

Nathalie Machon, Robert Bajon, Gérard Hunault & Jacques Moret

## Comment sauver *Arenaria grandiflora* L. de la depression?

### Abstract

Machon, N., Bajon, R., Hunault G., & Moret., J.: How to rescue *Arenaria grandiflora* L. from genetic diversity? – *Bocconea* 13: 181-188. 2001. – ISSN 1120-4060.

*Arenaria grandiflora* L. (*Caryophyllaceae*) is a species occurring in central and southern Europe more or less frequent in the mountain calcareous cliffs and slopes. It also occurs in the Île-de-France where it is very rare and therefore included among the protected taxa. With the aim of clarifying the origin of such local rarity, some populations of *A. grandiflora* from Fontainebleau (Île-de-France) and other localities, where this species is more spread, have been studied as far as their genetic diversity and germinating rate are concerned.

On the basis of the results, some considerations are made in order to rescue the species in question.

### Introduction

*Arenaria grandiflora* L. est une Caryophyllacée montagnarde, que l'on rencontre principalement sur les falaises et les rochers calcaires des montagnes du sud et du centre de l'Europe, de l'Autriche à la Sicile, de la Suisse aux Baléares. Dans la partie française de son aire, elle est encore fréquente dans l'ensemble de la chaîne pyrénéenne, et occupe des stations isolées dans les Alpes occidentales et méridionales. Elle existe également dans quelques stations de plaines dans le Lot, en Touraine et en Ile-de-France où on la trouve surtout sur des pentes de sables calcaires. En Ile-de-France, cette espèce est protégée car elle est très rare, il ne reste plus que deux stations d'*Arenaria grandiflora*, elles sont situées en forêt de Fontainebleau.

L'objectif de ce travail est de montrer que les menaces qui pèsent sur cette espèce à l'heure actuelle sont d'ordre génétique et d'en tirer les conclusions pour organiser son sauvetage en forêt de Fontainebleau

Les études génétiques sont de plus en plus employées en biologie de la conservation d'une part pour identifier et évaluer les dangers qui menacent les espèces et, d'autre part pour mettre en place des programmes de gestion adaptés. Les risques encourus par les populations à faibles effectifs sont de deux ordres: la dérive génétique qui entraîne une homogénéisation des populations les rendant particulièrement vulnérables aux aléas environnementaux et la consanguinité qui entraîne une baisse de la vigueur des individus et de leur aptitude à se reproduire au fil des générations. La connaissance de la structuration de la variabilité génétique permet de caractériser l'état des populations vis-à-vis de ces mena-

ces et de restaurer le potentiel évolutif des espèces en mettant en œuvre des politiques de gestion des ressources génétiques adaptées.

Dans cette étude, deux types d'expérimentation ont été menés: l'électrophorèse d'isoenzymes a été utilisée car c'est une méthode peu onéreuse, rapide et pratique pour une première approche génétique des espèces. Le but de cette analyse est d'étudier les caractéristiques génétiques des populations d'*Arenaria grandiflora* présentes en forêt de Fontainebleau, et de déterminer leur degré de différenciation par rapport aux populations du reste de l'aire de l'espèce. D'autre part, des expérimentations ont été entreprises sur des traits d'histoire de vie de ces plantes afin de mettre en évidence les liens existant entre les caractéristiques génétiques et la vigueur des plantes. La perte de vigueur par reproduction consanguine est connue sous le terme dépression de consanguinité. Les effets de la consanguinité sur la vigueur des plantes sont assez divers, ils peuvent affecter les plantes à tous les stades de leur cycle de vie. Nous nous sommes attachés, dans ce travail, à caractériser la faiblesse des plantes de Fontainebleau au stade germination et lors d'essais de bouturage.

