ETUDE GENETIQUE DES POPULATIONS ALSACIENNES D'ŒILLET SUPERBE, *DIANTHUS SUPERBUS* L.

Laurent Hardion, Isabelle Combroux

Laboratoire Image Ville Environnement
UMR CNRS Université de Strasbourg

Rapport final, juillet 2016

Photographie : M. Pouvreau

S

SOMMAIRE

CONTEXTE.....5

PROBLEMATIQUE.....6

MATERIEL & METHODES.....6

RESULTATS & DISCUSSION.....10

CONCLUSION : IMPLICATIONS DANS LA STRATEGIE DE CONSERVATION DE L'ESPECE.....19

VALORISATION ET PERSPECTIVES.....20

REFERENCES.....21

ANNEXES.....23

CONTEXTE

Le projet de suppression du passage à niveau 6 à Reichstett (67), qualifié de préoccupant sur le plan de la sécurité, a pour but de sécuriser son franchissement par l'élargissement de la plate-forme routière et la construction d'un ouvrage en passage supérieur de la RD63, au-dessus de la ligne SNCF Strasbourg-Lauterbourg – localisation (Figure 1). Cette suppression est considérée comme prioritaire au niveau national et s'inscrit à ce titre dans une politique nationale et départementale d'amélioration de la sécurité des passages à niveau. L'enjeu environnemental que présente le secteur des travaux a été identifié dès les études préliminaires au projet réalisées en 2001-2002 (Ecolor) et en 2005 (Est Ingénierie, 2007).

Les inventaires floristiques menés lors de l'étude d'impact en 2008-2011 ont précisé les enjeux flore et habitats. Ils ont en particulier mis en évidence la présence de l'Œillet superbe, *Dianthus superbus* L. (Caryophyllaceae), espèce protégée au niveau national, au sein de la prairie jouxtant le giratoire D63/D468 qui sera impactée par les travaux. Le Conseil Départemental du Bas-Rhin, maître d'ouvrage, a été autorisé à détruire, altérer et déplacer les spécimens d'Œillets superbes, *D. superbus* sur le secteur des travaux par l'arrêté préfectoral du 19 avril 2013 portant dérogation aux interdictions de destructions et de transferts d'espèces protégées, sous réserve de la mise en œuvre et du suivi des différentes opérations de transplantations et de compensations, ainsi que de l'élaboration d'une stratégie de conservation des prairies relictuelles à *D. superbus* dans le Ried Nord Alsacien.

Le cahier des charges prévoit notamment un volet de caractérisation génétique des populations alsaciennes pour la prise en compte de leur structure génétique dans les stratégies d'intervention, de conservation et de transplantation, ainsi que de la différentiation des sous-espèces de *Dianthus superbus* dans les populations alsaciennes.

PROBLEMATIQUE

Les objectifs initiaux de l'étude génétique des populations d'œillets superbe alsaciennes visent à fournir des résultats utiles à l'optimisation de la conservation de l'espèce. En concertation avec le Conservatoire Botanique d'Alsace (CBA), ces objectifs ont été définis ainsi :

i. Quelle est la diversité génétique présente dans les stations de *D. superbus* en Alsace? Quelles sont les stations les plus diversifiées, les plus différenciées, à conserver en priorité ?
ii. Quelle est la structure génétique populationnelle dans le Ried Nord ? Quelles sont les continuités et les barrières environnementales dans la reproduction et la dispersion de l'espèce ?
iii. Que représentent les populations du Ried Nord dans la structure génétique régionale (échelle écologique), nationale (échelle administrative, statut de protection), puis globale (échelle phylogéographique) de l'espèce ?
iv. Quelles distinctions génétiques, morphologiques et écologiques existent entre les trois sous-espèces actuellement considérées en Alsace ? Cette taxonomie infraspécifique est-elle cohérente ?

D'un point de vue pratique, les données génétiques récoltées sur cette espèce doivent ensuite orienter les mesures de transplantation, de compensation et de restauration en préservant le patrimoine génétique de l'espèce, voire en dynamisant le pool génétique de certaines populations. Ces données pourront aussi être croisées avec les données écologiques de terrain, afin de tester une potentielle corrélation entre la gestion agricole (trophie) des prairies et la structure génétique de l'espèce.

MATERIEL & METHODES

Echantillonnage. Suite à l'obtention d'une dérogation pour le prélèvement de matériel végétal, nous avons échantillonné 130 individus en région Alsace (Figure 1c), répartis sur 28 stations, dont 22 dans le seul Ried Nord (Figure 1d). Cet échantillonnage s'appuie sur le travail de recensement exhaustif de l'espèce dans le Ried Nord, réalisé en 2013-2014 par Marine Pouvreau (CBA ; Pouvreau 2014). L'étude génétique exhaustive des 32 000 individus recensés dans cette zone étant irréaliste, nous avons partitionné les

effectifs du Ried Nord en 15 groupes géographiques cohérents (utilisation d'un algorithme de partitionnement des k-moyennes), pour échantillonner une à deux prairies au hasard par groupe, et trois à cinq individus par prairie. Les parcelles cadastrales de prairies ont été utilisées comme délimitations de populations en raison de leur importance dans la structure paysagère. La délimitation des groupes géographiques n'a cependant pas été pondérée par les effectifs, et les écarts d'effectifs entre groupes peuvent être considérables (Cf. Pouvreau 2014). Cet échantillonnage a été monté et déposé à l'Herbier de Strasbourg (STR).

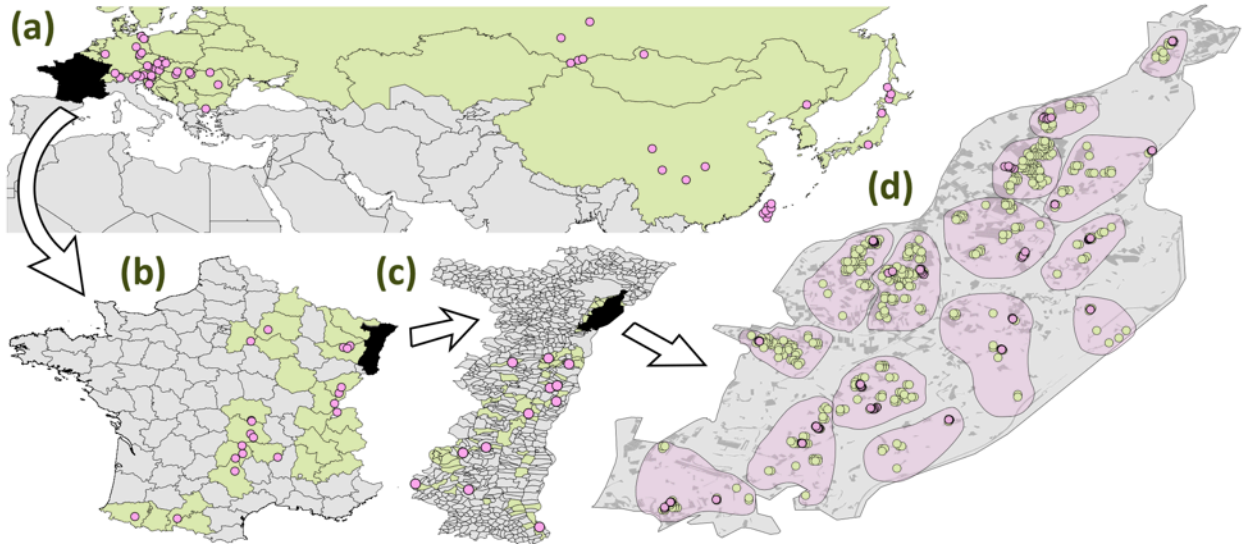


Figure 1. Distribution géographique de *Dianthus superbus* (zones et points verts) et localisation de l'échantillonnage (points roses) à différentes échelles spatiales. (d) Dans le Ried Nord, les zonages roses indiquent les 15 partitions géographiques de la distribution exhaustive de l'espèce.

A ces 28 populations alsaciennes s'ajoutent 24 autres populations françaises dont l'échantillonnage a été assuré par les Conservatoires Botaniques Nationaux du Bassin Parisien, de Franche-Comté, du Massif Central et de Midi-Pyrénées, et des Jardins Botanique de Mulhouse, Nancy et Strasbourg, sous la forme d'échantillons d'herbier ou de semences (Figure 1b).

