

50376
1999
441

UNIVERSITE LILLE I
U.F.R DE BIOLOGIE

N° attribué par la bibliothèque

.....



THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Discipline: Génétique des Populations

Présentée et soutenue publiquement

par

Benoît DESPLANQUE

le 29 Novembre 1999

Titre :

« Betteraves mauvaises herbes et rudérales :
diversité génétique, traits d'histoire de vie et flux de gènes
au sein du complexe d'espèces cultivées-sauvages *Beta vulgaris* ssp. »

Directeur de thèse : Professeur Hendrik Van DIJK

JURY

M. Detlef BARTSCH,	Doctor Hab. Univ. Aachen (D)	Rapporteur
M. Pierre-Henri GOUYON,	Professeur Univ. Paris XI	Rapporteur
M. Henri DARMENCY,	Directeur de Recherche INRA,	Examineur
Mme Marianne LEFORT,	Directrice de recherche INRA	Examinatrice
Melle Joëlle RONFORT,	Chargée de Recherche INRA,	Examinatrice
M. Hendrik Van DIJK,	Professeur Univ. Lille I,	Directeur de thèse

⊗ Remerciements

Il m'est agréable de remercier les nombreuses personnes qui permirent cette thèse:

Merci aux membres du Jury pour avoir accepté de bien vouloir juger mon travail.

Merci à L. Thaler et à toute son équipe pour cette année 1994 de DEA "Ecologie et Evolution".

Merci à Jacques Lepart. La "norme" régissant le manuscrit de mon DEA n'autorisait pas d'y inclure des remerciements, mais je n'ai pas oublié que je lui dois beaucoup.

Merci à la Délégation Régionale du CNRS Nord-Pas-de-Calais de m'avoir accordé une bourse de thèse, sur la recommandation bienveillante de M. Vernet.

Merci donc à M. Vernet, directeur du laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales qui permit ma venue au Labo et à Myriam Valéro qui lui succéda dans cette lourde tâche de direction (et qui me garda au Labo).

Merci à Henk Van Dijk, qui accepta de prendre en thèse un humble vermisseau ; qui respecta aussi ma décision d'allouer une partie de mon temps à l'enseignement, non sans m'avoir mis en garde contre les effets secondaires indésirables sur ma thèse. Je ne me souviens pas d'une seule fois où Henk ne fut pas disponible (et d'une égale bonne humeur) lorsque je toquai à sa porte.

Merci à Joël Cuguen, qui seconde Myriam dans sa mission. Joël est aussi un fin connaisseur de *Beta* sp, mais pas seulement car il a plus d'une corde à son arc.

Merci aux Permanents portant la charge pesante de l'assistance administrative et technique. Sans Anne-Catherine, Jacky, Jacqueline, Michèle, Muriel, Robert, Sandrine et leurs courageux adjoints temporaires, il n'y aurait pas de Labo ni de Science dans ce labo. Coté paillasse, j'ai surtout eu l'occasion de travailler avec Jacqueline, ce qui fut toujours fort agréable et constructif: merci Jacqueline.

Merci au Labo, entité complexe constituée de la synergie de tous ceux qui le compose. Je lui suis redevable des idées intéressantes qui éclairent cette thèse ténébreuse. Les parties peu subtiles -voire erronées - de ce document sont miennes. Je voudrais, s'il vous plaît, en assumer seul la paternité.

Merci aux jeunes chercheurs (Isabelle, Fred, Pascal, Yves) qui arrivèrent récemment au Labo. Une arrivée salvatrice. Indispensable pour moi mais aussi, me permettrai-je de penser, pour le Labo. J'ai apprécié de nombreuses discussions scientifiques avec Isabelle et Fred (Fred a un beau métier, qu'elle honore particulièrement ; elle sait combien je lui suis redevable).

"Le monde est un cloaque putride...". Certes. Cependant, certaines personnes ont su parfois atténuer la véracité de cette maxime. Aussi, sous un angle plus "social" - et malgré que les relations sociales ne soient pas à proprement parler ma spécialité - j'ai une pensée émue pour tous ceux^a qui m'ont supporté, et qui m'ont aussi tant apporté:

^a Nota Bene pour Christine: ceux comprend celles car le masculin l'emporte sur le féminin.

Merci à mes parents. Entre autres choses qui me furent finalement bénéfiques, ils m'ont interdit jadis de passer un CAP Agricole d'ouvrier forestier. Ils "proposèrent" plutôt que je poursuive des études. A cause d'eux, le Labo aura dû me supporter 4 ans.

Merci à Sabine et Pierre-Claude, formidables Ch'timis, infatigables de bienveillance. Si le contraire de l'égoïsme existe, c'est chez eux. Je sais que la formule qui suit est malheureusement un peu galvaudée mais je voudrais lui redonner ici tout son sens : sans eux, cette thèse n'aurait pas été.

Merci à Marcel Reinaudo, qui fut mon maître de stage en exploitation agricole lors de ma première année à l'ENSA de Montpellier. Nous faisons de grosses journées de travail, au cours desquelles je m'appliquais à observer pour mieux comprendre. Je me posais d'innombrables questions. Je lui en livrais certaines, dont la pertinence s'échelonnait de "nulle" à "faible" et pourtant, il y répondait toujours. Avec du recul, je m'aperçois combien les similitudes de l'agriculture avec la recherche sont nombreuses. A l'instar des pratiques du thésard, les pratiques agricoles consistent en une suite de manips, qui réussissent parfois, ratent souvent ou bien ne donnent pas le rendement espéré, voire capotent au dernier moment après plusieurs mois d'efforts. J'ai vu Marcel faire face au quotidien hostile avec une constante bonne humeur, sans compter sa peine. Cet homme qui a débuté comme aide familial dans l'exploitation paternelle possède un sens critique que beaucoup devraient lui envier. Son pragmatisme et son ouverture d'esprit sont encore un modèle pour moi.

Merci à Pierre, dit PSL. Pierre fut mon précepteur de DEA, mais je lui dois bien davantage... L'aide scientifique de Monika me fut précieuse à plusieurs occasions. De plus, nous partageons tout un tas de petits points communs (dont l'usage du vélo et un certain courroux envers les "paper waster").

Merci à Robert Dron, notre jardinier préféré. Il eut été facile de m'en sortir avec un proverbe bien senti, qui a le double mérite d'être véritable et vrai : "A la Saint Robert, tout pousse vert". Mais il me faut vous dire aussi combien la rigueur de Robert et la qualité de son travail ont été pour moi un exemple quotidien.

Merci aux stagiaires qui m'ont fait l'honneur de travailler avec moi. Tous se sont présentés spontanément et je puis certifier que j'ai largement insisté lors de nos premières rencontres sur le bénéfice qu'ils auraient à se procurer un autre maître de stage. Vainement. Franck, Guillaume et Anne-Céline m'ont donc prêté main forte pour certaines manips et je leur en suis grandement reconnaissant. Je garde un excellent souvenir de ces périodes (éprouvantes) de responsable de stage, rôle dans lequel j'espère n'avoir pas trop démerité. Récemment, Christelle est restée plus longtemps au Labo, a subi mes conseils de paillasse, et m'a aidé dans quelques manips pour vérifier que les protocoles BM auxquels je l'initiais donnaient des résultats. Elle a aussi, pour faire bon compte, partagé la même pièce de travail que moi et par là-même supporté mon humour douteux. Elle survécut et devint même Ingénieur d'Etude, ce qui me fit beaucoup plaisir.

Merci à tous les Enseignants (nombreux) que j'eus l'occasion de côtoyer lors de mes vacances d'enseignement. J'ai emprunté à tous un peu de leur expérience pour mieux faire. J'ai beaucoup appris en écoutant Bertrand Dehorter, sa modestie dût-elle en souffrir. J'ai aussi largement profité des immenses connaissances botaniques de M. Delay, et de son enthousiasme communicatif pour les coupes anatomiques bien réalisées.

Merci à l'étudiant de première année de DEUG B qui, lorsque j'annonçai en TD "la plupart des fleurs des Dicotylédones sont pentamères.." a murmuré au fond de la salle "...en rose". Un tel blasphème mérite qu'il aille brûler en ... thèse^b

Evidemment, je ne peux taire ma reconnaissance envers tous les étudiants du Labo, ceux de ma cohorte ainsi que ceux d'avant et d'après. Certains travaillent même sur des végétaux inférieurs mais je ne suis pas sectaire. Aussi, merci sincèrement à tous (je ne saurais les nommer individuellement, par pudeur ou par peur qu'un nom ne manque à la liste mais elles et ils se reconnaîtront).

Enfin, merci à Claire, qui a tenu bon durant mon DEA, puis ma thèse.. Etant très monogame, je ne sais pas si sa résistance est inférieure ou supérieure à la moyenne. Quelque chose me dit pourtant qu'elle doit être "hors catégorie". Je suis conscient d'avoir beaucoup de chance (je vais d'ailleurs m'empresseur de l'épouser).

⊗ "Même pas mal.."

Ceux qui me connaissent savent mon incorrigible optimisme (communicatif) et ma totale absence de rancune. Ils ne pourront m'en vouloir de clore ces remerciements (sincères) par quelques évocations du côté vide de la bouteille partiellement pleine (et me feront l'amitié de ne retenir que les bons souvenirs).

Particulièrement, je ne remercie pas du tout mon poêle à charbon, qui m'a finalement assez mal réchauffé (merci par contre à mon détecteur de Monoxyde de Carbone).

Je ne remercie pas vraiment non plus ceux qui ont omis pendant 15 jours de saler le passage unique et très verglacé entre les bâtiments de recherche et la serre. Je leur dois une fracture double de la quatrième côte, avec interdiction médicale de rire (ce qui de toute façon ne se fait pas pendant le service) et d'éternuer (plus difficile) mais surtout bien pire: mon premier accident du travail, c'est à dire plusieurs dizaines de feuillets (en triple exemplaire).

^b ceci est une boutade évidemment.

Avant-propos

Le '*nous*' est utilisé systématiquement dans ce document car rien de ce qui se fait dans un laboratoire n'est le fait d'une seule personne. Toutefois, le fond comme la forme de ce document n'engagent que son auteur, qui en est le seul responsable.

Table des matières

<u>Introduction générale</u>	1
<u>Chap. 1 - Analyse conjointe des polymorphismes mitochondriaux et chloroplastiques</u>	5
<u>I-1 Introduction</u>	5
<u>I-2 Matériels et Méthodes</u>	7
I-2.1 MATÉRIEL	7
I-2.2 INVESTIGATION DU POLYMORPHISME CYTOPLASMIQUE (MTDNA ET CPDNA)	7
I-2.3 ANALYSE STATISTIQUE	7
<u>I-3 Résultats</u>	7
I-3.1 DIVERSITÉ HAPLOTYPIQUE	7
I-3.2 ASSOCIATION CPDNA – MTDNA.....	8
<u>I-4 Discussion</u>	8
I-4.1 ASSOCIATION ENTRE CPDNA ET MTDNA	8
I-4.2 RELATIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS MITOTYPES	9
I-4.3 DÉPISTAGE RAPIDE DES MITOTYPES 'SV' PAR PCR-RFLP SUR LE CPDNA	10
<u>I-5 Conclusions</u>	10
<u>Chap. 2 - Situation générale: relations entre les différents partenaires du complexe cultivées-sauvages <i>Beta vulgaris</i></u>	11
<u>II-1 Introduction: origine des betteraves mauvaises herbes</u>	11
<u>II-2 Distance génétique entre les différentes formes de betteraves</u>	12
<u>II-3 Discussion</u>	12
II-3.1 ORIGINE DES BETTERAVES MAUVAISES HERBES	12
II-3.2 BETTERAVES RUDÉRALES DE LA ZONE D'AGEN.....	12
<u>Chap. 3 - Caractérisation des betteraves rudérales dans le Sud de la France</u>	14
<u>III-1 Introduction</u>	14
<u>III-2 Matériel et méthodes</u>	16
III-2.1 ETUDE DES POPULATIONS ET COLLECTE DU MATÉRIEL	16
III-2.2 EXPÉRIMENTATION EN CONDITIONS CONTRÔLÉES	16
III-2.3 ANALYSES MOLÉCULAIRES.....	17
III-2.4 ANALYSES STATISTIQUES	17
III-2.4.1 Analyses génétiques du polymorphisme mitochondrial.....	17
III-2.4.2 Expérimentations en conditions contrôlées	17
<u>III-3 Résultats</u>	17
III-3.1 LOCALISATION GÉOGRAPHIQUE ET DESCRIPTION DES BETTERAVES RUDÉRALES	17
III-3.2 DIVERSITÉ CYTOPLASMIQUE.....	18
III-3.3 TRAITS QUANTITATIFS	19
<u>III-4 Discussion</u>	20
III-4.1 BETTERAVES RUDÉRALES: PRÉSENCE DANS LE PAYSAGE	20
III-4.2 PARTICULARITÉS DES BETTERAVES SAUVAGES RUDÉRALES	21
III-4.3 FUITE DE GRAINES DEPUIS LE COMPARTIMENT CULTIVÉ	23
<u>III-5 Perspectives</u>	25

Table des matières

III-6 Conclusion	25
Chap. 4 - Etude des betteraves mauvaises herbes dans le nord de la France.....	27
IV-1 Introduction.....	27
IV-2 Observation des montaisons en champs.....	30
IV-2.1 MONTAISONS DU RANG	30
IV-2.2 MAUVAISES HERBES HORS RANG	32
IV-3 Degré d'infestation des champs	32
IV-3.1 TAUX D'APPARITION DANS LE RANG	32
IV-3.2 INFESTATION HORS RANG	33
IV-4 Syndrome de domestication vs syndrome de mauvaise herbe.....	34
IV-4.1 GERMINATION	35
IV-4.1.1 Taux de germination immédiate.....	35
IV-4.1.2 Précocité de germination.....	35
IV-4.1.3 Nombre de plantules par glomérules	36
IV-4.2 FLORAISON.....	36
IV-4.3 AUTRES TRAITS	38
IV-4.4 PRODUCTION DE POLLEN	39
IV-4.4.1 Viabilité	39
IV-4.4.2 Quantité de pollen par anthère.....	40
IV-4.5 REPRODUCTION ET SURVIE	40
IV-4.6 NIVEAU DE PLOÏDIE	41
IV-5 Analyse génétique	43
IV-5.1 VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE CYTOPLASMIQUE	43
IV-5.1 VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE NUCLÉAIRE.....	44
IV-6 Discussion - conclusion	45
IV-6.1 DOMESTICATION ET SYNDROME DE MAUVAISES HERBES.....	45
IV-6.2 ENTRÉE DES MIGRANTS DANS L'AGROSYSTÈME.....	46
IV-6.3 DISPERSION DES GÈNES	46
Chap. 5 - Contribution à l'étude de l'incidence des betteraves sucrières transgéniques lors de la multiplication des semences et de la culture des betteraves sucrières.....	48
V-1 Généralités sur les risques liés aux plantes transgéniques.....	48
V-1.1 FUIITE DU TRANSGÈNE.....	48
V-1.2 ÉTABLISSEMENT DU TRANSGÈNE HORS DE LA CULTURE	50
V-2 Le cas de la betterave	52
V-2.1 FACTEURS POUVANT INFLUENCER LA FUIITE DU TRANSGÈNE CHEZ LA BETTERAVE.....	53
V-2.1.1 Incidence du mode d'incorporation du transgène.....	53
V-2.1.1.1 Quel que soit le mode d'incorporation	53
V-2.1.1.2 Incorporation par la voie maternelle	54
V-2.1.1.3 Incorporation du transgène par la voie paternelle	54
V-2.1.1.4 Incorporation du transgène dans un organelle à hérédité maternelle?.....	55
V-2.1.2 Incidence du niveau de ploïdie des variétés sucrières	56
V-2.2 DIFFÉRENTS TYPES DE TRANSGÈNES	56
V-2.2.1 Betteraves transgéniques résistantes à un herbicide total	56
V-2.2.2 Betteraves transgéniques autres que "résistantes à un herbicide total"	57
V-3 Conclusions / Perspectives	58
Conclusion générale.....	60

Références bibliographiques..... 64

Liste des annexes:

Annexe 1: Présentation du matériel biologique et des techniques utilisées

Annexe 2: **The linkage disequilibrium between cpDNA and mtDNA haplotypes in *Beta vulgaris* subsp *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies.** Molecular Ecology (sous presse).

Annexe 3: **Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae) assessed by RFLP and microsatellite markers.** Theoretical and Applied Genetics, 98: 1194-1201

Appendice: liste des populations étudiées.

- Introduction -

Introduction générale

Les années 90 ont témoigné d'une certaine excitation autour de l'utilisation des plantes transgéniques. En parallèle du débat passionnel que cette perspective a suscité, on a pu noter un regain d'intérêt dans la communauté scientifique pour l'étude des complexes d'espèces cultivées-sauvages (revue dans Ellstrand in press), bien que la coexistence de formes cultivées et sauvages soit mentionnée depuis De Candolle (1883).

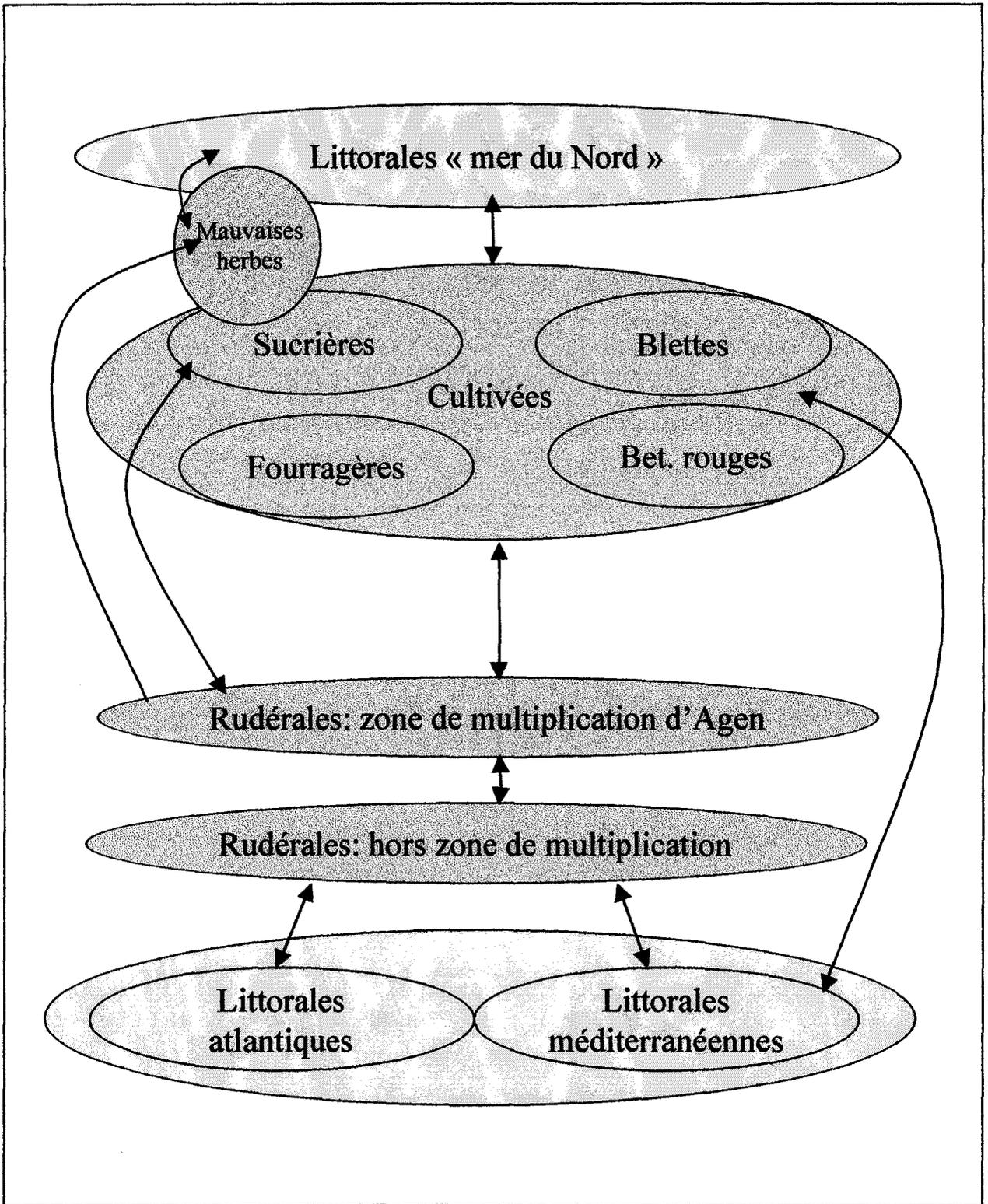
Un complexe d'espèces cultivées-sauvages comprend, de façon triviale, une espèce cultivée et une espèce sauvage. Chez *Beta vulgaris*, la forme cultivée est représentée notamment¹ par la **betterave sucrière** *B. vulgaris ssp vulgaris* ; il existe une forme sauvage "typique", *B. vulgaris ssp maritima*, qui est **littorale** comme son nom l'indique. De fait, Buttler (1977) voit trois raisons pour lesquelles la systématique de la section Beta est si compliquée: (i) il existe des formes sauvages et cultivées ; (ii) il n'y a pas de barrière efficace aux croisements ; (iii) on rencontre de nombreuses formes le long d'une distribution géographique très vaste. L'intérêt de l'étude de *Beta vulgaris* est indépendant du contexte actuel des Organismes Génétiquement Modifiés. L'arrivée probable de betteraves transgéniques est cependant un élément à prendre en compte. Cela ne modifie pas nécessairement les modalités d'étude de ce taxon mais certaines conclusions peuvent prendre un relief particulier.

Les champs d'investigation concernant le genre *Beta* sont nombreux. Plusieurs de ses espèces sont étudiées au laboratoire GEPV sous différents angles, comme leur système de reproduction (gynodioecie, stérilité mâle cytoplasmique) ou leur cycle de développement (annualité vs pérennité, sémelparité vs itéroparité, etc.). L'amorce de ma thèse s'est révélée au cours du travail de thèse de Pierre Boudry (1994). Ce dernier, tout en étudiant le gène du *bolting* (montaison), souligna l'intérêt d'une betterave particulière, présente dans les champs de betterave sucrière: la betterave mauvaise herbe. Il montra, sur la base de marqueurs phénotypiques (la montaison due à l'allèle B) et cytoplasmiques (un haplotype mitochondrial identique à celui des sucrières) que la betterave mauvaise herbe résultait d'hybridations accidentelles entre les lignées cultivées et des pollinisateurs sauvages indésirables lors de la multiplication des semences dans le sud-ouest de la France.

La situation en France est la suivante: on cultive la betterave pour le sucre dans la moitié Nord du territoire. La betterave sucrière est bisannuelle et développe une racine charnue entre son semis en avril et sa récolte en novembre. Ces réserves racinaires permettraient la survie et la floraison qui serait initiée par les froids hivernaux (vernalisation) si on ne la récoltait pas. Les

¹ les betteraves cultivées comprennent des formes de plein champ comme les sucrières ou les fourragères, mais aussi des formes potagères, de culture plus "artisanale": les blettes et les betteraves rouges.

Fig. 1. Les acteurs du complexe cultivées-sauvages chez *Beta vulgaris* ssp et leurs liens potentiels.



semences utilisées pour cette culture sont multipliées principalement dans une petite zone du Sud-ouest, dite "zone d'Agen". Une faible part des semences récoltées peut avoir été "polluée" lors de la multiplication par des betteraves non cultivées, parapatricques. Ces betteraves sauvages, rencontrées loin du littoral dans des habitats anthropisés, peuvent être qualifiées de **rudérales**. Elles transmettent par leur pollen l'allèle B, qui dispense de besoin de vernalisation pour monter à graine. De sorte que l'agriculteur sème parfois avec sa variété sucrière des betteraves hybrides qui vont monter durant la culture. Leur descendance constitue les betteraves "mauvaises herbes", qui exercent une compétition vis à vis de la variété alors que leur racine est petite, fibreuse et pauvre en sucre. De plus, elles se multiplient rapidement et envahissent ainsi progressivement le champ.

Le complexe d'espèces cultivées-sauvages chez *Beta vulgaris* est donc particulièrement remarquable: d'une part, il concerne des sous-espèces (entièrement interfertiles). D'autre part, il comporte deux formes atypiques: (i) les betteraves sauvages rudérales, rencontrées dans des situations écologiques très particulières et (ii) les **betteraves mauvaises herbes**.

La caractérisation (au sens le plus large possible) des betteraves rudérales est un des deux objectifs principaux de cette thèse.

Le second objectif est l'étude de la forme mauvaise herbe mentionnée précédemment. Cette forme inhabituelle "personnalise" le complexe cultivées-sauvages chez *Beta vulgaris*, qui comprend en définitive quatre formes majeures:

Betteraves cultivées	<i>B. vulgaris</i> subsp <i>vulgaris</i>
Betteraves sauvages rudérales	<i>B. vulgaris</i> subsp
Betteraves sauvages littorales	<i>B. vulgaris</i> subsp <i>maritima</i>
Betteraves mauvaises herbes	<i>B. vulgaris</i> subsp

Quelle sont les relations entre ces quatre "compartiments" ? Notamment, l'existence de la forme mauvaise herbe doit être considérée dans l'évaluation des risques liés au caractère transgénique potentiel des formes sucrières. En effet, un des risques associés à la culture d'OGMs² en plein champ est la possible dispersion des transgènes lors de la phase reproductive. Mais, alors que le maïs ou le colza fleurissent au cours de leur culture, la betterave sucrière bisannuelle dont on ne cultive que la rosette végétative semble *a priori* à l'abri de toute dispersion intempestive de (trans)gènes. Pourtant, la betterave fleurit aussi. Elle fleurit par le biais des mauvaises herbes d'une part, mais aussi parce que certains individus de la variété peuvent présenter une montaison -dite montaison variétale- quelques mois après le semis.

² OGMs: Organismes Génétiquement Modifiés

Encadré I. Précisions sur le vocabulaire utilisé

Le terme de '**mauvaises herbes**' qui sera utilisé dans ce document ne s'appliquera qu'à la betterave mauvaise herbe. Il concernera donc uniquement des betteraves présentes dans l'agrosystème. Il correspond au terme anglo-saxon '*weed*' duquel est dérivé '*weediness*', qui n'a malheureusement pas d'équivalent français¹. La *weediness* définit en l'occurrence l'ensemble des caractères propres aux mauvaises herbes, qui les rendent "performantes" dans leur domaine. Nous avons choisi comme traduction "syndrome de mauvaise herbe".

Le terme de '**sauvage**' est aussi habituellement sujet à caution: il ne devrait être réservé qu'à des plantes ne subissant aucune intervention humaine. Cette restriction ne peut s'appliquer à notre situation, dans laquelle les milieux étudiés sont semi-naturels, pour cause d'anthropisation. Le terme de '**sauvage**' concernera ici toutes les betteraves ni cultivées ni mauvaises herbes. Il sera utilisé comme équivalent de "spontanées" et il comprendra les betteraves littorales mais aussi les betteraves rudérales.

Nous utiliserons le terme de '**rudérales**' pour toutes les betteraves (sauvages) ne se trouvant pas au niveau du cordon littoral ou dans l'agrosystème. Pour éviter les confusions, nous n'appellerons pas ces plantes des 'mauvaises herbes'², contrairement à la littérature anglo-saxonne qui appelle souvent *weed* ou *weedy relative* toute plante poussant spontanément en dehors de l'agrosystème et interférant avec les intérêts agronomiques (et qui utilise indifféremment les termes de *crop-weed complex* ou de *crop-wild complex*).

¹ Le terme français devrait être proche de "*malherbitude*" ou de "*malherbosité*" (remarque: il nous manquera aussi un équivalent simple de '*inland*').

² Nous n'utiliserons pas le terme 'adventice'. Ce synonyme de 'mauvaises herbes' est en effet parfois utilisé pour qualifier des 'rudérales', ce qui pourrait entraîner des ambiguïtés.

Il faut finalement étudier les échanges génétiques (unilatéraux ou bilatéraux) à tous les niveaux, lors de la multiplication des semences, mais aussi dans l'agrosystème (voir Fig. 1, où sont récapitulées toutes les composantes du complexe cultivées-sauvages):

(i) Flux de gènes lors de la multiplication des semences:

(ia) des cultivées (transgéniques?) vers les sauvages...

(ib) des sauvages vers les cultivées (transgéniques?): formation d'hybrides futures mauvaises herbes (transgéniques?) parmi les semences certifiées.

(ii) Flux de gènes dans l'agrosystème sucrier:

(iia) entre les hybrides cultivées-sauvages (transgéniques?) et les mauvaises herbes anciennes, non transgéniques.

(iib) entre des montaisons variétales (transgéniques?) et les hybrides ou les mauvaises herbes.

En définitive, des floraisons se manifestent durant la culture des betteraves sucrières alors que, d'un point de vue strictement "académique", il ne devrait pas y en avoir. Les betteraves qui montent sont à l'origine des **betteraves mauvaises herbes**, et correspondent à une forme unique au sein des complexes d'espèces cultivées-sauvages. L'ensemble du travail réalisé au cours de cette thèse gravite autour de cette forme.

Cette thèse s'intéresse à l'évolution des **hybrides cultivées-sauvages** vers des formes ayant un "syndrome de **mauvaise herbe***", mais aussi à l'origine de ces hybrides. L'étude de cette origine mène aux **betteraves rudérales** de la zone de multiplication de semences.

* voir encadré I.

Ce document s'articule en 5 chapitres, dont certains sont directement associés à des manuscrits. Les annexes comprennent une description du matériel et des techniques utilisées, ainsi que les publications dérivées de ce travail.

Le matériel biologique *Beta vulgaris* est présenté **annexe 1**, de même que les différents protocoles mis en œuvre pour son étude en serre comme au laboratoire. Cette annexe précise aussi certains points comme la multiplication des semences ou le niveau de ploïdie des variétés de betteraves sucrières.

Le **chapitre 1** peut se lire indépendamment des autres. Il concerne l'étude conjointe des polymorphismes mitochondriaux et chloroplastiques chez la betterave. Ce travail a notamment confirmé la fiabilité des marqueurs mitochondriaux que nous avons employé pour étudier les déplacements de graines chez *Beta vulgaris*.

Le **chapitre 2** expose la situation générale du complexe cultivées-sauvages de *Beta vulgaris*. Le point initial de cette étude concerne la phase de multiplication des semences. L'analyse des distances génétiques (marqueurs nucléaires) entre les différentes formes du complexe permet de corroborer le scénario sur l'origine des mauvaises herbes et ouvre quelques pistes sur l'origine des rudérales de la zone de multiplication de semences d'Agen.

Le **chapitre 3** s'intéresse à la diversité des betteraves sauvages rudérales du sud de la France, au sein de la zone de multiplication d'Agen mais aussi en dehors. Il débute par le bilan des prospections réalisées et décrit les populations de betteraves sauvages en terme de localisation géographique et d'habitat. Puis les rudérales sont caractérisées par quelques traits majeurs de leur cycle de vie comme le taux de montaison sans vernalisation (ainsi qu'avec des mesures concernant la germination, la phénologie ou la morphologie). Ces mêmes betteraves sont analysées avec des marqueurs moléculaires cytoplasmiques, permettant d'appréhender les flux de graines. Cette double approche permet d'étudier les échanges entre les formes cultivées (betteraves sucrières et potagères) et sauvages. Enfin, l'origine des betteraves rudérales est discutée.

Le **chapitre 4** est consacré à l'agrosystème sucrier et à ses mauvaises herbes. Il détaille les résultats des observations faites en champs ou en conditions contrôlées sur les différentes catégories de betteraves montées à graine. L'acquisition d'un "syndrome de mauvaise herbe" au cours de l'évolution des hybrides cultivées-sauvages vers des betteraves mauvaises herbes est discutée. L'origine des betteraves mauvaises herbes est confirmée au moyen de marqueurs moléculaires mitochondriaux.

Enfin, le **chapitre 5** récapitule les différents flux de gènes possibles, des formes sauvages vers les formes cultivées et réciproquement (à l'intérieur et hors zone de multiplication de semence), mais aussi entre les formes cultivées sucrières et les betteraves mauvaises herbes. Les différentes modalités possibles d'incorporation d'un transgène lors de la fabrication de sucrières transgéniques hybrides sont discutées, en relation avec les risques de fuite prévisibles.

- Chapitre 1 -

**Analyse conjointe des polymorphismes
mitochondriaux et chloroplastiques**

Cette étude a fait l'objet d'un article (annexe 2):

Desplanque, B. Viard, F. Forcioli, D. Bernard, J. Saumitou-Laprade, P. Cuguen, J. Van Dijk, H.

The linkage disequilibrium between cpDNA and mtDNA haplotypes

in *Beta vulgaris* subsp *maritima* (L.):

the usefulness of both genomes for population genetic studies.

Molecular Ecology (sous presse)

Chap. 1 - Analyse conjointe des polymorphismes mitochondriaux et chloroplastiques

Le texte qui suit résume l'article présenté annexe 2.

Des résultats sur les betteraves cultivées et mauvaises herbes ont été rajoutés par rapport à cet article.

I-1 Introduction

Les gènes sont dispersés par les graines ou le pollen chez les végétaux. Ces deux vecteurs ont des capacités migratoires parfois très différentes et le généticien des populations cherche souvent à établir la part relative de ces deux modes de dispersion (Ennos 1994). Il peut pour cela comparer les structures génétiques établies d'après deux génomes: (i) le génome nucléaire, qui résulte de la contribution des deux parents, et dont une partie a migré par le pollen ; (ii) "le" génome cytoplasmique, transmis par la mère, qui a migré uniquement par graine³. Les marqueurs moléculaires cytoplasmiques concernent deux génomes (mitochondrial et chloroplastique) qui sont à hérédité maternelle chez tous les Anthophyta⁴ (Corriveau & Coleman 1988; Reboud & Zeyl 1994), en dehors de quelques exceptions notoires (e.g. Fauré *et al.* 1994; Testolin & Cipriani 1997). Pourtant, de faibles taux de transmission par le père (*via* le pollen) ne sont pas à exclure (Milligan 1992). Il semble que jusqu'à 30% des espèces présenteraient de telles fuites paternelles (Moggensen 1996). Celles ci n'ont cependant encore jamais été mises en évidence chez *Beta vulgaris*.

L'évolution moléculaire est différente pour chacun des génomes des deux organelles cytoplasmiques. L'ADN chloroplastique évolue en séquence, par mutations ponctuelles ou insertions-délétions (Clegg *et al.* 1992). Le génome mitochondrial en revanche est l'objet de fréquents remaniements par recombinaisons intra-moléculaires (Andre *et al.* 1992; Palmer 1992). Le polymorphisme chloroplastique, longtemps réservé aux études inter-spécifiques (e.g. Olmstead & Palmer 1994) est de plus en plus utilisé pour des investigations intra-spécifiques (Taberlet *et al.* 1991; Ennos 1994; McCauley 1995; Dumolin-Lapegue *et al.* 1997; Forcioli *et al.* 1998). Le polymorphisme mitochondrial a été beaucoup étudié chez la betterave (Lonsdale *et al.* 1988), en grande partie car il est le siège de la stérilité mâle cytoplasmique (CMS). Son polymorphisme a permis la réalisation de nombreuses études dans le genre *Beta*, notamment au travers de la technique RFLP (e.g. Komarnitsky *et al.* 1990; Boudry *et al.* 1993; Senda *et al.* 1998). Un large choix de sondes mitochondriales avait déjà été mis à contribution au laboratoire pour explorer la variabilité des populations maritimes françaises, principalement en relation avec la gynodioecie (Cuguen *et al.* 1994). Il était indispensable pour nous de pouvoir comparer la variabilité des

³ Cela n'est pas vrai pour les Pinophyta (Gymnospermes), qui présentent en général une transmission maternelle des mitochondries mais paternelle des chloroplastes.

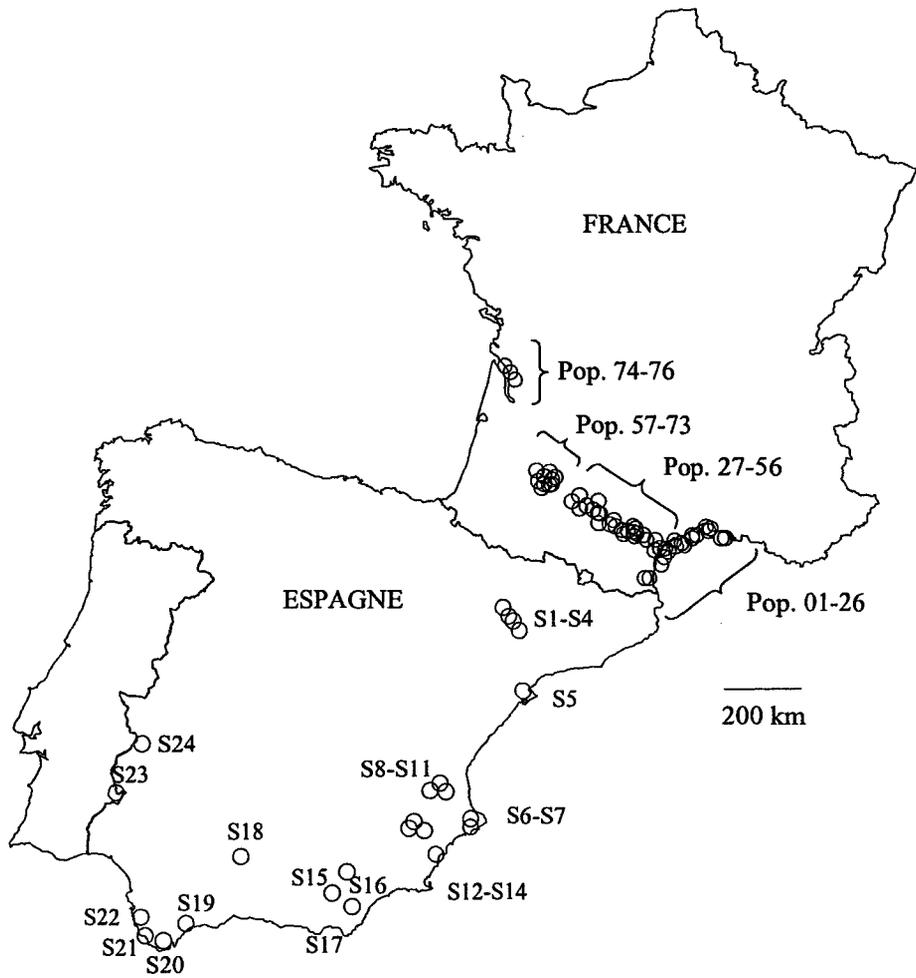
⁴ Angiospermes

betteraves rudérales (et cultivées) avec celle déjà bien connue des betteraves maritimes. L'utilisation de marqueurs mitochondriaux était donc légitime (association avec la CMS, polymorphisme, base de donnée de près de deux cent individus typés...). Cependant, ces marqueurs sont souvent considérés avec suspicion du fait même du mode de mutation de la mitochondrie (Cruzan 1998). **Le même haplotype mitochondrial pourrait en effet apparaître plusieurs fois indépendamment, par des événements récurrents de mutation. Une telle homoplasie rendrait alors caduque toute conclusion sur la dispersion des graines qui serait déduite de la distribution des haplotypes mitochondriaux.** Connaître la cause de l'apparition d'un variant à un endroit donné (mutation ou migration ?) est donc primordial. Le doute existe par exemple pour un mitotype particulier de la betterave (le type 'Nv'), qui est le type le plus fréquent et qu'on rencontre dans toutes les régions étudiées. Ce mitotype est présent chez les formes maritimes, sauvages, cultivées et mauvaises herbes.

En somme, il apparaît que chez la betterave comme chez d'autres espèces (i) le même mitotype peut avoir une très vaste distribution géographique, (ii) des populations présentent souvent plus d'un mitotype, même quand de petits nombres d'individus sont analysés, (iii) la différenciation haplotypique entre régions est due à des variations de fréquences sur les mêmes mitotypes plutôt qu'à une structuration qualitative. C'est pour ces raisons que la recombinaison intra-moléculaire récurrente ne peut être exclue *a priori* comme cause de l'explication de la distribution des mitotypes, quand ceux-ci sont définis par RFLP. Il existe un moyen de vérifier cette hypothèse: du fait de la co-transmission des deux génomes, on s'attend à un fort déséquilibre de liaison entre les haplotypes mitochondriaux et chloroplastiques. En d'autres termes, on doit retrouver chaque fois les mêmes associations pour deux haplotypes d'organelles différents donnés. Dans le cas contraire, cela traduirait soit (i) un brassage révélant que la co-transmission n'est pas totale et que des transmissions paternelles existent; soit (ii) qu'un des deux haplotypes est apparu plusieurs fois indépendamment par mutation.

Nous avons réalisé l'étude conjointe des haplotypes chloroplastiques et mitochondriaux chez la betterave. Ce type d'approche est rare dans la littérature (voir cependant une belle étude dans Dumolin-Lapegue *et al.* 1998). Nous avons recherché dans un premier temps les chlorotypes des individus sauvages déjà typés pour l'ADN mitochondrial. Puis des betteraves cultivées et mauvaises herbes ont été incluses dans l'échantillonnage, ainsi que des betteraves sauvages espagnoles. En définitive, nous disposons pour cette étude sur le polymorphisme cytoplasmique d'un échantillonnage assez large à la fois en terme de "diversité dans l'espèce" (betteraves maritimes, rudérales, cultivées, mauvaises herbes) et en terme de distribution géographique (façades maritimes française et espagnole, sud-ouest de la France jusqu'à l'embouchure de la Gironde). La variabilité chloroplastique avait déjà été examinée au laboratoire par RFLP (Forcioli

Fig. I-1. Localisation géographique des populations de betteraves sauvages analysées.



et al. 1998). Cette méthode cependant demeure assez lourde (en l'occurrence, l'ADN est digéré par trois enzymes de restriction, ce qui nécessite trois transferts sur membranes par individu). Nous avons donc choisi d'appliquer à la betterave la technique de PCR-RFLP sur la base d'amorces universelles, à un moment où le nombre d'espèces différentes étudiées avec ces outils restait encore limité.

I-2 Matériel et Méthodes

Se reporter à l'article annexe 2 pour les détails.

I-2.1 Matériel

L'étude a porté sur 530 plantes: 293 plantes sauvages (Fig. I-1) littorales ou rudérales collectées en France (76 populations), 121 collectées en Espagne (24 populations), ainsi que 15 betteraves sucrières, 14 betteraves potagères, 77 betteraves montées en champ et 3 betteraves littorales d'Israël et d'Argentine (les résultats concernant les formes cultivées et mauvaises herbes ne font pas partie de l'article annexe 2).