La littérature fait rarement état des problèmes génétiques dans la définition des plans de gestion des plantes rares ou menacées. Le plus souvent, elle s'intéresse uniquement à des problématiques écologiques ou démographiques. Dans le cas d'*Arenaria grandiflora*, la problématique exposée ici vise à évaluer les phénomènes génétiques susceptibles d'être néfastes aux populations de Fontainebleau afin d'en tirer par la suite des règles de gestion adaptées.

## **Matériel et méthodes**

D'après Bonnier (1894), *Arenaria grandiflora* L. (Sabline à grandes fleurs) est une Caryophyllacée de 4 à 15 cm de hauteur, à tiges fleuries nombreuses portant des fleurs blanches relativement grandes (2 cm de diam.) qui s'épanouissent depuis le mois de mai jusqu'au mois d'août. La grandeur des fleurs laisse présager une pollinisation entomophile. Des diptères ont été observés dans la nature sur les fleurs d'*Arenaria*. On s'attend donc à ce que *Arenaria grandiflora* soit une espèce à système de reproduction allogame. Le fruit mûr est une capsule contenant de nombreuses graines. *Arenaria grandiflora* est une plante vivace, gazonnante, à tiges souterraines ligneuses et rameuses.

### *a) Echantillonnage*

Les populations de l'étude proviennent de quatre régions françaises: les Alpes, le Lot, l'Ile-de-France et la Touraine. 10 populations ont été échantillonnées:

*Arenaria grandiflora* est assez répandue dans les Alpes, sur des crêtes ventées, des pelouses rocailleuses, toujours dans des stations très ensoleillées. Les individus semblent préférer des milieux nus, extrêmes, évitant les problèmes de compétition interspécifique. Dans les stations échantillonnées, le nombre d'individus était très important (de l'ordre de la centaine de pieds). Trois populations ont été échantillonnées: Col de l'Echelle: E (6 individus), Montagne du Pouet: P (20 individus) et Montagne de Couspeau: C (13 individus). Il y a de nombreuses autres stations, et le nombre d'individus y est chaque fois important.

Les stations du Lot sont situées sur des falaises le long de la route D32 en aval de Rocamadour. Les populations sont relativement continues. Elles sont constituées de très

nombreux pieds. Les individus ont la même physiologie que ceux des Alpes. Ils ont été prélevés dans trois stations: Roc 1 (6 individus échantillonnés), Roc 2 (5 individus échantillonnés) et Roc 3 (6 individus échantillonnés) sur les flancs d'une falaise sur laquelle il doit y avoir en tout une centaine d'individus.

En forêt de Fontainebleau, *Arenaria grandiflora* pousse sur des pentes de sable calcaire où elle n'a pas à souffrir de la compétition directe des autres plantes. Au printemps 1998, il ne restait en forêt de Fontainebleau que 9 pieds, répartis sur deux stations éloignées d'environ 3 km: Petit Mont Chauvet (MC) (4 pieds) et Mont Merle (MM) (5 pieds). Le substrat est formé par les sables stampiens de Fontainebleau, enrichis en gravillons venus de la table de calcaire de Beauce. Les *A. grandiflora* poussent sur des pentes fortement ravinnées où la lumière est la plus intense et où la végétation est la plus dispersée. L'évolution des effectifs en forêt de Fontainebleau n'est pas connue avec précision mais on sait qu'ils ont dramatiquement diminué ces dernières années, un résumé de l'évolution démographique des populations d'*A. grandiflora* est présenté dans le tableau 1. La physiologie d'*A. grandiflora* en forêt de Fontainebleau est particulière. Les individus sont frêles, composés de quelques tiges. Ils sont beaucoup moins fournis que les individus des Alpes et fleurissent très peu. Aucune germination n'a été observée en 1997. Les prélèvements ont été effectués dans ces deux stations: MM (4) et MC (3), tous les individus en état de supporter ont été échantillonnés.

Tableau 1. Dynamique des deux populations de Fontainebleau (Ile-de-France).