Avec le soutien de Michel Hoff, conservateur de l'Herbier de Strasbourg, les prêts inter-herbiers nous ont permis d'élargir notre échantillonnage à travers la distribution euro-sibérienne de l'espèce (Figure 1a), avec 95 spécimens d'herbier prêtés par les Herbiers de Brno (BRN, République Tchèque), Edimbourg (Ecosse), Leipzig (LI,

Allemagne), Strasbourg (STR, France), Taipei (TAIF, Taiwan) et Vienne (WU, Autriche). Au total, 273 individus ont été réunis pour cette étude. Les cartes de distribution ont été générées dans un système d'information géographique supporté par QGIS v.2.4 (QGIS Development Team 2015).

Analyse génétique. Parmi cet échantillonnage, 83 individus ont été utilisés pour les analyses génétiques, en n'analysant dans un premier temps que trois individus par population. L'extraction d'ADN génomique a suivi le protocole de Doyle et Doyle (1987) avec de légères modifications.

Suivant la littérature scientifique, les marqueurs génétiques classiques tels que les séquences d'ADN chloroplastiques et nucléaires parviennent difficilement à renseigner le polymorphisme génétique dans le genre *Dianthus* (Balao *et al.* 2010 ; Valente *et al.* 2010). La présente étude s'appuie donc sur des méthodes moléculaires à plus haute résolution, dites "empreintes multilocus", tel que l'Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Cette méthode permet de générer un grand nombre de marqueurs moléculaires dominants pouvant caractériser chaque individu à une échelle plus fine. Par l'action de deux enzymes de restriction (EcoRI et Tru1I), cette méthode consiste à découper le génome de chaque individu en des sites similaires, et à étudier le polymorphisme génétique représenté par les différentes tailles de fragments d'ADN obtenus. Cette méthode suit le protocole de Vos *et al.* (1995), avec de légères modifications (Hardion *et al.* 2014). L'amplification sélective des marqueurs s'est faite à partir d'un couple d'amorces +3, dont une seule (Eco+3) marquée par le fluorochrome FAM. Afin de sélectionner les marqueurs répétables, dix réplicats ont été réalisés pour des individus sélectionnés au hasard. La révélation finale sur électrophorégrammes a été produite sur un séquenceur ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem), prestation réalisée par la plateforme de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (UPR CNRS, Strasbourg). Par la suite, cette méthode pourra être renforcée par l'étude de 16 sites microsatellites (Smulders *et al.* 2000, 2003), marqueurs co-dominants apportant une information supplémentaire sur l'importance de la reproduction sexuée et du brassage génétique au sein des populations (hors budget CBA).

L'analyse des éléctrophorégrammes s'est faite à l'aide du logiciel GeneMapper V.4.1 (Applied Biosystem). La sélection des marqueurs a été réalisée manuellement sur

sous-échantillonnage d'un individu par population, par la correction d'un jeu de marqueurs défini automatiquement sur l'ensemble de l'échantillonnage. Suite à une nouvelle analyse automatique sur le jeu de marqueurs final, les dix réplicats ont été utilisés pour supprimer tout marqueur non-répétable. La vérification manuelle de la présence ou de l'absence de chaque marqueur pour chaque individu n'a pas encore été réalisée pour le présent rapport. Ce point méthodologique non-négligeable pourra significativement modifier les résultats du rapport final.

Les indices génétiques tels que le pourcentage de fragments polymorphes, la diversité génétique de Nei (1973) et l'indice de différentiation des populations ('down-weighted fragment values', *DW* ; Schönswetter & Tribsch 2005) par population ont été calculés en utilisant les fonctions du script *AFLPdat* (Ehrich 2006) dans l'environnement de programmation R v.3.1.1 (R Development Core Team 2016). L'analyse de variance moléculaire, le nombre de fragments privés ou fréquents à moins de 25% des individus et le test de Mantel ont été réalisés à l'aide de GenAlEx v.6.502 (Peakall & Smouse 2012).

Analyse morphométrique. Afin de tester la cohérence des quatre sous-espèces de *D. superbus*, 24 variables morphométriques (Figure 2) ont été mesurées sur 119 échantillons, dont 44 pour la sous-espèce (ssp.) *superbus* (prairies planitaires), 27 pour ssp. *alpestris* (prairies d'altitudes), 16 pour ssp. *sylvestris* (forestier, lisières), 29 pour ssp. *longicalycinus* (S-E asiatique). Dans la mesure du possible, les mesures ont été répétées sur trois individus par échantillons, puis moyennées. Par manque de représentation dans l'échantillonnage, la mesure de la longueur de la capsule a été écartée de l'analyse finale. Les rares mesures manquantes ont été remplacées par la moyenne totale par variable pour l'analyse finale. Afin de rendre compte de la variabilité et du pouvoir discriminatoire de chaque variable morphométrique entre sous-espèces, des boites à moustaches ont été réalisées, annotées du R^2 ajusté indiquant le taux de variabilité entre les sous-espèces expliqué par le facteur considéré. Par la suite, une analyse en composantes principales représentant l'ensemble du jeu de données a permis de figurer globalement la cohérence des sous-espèces, ainsi que les variables les plus discriminantes. Ces analyses ont été réalisées dans l'environnement de programmation R v.3.1.1 (R Development Core Team 2016) à l'aide d'*ade4* (Dray & Dufour 2007).

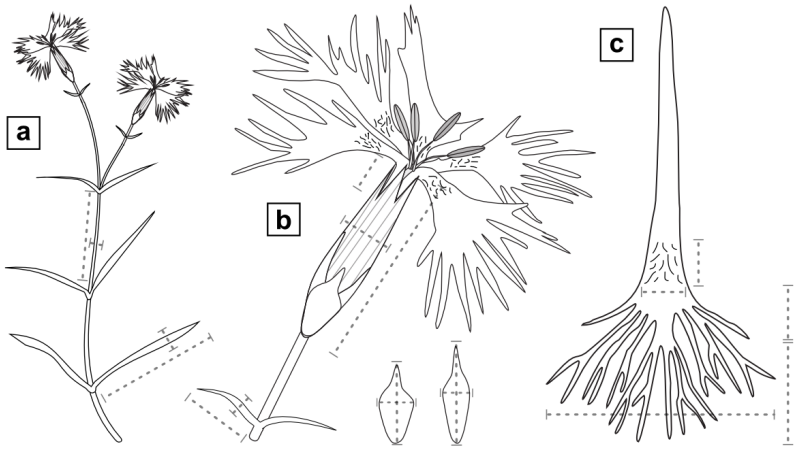


Figure 2. Description des variables 24 morphométriques mesurées sur (a) les parties végétatives, (b) les fleurs et (c) les pétales.

RESULTATS ET DISCUSSION

Diversité et structure génétique. Les 83 individus analysés ont permis l'obtention de 272 marqueurs analysables après retrait des fragments non-répétables, dont 264 (97%) se sont avérés polymorphiques sur l'ensemble de notre échantillonnage. Ce résultat démontre la variabilité génétique non négligeable des populations alsaciennes de *D. superbus*, légitimant une considération de cette part de la biodiversité (diversité génétique) dans les stratégies de conservation de l'espèce. A titre d'exemple, les pourcentages de polymorphisme des marqueurs AFLPs pour des graminées clonales à des échelles géographiques pourtant plus larges avoisinent au maximum les 30% (Hardion *et al.* 2014).