I-2.2 Investigation du polymorphisme cytoplasmique (mtDNA et cpDNA)

Le polymorphisme mitochondrial a été analysé par RFLPs (une enzyme, trois sondes) et le polymorphisme chloroplastique par PCR-RFLP (huit couples d'amorces).

I-2.3 Analyse statistique

Le déséquilibre de liaison entre les deux génomes cytoplasmiques a été calculé selon Lewontin (D' normalisé, Lewontin 1964; voir Lewontin 1988 pour une discussion à propos du déséquilibre gamétique) avec:

$$D' = \sum_i \sum_j p_i q_j |D'_{ij}|, \text{ où } D'_{ij} = \frac{D_{ij}}{D_{\max}}, \text{ avec } D_{ij} = p_{ij} - p_i p_j \text{ et } D_{\max} = \min\{p_i p_j, (1-p_i)(1-q_j)\} \text{ quand } D_{ij} < 0$$

ou $D_{\max} = \min\{p_i(1-q_j), (1-p_i)q_j\}$ quand $D_{ij} > 0$. p_i et q_j sont respectivement les fréquences du i ème allèle du premier locus et du j ème allèle du second locus; p_{ij} étant la fréquence du gamète ij .

I-3 Résultats

I-3.1 Diversité haplotypique

Nous avons observé 21 mitotypes (de A à U, plus Nv et Sv, voir tableau 1 annexe 1) et 14 chlorotypes (de I à XIV, voir tableau 3 annexe 1). L'investigation des betteraves rudérales du sud/sud-ouest de la France et des betteraves espagnoles a révélé neuf nouveaux mitotypes par rapport à ceux déjà connus sur le littoral français (voir Cuguen *et al.* 1994). En ce qui concerne le cpDNA trois loci sont polymorphes par modification d'un site de restriction, les autres étant supposés dus à des indels⁵. La taille des indels s'échelonne de 4 à 18 pb, sauf pour trois loci (DT, KQ et VL), qui sont aussi les seuls à présenter plus de deux variants. Les chlorotypes I, et XIII ne

⁵ indel = insertion-délétion.

Tableau I-1. Effectif pour chaque association entre les haplotypes chloroplastiques et mitochondriaux.
Les haplotypes sont définis avec tous les loci chloroplastiques (a) ou sans les loci DT, KQ, VL (b).

(a)

cpDNA	mtDNA																				Total	
	H	N	Sv	T	E	P	R	S	F	O	B	M	K	L	Q	U	C	Nv	A	G		I
II							3	6														9
IV	11	6																				17
XI									30	1												31
VIII											8											8
VI			90	8																		98
X					26	2																28
V																		253	2			255
VII												6	1	1	2		14	28				52
XIV																	1					1
IX																			2			2
XII																				1		1
III											10											13
I																						3
XIII																				10	2	12
Total	11	6	90	8	26	2	3	6	30	1	8	10	6	1	1	2	1	267	32	11	8	530

(b)

cpDNA	mtDNA																				Total	
	H	N	Sv	T	E	P	R	S	F	O	B	M	K	L	Q	U	C	Nv	A	G		I
IIIbis			90	8																		98
IVbis	11	6			26	2																45
Vbis									30	1												31
IIbis											8		6	1	1	2		267	32			317
Ibis							3	6				10										22
VIbis																					11	16
VII bis																		1				1
Total	11	6	90	8	26	2	3	6	30	1	8	10	6	1	1	2	1	267	32	11	8	530

furent rencontrés que dans une population (le 'XI' est rare dans ce jeu de donnée mais il fut aussi observé lors du test des 21 individus ayant permis de choisir les amorces). Sept mitotypes sont aussi apparus rares. Là encore, deux d'entre eux (C et L) avaient déjà été mentionnés dans d'autres régions (Cuguen *et al.* 1994) et leur rareté est donc relative. En dépit du faible nombre d'individus regardés par population, 56% d'entre elles présentent deux haplotypes ou plus (calcul réalisé sur les populations ayant au moins trois individus échantillonnés).

I-3.2 Association cpDNA – mtDNA

Les associations observées entre chlorotypes et mitotypes ont permis de définir 27 types cytoplasmiques ou cytotypes (voir le tableau synthétique I-1(a)). Le tableau I-2 détaille la répartition des haplotypes en fonction de la provenance des plantes. Le nombre moyen de mitotypes par chlorotype est de 1.86 ± 0.69 , contre 1.29 ± 0.27 chlorotypes par mitotype. Seuls 4 mitotypes sur 21 sont associés à plusieurs chlorotypes. Ce phénomène disparaît d'ailleurs presque totalement lorsque certains loci sont exclus de l'analyse: il s'agit des loci les plus polymorphes, caractérisés par de petits indels (1 à 4 pb). Le choix de mettre ces trois loci de côté est justifié par l'origine de leur polymorphisme (*i.e.* de petits indels). Ces indels sont fort susceptibles de résulter de répétitions de T (ou A), ou de microsatellites di-nucléotidiques, dont on connaît l'existence dans le génome chloroplastique. Dans ce cas leur mode de mutation ne serait pas comparable à celui des autres loci, ce qui justifie leur écart. Sans ces trois loci, le nombre de chlorotypes passe de 14 à 7 et le nombre de cytotypes décroît de 27 à 22 (Tableau synthétique I-1(b)). Le nombre de mitotypes par chlorotype atteint 3.14 ± 1.72 , avec 1.05 ± 0.10 chlorotypes par mitotype. Seul le mitotype I reste alors associé à plus d'un chlorotype.

Le déséquilibre de liaison entre les deux catégories d'haplotypes est très élevé: $D' = 0.965$ en prenant en compte tous les loci chloroplastiques et $D' = 0.995$ après exclusion des loci DT, KQ et VL.

I-4 Discussion

I-4.1 Association entre cpDNA et mtDNA

Nous avons observé une **très forte association entre les deux haplotypes**.

Ce résultat n'est pas compatible avec un brassage fort des deux génomes cytoplasmiques qui se produirait si un des deux organelles était transmis par le père, ce qui confirme l'absence de transmission paternelle fréquente d'organelles chez la betterave.

Un déséquilibre de liaison important est aussi incompatible avec un fort taux d'apparition récurrente de mitotypes par mutation, car dans ce cas cette apparition récurrente mimerait une recombinaison entre les deux génomes. Cependant quelques non-associations (mitotypes associés avec plus d'un chlorotype) ont été relevées et examinées. Ce phénomène est principalement du aux trois loci chloroplastiques DT, KQ et VL mentionnés précédemment. Nous avons observé pour ces

Tableau I-2. Associations entre les haplotypes mitochondriaux et chloroplastiques: détail selon le type de betterave analysée

	Cp DNA	mtDNA																		Total				
		H	N	Sv	T	E	P	R	S	F	O	B	M	K	L	Q	U	C	Nv		A	G	I	
Sucrières	VI			15																				15
Potagères	IV	1																						1
	VI			1																				1
Hyb. Cult. Sauv.	V																		12					12
	VI			25																				25
mauvaises herbes	VI			47																				47
	XIV																		1					1
rudérales	V																		5					5
	IV	10																						10
	VI			2																				2
	X				19																			19
	XI								25	1														26
	V																		130					130
littorales	XIII																					2	2	
	X				4																			4
	II							1																1
	XI								5															5
	VIII									8														8
	VII														1					2				3
	V																		45	24				69
	IX																			2				2
	XIII																					4		4
	I																						3	3
Divers (Espagne)	III																						3	3
	III																						3	3
	IV		6																					6
	VI				8																			8
	X					3	2																	5
	II							2	6															8
	III										10													10
	VII											6	1		2			13	4					26
	V																	59						59
	XII																					1		1
XIII																					6		6	
Divers (Israël)	V																		1					1
Divers (Argentine)	V																		2					2
Total		H	N	Sv	T	E	P	R	S	F	O	B	M	K	L	Q	U	C	Nv	A	G	I		
		11	6	90	8	26	2	3	6	30	1	8	10	6	1	1	2	1	267	32	11	8	530	

cas qu'un chlorotype était toujours majoritaire, accompagné de un ou deux autres plus rares et que la répartition géographique de ces types n'est pas aléatoire. Les ruptures d'association mettent généralement en cause les loci DT, KQ et VL.

Le mitotype Nv, qui comprend 50.8% des individus analysés est finalement apparu non-homoplasie puisque la rupture de l'association majoritaire peut s'expliquer en supposant une seule mutation sur le locus VL définissant le chlorotype V. Le séquençage des loci DT, KQ et VL apparaît indispensable pour connaître le type et le nombre de mutations responsables de leur polymorphisme (polyA, autres types de microsatellites?). Si les microsatellites sont avérés et que de nouvelles amorces peuvent être définies, nous pourrions alors disposer d'outils puissants pour des études en population sur des échelles géographiques plus fines.

L'apparition du même mitotype par mutation récurrente dans des populations éloignées n'a pas pu être rejetée dans un cas. Le mitotype I a en effet été trouvé associé à trois chlorotypes, et en présente toujours deux après mise à l'écart des trois loci chloroplastiques suspects: le mitotype I est vraisemblablement homoplasie.

1-4.2 Relations entre les différents mitotypes

Dans une précédente étude, Cuguen *et al.* (1994) ont discuté de la corrélation entre mitotypes et stérilité mâle cytoplasmique (CMS). Quatorze types (de A à L, plus Nv et Sv) furent mentionnés, dont quatre associés à de la CMS (Sv, E, G et H). 'Sv' est le type unique des variétés sucrières, tandis que 'E' est le type majoritaire de la CMS rencontrée en populations naturelles. Les types H et G ont été récemment décrits, respectivement par Laporte *et al.* (1998) et Ducos *et al.* (1998). Nous avons observé ici pour la première fois le mitotype T, associé au chlorotype VI qui est le chlorotype spécifique de la betterave sucrière mâle stérile 'Sv'. Ce chlorotype est principalement caractérisé par un locus avec une mutation ponctuelle dans un site de restriction *HindIII*. Cette mutation a été décrite par Ran & Michaelis (1995) sur deux lignées cultivées. Nous avons vérifié son association avec 'Sv' sur plus de 80 plantes; nous l'avons finalement aussi rencontré avec le mitotype T. Ce mitotype présent en population naturelle (exclusivement en Espagne) peut sembler dès lors très proche du mitotype cultivé Sv. Le phénotype sexuel des plantes ayant ce type n'est pas encore connu, comme celui des plantes ayant les types M à U. Parmi ces dernières, on trouve le type P, associé au chlorotype X, qui est aussi le chlorotype rencontré avec le type stérile E. Il en est de même pour le type N, qui partage le même chlorotype IV que le mitotype H. On peut faire l'hypothèse (excessive ?) que ces mitotypes T, P et N ont un ancêtre commun respectivement avec les mitotypes Sv, E et H ou qu'ils en dérivent. Ces observations, qui concernent plutôt la facette gynodioïque de la betterave, méritent d'être approfondies par l'observation des phénotypes sexuels autant que par des investigations plus fines au niveau du

génomique mitochondriale (quelle est la zone mutée du génome mitochondrial qui distingue les mitotypes entre eux? Le cas échéant, les allèles nucléaires de restauration sont-ils les mêmes?).

1-4.3 Dépistage rapide des mitotypes 'Sv' par PCR-RFLP sur le cpDNA

L'association du mitotype Sv et du chlorotype VI s'est révélée sans faille. Une seule amorce est nécessaire à la caractérisation du chlorotype VI par amplification. Cette caractéristique peut **faciliter la recherche rapide et dans de grands échantillons de plantes ayant le mitotype Sv, qui est diagnostique des betteraves sucrières** (exemple: recherche de flux de gènes par graines depuis les champs de sucrières vers les betteraves littorales parapatriques). Une seule amplification, suivie d'une digestion et d'un minigel d'agarose suffit. Cependant, en présence du chlorotype VI, il faudra vérifier le mitotype associé par la voie RFLP classique, ne serait-ce que pour contrôler qu'il s'agit bien du mitotype Sv et non de T. Le mitotype T n'a certes encore jamais été rencontré en France mais il n'est pas rare en Espagne (9 plantes sur 122, 4 populations sur 27).

1-5 Conclusions

L'investigation conjointe de la variabilité chloroplastique et mitochondriale chez la betterave nous a permis de conclure que **la distribution spatiale d'un mitotype résulte de migration plutôt que d'apparition récurrente du même mitotype par mutation** (excepté pour le mitotype I).

D'autre part, nous avons vérifié (i) **l'intérêt des marqueurs chloroplastiques issus de PCR-RFLP à partir d'amorces universelles**, et (ii) **l'association stricte du mitotype Sv, diagnostique des betteraves sucrières, avec un chlorotype aisé à révéler**. Cela peut permettre de rechercher rapidement la présence de mitotypes Sv en populations naturelles.

- Chapitre 2 -

**Situation générale:
relations entre les différents partenaires
du complexe cultivées-sauvages *Beta vulgaris***

Cette étude a fait l'objet d'un article (annexe 3):

Desplanque, B. Boudry, P. Broomberg, K. Saumitou-Laprade, P. Cuguen, J. Van Dijk, H. (1999)

**Genetic diversity and gene flow between
wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae)
assessed by RFLP and microsatellite markers.
Theoretical and Applied Genetics, 98: 1194-1201**

Fig. II-1. Localisation des populations étudiées

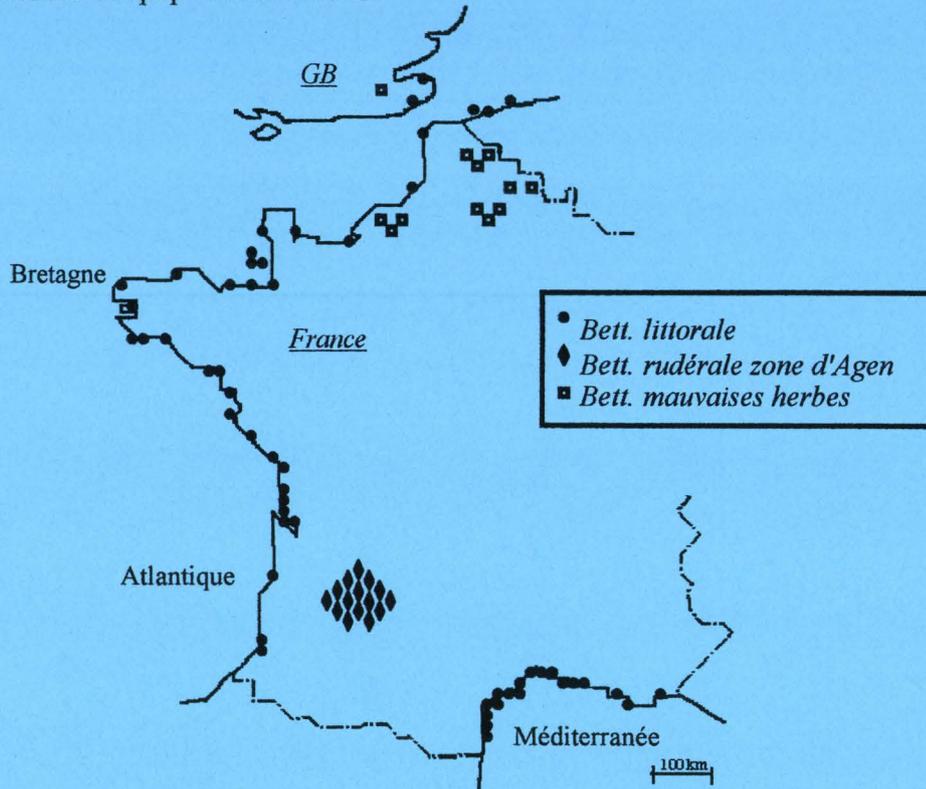
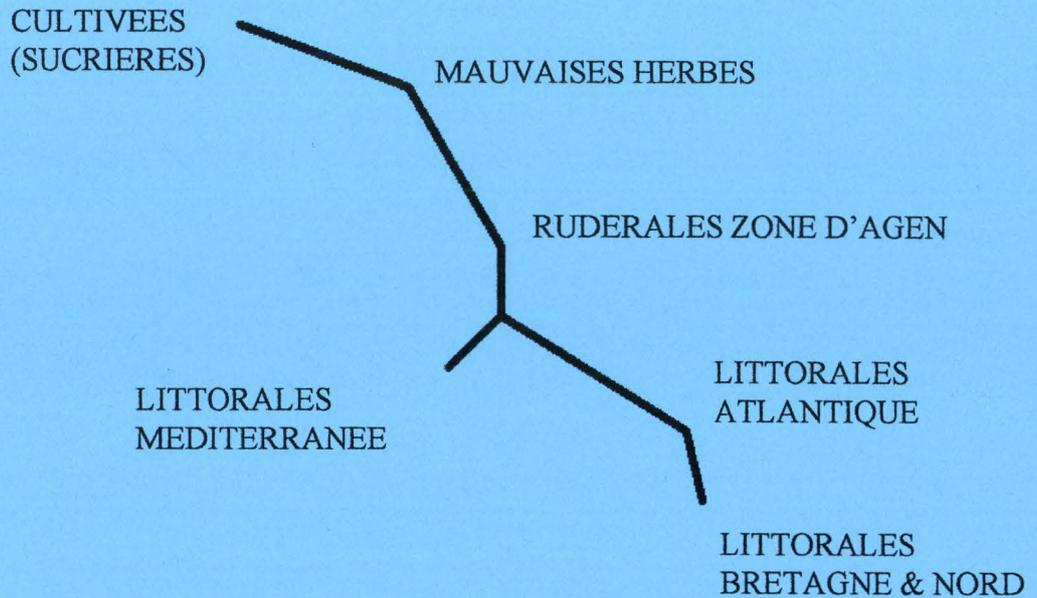


Fig. II-2. Arbre non raciné (Neighbor joining) basé sur les distances génétiques de Reynolds entre les différentes formes de betteraves



Chap. 2 - Situation générale: relations entre les différents partenaires du complexe cultivées-sauvages *Beta vulgaris*

Ce chapitre résume l'article présenté annexe 3.

II-1 Introduction: origine des betteraves mauvaises herbes

Le phénomène des betteraves mauvaises herbes en Europe est connu depuis le début des années soixante-dix (revues dans Longden 1993; Boudry 1994). Plusieurs hypothèses pouvaient expliquer la présence d'individus qui montent à graine dans les champs de sucrières (Horsney & Arnold 1979; Desprez 1980):

(i) Origine ancienne par hybridation entre montaisons variétales puis "sélection à rebours" sur la variété sucrière en faveur d'une montaison rapide. Les individus montés seraient des sucrières à très faible besoin de froid, dont l'induction florale se produirait quasiment sans vernalisation (bien que la betterave soit bisannuelle, l'amélioration des sucrières est une lutte permanente contre la montaison).

(ii) Origine plus récente, issue de contamination des variétés monogermes mâles stériles par des betteraves sauvages. La possibilité d'une telle hybridation a été envisagée par Santoni & Bervillé (1992), sur la base d'une étude concernant quelques betteraves rudérales récoltées dans la zone d'Agen, des mauvaises herbes et des témoins cultivés. Ces auteurs ont observé que certaines mauvaises herbes possédaient des variants moléculaires absents des témoins cultivés et parfois présents dans les accessions sauvages. L'hypothèse d'une contamination par des betteraves sauvages a été confirmée par Boudry *et al.* (1993), qui ont démontré (i) l'origine maternelle cultivée des mauvaises herbes au moyen de marqueurs cytoplasmiques mitochondriaux; (ii) la présence à forte fréquence chez les betteraves rudérales de la zone d'Agen de l'allèle 'B', responsable de la capacité à fleurir sans vernalisation retrouvée chez les mauvaises herbes. Ces résultats invalident l'hypothèse alternative d'une possible origine des mauvaises herbes par contamination des champs de sucrières par des betteraves sauvages littorales, fréquentes le long des côtes Européennes et très présentes sur le littoral de la moitié nord de la France.

Finalement, les betteraves mauvaises herbes sont principalement issues d'hybridation des portes-graines cultivées (c.f. mitotype caractéristique) avec des betteraves rudérales (c.f. allèle B) lors de la phase de multiplication des semences.

L'étude des distances génétiques entre les différentes formes doit pouvoir valider ce scénario. Nous avons mené une analyse sur plus de 300 individus de diverses provenances (Fig. II-1) avec des marqueurs moléculaires nucléaires représentatifs des contributions génétiques biparentales pour mettre en évidence ces relations. De tels marqueurs permettent de prendre en compte la contribution paternelle (pollinique) qui n'avait jusqu'alors été considérée que *via* la

Tableau II-1. Hétérozygotité (observée et attendue) et valeurs de F_{is} pour les différentes formes de betteraves.

Groupe	Nb de pop.	Nb d'ind.	H_o (SD)		H_e (SD)		F_{is} (estimateur de Weir & Cockerham) (SD)	
			RFLPs	BVM3	RFLPs	BVM3	RFLPs	BVM3
Betteraves cultivées	39 var.	39	0.538 (0.255)	0.657	0.480 (0.250)	0.719	-0.069 ^{ns} (0.170)	0.100 ^{ns}
Bet. Rudérales (zone d'Agen)	15	82	0.634 (0.094)	0.766	0.724 (0.091)	0.867	0.165 ^{***} (0.094)	0.122 [*]
Bet. Mauvaises herbes	12	71	0.497 (0.153)	0.609	0.632 (0.153)	0.823	0.261 ^{***} (0.111)	0.267 ^{***}
Littorales Méditerranéennes	18	47	0.655 (0.083)	0.659	0.772 (0.044)	0.900	0.163 ^{***} (0.099)	0.278 ^{***}
Littorales Atlantiques	10	24	0.508 (0.211)	0.609	0.644 (0.180)	0.867	0.251 ^{**} (0.164)	0.318 ^{**}
Littorales Nord et Bretagne	27	54	0.556 (0.244)	0.796	0.609 (0.265)	0.862	0.222 ^{***} (0.155)	0.085 [*]
Total sur l'ensemble	82 (sans les var.cult.)	319			0.725	0.894		

Tableau II-2. Matrice de F_{st} entre les différents groupes de betteraves

Groupes	Betteraves cultivées	Bet. rudérales (zone d'Agen)	Betteraves mauv. herbes	Littorales Médit.	Littorales Atlantiques	Littorales Nord et Bretagne
Betteraves cultivées	0					
Bet. Rudérales (zone d'Agen)	0.115	0				
Betteraves mauvaises herbes	0.043	0.042	0			
Littorales Méditerranéennes	0.174	0.022	0.088	0		
Littorales Atlantiques	0.186	0.079	0.128	0.067	0	
Littorales Nord et Bretagne	0.199	0.112	0.157	0.102	0.002	0

transmission de l'allèle B (repéré phénotypiquement par le caractère de montaison sans vernalisation).

II-2 Distance génétique entre les différentes formes de betteraves

Six loci nucléaires (cinq loci RFLP et un locus microsatellite) ont été utilisés pour étudier les relations existantes entre les différentes formes de betteraves du complexe cultivées-sauvages (cf. article annexe 3). Le tableau II-1 donne les valeurs de H_o , H_e et F_{is} observées. La matrice des F_{st} entre les groupes est donnée Tableau II-2. Une image synthétique de leurs relations peut être donnée sous forme de représentation graphique par Neighbour-joining de la distance génétique de Reynolds (Fig II-2).

II-3 Discussion

II-3.1 Origine des betteraves mauvaises herbes

Les betteraves mauvaises herbes apparaissent intermédiaires entre variétés sucrières et betteraves rudérales, ce qui corrobore l'hypothèse faite sur leur origine. Elles semblent bien loin génétiquement des betteraves littorales des côtes Nord de la France, qui sont les betteraves sauvages les plus proches des champs cultivés.

La diversité génétique des mauvaises herbes est forte et contraste avec l'histoire récente de cette forme de betterave. Cette grande diversité nucléaire tranche avec une relative uniformité mitochondriale, et suggère que la formation de mauvaises herbes par hybridation n'est pas un phénomène rare. Ces deux points seront traités plus en détail dans le chapitre 4.

II-3.2 Betteraves rudérales de la zone d'Agen

Les betteraves rudérales de la zone de multiplication de semences ne semblent pas extrêmement introgressées par les variétés sucrières, contrairement à ce que pouvait laisser penser l'étude menée par Santoni & Bervillé (1992). Ces auteurs ont observé chez quelques betteraves rudérales un variant commun aux betteraves sucrières. Ils en ont déduit que les rudérales concernées avaient été introgressées par les cultivées dans la zone d'Agen. Toutefois, le faible nombre de plantes analysées et l'absence de caractère diagnostique avéré pour le variant considéré rendent peut-être cette conclusion un peu hâtive. De fait, les rudérales se rapprochent davantage des littorales que des cultivées. **L'origine des betteraves rudérales de la zone d'Agen serait donc à chercher parmi les betteraves sauvages littorales.** D'autre part, la distance génétique la plus faible entre les rudérales et des betteraves littorales se rencontre avec les méditerranéennes et pas avec les littorales de la côte atlantique, bien que ces dernières soit plus proches géographiquement de la zone d'Agen.

La probable origine méditerranéenne des betteraves rudérales présente autour des champs de multiplication devait donc être précisée, ainsi que les flux de gènes bilatéraux entre cultivées et sauvages dans cette zone. Pour cela, nous avons approfondi nos investigations sur la forme rudérale

(i) en recherchant des populations en dehors de la "zone d'Agen",

(ii) en caractérisant les betteraves rudérales dans et hors "zone d'Agen"

- avec des marqueurs maternels pour estimer la dispersion par graines.

- par l'observation de traits de vie (comparaison des rudérales avec les littorales et les cultivées, estimation du niveau d'introgression potentiel).

Cette étude centrée sur les betteraves rudérales est présentée chapitre 3.

- Chapitre 3 -

Caractérisation des betteraves rudérales dans le sud de la France

Manuscrit en préparation

**Relations between inland ruderal beets and cultivated beets in southern France
assessed by cytoplasmic molecular markers and life history traits**

Chap. 3 - Caractérisation des betteraves rudérales dans le Sud de la France

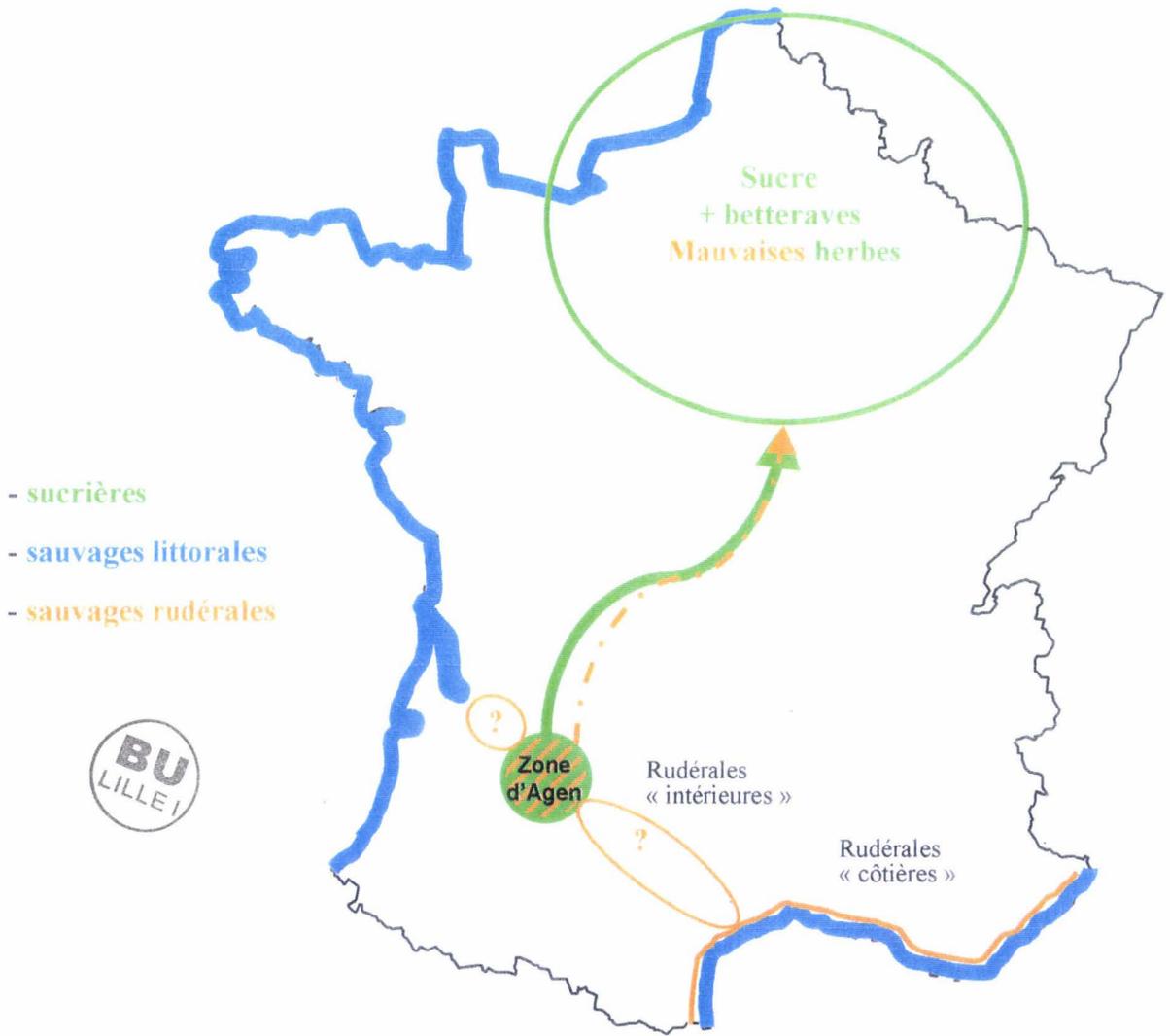
III-1 Introduction

Des plantes présentant à la fois des formes cultivées et des formes sauvages sont mentionnées depuis De Candolle (1883). Les flux de gènes entre compartiments sauvages et cultivés ont ensuite été pris en compte progressivement (Heiser 1973). Les interactions entre les partenaires de ces "complexes d'espèces cultivées-sauvages" rencontrent un intérêt croissant car elles doivent être considérées dans l'évaluation des risques écologiques liés aux OGMs (Ellstrand & Hoffman 1990; Rogers & Parkes 1995; Rissler & Mellon 1996). Les partenaires cultivés, sauvages ou mauvaises herbes⁶ de ces complexes sont parfois sympatriques et s'influencent mutuellement: le mot clé est 'introgression' (Van Raamsdonk & Van Der Maesen 1996). Ces complexes impliquent des formes intra-spécifiques (e.g. De Vries 1997; Jenczewski *et al.* 1999), mais les hybridations surviennent aussi entre espèces différentes cultivées et sauvages (e.g. Langevin *et al.* 1990; Hancock *et al.* 1996; Lefol *et al.* 1996b; Chèvre *et al.* 1998; Darmency *et al.* 1998b).

Les formes cultivées et sauvages sont soumises à différentes pressions de sélection. Leurs échanges génétiques peuvent avoir des effets opposés: d'un côté, les plantes cultivées peuvent recevoir des gènes aux conséquences agronomiques défavorables ; de l'autre côté elles peuvent apporter aux formes sauvages des gènes "domestiques" (Linder *et al.* 1998). Ces gènes peuvent persister en milieu sauvage s'ils sont neutres ou s'ils confèrent à la plante un avantage sélectif (Arriola & Ellstrand 1997). Dans ce dernier cas, le succès reproducteur de la plante est augmenté (Stewart *et al.* 1997). A l'opposé, une introgression de la forme sauvage avec un transgène de résistance n'est pas maintenu en milieu naturel en l'absence de pression de sélection si un coût est associé au transgène (Purrington & Bergelson 1997; Snow *et al.* 1999). Dans tous les cas d'introgression, de possibles effets négatifs sur la biodiversité sont à prendre en compte (Williamson 1993; Snow & Palma 1997; Raybould 1999), par exemple par la formation de mauvaises herbes agressives en milieu naturel (Darmency 1994; Regal 1994).

Les flux géniques chez les betteraves sont potentiellement importants (Raybould & Gray 1993): les différentes formes cultivées, sauvages et mauvaises herbes forment un complexe de sous-espèces entièrement fertiles. Les betteraves cultivées (*Beta vulgaris* subsp *vulgaris* (L.)) comprennent les sucrières principalement, mais aussi les fourragères, les blettes et les betteraves rouges (voir annexe 1). Les betteraves cultivées sont bisannuelles et doivent être récoltées avant l'hiver pour éviter la vernalisation et la montaison qui en résulterait. En revanche, les betteraves sauvages peuvent souvent fleurir sans vernalisation grâce à l'action d'un gène majeur dont l'allèle dominant B dispense de période froide (voir Boudry *et al.* 1994). Les semences de sucrières sont

Fig. III-1. Répartition géographique des différentes formes de betteraves



multipliées dans deux zones principales: une zone près d'Agen dans le sud de la France qui fournit près de 70% des semences européennes (voir annexe 1), et une seconde zone en Italie (e.g. Bartsch & Schmidt 1997). Des hybridations peuvent survenir entre les lignées sucrières maternelles et des betteraves sauvages rudérales sympatriques dont le pollen amène l'allèle B (Boudry *et al.* 1993). Les hybrides – en l'occurrence les futures betteraves mauvaises herbes – peuvent fleurir dans les champs de sucrières durant la culture et représentent un gros problème agronomique en Europe (e.g. Longden 1993). Des betteraves sucrières transgéniques résistantes aux herbicides sont attendues par les agriculteurs pour résoudre ces problèmes d'infestation mais ne sont pas encore commercialisées.

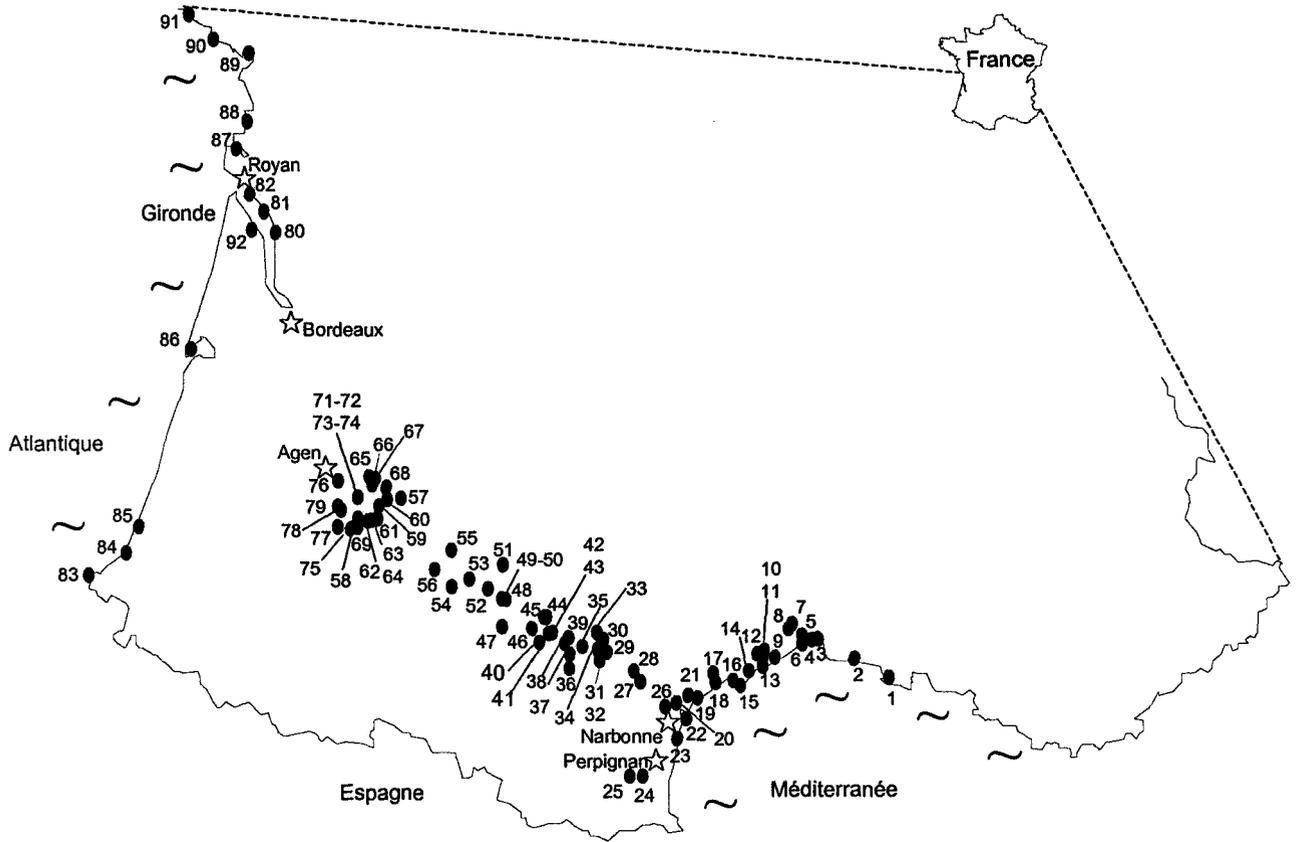
Les betteraves sauvages (*Beta vulgaris* subsp. *maritima* (L.) Arcang.) sont typiquement littorales et originaires de l'Est de la méditerranée (voir annexe 1). On les rencontre communément le long des côtes méditerranéennes mais aussi vers le Nord de l'Europe. Ces betteraves littorales sont nitrophiles et poussent habituellement dans des habitats côtiers riches en matière organique. Par ailleurs, on rencontre aussi des betteraves sauvages non littorales dans des habitats rudéraux autour du bassin méditerranéen (quelques kilomètres en arrière en arrière du cordon littoral) mais elles ne sont pas décrites dans des zones plus reculées, à l'exception des betteraves rudérales de la zone de multiplication d'Agen (e.g. Santoni & Bervillé 1992; Boudry *et al.* 1993). L'origine de ces betteraves non littorales est incertaine: ces betteraves rudérales pourraient être des formes cultivées échappées⁷ devenues sauvages, comme beaucoup de plantes domestiques le montrent (Bartsch *et al.* 1993), ou être déjà présentes en zone d'Agen avant la multiplication des semences. Notre étude avec des marqueurs nucléaires a souligné que les betteraves rudérales de la zone de multiplication étaient davantage liées aux betteraves sauvages méditerranéennes qu'aux betteraves atlantiques (Desplanque *et al.* 1999). En revanche, les betteraves rudérales n'avaient encore jamais été examinées en dehors de la zone d'Agen. La figure III-1 schématise la localisation des différentes formes de betteraves en France.

Une étude préliminaire réalisée par H. Van Dijk l'été 1995 entre Narbonne et Agen a permis d'observer quatre petites populations de betteraves se distribuant sur un continuum 'littoral méditerranéen – Agen'. Plusieurs prospections plus intensives ont alors été réalisées le long de ce transect. **Nous avons voulu préciser la situation des betteraves rudérales dans la zone de multiplication, ainsi qu'en dehors de cette zone, en direction des côtes atlantiques et méditerranéennes. D'autre part, nous avons aussi exploré une partie de la frange littorale méditerranéenne (depuis le Rhône jusqu'à Perpignan), qui demeurait mal connue.** Du fait de la grande longévité des graines et de la présence d'une opération de multiplication des semences

⁶ mauvaises herbes au sens large, dans ou hors de l'agrosystème

⁷ *Feral plants* des anglo-saxons

Fig. III-2. Localisation géographique des populations (détail des noms et caractéristiques d'habitat appendice III-1).



avec des fuites possibles de graines, nous souhaitons étudier particulièrement la dispersion des graines. Nous avons employé pour cela des marqueurs cytoplasmiques mitochondriaux (la mitochondrie est à hérédité strictement maternelle chez la betterave, Corriveau & Coleman 1988). En règle générale, la dispersion des graines est moins étudiée que celle du pollen (Van Raamsdonk & Schouten 1997), puisque les flux géniques des cultivées vers les sauvages sont supposés intervenir surtout par le pollen (Ellstrand & Hoffman 1990). Pourtant, les graines peuvent permettre à des (trans)gènes d'intégrer des populations au travers du phénomène de dormance (Linder & Schmitt 1994). D'autre part, les flux géniques par graines sont particulièrement importants dans le cas de cultures transgéniques mâle stériles ou en cas de transmission exclusivement maternelle du transgène (ces points sont discutés chapitre 5). Une meilleure connaissance des flux de gènes par graines est donc nécessaire.

Finalement, nous voulions

(i) documenter la présence et l'abondance des betteraves rudérales, la taille des populations, et les caractéristiques de leur habitat.

(ii) préciser l'origine des betteraves rudérales et leur possible introgression par les betteraves cultivées. Les échanges génétiques depuis le compartiment sauvage vers le compartiment cultivé ont déjà été étudiés (Boudry *et al.* 1993; Desplanque *et al.* 1999). Nous nous sommes intéressés ici aux flux opposés (des cultivées vers les sauvages), dans cette même région de multiplication des semences. La possibilité de fuite depuis les formes potagères cultivées en jardins privés a aussi été prise en compte. Nous avons utilisé à la fois des marqueurs moléculaires (pour étudier la dispersion des graines) et des traits quantitatifs (pour caractériser les betteraves rudérales).

III-2 Matériel et méthodes

III-2.1 Etude des populations et collecte du matériel

Trois prospections ont été réalisées (en avril 1996 pour le repérage de plantes au stade rosette, et durant les deux étés 1996 et 1997). L'échantillonnage a couvert la côte méditerranéenne depuis le delta du Rhône jusqu'à Perpignan ainsi qu'un transect de Narbonne vers Royan, traversant la zone de multiplication de semence de sucrières d'Agen (abrégée en 'zone d'Agen' dans le reste du chapitre). Des variétés de blettes et de betteraves rouges ont aussi été achetées (respectivement 8 et 6 variétés). Des données provenant d'une étude précédente (Cuguen *et al.* 1994) ont été utilisées pour six des populations atlantiques et pour comparer nos résultats aux situations littorales de la Gironde à la mer du Nord.

L'effectif total des betteraves analysées avec les marqueurs moléculaires représente 447 betteraves, provenant principalement de 92 populations naturelles. La figure III-2 indique la localisation de ces populations (détails sur l'origine et les effectifs en appendice à la fin du chapitre).

III-2.2 Expérimentation en conditions contrôlées

Les mesures ont été réalisées durant les étés 1997 et 1998 (respectivement 830 et 581 individus analysés). Les conditions expérimentales ayant été strictement identiques entre les deux opérations, nous avons réuni les données en un seul jeu. Les plantes ont été semées et conduites en serre, sous une photopériode de 16 h (jours longs, nécessaires pour la montaison) à une température constante de 20-22°C. Les protocoles de semis, rempotage et traitements des plantes sont décrits annexe 1.