Mont Merle	Petit Mont Chauvet
Extinctions/Réapparitions	Existe depuis plus de 300 ans
1995 : 18 individus	1950 : centaine(s) d'individus
1996 : 9 individus	1995 : vingtaine d'individus
1997 : 5 individus	1996 : 12 individus
1998 : 5 individus	1997 : 4 individus
	1998 : 4 individus

Les stations de Touraine d'*Arenaria grandiflora* sont assez proches sur le plan écologique de celles de Fontainebleau (pentes de sables calcaires). Cependant, les individus y sont plus nombreux (plusieurs dizaines sur la station de Beaumont) et semblent plus touffus. D'autres stations sont susceptibles d'exister dans la région. Deux populations ont été échantillonnées: Beaumont (11 individus) et Sablons (5 individus).

#### b) L'électrophorèse d'isoenzymes

La technique utilisée pour décrire ces populations est l'électrophorèse d'isoenzymes. Un total de 79 individus a été analysé, pour douze systèmes enzymatiques. Le tampon d'extraction est composé de 20 ml de tampon Tris-HCl 0.2M pH 8.5, 24 mg de D-cystéine, 32 mg de Dithioerythritol, 100 mg d'EDTA et 200 mg de PVP 40T. Les douze systèmes enzymatiques sont les suivants:

ACP E.C.3.1.3.2. acide phospho-mono-esterase; CAT E.C.1.11.1.6. catalase; 6PGD E.C.1.1.1.49. glucose-6-phosphate deshydrogénase; GDH E.C.1.4.1.2. glutamate deshydrogénase; GOT E.C.2.6.1.1. glutamate oxaloacétate transaminase; IDH

E.C.1.1.1.42. isocitrate deshydrogénase (D); MDH E.C.1.1.1.37. malate deshydrogénase; PGI E.C.5.3.1.9. phosphoglucoisomerase; PGM E.C.5.4.2.2. phosphoglucomutase; SKDH E.C.1.1.1.25. shikimate deshydrogénase; LAP E.C.3.4.11.1. leucine-amino-peptidase.

La diversité génétique dans les populations a été calculée à partir du pourcentage de locus polymorphes (P), du nombre moyen d'allèles par locus (A), et du taux d'hétérozygotie observé (Ho).

### C) Evaluation de la valeur sélective des plantes

Une première expérimentation a eu lieu en mars 1997, elle avait pour but d'évaluer le taux de germination des graines d'*Arenaria grandiflora* provenant de Fontainebleau et de Touraine. 80 graines ont été semées dans du sable, dans 15 pots différents correspondant à 15 pieds mères différents, 50 graines provenant de Fontainebleau et 30 de Touraine. Aucun traitement de levée de dormance ne leur a été préalablement infligé. Les graines avaient été ramassées en 1996 et stockées dans un endroit sec et à l'obscurité. Les germinations ont été effectuées en lumière naturelle à 20°C environ.

Des essais de germination *in vitro* sur milieu de Knot ont été tentés en septembre 1997 sur des graines prélevées en Touraine en juillet 1996, et sur des graines prélevées à Fontainebleau en juin 1996. Les germinations ont eu lieu à 25°C en lumière artificielle (environ  $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  au niveau des tubes de culture) avec une photopériode de 16 h de jour et 8h de nuit.

Deux essais de bouturage ont été tentés au mois de décembre 1997 et au mois de mars 1998. Des boutures d'environ 4 cm ont été effectuées à partir de plantes toutes conservées dans le même jardin. Dans la première expérimentation, 1 bouture a été prélevée sur 14 individus de Touraine, 3 du Lot et 7 boutures ont été effectuées sur 3 individus de Fontainebleau. Dans la seconde expérimentation, 10 boutures ont été effectuées sur 3 individus du Lot, 14 sur 4 individus de Touraine et 28 sur 2 individus de Fontainebleau, sous traitement fongique.