A l'intérieur des populations (Tableau 1), cette variabilité diminue drastiquement pour varier de 15.3 à 35.1% de marqueurs polymorphes par population. Si ces résultats semblent souligner une diversité génétique plus faible à l'échelle intra-populationnelle qu'à l'échelle inter-populationnelle, cette interprétation doit être relativisée par le faible nombre d'individus analysés par population (n = 3), permettant d'évaluer la structure génétique de l'espèce, mais pas de conclure sur la diversité réelle de chaque population. Un plus grand nombre d'individus ne pouvait être assumé compte tenu du budget alloué à l'étude. Cependant, la distribution de cette diversité est assez homogène à travers le Ried Nord et L'Alsace (Figures 3A et 3B). Les indices de différentiation génétique tel que le nombre de marqueurs spécifiques par population montre que la plupart des 30 populations ne présentent pas de marqueurs spécifiques (n = 18) ou seulement un (n = 6). Ainsi, les populations à l'échelle du Ried Nord ou même de l'Alsace semblent peu

différenciées. Cependant, suivant l'indice de différentiation génétique *DW*, la population la plus différenciée est localisée dans le Ried Nord (La Wantzenau), avec une valeur relativement forte, voire aberrante par rapport au reste de l'échantillonnage et au vue de sa position géographique centrale dans le Ried Nord (Tableau 1 ; Figure 3C). Cette différentiation excessive pourrait s'expliquer par une hybridation passée avec une autre espèce de *Dianthus* puis par l'introgression de cet hybride (croisements successifs de l'hybride avec une des espèces parentes) avec *D. superbus* (Andersson-Kotto & Gairdner 1931). En effet, les hybridations interspécifiques dans le genre *Dianthus* peuvent donner des hybrides fertiles et interféconds avec une espèce parente, tendant à lui ressembler morphologiquement dès deux à six générations introgressées (Williams 1892). Le seul autre œillet indigène dans les prairies de fauches alsaciennes est *Dianthus carthusianorum*, mais son hybride avec *D. superbus* a été décrit comme stérile (Föcke 1881 ; Carolin 1957), contrairement à ceux issus de l'hybridation de *D. superbus* avec des espèces horticoles comme *D. plumarius* ou *D. caryophyllus*, cultivées en Alsace. A l'exception de cette population 'outlier', l'indice de différentiation le plus fort est attribué à la seule population échantillonnée à l'extérieur de l'Alsace, à Bannans (Franche-Comté). Ce résultat témoigne potentiellement d'une différentiation génétique plus nette à l'échelle inter-régionale, hypothèse qui sera testée par nos travaux futurs sur un plus large échantillonnage par la phylogéographie de l'espèce.

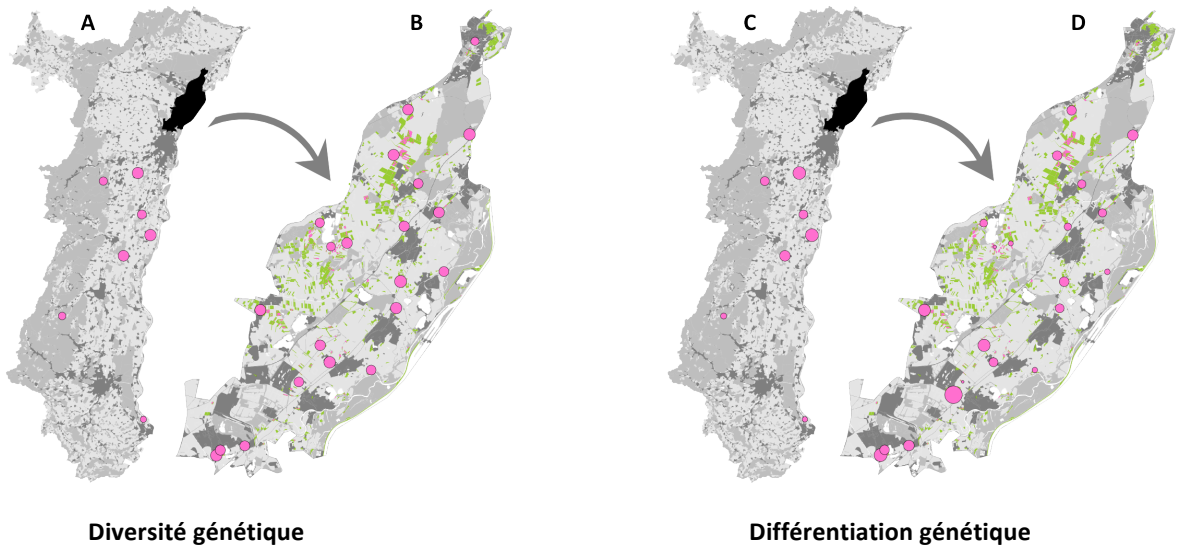


Figure 3. Répartition géographique à travers l'Alsace (A, C) et plus précisément le Ried Nord (B, D) des indices de diversité (*D* ; A, B) et différentiation (*DW* ; C, D) génétiques de chaque population.

Tableau 1. Indices génétiques et localisation géographique (Latitude et longitude) des populations alsaciennes analysées, dont le pourcentage de marqueurs polymorphe par populations (%PF), la diversité génétique (*D* ; 'Gene diversity', Nei 1973), l'hétérozygotie attendue (He), le nombre de marqueurs privés, *i.e.* présents uniquement dans une population (SF), le nombre de fragments présent chez moins de 25% des individus de l'échantillonnage (LCF 25%), et la différentiation génétique (*DW* ; 'down-weighted fragment values', Schönswetter & Tribsch 2005) par population. SD, écartype.

Localité	Code	Lat	Long	%PF	*D* ± SD	He ± SD	SF	LCF 25%	DW
Ried Nord (Nord Alsace)									
Reichstett	11A	48.637	7.757	33.2	0.221 ± 0.019	0.152 ± 0.014	2	14	416.1
La Wantzenau	11B	48.663	7.812	15.3	0.102 ± 0.015	0.072 ± 0.011	0	16	601.2
La Wantzenau	11C	48.669	7.820	28.0	0.187 ± 0.018	0.127 ± 0.013	0	6	197.1
Kilstett	11D	48.678	7.843	33.2	0.221 ± 0.019	0.145 ± 0.013	0	16	298.4
Kilstett	11E	48.686	7.837	30.2	0.201 ± 0.019	0.129 ± 0.012	4	16	393.2
Hoerdt	11F	48.705	7.795	20.9	0.209 ± 0.025	0.115 ± 0.014	2	11	384.1
Gries	11G	48.745	7.842	26.9	0.179 ± 0.018	0.114 ± 0.012	0	12	269.2
Schirrhein	11H	48.796	7.911	31.0	0.206 ± 0.019	0.139 ± 0.013	0	16	313.1
Reichstett	11Z	48.639	7.760	26.9	0.193 ± 0.019	0.126 ± 0.013	0	11	311.3
Reichstett	14A	48.640	7.778	28.7	0.192 ± 0.018	0.134 ± 0.013	3	10	342.3
La Wantzenau	14B	48.673	7.872	28.0	0.187 ± 0.018	0.128 ± 0.013	0	8	227.8
Gambsheim	14C	48.702	7.893	21.6	0.216 ± 0.025	0.120 ± 0.014	0	13	294.3
Offendorf	14D	48.714	7.898	23.1	0.231 ± 0.026	0.128 ± 0.014	0	11	316.9
Offendorf	14E	48.718	7.929	28.4	0.189 ± 0.018	0.136 ± 0.014	0	6	231.2
Herrlisheim	14F	48.746	7.929	30.6	0.204 ± 0.019	0.139 ± 0.013	0	14	281.9
Drusenheim	14G	48.760	7.915	28.0	0.187 ± 0.018	0.130 ± 0.013	0	8	283.6
Soufflenheim	14H	48.782	7.954	22.4	0.224 ± 0.026	0.124 ± 0.014	0	9	346.4
Soufflenheim	14I	48.826	7.963	24.3	0.162 ± 0.017	0.108 ± 0.012	0	4	185.4
Oberhoffen/moder	9A	48.775	7.898	32.1	0.214 ± 0.019	0.142 ± 0.013	1	12	312.2
Herrlisheim	9B	48.740	7.903	29.9	0.199 ± 0.019	0.133 ± 0.013	1	4	261.2
Bischwiller	9C	48.734	7.861	30.6	0.204 ± 0.019	0.134 ± 0.013	0	12	221.7
Gries	9D	48.733	7.849	25.7	0.172 ± 0.018	0.116 ± 0.013	0	5	203.0
Sud Alsace									
Petit Ballon	18A	48.006	7.149	23.1	0.154 ± 0.017	0.106 ± 0.012	0	8	237.5
Sundhouse	18B	48.270	7.633	32.8	0.219 ± 0.019	0.150 ± 0.014	1	18	413.6
Innenheim	20A	48.489	7.587	32.1	0.214 ± 0.019	0.148 ± 0.014	3	17	408.8
Ottrott	20B	48.468	7.403	16.4	0.164 ± 0.023	0.091 ± 0.013	1	5	296.5
Huttenheim	20C	48.344	7.595	17.5	0.175 ± 0.023	0.097 ± 0.013	0	11	296.8
Ohnenheim	20D	48.204	7.486	31.0	0.206 ± 0.019	0.138 ± 0.013	1	16	345.0
Petite Camargue	31A	47.630	7.540	20.5	0.137 ± 0.016	0.091 ± 0.011	1	5	226.7
Franche-Comté									
Bannans	CF	46.900	6.250	35.1	0.234 ± 0.019	0.155 ± 0.013	2	19	423.5

