peu que les autorités locales soient alertées sur le sujet.

En parallèle à ce maintien *in situ* de la diversité, il nous semble prudent d'envisager la collecte de certaines populations permettant de couvrir la richesse allélique existante. Nous pourrions inclure, à cet effet, la population 1.1 de la réserve et une ou deux autres populations dont la population 3.2, susceptibles de conserver une proportion significative de la diversité. Ces populations pourront être maintenues de façon *ex situ* à l'INHP, Agrocampus-Ouest, car nous disposons d'une chambre froide à 4 °C, 35 % HR, permettant d'assurer une longue conservation. Ce maintien permettrait non seulement de constituer un « double de sécurité », mais

également pourrait faire l'objet d'une étude ultérieure pour comparer un mode de conservation statique à un mode de conservation dans lequel les populations *in situ* sont sujettes à diverses pressions environnementales (pression de pathogènes, changements climatiques...) et évaluer ainsi la capacité d'adaptation du matériel sauvage à son écosystème. La comparaison de la diversité génétique de la population maintenue dans la réserve avec celle des autres populations échantillonnées permettrait de refaire le point sur une éventuelle érosion de la diversité sur une échelle de temps plus importante.

### Déclaration d'intérêts

Les auteurs n'ont pas transmis de déclaration de conflits d'intérêts.

### Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement Jean-Yves Péron et Jean-Pierre Reduron pour leur participation à ce programme, et plus spécifiquement aux prospections, ainsi qu'Oscar Ayala-Garay, Damien Peltier et Dominique Dumet pour leur participation aux prospections. Ce projet a été soutenu financièrement par l'Institut français de la biodiversité. Merci également à Gail Wagman pour sa traduction de la version abrégée en anglais.

### Références

- [1] J.-Y. Péron, D. Dubost, Revalorization of lost vegetables: a contribution to preservation of genetic resources, *Acta Hort.* 318 (1992) 263–270.
- [2] J.-Y. Péron, M. Briard, Breeding advances in tuberous-rooted chervil (*Chaerophyllum bulbosum* L.), a new 'old vegetable' among the Apiaceae, *Acta Hort.* 598 (2002) 235–242.
- [3] H. Jacquemyn, O. Honnay, K. Van Looy, P. Breyne, Spatiotemporal structure of genetic variation of a spreading metapopulation on dynamic riverbanks along the Meuse River, *Heredity* 96 (2006) 471–478.
- [4] M. Briard, V. Le Clerc, D. Grzebelus, D. Senalik, P.W. Simon, Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLPtm analysis using silver stain or radioisotope, *Plant Mol. Biol. Rep.* 18 (2000) 235–241.
- [5] V. Le Clerc, Étude de la diversité génétique chez la carotte (*Daucus carota* L.) : mise au point de stratégies d'analyse et de régénération des ressources génétiques, thèse de doctorat, université d'Angers, Angers, 2001 (124 p).
- [6] M. Nei, Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 70 (1973) 3321–3323.
- [7] F.C. Yeh, R.C. Yang, T. Boyle, POPGENE, Version 1.21: a Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetic Analysis, Department of renewable resources, University of Alberta, Edmonton, Canada, 1997
- [8] R.R. Sokal, C.D. Michener, A statistical method for evaluating systematic relationships, *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38 (1958) 1409–1438.
- [9] X. Perrier, A. Flori, F. Bonnot, Data analysis methods, in : P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier, J.C. Glaszmann (Eds.), *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, Enfield Science Publishers, Montpellier, 2003, pp. 43–76.
- [10] J. Wu, K.V. Krutovskii, S.H. Strauss, Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers, *Genome* 41 (1999) 893–908.
- [11] M. Gaudeul, I. Till-Bottraud, F. Barjon, S. Manel, Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers, *Heredity* 92 (2004) 508–518.
- [12] R.S. Dodd, N. Kashani, Molecular differentiation and diversity among the California red oaks section *Lobatae*, *Theory Appl. Genet.* 107 (2003) 884–892.
- [13] M. Lynch, B.G. Milligan, Analysis of population genetic structure with RAPD markers, *Mol. Ecol.* 3 (1994) 91–99.
- [14] K.V. Krutovskii, S.Y. Erofeeva, J.E. Aagaard, S.H. Strauss, Simulation of effects of dominance on estimates of population genetic diversity and differentiation, *J. Hered.* 90 (1999) 499–502.
- [15] R. Petit, A. El Mousadik, O. Pons, Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers, *Conserv. Biol.* 12 (1998) 844–855.
- [16] D.R. Marshall, H.D. Brown, Optimum sampling strategies in genetic conservation, in : O.H. Frankel, J.G. Hawkes (Eds.), *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1975, pp. 53–80.