Nous avons mesuré divers traits quantitatifs, morphologiques ou phénologiques. La germination a été notée le jour de l'apparition de l'hypocotyle hors du substrat. Nous avons aussi relevé le nombre de plantules par glomérule. Le taux de germination a été calculé comme le nombre de glomérules avec au moins

une plantule, rapporté sur le nombre total de glomérules semés. La précocité de floraison a été définie comme la durée entre la germination et l'anthesis (ouverture de la première fleur). La hauteur de la hampe florale était mesurée le même jour. Les diamètres de la hampe florale et de la racine ont été mesurés en fin d'été, après maturation des graines. Nous avons aussi mesuré la longueur et la largeur moyenne des trois feuilles basales les plus grandes, et noté la présence ou l'absence de pubescence.

III-2.3 Analyses moléculaires

Les analyses ont été réalisées à partir d'ADN de plantes individuelles pour la plupart issues de semis en serre (L'ADN a parfois été extrait à partir de feuilles prélevées sur le terrain). L'ADN génomique total a été digéré par *EcoRI*, déposé sur membrane et hybridé selon des protocoles décrits dans (Desplanque *et al.* 1999). Trois sondes mitochondriales ont été utilisées pour révéler le polymorphisme RFLP: ATP6 (sous-unité 6 du maïs), pBV4 (séquence mitochondriale non codante issue de la betterave sucrière) et NvulgN2 (fragment de 12.5 kb isolé d'une digestion *EcoRI* de l'ADN mitochondrial de betterave).

III-2.4 Analyses statistiques

Les betteraves provenant des populations naturelles ont été séparées en six groupes: (1) 'littorales méditerranéennes'⁸, (2) 'rudérales côtières', (3) 'rudérales intérieures', (4) 'rudérales zone d'Agen' (5) 'littorales atlantiques' (6) 'littorales de Gironde' pour les analyses statistiques. Les regroupements ont été faits en tenant compte de l'origine géographique et du statut "côtier" *versus* "intérieur des terres" des populations. Les betteraves cultivées n'ont pas participé à ces analyses.

III-2.4.1 Analyses génétiques du polymorphisme mitochondrial

Les haplotypes mitochondriaux (mitotypes) ont été déterminés en fonction des polymorphismes obtenus avec les trois sondes mitochondriales et nommés de A à S, plus Nv et Sv (Tableau III-1), en utilisant la même nomenclature que Cuguen *et al.* (1994). La fréquence des haplotypes dans chaque groupe de population a été estimée en considérant le génome mitochondrial comme un locus et les haplotypes comme des allèles. La diversité haplotypique selon Nei (1987) a été calculée avec le logiciel Arlequin (Schneider *et al.* 1997). Une analyse moléculaire de la variance (AMOVA Excoffier *et al.* 1992) a été conduite avec le même logiciel. Les F_{st} totaux et par paires, l'isolement par la distance et les tests exacts de différenciation des groupes de populations ont été calculés avec GENEPOP (Raymond & Rousset 1995). L'isolement par la distance le long du transect Narbonne-Agen a été testé après regroupement des populations en sept groupes équidistants. Les F_{st} par paire ont été calculés pour ces groupes ; une matrice de $F_{st}/(1 - F_{st})$ a ensuite été comparée à une matrice de distances géographiques avec un test de Mantel.

III-2.4.2 Expérimentations en conditions contrôlées

Une Analyse en Composantes Principales (logiciel StatGraphics Plus 2.1) concernant les traits de vie a permis de comparer les groupes. Nous avons utilisé des valeurs moyennes par famille⁹ pour les attributs suivants (relevés uniquement sur les plantes fleuries): diamètre hampe florale, largeur du limbe, longueur de limbe, longueur du pétiole, nombre de plantules par glomérule, précocité de floraison, précocité de germination, taux de germination, hauteur à l'anthesis et nombre de fleurs par inflorescence.

III-3 Résultats

III-3.1 Localisation géographique et description des betteraves rudérales

De nombreuses populations ont été rencontrées dans toutes les zones prospectées, à l'exception notable de la région entre Agen et Bordeaux (Fig. III-2). Les populations ont toutes été trouvées sur des terrains perturbés par l'homme: travaux routiers contemporains¹⁰ ou plus anciens (ronds-points, fossés, parkings), dépôts de gravats mais aussi bord de champs dans quelques cas (voir appendice III-1 en fin de chapitre). Les surfaces occupées par ces populations sont plutôt

⁸ la côte méditerranéenne est fortement anthropisée, parfois au niveau même du lido. La frontière est donc floue entre les deux formes sauvages: les betteraves littorales de la mer Méditerranée sont souvent dans des sites que l'on qualifierait de rudéraux s'il n'étaient pas en bord de mer... Nous nous sommes donc strictement limités dans notre appellation de 'littorales méditerranéennes' aux populations susceptibles d'être envahies par la mer en cas de forte tempête de façon à disposer d'un groupe de référence le plus fiable possible.

⁹ familles: descendances maternelles de demi-frères.

¹⁰ Beaucoup de populations occupaient des tas de terre bennés par des camions.

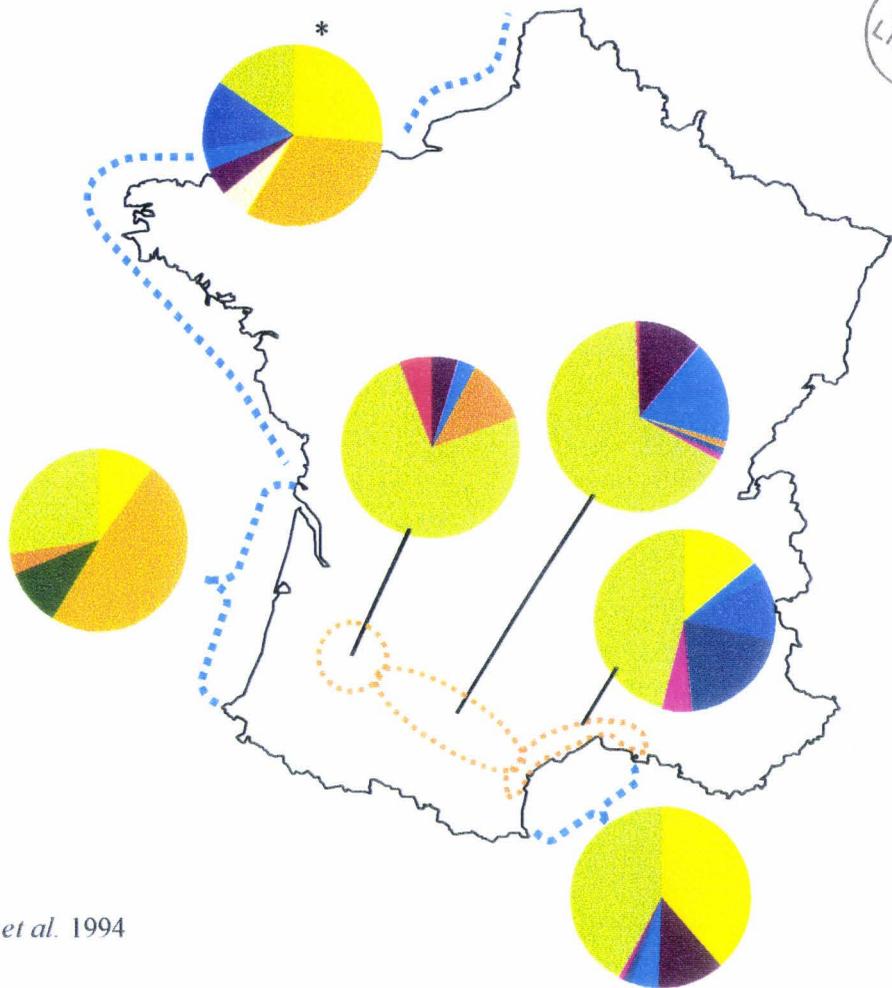
Fig. III-3. Distribution géographique des mitotypes



15 mitotypes

-  A
-  B
-  C
-  D
-  E
-  F
-  G
-  H
-  I
-  divers

-  Nv
-  Sv



* : d'après Cuguen *et al.* 1994

Fig. 4: distribution géographique de quelques mitotypes

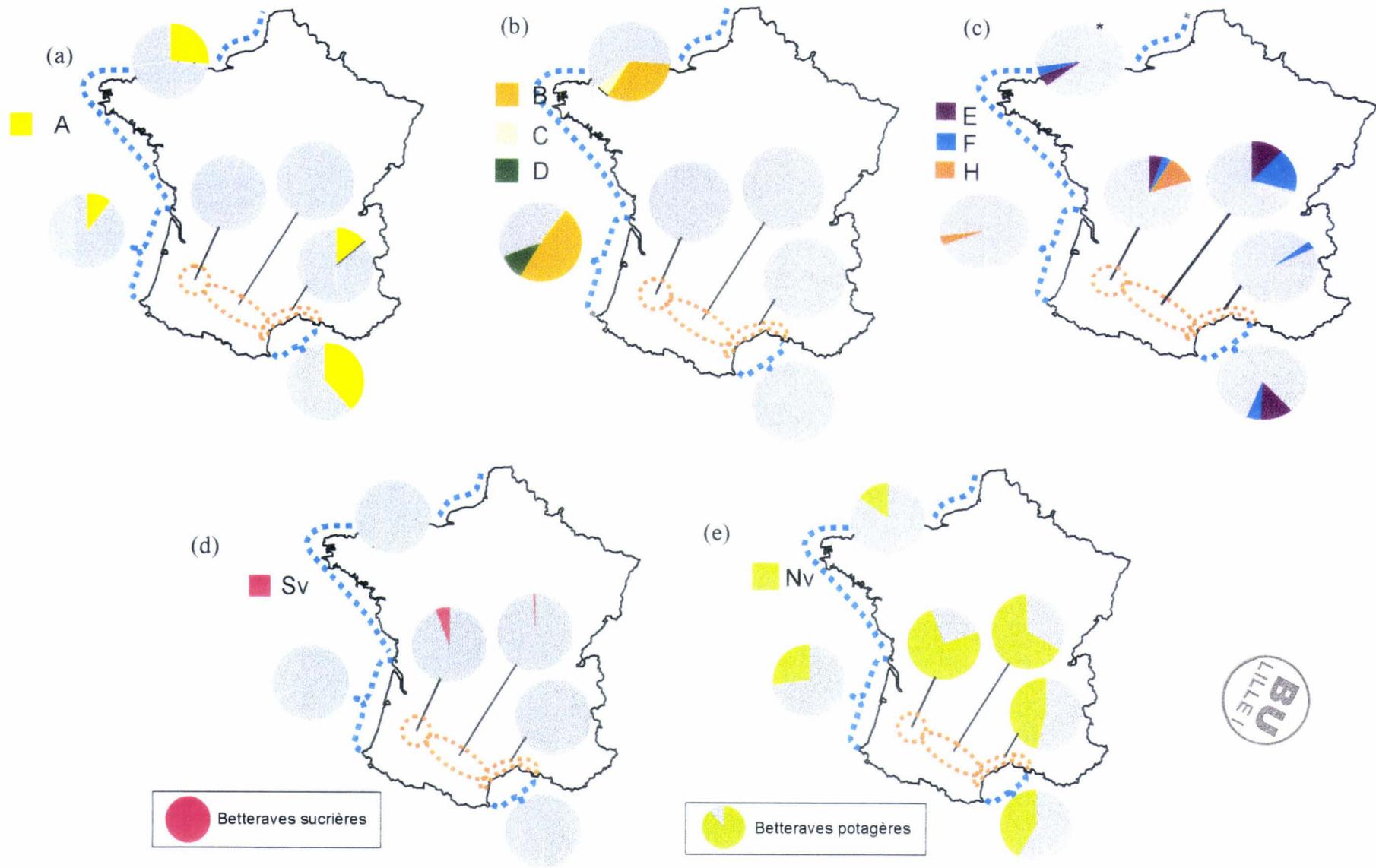
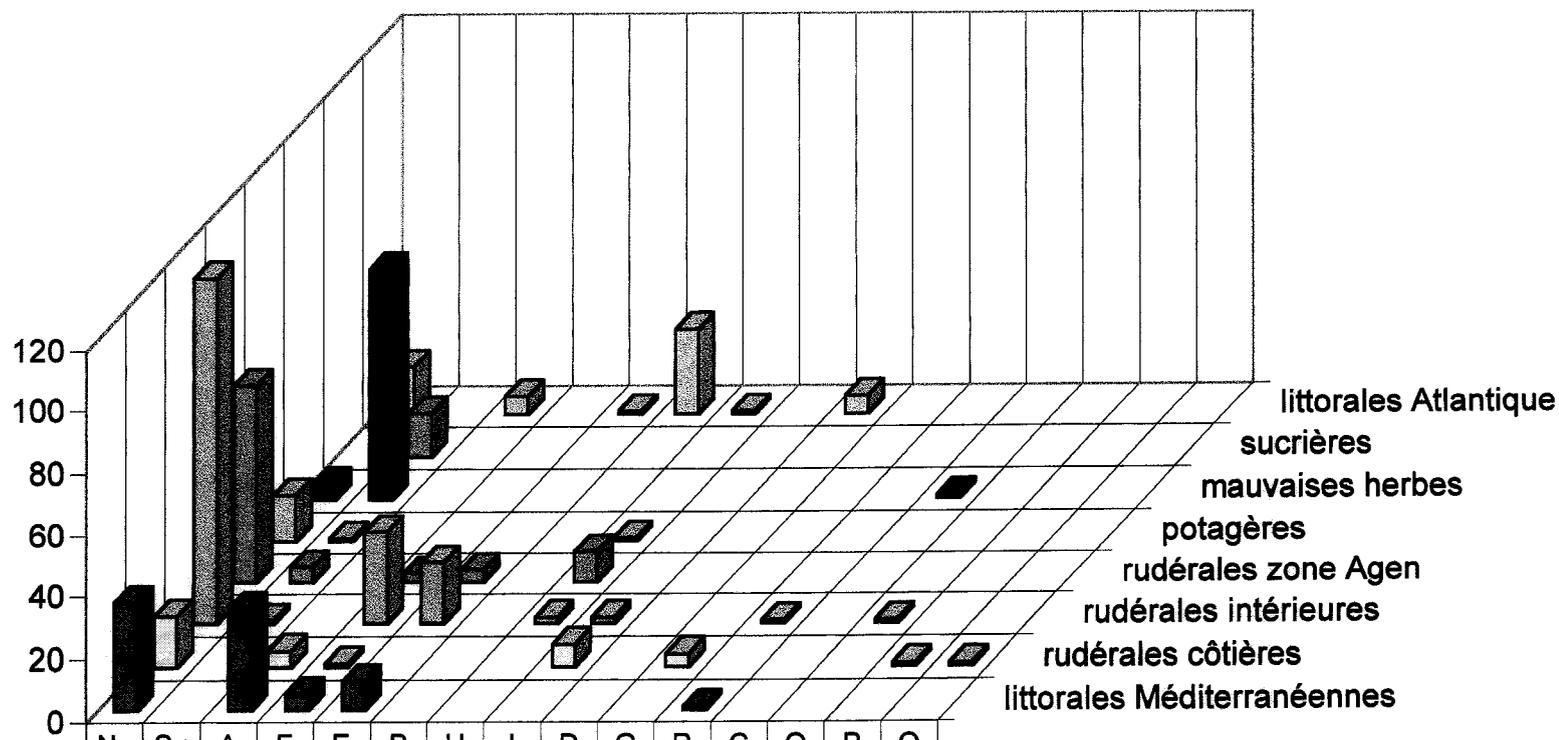


Fig. III-5. Répartition des mitotypes entre les groupes de betteraves



- littorales Méditerranéennes
- rudérales côtières
- ▨ rudérales intérieures
- ▩ rudérales zone Agen
- ▧ potagères
- mauvaises herbes
- ▨ sucrières
- ▩ littorales Atlantique

	Nv	Sv	A	F	E	B	H	I	D	G	R	C	O	P	Q
■ littorales Méditerranéennes	34		32	5	9						1				
□ rudérales côtières	16		5	1				7		4				1	1
▨ rudérales intérieures	112	1		30	20		2	2			1		1		
▩ rudérales zone Agen	64	5		3	4		10								
▧ potagères	15	1					1								
■ mauvaises herbes	5	74										1			
▨ sucrières		14													
▩ littorales Atlantique	16		6		1	28	1		6						

Tableau III-1. Répartition des haplotypes mitochondriaux dans les différents groupes de populations

Nombre moyen de mitotypes, diversité haplotypique et nombre de plantes ayant un mitotype donné par groupe de population (fréquence en italique).

N_p = Nb de populations. A = Nb de mitotypes différents. H_e = Diversité haplotypique selon Nei (1987).

Groupes	N_p	A	H_e	Mitotypes														Total	
				A	B	D	E	F	G	H	I	O	P	Q	R	Nv	Sv		
Littorales méditerranéennes	15	5	0.660	32 <i>0.40</i>			9 <i>0.11</i>	5 <i>0.06</i>								1 <i>0.01</i>	34 <i>0.42</i>		81 <i>1.00</i>
Rudérales côtières ^a	9	7	0.736	5 <i>0.14</i>				1 <i>0.03</i>	4 <i>0.11</i>		7 <i>0.20</i>		1 <i>0.03</i>	1 <i>0.03</i>			16 <i>0.46</i>		35 <i>1.00</i>
Rudérales intérieures ^b	32	8	0.514				20 <i>0.12</i>	30 <i>0.18</i>		2 <i>0.01</i>	2 <i>0.01</i>	1 <i>0.01</i>				1 <i>0.01</i>	112 <i>0.66</i>	1 <i>0.01</i>	169 <i>1.00</i>
Rudérales zone d'Agen	23	5	0.431				4 <i>0.05</i>	3 <i>0.03</i>		10 <i>0.12</i>							64 <i>0.74</i>	5 <i>0.06</i>	86 <i>1.00</i>
Littorales atlantiques	3	3	0.622		2 <i>0.20</i>	6 <i>0.60</i>											2 <i>0.20</i>		10 <i>1.00</i>
Littorales de Gironde	10	5	0.618	6 <i>0.13</i>	26 <i>0.54</i>		1 <i>0.02</i>			1 <i>0.02</i>							14 <i>0.29</i>		48 <i>1.00</i>
Blettes	/	1	/														8 <i>1.00</i>		8 <i>1.00</i>
Betteraves rouges	/	3	/							1 <i>0.17</i>							4 <i>0.67</i>	1 <i>0.17</i>	6 <i>1.00</i>
Total	92	14	/	43	28	6	34	39	4	14	9	1	1	1	2	254	7	447	

^a : environnement rudéral < 15 km de la côte.

^b : environnement rudéral > 15 km de la côte.

Tableau III-2. Matrice des valeurs de F_{st} par paires entre les groupes de populations (calcul basé sur les fréquences des mitotypes).

Les valeurs de $F_{st} < 0.100$ sont en grisé.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Littorales méditerranéennes (1)	0.000				
Rudérales cotières (2)	0.071*	0.000			
Rudérales intérieures (3)	0.164***	0.106***	0.000		
Rudérales zone d'Agen (4)	0.200***	0.131**	0.036***	0.000	
Littorales Atlantiques (5)	0.294***	0.240***	0.369***	0.426***	0.000
Littorales Gironde	0.225***	0.205***	0.307***	0.340***	0.256**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

Tableau III-3. Partition hiérarchique de la diversité mitochondriale (AMOVA)

Source de variation	ddl.	Pourcentage de variation
Entre les groupes ^a	5	18.45***
Entre les provenances ^b	2	15.18 ^{ns}
Entre les groupes dans une provenance	3	06.48***
Dans les groupes	425	78.34***
Entre les habitats ^c	1	08.67 ^{ns}
Entre les groupes dans un habitat	4	12.72***
Dans les groupes	425	78.62***

ns = non significatif; *** = $P < 0.001$

^a : groupe = [Atlantique] vs. [Gironde] vs. [littorales méditerranéennes] vs. [rudérales côtières] vs. [rudérales intérieures] vs. [rudérales zone d'Agen].

^b : provenance = [Atlantique + Gironde] vs. [littorales méditerranéennes] vs. [toutes les rudérales].

^c : habitat = [littorales (Atlantique, Gironde et Méditerranée)] vs. [rudérales (le reste)].

petites, ce qui est une conséquence directe de la faible étendue des perturbations qu'elles occupent: 83% d'entre elles sont inférieures à 100 m² et 36% inférieures à 10 m². La taille des populations est plutôt faible (100% des populations < 100 individus, 38% < 10 individus). Plusieurs populations (n° 60-79) ont été trouvées en parapatricie des champs de multiplication dans la zone d'Agen.

III-3.2 Diversité cytoplasmique

La localisation géographique des mitotypes est détaillée figure III-3. Les figures III-4a à 4e détaillent certains de ces mitotypes. Le nombre de mitotypes par groupe de betteraves, ainsi que la fréquence des haplotypes et la diversité (H_e) sont donnés Tableau III-1 (représentation graphique Fig. III-5). Toutes les betteraves potagères possèdent le mitotype Nv sauf deux betteraves rouges: 'Crapaudine' (type H) et 'Warrior F1' (type Sv). Le mitotype le plus fréquent chez les betteraves sauvages rudérales et littorales est le type Nv. Les trois groupes de betteraves rudérales ont montré une fréquence de Nv significativement supérieure à celle des trois autres groupes de betteraves littorales (test non-paramétrique de Mann-Whitney, $P < 0.05$). En revanche, seulement six betteraves sauvages sur 428 ont présenté le type Sv (cinq populations sont impliquées N° 55,59,60,69,70). Les betteraves rudérales présentent la diversité cytoplasmique la plus faible, avec $H_e = 0.431$ et 0.514 (pour les 'rudérales de la zone d'Agen' et les 'rudérales intérieures') contre des valeurs de H_e supérieures à 0.618 pour le reste des groupes. Un test de différenciation entre les groupes de betteraves rudérales a été conduit à partir des fréquences de mitotypes basé sur une description fine de l'habitat: les populations 'bord de champ' ne sont pas différentes des populations 'dépôts de gravats' ou 'travaux routiers' (cf. F, R et RW dans l'appendice III-1). Cependant ces deux derniers groupes (R et RW) sont différents entre eux (test exact de différenciation, $P < 0.001$).

La matrice des F_{st} deux à deux entre les groupes est donnée Tableau III-2. Les F_{st} sont tous différents de zéro. La valeur globale atteint 0.504 . Les tests exacts de différenciation entre paires de groupes sont tous hautement significatifs ($P < 0.001$). Toutefois, les trois groupes de populations rudérales sont apparus regroupés et plus proches des populations littorales méditerranéennes que des populations atlantiques. Les betteraves rudérales côtières sont très proches génétiquement des betteraves littorales voisines. Il n'y a aucune évidence d'isolement par la distance entre les populations le long d'un transect Narbonne-Agen: les deux matrices ' $F_{st}/(1-F_{st})$ ' et 'distance géographique' sont indépendantes (P (corrélation > corrélation observée) = 0.128 sous l'hypothèse nulle de l'indépendance).

Le nombre moyen de mitotypes par population (ayant plus de trois individus échantillonnés) est de 1.70 ± 0.16 .

La partition de la variance entre les groupes de populations par AMOVA (Tableau III-3) montre que seulement 18.5% de la variation est attribuée à la différenciation entre les groupes. Lorsque les populations sont regroupées autrement, par exemple en fonction de leur provenance

Tableau III-4. Valeurs moyennes observées pour les traits quantitatifs. N = effectif analysé.

groupes	N	Taux de germination par glomérule ^a (%±SE)		Nb moyen de plantules par glomérule ^b	Précocité de germination	Feuille L/l ^c	Feuille L/P ^d	Pubesc. ^e (%)	Taux mont. ^f (%)	Précocité de floraison	Hauteur ^g (cm)	Diam. Racinaire des bet. montées (mm)	Diam. Racinaire des bet. non montées (mm)	Diam. Hampe florale (mm)
		1 ^{ère} vague	2 ^{ème} vague											
Littorales méditerranéennes	275	0.26 ± 0.08	0.32 ± 0.08	1.15 ±0.05	7.98 ±0.40	1.61 ±0.03	0.94 ±0.04	31.34 ±0.08	52.73 ±0.07	73.05 ±3.20	86.99 ±3.30	8.83 ±0.46	15.00 ±0.54	4.88 ±0.76
Rudérales côtières	160	0.26 ± 0.09	0.34 ± 0.10	1.09 ±0.04	8.13 ±0.44	1.61 ±0.04	0.99 ±0.06	08.27 ±0.06	34.11 ±0.09	74.72 ±4.26	85.11 ±4.61	8.47 ±0.55	13.98 ±0.83	5.12 ±1.02
Rudérales intérieures	511	0.31 ± 0.08	0.38 ± 0.08	1.10 ±0.03	6.87 ±0.25	1.57 ±0.02	1.12 ±0.03	23.72 ±0.05	67.43 ±0.06	72.65 ±1.82	76.04 ±2.16	9.09 ±0.27	15.06 ±0.47	5.50 ±0.57
Rudérales zone d'Agen	186	0.36 ± 0.15	0.38 ± 0.14	1.14 ±0.06	6.53 ±0.27	1.57 ±0.05	1.44 ±0.07	15.54 ±0.08	90.00 ±0.05	59.19 ±2.89	71.65 ±2.63	7.91 ±0.44	17.29 ±3.10	5.14 ±0.79
Littorales atlantiques	26	0.56 ± 0.23	0.59 ± 0.22	1.11 ±0.08	9.16 ±0.60	1.76 ±0.15	1.02 ±0.10	00.00	00.00	/	/	/	14.85 ±1.46	/

^a : calculé sur l'ensemble des glomérules semés.

^b : calculé sur l'ensemble des glomérules semés.

^c : valeur moyenne du rapport longueur sur largeur calculé sur les trois plus grandes feuilles pour chaque plante.

^d : valeur moyenne du rapport longueur sur pétiole calculé sur les trois plus grandes feuilles pour chaque plante.

^e : pubescence: valeur moyenne du pourcentage de familles dans chaque population ayant au moins un individu pubescent (feuilles et tige).

^f : valeur moyenne par famille du pourcentage de betteraves montées sans vernalisation.

^g : hauteur de la plante à l'anthèse.

géographique, il n'y a pas de différence significative entre les groupes. Le même résultat est obtenu quand les groupes sont construits en fonction de l'habitat ('habitat littoral' vs. 'habitat intérieur proche du littoral' vs. 'habitat intérieur loin du littoral').

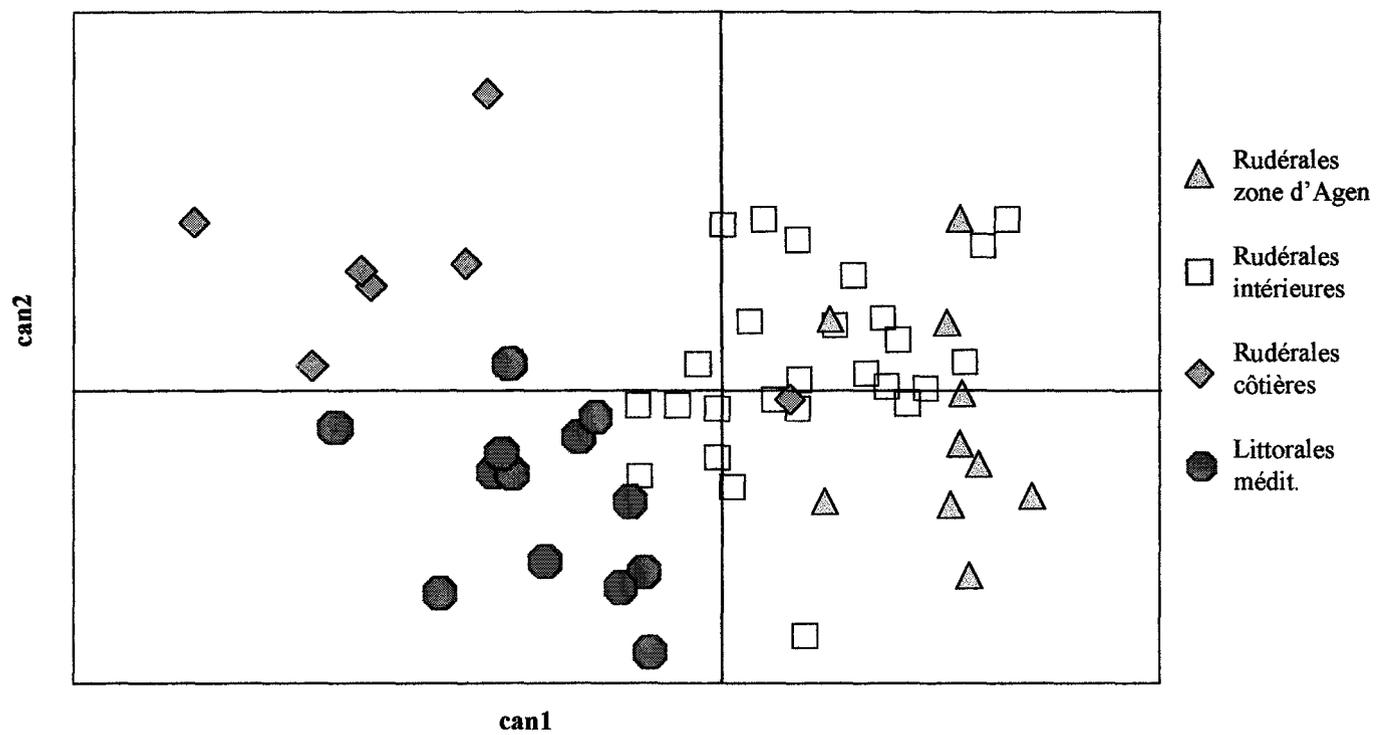
III-3.3 Traits quantitatifs

Le tableau III-4 détaille les valeurs moyennes mesurées pour les différents groupes de betteraves. Il existe une grande variabilité intra- et inter-populations, ainsi que intra- et inter-groupes de populations. L'analyse en composantes principales (Fig. III-6) confirme la pertinence de nos regroupements basés sur la provenance géographique et l'habitat. Les betteraves rudérales de la zone d'Agen sont proches des autres betteraves rudérales du transect Narbonne – Agen, tandis que les rudérales côtières sont proches des littorales méditerranéennes.

Certains traits apparaissent fortement discriminants entre les groupes. Les rudérales de la zone d'Agen présentent souvent des valeurs extrêmes. Habitus: les plantes rudérales ont un pétiole plus court que les autres mais il s'agit vraisemblablement d'une conséquence de leur floraison précoce: le stade 'rosette' est extrêmement bref et les feuilles sont presque des bractées, dont on sait qu'elles présentent un pétiole court. Des plantes pubescentes sont trouvées partout, sauf sur la côte atlantique. Entre 15 et 53% des rudérales ont au moins un représentant pubescent dans chaque famille, avec une décroissance de cette fréquence depuis la côte méditerranéenne vers Agen. Germination: Le taux de germination est faible et s'étage de 26 à 36% pour les rudérales et les littorales méditerranéennes (56% pour les littorales atlantiques). Ce taux augmente quand les glomérules non germés sont laissés sécher dans le terreau avant d'être ré-humidifiés quatre semaines plus tard. Cependant, les rudérales d'Agen sont les seules parmi les rudérales à ne pas présenter une telle "seconde vague" de germination. Les rudérales intérieures et parmi elles les rudérales d'Agen sont les plus précoces. Floraison: Le taux de floraison sans vernalisation est très variable entre les groupes. Aucune montaison n'a été observée pour les littorales atlantiques alors qu'elles représentent 59 à 90% chez les autres betteraves. Le taux le plus faible appartient au littoral méditerranéen (pour les betteraves rudérales ou littorales), tandis que le taux le plus fort est rencontré en zone d'Agen où 90% des plantes sont annuelles¹¹. Les autres betteraves rudérales montrent des valeurs intermédiaires. Le fort taux de floraison dans la zone d'Agen est associé à une forte précocité de floraison: la durée entre la germination et l'anthèse y est de 60 jours contre environ 72 jours pour les autres. Diamètre racinaire: les betteraves montées de la zone d'Agen ont des racines plutôt petites. Cependant, cette tendance n'est pas partagée par les autres betteraves rudérales puisque les rudérales hors zone d'Agen ont les plus grosses racines. En ce qui concerne les plantes non montées, le groupe ayant les plus grosses racines est aussi celui de la zone d'Agen.

¹¹ Ce terme est utilisé ici pour signifier que la plante fleurit la première année mais n'implique pas forcément une mortalité post-floraison

Fig. III-5. Analyse en Composantes Principales
sur les traits de vie des plantes montées (ayant l'allèle B)



Nous avons trouvé deux familles (de deux populations N° 24 et 48) ayant des traits de betterave rouge (i.e. une couleur rouge caractéristique due au gène 'Rouge'). De plus, 10 populations (N° 24, 25, 28, 34, 38, 48, 51, 54, 56, 62) ont montré des plantes avec des caractères de blettes (i.e. de larges feuilles avec une grande nervure centrale). Finalement, deux populations ont présenté des plantes avec une nervation blanche, ce qui est un attribut de sucrière qui est aussi visible chez certaines betteraves mauvaises herbes (Observ. Pers.) Les sucrières sont aussi en général non pubescentes, bisannuelles (sans l'allèle B) et ont une grande racine, de grandes feuilles avec un long pétiole ainsi qu'une hampe florale vigoureuse.

III-4 Discussion

III-4.1 Betteraves rudérales: présence dans le paysage

En zone d'Agen: les multiplicateurs de semences doivent rechercher et détruire toutes les rudérales¹² à proximité des champs de multiplication. Malgré cette vigilance, de petits foyers de rudérales existent (Santoni & Bervillé 1992; Boudry *et al.* 1993), en général à plusieurs kilomètres des champs de multiplication. Les betteraves que nous avons trouvé (indépendamment de toute information) proviennent pour la plupart de la partie sud de la zone de multiplication. C'est d'ailleurs là qu'elles sont les plus nombreuses aux dires des sélectionneurs, qui se déplacent actuellement vers la partie Nord de la zone.

Hors zone d'Agen: En supposant que les betteraves rudérales soient exclusivement liées à la multiplication des semences, il n'y avait pas lieu d'en trouver loin du littoral en dehors de cette zone. Elle se sont au contraire révélées très nombreuses. Le grand nombre de sites observés élimine tout caractère anecdotique à leur présence. Des betteraves non littorales sont facilement rencontrées quelques kilomètres en arrière du trait de côte, associées avec des sites récemment perturbés¹³. En revanche, aucune population rudérale n'a été trouvée entre Agen et Bordeaux, en dépit de conditions écologiques *a priori* similaires et de nombreux sites potentiellement favorables.

La dispersion des graines chez les betteraves non littorales semble fortement liée aux activités humaines, en particulier au transport de terre. Les camions pourraient être les agents principaux de dispersion de ces betteraves. Leur maintien est dépendant de la récurrence des perturbations, qui crée des habitats ouverts avec un sol profond. En quelques années, si le sol n'est pas perturbé à nouveau, la population décline face à la compétition exercée par les autres espèces puis disparaît. De fait, la betterave est une piètre compétitrice¹⁴ (Bartsch *et al.* 1994). Les betteraves peuvent avoir produit un grand nombre de glomérules avant d'être éliminées par des plantes plus

¹² d'autre part, la mise à graine des betteraves potagères en jardins privés est interdite par arrêté préfectoral.

¹³ Le nombre de populations réelles est très supérieur à celui mentionné ici. J'ai par exemple relevé de façon totalement fortuite cinq populations dans les quelques kilomètres carrés d'un village héraultais (10 km de la mer).

Les betteraves rudérales appartiennent à l'espèce *Beta vulgaris*, qui constitue un complexe de sous-espèces cultivées-sauvages. Vouloir qualifier plus précisément la betterave rudérale paraît illusoire, sinon inutile. Il est certes facile d'attribuer un nom (ssp *vulgaris* versus ssp *maritima*) à une plante dont on connaît la provenance (champ cultivé *versus* littoral) mais l'exercice se complique s'il est pratiqué "en aveugle" devant un échantillon anonyme. Toutes nos observations sur **les betteraves littorales montrent une très grande variabilité morphologique des individus**. Toutes les betteraves cultivées sont érigées lors de leur fructification mais certaines betteraves littorales le sont aussi et elles ne sont pas toutes prostrées et rampantes, loin s'en faut (observations personnelles en France, Espagne, et Italie). Cette variabilité est valable pour l'ensemble de la plante (Letschert 1993): "la plante est pérenne mais parfois annuelle, érigée ou prostrée, aux branches ascendantes ou décombantes, verte ou veinée de rouge, aux feuilles glabres ou légèrement duveteuses...". L'appartenance à *vulgaris* ou *maritima* est donc généralement conclue sur l'appréciation "racine charnue" *versus* "racine peu épaisse" (Jauzein 1995), ce qui est insuffisant dans le cas de plantes introgressées.

En revanche, il est certain que **les betteraves rudérales n'appartiennent pas à l'espèce *Beta macrocarpa***. La mention de cette dernière espèce dans le sud-ouest de la France (Desprez 1980 ; Santoni & Bervillé 1992) semble être liée à une confusion sur le nom. Cette méprise est entretenue par les professionnels de la betterave, mais n'a pas de fondement "biologique". *B. macrocarpa* est une espèce à part entière. Sa diagnose la rend d'ailleurs aisément discernable de *maritima*. La véritable espèce *B. macrocarpa* est aussi une habituée des sites rudéraux tels que bords de champs, dépôts d'ordures, terrassements, fossés et bord de route en Espagne, où elle croît dans des sols de salinité variable. Au Portugal, elle semble restreinte aux zones sèches des salines. La littérature rapporte cependant cette espèce dans le sud de la France. Letschert (1993) en effet la signale au Portugal et en Espagne, deux pays où nous l'avons effectivement échantillonnée (Cuguen, Desplanque, Viard non publié); mais aussi aux Baléares, aux Canaries, au Maroc, en Algérie, à Chypre, en Sicile, en Grèce, en Turquie et ... dans le sud de la France³. Nous n'avons de notre côté jamais rencontré cette espèce en France.

³ les spécimens examinés par cet auteur proviennent de tous les pays qu'il cite sauf de France, ce qui rend cette information suspecte.

compétitives. La perte de vigueur germinative est plus faible chez la betterave que chez les légumineuses et les céréales (Meyer 1989). La banque de graines résultante peut attendre des dizaines d'années avant une nouvelle perturbation, ce qui est classique chez les espèces d'habitats perturbés (Harper 1977). Il est aussi fréquent qu'il existe plusieurs modes de dispersion pour une graine (Bakker *et al.* 1996). C'est le cas pour la betterave. Ses diaspores sont en fait des glomérules, c'est à dire des fruits ligneux et riches en liège capables de flotter (les betteraves littorales sont dispersées par le balancement des marées). Ce mode de dispersion (barochorie puis hydrochorie) est le seul mode utilisé de façon évidente en conditions naturelles: le vent ne peut pas disperser les glomérules sur de longues distances et aucun animal n'est connu pour les disperser. Compte tenu de cette hydrochorie, nous devons aussi considérer les crues de rivières en plus de l'action humaine, particulièrement dans le sud de la France qui subit des pluies violentes. L'existence de décharges "colonisées" par des betteraves en bord de rivière pourrait permettre aux glomérules d'être dispersés sans l'intervention de l'homme en situation non littorale.

III-4.2 Particularités des betteraves sauvages rudérales

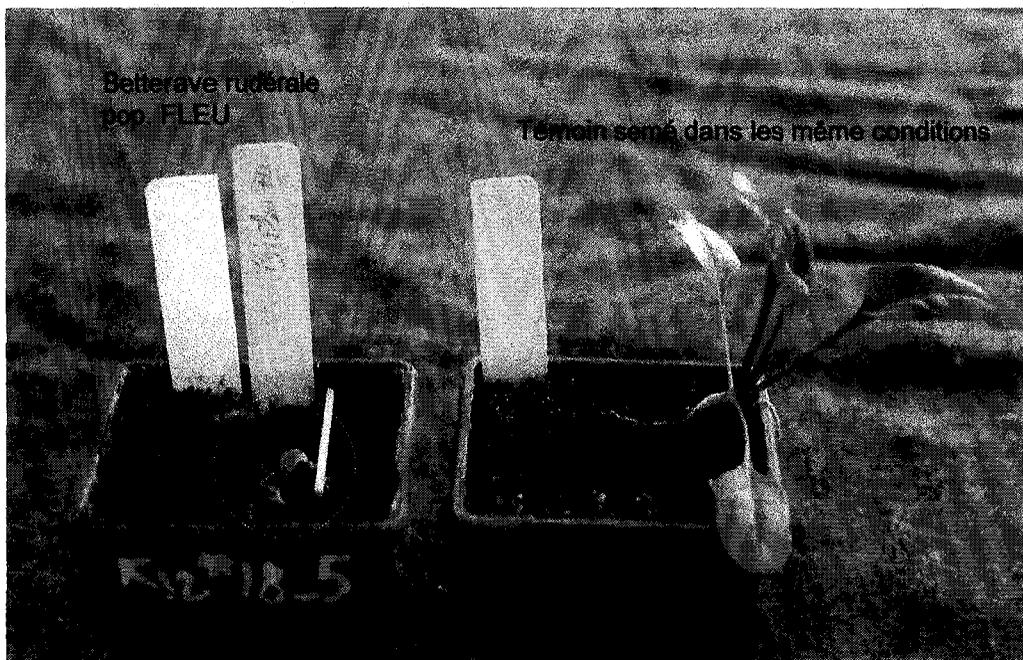
Nos observations soulignent la grande variabilité morphologique des betteraves sauvages (voir aussi l'encadré III-1). Cette variabilité rend d'ailleurs difficile le discernement des traits pouvant provenir du compartiment cultivé (à l'exception des cas flagrants comme la couleur due au gène 'R' des betteraves rouges ou des feuilles de type "blette"). Les betteraves rudérales présentent des similitudes avec les betteraves littorales méditerranéennes. Elle s'en distinguent toutefois, comme le montre l'ACP. D'autre part, la décomposition des rudérales en sous-groupes sur la base de l'habitat et de la provenance géographique semble justifiée.

Le cas particulier des betteraves de la zone d'Agen doit être discuté car ce sont les seules qui peuvent être introgressées par les sucrières. Ces rudérales forment un groupe homogène pour les traits mesurés et montrent des valeurs extrêmes pour certains de ces traits, par rapport aux autres rudérales. Plusieurs attributs de betteraves sucrières semblent pouvoir être reconnus dans ce groupe: la précocité de germination (associée à une absence de germination en seconde vague) pourrait indiquer une introgression depuis les sucrières, fortement sélectionnées pour ces deux caractères. Le diamètre racinaire des rares formes rudérales bisannuelles est aussi légèrement plus grand que dans les autres groupes (et même supérieur à celui des littorales atlantiques qui sont largement pérennes et donc accumulent beaucoup de réserves). Ce phénomène pourrait résulter de flux géniques depuis les sucrières.