Lat, latitude; Long, longitude; %PF, pourcentage de marqueurs polymorphiques; *D*, Diversité génétique de Nei (Nei Gene diversity); He, hétérozygotie attendue; SF, marqueurs spécifiques; LCF25%, marqueurs présents chez moins de 25% des individus, *DW*, indice de différentiation génétique (frequency down-weighted marker value).

L'analyse de variance moléculaire (AMOVA, tableau 2) confirme la faible différenciation des populations avec un pourcentage de variation génétique très majoritairement situé entre les individus au sein des populations (~90%), et non pas entre les populations. En ce sens, la diversité génétique observée en Alsace et dans le Ried Nord ne présente pas de structuration notable. Afin de confirmer cette absence de structuration d'un point de vue géographique de la diversité génétique, la corrélation entre les distances génétiques et géographiques entre chaque individu a été testée par un correlogramme de Mantel au sein du Ried Nord (Figure 4). Cette corrélation a pu être

significativement mise en évidence entre des individus distants de moins de 1,17 km, distance au-delà de laquelle les distances génétiques et géographiques ne présentent plus de corrélation (résultats non présentés).

Tableau 2. Analyse de variance moléculaire (AMOVA) au sein du Ried Nord (et en Région Alsace)

	dl	SS	MS	Var	%Var
Inter-population	22 (27)	687.7 (864.2)	31.3 (32.0)	2.7 (3.2)	10.3% (11.9%)
Intra-population	42 (50)	991.7 (1162.0)	23.6 (23.2)	23.6 (23.2)	90.7% (88.1%)
Total	64 (77)	1679.4 (2026.2)	54.9 (55.3)	26.3 (26.4)	100% (100%)

dl, degré de liberté; SS, somme des carrés; MS, mean square; Var., variance estimée

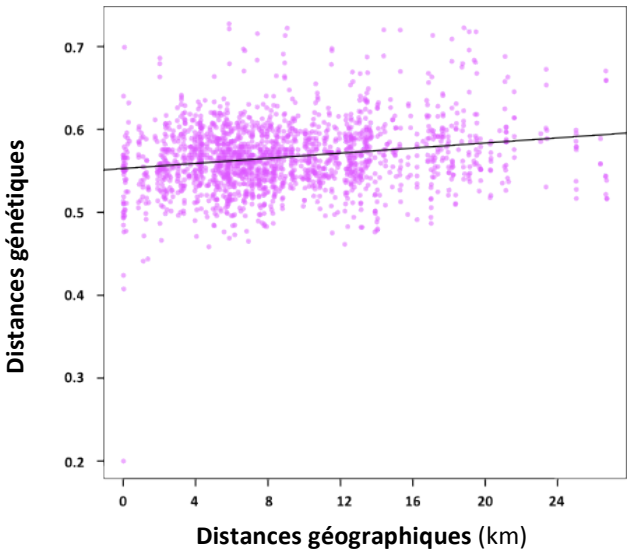


Figure 4. Absence de corrélation entre distances géographiques et distances génétiques (distance de Jaccard) au-delà de 1,17 km.

Ce constat de faible structuration spatiale du patrimoine génétique d'une espèce se développant dans des agrosystèmes n'est cependant pas surprenant, puisqu'il a déjà été démontré sur des messicoles telles que *Centaurea cyanus* L. (Asteraceae) (Le Corre *et al.* 2014 ; Petit *et al.* 2015), *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) (Kati et al. 2013) ou encore *Alopecurus myosuroides* Huds. (Poaceae) (Menchari *et al.* 2007). Dans ces études comme dans le cas de *Dianthus superbus* en Alsace, deux arguments peuvent être avancés : (i) la pollinisation entomogame (*i.e.* par les insectes), qui, en milieux ouverts assez bien connectés, permet un brassage génétique important de proche en proche ; (ii) l'impact

anthropique en milieu agropastoral, impliquant de nombreux vecteurs de dispersion (*e.g.* dispersion involontaire sur les faucheuses ; transferts de foin ; ensemencement des prairies avec les débris collectées en grange). Dans le cas de *Dianthus superbus*, l'absence de structuration à l'échelle de la Région Alsace implique forcément un impact anthropique dans la dispersion et l'absence de structuration génétique de l'espèce par mélange de génotypes, certainement depuis de nombreuses décennies.

Un des questionnements initiaux amenant à la présente étude s'interrogeait sur le régime de reproduction de cette espèce herbacée pérenne, présentant des habilités pour se multiplier végétativement (limitant le brassage et la diversité génétique), mais aussi pour produire de nombreuses graines chaque année (favorisant le brassage génétique). Cette espèce étant régulièrement coupée avant sa fructification dans les prairies de fauches alsaciennes, sa multiplication végétative et une faible diversité génétique pouvaient être attendues. Cependant, la présente étude démontre la présence d'une diversité génétique non-négligeable chez *D. superbus* en Alsace, et l'absence de structuration et de différentiation inter-population témoignent d'un brassage génétique et donc du régime de reproduction sexué de l'espèce.

Des analyses plus poussées au sein du Ried Nord n'ont pas permis de mettre en évidence des corrélations entre les indices génétiques populationnels et la taille des populations (nombre d'individus ; données recueillies en 2013-2014 par le CBA ; Pouvreau 2014), la taille de la prairie (m^2), son isolement géographique par rapport aux autres prairies (pondéré ou non par les effectifs), sa connectivité écologique aux autres prairies (évaluée dans Graphab 2.0 ; Clauzel *et al.* 2016), et le nombre d'espèces mésotrophes présentes dans la prairie, indicateur de l'état trophique de cette prairie et donc de sa gestion (fertilisation, eutrophication) par les agriculteurs (données recueillies en 2013-2014 par le CBA ; Pouvreau 2014). Cependant, cette absence de corrélation doit ici aussi être relativisée par le faible nombre d'individus caractérisant chaque population (Figures 5 & 6).