## Resultats

### Electrophorèse

Sur les douze systèmes enzymatiques étudiés, 14 locus ont été révélés. La lecture des gels semble indiquer que pour certains locus, les *Arenaria grandiflora* analysés ont une hérédité tétrasomique.

Les résultats obtenus montrent que les populations des Alpes et du Lot renferment une diversité génétique plus importante que les populations de plaine (Touraine et Fontainebleau). Cette diversité génétique se manifeste à la fois sur le taux de locus polymorphes, le nombre moyen d'allèles par locus et le taux d'hétérozygotes observés (Tab 2).

En ce qui concerne particulièrement les populations de Fontainebleau, celles-ci renferment une diversité génétique relativement faible. Au Mont Merle, pour 11 locus, les quatre individus ont le même phénotype; pour les trois autres locus, les individus ne sont pas tous identiques, ils renferment les mêmes allèles mais en quantité différente. Au Mont Chauvet les trois individus sont identiques pour 9 des 14 locus révélés et proches pour les

Tableau 2. Résultats de l'analyse génétique par électrophorèse.

	Fontainebleau	Touraine	Lot	Alpes
Echantillonnage	7 (2 pop)	16 (2 pop)	17 (3 pop)	39 (3 pop)
Pourcentage de locus polymorphes (95%)	0.50	0.36	0.67	0.82
Nb moyen d'allèles par locus	1.67	1.5	1.75	2.16
Hétérozygotie observée	0.31	0.20	0.41	0.36

3 autres locus. Au niveau de ces deux populations, une bonne différenciation a été observée. En effet, certains allèles se trouvent uniquement dans l'une des populations. Pour ce qui est de l'originalité des populations de Fontainebleau, pour le système LAP, les individus de Fontainebleau qui sont homozygotes AAAA alors que tous les autres individus échantillonnés en France sont homozygotes BBBB (Les individus de Touraine n'ont pas donné de résultats lisibles pour ce système). Il s'agirait là du seul allèle original pour Fontainebleau.

#### *La dépression de consanguinité chez Arenaria grandiflora*

Les résultats de taux de germination en pot ont montré que 5/30 graines de Touraine et 16/50 graines de Fontainebleau ont germé. Un test d'homogénéité du  $\chi^2$  a été effectué et a montré qu'il n'y avait pas de différence significative de taux de germination entre les deux provenances. Les résultats sont cependant très variables d'une descendance à l'autre. A la fin du mois de juin 1997 seules trois plantules issues d'une seule plante mère sont encore en vie. Il s'agit de descendants de la plante mère n°8 provenant de la station du Mont Merle à Fontainebleau. Toutes les autres germinations ont abouti à la mort des plantules.

Les résultats de taux de germination *in vitro* sont exposés dans le tableau n°3. Un test du  $\chi^2$  effectué sur les deux provenances (Touraine et Fontainebleau) montre que la différence observée n'est pas significative au risque de 5%. De même que pour les cultures en pot, certains individus ont une valeur sélective plus importante. Ce sont les mêmes individus qui sont les plus performants dans les deux expérimentations.

Les deux essais de bouture ont donné des résultats analogues. Les populations et individus dans les populations ayant eu les meilleurs taux de germination ont également les boutures les plus vigoureuses. Dans l'expérimentation 1, les 3 boutures du Lot sont très robustes et croissent avec beaucoup de rapidité. Celles de Touraine ont été dévastées à 100% par

Tableau 3. Résultats des essais de germination *in vitro* effectués en 1997.

N° du pied mère	Nb de graines germées sur nb de graines semées moins les infections
Beaumont 1 (Touraine)	1 / 17
Beaumont 3 (Touraine)	11 / 19
Beaumont 3 (Touraine)	9 / 17
Beaumont 3 (Touraine)	15 / 20
Beaumont 7 (Touraine)	0 / 17
Petit Mont Chauvet	0 / 1

un champignon pathogène, celles de Beaumont plus rapidement que celles des Sablons. Celles de Fontainebleau ont également été contaminées par le champignon mais certains plants ont mieux résisté que d'autres, on trouve une certaine hétérogénéité dans la sensibilité au pathogène.