Un autre résultat particulièrement intéressant concerne le cycle de vie des betteraves rudérales d'Agen. Elles ont montré un cycle de vie très court. Elles étaient presque toutes annuelles

¹⁴ La betterave a moins de concurrents dans des milieux hostiles car régulièrement perturbés ou fortement salés. Sa résistance à la sécheresse (climatique ou "physiologique" à cause du sel), propre à la plupart des représentants de la

Photo. III-1. Illustration de la dépression observée chez certains descendants de betteraves rudérales d'Agen (à gauche).



tandis que les autres rudérales ont des taux de montaison sans vernalisation plus faibles, dont les valeurs sont conformes à celles déjà mesurées pour les betteraves littorales (Van Dijk *et al.* 1997). Les rudérales d'Agen montrent aussi une forte précocité, qui leur permet de produire des graines rapidement. Nous pouvons proposer une explication à ce résultat *a priori* paradoxal (les rudérales d'Agen ont presque toutes l'allèle B d'annualité, tandis que les sucrières sont homozygotes pour l'allèle b): les multiplicateurs de semences doivent détruire les rudérales visibles à proximité des champs de multiplication. En conséquence, il y aurait une sélection forte contre les formes bisannuelles qui exhibent une large rosette de feuilles durant l'automne et l'hiver. Ainsi, plus les rudérales sont visibles (longtemps), plus elles sont éliminées, tandis que des formes fugaces qui sont capables de produire des graines le plus rapidement possible ont une descendance. Finalement, il semble que les multiplicateurs favorisent l'allèle 'B' en essayant d'exterminer les betteraves rudérales alors que leur objectif premier est d'éliminer toute source de pollen ayant l'allèle 'B'.

Remarque concernant l'hybridation de rudérales par les sucrières: la fuite de gènes depuis les formes cultivées vers les formes rudérales lors de la multiplication des semences devrait pouvoir être dépistée par le niveau de ploïdie des rudérales dans les populations réceptrices. En effet, la triploïdie d'un individu y signerait une fécondation (plus ou moins récente) par le pollen diploïde des lignées pollinisatrices tétraploïdes cultivées. Il pourrait s'agir aussi de fuite contemporaine de graines triploïdes, mais dans ce cas les marqueurs moléculaires cytoplasmiques peuvent le préciser. Nous avons analysé par comptage de chloroplastes stomatiques (Desplanque *et al.* 1996) 81 plantules issues de graines de betteraves rudérales récoltées dans la zone d'Agen. Aucune ne s'est avérée triploïde. Cependant, ce type de recherche suppose la viabilité des hybrides triploïdes. Notamment dans le cas de la formation de pollen à partir d'individus triploïdes, il est possible qu'une partie du pollen formé soit aneuploïde et ne permettent pas une descendance viable. Nous avons observé pour certaines plantules des malformations et une mortalité forte, qui n'ont pas permis de procéder au comptage des chloroplastes (Photo. III-1). La procédure à mettre en œuvre pour une étude complète aurait du concerner un effectif plus grand, avec examen de la ploïdie au cytomètre de flux. Cette investigation n'a pas été poursuivie car l'introgression des rudérales par le pollen des cultivées n'est décelable que si la lignée cultivée paternelle est tétraploïde. Or, il s'est avéré au cours de ma thèse que les variétés sucrières diploïdes supplantent rapidement les variétés triploïdes (voir annexe 1). L'offre en variété triploïdes reste globalement forte, mais ce sont quelques variétés majoritaires diploïdes qui sont principalement plantées en France. La possibilité que la plupart des pollinisateurs cultivés soient diploïdes a rendu caduque la recherche de l'introgression contemporaine par la méthode cytologique, que nous avons rapidement abandonné.

famille des Chenopodiaceae, lui permet de se maintenir face à la compétition dans certaines situations.

Encadré III-2. Comparaison de la situation française avec d'autres situations géographiques

Espagne: l'Espagne possède une façade méditerranéenne riche en betteraves sauvages dans des situations classiques de bord de mer, mais aussi en betteraves rudérales dans des sites anthropisés en arrière du cordon littoral (Obs. pers¹). D'autre part, on rencontre des betteraves rudérales loin des côtes, à une altitudes parfois élevée (600m). L'aspect de la plante rudérale en rosette est souvent proche de la blette, ce qui laisse supposer des échanges avec les jardins privés (les espagnols sont de gros consommateurs de *acelga* =blettes).

Vallée du Pô²: l'Italie est le second pays européen avec la France à multiplier des semences de betterave (delta du Pô). Le caractère remarquable de cette situation est la parapatrie des champs de multiplication avec d'une part, (i) des champs de sucrières, qui sont très nombreux sur toute la côte Adriatique et d'autre part, (ii) des populations sauvages littorales. La présence de betteraves rudérales autour des champs de multiplication n'est pas documentée (Bartsch & Schmidt 1997). Cependant, les champs de multiplications étant à quelques kilomètres de la côte, l'arrivée de l'allèle B par pollen peut être envisagé directement depuis les betteraves littorales. La présence des champs de sucrières n'exclut pas non plus des échanges avec les betteraves mauvaises herbes, pouvant là encore apporter l'allèle B. Cela contraste avec la situation française où un relais par des betteraves rudérales est indispensable, puisque les champs de multiplication y sont hors de portée pollinique des betteraves littorales et mauvaises herbes.

Californie: les USA sont de grands cultivateurs de betterave (voir annexe 1), bien que la betterave soit originaire de l'ancien monde. Des betteraves sauvages non littorales sont présentes dans la vallée impériale de Californie. Une étude récente avec des allozymes (Bartsch & Ellstrand 1999) a notamment mis en évidence des échanges entre ces betteraves spontanées et les betteraves potagères. Les auteurs soulignent cependant la possibilité que les betteraves sauvages littorales californiennes aient à l'origine été amenées par le sable des ballasts des bateaux espagnols du XIX^e siècle (l'intervention de l'homme dans le transport des betteraves semble décidément omniprésente). Une analyse du mitotype de ces plantes en comparaison avec les provenances espagnoles pourrait apporter un début de réponse.

Argentine: La présence de betteraves spontanées sur des plages argentines a aussi été rapportée (R. Lahousse, Comm. Pers.). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette situation: (i) des betteraves cultivées sont redevenues sauvages. Il n'y a actuellement aucune culture de sucrières en Argentine mais il n'en a pas toujours ainsi car des essais furent entrepris avant d'être abandonnés sous la pression des planteurs de canne à sucre. On ne peut donc pas exclure une origine "sucrière". D'autre part, il semble que des sélectionneurs européens testent la montaison de leurs lots de variétés de sucrières dans ce pays pour profiter de conditions non vernalisantes durant la saison hivernale européenne (R. Lahousse, Comm. Pers.). Enfin, une origine "potagère" est possible. (ii) le dépôt de ballasts de sable de navires européens est toujours envisageable. Nous avons testé deux individus de "Mar del Plata" aimablement fournis par Monsieur Lahousse: leur mitotype est 'Nv', ce qui ne permet malheureusement pas de conclure.

¹ Deux semaines de prospection l'été 1998.

² Une semaine de prospection avec l'équipe du Dr Bartsch (Aachen, Allemagne) l'été 1999.

III-4.3 Fuite de graines depuis le compartiment cultivé

Nous avons mis en évidence quelques cas de fuite de graine depuis le compartiment cultivé, sur la base de la présence du mitotype Sv dans le compartiment sauvage. Ce mitotype est le seul utilisé pour les variétés sucrières (Senda *et al.* 1998) et n'a pas été trouvé dans les populations sauvages jusqu'à présent (Cuguen *et al.* 1994). Nous avons relevé six plantes 'Sv' provenant de cinq populations dont quatre dans la zone de multiplication et la cinquième à sa limite. Ces observations suggèrent fortement une fuite de graines depuis le compartiment des betteraves sucrières.

A l'opposé, le type Nv a été trouvé partout, ce qui corrobore les observations faites précédemment par Cuguen *et al.* (1994), qui ont décrit ce type dans les populations naturelles des côtes françaises. Nous avons par ailleurs montré qu'en dépit de sa très vaste répartition géographique, le type Nv n'était pas homoplasie (Desplanque *et al.* in press): les individus 'Nv' rencontrés dans différentes situations géographiques sont considérés comme identiques par ascendance et déplacés par migration plutôt qu'issus d'apparitions indépendantes du fait de mutations récurrentes. La même remarque est valable pour les autres mitotypes mentionnés (à l'exception du mitotype I). Le mitotype Nv a été observé chez 2/3 des plantes de la zone d'Agen, ce qui est considérable. Les variétés sucrières sont des hybrides entre des portes-graines 'Sv' et des pollinisateurs 'Nv'. Nous ne pouvons donc pas exclure une fuite de graines depuis ces plantes cultivées, bien que les pollinisateurs soient en principe détruits immédiatement après la pollinisation. Nous avons aussi observé une fréquence de 'Nv' plus forte chez les autres betteraves rudérales que chez les littorales. Ce fait pourrait indiquer une fuite de graines depuis les potagères. Une telle possibilité a été observée en Californie (voir une étude avec des marqueurs allozymiques par Bartsch & Ellstrand 1999). La coexistence de betteraves cultivées et sauvages n'est pas propre à la France. L'encadré III-2 en donne quatre exemples. Les betteraves potagères sont domestiquées depuis les romains et sont actuellement largement cultivées dans les jardins. Toutefois, le type Nv n'est pas diagnostique de cet ensemble génétique cultivé et est par ailleurs très répandu: seulement 20 populations sur 92 ne présentent aucune plante Nv (cette valeur passe à 8 sur 81 quand les populations ne contenant pas trois individus analysés sont écartées).

Le type F est bien représenté dans les populations rudérales, mais ne peut pas être considéré comme spécifique de ces dernières car il est aussi observé dans les populations littorales du Nord (Viard, non publié). A l'opposé de 'Nv', certains mitotypes sont rares et ont été observés pour la première fois au cours de cette étude: c'est le cas de O, P, Q et R, qui sont de ce fait peu informatifs actuellement. D'autres types étaient déjà connus mais n'ont pas été rencontrés en forte fréquence: le type G a été vu dans une seule population, mais Cuguen *et al.* (1994) l'ont déjà observé parmi les littorales atlantiques. Il est actuellement étudié pour son incidence sur la Stérilité Mâle Cytoplasmique (Ducos *et al.* 1998): notre contribution à la connaissance de sa distribution en

populations naturelles est importante pour l'étude de la gynodioecie. Le type H est une autre source de CMS (Laporte *et al.* 1998). Il a été trouvé dans six populations: quatre dans la zone d'Agen et deux en dehors (N° 89 and 43). La population N°89 était localisée dans une zone humide loin de la mer et la population 43 en bordure d'un champ de tournesol. De sorte que le type H apparaît comme fortement associé avec les betteraves rudérales. C'est aussi le type de la 'crapaudine', qui est une des plus anciennes variétés de betterave rouge. Nous ne pouvons donc pas exclure des flux de gène depuis des betteraves rouges.

D'autre part, on peut trouver de petites zones de multiplication de semence anciennes ou contemporaines entre Narbonne et Agen. Les populations 35 à 46 par exemple sont parapatriques d'une zone de multiplication de blettes, rouges, sucrières et fourragères, modeste par rapport à la zone d'Agen mais en activité¹⁵. La multiplication de semence est actuellement un secteur attractif pour les agriculteurs et de nouvelles zones apparaissent. C'est le cas autour de St Jean de Marvejols, non loin de la vallée du Rhône. Il semble à ce propos que des betteraves rudérales existeraient le long de la vallée du Rhône, ce qui a conduit la Société Deleplanque en quête d'un site d'installation à négliger certains lieux par ailleurs favorables à la multiplication des semences au profit de la vallée de la Durance (Deleplanque, Com. Pers.). Il y a donc localement de grandes sources potentielles de pollen (et de graines) de betterave cultivée en dehors de la zone d'Agen. Il faut ajouter aux zones de multiplication les très nombreuses sources de gènes cultivés que sont les jardins privés où poussent betteraves rouges et blettes, avec souvent une multiplication artisanale des semences.

Le littoral atlantique présente les types B et D, qui n'apparaissent pas en Méditerranée ni chez les rudérales. Les betteraves littorales montrent aussi les types A et E. Le type A est absent des formes rudérales (excepté pour deux de leurs populations, très proches du littoral méditerranéen). A l'opposé, le type E a été trouvé à la fois chez les populations littorales et chez les rudérales.

A l'exception des mitotypes Sv et H (nous ne tenons pas compte de 'I', qui peut être homoplasie), aucun mitotype n'est apparu spécifique des betteraves rudérales et n'a permis de séparer correctement les groupes de populations: la différenciation entre les groupes est plutôt due à des variations en fréquence. La partition de la variance génétique totale a souligné que la plupart de la diversité se trouve à l'intérieur des groupes géographiques.

Les betteraves rudérales auraient pour origine les betteraves littorales méditerranéennes. Les rudérales côtières semblent ne représenter qu'un sous-ensemble des littorales méditerranéennes voisines. Toutefois, même si les rudérales intérieures ne présentent pas de mitotypes spécifiques,

¹⁵ il y aurait aussi eu des cultures de betteraves pour le sucre dans le Sud, avec par exemple une sucrerie à Toulouse, à une époque où les variétés n'étaient pas encore sur le type 'Sv'.

Tableau III-5. Matrice des valeurs de F_{st} par paires entre les différents groupes de betteraves (valeurs calculées avec ARLEQUIN, Schneider *et al.* 1997) et diversité génétique (He). Les valeurs sont basées sur un seul locus microsatellite (Bvm3)

	Effectif	Sucrières-potagères	Mauvaises herbes	Rudérales zone Agen	Rudérales intérieures	Rudérales côtières	Diversité (He)
Sucrières-potagères	95						0.556
Mauvaises herbes	152	0.029					0.742
Rudérales zone Agen	117	0.113	0.040				0.830
Rudérales intérieures	164	0.123	0.050	0.013 ^{ns}			0.828
Rudérales côtières	38	0.167	0.072	0.027 ^{ns}	0.004 ^{ns}		0.863
Littorales médit.	61	0.210 ^s	0.108	0.040	0.026	0.013 ^{ns}	0.908

ns: non significativement différent de zéro.

elles ne montrent pas non plus la stricte "signature" des littorales. En outre, la diversité haplotypique est plus faible chez les rudérales intérieures que chez les littorales, particulièrement en zone d'Agen. L'analyse des F_{st} indique une origine des betteraves rudérales plus probablement méditerranéenne qu'atlantique. Cela confirme notre étude des rudérales d'Agen basée sur des marqueurs nucléaires (Desplanque *et al.* 1999). Toutefois, malgré cette origine méditerranéenne probable, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'isolement par la distance. Cela pourrait être dû aux betteraves potagères agissant comme source de graines (cf. le type Nv omniprésent). Mais il s'agit plus vraisemblablement du résultat de la dispersion fréquente et aléatoire des graines par l'homme. Le fait que les populations présentent plusieurs mitotypes malgré leur petite taille va dans le sens d'un fort impact humain sur la dispersion. Sous cette hypothèse, l'absence d'isolement par la distance n'est plus contradictoire avec une origine méditerranéenne.

III-5 Perspectives

L'étude des betteraves rudérales au moyen de marqueurs nucléaires est en cours. Nous pourrions bientôt quantifier la part relative de la dispersion des gènes par le pollen et par les graines (voir Ennos 1994). De même, nous pourrions examiner la proximité génétique existant entre toutes les betteraves sauvages mentionnées dans ce chapitre (notre première étude – chapitre 2 – ne concernait que les rudérales d'Agen et les littorales méditerranéennes). Actuellement, nous ne disposons de résultats que sur un seul locus microsatellite (Bvm3). Le tableau III-5 donne la matrice des valeurs de F_{st} deux à deux. D'autre part, le test de différenciation entre toutes les paires de groupes (seuil 5%) montre que tous les groupes sont différents entre eux, exceptés les 'rudérales côtières', qu'on ne peut pas séparer des 'littorales méditerranéennes' ou des 'rudérales intérieures'. Ces résultats, bien que préliminaires, confirment nos conclusions tirées de l'observation des traits de vie et du type cytoplasmique des différents groupes de betteraves rudérales.

III-6 Conclusion

Des betteraves sauvages non littorales, bien que discrètes, sont omniprésentes dans les habitats anthropisés du Sud de la France. Elles occupent au sein du complexe cultivées-sauvages une forme remarquable par leur situation écologique. L'homme leur semble indispensable, à la fois pour leur fournir des habitats adaptés et pour transporter leurs graines.

Les résultats des investigations par marqueurs moléculaires et observation des traits quantitatifs confirme que l'origine des betteraves rudérales est très probablement le littoral méditerranéen.

Les betteraves étudiées ont montré une grande diversité, à la fois en terme de polymorphisme cytoplasmique et de traits de vie. Nous avons observé des différences entre les littorales et les rudérales. Ces dernières peuvent être séparées en plusieurs groupes. Les rudérales côtières proches de la mer Méditerranée sont un sous-ensemble des littorales voisines. Les

rudérales intérieures sont variables. Nous avons trouvé des différences significatives entre les rudérales de la zone de multiplication d'Agen et les autres.

Les particularités rencontrées en zone d'Agen sont vraisemblablement la conséquence d'une sélection plutôt que d'une introgression massive par les sucrières: la destruction des rudérales repérées pourrait avoir favorisé les formes annuelles avec un cycle de vie aussi court que possible. En revanche, les betteraves bisannuelles qui sont celles potentiellement introgressées ont de larges feuilles qui les font repérer et détruire, de sorte qu'elles échappent en grande partie à notre analyse. Cela étant précisé, les traits quantitatifs que nous avons observé ne montrent pas d'introgression forte ou permanente de la part des sucrières. Cette implication modérée des sucrières se retrouve dans le faible nombre de graines échappées que nous avons trouvé en zone d'Agen. Enfin, l'introgression par les betteraves potagères ne peut pas être exclue et fut observée de façon flagrante dans certains cas.

Le niveau d'introgression dans les complexes cultivées-sauvages est habituellement faible (Van der Maesen 1994) et ne survient pas nécessairement chaque année. Toutefois, même un faible niveau d'introgression peut être effectif dans le cas de plantes transgéniques si le transgène augmente le succès reproducteur des plantes sauvages introgressées. Ce point est discuté dans le chapitre 5.

Appendice III-1. Détail des populations étudiées chapitre 3 (betteraves littorales et rudérales, betteraves potagères).

N = effectif (analyses génétiques). A = Nb de mitotypes par population.

code	Nom des populations	Surface ^a	Taille pop. ^b	Habitat	Sous-habitat ^d	Effectif pour les obs. en cond. contrôlées ^e	N	A	Mitotypes (Nb de plantes)
1	Sts Maries de la mer	1	1	C	/	/	4	1	Nv(4)
2	La Gde Motte (Ponant)	2	2	C	/	6 (19)	4	1	Nv(4)
3	Palavas les flots	3	2	C	/	5 (11)	10	3	A(5) E(1) Nv(4)
4	Maurin (le Thot)	2	1	C	/	10 (21)	4	2	A(3) Nv(1)
5	Lattes	2	2	IC	RW	21 (35)	7	2	G(4) Nvv(1)
6	Villeneuve les Mag.	3	3	C	/	16 (46)	7	4	A(3) E(2) R(1) Nv(1)
7	St J. de Vedas (Ortet)	1	1	IC	RW	/	3	1	A(3)
8	St J. de Vedas (Terral)	1	1	IC	R	/	3	1	I(3)
9	Balaruc les Bains	2	2	IC	R	13 (37)	4	1	Nv(4)
10	Meze a	1	1	C	/	6 (18)	5	2	A(3) Nv(2)
11	Meze b	2	2	C	/	7 (18)	6	2	A(4) Nv(2)
12	Meze c	2	2	IC	RW	6 (14)	3	3	P(1) Q(1) Nv(1)
13	Sete	2	2	C	/	5 (9)	6	3	A(1) E(3) Nv(2)
14	Marseillan	4	4	IC	R	9 (21)	5	3	A(2) F(1) Nv(2)
15	Cap d'agde	3	3	C	/	5 (10)	4	2	A(2) Nv(2)
16	Agde	1	1	C	/	1 (1)	2	1	A(2)
17	Bezier	2	2	IC	RW	9 (19)	7	2	R(1) Nv(6)
18	Valras plage	3	3	C	/	8 (23)	4	2	A(3) Nv(4)
19	St Pierre / Mer	3	2	C	/	8 (26)	7	2	E(2) Nv(5)
20	Bages	3	2	C	/	7 (19)	4	2	A(2) Nv(2)
21	Fleury	2	2	IC	RW	8 (28)	4	1	Nv(4)
22	Gruissan	2	2	C	/	10 (24)	6	2	F(5) Nv(1)
23	Leucate	3	2	C	/	10 (24)	6	3	A(4) E(1) Nv(1)
24	Toulouge	2	2	I	RW	6 (17)	5	1	Nv(5)
25	Millas	1	1	I	RW	1 (12)	4	1	E(4)
26	Portel les Corbières	2	2	I	R	8 (17)	5	2	F(3) Nv(2)
27	Ferrals	3	3	IC	RW	10 (20)	6	2	I(4) Nv(2)
28	Conhitac	1	1	I	R	4 (14)	4	1	Nv(4)
29	Conques/Orbiel	2	2	I	RW	9 (23)	4	2	E(2) Nv(2)
30	Conques/Orbiel (mines)	4	3	I	RW	10 (33)	5	3	F(3) I(1) Nv(1)
31	Carcassone (Trebes)	2	2	I	RW	13 (30)	7	1	Nv(7)
32	Carcassone (PSL)	?	?	I	?	/	5	1	F(5)
33	Lastour	?	?	I	?	/	4	1	Nv(2)
34	Villegailhenc	3	2	I	RW	10 (46)	4	1	Nv(4)
35	Alzonne	1	1	I	RW	4 (7)	5	1	Nv(5)
36	Prouille	2	2	I	RW	8 (20)	8	1	Nv(8)
37	Bram	3	3	I	R	8 (28)	4	3	H(1) I(1) Nv(2)
38	Villepinte(vilp)	1	1	I	R	5 (29)	5	1	F(5)
39	Villepinte(vil)	2	3	I	F	10 (22)	5	1	Nv(5)
40	Villeneuve la Comptal	1	1	I	RW	3 (5)	3	1	F(3)
41	Estambigou	3	2	I	RW	/	5	1	Nv(3)
42	Castelnaudary(psos)	2	2	I	RW	/	3	1	Nv(3)
43	Castelnaudary(tourn)	2	2	I	F	4 (10)	3	1	Nv(3)
44	Montmaur(chateau)	3	2	I	RW	/	7	2	F(5) Nv(2)
45	Montmaur	2	2	I	R	3 (13)	3	1	Nv(3)
46	Avignonnet	1	1	I	RW	12 (28)	7	2	E(6) F(1)
47	Cintegabelle	1	1	I	R	4 (10)	4	1	Nv(4)
48	Baziège	2	2	I	RW	8 (20)	3	2	E(2) Nv(1)
49	Montgiscard	4	4	I	R	3 (3)	6	2	E(2) Nv(4)
50	Lagardelle / Ceze	2	2	I	RW	8 (18)	6	2	F(2) Nv(4)
51	Verfeil	2	2	I	R	4 (8)	11	2	F(1) Nv(10)
52	Castanet Tolosan	1	1	I	RW	3 (6)	3	2	E(2) Nv(1)
53	Plaisance du Touch	2	2	I	RW	5 (12)	3	2	E(2) F(1)
54	St Lys	1	2	I	F	3 (11)	3	1	Nv(3)
55	Grenade / Garonne	2	2	I	RW	/	9	2	Nv(8) Sv(1)
56	Montaigut/Save	2	2	I	R	8 (29)	7	3	F(1) Nv(5) O(1)

57	Gimat	?	?	I	R	/	2	1	Nv(2)
58	Mestre	?	?	I	R	/	2	1	H(2)
59	Montestruc	1	1	I	R	4 (8)	5	3	F(1) Nv(1) Sv(1)
60	Fleurance	2	1	I	R	3 (23)	2	2	H(1) Sv(1)
61	Merens	4	4	I	F	/	2	2	E(1) Nv(1)
62	Lavardens	1	1	I	?	2 (8)	4	1	Nv(4)
63	Lavardens(sec)	1	1	I	?	/	3	1	Nv(3)
64	Lavardens(tourn)	2	2	I	F	4 (12)	4	2	E(3) Nv(1)
65	Lectoure(63)	2	1	I	R	1 (1)	1	1	F(1)
66	Lectoure(64+)	1	1	I	R	2 (5)	5	1	Nv(5)
67	Lectoure	1	1	I	?	/	1	1	Nv(1)
68	Castelnaud d'Arbieu	?	?	I	?	/	10	3	F(1) H(2) Nv(7)
69	St Puy(0)	1	1	I	RW	4 (9)	4	1	Nv(4)
70	St Puy(1)	3	3	I	RW	10 (18)	11	2	H(5) Nv(6)
71	La Romieu	2	1	I	R	5 (22)	4	1	Nv(4)
72	La Romieu (dech96)	1	1	I	R	/	1	1	Sv(1)
73	La Romieu (dech97)	2	1	I	R	/	2	1	Sv(2)
74	La Romieu (tourn)	1	2	I	F	/	5	1	Nv(5)
75	Ayguetinte	2	2	I	F	3 (9)	3	1	Nv(3)
76	Nerac	1	1	I	R	/	1	1	Nv(1)
77	Vic Férensac	2	1	I	R	/	1	1	Nv(1)
78	Condom	2	2	I	RW	9 (36)	9	1	Nv(9)
79	St Orens	1	1	I	R	5 (32)	5	1	Nv(5)
80	St Seurin d'Euzet	2	2	C	/	5 (5)	6	2	A(1) B(3)
81	Talmont	4	4	C	/	4 (4)	4	2	B(3) Nv(1)
82	Suzac	2	2	C	/	5 (5)	4	3	A(1) B(1) Nv(2)
83*	Erromardie	/	/	C	/	1 (1)	5	1	D(5)
84*	Port d'Albret	/	/	C	/	1 (2)	2	1	B(2)
85*	Hossegor	/	/	C	/	1 (2)	3	2	D(1) Nv(2)
86*	Port de Cassy	/	/	C	/	1 (7)	5	1	B(5)
87*	St Trojean les Bains	/	/	C	/	/	5	1	B(5)
88*	Rivedoux	/	/	C	/	/	5	2	B(5)
89*	Marant	/	/	IC	/	/	5	2	H(1) E(1) Nv(3)
90*	Les Sables d'Olonne	/	/	C	/	/	5	2	A(3) Nv(2)
91*	Port le Bonhomme	/	/	C	/	/	5	2	B(4) Nv(1)
92*	La Maréchale	/	/	C	/	/	4	1	Nv(4)
Total							428	/	
Moyenne							6.3 (17.0)	4.65 ± 0.41	1.70 ^f ± 0.16

"blettes"	Poirée verte à carde blanche 3 race de Paris	1	1						Nv
	Poirée verte à carde blanche	1	1						Nv
	Poirée blonde à couper (biondissima di Trieste)	1	1						Nv
	Poirée verte à couper (Erlette)	1	1						Nv
	Poirée blonde à carde blanche	1	1						Nv
	Poirée verte à carde rouge (Rhubarb chard)	1	1						Nv
	Cote de bette à carde rouge	1	1						Nv
	Cote de bette verte à carde blanche	1	1						Nv
Bet. rouges	Crapaudine	1	1						H
	Detroit améliorée 3 race Short-top	1	1						Nv
	Bet. d'Egypte race Tezier	1	1						Nv
	Bet. rouge de Detroit améliorée 2	1	1						Nv
	Rouge globe 2 race Lorette	1	1						Nv
Warrior F1	1	1						Sv	

* données issues d'une précédente étude (Cuguen *et al.*, 1994). ^a estimation visuelle de la surface en m²: 1=1 à 10, 2= 11 à 100, 3=101 à 1000, 4=1001 à 10 000. ^b estimation visuelle du nombre d'individus: 1=1 à 10, 2= 11 à 100, 3=101 à 1000, 4=1001 à 10 000. ^c C = environnement littoral. IC = environnement rudéral proche du littoral (<15 km). I = environnement rudéral loin du littoral (>15 km). ^d RW = travaux routiers, R = gravats, F = bord de champ. ^e effectif pour les observations en serre: nb de familles et nb d'individus entre parenthèses). ^f valeur moyenne du nb de mitotypes par population (ne comprend que les populations avec plus de deux individus analysés: 81 pop. sur 92).

- Chapitre 4 -

**Étude des betteraves mauvaises herbes
dans le nord de la France**

Chap. 4 - Etude des betteraves mauvaises herbes dans le nord de la France

IV-1 Introduction

Les mauvaises herbes accompagnent l'agriculture depuis ses débuts. La définition populaire en font "des plantes qui poussent au mauvais endroit, qui causent des dommages et n'apportent aucun bénéfice". Cette appréciation permet cependant de classer virtuellement toutes les plantes comme mauvaise herbe. De fait, la définition parfaite de la mauvaise herbe n'existe pas et de nombreux concepts coexistent, basés sur des considérations qui vont de la botanique à l'économie (revue dans Harlan 1992). D'autre part, la notion de caractère indésirable est inadéquat car une espèce mauvaise herbe pour certains est une culture pour d'autres (17 des 18 mauvaises herbes mondialement les plus craintes sont cultivées). Dans tous les cas, les mauvaises herbes sont adaptées aux environnements perturbés par l'homme (certains les définissent comme des pionnières des successions secondaires). Les caractéristiques qui permettent aux plantes de perdurer dans les agrosystèmes sont variables. Ces traits ne sont évidemment jamais tous réunis dans la même espèce. L'ensemble des caractéristiques permettant à une plante de se comporter comme mauvaise herbe constitue le syndrome de mauvaises herbes. Il en existe une longue liste (forcément incomplète), qui définit la mauvaise herbe "idéale" (*sensu* Baker 1994). Cependant, considérer que les mauvaises herbes ont toutes des traits en commun serait abusif. Au contraire, certains auteurs ont montré qu'aucun caractère ne permet de prédire si une plante est une mauvaise herbe ou non (e.g. Williamson *et al.* 1990), même si on constate par ailleurs que certaines familles botaniques contiennent plus de mauvaises herbes que ne le voudrait le hasard (Daehler 1998). Il est finalement préférable de considérer des groupes fonctionnels, qui tiennent compte de la façon dont l'ensemble des caractères interagissent avec l'habitat (ou le système de culture) de la plante considérée (Perrins *et al.* 1992).

La betterave mauvaise herbe illustre bien que chaque cas est particulier. La betterave sucrière est une plante bisannuelle cultivée pour les réserves qu'elle accumule dans sa racine durant la première année. On sème en rang au printemps (20 mars – 20 avril) pour récolter en octobre-novembre, alors que la culture est encore dans sa phase végétative. Cette culture est donc théoriquement dépourvue de toute forme de reproduction sexuée, contrairement à la plupart des autres cultures de plein champs qui sont exploitées pour leurs graines. Néanmoins, des individus "montent" dans les champs de sucrières. Il s'agit des betteraves mauvaises herbes dont la capacité à fleurir pendant la culture constitue la caractéristique essentielle. La culture et sa mauvaise herbe appartiennent ici à la même espèce: la mauvaise herbe est issue d'une hybridation entre la plante cultivée et un apparenté sauvage (Fig. IV-1&2). On retrouve ce cas pour le riz (Langevin *et al.*

Fig. IV-1. Schéma de fabrication des semences de sucrières hybrides triploïdes

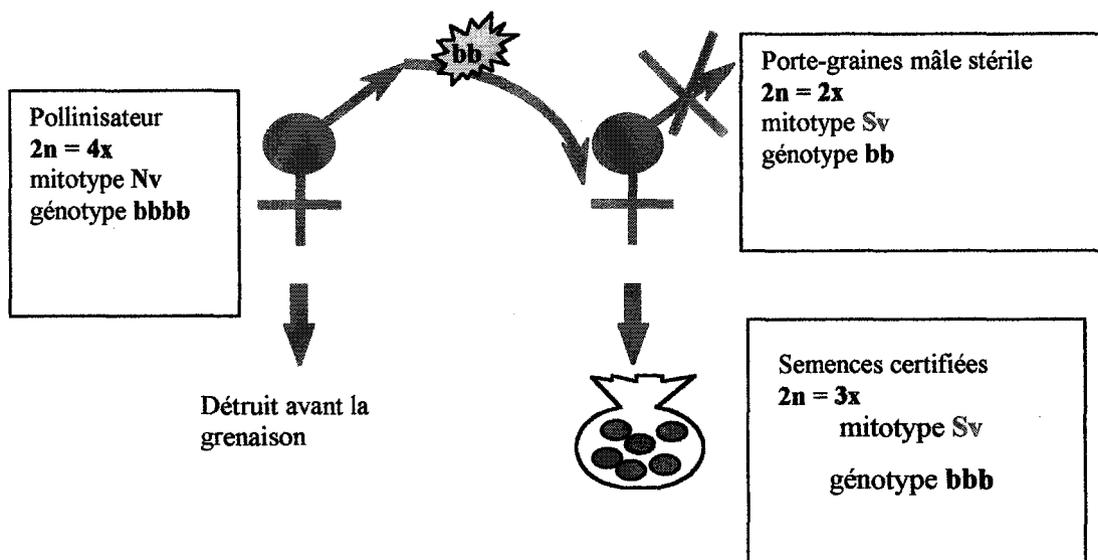
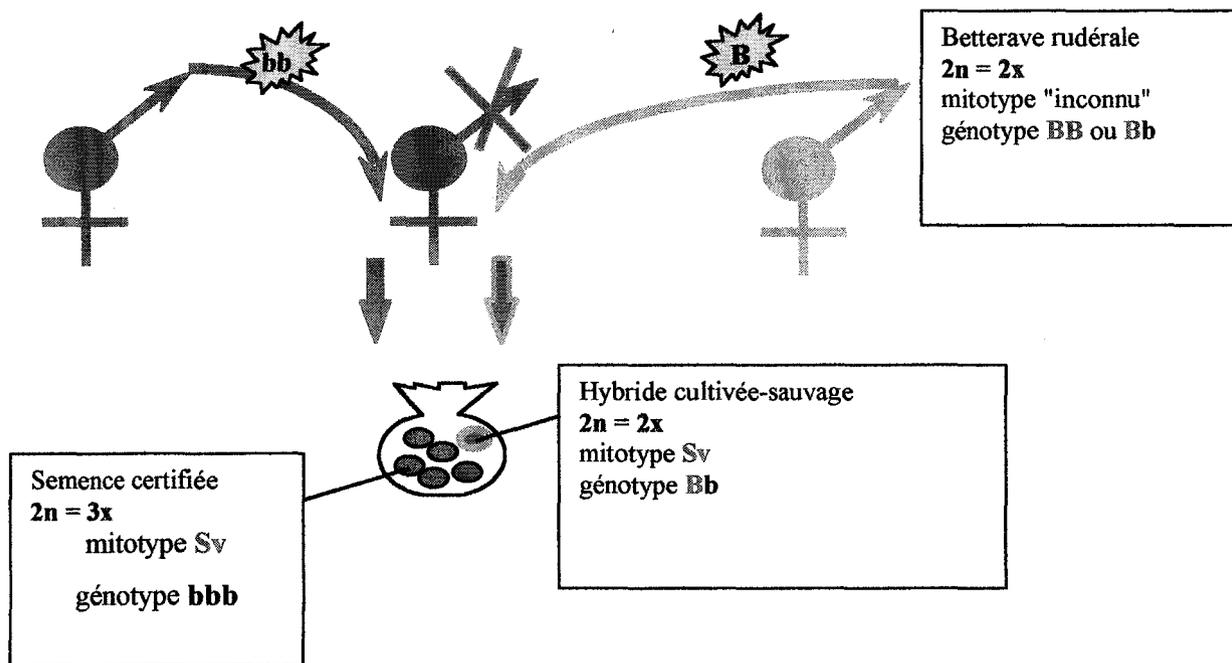


Fig. IV-2. Genèse d'un hybride cultivées-sauvages



1990) et pour l'avoine (cité par Hancock *et al.* 1996) mais ces deux exemples concernent des cultures qui fleurissent.

Les betteraves mauvaises herbes concurrencent en lumière, en eau, et en nutriments la variété cultivée tandis que leur racine est fourchue, fibreuse et pauvre en sucre. Ce phénomène pose depuis 30 ans de sérieux problèmes agronomiques dans les cultures européennes (Longden 1989). En automne, de grandes quantités de graines tombent au sol et alimentent une banque qui peut être considérable. La longévité des graines (toutes espèces confondues) est généralement de quelques années à 10 ans, bien que des germinations soient possibles sur des graines (pluri)centenaires (exemples dans Ul'janova 1997; Freckleton & Watkinson 1998). La semence de betterave fait partie de la catégorie longévive (un cas de 47 ans au moins est mentionné par Desprez 1980). Les betteraves mauvaises herbes réapparaissent donc à chaque mise en culture du champ et doivent être détruites. Or, si leur élimination est aisée lors d'une culture de blé (de colza, de pois, etc.), elle est impossible pendant la culture de betteraves: le désherbage chimique par herbicide sélectif est évidemment inopérant contre cette mauvaise herbe qui appartient à la même espèce que la culture. La seule méthode de lutte possible consiste à passer à pied dans les champs pour arracher manuellement les betteraves montées. Cette opération fait partie des pratiques culturales nécessaires (Brants & Hermann 1998) et devient d'autant plus délicate que des betteraves montées ont pu proliférer précédemment par négligence. Le phénomène peut donc s'amplifier car la main d'œuvre nécessaire au désherbage manuel manque toujours au planteur mais aussi car les rotations de betteraves sont parfois trop courtes¹⁶. Par ailleurs, le désherbage classique des mauvaises herbes en général reste un poste important financièrement et complexe techniquement (Dhalluin *et al.* 1992): en moyenne six passages, avec de très nombreuses matières actives. La perte de rendement en l'absence de contrôle des mauvaises herbes (toutes espèces confondues) est de l'ordre de 30-50% (Brants & Hermann 1998). Les professionnels attendent une solution plus simple et plus flexible, mettant par exemple en œuvre un herbicide à large spectre. Les betteraves transgéniques manipulées pour une résistance à certains herbicides totaux répondraient à cette attente. Elles auraient le double avantage de simplifier le désherbage et de permettre le contrôle chimique des betteraves mauvaises herbes, qu'aucune technique ne peut plus maîtriser au delà d'un certain seuil d'infestation¹⁷. A condition toutefois que ces dernières ne deviennent pas résistantes à l'herbicide par incorporation accidentelle du transgène.

L'attribut majeur qui confère aux betteraves mauvaises herbes un succès remarquable dans leur environnement est la capacité à fleurir sans vernalisation. Connaître les causes de la montaison

¹⁶ La betterave ne devrait revenir que tous les 3-4 ans sur la même parcelle mais on la retrouve parfois tous les 2-3 ans.

¹⁷ Lorsque le nombre de mauvaises herbes est incompatible avec le désherbage manuel, la seule alternative est le passage d'un tracteur traînant un ruban imbibé d'un herbicide systémique en contact avec les hampes florales et ne touchant pas les rosettes. Cette méthode n'est cependant pas entièrement efficace.

des betteraves en champ est donc essentiel. Les sucrières sont bisannuelles et ne peuvent monter qu'après une longue période de froid. L'induction florale nécessite en effet 12 à 14 semaines de froid (les températures entre 2°C et 15°C ont un effet vernalisant, avec un optimum vers 8°C). Ce besoin est normalement couvert pour les betteraves sauvages par les froids hivernaux, auxquels les betteraves cultivées échappent (la récolte a lieu avant). Certains individus de la variété peuvent néanmoins monter. Cette "montaison physiologique" ou "montaison variétale" concerne les individus à faible besoin de vernalisation¹⁸. Le phénomène est parfois important dans le cas d'un semis printanier précoce suivi d'une vague de froid¹⁹. Ces montaisons impliquant la variété ne sont cependant pas l'unique origine des betteraves mauvaises herbes: le point d'entrée majeur de la reproduction sexuée dans les champs de sucrières est du aux hybrides cultivées-sauvages que l'allèle 'B' dispense de vernalisation.

Le déterminisme génétique de la montée à graine implique plusieurs gènes. Le principal est le gène du *Bolting* (montaison) dont l'allèle dominant 'B' permet la montaison sans vernalisation, tandis que les individus 'bb' doivent subir le froid (Munerati 1931). Il existe aussi un complexe multigénique quantitatif (Boudry *et al.* 1994; Abe *et al.* 1997a; Abe *et al.* 1997b). Cet ensemble de gènes à effets récessifs additifs complique la tâche du sélectionneur (Desprez 1998): éliminer 'B' des lignées cultivées est facile (il est dominant) mais la sélection pour la résistance à la montée des 'bb' est ensuite plus délicate. Elle a commencé après guerre, par application d'une vernalisation artificielle au stade quatre feuilles (Campbell 1979), de façon à pouvoir écarter les génotypes les plus sensibles. Cette sélection a permis de produire des betteraves sucrières en remontant toujours plus au nord sans vernalisation printanière intempestive. La sensibilité au froid des différentes variétés est cependant très variable (la résistance à la montée est pour les sélectionneurs un argument commercial important).