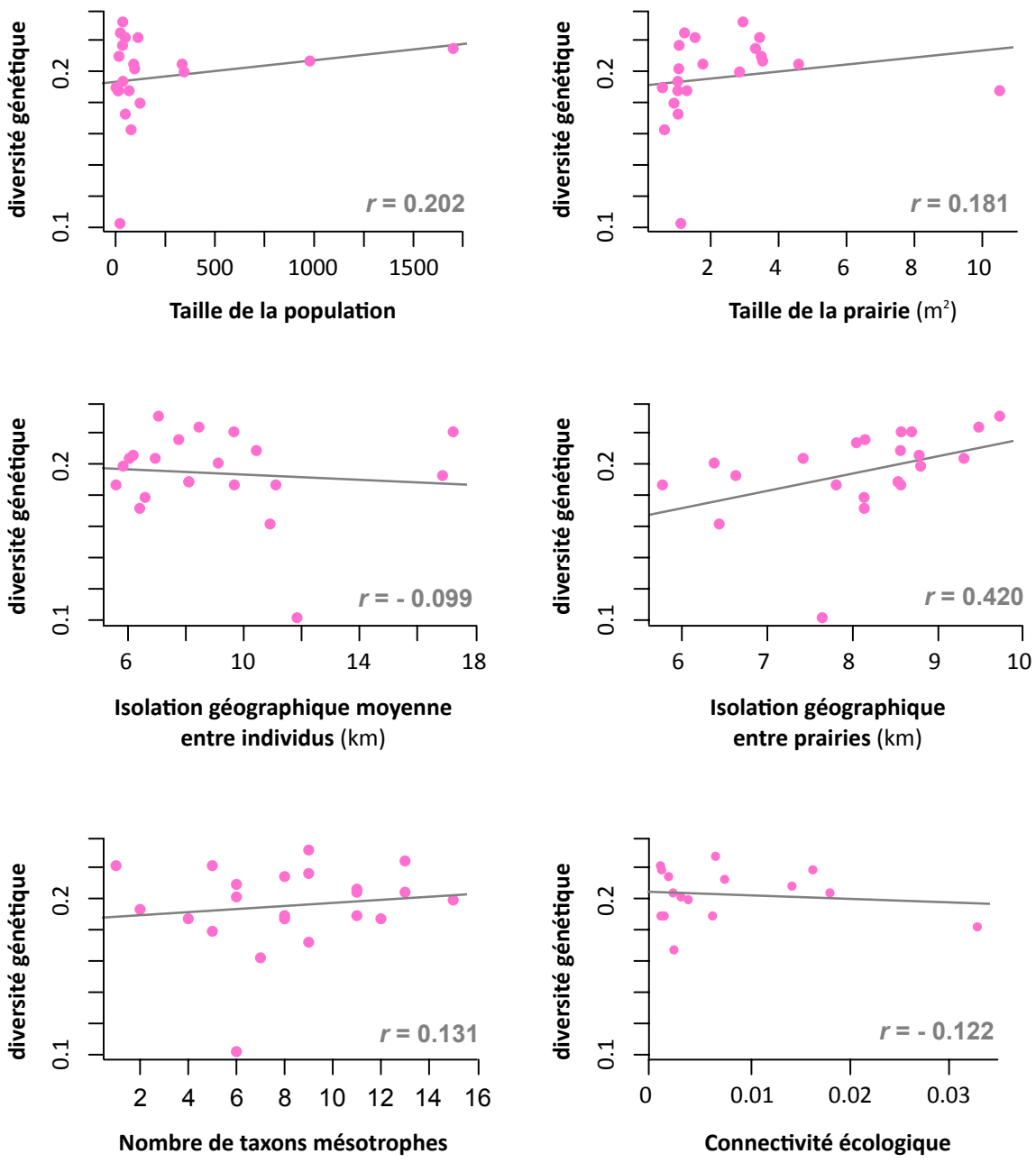


Figure 5. Corrélation (coefficient de Pearson) entre la diversité génétique estimée par population (Gene diversity de Nei) et la taille des populations (nombre d'individus dénombrés ; Pouvreau 2014), la taille de la prairie (surface en m^2), son isolement géographique estimé comme une moyenne de l'isolement entre tous individus au sein du Ried Nord (i.e. pondéré par la démographie), ou entre centroïdes des prairies, le nombre de taxons mésotrophes par prairie (indicateur de l'état trophique des prairies ; Pouvreau 2014) et la connectivité écologique des prairies au sein du Ried Nord (évaluée dans Graphab 2.0).

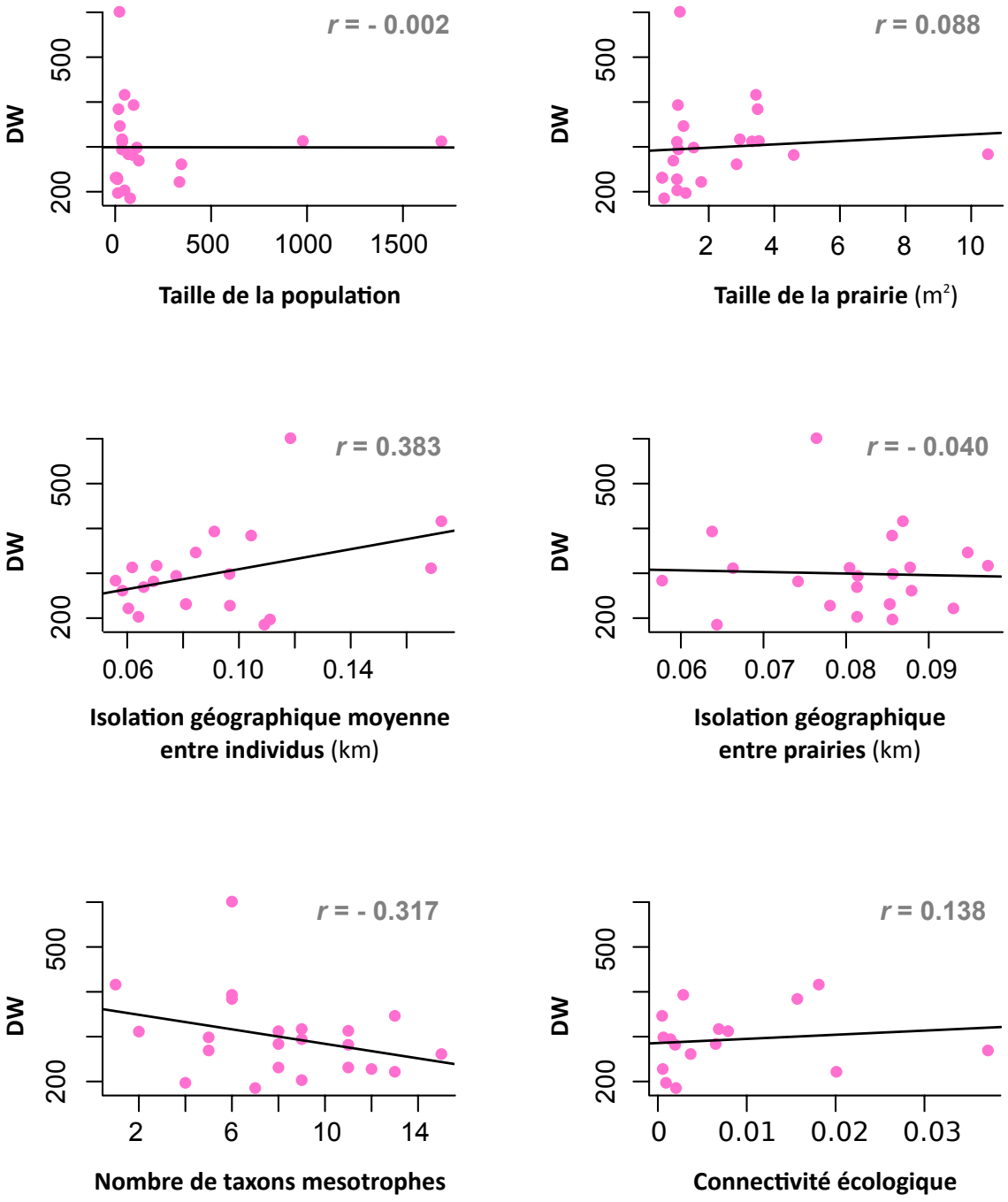


Figure 6. Corrélation (coefficient de Pearson) entre la différentiation génétique estimée par population (DW) et la taille des populations (nombre d'individus dénombrés ; Pouvreau 2014), la taille de la prairie (surface en m²), son isolement géographique estimé comme une moyenne de l'isolement entre tous individus au sein du Ried Nord (i.e. pondéré par la démographie), ou entre centroïdes des prairies, le nombre de taxons mésotrophes par prairie (indicateur de l'état trophique des prairies ; Pouvreau 2014) et la connectivité écologique des prairies au sein du Ried Nord (évaluée dans Graphab 2.0).

Différenciation morphométrique des sous-espèces. La représentation sous forme de boîtes à moustaches par sous-espèces des 23 variables démontre l'absence de caractères morphométriques non-chevauchants, et donc la différenciation relativement limitée des sous-espèces de *Dianthus superbus* (Figure 7). Cependant, les tests ANOVA soulignent des différences significatives pour 18 variables, majoritairement attribuées à la différenciation de la ssp. *longicalycinus* (supportée par 10 variables). Ainsi, les tests ANOVA ne détectent plus que 10 variables significativement différentes en ne considérant que les trois ssp. européennes. La ssp. *longicalycinus* se distingue par son calice long et large (LC & dC), mais aussi par des feuilles plus larges (laF & lapF), un pétale large à sa base (laech & latri), et des échancrures peu profondes (Lechap). Dans une moindre proportion, la ssp. *alpestris* montre une légère différenciation suivant celle de ssp. *longicalycinus* vers des tailles plus grandes (*e.g.* dC, ladC, LpF, lapF, labi), mais peu de caractères la différencient de l'ensemble de l'échantillonnage, et elle reste plus proche des ssp. *sylvestris* et *superbus*. Ces deux dernières sont très largement similaires.