La deuxième expérimentation, sous traitement anti-fongique a révélé de meilleurs résultats. 60% des boutures provenant d'individus de Fontainebleau sont encore en vie au bout de 3 mois. Les boutures provenant de Touraine ont toutes résisté mais elles ont une croissance lente. Les individus du Lot ont très vite pris et ont une croissance particulièrement rapide.

## Discussion

Les données caryologiques sur *Arenaria grandiflora* (Küpfer 1974) indiquent que ces plantes seraient soit diploïdes, soit tétraploïdes selon leur région d'origine. L'analyse par électrophorèse semble montrer que les *Arenaria grandiflora* que nous avons échantillonnées sont tétraploïdes. Il en résulte de grandes difficultés pour ce qui est de la lecture des gels et l'analyse des résultats. D'autre part, aussi bien en ce qui concerne les résultats d'électrophorèse que les résultats des tests de vigueur, les échantillons utilisés sont très petits (surtout à cause du fait que les populations que nous étudions ont des effectifs très restreints) et sont difficilement valables sur le plan statistique.

Cependant, un certain nombre de résultats observés sont de bons indices révélateurs des problèmes génétiques présentés par *Arenaria grandiflora* en forêt de Fontainebleau.

Tout d'abord, ces populations sont certainement extrêmement isolées les unes des autres. La bonne différenciation observées entre les deux populations de Fontainebleau laisse à penser que les deux populations n'ont pas échangé de gènes depuis longtemps. Pour ce qui est des autres populations du reste de l'aire, des changes géniques récents sont encore moins probables (même par l'intermédiaire d'une intervention humaine).

D'autre part, en ce qui concerne les populations de Fontainebleau, les résultats montrent que les individus sont très proches sur le plan génétique. En effet, si les individus ne peuvent pas être des clones, leurs similitudes génétiques laissent à penser qu'ils sont très apparentés, c'est-à-dire, tous descendants d'un petit nombre d'individus ancêtres. Il est probable que des événements d'ordre environnemental (le changement des pratiques sylvicoles, principalement) sont venus perturber les populations d'Ile-de-France, déjà isolées du reste de l'aire de l'espèce, et ont entraîné une chute brutale des effectifs. Le nombre des reproducteurs potentiels aurait donc été considérablement réduit et leurs descendants seraient tous apparentés.

L'effet d'une trop grande consanguinité dans les populations est bien connu, c'est phénomène de dépression de consanguinité. Il peut être contrebalancé par le phénomène de purge des allèles délétères qui consiste en l'élimination des individus homozygotes récessifs aux locus impliqués dans la valeur sélective des plantes et l'augmentation dans la population d'individus hétérozygotes. Or, il se trouve que dans les populations de Fontainebleau, il y a beaucoup d'hétérozygotes, parfois 100% pour certains locus. Ce taux d'hétérozygotie particulièrement élevé est certainement partiellement dû au fait qu'*Arenaria grandiflora* est tétraploïde, cependant il n'est pas à exclure que certains locus sont en déséquilibre de liaison avec des locus adaptatifs. Une étude génétique avait été

menée sur des descendants des plantes de Fontainebleau, après une forte mortalité au stade plantules. Les analyses avaient donné des résultats comparables (beaucoup d'hétérozygotes: 100% sur 17 individus pour le locus PGIf). L'observation de ce taux d'hétérozygote particulièrement élevé à certains locus, est un indice sérieux de l'existence des phénomènes de dépression de consanguinité chez *Arenaria* en Ile-de-France.