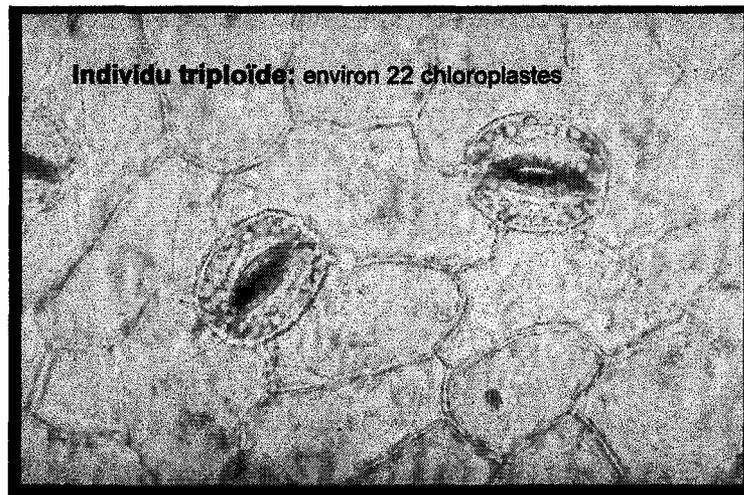
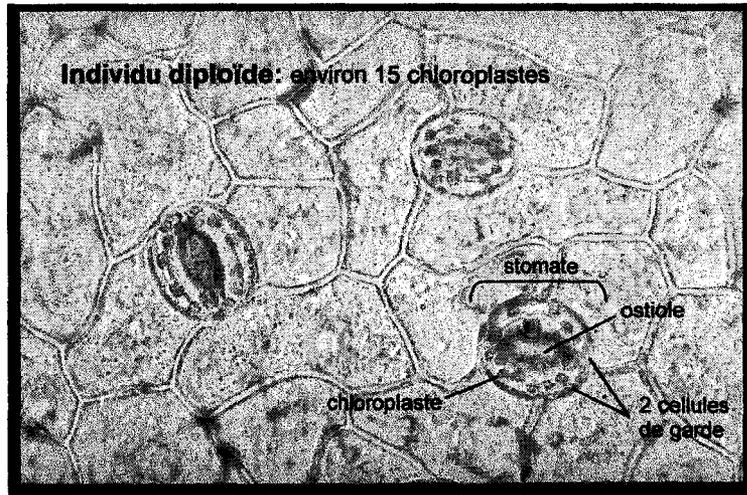
Finalement, l'étude des betteraves mauvaises herbes dans les champs du nord de la France présente plusieurs niveaux d'intérêt. (i) des hybrides moitié cultivés – moitié sauvages sont introduits dans les champs. Ils se reproduisent et le champ est envahi par les betteraves mauvaises herbes. Quels sont les traits qui changent entre des formes ayant un syndrome de domestication (cf. leur demi génome domestique) et d'autres ayant évolué vers un syndrome de mauvaise herbe ? Le syndrome des betteraves mauvaises herbes est-il préparé par un éventuel syndrome déjà présent chez les betteraves rudérales dont descendent les hybrides ?

(ii) des betteraves transgéniques résistantes à un herbicide sont disponibles (même si leur commercialisation n'est pas encore effective). La perspective de leur utilisation à grande échelle

¹⁸ La montaison peut parfois survenir à la suite d'un traitement particulier (problème de structure du sol (Desprez 1980), traitement fongicide des graines, traumatisme par écrasement, etc.).

¹⁹ L'effet vernalisant de basses températures peut être reçu dès la germination de la graine ; il peut même se produire partiellement sur la plante mère (Bell *et al.* 1997; Defalque & Guyot 1987).

Fig IV-3. Détermination du niveau de ploïdie par comptage du nombre de chloroplastes stomatiques (microscopie, grandissement 400-600)



incite à mieux connaître les betteraves mauvaises herbes et les flux de gènes auxquels elles participent (une discussion globale sur cet aspect est présentée chapitre 5).

Dans ce chapitre, nous décrivons les différentes betteraves qui présentent une montaison en champ. Puis nous détaillons certains de leurs traits quantitatifs (morphologiques et traits d'histoire de vie), en les comparant au syndrome de domestication. Enfin, nous nous intéressons à la diversité génétique des mauvaises herbes.

Les résultats sont discutés au fur et à mesure de leur présentation (la localisation géographique des champs prospectés est donnée en fin de chapitre: appendice IV-1). Ils sont issus de plusieurs expérimentations pour lesquelles des stagiaires m'ont assisté:

"croisements contrôlés MH".

"suivi-champs" (été 1997 ; avec Franck Dedeine, stagiaire entre licence et maîtrise).

"germination-MH" (printemps 1998 ; avec Guillaume Gigot, stagiaire en Deug).

"floraison-MH" (été 1997 ; avec Franck Dedeine).

"pollen-survie" (été 1998 ; avec Anne-céline Thuillier, stagiaire entre maîtrise et DEA).

"détail-genet-champ" (automne 1998).

IV-2 Observation des montaisons en champs

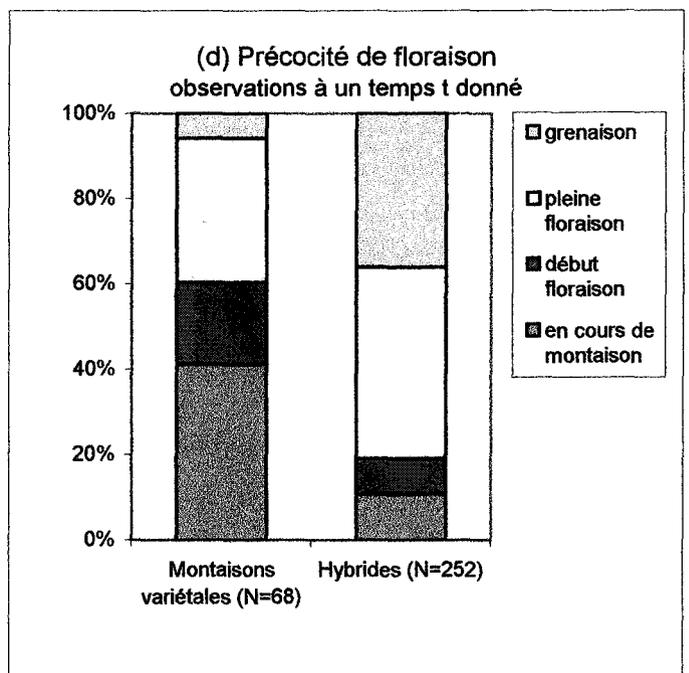
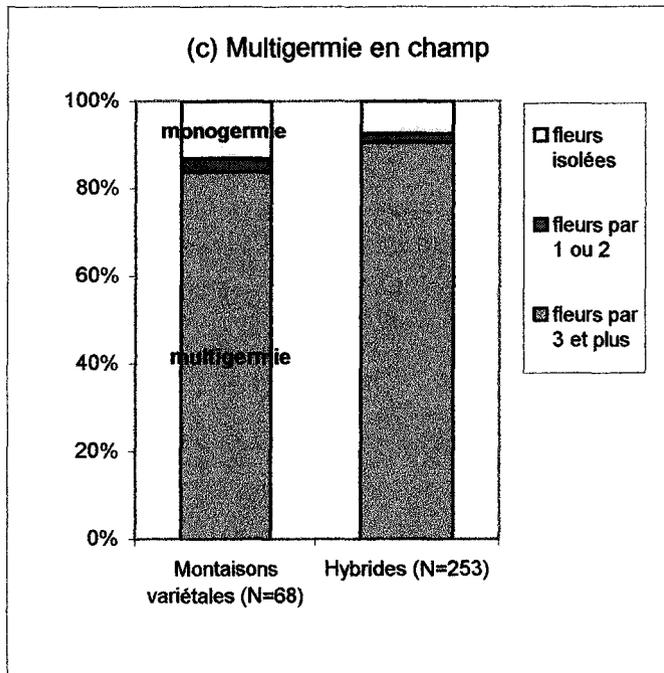
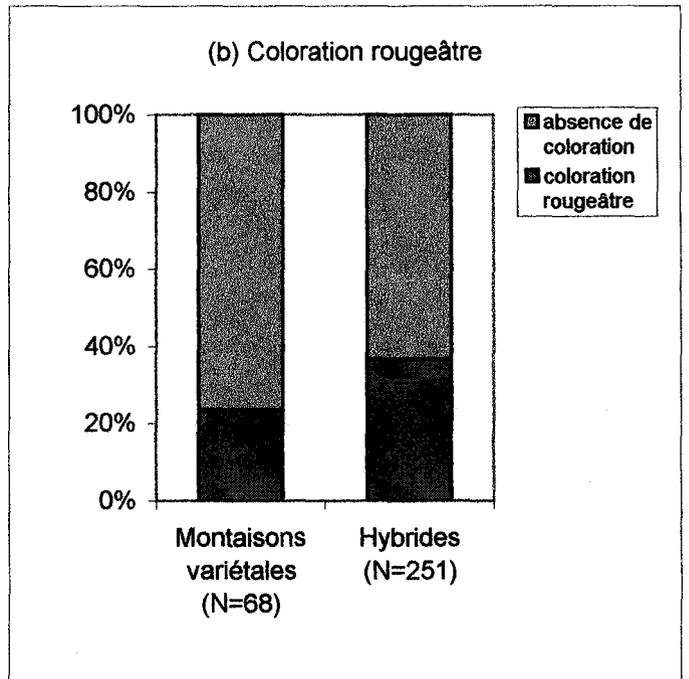
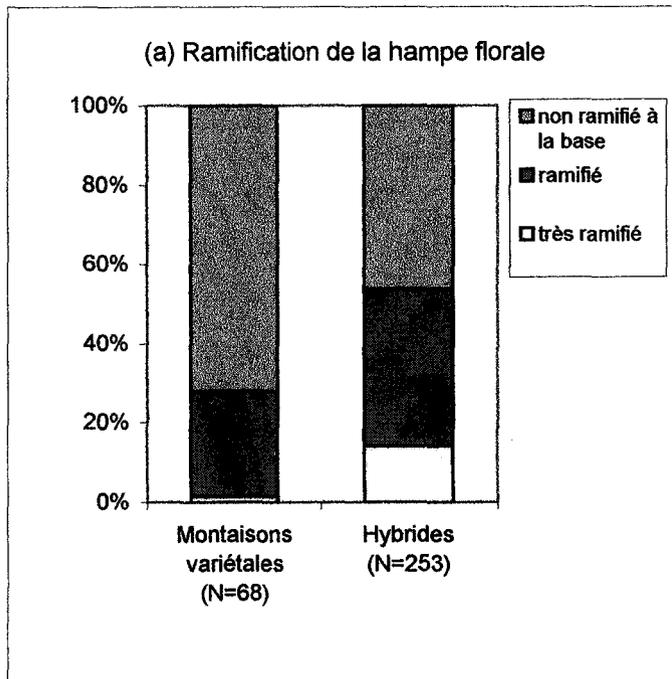
Les betteraves qui fleurissent lors de la culture ont en fait des origines différentes et par conséquent un emplacement différent dans le champ. Les montaisons qui concernent des individus du rang (i.e. la ligne du semis) ont été semées: il s'agit de **montaisons variétales** ou d'**hybrides cultivées-sauvages**. Celles qui se situent en dehors du rang concernent des **mauvaises herbes sensu stricto** qui proviennent de la banque de graine du champ.

***Expérimentation "suivi-champs":** 35 champs ont été suivis dans un rayon de 10 kilomètres autour du laboratoire. Seuls dix champs ont été retenus pour le comptage des montaisons du rang, les autres ayant été désherbés ou présentant des montaisons hors du rang susceptibles de gêner le repérage. Nous avons aussi mesuré le taux d'infestation sur deux champs peu infestés (quelques taches seulement visibles du bord de la route). Méthode: Parcours de la totalité du champ à pieds. Pour chaque montaison, prélèvement d'une feuille pour détermination du niveau de ploïdie, relevé de la coloration, du niveau de ramification et du stade de floraison (estimation de la précocité de floraison par comparaison avec les autres plantes du champs: les individus sont répartis en quatre classes: en montaison, anthèse récente, pleine floraison, grenaison). Il a été retenu une valeur moyenne de 90.000 betteraves/ha pour le calcul du taux d'infestation. Dans le cas du comptage des mauvaises herbes des deux champs peu infestés, nous avons compté les individus montés respectivement sur 22 et 17 transects de 20 m (chaque transect faisant cinq rangs et cinq inter rang de largeur), ainsi qu'au sein d'une zone du champ très envahie (une par champ).*

IV-2.1 Montaisons du rang

Les betteraves montées dans le rang sont toutes de forte taille, avec une hampe florale vigoureuse dont la hauteur peut dépasser deux mètres. Il existe une certaine variabilité intra-champ en terme de ramification, de couleur ou de nombre de fleurs par inflorescence. Aucun critère ne permet cependant de différencier *a priori* les montaisons variétales des mauvaises herbes hybrides. Leur caractérisation systématique par analyse génétique avec des marqueurs hypervariables serait une méthode lourde, et peut-être vaine du fait de la grande variabilité intra-variétale des sucrières (voir plus loin). Une technique alternative existe cependant, qui est basée sur l'analyse du niveau de

Fig. IV-4(a-e). Observations en champs (expérimentation "suivi-champ")



ploïdie: dans le cas de variétés triploïdes²⁰, les montaisons variétales sont triploïdes tandis que les mauvaises herbes hybrides sont diploïdes (Fig. IV-3; technique décrite annexe 1). Nous avons cherché si des descripteurs morphologiques et phénologiques simples ne pouvaient pas prédire le type de betterave considéré. Nous avons donc en parallèle établi la diagnose du type de montaison par analyse du niveau de ploïdie et observé en champ les traits suivants sur les betteraves montées du rang.

- Ramification: certaines plantes sont fortement ramifiées vers la base de la hampe florale tandis que d'autres présentent une hampe dégagée sur une grande hauteur ; la morphologie "buissonnante" n'est pas exclusivement d'origine "sauvage". Les montaisons variétales peuvent être ramifiées (Fig. IV-4a). Cependant, même si le critère de ramification n'est pas diagnostique, les mauvaises herbes hybrides se montrent nettement plus ramifiées que les montaisons variétales (khi-deux, $p = 0.0002$).

- Coloration rougeâtre²¹ de la tige: Beaucoup de plantes présentent une telle coloration à la base de leurs rameaux (intensité très variable) tandis que d'autres sont totalement vertes. Ce caractère 'rougeâtre' est habituellement vu comme plutôt "sauvage" (Desprez 1980; Bartsch & Schmidt 1997) mais ne semble pas diagnostique ici (Fig. IV-4b), même si les mauvaises herbes hybrides sont plus souvent colorées que les montaisons variétales (khi deux, $p=0.0415$).

- Multigermie: La monogermie fait partie du syndrome de domestication de la sucrière, puisque les portes-graines cultivés du Sud-ouest sont monogermes. Toutefois, les pollinisateurs cultivés sont multigermes, de sorte que les betteraves sucrières ne sont pas forcément monogermes (la monogermie est récessive). Certaines montaisons du rang apparaissent cependant clairement monogermes tandis que d'autres présentent des fleurs isolées ou par deux sur les rameaux (les autres ayant des ensembles de trois fleurs et plus). Là encore, le caractère n'est pas diagnostique (Fig. IV-4c) ; les deux catégories présentent des profils comparables (khi deux, $p=0.1016$).

- Phénologie de la floraison. Deux faits majeurs apparaissent:

- **Les montaisons variétales sont globalement plus tardives** (Fig. IV-4d ; khi-deux, $p=0.0000$). Dans chaque champ (pour la période d'observation considérée, c'est à dire une semaine fin juillet) la part d'hybrides en fin de floraison est toujours plus forte que celle des montaisons variétales qui sont plutôt en cours de montaison ou en début de floraison, même si les quatre classes de précocité sont représentées dans les deux catégories. Il faut noter que les individus à floraison très tardive n'auront peut-être pas le temps de murer leurs graines (cela concernerait

²⁰ Nous n'avons rencontré que des variétés triploïdes dans nos mesures en champ (autour de Lille).

²¹ Il ne s'agit pas du gène 'R' des betteraves 'Rouges' mais d'une coloration par les bêtaïnes, partiellement sous influence environnementale.

Tableau IV-1. Taux d'infestation en betteraves montées du rang

Date	Champs	Surface (ha) ^a	Nb ^b betteraves du champ	Taux en ‰ (effectif) mauv. herbes hybrides		Taux en ‰ (effectif) montaisons variétales		Taux en ‰ (effectif) total montaisons du rang	
24/07/97	transformateur	1.30	117000	0.09	10	0.03	4	0.12	14
24/07/97	Tilleul A	1.43	128700	0.16	20	0.03	4	0.19	24
24/07/97	Petit Paris	2.90	261225	0.08	21	0.02	4	0.10	25
25/07/97	Merchin A	4.11	369720	0.14	52	0.03	11	0.17	63
28/07/97	Voyette B	3.98	358425	0.03	10	0.01	3	0.04	13
28/07/97	Cimetière	1.00	90000	0.26	23	0.06	5	0.31	28
29/07/97	Babermont	1.94	174420	0.12	21	0.02	4	0.14	25
30/07/97	Charrue	1.49	133848	0.25	33	0.04	5	0.28	38
04/08/97	Ermitage	1.39	124740	0.17	21	0.06	7	0.22	28
04/08/97	Voyette A	4.38	393750	0.10	41	0.03	12	0.13	53
			moyenne	0.14 ‰	252	0.03 ‰	59	0.17 ‰	311
			SE	0.043		0.005		0.051	

plutôt les montaisons variétales). Dans ce cas la dispersion de leurs gènes n'est réalisée que par le pollen.

- **Les période de floraison des deux catégories se chevauchent.** Le décalage est tel entre les différentes montaisons d'une même catégorie qu'il y a toujours des plantes en cours de floraison (sans même impliquer ici les mauvaises herbes hors du rang) dans un champ. De plus, la floraison est continue chez la betterave et progresse de façon basifuge le long de la hampe florale, en s'étalant sur plusieurs semaines (Alcaraz *et al.* 1998a). **D'un point de vue phénologique, les échanges génétiques entre montaisons variétales et hybrides sont donc parfaitement envisageables.**

Finalement, nous n'avons pas pu mettre en évidence de caractère morphologique simple permettant de repérer visuellement une montaison variétale d'un hybride en champ.

IV-2.2 Mauvaises herbes hors rang

La germination de la banque de graines issue d'une première contamination par des montaisons du rang est visible dans le champ sous forme d'une tache de betteraves montées, centrée sur la position occupée par l'hybride lors de la culture précédente. Ces plantes ne se situent plus dans le rang du semis, contrairement aux deux autres formes décrites précédemment. Elles constituent les **betteraves mauvaises herbes *sensu stricto*** (elles ont au moins une génération d'écart avec les hybrides introduits lors du semis). Si elles ne sont pas éliminées, les taches s'agrandissent au fil des cultures pour finalement confluer et envahir la totalité du champs. On peut donc observer des champs (i) très peu contaminés (quelques betteraves montées) si l'agriculteur désherbe manuellement, (ii) moyennement contaminés (les mauvaises herbes vont par taches, à l'emplacement des quelques pieds montés à graine laissés lors de la culture précédente), mais aussi (iii) entièrement envahis de mauvaises herbes "anciennes" qui ont de nombreuses générations d'écart avec l'introduction des hybrides (aucune intervention n'est désormais envisageable).

IV-3 Degré d'infestation des champs

Le point d'entrée des mauvaises herbes dans le champ est toujours le semis. Une seule année d'introduction d'hybrides suffit théoriquement à polluer le champ, avec une aggravation exponentielle lors de chaque culture si aucun désherbage n'est entrepris.

IV-3.1 Taux d'apparition dans le rang

Les sucrières sont normalement bisannuelles ; la formation d'hybrides peut être supposée peu fréquente en raison de son caractère accidentel. On peut alors postuler que la présence de betteraves montées dans le rang doit être rare. Les mauvaises herbes pourraient ainsi dériver de quelques événements exceptionnels d'introduction. Pourtant, nos mesures montrent que **la contamination par des hybrides est présente dans chacun des dix champs analysés.** Elle reste

Tableau IV-2. Estimation du taux d'infestation par les mauvaises herbes dans deux champs peu infestés (moyenne des comptages sur les transects choisis au hasard et résultat pour une zone infestée choisie volontairement)

Date	Champ	Surface (m ²)	Nb sucrières	Nb individus hors du rang		Nb individus dans le rang		Taux de montaison	
				Montés non fleuris	Fleuris	Montés non fleuris	Fleuris	Hors du rang	Dans le rang
22/07/97	Buisson	990	8910	38	220	2	8	29 ‰	1.1 ‰
	Portion très infestée	31.5	284	18	116	4	1	470 ‰	18 ‰
22/07/97	Autoroute	765	6885	58	107	2	3	24 ‰	0.7 ‰
	Portion très infestée	108	981	20	105	0	1	127 ‰	1 ‰

néanmoins faible et très en dessous du seuil maximum autorisé de 1‰ (Tableau IV-1). D'autre part, **les montaisons variétales sont peu nombreuses mais sont aussi systématiquement observées** (de l'ordre de 3/ha, pour les situations que nous avons rencontré).

Les planteurs peuvent maintenant choisir leurs variétés en tenant compte de leur résistance à la montaison, établie d'après les essais variétaux de l'ITB. Un taux global de montaison est cependant peu informatif car il recouvre en fait les montaisons variétales et les hybrides. Les comptes-rendus des essais variétaux séparent depuis 1996 le taux de montaison en ses deux composantes: 'résistance variétale' et 'pollution'. La dichotomie est établie sur la base d'expérimentations dans différentes régions aux températures printanières contrastées (ITB 1997): (i) Littoral de la Manche et de la mer du Nord: semis début mars sous des températures très vernalisantes: permet de détecter l'ensemble 'pollution' + montaison variétale. (ii) Picardie: les températures sont moins vernalisantes et révèlent 'pollution' + géotypes cultivés très sensibles à la vernalisation. (iii) Loiret: faible vernalisation associée à une dévernalisation²²: révèle la 'pollution'. Cette méthodologie entraîne peut-être quelques mauvais classements, mais dans l'ensemble, les résultats disponibles vont dans le sens de nos comptages.

IV-3.2 Infestation hors rang

Lorsque le désherbage manuel est défectueux, on observe dans les premiers stades d'infestation une tache circulaire de mauvaises herbes (hors rang) qui correspond à l'expression de la banque de graines laissée par une betterave montée lors de la culture précédente. Chaque opération culturale entre deux semis de sucrières va permettre d'éliminer un certain nombre de ces mauvaises herbes mais la banque de graines est telle que chaque retour de sucrière dans la rotation s'accompagne de près de vingt fois plus de mauvaises herbes²³. Les taches peuvent donc rapidement confluer et le champ être envahi. La densité de mauvaises herbes peut alors atteindre 80 plantes au m² (Hautekète 1995) alors que la densité de la culture est de 9-10 ind./m². L'ITB estime que 4% des surfaces sont actuellement fortement infestées (après une période noire dans les années 75-80). Nous avons mesuré le taux d'infestation sur deux champs, qui paraissaient peu infestés (quelques taches seulement étaient visibles du bord de la route). De telles situations, pourtant peu spectaculaires visuellement, ont cependant montré une infestation de l'ordre de 25 ‰, soit 2500 betteraves montées à l'hectare (Tableau IV-2).

Des observations complémentaires ont été faites: (i) de nombreuses montaisons du rang (mais aussi des mauvaises herbes) présentent de la **stérilité mâle** (anthères non déhiscentes jaune-pâles ou blanches). (ii) Il existe une **grande variabilité de taille** entre les mauvaises herbes hors du rang. Certaines ne mesurent que 20 à 30 cm et sont parfois en graines, cachées sous les feuilles des

²² dévernalisation: une période de températures hautes stoppe le processus de vernalisation.

²³ "1 betterave mauvaise herbe aujourd'hui, 18 demain" (ITB)

Tableau IV-3. Croisements contrôlés en serre (détail des individus croisés)

Type de croisement	individus croisés
<u>Montaison variétale</u> x <u>Montaison variétale</u>	7 ind. : <u>DGRU 2,3,4,6,8,9,10</u> 5 ind. : <u>DTOU 1,2,3,4,5</u>
<u>Montaison variétale</u> x Hybride	4 ind. : <u>POMP 1</u> , POMP4,6,7 3 ind. : <u>POMP 2</u> , POMP3,5
Hybride x Hybride	2 ind. : LEZ 2,6 3 ind. : LEZ 1,4,7 4 ind. : WATT 1,3,4,6

Tableau IV-4. Effectif analysé lors de l'expérimentation "*germination MH*"

Type de montaison	Population (Champ)	Nb familles	Nb moyen individus par fam.
Dans le rang	CAM	4	50
	PPpro	8	50
	VEN	3	50
	VOY	6	50
Mauvaises herbes	BUG	10	30
	ESQ	12	30
	GOU	15	30
	LER ₁	14	30
	LER ₂	18	30
	POU	11	30
	PPMS	9	30
	PPR	10	30
	PPTS ₁	15	30
	PPTS ₂	14	30
	JUST	14	30
	total		163

sucrières en rosettes. (iii) Une **activité intense d'insectes** est systématiquement constatée sur les betteraves montées: nous avons observé des mouches syrphoïdes de trois espèces au moins (10 à 30 mouches par plante), d'autres diptères plus petits et quelques abeilles.

IV-4 Syndrome de domestication vs syndrome de mauvaise herbe

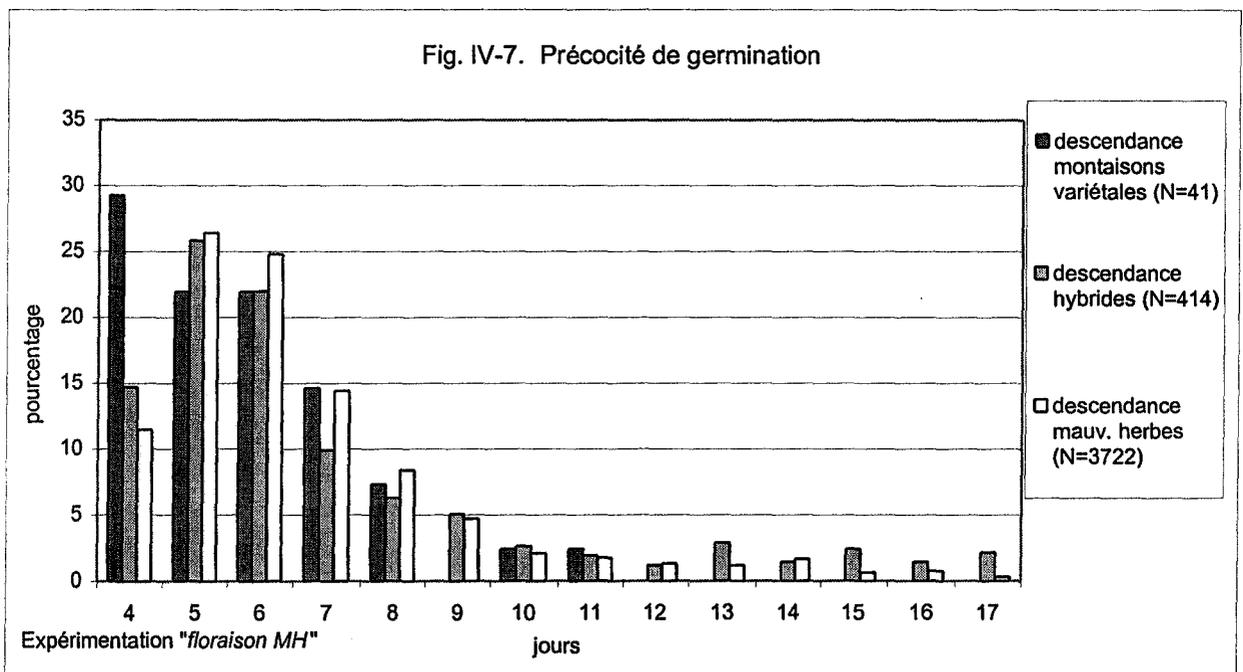
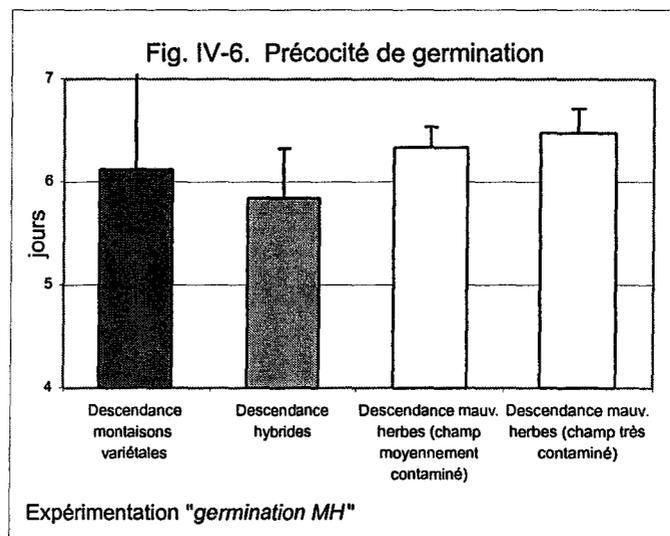
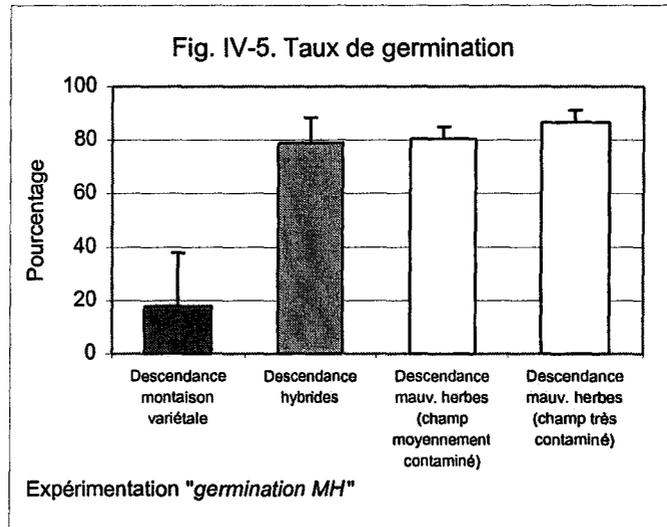
La domestication est un processus évolutif durant lequel les plantes deviennent morpho-physiologiquement différentes de leurs ancêtres sauvages (e.g. Colunga-Garciamarin *et al.* 1996), au point qu'une plante totalement domestiquée est supposée totalement dépendante de l'homme pour sa survie (Harlan 1992). Le syndrome de domestication représente alors l'ensemble des traits modifiés à partir des traits originaux présents dans la forme sauvage.

La betterave sucrière est fortement sélectionnée pour un certain nombre de caractères agronomiques. Le taux de germination doit être élevé: l'apparition de la monogermie a entraîné un effort de sélection sur ce trait car auparavant les faibles taux d'émergence étaient compensés par le grand nombre de plantules dues à la multigerme (Campbell 1979). Les lots de semences ne sont certifiés qu'au delà de 90-92 % de germination (il faut noter qu'un tri très sévère est réalisé en amont du test, avant l'enrobage des semences). Une **précocité germinative** maximale est recherchée car la plantule doit émerger avant la formation d'une éventuelle croûte de battance qui pourrait la bloquer dans le sol. D'autre part, les portes-graines maternels sont **monogermes** (i.e. les fleurs sont isolées sur les rameaux), de façon à ce que les glomérules récoltés ne contiennent qu'une seule graine, pour éviter de devoir éclaircir manuellement la ligne de semis après germination (opération de démariage). Il s'agit d'une monogermie génétique, récessive. Les variétés sont plus ou moins **résistantes à la montaison**. Enfin, les **racines** sont sélectionnées pour leur grande taille (pour ne citer qu'un seul critère morphologique).

Nous avons observé plusieurs traits quantitatifs sur les betteraves montées en champ. Nous ne pouvons pas étudier en conditions contrôlées les montaisons variétales ou les hybrides, faute de graines. Nous avons néanmoins accès à leur descendance, mais sans intervention possible sur le parent pollinisateur si les glomérules ont été récoltés en champ (ce qui donne par exemple une *pseudo-F2* sur les hybrides). Nous avons cependant réalisé quelques croisements contrôlés en serre:

Expérimentation "croisements contrôlés MH". *Méthode: déterrage en champ des montaisons du rang en début de montaison et repotage en serre. Critique majeure : l'expérimentation est restée préliminaire en raison de difficultés techniques lors de la réalisation des croisements: lorsque les plantes sont sous manchons d'isolement en coton, aucun pollen étranger ne perturbe le dispositif mais l'état phytosanitaire des plantes se dégrade rapidement. D'autre part, sans manchons la pollinisation accidentelle par d'autres betteraves de la serre n'est pas à exclure, même si les plantes sont réunies en amont du flux d'air qui entre dans la serre pour la ventiler. Ce dispositif expérimental de croisement a été amélioré par la suite (grandes cages, textile non tissé au maillage adapté, etc.) mais notre travail n'aura pas pu en bénéficier.*
Matériel : *prélèvement dans les champs GRU²⁴, TOU, POMP, LEZ et WATT (tableau IV-3).*

²⁴ les croisements impliquant les populations GRU et TOU ont été réalisés par Nina Hautekeete (1995).



IV-4.1 Germination

Les résultats ont été obtenus lors des expérimentations "floraison-MH" (décrite plus loin) et "germination-MH". **Expérimentation "germination-MH"**. **Matériel**: Chaque champ est représentée par 11 descendances maternelles en moyenne, de 30 à 50 glomérules chacune, pour un total de 5650 glomérules semés (Tableau IV-4). **Méthode**: les glomérules sont semés en barquettes de terreau (53 barquettes de 9 lignes de 10 glomérules chacune). La germination est relevée quotidiennement pour chaque glomérule, qui peut donner plusieurs plantules dont la germination n'est pas synchrone. Au bout de 20 jours, les plantules sont coupées au ciseau et les barquettes sont mises à sécher plusieurs semaines avant d'être humidifiées à nouveau, ce qui génère une seconde vague de germination.

IV-4.1.1 Taux de germination immédiate

La dormance est un caractère fréquemment rencontré chez les mauvaises herbes "idéales" et peut s'avérer très marquée (e.g. Dekker *et al.* 1996). Nous avons donc mesuré le pourcentage de glomérules germant spontanément, en supposant que l'absence de germination était due à une "dormance"²⁵.

Le taux de germination est très variable selon les catégories: il est très faible à nul pour les descendances de montaisons variétales, tandis qu'il approche les 80% de moyenne pour les descendances d'hybrides (Fig. IV-5). Les valeurs sont encore supérieures pour les mauvaises herbes, pour lesquelles des taux de 100% ne sont pas rares dans certaines familles²⁶. Ces valeurs sont très supérieures à celles rencontrées chez les betteraves rudérales du Sud-ouest dont elles sont issues, qui présentent dans les mêmes conditions de semis un taux de germination de 30 à 40% (chap. 3). On notera que la dormance en général est sous l'influence d'un fort effet maternel (Mulugeta & Stoltenberg 1998). Nos résultats vont dans ce sens car les hybrides à l'origine des mauvaises herbes ont une mère cultivée, dont le taux de germination est fort (il faudrait fabriquer des hybrides mère sauvage x père cultivé pour vérifier cet effet maternel).

N.B.: une graine ne germant pas n'est pas nécessairement dormante. Les betteraves cultivées présentent toujours un certain taux de glomérules vides, qui est souvent la conséquence de mauvaises conditions de fécondation (Alcaraz *et al.* 1998b). Il serait nécessaire pour compléter notre étude de quantifier la part relative des glomérules vides et de la dormance dans le cas où le taux de germination est faible (par exemple en utilisant les rayons X, voir Darmency *et al.* 1998a; Mannino & Expert 1998).

IV-4.1.2 Précocité de germination

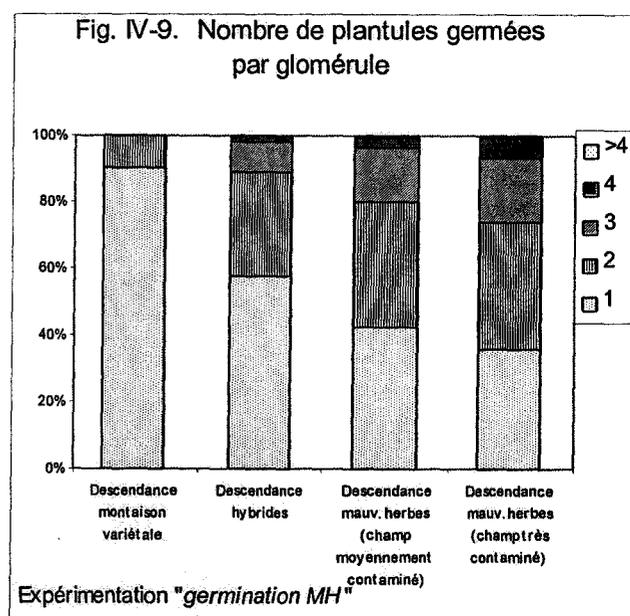
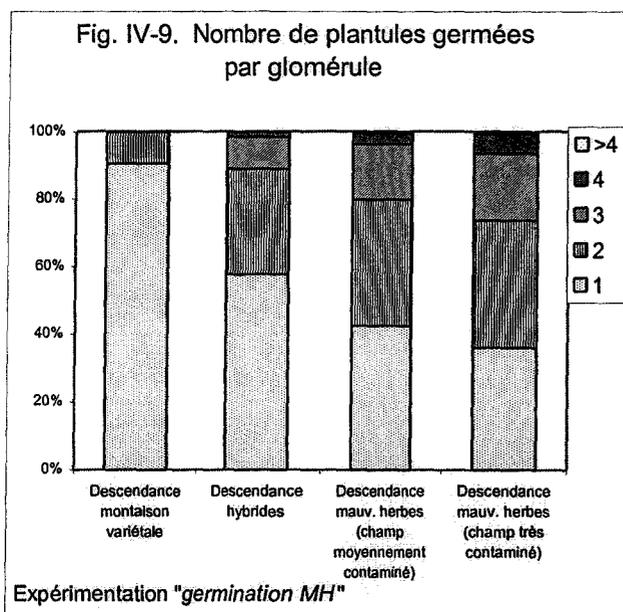
Les descendances des hybrides germent plus rapidement que les mauvaises herbes, qui semblent donc perdre cette facette du syndrome de domestication. Les valeurs rencontrées chez les

²⁵ Le terme même de 'dormance' est délicat à définir et sujet à caution (Bewley 1997). La dormance ne devrait pas être vue comme une "absence de germination" mais comme une caractéristique dont le degré détermine la diversité des conditions dans lesquelles une graine peut germer. Elle varie sur une échelle continue: à chaque degré, les graines réagissent à leur environnement en ajustant leur niveau de dormance aux changements environnementaux (Vleeshouwers *et al.* 1995).

²⁶ du fait du grand nombre d'individus testés par familles, nous avons calculés des moyennes par famille avant de calculer la moyenne de ces moyennes, avec l'erreur standard associée.

Tableau IV-5. Effectif analysé lors de l'expérimentation "floraison MH" (été 1997 ; avec Franck Dedeine, stagiaire entre licence et maîtrise)

Type de montaison ("descendance de:")	Champ	Nb familles	Nb individus	
Montaison variétale	PPpro	5	24	
	CAM	9	49	
Hybride	PPpro	5	29	
	VEN	3	17	
	BUG	10	60	
Mauvaise herbe	ESQ	10	60	
	GOU	11	58	
	LER	28	173	
	POU	9	60	
	PPMS	10	60	
	PPTS	20	113	
	JUST	10	59	
	MIX	5	10	
	Croisement contrôlé	GRU	4	19
	Mont. var. x mont. var.	TOU	1	2
Croisement contrôlé mont. var. x hyb.	POM	6	33	
	GRU	3	15	
Croisement contrôlé Hyb. x hyb.	LEZ	5	25	
	TOU	1	10	
	WATT	4	20	



descendances de montaisons variétales (Fig. IV-6) sont parfois difficilement interprétables car très variables et concernant de petits effectifs: de fait, beaucoup de glomérules ne germent pas. La moyenne élevée rencontrée ici est donc plutôt le fait d'une mauvaise germination que d'une germination plus tardive que les autres catégories. Les valeurs présentées Figure IV-7 sont davantage en adéquation avec un fort syndrome de domestication pour les descendances de montaisons variétales puisque 30% des glomérules germent en quatre jours, contre seulement 12% pour les mauvaises herbes.