Ce patron de différenciation se retrouve logiquement sur le premier plan principal de l'ACP (Figure 8), représentant 38% de la variabilité du jeu de données, avec une première composante forte (axe horizontal, 24%) différenciant assez bien la ssp. *longicalycinus* des ssp. *sylverstris* et *superbus*, et la ssp. *alpestris* occupant une position intermédiaire bien que plus chevauchante avec la ssp. *superbus*. La seconde composante (axe vertical, 14%) permet de renforcer la différenciation entre la ssp. *longicalycinus* et la ssp. *alpestris*

Figure 7 (figure en page suivante). Variabilité morphométrique (boites à moustaches), tests post-hoc (caractères en gris) et taux de variabilité intergroupe expliquée (R^2 ajusté, valeurs en noir) par variable entre les quatre (et les trois) sous-espèces de *Dianthus superbus*, ssp. *longicalycinus* (n = 29 ; points jaunes), ssp. *alpestris* (n = 27 ; triangles roses), ssp. *superbus* (n = 44 ; losanges bleus) et ssp. *sylvestris* (n = 16 ; carrés verts). * Différence significative (test ANOVA, p-value < 0,01). LF & laF, longueur et largeur de la plus longue feuille ; ddo & ddup, diamètre de la tige à la base et sous la fleur ; LeN, longueur du plus grand entre-nœud ; LpF & lapF, longueur et largeur de la feuille sous la flur ; Lbo & labo, longueur et largeur de la bractée externe du calice ; Lbi & labi, longueur et largeur de la bractée interne du calice ; nbb, nombre de bractées du calice ; LC & dC, longueur et diamètre du calice ; LdC & ladC, longueur et largeur d'une dent du calice ; Ltri & latri, longueur et largeur maximale de la zone pileuse du pétale ; laech, distance entre les échancrures basales extrêmes du pétale ; Ltriech, distance entre la zone pileuse et l'échancrure centrale du pétale ; Lechap, longueur de l'échancrure centrale du pétale ; lapet, largeur de l'étendue des échancrures ; nech, nombre d'échancrures.

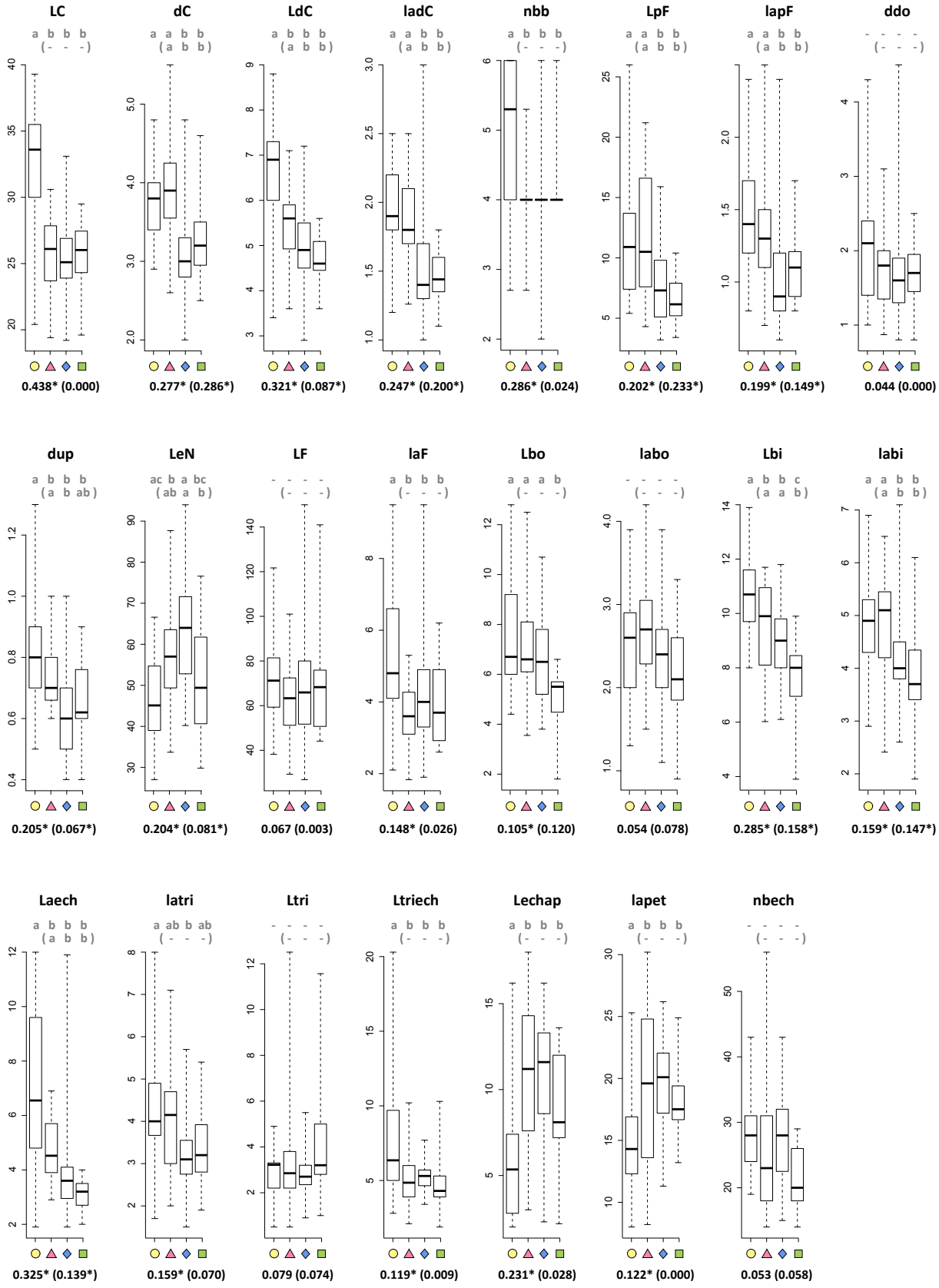


Figure 7. (légende en page précédente)