Les résultats des essais de germination et de bouturage sur *A. grandiflora* sont également révélateurs de la faiblesse des génotypes de Fontainebleau par rapport aux populations d'effectifs plus importants. Il n'est pas à exclure que les problèmes de germination soient liés à des phénomènes de dormance mais on sait que la dépression de consanguinité peut se manifester à tous les stades du cycle des plantes: formation des graines, germination, vigueur des plantules, nombre de fleurs et nombre de fruits des plantes issues de croisements consanguins. Les stades germination ou jeune bouture sont des caps particulièrement difficiles à surmonter où des différences de vigueur peuvent clairement s'exprimer entre des plantes de vulnérabilité différente.

A ce jour, les individus les plus vigoureux parmi ceux testés sont ceux du Lot. Les boutures effectuées à partir des individus de Fontainebleau et de Touraine ont montré beaucoup plus de fragilité et de sensibilité aux pathogènes. Une grande hétérogénéité intergénotypique a été observée. De même les tests de germination ont montré une certaine faiblesse des individus de Fontainebleau et Touraine et des tests complémentaires sur des graines provenant des Alpes sont à effectuer pour comparaison. En tout cas, des problèmes de dépression de consanguinité peuvent être invoqués.

## Conclusion

L'étude génétique montre que les populations de Fontainebleau et de Touraine ont une variabilité génétique plus faible que celles des Alpes ou du Lot. D'autre part, les premiers tests montrent qu'au niveau de la vigueur des plantes, des problèmes de consanguinité sont à craindre dans les populations de plaine. Des tests avec des effectifs plus importants sont en cours pour compléter les premières données.

Si les problèmes de consanguinité sont confirmés dans les populations de Fontainebleau, la question des moyens de sauver cette espèce en Ile-de-France est alors posée. Comment renforcer les populations existantes et avec quel matériel?

Pour répondre à cette question, nous avons entrepris une étude par simulations informatiques qui met en évidence le sursis que peuvent espérer les populations dans le cas où elles sont renforcées uniquement par du matériel local ou bien avec des mélanges entre plusieurs populations plus ou moins éloignées géographiquement. Les premiers résultats montrent que le simple mélange des deux populations de Fontainebleau n'offrira pas un sursis significatif de nos populations dans la mesure où les neufs pieds aussi différents soient-ils entre le Mt Merle et le Mt Chauvet ne renferment plus assez de diversité génétique pour être viables à long terme. Des mélanges plus importants sont à envisager, tout en évitant le phénomène inverse de dépression hybride qui survient lorsque les mélanges se font entre des individus de provenances trop éloignées.

Afin de respecter la législation en vigueur, et d'entreprendre une expérimentation à grande échelle, nous souhaitons proposer deux types d'opérations: le renforcement des popu-

lations locales de Fontainebleau par des individus issus de la collection *in vitro*, et la création de nouvelles populations, en des lieux éloignés des populations d'origine (afin de ne pas provoquer de pollution génétique): des populations issues du croisement des deux populations d'origine, de Fontainebleau, et des populations issues du mélange des populations de Fontainebleau avec d'autres origines (de Touraine, du Lot ou des Alpes).

Le fonctionnement des populations à faible effectif et la manière de les sauver de l'extinction ne sont pas encore bien maîtrisés par les scientifiques et les gestionnaires. Ce type d'expérimentation devrait donc permettre à la fois de sauvegarder cette espèce en forêt de Fontainebleau et sur un plan plus théorique, de donner des indications sur le fonctionnement de la biodiversité et les facteurs favorables à son maintien.

#### Références bibliographiques

Bonnier, G. 1894: La grande Flore en Couleur.— Paris.

Kupfer, P. 1974: Liens de parenté entre les flores alpienne et pyrénéennes. — *Boissiera* **23**: 131-139.

#### Adresse des l'auteurs:

Nathalie Machon, Robert Bajon, Gérard Hunault & Jacques Moret: Museum National d'Histoire Naturelle, Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien 61, rue Buffon, 75 005 PARIS — Téléphone: 01 40 79 35 54 Télécopie: 01 40 79 35 53  
E-mail: cbbp@mnhn.fr