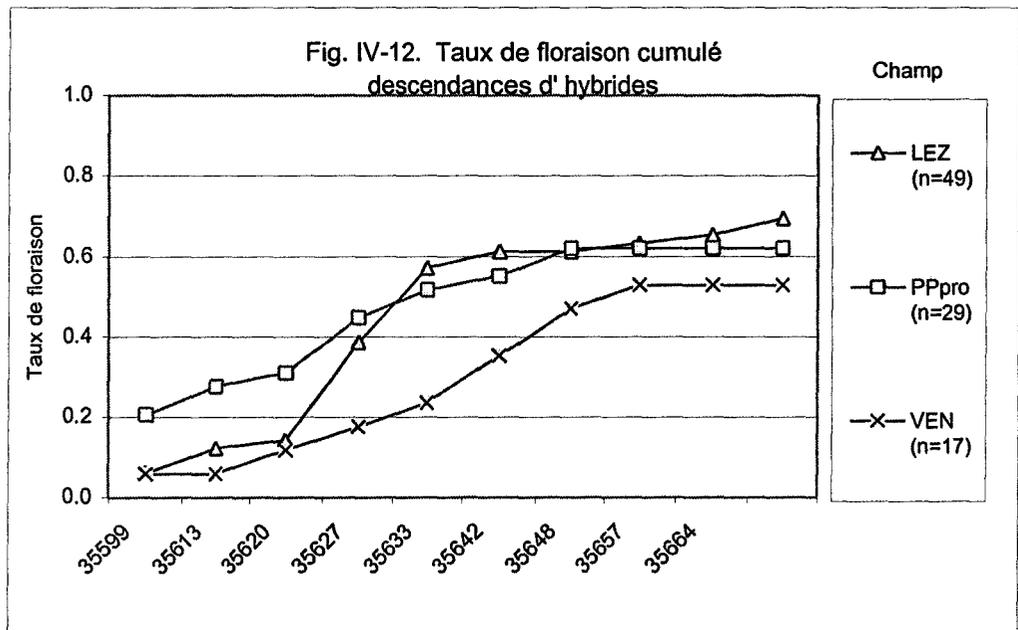
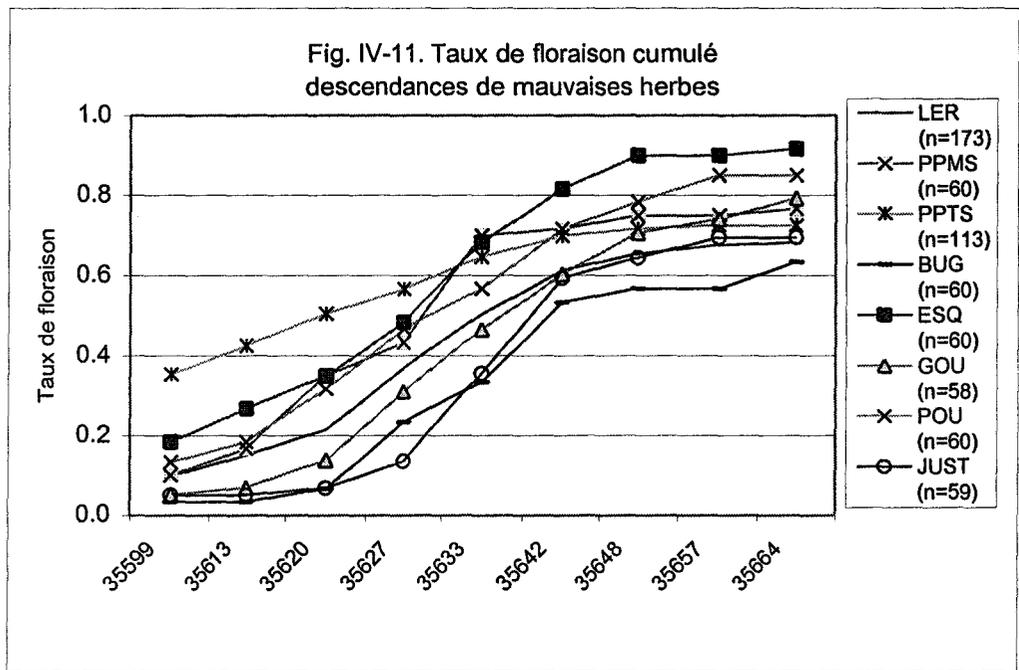
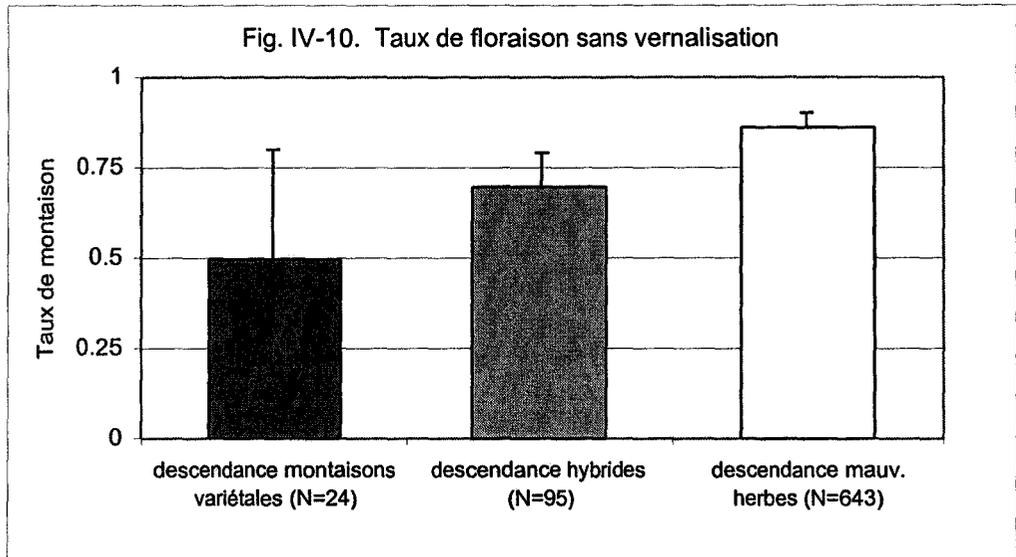
IV-4.1.3 Nombre de plantules par glomérules

Le nombre de plantules germées par glomérule renseigne de façon indirecte sur le degré de multigerme de la mère. Les descendances de montaisons du rang présentent rarement plus d'une plantule par glomérule (Fig. IV-8&9) tandis que chez les mauvaises herbes, il y a généralement deux plantules et plus (jusqu'à six). Il semble ici que la tendance est à la perte du syndrome de domestication, avec retour à la situation rencontrée chez les betteraves sauvages (chap. 3). L'avantage pour la plante de disposer de plusieurs plantules par glomérule reste cependant obscur. L'existence de glomérules multigermes est relativement rare chez les angiospermes. Certains auteurs (Dale & Ford-Lloyd 1985) ont proposé que ce trait permette la survie de plantes dioïque (e.g. épinar) ou auto-incompatibles (e.g. betterave) après une dispersion de diaspore(s) hors d'atteinte du pollen de congénères. En champ, on peut imaginer un bénéfice dans le cas d'attaque fongique ponctuelle (e.g. fonte des semis), si les germinations sont suffisamment asynchrones pour que les plantules tardives remplacent celles détruites lors de la vague de fonte de semis. C'est effectivement le cas: l'écart entre la première et la dernière plantule peut atteindre 10 jours, avec une moyenne de 1.32 jours pour les descendances de montaisons du rang et 1.72 pour celle des mauvaises herbes (différence significative, ANOVA, $P=0.0000$).

IV-4.2 Floraison

Le taux et la précocité de floraison sans vernalisation ont été observés lors des deux expérimentations "floraison MH" et "pollen-survie". **Expérimentation "floraison-MH"** *Matériel:* semis de 4000 glomérules récoltés sur 129 familles de 11 champs et 28 familles issues de croisements contrôlés. *Transplantation de 896 individus (Tableau IV-5). Remarque concernant les glomérules prélevés en champ:* Les descendances prélevées sur des individus montés dans le rang l'ont été dans des champs "propres", avec très peu ou pas de mauvaises herbes hors du rang. *La détermination du niveau de ploïdie de la plante mère a été réalisée au laboratoire à partir d'une feuille prélevée en même temps que les glomérules. Il s'est avéré que les individus triploïdes (i.e. les montaisons variétales) ne donnaient que peu de glomérules, ce qui explique les faibles effectifs utilisés pour cette catégorie lors des expérimentations. Un seul champ (PPpro) a permis d'avoir à la fois des descendances de montaisons variétales et d'hybrides. Méthode:* semis en serre chauffée, sevrage 15 jours en serre non chauffée et transplantation en pleine terre en respectant l'écartement intra- et inter-rang rencontré en situation agronomique (15- 20 cm entre les plantes du rang et 45-50 cm entre les rangs). *Le terrain a été divisé en quatre secteurs dans lesquels ont été répartis les réplicats des différentes familles, pour éviter que tous les représentants d'une même famille ou d'un même champ ne subissent le même éventuel effet artéfactuel (effet "bordure", problème de sol, etc.) Les individus à repiquer ont été tirés au sort parmi les plantules, sans tenir compte de la précocité de germination.*

Taux de floraison (expérimentation "floraison MH")



Les taux de montaison attendus pour les différentes catégories de montaisons sont présentés ci dessous:

Descendance de:	Génotype maternel	Génotypes paternels possibles	Taux de montaison attendu (sans hypothèse)	Taux de montaison attendus (sous l'hypothèse d'absence de pollen bb)*
Montaison variétale	bb	bb et Bb	0 à 50%	50%
Hybride	Bb	bb et Bb	0 à 75%	50 à 75%
Mauvaise herbe	Bb ou BB	BB, Bb, ou bb	50 à 100%	75 à 100%

* on suppose la contribution pollinique des génotypes 'bb' faible, du fait de leur rareté.

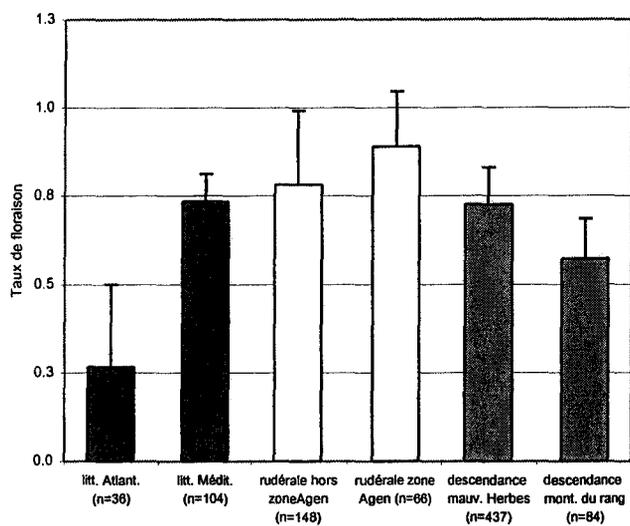
Nos observations (Fig. IV-10) sont compatibles avec les taux de montaison attendus. Le taux de 50% de montaison dans la descendance des montaisons variétales confirme la piètre contribution de ces montaisons variétales au nuage pollinique (peu de pollen semble émis par les individus 'bb'). En effet, il faut préciser que les glomérules prélevés sur les montaisons du rang l'ont été dans des champs sans mauvaises herbes, et soumis de ce fait à un nuage pollinique de "génotypes" 'bb' et 'Bb' seulement, dus respectivement aux contributions des montaisons variétales et des hybrides. Les champs très contaminés présentent en revanche toutes les catégories de montaison, de sorte que le pollen présent est surtout 'BB' ou 'Bb' mais peut être aussi 'bb' pour une faible part. Les valeurs observées sont variables selon les champs mais vont toujours dans le même sens (Fig. IV-11&12).

Enfin, les figures IV-13,14&15 permettent de comparer la floraison des mauvaises herbes avec celle des betteraves sauvages²⁷. Les mauvaises herbes ne sont pas particulièrement précoces dans leur floraison contrairement aux betteraves de la zone d'Agen. Pourtant, les espèces subissant un fort taux de mortalité adulte sont susceptibles d'avoir un cycle de vie plus court, des taux de développement plus rapide et d'atteindre la maturité sexuelle à stade jeune (Franco & Silvertown 1996). L'absence de cette tendance montre ici qu'aucune pression de sélection forte ne semble agir sur la précocité de floraison. Certes, il peut y avoir une sélection artificielle dans le champ pour les individus les plus précoces si l'agriculteur désherbe systématiquement en fin d'été. Mais dans le cas où le champ devient quand même infesté, plus aucun désherbage n'est fait et la précocité importe peu, tant que les plantes peuvent achever la maturation de leurs graines (ce qui est le cas puisque la récolte commence en octobre).

Remarque: à chaque culture de betterave, les individus 'bb' sont éliminés et seuls les individus 'BB' et 'Bb' ont une descendance. La fréquence de B devrait donc augmenter très rapidement. Si on calcule la descendance théorique de deux uniques betteraves hybrides du rang au fil des cultures de betteraves, le taux d'individus bb qui ne montent pas est de 25% en F2 (lors de la

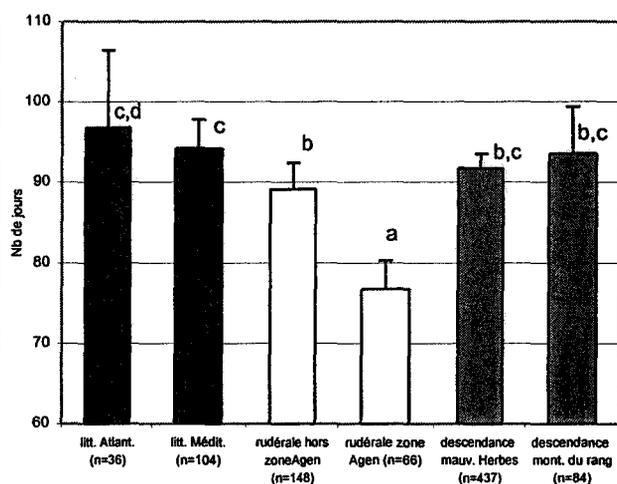
²⁷ les valeurs sont légèrement différentes entre les deux figures car le graphe de floraison cumulé est basé sur une moyenne de tous les individus confondus tandis que les histogrammes sont construits sur la base de moyennes calculées sur des valeurs moyennes par famille.

Fig. IV-13. Taux de floraison (N=875)



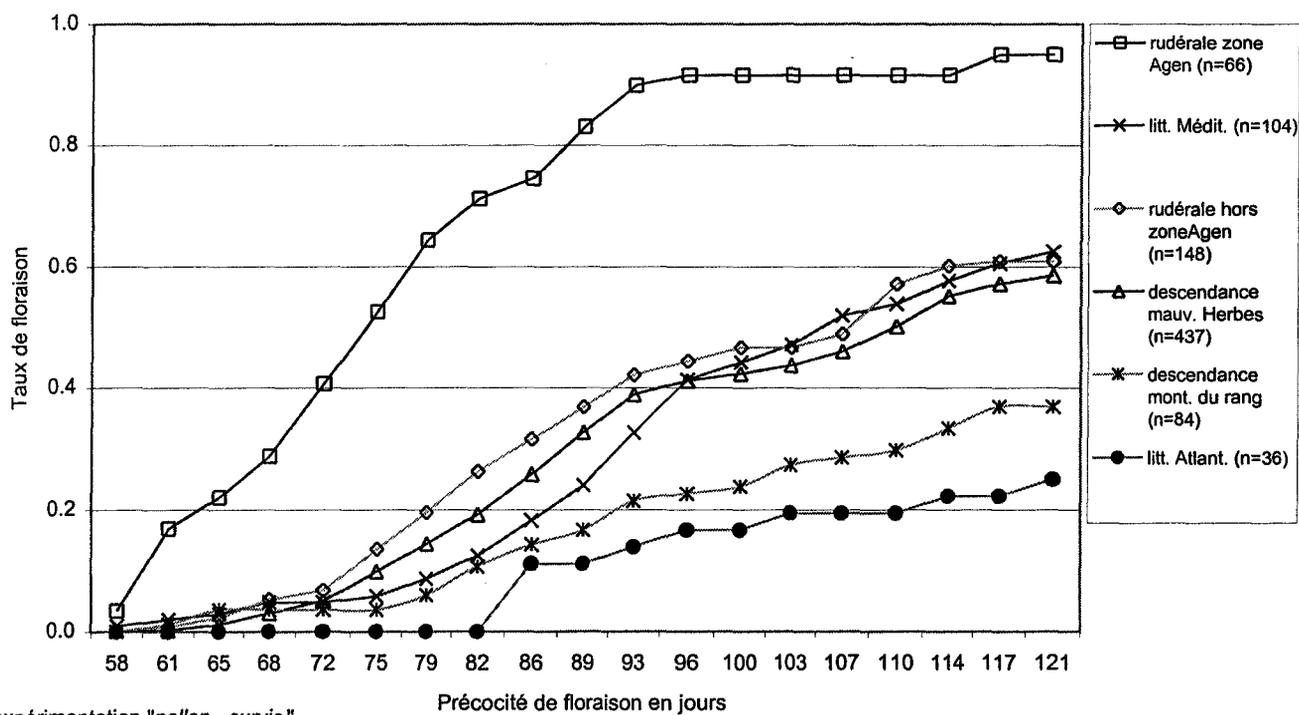
Expérimentation "pollen - survie"

Fig. IV-14. Précocité de floraison (N=498)



Expérimentation "pollen - survie"

Fig. IV-15. Taux de floraison cumulé en fonction du type de betterave



expérimentation "pollen - survie"

1^{ère} culture avec des mauvaises herbes hors rang), puis 11% à la 2^{nde} culture, 6% à la 3^{ème}, 4% à la 4^{ème}, 2.7%, etc. Or, nous n'avons jamais mesuré un taux de non-montaison inférieur à 10% (il est proche de 20% en général), même pour les champs bien infestés. Une première explication implique que des allèles *b* sont fréquemment réintroduits dans le système *via* des montaisons variétales 'bb' et des hybrides 'Bb'. Pourtant, quel que soit le champ, le nombre de montaisons du rang reste de quelques dizaines. La contribution pollinique de ces dernières doit donc être négligeable par rapport à celle des milliers de mauvaises herbes par hectare des champs très infestés. Pour compenser ce déséquilibre numérique en défaveur de *b*, il faudrait imaginer un avantage pollinique aux montaisons du rang. Cela semble peu probable, d'autant que la proportion de pollen viable est faible chez les montaisons du rang (voir plus loin). On peut aussi envisager un avantage aux mauvaises herbes 'Bb', par rapport aux 'BB', mais cette hypothèse est très spéculative. Une autre explication (n'excluant pas les précédentes) peut être avancée, qui suppose qu'une partie des hétérozygotes 'Bb' ne monte pas pour cause de pénétrance partielle de l'allèle *B* (Boudry *et al.* 1994; Abe *et al.* 1997b). De sorte que nous pourrions attribuer à tort un génotype 'bb' à un individu qui est en fait 'Bb': la fréquence de *B* serait en fait supérieure à celle déduite des montaisons.

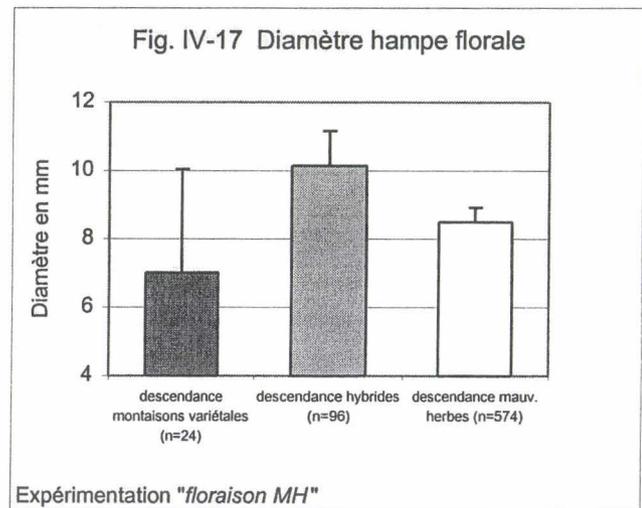
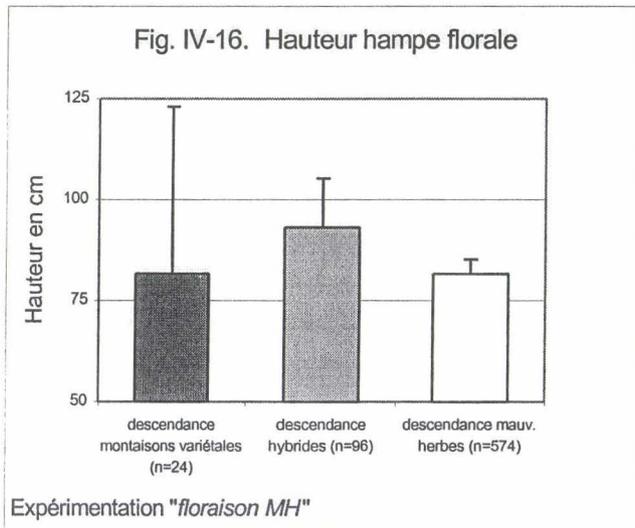
Nous voyons là les limites de notre approche de 'B', qui n'est basée que sur l'observation des floraisons. Une recherche moléculaire de 'B' directement sur l'ADN permettrait de faire la part des génotypes *bb* et *Bb* avec pénétrance partielle. D'autre part, nous avons postulé dès le départ que les montaisons du rang qui sont triploïdes correspondent à des montaisons variétales qui fleurissent malgré leur génotype *bb* tandis que les montaisons diploïdes du rang sont étiquetées "hybrides *Bb*". Un marqueur moléculaire de 'B' permettrait une vérification de ces allégations. L'équipe du Pr. C. Jung (Université de Kiel, Allemagne) est actuellement en phase de mise au point d'un tel marqueur et espère pouvoir séquencer la région du gène du '*Bolting*'. Une fois la séquence disponible, il sera par ailleurs très intéressant de regarder si différents variants de 'B' existent. Nous disposons maintenant de nombreuses accessions sauvages dans lesquelles on rencontre une floraison sans vernalisation. On peut "rêver" par exemple de formes "alléliques" différentes entre le 'B' du Sud-ouest et le 'B' de la côte Adriatique (Italie). Les betteraves sauvages littorales de la côte Adriatique sont en effet susceptibles de générer des mauvaises herbes *via* la zone de multiplication des semences italienne (Bartsch & Schmidt 1997). On pourrait alors, le cas échéant, remonter les différentes sources de contamination au niveau d'un champ de betterave. L'existence de variants alléliques entre les différentes betteraves rudérales et celles des littorales méditerranéennes approfondirait l'étude de l'origine des betteraves rudérales.

IV-4.3 Autres traits

Nous avons observé (Tableau IV-6) que:

Tableau IV-6. Traits quantitatifs des betteraves montées (expérimentation "germination MH")

Type de betterave montée: "descendance de..."	Effectif observé (<i>fréquence</i>) pour le trait considéré					
	Fonte des semis		Hypocotyle vert		Germination différée	
	absence	présence	absence	présence	absence	présence
Montaison du rang	937	15 (0.016)	765	187 (0.24)	940	12 (0.013)
Mauvaises herbes Champs moyennement infestés	3649	98 (0.027)	3404	343 (0.10)	3666	81 (0.022)
Mauvaises herbes Champs très infestés	2470	92 (0.037)	2503	59 (0.02)	2479	83 (0.033)
Test du khi-deux	P=0.0032		P=0.0000		P=0.0010	



- les descendances de mauvaises herbes ont plus sensibles à la fonte des semis, qui intervient faiblement malgré un traitement préventif. La résistance des jeunes plantules aux attaques fongiques (caractère sélectionné chez les sucrières) se perd donc progressivement chez les mauvaises herbes du rang.

- le taux d'hypocotyles verts passe de 24% chez les descendances de montaisons dans le rang à 2% chez les descendances de mauvaises herbes hors du rang. Ce caractère "hypocotyle vert" est couramment utilisé comme marqueurs en sélection variétale.

- le taux de glomérules ne germant pas immédiatement mais seulement après un traitement doux de levée de dormance (voir annexe 1) est sensiblement supérieur chez les mauvaises herbes, même s'il reste faible en général. Les betteraves sucrières sont sélectionnées pour l'absence de dormance, même partielle, de façon à garantir une levée rapide: on observe donc ici un léger relâchement sur ce trait.

- les descendances des mauvaises herbes ont une hampe florale plus grêle (hauteur et diamètre) que les descendances des hybrides (Fig. IV-16&17), ce qui corrobore l'hypothèse d'une allocation préférentielle des ressources à la reproduction (voir plus loin). La variance inter-champ de ces valeurs est assez élevée, et certains champs présentent des mauvaises herbes de très petite taille.

IV-4.4 Production de pollen

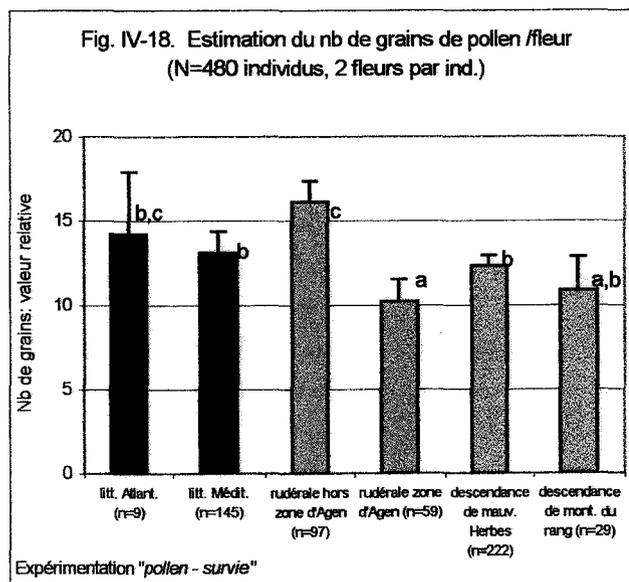
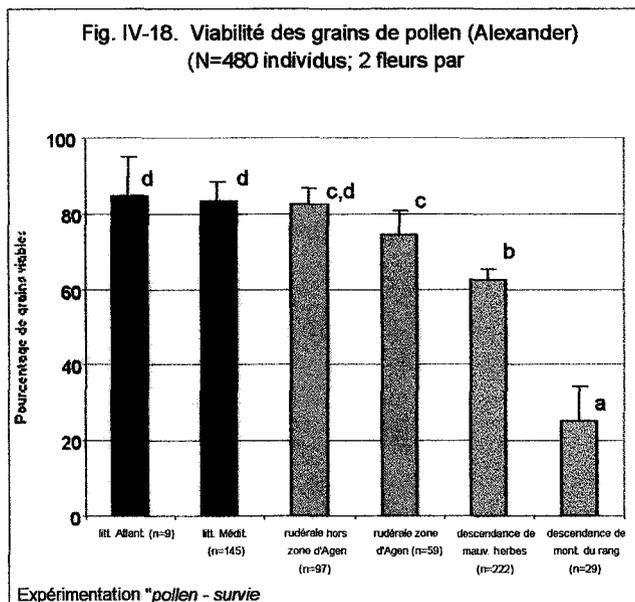
Expérimentation "pollen-survie". Matériel: 875 individus: betteraves mauvaises herbes principalement, mais aussi betteraves sauvages (Tableau IV-7). Méthode: semis des glomérules en serre, repotage puis sevrage 15 jours en serre non chauffée et sortie des pots en extérieur avec arrosage quasi quotidien (la situation en plein air est nécessaire car l'observation de la stérilité mâle sous serre conduit à une surestimation). Relevé bi-hebdomadaire des floraisons. Prélèvement d'anthères pour comptage du nombre de grains de pollen et coloration d'Alexander (viabilité).

IV-4.4.1 Viabilité

Les observations en conditions contrôlées confirment ce qui était observé en champ: les mauvaises herbes produisent un taux de grains non viables très élevé (Fig. IV-18). Le phénomène, qui est très présent sur les hybrides (observation en champ), est encore marqué dans leur descendance mais décroît chez les autres mauvaises herbes. En revanche, la fertilité femelle de ces hybrides est très bonne car toutes les fleurs produisent des glomérules (observation en champs et en terrain d'expérience), ce qui indique que le pollen n'est pas limitant. Toutes les variétés de sucrières actuelles sont issues de lignées maternelles mâle stériles (CMS d'Owen). Pourtant, l'existence de stérilité mâle chez les montaisons du rang n'est pas systématique: le déterminisme de cette stérilité est nucléo-cytoplasmique, avec un cytoplasme stérilisant à hérédité maternelle et des allèles nucléaires restaurateurs. Il est vraisemblable que l'arrivée d'allèles de restauration dans les champs se produise fortuitement et soit sélectionnée favorablement chez les mauvaises herbes. Lors de la fabrication des semences hybrides cultivées, la mère est certes mâle-stérile mais le père peut apporter (ou non) les allèles restaurateurs qui permettront à la génération suivante d'être fertile (ou

Tableau IV-7: effectif analysé lors de l'expérimentation "pollen-survie"
(juillet - août 1998 ; avec Anne-Céline Thuillier, stagiaire entre maîtrise et DEA)

Type de betterave	population	Nb familles	Nb individus
Littorales Atlantiques	SEU	2	21
	TAL	2	15
	LEU	9	29
Littorales Méditerranéennes	MAG	10	30
	PAL	6	25
	PIER	7	20
Rudérales hors zone d'Agen	CAR	8	18
	CQU	9	26
	FER	5	22
	LAG	9	17
	MGU	8	23
	POR	2	21
	VLG	9	21
	CON	6	21
Rudérales zone Agen	MUC	5	16
	PUY	1	29
	CAM	5	30
Montaisons du rang	PPpro	4	15
	VEN	3	15
	VOY	5	24
Mauvaises herbes	BUG	8	30
	ESQ	10	31
	GOU	14	45
	JUST	10	46
	LER	19	87
	POU	9	33
	PP	23	63
	PPR	6	30
	PPTS	8	72
Total		222	875



non). Les betteraves rudérales à l'origine de la formation des hybrides n'ont pas non plus forcément les allèles de restauration de la stérilité mâle de la CMS d'Owen. On sait cependant que des allèles nucléaires restaurateurs de cette CMS sont rencontrés dans des populations littorales du Nord (Laporte 1998) mais leur existence dans les populations de betteraves rudérales de la zone d'Agen n'a pas été recherchée.

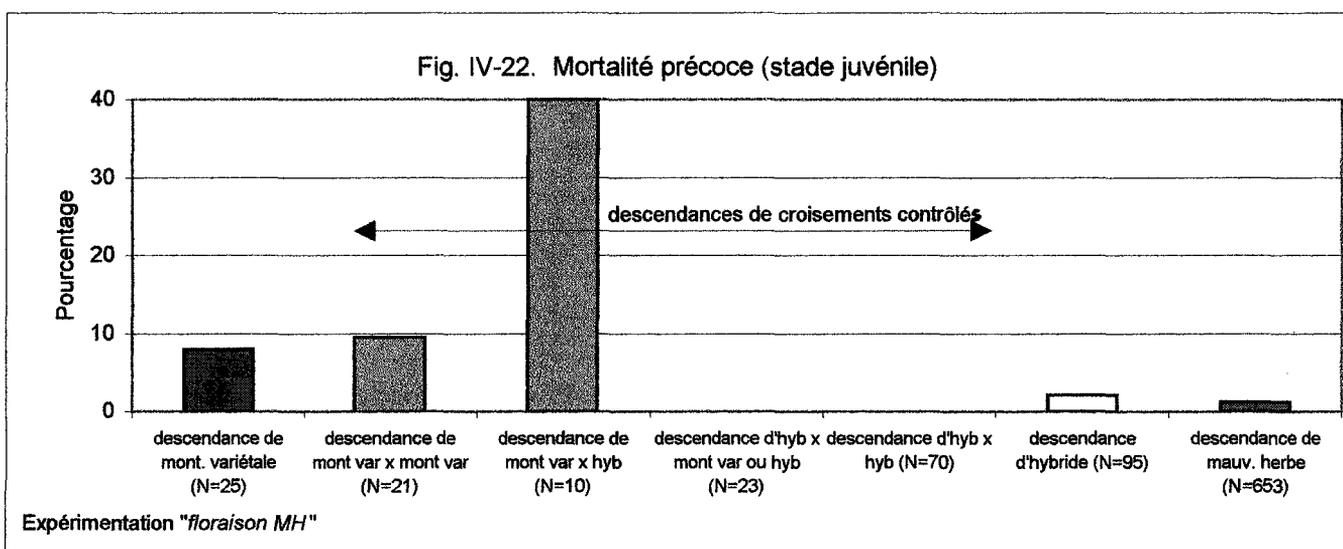
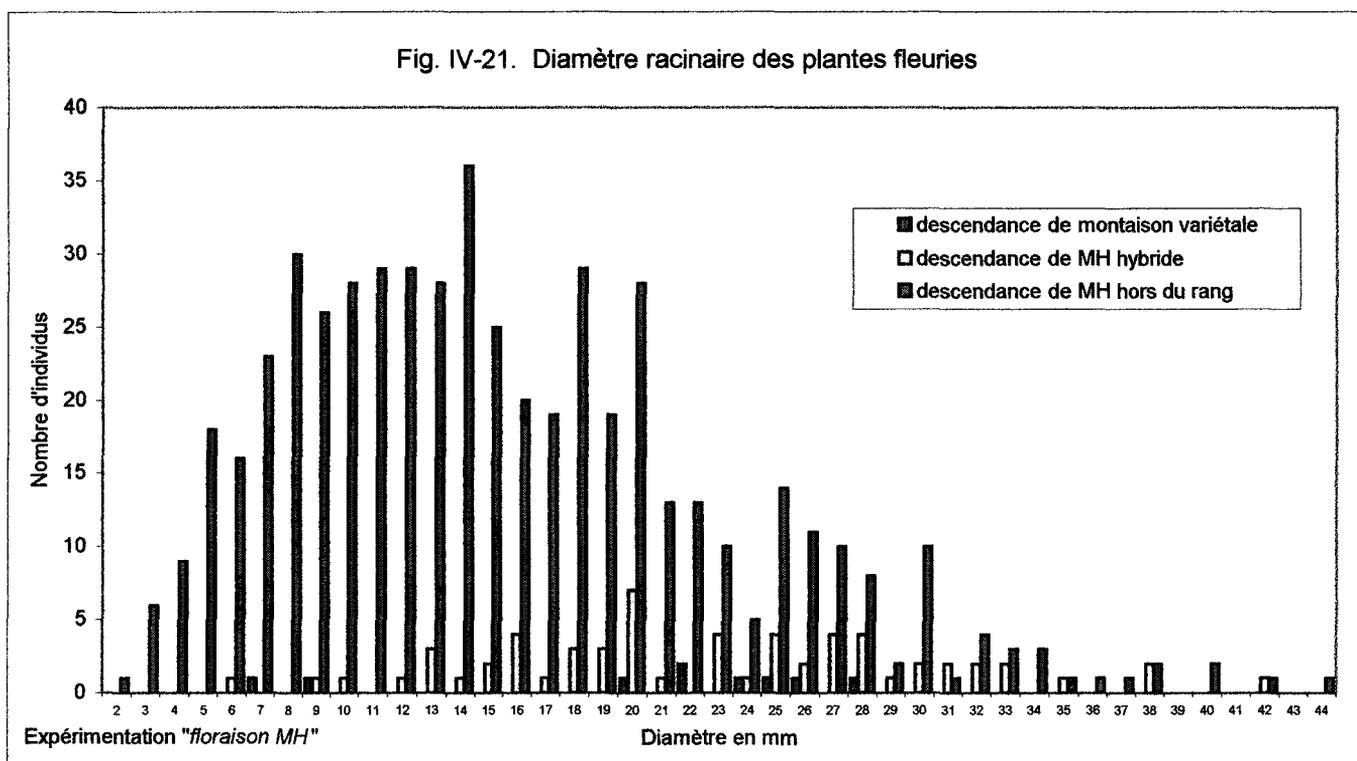
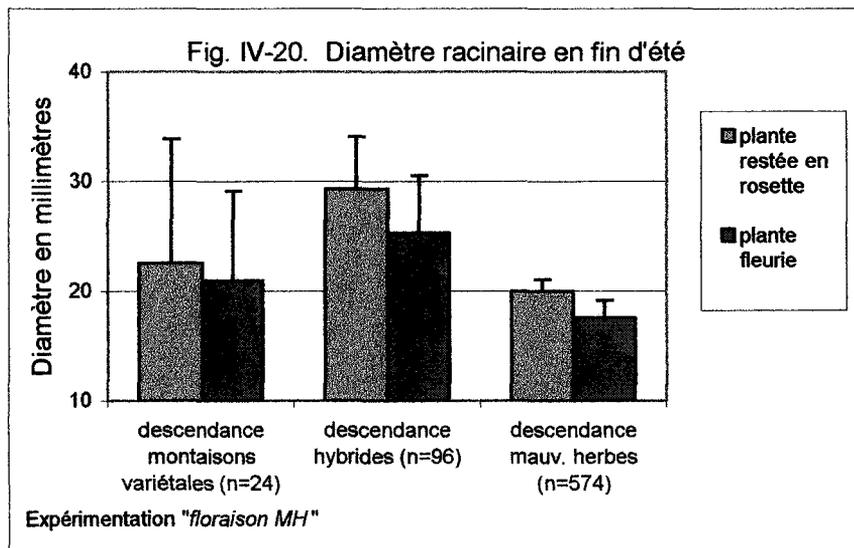
IV-4.4.2 Quantité de pollen par anthère

Les fortes variances observées entre les comptages obligent à la prudence: la technique de comptage est grossière (voir annexe 1). Cependant, une forte variance inter- et intra-individus n'est guère surprenante: on sait qu'il existe chez les sucrières une très grande variation entre les lignées cultivées ainsi que intra-plante et intra-fleur (Hecker 1988). Si on considère les résultats obtenus comme valables, il faut conclure à l'absence de différence entre les catégories de montaisons pour la production de pollen (Fig. IV-19). D'autre part, la quantité émise par les betteraves mauvaises herbes n'est pas très différente de celle émise par les betteraves sauvages.

IV-4.5 Reproduction et survie

L'allocation différentielle des ressources à la reproduction ou à la survie est un point crucial dans l'évolution des betteraves mauvaises herbes. Un individu ne se reproduisant pas la première année n'aura pas de descendance à cause du labour automnal. L'allocation des ressources à la survie est contre sélectionnée de la même façon car tout ce qui n'est pas dédié à la reproduction est perdu. C'est donc à la dualité "effort reproducteur - effort végétatif" des mauvaises herbes qu'il faut s'attacher. On s'attend à un investissement maximal dans la reproduction chez les mauvaises herbes pour les champs infestés depuis longtemps (*i.e.* dont les mauvaises herbes ont subi un grand nombre d'épisodes de sélection). L'extrême consiste théoriquement en une annualité vraie, avec une mortalité naturelle en fin de maturation des graines. En revanche, les hybrides et leur descendance immédiate constituent de fortes réserves racinaires du fait du syndrome de domestication encore présent.

La mesure du ratio reproduction/survie chez la betterave n'est pas aisée. Une méthode possible consiste à comparer la biomasse de la partie aérienne (hors rosette) à la partie racinaire (avec rosette). La partie aérienne (hampe florale et bractées), bien que "végétative" est alors considérée comme entièrement dédiée à la reproduction. Cependant, les montaisons variétales et les hybrides font peu de glomérules alors que leur hampe florale est énorme. Seules les mauvaises herbes présentent une hampe florale gracile et entièrement couverte de glomérules. Ces derniers sont un point clé dans l'envahissement du champ car ils restent sur place et représentent une banque de graines considérable. L'effort reproducteur pourrait donc être estimé plus précisément en comparant la quantité de glomérules produite, rapportée à la biomasse totale des parties



végétatives. Nous n'avons pas eu le temps de pratiquer de telles mesures²⁸. En revanche, nous avons mesuré l'allocation des ressources à la survie, mesurée par le diamètre racinaire: les plantes restées en rosette présentent logiquement une plus grosse racine, nécessaire à leur survie hivernale. On attend des mauvaises herbes qu'elles allouent davantage de ressources à leur reproduction qu'à leur survie car elles sont sélectionnées chaque année pour cela lors du labour, qui tue toutes les plantes. Nos résultats confirment ce phénomène puisque les racines des mauvaises herbes fleuries sont plus petites que celles de la descendance des montaisons du rang (Fig. IV-20). Les valeurs obtenues pour les descendances des montaisons variétales ne sont pas réellement informatives: elles sont très variables et la petite taille observée pour les racines des très rares plantes montées est seulement représentative du mauvais état général de ces plantes.

L'expérimentation "*floraison-MH*" a montré que certains individus fleuris (en l'occurrence uniquement des descendances de mauvaises herbes) mourraient très rapidement, tandis que d'autres restaient vivants même après la maturation des glomérules. L'expérimentation "*pollen-survie*", conduite en pots, devait permettre de quantifier ce caractère d'annualité en comparant les différents groupes. Malheureusement, la météorologie de 1998 s'est montrée excessivement mauvaise²⁹, ce qui a entraîné une forte mortalité des individus par pourrissement des racines rendant impossible toute interprétation.

Néanmoins, même en absence de mortalité précoce pré-hivernale, il est possible d'apprécier l'allocation à la survie en mesurant le diamètre racinaire après maturation des graines. Une racine trop grêle entraînera la mort de l'individu au cours de l'hiver, même si la plante végétait encore en automne. Les mesures de diamètre racinaire prises en fin d'été révèlent certaines valeurs très faibles (Fig. IV-21). Ces valeurs extrêmes (quelques millimètres seulement) indiquent en fait que la plante était déjà morte ou mourante et que sa racine était en train de sécher.

IV-4.6 Niveau de ploïdie

Les montaisons variétales sont capables de produire des graines en conditions "naturelles" (en champs): nous en avons récolté. En l'absence d'introduction d'hybrides lors du semis, la mise en place de mauvaises herbes à partir de la descendance de ces montaisons variétales triploïdes n'est pas exclue. Toutefois, les paragraphes précédents ont souligné que cette descendance était moins performante que celle des hybrides. Nous avons analysé des individus issus des glomérules récoltés en champ sur des montaisons variétales (triploïdes) ainsi que sur des descendances de croisements contrôlés (expérimentation "*croisements contrôlés MH*"). Nous nous sommes aussi intéressés au niveau de ploïdie de ces descendances. Les résultats montrent que:

²⁸ Une étude a récemment montré l'existence d'une forte corrélation entre la somme cumulée des ramifications et la quantité de graines produites chez les betteraves mauvaises herbes (Darmency *et al.* 1998a).

²⁹ Pluviométrie automnale 3 fois plus forte que la moyenne des 30 dernières années, après une période d'insolation 40% moins importante.

Tableau IV-8. Détail de quelques traits de la descendance de montaisons du rang en fonction du niveau de ploïdie de la mère (Champ PPpro).

Champ PPpro Descendance de:	N	Germination		Floraison	Diam. Tige	Haut.	Nb. ramif.	Diam. Racinaire (mm)	
		taux	Précocité (jours)	taux	(mm)	(cm)		Plante fleurie	non fleurie
Montaison variétale	24	42.1 %	6.1	42 %	7.6	87.3	2.9	19.8	20.3
Hybride	29	80.0 %	6.9	62 %	10.3	102.6	4.5	32.5	20.5

Tableau IV-9. Détail du niveau de ploïdie et observations des descendance de montaisons du rang

Type de croisement contrôlé	individus croisés (en grisé si triploïdes)	Traits observés sur la descendance								
		Taux de germi- nation	Ploïdie		Montaison sans vernalisation		Taux de mont. observé	effectif non monté	effectif monté	
			2n	3n	allèles B,b de la mère	allèles B,b du père				taux de montaison attendu
Mont. var. x Mont. var.	DGRU2	52 %	6	4	bb	bb	0 %	56 %	4	5
	DGRU3	40 %	1	0	bb	bb	0 %	0	1	0
	DGRU6	47 %	5	1	bb	bb	0 %	67 %	2	4
	DGRU10	04 %	0	1	bb	bb	0 %	0	1	0
Mont. var x Hybride	POMP1	33 %	3	1	bb	bb ou Bb	0 à 50 %	0	3	0
	POMP4	64 %	10	0	Bb	bb ou Bb	50 à 75 %	50 %	4	4
	POMP6	96 %	5	0	Bb	bb ou Bb	50 à 75 %	60 %	2	3
	POMP7	100 %	5	0	Bb	bb ou Bb	50 à 75 %	60 %	2	3
	POMP2	40 %	4	1	bb	bb ou Bb	0 à 50 %	50 %	2	2
	POMP3	20 %			Bb	bb ou Bb	50 à 75 %	/	/	/
	POMP5	96 %	5	0	Bb	bb ou Bb	50 à 75 %	20 %	4	1
Hybride x Hybride	LEZ2	80 %			Bb	Bb	75 %	60 %	2	3
	LEZ6	72 %			Bb	Bb	75 %	40 %	3	2
	LEZ1	100 %			Bb	Bb	75 %	100 %	0	5
	LEZ4	100 %			Bb	Bb	75 %	80 %	1	4
	LEZ7	84 %			Bb	Bb	75 %	40 %	3	2
	WATT1	70 %			Bb	Bb	75 %	100 %	0	6
	WATT3	16 %			Bb	Bb	75 %	100 %	0	4
WATT4	84 %			Bb	Bb	75 %	100 %	0	7	
WATT6	60 %			Bb	Bb	75 %	100 %	0	3	
Descendance de mont. var. champ PPpro	PP48	48 %	3	0	bb		< 50%	80 %	1	4
	PP51		0	2	bb		< 50%	/	/	/
	PP54	67 %	3	0	bb		< 50%	20 %	4	1
	PP56	36 %	5	1	bb		< 50%	50 %	3	3
	PP57	24 %	3	1	bb		< 50%	40 %	3	2
	PP58	60 %	1	0	bb		< 50%	33 %	2	1
Descendance D'hybrides	LEZ46	04 %	1	0	Bb		50 à 100 %	/	0	1
	LEZ47	44 %	1	0	Bb		50 à 100 %	100 %	0	4

- La descendance des montaisons variétales présente une mortalité précoce élevée (Fig. IV-22).