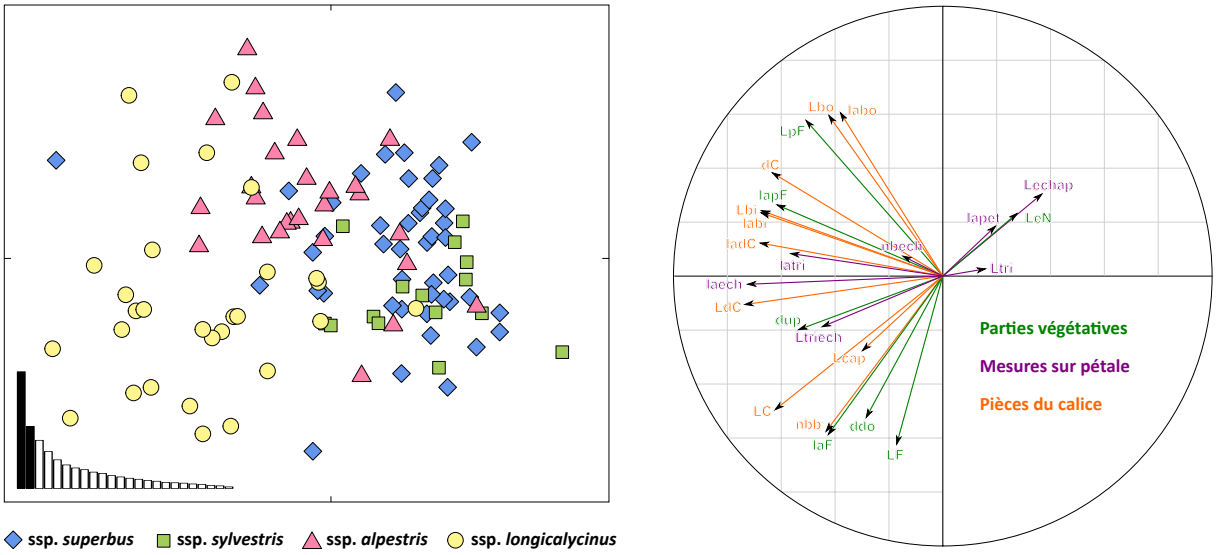


Figure 8. Premier plan de l'analyse en composantes principales illustrant 38% (24 et 14 %) de la variabilité du jeu de données, et corrélations entre les 23 variables morphométriques et les deux axes principaux. LF & laF, longueur et largeur de la plus longue feuille ; ddo & ddup, diamètre de la tige à la base et sous la fleur ; LeN, longueur du plus grand entre-nœud ; LpF & lapF, longueur et largeur de la feuille sous la fleur ; Lbo & labo, longueur et largeur de la bractée externe du calice ; Lbi & labi, longueur et largeur de la bractée interne du calice ; nbb, nombre de bractées du calice ; LC & dC, longueur et diamètre du calice ; LdC & ladC, longueur et largeur d'une dent du calice ; Ltri & latri, longueur et largeur maximale de la zone pileuse du pétale ; laech, distance entre les échancrures basales extrêmes du pétale ; Ltriech, distance entre la zone pileuse et l'échancrure centrale du pétale ; Lechap, longueur de l'échancrure centrale du pétale ; lapet, largeur de l'étendue des échancrures ; nech, nombre d'échancrures.

Conclusion : implications dans la stratégie de conservation de l'espèce

Par l'utilisation de marqueurs moléculaires à fine résolution génétique, la présente étude a permis de mettre en évidence la diversité génétique non-négligeable de *Dianthus superbus* en Alsace. Le brassage de cette diversité et l'absence de population complètement clonale supportent le régime de reproduction sexuée de l'espèce, même en prairies de fauche. Cependant, cette diversité ne présente pas de structuration forte, ni de groupes de populations plus distinctement diversifiés ou différenciés, à conservation prioritaire. Ainsi, aucune barrière de dispersion évidente n'a pu être mise en évidence par la présente étude. Cette absence de structuration peut être due au lien fort entre les activités anthropiques et le biotope principal de cette espèce en Alsace (les prairies de fauche), provoquant des mélanges récurrents d'individus entre populations depuis de nombreuses décennies. Ce patron de diversité génétique non-structurée dans

le Ried Nord et en Alsace représente le scénario le plus avantageux pour la conservation de l'espèce d'un point de vue pratique, puisqu'il couple une bonne conservation de la diversité génétique sans priorisation dans les mesures de protection et de transplantation. A titre d'exemple, les mesures compensatoires visant d'autres populations que celles impactées sont cohérentes dans la mesure où elles partagent des diversités génétiques équivalentes et une même identité génétique globale. Aux vues des présents résultats et des travaux du CBA sur la stratégie de conservation de *D. superbus* (Pouvreau 2014), il apparaît donc moins nécessaire de prendre en compte la dimension génétique de l'espèce que sa démographie et son écologie. En effet, aux vues des caractéristiques génétiques plus ou moins équivalentes des populations alsaciennes, la priorité de conservation peut être donnée aux prairies abritant les plus grandes populations pour une meilleure conservation quantitative de la diversité génétique de l'espèce, cette démographie étant d'ailleurs corrélée avec l'écologie (état trophique) des prairies (Pouvreau 2014).

Valorisation et perspectives

La présente étude vient compléter les travaux du CBA sur la stratégie de conservation de *D. spuerbus* en Alsace, et plus particulièrement dans le Ried Nord (Pouvreau 2014). Elle a permis de répondre à plusieurs questionnements initialement posés par les acteurs de la conservation, du point de vue de la génétique des populations alsaciennes et de la biologie de l'espèce, et d'amorcer des travaux de systématique sur *D. superbus* et ses sous-espèces. De plus, cette étude va pouvoir se poursuivre à une échelle géographique plus large à travers la révision taxonomique et la phylogéographie de l'espèce grâce à l'obtention de financement de la Société Botanique de France (4 000€). Cette étude mêlera les trois types de marqueurs suivants :

(i) l'analyse morphologique de 24 traits morphométriques (étape déjà réalisée et présentée précédemment), afin de tester statistiquement ce découpage taxonomique, d'évaluer la variabilité morphologique de chaque sous-espèce, et ainsi d'aider à la réalisation de clés d'indentification.

(ii) l'analyse génétique de marqueurs AFLP et microsatellites, afin de reconstruire la phylogéographie de l'espèce, et ainsi vérifier si sa taxonomie infraspécifique correspond à son histoire évolutive.

(iii) l'analyse chimio-écologique des composés organiques volatiles émis par les fleurs, afin d'évaluer la différenciation phénotypique en lien avec l'écologie de chaque sous-espèce.

La poursuite de ce projet vise à explorer la dimension évolutive de chaque sous-espèce. Par l'utilisation de marqueurs génétiques multilocus tels que les empreintes AFLP (déjà utilisées pour la conservation des populations alsaciennes) et les microsatellites nucléaires (déjà développés ; Smulders *et al.* 2000, 2003), nous comparerons les principales lignées phylogénétiques de *Dianthus superbus* et ses patrons phylogéographiques avec les sous-espèces précédemment décrites. Cette analyse révèlera la nature monophylétique (validant les sous-espèces) ou polyphylétique (décrivant plutôt des écotypes, ou une espèce très plastique) des sous-espèces testées. La description de l'habitat comme marqueur écologique ne permet pas de s'assurer de la différentiation adaptative des sous-espèces ou des écotypes à différents milieux. Cependant, l'étude de traits adaptatifs soumis à la sélection naturelle, et donc en interaction avec l'environnement, pourrait permettre de distinguer des écotypes, voire des sous-espèces. Concernant le genre *Dianthus*, ce type de traits écologiques est parfaitement représenté par la forte émission de composés organiques volatiles (COVs) afin d'attirer ses pollinisateurs. La variabilité de ces composés a déjà été mise en évidence, ainsi que l'identité de différents pollinisateurs (Jürgens *et al.* 2003, 2006). En comparant les COVs des différentes sous-espèces dans leur milieu et en jardin botanique, nous testerons la différenciation écologique de l'espèce potentiellement provoquée par une co-évolution avec des pollinisateurs de milieux différents.

Enfin, les travaux présentés ici ont déjà fait l'objet d'une communication scientifique lors des journées ateliers en écologie de la restauration (Hardion *et al.* 2015, annexe 1). Ils seront aussi valorisés très prochainement par le biais d'une publication scientifique sur la génétique des populations Alsaciennes, puis sur la taxonomie et la phylogéographie de l'espèce.

REMERCIEMENTS

Pour leur aide consultative ou leur contribution dans l'apport de données, nous remercions les membres du Conservatoire Botanique d'Alsace (CBA, Conseil Départemental du Bas-Rhin), Corinna Buisson, Régis Huet, Julie Vangendt, Marine Pouvreau, ainsi qu'Aurélien Davroux (Phyta Conseil) et Michel Hoff (Herbier de l'Université de Strasbourg, Société Botanique d'Alsace). Nous remercions aussi les membres des Conservatoires Botaniques Nationaux de France ainsi que le personnel des Herbiers internationaux (BRNU, E, LZ, STR, TAIF, WU) ayant permis de rassembler un échantillonnage d'étude complet.

REFERENCES

Andersson-Kottö I., Gairdner A.E. 1931. Interspecific crosses in the genus *Dianthus*. *Genetica* 13 : 77-112.

Balao F., Valente L.M., Vargas P., Herrera J., Talavera S. 2010. Radiative evolution of polyploid races of the Iberian carnation *Dianthus broteri* (Caryophyllaceae). *New Phytologist* 187 : 542-551.

Bernard A. 1971. Contribution à l'étude de la biosystématique du genre *Dianthus* – Caryophyllaceae. Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, série D, 272 : 1750-1754.