-Une partie de la descendance des montaisons variétales peut fleurir.

-Le taux de floraison observé pour les deux catégories de montaison du rang est parfois supérieur au taux attendu. Cependant, les effectifs observés sont faibles. De plus, des floraisons sont observées pour les descendance de montaisons variétales croisées en serre entre elles (taux attendu = 0%). Il est donc vraisemblable que le croisement fut mal conduit et que du pollen 'B' a parasité l'expérience. Cela soulignerait le caractère faiblement compétitif du pollen produit par les montaisons variétales

-Le tableau IV-8 est particulièrement intéressant car il compare deux catégories de montaisons du rang provenant du même champ 'Pppro'. Ce champ de superficie réduite (< 1ha; une dizaine de montaisons seulement) se trouvait à 100 m environ du champ 'PPTS', entièrement couvert de mauvaises herbes et donc susceptible d'émettre un important nuage pollinique contenant majoritairement 'B'³⁰. Or, les résultats du champ 'Pppro' montrent que le pollen impliqué lors des fécondations a surtout été du pollen provenant de génotypes 'bb' et 'Bb', car sinon les taux de montaison seraient très supérieurs à ceux observés. **Il semble donc que le pollen n'ait pas voyagé autant qu'on aurait pu le postuler pour une espèce anémophile** et que les individus 'BB' du champ 'PPTS' voisin aient peu ou pas participé à la fécondation du champs 'Pppro'.

- On trouve des individus triploïdes³¹ dans la descendance des montaisons variétales, que ces dernières soient croisées par d'autre montaisons variétales ou par des hybrides. Cela est vrai en conditions contrôlées mais aussi en pollinisation ouverte en champ (Tableau IV-9). Des gamètes femelles diploïdes sont donc produits. Il est d'ailleurs possible que le taux de graines triploïdes formées soit plus important que la valeur observée mais que ces graines ne germent pas (cf. le faible taux de germination des descendants de montaison variétale): on sait par exemple que, lors de la multiplication des semences, les individus tétraploïdes produisent une part de grains de pollen aneuploïdes (Alcaraz *et al.* 1998b) pouvant éventuellement assurer la fécondation des portes-graines diploïdes mais donnant finalement des semences aneutriploïdes ayant une faculté germinative moindre (Bosemark, 1966 in Alcaraz *et al.* 1998a). Inversement, nous n'avons pas vu de triploïdes dans la descendance des hybrides alors que ces derniers étaient susceptibles d'avoir été pollinisés par des montaisons variétales ; soit qu'il n'y ait pas de gamètes mâles diploïdes formés, soit qu'ils soient inefficaces en compétition avec des gamètes haploïdes.

³⁰ Le champ est certainement "ancien" car il est très infesté, donc les allèles 'b' y ont été partiellement purgés par disparition récurrente des individus 'bb' qui sont sans descendance au moment du labour.

³¹ Triploïdes ou ...aneuploïdes, ce que nous ne pouvons pas vérifier étant donné l'imprécision de notre méthode d'investigation, basée sur une corrélation ploïdie-nombre de chloroplastes stomatiques.

Tableau IV-10. Mitotypes des betteraves montées

Type de montaison	Population	Mitotype			total
		Sv	Nv	C	
Montaisons variétales	4CANT	14			14
	CYS	2			2
	PPpro	3			3
Montaisons Du rang	4CANT	31			31
	CYS	14			14
	LEZ	7			7
	VOY	4			4
	WATT	4			4
Mauvaises herbes	4CANT	22			22
	BUG	5			5
	CHA	1			1
	CYS	9			9
	ESQ	4	3	1	8
	GOU	3	1	1	5
	JUST	7	1		8
	LAON	4			4
	LER	13			13
	QUEN	1			1
	POU	7			7
	PPMS	4			4
	PPTS	4			4
PPR	5			5	
		168	5	2	175

Tableau IV-11 Association entre les deux haplotypes cytoplasmiques:

	Association mitotype - chlorotype			total
	Sv-VI	Nv-V	C-XI	
Effectif analysé	72	5	1	78

IV-5 Analyse génétique

Une double approche a été menée avec des marqueurs à hérédité maternelle (transmis via les graines) et des marqueurs nucléaires à hérédité biparentale.

Du fait de même de leur origine, les betteraves mauvaises herbes doivent avoir le **type cytoplasmique 'Sv'** caractéristique des betteraves sucrières portes-graines (Fig. IV-1&2). D'autre part, retrouve t-on par l'analyse avec des **marqueurs moléculaires nucléaires** les postulats énoncés en début de paragraphe sur la genèse des différentes montaisons? C'est à dire: (i) les montaisons variétales doivent être génétiquement comparables aux témoins (sucrières non montées) ; (ii) les hybrides doivent partager la moitié de leur génotype avec les sucrières, puisqu'elles ont la même mère (i.e. les portes-graines cultivés du Sud-ouest) ; (iii) les mauvaises herbes hors du rang seront d'autant plus différentes des hybrides présents lors de l'échantillonnage qu'il y aura eu de variétés différentes de sucrières dans le champ et qu'il y aura eu d'épisode d'introduction d'hybrides ayant eu des pères sauvages différents.

IV-5.1 Variabilité génétique cytoplasmique

La majorité des mauvaises herbes a bien le mitotype Sv (Tableau IV-10). Cependant, quelques champs montrent aussi des plantes de type Nv ou C, présentes conjointement dans le même champ. Un résultat similaire obtenu de façon indépendante avait déjà été observé (Boudry 1994). Le mitotype Nv est un mitotype fréquent dans les populations naturelles (chap. 1 et 3) ; c'est aussi celui de la lignée paternelle lors de la fabrication des semences. On ne peut pas exclure que certains pieds de pollinisateurs échappent à la destruction, soient récoltés comme des portes-graines et que certains de leurs glomérules, bien que multigermes, ne soient pas écartés lors du tri granulométrique de préparation des semences. Cette hypothèse est cependant peu plausible car on devrait alors rencontrer ce mitotype pour toutes les provenances géographiques. D'autre part, cette hypothèse n'explique pas la présence du mitotype C. Il faut noter que ce dernier, rarement observé chez les mauvaises herbes, est toujours présent dans des champs où 'Nv' intervient. Or, l'haplotype C est identique à 'Nv' pour deux des trois sondes mitochondriales utilisées pour sa définition (voir annexe 1). Nous ne pouvions donc pas écarter, *a priori*, la possibilité qu'il s'agisse d'un variant proche de 'Nv', qui serait dérivé de ce dernier par recombinaison intra-génomique du génome mitochondrial. L'analyse conjointe des mitotypes et chlorotypes (chap. 1) a permis de réfuter cette hypothèse et de prouver que les individus porteurs du mitotype 'C' sont arrivés par "migration" et non par "mutation" de 'Nv': le type 'C' de l'un des individus observés (sinon des deux) est en effet associé au chlorotype XI, qui est aussi le chlorotype associé aux mitotypes C rencontrés dans les populations littorales du Nord (Tableau IV-11). En revanche, les mitotypes Nv sont associés au chlorotype V. Il est par conséquent plutôt envisageable que la présence de mauvaises herbes 'Nv' et 'C' remonte à l'utilisation ancienne – et géographiquement limitée – de variétés 'non Sv' aujourd'hui

Tableau IV-12. Matériel disponible pour l'expérimentation "détail-genet-champ"

Champ	Effectif prélevé et analysé pour le niveau de ploïdie			effectif final par catégorie et effectif avec ADN disponible (entre parenthèses)			
	Rang	Hors rang	Témoins variétaux	Témoins variétaux	Montaisons variétales	Hybrides	Mauvaises herbes
4CANT	59	32	24	24 (24)	14 (14)	45 (33)	32 (24)
CYS	44	12	12	12 (12)	4 (4)	40 (26)	12 (12)

Tableau IV-13. Diversité génétique pour les betteraves montées intra-champ (Champ 4CANT). Loci nucléaires RFLP 851, 766 et 853

	N	A (nb allèles par locus)			<i>He</i>
		851	766	853	
Témoins variétés	24	4	1	4	0.726
Montaisons variétales	13	4	1	4	0.834
Hybrides	29	5	2	5	0.874
Mauvaises herbes	19	3	2	3	0.890

disparues (l'utilisation de 'Sv' ne date que d'une quarantaine d'année). Les anciennes variétés "populations" sont en effet susceptibles d'avoir été construites sur des cytoplasmes divers, représentatifs de ceux rencontrés chez les betteraves littorales. De fait, les sucrières sont dérivées des betteraves littorales et des croisements par ces dernières ont été conduits à plusieurs reprises lors de l'élaboration des variétés cultivées (annexe 1). La présence de cytoplasmes 'non Sv' des dizaines d'année après l'arrêt de leur utilisation montre à quel point certains génotypes de mauvaises herbes peuvent perdurer dans l'agrosystème. Une autre hypothèse non exclusive de la précédente implique la culture de betteraves fourragères (assez fréquente), dont on connaît également mal les cytoplasmes des anciennes variétés.

Finalement, le mode d'apparition des mauvaises herbes en champ par introduction d'individus hybrides cultivées-sauvages issus de la multiplication des semences n'est pas remis en cause par notre étude avec des marqueurs cytoplasmiques.

IV-5.1 Variabilité génétique nucléaire

Une première analyse génétique (cf. chap. 2) a été conduite sur un échantillon de mauvaises herbes pour comparer les différents groupes de betteraves entre eux (cultivées, littorales, rudérales, mauvaises herbes...).

Une autre analyse, plus fine, a ensuite concerné les mauvaises herbes de différentes catégories d'un même champ pour quantifier précisément le polymorphisme intra-variétal (sucrières), intra-hybrides, intra- mauvaises herbes hors rang et inter-catégories:

Expérimentation "détail-genet-champ". Matériel: deux champs proches du laboratoire: 4CANT (Villeneuve d'Ascq) et CYS (Cysoing). Méthode: échantillonnage de feuilles de témoins de la variété du champ, de montaisons variétales, d'hybrides et de mauvaises herbes. Détermination du niveau de ploïdie au laboratoire et extraction d'ADN d'une partie des individus. Analyse avec marqueurs moléculaires. Le matériel disponible en fin d'expérimentation est décrit tableau IV-12.

Les résultats de cette étude sont actuellement en cours d'acquisition, avec de nouveau loci microsatellites disponibles seulement depuis peu. Quelques résultats très préliminaires existent cependant: j'ai utilisé pour quelques individus du champ 4CANT trois loci nucléaires (RFLP *Southern*) sur les membranes ayant servi à l'analyse des mitotypes. Il s'avère (Tableau IV-13) que les quatre groupes de betteraves sont fortement polymorphes. La variance totale est rencontrée pour 99.2% à l'intérieur des groupes (procédure AMOVA de ARLEQUIN, Schneider *et al.* 1997). Aucune valeur de F_{st} (F_{st} calculés deux à deux) entre ces groupes de betteraves n'est significativement différente de zéro. Les tests exacts de différenciation entre groupes opposent cependant les témoins de la variété avec les hybrides et les mauvaises herbes ($P < 0.05$), ce qui va dans le sens de nos hypothèses. L'analyse doit être poursuivie avec un grand nombre de loci, de façon notamment à examiner les différences éventuelles entre montaisons variétales et témoins de la variété.

Remarque: la grande variabilité rencontrée pour la même variété de sucrière n'est pas surprenante: les variétés sont examinées avant leur inscription au catalogue et doivent satisfaire aux critères de DHS: Distinction, Homogénéité, Stabilité (Defalque & Guyot 1987) mais la variabilité intra-variétale est forte, de l'avis même des sélectionneurs. Une étude moléculaire par AFLP a été conduite récemment sur 15 variétés, analysées lors de trois années consécutives (Van Den Broecke *et al.* 1998). Les résultats de l'AMOVA (Analyse Moléculaire de la Variance) ont montré que: (i) *Distinction*: 89.8% de la variance totale est intra-variétale. (ii) *Homogénéité*: elle est plutôt moyenne, avec des valeurs très variables selon les variétés. (iii) *Stabilité*: le pourcentage de variation totale imputé à la variation entre les années va de 16.9 à 31.4%.

IV-6 Discussion - conclusion

IV-6.1 Domestication et syndrome de mauvaises herbes

Le syndrome de domestication des montaisons du rang est très fort. On ne peut d'ailleurs pas distinguer visuellement les montaisons variétales d'origine cultivée d'avec les hybrides dont la moitié du génome est pourtant d'origine "sauvage". Les descendances de ces deux catégories sont cependant très différentes. Les montaisons variétales produisent peu de glomérules, qui germent mal et donnent des individus – parfois triploïdes sinon aneuploïdes - dont le taux de mortalité est élevé. Le taux de montaison des survivants est faible. En revanche, le taux de germination de la descendance des hybrides est très supérieur et la mortalité moins forte.

Les mauvaises herbes ont perdu les traits majeurs du syndrome de domestication. La forte précocité de germination s'estompe et la fréquence de certains caractères purement domestiques (*e.g.* l'hypocotyle vert) diminue fortement. La taille de la hampe florale diminue, les glomérules contiennent plusieurs graines, qui sont capables pour la plupart de germer. Les mauvaises herbes allouent davantage de ressource à la reproduction qu'à la survie et évoluent vers l'annualité, comme en témoigne un diamètre racinaire très réduit (voire une mortalité en fin de maturation des graines). Au cours de l'évolution de la descendance des montaisons du rang vers des mauvaises herbes de plus en plus "anciennes", le taux de montaison augmente fortement.

Nos observations confirment que l'attribut majeur des betteraves mauvaises herbes qui leur confère un succès remarquable dans leur environnement est la floraison sans vernalisation. On sait que la biologie des mauvaises herbes est adaptée aux méthodes culturales de la région considérée (Ul'janova 1997). Ici, l'adaptation est spécifique à la culture en question: l'absence de potentiel "agressif" et de dispositions pour la compétition rend la betterave mauvaise herbe inapte ailleurs que lors de la culture de sucrières (où elle est protégée de la compétition inter-spécifique). Il semble réaliste de considérer que le syndrome de mauvaise herbe en général est un caractère multi-attribut et que l'addition d'un seul gène est peu susceptible de transformer une espèce domestiquée en mauvaise herbe. Il n'y aurait pas d'ailleurs de cas de réversion complète de plantes cultivées

ayant perdu tous les caractères domestiques, notamment lorsque la domestication date de plusieurs millénaires. Cependant, si le degré de domestication est faible, des modifications majeures sont envisageables sur la base d'une seule mutation (exemples dans Bartsch *et al.* 1993). On sait aussi que l'adaptation aux habitats extrêmes (comme l'agrosystème) peut être réalisée à travers peu de mutations ayant de grands effets phénotypiques. Par exemple, quelques gènes associés à des QTLs peuvent avoir de grands effets sur l'architecture de la plante, sa phénologie, la dispersion et la dormance des graines, la taille des graines ou des fruits (e.g. Koinange *et al.* 1996; Poncet *et al.* 1998). Ainsi, la betterave mauvaise herbe propose un exemple de "gène *mauvaise herbe*³²": l'allèle 'B' modifie de façon drastique le comportement d'une plante cultivée (Ammann *et al.* 1997), tandis que les autres attributs des betteraves rudérales ne semblent pas exploités par les betteraves mauvaises herbes.

IV-6.2 Entrée des migrants dans l'agrosystème

Nos comptages en champs indiquent que l'apparition de montaisons dans le rang est récurrente. Les mauvaises herbes ne sont donc pas issues de rares évènements de montaisons dans le rang. Au contraire, de nouveaux allèles peuvent être introduits dans l'ensemble génétique des mauvaises herbes à chaque culture, à partir des variétés qui se succèdent et des différents hybrides (qui ont des contributions paternelles rudérales variables). On peut donc retrouver chez les mauvaises herbes d'une même parcelle une partie de "l'historique" du champ (cf. le grand nombre - relatif - d'allèles rencontré chez les mauvaises herbes). Cette récurrence semble confirmée par le taux de betteraves montées chez les mauvaises herbes, qui est inférieur à celui attendu et qui pourrait résulter d'une entrée fréquente d'allèles b. Ce dernier point reste toutefois assez spéculatif, car un avantage aux individus Bb pourrait aussi expliquer la relativement forte fréquence de b chez les mauvaises herbes. Cette ambiguïté souligne la nécessité d'un marqueur moléculaire de B qui pourrait permettre de discriminer les individus Bb et BB.

IV-6.3 Dispersion des gènes

Le nombre considérable de glomérules produits est à prendre en compte: chez les mauvaises herbes en général, toute absence de contrôle lors d'une culture se paye par une augmentation de la banque de graines. Les glomérules produits dans un champ restent sur place, puisque ces petits fruits secs n'ont aucun dispositif adapté pour l'anémochorie et ne sont pas consommés par les animaux³³. Cela permet d'ailleurs qu'un champs entièrement infesté de mauvaises herbes puisse jouxter un champ propre sans conséquence fâcheuse pour ce dernier. La dispersion des glomérules dans l'espace est donc faible. Leur seul déplacement spatial est une légère dispersion horizontale lors de la préparation du sol et verticale lors des labours.

³² "weediness gene"

³³ sauf parfois par les campagnols (ITB Com. Pers.)

L'enfouissement des glomérules bloque la germination, qui peut avoir lieu des dizaines d'années plus tard lorsque le glomérule est remonté. L'étude de la diversité génétique enfouie sous forme de banque pourrait permettre de quantifier la variabilité cumulée (dans le temps) d'une parcelle donnée (Il existe des méthodes adaptées permettant de traiter de grands volumes de sol par tamisage et lavage, voir Cardina & Sparrow 1996; Ter Heerd *et al.* 1996).

Le pollen en revanche est susceptible de sortir de la parcelle. Nos investigations au moyen de marqueurs moléculaires sont restées limitées et ne nous permettent pas de quantifier précisément les flux de gènes inter-champs. Nous avons proposé sur la base d'observations indirectes qu'il n'y avait pas de forts nuages polliniques qui s'échangeaient entre champs, même proches. A l'encontre de cette hypothèse, nous avons observé que les montaisons du rang sont (allo)fécondées alors qu'elles sont peu nombreuses dans le champ et distantes de plusieurs dizaines de mètres. Soit le vent suffit à la pollinisation, même en cas de pollen "limitant" ; soit il faut envisager une entomophilie accessoire (cf. les nombreuses mouches syrphoïdes que nous avons observé). Une telle possibilité a déjà été évoquée par certains auteurs (Archimovitch 1950; Free *et al.* 1975; Darmency *et al.* 1998a).

- Chapitre 5 -

**Contribution à l'étude de l'incidence des betteraves sucrières transgéniques
lors de la multiplication des semences et de la culture des betteraves sucrières**

**Chap. 5 - Contribution à l'étude de l'incidence des betteraves sucrières transgéniques
lors de la multiplication des semences et de la culture des betteraves sucrières**

V-1 Généralités sur les risques liés aux plantes transgéniques

De nombreuses espèces cultivées sont dorénavant disponibles en version transgénique (revue dans Snow & Palma 1997). La prise en compte du risque lié à l'utilisation de plantes transgéniques est nécessaire avant toute commercialisation (e.g. Dale *et al.* 1993). L'hybridation entre les cultivées et leurs apparentées sauvages est présentée comme le risque principal (Tiedje *et al.* 1989; Raybould & Gray 1993; Rissler & Mellon 1996), puisqu'elle offrirait ainsi au transgène la possibilité de quitter le compartiment cultivé (il en serait de même si la culture redevenait sauvage). La fuite de (trans)gènes dépend de nombreux facteurs: proximité d'apparentés compatibles, valeur sélective des hybrides, système de reproduction et mode de pollinisation, mode de dispersion des graines et valeur sélective conférée par le transgène. De façon schématique, l'appréciation du risque s'appuie sur deux points (Van Raamsdonk & Schouten 1997):

- (i) la probabilité que le transgène s'échappe du compartiment cultivé.
- (ii) la probabilité que le transgène s'établisse dans les communautés naturelles ou semi-naturelles avec, en corollaire de ce dernier point, l'impact de cet établissement.

N.B.: il est plus facile de mesurer ou de modéliser la dispersion d'un transgène que de prédire ses conséquences (Raybould 1999). Les processus écologiques et évolutifs sont complexes, de sorte que déduire les risques existants et décider comment les mesurer sont des tâches difficiles (Williamson 1993).

V-1.1 Fuite du transgène

La dispersion des gènes est probablement identique qu'il s'agisse ou non de transgènes (Raybould & Gray 1993): les croisements entre variétés cultivées OGMs et apparentées sauvages sont aussi efficaces qu'en absence de transgènes (mais voir Bergelson *et al.* 1998). La probabilité de fuite peut donc être déduite indirectement par des études de flux géniques classiques, sans utilisation du transgène (Raybould & Gray 1993; Ford-Lloyd 1998). Parallèlement, la mise en place d'essais contrôlés avec des variétés transgéniques peut parfois fournir des informations facilement, en utilisant par exemple la résistance aux herbicides comme marqueur (e.g. Paul *et al.* 1995; Conner & Dale 1996; Darmency *et al.* 1998a).

Les conditions minimales pour qu'une hybridation ait lieu imposent que les plantes disposent d'un mode de transport du pollen, soient compatibles et fleurissent en même temps (Dale 1992). De fait, les hybridations spontanées entre espèces cultivées et sauvages sont nombreuses et plus fréquentes que prévu initialement (Arriola & Ellstrand 1997). Elles concernent la plupart des

cultures majeures (Hancock *et al.* 1996; Ellstrand in press). De nombreux cas d'hybridations spontanées inter-génériques (Lefol *et al.* 1995; Lefol *et al.* 1996a; Lefol *et al.* 1997; Darmency *et al.* 1998b), inter-spécifiques (e.g. Arriola & Ellstrand 1996; Chèvre *et al.* 1998) ou intra-spécifiques (Linder *et al.* 1998) impliquant des cultures sont rapportés (revue partielle dans Snow & Palma 1997). La présence de partenaires sexuels compatibles est variable selon la zone géographique considérée: le maïs n'a aucun apparenté sauvage dans l'ancien monde, ce qui n'est pas le cas au Mexique (Doebley 1990). La pomme de terre semble ne pas pouvoir s'hybrider avec les *Solanum* sauvages européens (Dale 1992). Cependant, il faut se garder de considérations simplistes: les flux géniques sont variables en fonction des conditions locales (exemple dans Langevin *et al.* 1990) et leur étude n'est jamais superflue, surtout pour des taxons qui montrent en général peu de propension à s'hybrider. En revanche, beaucoup d'hybridations en Europe concernent le colza avec de nombreux taxons congénériques ou conspécifiques (Lefol *et al.* 1997; Metz *et al.* 1997), mais d'autres espèces sont concernées (e.g. Luby & McNicol 1995), dont la betterave (Bartsch *et al.* 1993). Le rendement de ces hybridations et le succès reproducteur des hybrides sont variables (e.g. Zemetra *et al.* 1998). Le succès reproducteur des hybrides est généralement faible et pourrait limiter le transfert des gènes (Eber *et al.* 1994; Lefol *et al.* 1996b; Lefol *et al.* 1997).

Les deux vecteurs possibles pour la dispersion des gènes sont les graines et le pollen, qui diffèrent notablement par leur capacité de dispersion et leur contenu génétique (les graines permettent l'établissement de nouvelles plantes tandis que le pollen ne permet un transfert qu'en présence d'un receveur). Le pollen est le vecteur principal de passage des gènes de plantes cultivées vers le compartiment sauvage (Ellstrand & Hoffman 1990; Klinger *et al.* 1992; Van Raamsdonk 1995). Mais il existe aussi un passage de pollen depuis le compartiment sauvage vers le compartiment cultivé (Darmency *et al.* 1992; Eber *et al.* 1994). Les études de dispersion de pollen ont d'abord été entreprises pour déterminer les distances d'isolement requises pour produire les variétés (voir Boucherie & Broucqsault 1997). Actuellement, la plupart des études sur les OGMs considèrent ce vecteur (Tiedje *et al.* 1989; Dale 1992; Rissler & Mellon 1996; Giddings *et al.* 1997b; Giddings *et al.* 1997a; Garcia *et al.* 1998). Le vent et les insectes peuvent transporter du pollen très loin de la source: les distances de dispersion sont potentiellement très grandes (e.g. Campbell *et al.* 1999). En règle générale, la plupart des grains de pollen des espèces anémophiles ne dépasse pas quelques mètres à partir de la source, mais la queue de cette distribution est très longue et de longueur incertaine (Hancock *et al.* 1996). La proportion de pollen dispersé à longue distance a plutôt tendance à être sous-estimée (Lavigne *et al.* 1998). La décroissance de la quantité de pollen avec la distance ne doit pas faire minimiser les risques d'introgression avec des apparentés sauvages: si ces derniers sont présents, l'hybridation aura lieu (Ellstrand & Hoffman 1990). Parallèlement, la dispersion possible des transgènes par les graines est beaucoup moins

étudiée (Hancock *et al.* 1996; Van Raamsdonk & Schouten 1997). Peut-être parce que les graines sont récoltées pour la majorité des cultures, ce qui se solde par un flux quasi unidirectionnel, pollinique, venant de la culture (Langevin *et al.* 1990). Pourtant, les graines ont une importance considérable dans l'étude des flux géniques car la dormance et les banques de graines amènent une dispersion temporelle en plus de la dispersion spatiale (Dale 1994; Linder & Schmitt 1994; Landbo & Jorgensen 1997): les effets d'un transgène pourraient donc apparaître des années après sa dispersion (à l'opposé, la viabilité des grains de pollen dépasse rarement quelques jours (Masood 1998)).

V-1.2 Etablissement du transgène hors de la culture

Les grandes possibilités d'hybridation entre cultures et apparentées sauvages rendent la fuite de transgènes inévitable (Ellstrand & Hoffman 1990): les transgènes finiront le plus souvent par s'établir hors de l'OGM de départ. Des études récentes montrent d'ailleurs la persistance "d'allèles cultivés" dans les populations sauvages proches des cultures: par exemple chez le tournesol (e.g. Whitton *et al.* 1997; Linder *et al.* 1998) ou le sorgho (Arriola & Ellstrand 1997). Le maintien possible de ces traits (neutres ou avantageux) laisse prédire que des traits modifiés génétiquement persisteront tout autant (Mikkelsen *et al.* 1996). Aussi, de nombreux auteurs proposent de se concentrer plutôt sur l'impact de ces fuites (Kareiva *et al.* 1994). La question cruciale n'est donc pas "les transgènes vont-ils s'échapper ?" mais "quelle est l'incidence de ces transgènes dans les communautés naturelles ou semi-naturelles ?" (Williamson 1993; Hancock *et al.* 1996). Les craintes sont multiples et concernent par exemple: l'érosion génétique dans les centres de diversités, source de gènes pour les sélectionneurs (e.g. King & Ferris 1998) ; la "pollution génétique" des communautés sauvages (Gray & Raybould 1998; Raybould 1999), voire leur extinction (Ellstrand in press); la modification de l'équilibre naturel des écosystèmes par augmentation de la valeur sélective des apparentées sauvages (Ellstrand & Hoffman 1990; Raybould & Gray 1993; Rissler & Mellon 1996).

L'attention se porte actuellement sur la création possible de "super mauvaises herbes", à partir de la culture ou de mauvaises herbes déjà présentes, à l'intérieur ou à l'extérieur de l'agrosystème (Keeler 1989; Rissler & Mellon 1996; Purrington & Bergelson 1997; Snow & Palma 1997; Kling 1998). De même, les exemples d'invasion imprévisibles par des taxons non transgéniques sont suffisamment nombreux (Andow 1994; Williamson 1994; Williamson & Fitter 1996) pour que les OGMs soient aussi suspectés de pouvoir conduire à des "pestes" invasives (Dale 1992; Williamson 1994). Ce dernier cas pourrait se produire en cas de modification du caractère "agressif" de la plante introgressée, même si cette modification n'est pas immédiatement consécutive à la fuite du transgène (Williamson 1993). Notons que, en parallèle des études centrées

sur les risques écologiques, un intérêt émerge pour la prise en compte d'éventuelles retombées agronomiques *sensu-stricto* (Masood 1998; Raybould 1999).

La sélection est un facteur important dans la probabilité du maintien ou de l'envahissement d'un gène dans une population (Crawley *et al.* 1993; Raybould & Gray 1993; Van Raamsdonk & Schouten 1997). Le point clé se situe donc dans la modification de la valeur sélective conférée par le transgène à la plante recevant le trait manipulé (e.g. Raybould & Gray 1994; Bartsch *et al.* 1996a). De nombreux traits reliés à la valeur sélective peuvent être affectés par l'expression d'un transgène (Dale 1994) et affecter la survie et la fécondité des hybrides. Le transgène considéré peut lui même conférer directement un avantage sélectif, mais la valeur sélective pourrait aussi augmenter par des interactions épistatiques entre transgène et gènes "natifs" (Keeler 1989; Rissler & Mellon 1996). D'autre part, certains phénotypes transgéniques ont des équivalents dans les espèces cultivées et sauvages et peuvent être avantageux dans les communautés naturelles (e.g. résistance à la sécheresse) tandis que d'autres sont complètement nouveaux et sont présents seulement dans les plantes fortement sélectionnées par homme, comme la résistance aux herbicides (Raybould & Gray 1994). La réflexion au cas par cas s'impose (Timmons *et al.* 1996): pour une espèce manipulée donnée, les conséquences seront très différentes selon le transgène en cause. Parker et Bartsch (1996) ont souligné l'importance de regarder des traits ayant une incidence écologique lors des études d'impact d'OGMs. Un transgène conférant un avantage pour la plante sous une pression de sélection effectivement exercée dans le milieu peut conduire à une augmentation de la valeur sélective des plantes ayant reçu le transgène (e.g. Bartsch *et al.* 1996b; Stewart *et al.* 1997). En l'absence de pression de sélection agissant directement sur le trait conféré par le transgène, l'acquisition du transgène peut être neutre en terme de valeur sélective (e.g. Lavigne *et al.* 1995) ou au contraire avoir un coût (Purrington & Bergelson 1997). Ce coût est variable en fonction du niveau des contraintes exercées sur la plante (par exemple la compétition, voir Reboud 1992). Il faut noter cependant que les études expérimentales pointant les succès relatifs d'OGMs *versus* non-OGMs sont fortement dépendantes de variations environnementales et nécessiteraient d'être poursuivies sur plusieurs années et de nombreux sites (Kareiva *et al.* 1996). En l'absence d'avantages adaptatifs, un trait génétiquement modifié ne persistera pas dans les communautés naturelles. Toutefois, même si le transgène s'accompagne d'une légère baisse de valeur sélective, la disparition de la population prendra de nombreuses générations. D'autre part, un désavantage sélectif faible peut être compensé par des flux récurrents ou de la dérive génétique (Van Raamsdonk & Schouten 1997): en cas de taux de migration fort, des (trans)gènes désavantageux peuvent s'implanter si les populations réceptrices sont petites (Slatkin 1987; Gliddon 1994). D'autre part, un gène domestique conférant une forte valeur adaptative peut-être accompagné d'un cortège de gènes domestiques pouvant avoir un effet négatif sur la valeur

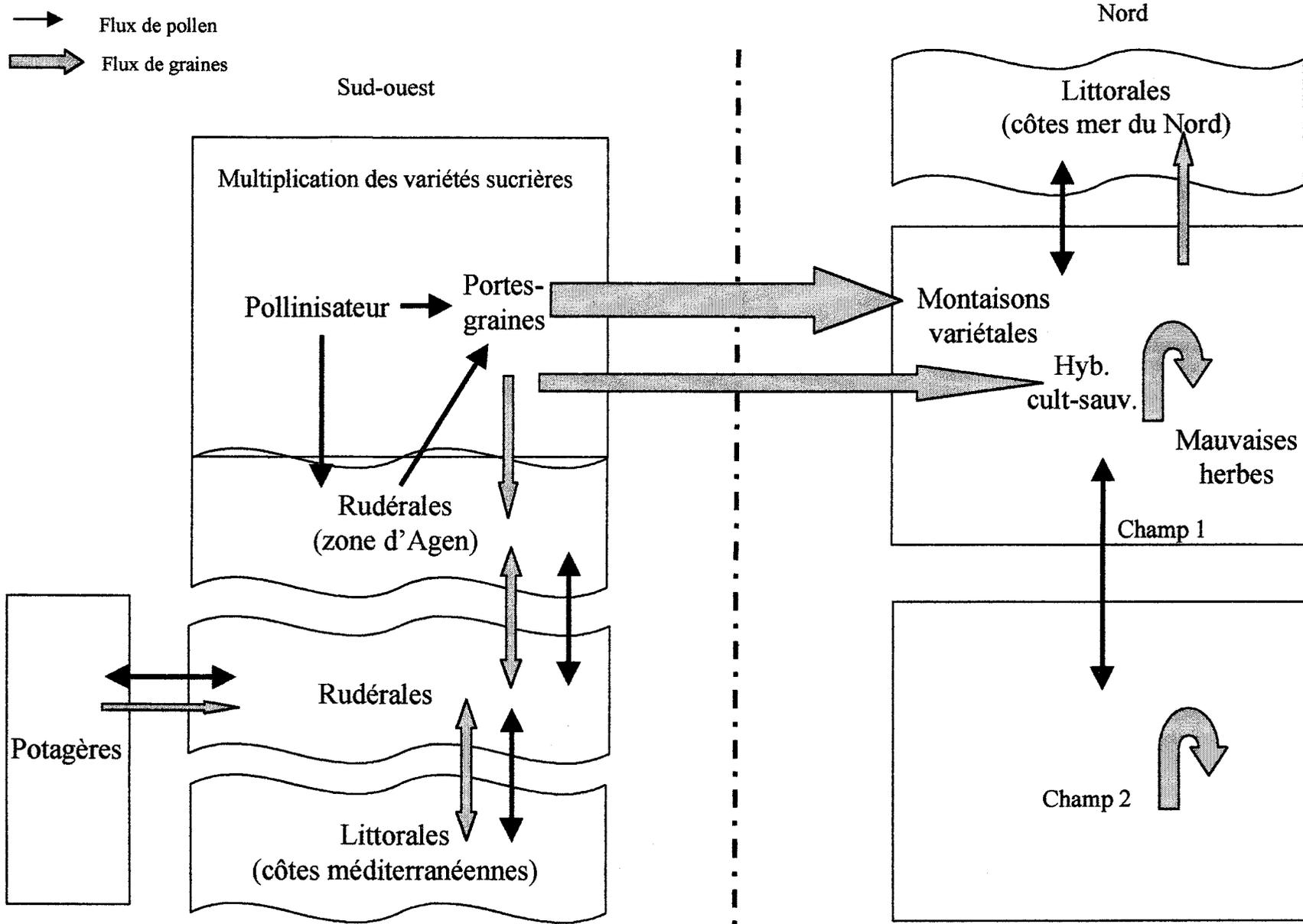
sélective (Dale 1994; Regal 1994). Mais des back-cross répétés peuvent entraîner une introgression du transgène dans la forme mauvaise herbe ou sauvage tandis que les traits agronomiques "maladaptatifs" sont éliminés par le jeu des recombinaisons, de la ségrégation et de la sélection naturelle (Kareiva *et al.* 1994; Regal 1994).

V-2 Le cas de la betterave

L'espèce est allogame et principalement anémophile, deux caractéristiques laissant supposer une dispersion du pollen à longue distance (modèle explicatif de type exponentielle négative, voir Van Raamsdonk & Schouten 1997). De nombreux auteurs ont mesuré des pourcentages d'hybridation non négligeables à plusieurs centaines de mètre de la source pollinique (revue dans Boucherie & Nardi 1999). Néanmoins, certaines études ne rapportent qu'un faible taux de formation d'hybrides à 75 m (voir Van Raamsdonk & Schouten 1997), ce qui est peu pour une espèce anémophile. Cela montre la nécessité de prendre en compte les conditions expérimentales et les quantités relatives de donneurs et receveurs (il semble aussi important de calculer la baisse du taux d'hybridation en fonction de la distance plutôt que le taux absolu à une distance donnée, Kareiva *et al.* 1994). Des études anciennes font état de pollen viable à plusieurs milliers de mètres en altitude (Meier & Artschwager 1938), ce qui laisse présager un transport à longue distance, bien que le pollen de betterave soit particulièrement fragile (Alcaraz *et al.* 1998a). D'autres auteurs mentionnent des cas de transport de pollen viable au delà de 1000 m par le vent (cité par Kapteijns 1993) et même de 3200 m (cité par Raybould & Gray 1993). De fait les distances d'isolement requises pour la multiplication de la betterave sont plutôt grandes (1000 m) par rapport autres espèces cultivées. En outre, l'intervention d'insectes est vraisemblable en zone sucrière (Archimovitch 1950; Free *et al.* 1975) et pourrait jouer un rôle en situation de pollen limitant (voir chap. 4 et Darmency *et al.* 1998a). Les graines ne sont pas récoltées, à l'inverse de la plupart des espèces cultivées. Les betteraves mauvaises herbes peuvent donc alimenter une banque de graines, contrairement à certaines mauvaises herbes ayant une origine comparable par hybridation cultivées-sauvages (riz ou avoine, Hancock *et al.* 1996). Or, les graines sont un paramètre fondamental à prendre en compte en démographie (Raybould 1999).

Les apparentés sauvages de la sucrière appartiennent à la même espèce que la culture et sont potentiellement parapatriques des champs. La betterave sucrière est donc logiquement recensée comme pouvant s'hybrider très facilement avec des populations sauvages en Europe (De Vries 1992 cité par Raybould & Gray 1993; Williamson 1993; Bartsch & Pohl-Orf 1996; Dietz-Pfeilstetter & Kirchner 1998). De nombreux auteurs ont souligné l'impact écologique possible des betteraves OGMs (revue dans Bartsch *et al.* 1994). L'existence de flux de gènes semble évidente dans le cas de plantes cultivées pour leurs graines: on craint alors des hybridations avec les apparentées sauvages durant la floraison de la culture (colza, tournesol, etc.). Cependant, la

Fig 1: Schématisation des flux de gènes possibles dans le complexe *Beta vulgaris* en France



probabilité de dispersion des gènes d'espèces bisannuelles récoltées avant floraison n'est pas nulle: des échanges cultivées-sauvages peuvent se produire lors de la phase de multiplication des semences, indépendamment de la phase de culture. La littérature concernant les plantes transgéniques semble peu s'intéresser à cet aspect mais son importance a été soulignée dans le cas de la betterave (Desplanque *et al.* 1996; Bartsch & Schmidt 1997; Darmency *et al.* 1998a). En outre, la culture proprement dite des betteraves sucrières, espèce pourtant bisannuelle, n'est pas exempte de formes sexuées. L'étude des flux géniques au sein du complexe de *Beta vulgaris* doit donc inclure les deux phases de multiplication et d'exploitation des variétés, qui sont associées à des zones géographiques distinctes (respectivement "zone d'Agen" et "zone sucrière" dans les paragraphes suivants), et à des formes non cultivées différentes (betteraves rudérales et mauvaises herbes). La figure V-1 schématise les différents flux de gènes envisageables. De plus, il est possible d'agir sur les différents vecteurs de dispersion des gènes en intervenant sur le mode de construction des variétés transgéniques et sur le niveau de ploïdie des variétés de sucrières, qui détermine sans doute la fertilité des hybrides potentiels. Les conséquences associées à chaque scénario sont discutées ci-dessous (le tableau V-1 récapitule les options possibles).

N.B.: nous considérerons que l'utilisation d'une variété sucrière transgénique résistante à un herbicide total³⁴ s'accompagne immédiatement d'un champ nettoyé de toute mauvaise herbe, puisque ces dernières sont *a priori* 'sensibles' et détruites dans les premiers stades de la culture de la variété OGM. Les seules montaisons du champ sont donc des montaisons du rang.

V-2.1 Facteurs pouvant influencer la fuite du transgène chez la betterave

V-2.1.1 Incidence du mode d'incorporation du transgène

Du fait du caractère hybrides des semences de sucrières, les sélectionneurs auront à choisir entre l'incorporation du transgène par la voie maternelle (porte-graine mâle stérile) ou par la voie paternelle. Le choix sera lourd de conséquences car la contribution "cultivée" du génotype des hybrides cultivées-sauvages est exclusivement maternelle. D'autre part, le pollen et les graines ne se dispersent pas de la même façon.

V-2.1.1.1 Quel que soit le mode d'incorporation

La variété est 'résistante', donc les montaisons variétales des champs de sucrières le sont aussi et sont susceptibles de transmettre cette résistance par graine (dans le champ considéré) et par pollen (vers des betteraves fleuries de champs voisins).

³⁴ comme le glyphosate (Roundup®) ou le glufosinate d'ammonium (Liberty™).

Tableau 1: incidence du mode de construction des variétés sucrières OGMs sur la fuite potentielle d'un transgène

Voie d'incorporation du transgène		Dispersion du transgène vers les rudérales dans la zone d'Agen, via:		Niveau de ploïdie des montaisons du rang		Résistance des montaisons du rang		Dispersion du transgène vers les mauvaises herbes dans la zone sucrière:				
								par les hybrides cultivées-sauvages, via:		par les montaisons variétales, via:		
parent	Compartiment cellulaire	niveau de ploïdie du père (mère: 2n=2x)	graines	pollen	Hyb. cult.-sauv.	Mont. variétale	Hyb. Cult.-sauv.	Mont. variétale	graines	pollen	graines	pollen
maternelle	nucléaire	2n=4x	+	/	diploïde	triploïde	R	R	++	++	+	+
		2n=2x	+	/	diploïde	diploïde	R	R	++	++	++?	++?
	chloroplaste	2n=4x	+	/	diploïde	triploïde	R	R	++	-	+	-
		2n=2x	+	/	diploïde	diploïde	R	R	++	-	++	-
paternelle	nucléaire	2n=4x	/	+	diploïde	triploïde	S*	R**	/	/	+	+
		2n=2x	/	++?	diploïde	diploïde	S*	R**	/	/	++?	++?

+ = dispersion modérée ; ++ = dispersion forte

*: contamination possible des portes-graines par des betteraves rudérales devenues transgéniques suite à une fuite de graine ou de pollen transgénique lors des années de multiplication précédentes.

** : risque d'individus "non résistants", en cas de contamination du porte-graine par du pollen d'une variété 'sensible' multipliée à proximité.