Bernard A. 1972. Sur la présence en Alsace de trois écotypes du *Dianthus superbus* L. *Bulletin de l'Association Philomathique d'Alsace et de Lorraine* 14 : 81-87.

Carolin R.C. 1957. Cytological and hybridization studies in the genus *Dianthus*. *New Phytologist* 56 : 81-97.

Clauzel C., Foltête J.C., Girardet X., Vuidel G. 2016. Graphab 2.0. Manuel d'utilisation.

Doyle J.J., Doyle J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19 : 11-15.

Dray S., Dufour A.B. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software* 22 : 1-20.

Ehrich D. 2006. AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 6 : 603-604.

Focke W.O. 1881. Die Pflanzen-Mischlinge: ein Beitrag zur Biologie der Gewächse. Gebr. Borntraeger.

Hardion L., Baumel A., Verlaque R., Vila B. 2014. Distinct evolutionary histories of lowland biota on Italian and Balkan peninsulas revealed by the phylogeography of *Arundo plinii* (Poaceae). *Journal of Biogeography* 41 : 2150-2161.

Hardion L., Verlaque R., Saltonstall K., Leriche A., Vila B. 2014. Origin of the invasive *Arundo donax* (Poaceae): a trans-Asian expedition in herbaria. *Annals of Botany* 114 : 455-462.

Jürgens, A. 2006. Comparative floral morphometrics in day-flowering, night-flowering and self-pollinated Caryophylloideae (*Agrostemma*, *Dianthus*, *Saponaria*, *Silene* and *Vaccaria*). *Plant Systematics and Evolution* 257 : 233-250.

Jürgens, A., Witt, T., Gottsberger G., 2003. Flower scent composition in *Dianthus* and *Saponaria* species (Caryophyllaceae) and its relevance for pollination biology and taxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology* 31 : 345-357.

Kati V., Le Corre V., Michel S., Jaffrelo L., Poncet C., Délye C. 2012. Isolation and characterisation of 11 polymorphic microsatellite markers in *Papaver rhoeas* L. (corn poppy), a major annual plant species from cultivated areas. *International journal of molecular sciences* 14 : 470-479.

Le Corre V., Bellanger S., Guillemin J.P., Darmency H. 2014. Genetic diversity of the declining arable plant *Centaurea cyanus*: population fragmentation within an agricultural landscape is not associated with enhanced spatial genetic structure. *Weed Research* 54 : 436-444.

Menchari Y., Délye C., Le Corre V. 2007. Genetic variation and population structure in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.), a successful, herbicide-resistant, annual grass weed of winter cereal fields. *Molecular Ecology*, 16 : 3161-3172.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70 : 3321-3323.

Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28 : 2537-2539.

Petit C., Arnal H., Darmency H. 2015. Effects of fragmentation and population size on the genetic diversity of *Centaurea cyanus* (Asteraceae) populations. *Plant Ecology and Evolution* 148 : 191-198.

Pouvreau M. 2014. Stratégie de conservation de l'œillet superbe, *Dianthus superbus* L., dans le Ried Nord (67). Rapport du Conservatoire Botanique d'Alsace, C.G. Bas Rhin, 141 pp.

QGIS Development Team 2015. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation. URL http://qgis.osgeo.org

R Development Core Team 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/

Schönswetter P., Tribsch A. 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon* 54 : 725-732.

Smulders M.J.M., Rus-Kortekaas W., Vosman B. 2000. Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*. *Genome* 43 : 208-210.

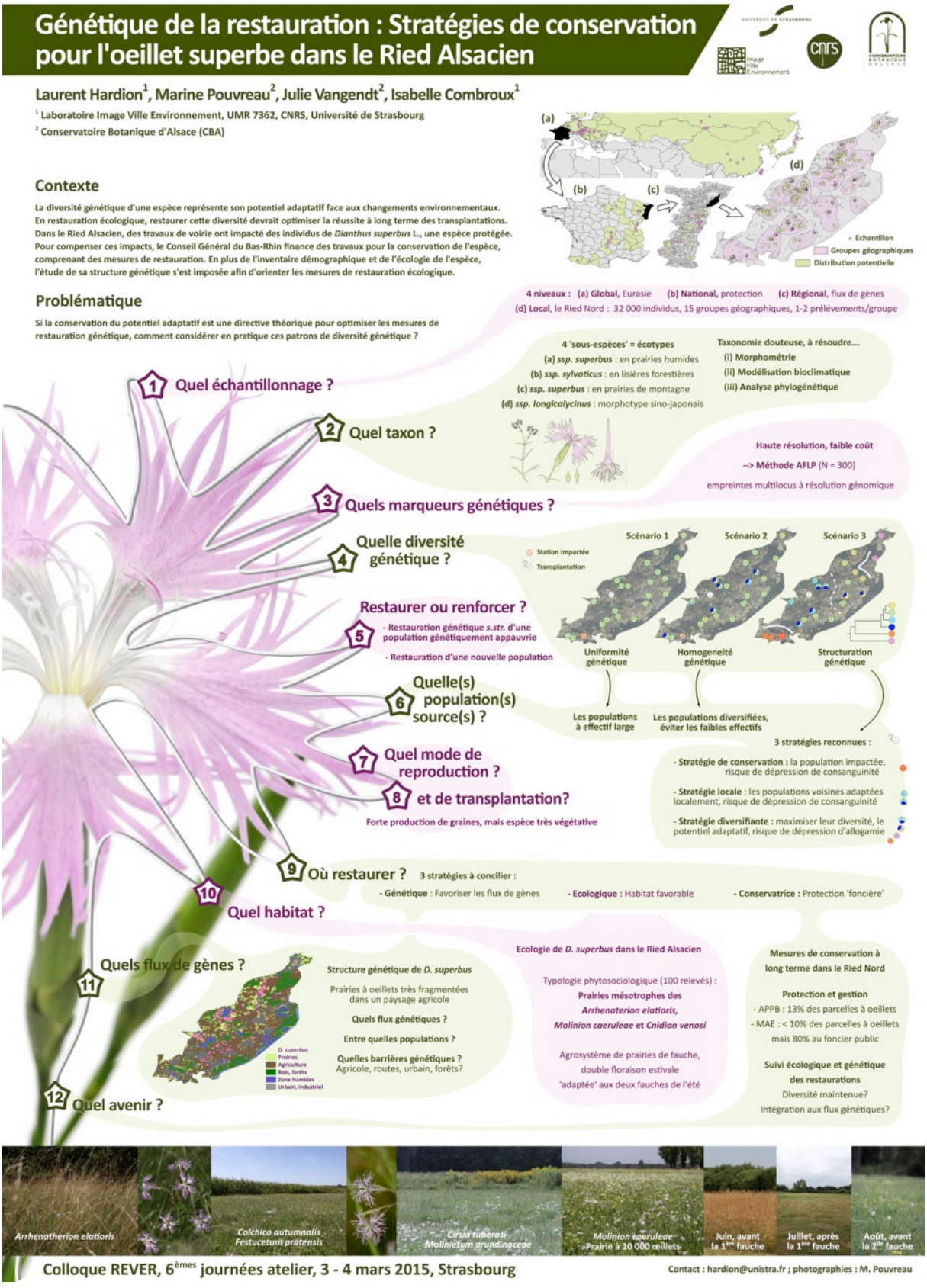
Smulders M.J.M., Noordijk Y., Rus-Kortekaas W., Bredemeijer G.M.M., Vosman B. 2003. Microsatellite genotyping of carnation varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 106 : 1191-1195.

Tison J.M., de Foucault B. 2014. *Flora Gallica*. Flore de France. Biotope éditions, Mèze, 1196 pp.

Valente L.M., Savolainen V., Vargas P. 2010. Unparalleled rates of species diversification in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277 : 1489-1496.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M. *et al.* 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 : 4407-4414

Williams F.N. 1893. A Monograph of the Genus *Dianthus*, *Linn. Journal of the Linnean Society of London, Botany* 29 : 346-478.

ANNEXES

Annexe 1. Poster de présentation aux 6èmes journées atelier du Réseau d'Echanges et de Valorisation en Ecologie de la Restauration (REVER), Strasbourg, 3-4 mars 2015.