V-2.1.1.2 Incorporation par la voie maternelle

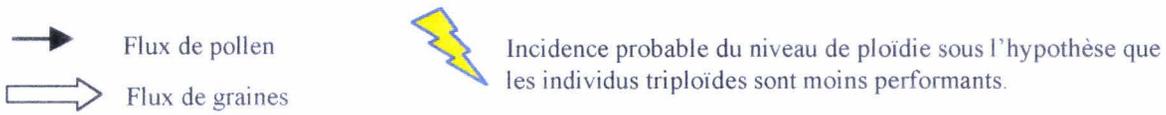
Incidence en zone d'Agen: la voie maternelle est perçue comme une voie "sûre" du fait que les graines se déplacent peu par rapport au pollen. Nous avons cependant montré qu'une fuite de graines existait lors de la multiplication, même si elle était modérée.

Incidence en zone sucrière. Dans le cas où le porte-graine est transgénique, le sélectionneur est assuré que tout individu semé en zone sucrière est 'résistant'. Toutefois, ce mode de construction aura un impact agronomique négatif très fort: les hybrides cultivées sauvages seront résistants dès la première utilisation du transgène. Lors de l'arrivée de ces hybrides cultivées-sauvages dans le champs, il n'y a pas de mauvaises herbes car elles sont 'sensibles' et détruites par l'herbicide. Cependant, si les hybrides cultivées-sauvages 'résistantes' (ou les montaisons variétales) ne sont pas toutes correctement désherbées manuellement, elles peuvent: (i) émettre du pollen avec transgène vers des champs voisins (non transgéniques) infestés. La descendance de ces mauvaises herbes peut alors rapidement devenir résistante à l'herbicide. Si les germinations ne sont pas toutes éliminées lors des cultures non betteravières de la rotation, la culture de sucrière transgéniques sur ces champs s'accompagnera de mauvaises herbes 'résistantes'. (ii) produire des graines, dont la germination donnera des individus 'résistants': le retour d'une culture transgénique sur la parcelle sera problématique. N.B.: pour que ces betteraves mauvaises herbes 'résistantes' soient détruites entre deux cultures de sucrières, il faut éviter la culture de plantes modifiées pour une résistance au même herbicide (e.g. colza).

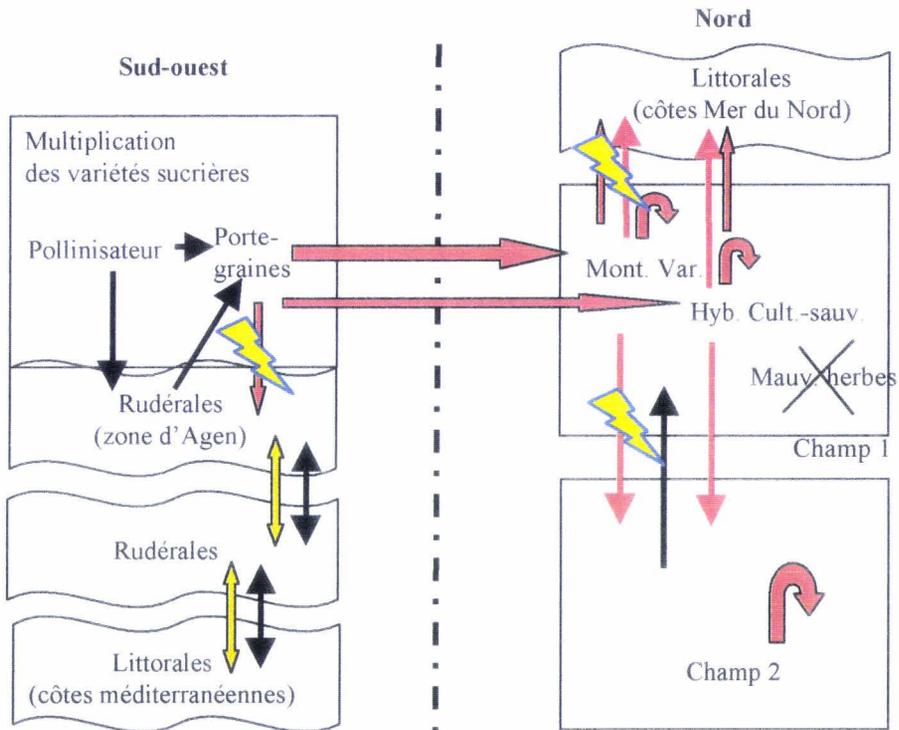
V-2.1.1.3 Incorporation du transgène par la voie paternelle

Incidence en zone d'Agen: ce type de construction possède deux "handicaps": premièrement, il inquiète par la perspective d'un nuage de pollen transgénique (Bartsch & Schmidt 1997). Le pollen transgénique introgressera les betteraves rudérales au même niveau qu'en absence de transgène, mais rendra ces dernières 'résistantes'. Deuxièmement (et principalement), les sélectionneurs savent bien que lors de la multiplication, le pollen fécondant les portes-graines n'est jamais à 100% celui des pollinisateurs cultivés voulus. Sans même évoquer le cas de la contamination accidentelle par les rudérales, il est certain que du pollen de champs de multiplication voisins réalise quelques fécondations. Ces hybridations accidentelles passent totalement inaperçues en champs de sucrières sauf dans certains cas: exemple 1: c'est un pollinisateur de type betterave potagère rouge qui est impliqué ; on trouve donc des betteraves avec le gène R (rouge) au milieu des sucrières. Exemple 2: la variété considérée est une variété résistante à la rhizomanie et le pollinisateur impliqué est 'sensible' ; on visualise alors facilement dans les champs touchés par la rhizomanie des betteraves malades. La démonstration que les phases de multiplication ne sont jamais étanches sera encore plus nette avec un transgène de

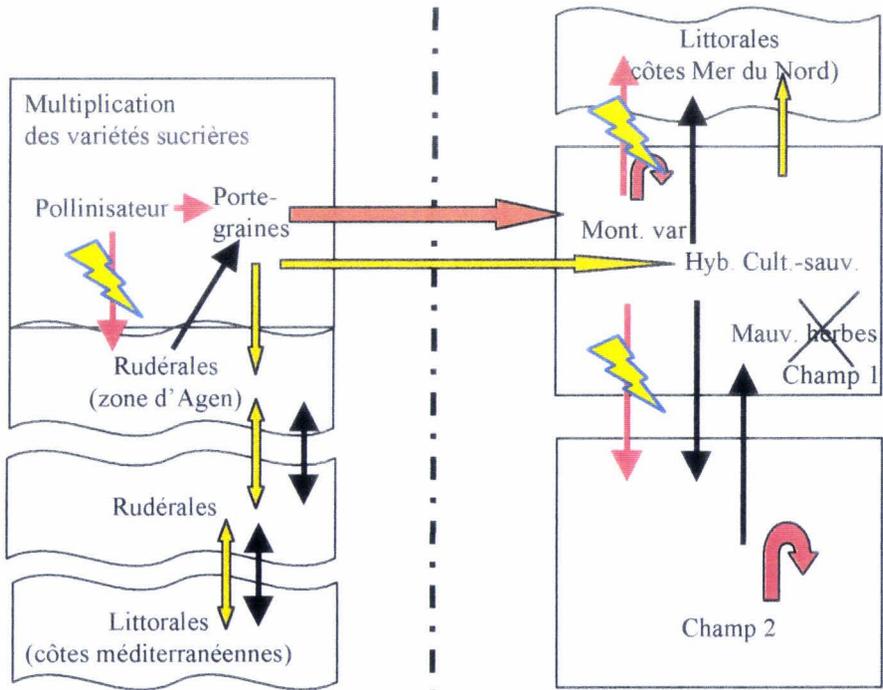
Fig. 2: Incidence du mode d'incorporation du transgène et du niveau de la ploïdie de la variété
 Exemple d'utilisation d'une variété résistante à un herbicide total.
 La présence du transgène est mentionnée en rouge.



a:
Incorporation
par la voie
maternelle



b:
Incorporation
par la voie
paternelle



résistance à un herbicide: la présence d'hybrides "cultivées-sauvages" ou "cultivées-cultivées 'sensibles'" se traduira par une mortalité bien visible dans le rang.

Incidence en zone sucrière: ce type de construction présente l'immense avantage agronomique de ne pas générer d'hybrides cultivées-sauvages résistants (les hybrides ont pour père une betterave rudérale 'sensible' et seront donc détruits lors du traitement: pas de descendance sous forme de mauvaise herbe). La seule possibilité que ces hybrides soient 'résistants' est que leur père rudéral soit devenu 'résistant' par incorporation du transgène lors des précédentes années de multiplication. La probabilité d'un tel scénario est faible. C'est donc l'incorporation par la voie paternelle qui a été choisie jusqu'à présent pour la betterave OGM (Boucherie & Nardi 1999). Le transgène peut cependant s'échapper vers les champs voisins par le pollen des montaisons variétales, qui produisent un peu de pollen (chap. 4). Une stérilité mâle totale des variétés transgéniques pourrait prévenir la fuite potentielle de pollen transgénique (Raybould & Gray 1994), mais ce n'est actuellement pas la situation chez la betterave (chap. 4).

V-2.1.1.4 Incorporation du transgène dans un organelle à hérédité maternelle?

L'incorporation d'un transgène de résistance au glyphosate dans le chloroplaste (Daniell *et al.* 1998) a pu être présentée comme une prévention élégante de la fuite des transgènes vers le milieu sauvage par le pollen (Gray & Raybould 1998). Toutefois, la technique n'empêche pas l'établissement de plantes transgéniques par dispersion de graines à l'intérieur et à l'extérieur de l'agrosystème, ce qui sera le cas de la betterave, dont les graines ne sont pas récoltées. D'autre part, la technique n'est valable que pour les taxons à hérédité strictement maternelle des chloroplastes, qui est une règle générale souffrant de multiples exceptions (Moggensen 1996): le tabac et la luzerne sont par exemple deux angiospermes cultivés qui ne pourraient pas bénéficier de ce type de construction (exemples cités par Stewart & Prakash 1998). Enfin, des mauvaises herbes donneuses de pollen peuvent apporter des gènes associés au syndrome de mauvaise herbe vers la culture transgénique, et créer ainsi des hybrides mauvaises herbes transgéniques (Stewart & Prakash 1998): on sait par exemple que le colza est facilement hybridé par *Raphanus raphanistrum* (Chèvre *et al.* 1997).

Dans le cas de la betterave, la localisation du transgène dans le chloroplaste limiterait le risque en zone d'Agén à la fuite de graines, qui est faible. En zone sucrière, l'intérêt serait notable car les graines ne sortent pas de la parcelle. Certes, les mauvaises herbes de champs voisins pourraient toujours polliniser les montaisons du rang 'résistantes', fabriquant de ce fait des mauvaises herbes 'résistantes'. Mais la résistance des mauvaises herbes resterait confinée au champ et la dispersion de pollen n'aurait aucune incidence sur les mauvaises herbes des champs voisins.

V-2.1.2 Incidence du niveau de ploïdie des variétés sucrières

Nos mesures dans la zone sucrière n'ont concerné que des variétés triploïdes. Or ces variétés sont en perte de vitesse depuis quelques années (voir annexe 1) et toutes les variétés OGMs actuelles sont diploïdes (Boucherie & Nardi 1999). L'importance du niveau de ploïdie est due à la fertilité des pollinisateurs tétraploïdes de la zone d'Agen, ainsi qu'à la qualité des gamètes et de la descendance des variétés hybrides. La figure V-2 schématise les flux sur lesquels une modification du niveau de ploïdie pourrait avoir une incidence.

Incidence dans la zone d'Agen: le pollinisateur des variétés triploïdes est tétraploïde. De façon classique, on considère que son pollen, plus lourd que du pollen haploïde, se déplace moins loin (voir une bonne revue des aspects polliniques de la betterave dans Boucherie & Nardi 1999). Il est donc moins susceptible d'introgresser des betteraves rudérales diploïdes. Hecker (1988) a montré que la descendance d'une betterave diploïde mise en présence d'une quantité égale de pollen diploïde et haploïde est diploïde à 89 %. De plus, les individus tétraploïdes produisent une part de grains aneuploïdes inefficaces lors de la fécondation (Alcaraz *et al.* 1998b). Enfin, la déhiscence des anthères des individus tétraploïdes est retardée dans la matinée par rapport à celle des individus diploïdes (Scott & Longden 1970), ce qui rend ces derniers plus compétitifs en cas de sympatrie. Ces handicaps pourraient expliquer le succès des petits effectifs de betteraves rudérales diploïdes, capables de polliniser les portes-graines noyées dans un nuage de pollen de sucrières. L'utilisation de pollinisateurs cultivés diploïdes serait ainsi un rempart contre la formation des hybrides cultivées-sauvages (Santoni 1991). A l'opposé, la production de grandes quantités de pollen haploïde cultivé est susceptible d'introgresser plus efficacement les betteraves rudérales (indépendamment d'un quelconque transgène). De plus, tandis que la descendance d'hybrides triploïdes est souvent "semi-fertile", celle d'hybrides diploïdes ne présente pas de handicap particulier: la descendance des graines échappées de variétés sucrières lors de la multiplication des semences pourrait entretenir des flux de gènes plus facilement avec les betteraves diploïdes (fécondation par ces dernières et/ou émission de pollen).

Incidence en zone sucrière: l'utilisation de variétés diploïde au lieu de triploïdes serait critique car les montaisons variétales produisant du pollen haploïde seraient plus efficaces dans la transmission de leurs gènes.

V-2.2 Différents types de transgènes

V-2.2.1 Betteraves transgéniques résistantes à un herbicide total

On sait peu de choses sur les effets en populations naturelles de la résistance aux herbicides (Raybould & Gray 1993) et sur les coûts éventuels pouvant affecter la persistance de tels transgènes (Snow *et al.* 1999). Ce type de résistance pourrait ne pas avoir d'incidence écologique car les herbicides ne sont pas appliqués en populations naturelles (Timmons *et al.* 1996), mais il

faut reconnaître notre ignorance sur de possibles effets pleiotropiques (Raybould & Gray 1994). Par ailleurs, une plante sauvage introgressée peut devenir une "mauvaise herbe" (Dale 1992) et envahir un agrosystème où est utilisé l'herbicide. Le maintien du transgène peut être influencé par une immigration continue du transgène, une sélection favorable en présence de l'herbicide, ou un désavantage en cas de coût associé à la résistance en absence d'herbicide (e.g. Lavigne *et al.* 1995).

L'avantage fourni par un tel transgène de résistance peut être décisif si l'herbicide est appliqué dans le milieu. Ce pourrait être le cas dans certains milieux anthropisés du Sud (parkings, fossés, bords de route), où on rencontre la betterave rudérale (la résistance des betteraves OGM concerne deux herbicides largement utilisés pour l'entretien des voiries). Dans un agrosystème sucrier désherbé avec l'herbicide considéré, l'avantage des mauvaises herbes 'résistantes' est immédiat et total. En revanche, l'avantage est certainement nul (ou négatif) dans un champ non soumis à l'herbicide. Néanmoins, même en absence de pression de sélection, la fréquence du transgène peut augmenter par le simple fait d'immigrations récurrentes (Gliddon 1994), ce qui est le cas avec les montaisons du rang. Un champ non transgénique pourrait alors accumuler une banque de graines 'résistantes' pouvant poser problème ultérieurement. Nous avons déjà souligné que des mauvaises herbes peuvent devenir résistantes, par le biais de graines ou de pollen. L'argumentation défendue par les professionnels de la betterave pour favoriser le développement de betteraves OGM souligne que, en cas de résistance acquise par les mauvaises herbes, le retour au désherbage chimique traditionnel renverrait à la situation de départ. Cependant, deux points font que la nouvelle situation sera différente: (i) La formation de "super-mauvaises herbes" 'résistantes' privera ces champs de l'emploi ultérieur de variétés transgéniques de sucrières mais aussi d'autres cultures résistantes au même herbicide (colza par exemple). C'est à dire que la présence de betteraves mauvaises herbes 'résistantes' rendra impossible l'utilisation de toute culture résistante au même herbicide sur la même parcelle, à moins d'utiliser aussi un herbicide sélectif conventionnel de la culture considéré et efficace sur betterave, rendant par exemple la gestion des jachères par herbicide total difficile. Il faudra compter avec la banque de graine générée par les mauvaises herbes dont la taille et la durée de vie sont grandes: le contrôle des plantes 'résistantes' sera long. (ii) Jusqu'alors, les mauvaises herbes d'un champ donné gênaient peu les champs voisins (sauf par apport éventuel de pollen 'B' sur les montaisons variétales). Dans cette nouvelle situation, les mauvaises herbes d'un champ sans OGM peuvent devenir 'résistantes' si elles sont pollinisées par des betteraves montées 'résistantes' de champs proches.

V-2.2.2 Betteraves transgéniques autres que "résistantes à un herbicide total"

D'autres types de betteraves transgéniques seront bientôt disponibles. Les mises au point actuelles concernent des betteraves OGMs résistantes à la rhizomanie, un fléau grandissant (multiplication par 20 des surfaces touchées en 10 ans), ou à d'autres ravageurs (en outre la

résistance à la sécheresse est en cours d'expérimentation tandis que la résistance à la montaison est à l'étude). Il semble que la rhizomanie puisse exister dans certaines situations littorales, où les populations présentent différents niveaux de résistance naturelle (Dietz-Pfeilstetter & Kirchner 1998). La fuite d'un transgène de résistance à la rhizomanie pourrait avoir un impact écologique (Bartsch *et al.* 1996b) car la fréquence du transgène pourrait s'étendre par sélection favorable dans les populations sauvages littorales, même si la fuite est rare. Un tel scénario est envisageable autour des zones de multiplication de semence italiennes, même si le virus de la rhizomanie n'y a pas été détecté pour l'instant.

V-3 Conclusions / Perspectives

La situation de la betterave sucrière est complexe. L'analyse des risques liés aux futures betteraves transgéniques nécessite de prendre en compte à la fois les opérations de multiplication des semences et de culture proprement dite, qui se situent dans des zones géographiques différentes et impliquent diverses formes sauvages, cultivées ou mauvaises herbes selon la zone considérée (Darmency *et al.* 1998a). Les fuites entre cultivées et sauvages existent déjà. C'est la nature des gènes en cause qui est à prendre en compte avec les OGMs (Käppeli & Auberson 1998). D'autre part, le mode de construction et le niveau de ploïdie des variétés est important à considérer car ils influent sur les différents flux géniques possibles. La betterave n'est pas "mâle-stérile et triploïde" alors que cette situation limiterait les flux de pollen. Il semble notamment que l'arrivée actuelle de betteraves diploïdes puisse favoriser les fuites de transgènes en dehors du compartiment cultivé. Le cas de la betterave sucrière met en lumière la nécessité de dispositifs permettant de neutraliser les OGMs après leur utilisation (voir Arnould *et al.* 1993; Marshall 1998). Il faudrait examiner attentivement les possibilités offertes par les recherches actuelles sur des dispositifs permettant de neutraliser la descendance des plantes transgéniques (e.g. les procédés de type "terminator" qui empêchent la germination des graines). En tout état de cause le désherbage manuel des montaisons du rang apparaît plus que jamais impératif (il s'agit déjà d'une opération clé des "Bonnes Pratiques Agricultrales", Brants & Hermann 1998).

La fuite prévisible de transgènes de résistance à un herbicide peut avoir un impact écologique (en zone de multiplication) ou agronomique (en zone sucrière). Il est peu probable que des sucrières deviennent des pestes en dehors de l'agrosystème dans le Nord: la betterave supporte mal la compétition (Fredshavn & Poulsen 1996) et la betterave sucrière jusqu'à présent n'a jamais été vue en dehors des champs. Cependant, une étude récente a montré que des betteraves peuvent passer l'hiver dans le nord de l'Europe (Pohl-Orf *et al.* 1999). A défaut de réel risque écologique (Williamson 1993), les risques agronomiques peuvent être conséquents. L'utilisation optimale d'un OGM dépend de des caractéristiques propres à cet OGM et à l'environnement auquel il accède: les utilisateurs doivent apprendre à gérer ces risques spécifiques (Klinger 1998). Cependant, même si

la culture de betteraves OGMs s'accompagne d'un fort appui technique aux agriculteurs (notamment dans la gestion des rotations culturales), des betteraves mauvaises herbes résistantes à un herbicide (voire aux deux herbicides manipulés actuellement) apparaîtront. Elles pourront sans doute être contrôlées par des herbicides classiques mais il ne s'agira pas d'un simple retour à la situation antérieure: les agriculteurs se seront privés de l'utilisation d'un herbicide total efficace et peu toxique. Bien qu'un seul cas mondial de résistance n'ait été répertorié jusqu'à présent pour le glyphosate (voir Powles *et al.* 1997), on ne peut écarter la possibilité d'apparition d'autres cas, compte tenu de l'augmentation prévisible de l'application de ces herbicides (Strauss *et al.* 1997). La "perte" de quelques herbicides précieux soulève des problèmes d'ordre presque éthique (Aiken 1998). La malherbologie est une discipline qui requiert la prise en compte du long terme (Cousens & Mortimer 1995). La question se pose de savoir si les betteraves OGMs résistantes à un herbicide ne sont pas une "réponse à court terme à un problème posé sur le long terme" (Marshall 1998).

Nous avons au cours de notre étude soulevé davantage de questions qu'apporté de réponses: de nombreux points restent encore à préciser sur les échanges entre les sucrières et les mauvaises herbes (le Laboratoire de Malherbologie de l'INRA de Dijon travaille sur le sujet). Nous avons mentionné que l'expansion prévisible d'un transgène dans les populations de betteraves mauvaises herbes va dépendre de nombreux facteurs dont le mode de construction de la variété, son niveau de ploïdie, la présence d'autres cultures transgéniques dans la rotation, la présence de betteraves mauvaises herbes dans les champs voisins, leur distance relative, etc. Des approches par modélisation (Van Raamsdonk & Schouten 1997) permettraient de simuler l'envahissement d'un transgène dans différentes parcelles et peut-être de mieux cerner l'impact agronomique résultant (Kareiva *et al.* 1996; Darmency *et al.* 1998a; Van Dijk & Desplanque 1998; Raybould 1999).

En outre, les conséquences possibles de l'utilisation d'OGMs en zone sucrière ne se limitent pas à un risque agronomique. Il peut aussi être écologique si un transgène conférant un trait adaptatif s'échappe des champs de sucrières vers des populations sauvages littorales parapatriques (Kapteijns 1993). Il est évident que même si les flux géniques sont faibles directement à partir des betteraves cultivées, les mauvaises herbes peuvent assurer un relais important dans le transfert des gènes. Le pollen peut se déplacer facilement et la présence de nombreux cours d'eau en arrière du littoral pourrait faciliter la dispersion des graines hors des champs. Les flux géniques entre ces deux compartiments doivent maintenant être précisés (un programme est en route au laboratoire), en prenant en compte les conditions environnementales, la taille et la distribution spatiale des populations émettrices et réceptrices (voir Klinger *et al.* 1992).

- Conclusion générale -

Conclusion générale

La betterave constitue un **complexe de sous-espèces cultivées sauvages**, qui comprend diverses **formes cultivées** (*B. vulgaris* ssp *vulgaris*) ainsi que des **formes sauvages** (*B. vulgaris* ssp *maritima*) **littorales** mais aussi **non littorales**, qui sont à l'origine de **betteraves mauvaises herbes** par hybridation avec les betteraves sucrières. Toutes ces formes sont interfertiles. En France, la forme cultivée sucrière peut recevoir ou disperser des gènes lors de deux opérations de culture, de localisation géographique distincte: la multiplication des semences dans le Sud-ouest et la culture de sucrières dans le Nord. Nous nous sommes intéressés à ces deux situations et aux flux géniques possibles lors de chacune d'elles, en étudiant les betteraves sauvages non littorales dans le Sud ainsi que les betteraves mauvaises herbes dans le Nord.

Les betteraves sauvages sont typiquement littorales et sont présentes sur l'ensemble des côtes françaises. Toutefois, la présence très localisée de formes non littorales était connue dans le Sud-ouest. Nous avons voulu savoir si l'existence de betteraves à l'intérieur des terres était exclusivement liée à la multiplication des semences de variétés cultivées. Nos diverses prospections ont montré que ces betteraves, bien que discrètes, se rencontrent en fait abondamment entre le littoral méditerranéen et la zone de multiplication. Par contre, nous n'avons rencontré aucune population en direction du littoral atlantique, pourtant plus proche de la zone de multiplication que ne l'est le littoral méditerranéen. Les betteraves **rudérales** occupent des habitats anthropisés, et forment des populations fugaces, de petite taille en général. Elles sont dépendantes de l'homme, qui crée en permanence les milieux indispensables à leur développement dans l'intérieur des terres et qui transporte leurs diaspores. Nous avons utilisé pour leur étude une double approche, par marqueurs moléculaires et observation de traits quantitatifs.

Les betteraves rudérales de la zone de multiplication de semences peuvent polliniser les formes sucrières en phase reproductive pour former des hybrides cultivées-sauvages, qui seront semés dans les champs de sucrières. A l'inverse, nous avons montré que des fuites de graines depuis le compartiment cultivé se produisent, même si elles semblent limitées. La fuite possible de pollen est moins facilement détectable, faute de marqueurs nucléaires diagnostiques évidents. De plus, les betteraves rudérales de cette zone sont activement recherchées et détruites, de sorte que les individus avec un fort syndrome de domestication (i.e. introgressés) échappent en grande partie à notre analyse. Cette forte pression de sélection pourrait aussi expliquer que les betteraves rudérales présentent un cycle de vie particulièrement court dans cette zone, avec une très forte fréquence de l'allèle 'B', qui permet de monter à fleur sans vernalisation.

L'hybridation accidentelle des portes-graines cultivés par des formes rudérales lors de la multiplication des semences amène un apport de **betteraves hybrides cultivées-sauvages** dans les

champs de sucrières du Nord. Ces hybrides sont à l'origine de la forme **betterave mauvaise herbe** dont le syndrome "mauvaise herbe" est principalement dû à l'allèle 'B' apporté par les betteraves rudérales. Nous avons observé que ces hybrides, bien qu'issus de pères betteraves rudérales, présentent encore un fort syndrome de domestication. Certains traits des betteraves rudérales, qui font pourtant partie d'un syndrome de mauvaise herbe très général, comme la "dormance" des graines ou la forte précocité de floraison, ne se retrouvent pas systématiquement chez les betteraves mauvaises herbes. On ne peut donc pas conclure que le caractère mauvaise herbe de ces dernières est "préparé" par les rudérales (hormis pour l'allèle B): l'évolution d'un syndrome de mauvaise herbe de plus en plus marqué semble due surtout à une perte du syndrome de domestication associée à la contre sélection par le labour automnal de toute allocation des ressources à la survie. Ainsi, l'allocation des ressources à la survie diminue (avec une tendance vers l'annualité), tandis que le taux de montaison et la production de glomérules et de pollen viable augmentent.

D'autre part, nous avons observé que l'apport de ces hybrides cultivées-sauvages lors du semis n'était pas un événement rare mais récurrent. Nous avons aussi mis en évidence que les **montaisons variétales** contribuent, bien que faiblement, à la production de pollen et de graines en champ. Leur descendance est cependant réduite par rapport à celle des hybrides. En définitive, les champs de sucrières ne sont pas exempts de reproduction sexuée, comme le caractère bisannuel des variétés aurait pu le laisser entendre: des gènes "domestiques" sont incorporés en permanence au compartiment des mauvaises herbes. Les graines qui sont produites restent confinées à la parcelle considérée, mais le pollen est susceptible de sortir du champ sous l'action du vent (voire des insectes).

La perspective de la mise en culture de betteraves transgéniques, notamment résistantes à un herbicide total, pose avec davantage d'acuité le problème des flux géniques dans le complexe cultivées-sauvages de *Beta vulgaris*. Ces flux sont déjà source de problèmes agronomiques avec le phénomène des betteraves mauvaises herbes. Nous avons souligné la nécessité de considérer toutes les situations où la betterave cultivées présente des formes sexuées et l'importance de réfléchir au **mode d'incorporation du transgène** lors de la fabrication des semences hybrides, et au **niveau de ploïdie** de celles-ci. Il semble que le scénario le plus sûr serait d'incorporer le transgène par la voie paternelle, à condition que les variétés restent triploïdes, ce qui n'est pas la tendance actuelle. En tout état de cause, il est peu probable que le transgène reste confiné à la forme cultivée. Notre connaissance actuelle des conditions écologiques associées aux betteraves rudérales ne laisse pas présager un impact écologique fort dans le Sud-ouest en cas de betteraves devenues résistantes à un herbicide. En revanche, l'impact agronomique dans le Nord pourrait s'avérer conséquent, car l'apparition de betteraves mauvaises herbes 'résistantes' bannirait l'usage des herbicides incriminés

pour l'ensemble des cultures se succédant sur les parcelles touchées (et sur leurs bordures). La rapidité d'apparition de telles "super mauvaises herbes" dépendra entre autre du parent choisi pour incorporer le transgène dans la variété hybride et de son niveau de ploïdie.

Les régions d'exploitation de sucrières ne présentent pas de betteraves rudérales. Cependant, les échanges cultivées-sauvages sont envisageables au niveau des zones littorales, par fuite de graine (sans doute faible, mais il est nécessaire de la quantifier) et surtout de pollen. Cette introgression supposée de gènes cultivés vers les littorales doit être principalement assurée par le relais des mauvaises herbes (ces dernières émettent d'ailleurs aussi des allèles venus des rudérales du Sud-ouest). L'étude du niveau d'introgression *via* les graines pourra être conduite avec les mêmes marqueurs que ceux utilisés au cours de cette thèse. En ce qui concerne l'apport pollinique, aucun marqueur moléculaire nucléaire diagnostique fiable permettant de discriminer la contribution génétique cultivée n'est disponible: il faudra utiliser un grand nombre de locus très polymorphes (microsatellites, AFLP, etc) ; il serait aussi utile de disposer d'un marqueur de l'allèle 'B', car ce dernier est présent, au moins à l'état hétérozygote, dans la contribution pollinique des mauvaises herbes et absent dans les populations naturelles du Nord.

Le niveau d'introgression actuel ne changera pas avec l'arrivée de variétés transgéniques par le seul fait du transgène. Ce dernier ne constituera qu'un allèle "cultivé" parmi les autres, et sera certainement sans incidence particulière en zone littoral s'il s'agit d'une résistance à un herbicide. Cependant, il n'en sera pas de même s'il confère aux plantes introgressées un trait soumis à une pression de sélection présente en milieu naturel (comme une résistance à la sécheresse ou aux maladies). Enfin, il nous apparaît que l'emploi de variétés diploïdes risque d'augmenter le risque de transfert de gènes vers les betteraves littorales. Ainsi, l'utilisation de betteraves OGMs résistantes à un herbicide pourrait avoir un impact sur ces betteraves littorales par le fait que ces variétés OGMs sont diploïdes et remplaceraient des variétés triploïdes encore utilisées actuellement.

En définitive, le complexe cultivées-sauvages de *Beta vulgaris* en France comprend deux formes sauvages: (i) une forme, bien connue des phyto-sociologues, qui occupe un habitat littoral naturellement perturbé ; mais aussi (ii) une forme non littorale associée aux habitats perturbés par l'homme. D'une part le bord de mer méditerranéen s'anthropise exagérément, au détriment des communautés végétales littorales qui périclitent. D'autre part on observe un très grand nombre de "micro-sites" perturbés qui sont favorables à la betterave, le long et en arrière du littoral. Les betteraves sauvages profitent de ces habitats et peuvent même s'éloigner franchement de la côte (par exemple en direction d'Agen, mais sans doute aussi en remontant la vallée du Rhône, jusqu'à une limite nord qu'il reste à préciser). Nous avons mentionné les affinités des betteraves rudérales

(même proches d'Agen) avec les formes littorales méditerranéennes et observé que la cause "proximale" de leur présence est en grande partie due à un transport des diaspores par l'homme. Toutefois, la cause "distale" de leur présence n'est pas entièrement claire: depuis combien de temps les betteraves occupent-elles l'intérieur des terres ? S'agit il d'un phénomène récent, éventuellement amplifié par l'augmentation des interventions humaines ou plus ancien (période romaine ?).

Cette thèse a permis d'esquisser la caractérisation de ces betteraves rudérales: l'étude de leur distribution globale dans le Sud de la France devra être poursuivie. Ces formes particulières du complexe de *Beta vulgaris* doivent être suivies attentivement, car il est probable que le compartiment "sauvage" de *B. vulgaris ssp maritima* soit de plus en plus représenté dans les zones rudérales et de moins en moins dans les milieux littoraux originels. En outre, les betteraves rudérales sont largement en contact avec les betteraves potagères (blettes et betteraves rouges) cultivées en jardins privés, avec qui elles ont très probablement des échanges. Les introgressions cultivées-sauvages ne se limitent donc pas à la contribution des sucrières. On peut craindre une certaine érosion du "capital génétique" des betteraves sauvages, dont on mesure pourtant l'importance, ne serait-ce que pour la sélection de nouvelles variétés sucrières.

- Références bibliographiques -

Références bibliographiques

- Abe J, Guan G-P, Shimamoto, Y. (1997a) A gene complex for annual habit in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica*, **94**, 129-135.
- Abe J, Guan G-P, Shimamoto Y (1997b) A marker-assisted analysis of bolting tendency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica*, **94**, 137-144.
- Aiken W (1998) The goals of agriculture and weed science. *Weed Science*, **46**, 640-641.
- Alcaraz G, Genter T, Laillet G, Rageot D (1998a) Biologie du pollen de betteraves sucrières. Proceedings of the 61st IIRB congress, February 1998, Brussels (B), IIRB: 393-399
- Alcaraz G, Laillet G, Titonel ED, Rageot D (1998b) Relation entre qualité du pollen et taux de graines vides en production de semences de betteraves sucrières. Proceedings of the 61st IIRB congress, February 1998, Brussels (B), IIRB: 401-402
- Ammann K, Jacot Y, Rufener Al Mazyad P (1997) Field release of transgenic crops in Switzerland - an ecological risk assesment of vertical gene flow.
- Andow DA (1994) Community response to transgenic plant release: using mathematical theory to predict effects of transgenic plants. *Molecular Ecology*, **75**, 65-70.
- Andre C, Levy A, Walbot V (1992) Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes. *Trends in Genetics*, **8**, (4), 128-132.
- Archimovitch A (1950) Control of pollination in sugar beet. *The Botanical Review*, 613-628.
- Arnould J, Gouyon PH, Lavigne C, Reboud X (1993) OGM: une théorie pour les risques. *Biofutur*, **6**, 45-65.
- Arriola PE, Ellstrand NC (1996) Crop-to-weed gene flow in the genus *Sorghum* (Poaceae): spontaneous interspecific hybridization between johnsongrass, *Sorghum halepense*, and crop sorghum, *S. bicolor*. *American Journal of Botany*, **83**, (9), 1153-1160.
- Arriola PE, Ellstrand NC (1997) Fitness of interspecific hybrids in the genus *Sorghum*: persistence of crop genes in wild populations. *Ecological Applications*, **7**, (2), 512-518.
- Baker HG (1974) The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **5**, (1),
- Bakker JP, Poschold P, Strykstra RJ, Bekker RM, Thomson K (1996) Seed banks and seed dispersal: important topics in restoration ecology. *Acta Botanica Neerlandica*, **45**, (4), 461-490.
- Bartsch D, Ellstrand NC (1999) Genetic evidence for the origin of Californian wild beets (genus *Beta*). *Theoretical and Applied Genetics*, **99**, 1120-1130.
- Bartsch D, Emonds A, Gluth H, Haag C, Morak C, Pohl-Orf M, Schmidt M, Eds. (1996a) How will transgenic sugar beets behave in natural plant communities? *Transgenic Organism and Biosafety*. Springer-Verlag, Berlin heidelberg
- Bartsch D, Haag C, Morak C, Pohl M, Witte B (1994) Autoecological studies of the competitiveness of transgenic sugar beets. *Verhandlungen der gesellschaft für Ökologie*, innsbruck 23
- Bartsch D, Pohl-Orf M (1996) Ecological aspects of transgenic sugar beet: transfer and expression of herbicide resistance in hybrids with wild beets. *Euphytica*, **91**, 55-58.
- Bartsch D, Schmidt M (1997) Influence of sugar beet breeding on populations of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* in Italy. *Journal of Vegetation Science*, **8**, 81-84.
- Bartsch D, Schmidt M, Pohl-Orf M, Haag C, Schuphan I (1996b) Competitiveness of transgenic sugar beet resistant to beet necrotic yellow vein virus and potential impact on wild beet populations. *Molecular Ecology*, **5**, 199-205.
- Bartsch D, Sukopp H, Sukopp U, Eds. (1993) Introduction of plants with special regard to cultigens running wild. *Transgenic organisms*. Birkhäuser Verlag, Switzerland
- Bell CI, Milford GJF, Leigh RA (199?) Sugar beet. In: xxx
- Bergelson J, Purrington CB, Wichmann G (1998) Promiscuity in transgenic plants. *Nature*, **395**, 25-26.
- Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, **9**, 1055-1066.
- Boucherie R, Broucqsault LM (1997) Critères et méthodologie d'évaluation des distances d'isolement pour la multiplication des semences potagères. FNAMS.

- Boucherie R, Nardi L (1999) Evaluation du risque de flux géniques au sein du genre *Beta* (*Beta vulgaris* et *Beta macrocarpa*). Synthèse bibliographique. Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences. Centre Technique des Semences.
- Boudry P (1994) Evolution des caractères de cycle de vie dans les populations de betteraves sauvages et adventices (*Beta vulgaris* ssp *maritima*). Thèse de doctorat : Ressources génétiques et amélioration des plantes. Paris 6.
- Boudry P, Mörchen M, Saumitou-Laprade P, Vernet P, Van Dijk H (1993) The origin and evolution of weed beets : consequences for the breeding and release of herbicide-resistant transgenic sugar beets. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**, 471-478.
- Boudry P, Wieber R, Saumitou-Laprade P, Pillen K, Van Dijk H, Jung C (1994) Identification of RFLP markers closely linked to the bolting gene B and their significance for the study of the annual habit in beets (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **88**, 852-858.
- Brants I, Hermann H (1998) Herbicide tolerant sugar beet. Proceedings of the 61st IIRB Congress, Brussels (B): 195-204
- Buttler KP (1977) Variation in wild populations of annual beet (*Beta*, *chenopodiaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, **128**, 123-136.
- Campbell GKG (1979) Sugar beet. In: *Evolution of crop plants* (N. W. Simmonds). Longman,
- Campbell ID, McDonald K, Flannigan MD, Kringayark J (1999) Long-distance transport of pollen into the Artic. *Nature*, **399**, 29-30.
- Cardina J, Sparrow DH (1996) A comparison of methods to predict weed seedling populations from the soil seedbank. *Weed Science*, **44**, 46-51.
- Chèvre AM, Eber F, Baranger A, Hureau G, Barret P, Picault H, Renard M (1998) Characterization of backcross generations obtained under field conditions from oilseed rape-wild radish F1 interspecific hybrids: an assessment of transgene dispersal. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**, 90-98.
- Chèvre A-M, Eber F, Baranger A, Renard M (1997) Gene flow from transgenic crops. *Nature*, **389**, 924.
- Clegg MT, Learn GH, Golenberg EM (1992) Molecular evolution of chloroplast DNA. In: *Evolution at the molecular level* (R. K. Selander, A. G. Clark and T. S. Whittam). Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Colunga-Garciamarin P, Estrada-Loera E, May-Pat F (1996) Patterns of morphological variation, diversity, and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatan, Mexico. *American Journal of Botany*, **83**, (8), 1069-1082.
- Conner AJ, Dale PJ (1996) Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 505-508.
- Corriveau JL, Coleman AW (1988) Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *American Journal of Botany*, **75**, (10), 1443-1458.
- Cousens R, Mortimer M (1995) *Dynamics of weed populations*. Cambridge University Press,
- Crawley MJ, Hails RS, Rees M, Kohn D, Buxton J (1993) Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *nature*, **363**, 620-623.
- Cruzan MB (1998) Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology*, **79**, (2), 400-412.
- Cuguen J, Wattier R, Saumitou-Laprade P, Forcioli D, Mörchen M, Van Dijk H, Vernet P (1994) Gynodioecy and mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Genetics Selection Evolution*, **26**, 87-101.
- Daehler CC (1998) The taxonomic distribution of invasive angiosperm plants: ecological insights and comparison to agricultural weeds. *Biological Conservation*, **84**, 167-180.
- Dale MFB, Ford-Lloyd BV (1985) The significance of multigerm seedballs in the genus *Beta*. *Watsonia*, **15**, 265-267.
- Dale PJ (1992) Spread of engineered genes to wild relatives. *Plant Physiology*, **100**, 13-15.
- Dale PJ (1994) The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their relatives species: general considerations. *Molecular Ecology*, **3**, 31-36.

- Dale PJ, Irwin JA, Scheffler JA (1993) The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breeding*, **111**, 1-22.
- Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee S-B (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology*, **16**, 345-34.
- Darmency H (1994) The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their relatives species: introgression and weediness. *Molecular Ecology*, **3**, 27-40.
- Darmency H, Desplanque B, Vigouroux Y, Van Dijk H (1998a) Les betteraves mauvaises herbes: caractéristiques génétiques et démographiques; flux géniques avec les betteraves transgéniques. Travaux soutenus dans le cadre d'une Action Incitative Programmée de l'INRA 1996-1997: Structuration génétique des populations naturelles, INRA, BRG
- Darmency H, Lefol E, Chadoeuf R (1992) Risk assessment of the release of herbicide resistant transgenic crops: two plant models. IXème colloque international sur la biologie des mauvaises herbes, Dijon: 513-523
- Darmency H, Lefol E, Fleury A (1998b) Spontaneous hybridization between oilseed rape and wild radish. *Molecular Ecology*, **7**, 1467-1473.
- De Candolle A (1883) *L'origine des plantes cultivées*. Diderot Multimedia 1998,
- De Vries IM (1997) Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **44**, 165-174.
- Defalque J, Guyot J-J (1987) La betterave sucrière: culture et débouchés. In: *Encyclopédie Agricole Pratique* (K. Agri-Nathan).
- Dekker J, Dekker B, Hilhorst H, Karssen C (1996) Weedy adaptation in *Setaria* spp. IV. Changes in the germinative capacity of *S. faberii* (Poaceae) embryos with development from anthesis to after abscission. *American Journal of Botany*, **83**, (3), 979-991.
- Desplanque B, Boudry P, Broomberg K, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Van Dijk H (1999) Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**, (8), 1194-1201.
- Desplanque B, Boudry P, Broomberg K, Van Dijk H (1996) Flux géniques entre betteraves sauvages et cultivées: des populations de betteraves mauvaises herbes transgéniques peuvent-elles s'installer rapidement ? Xème Colloque International sur la Biologie des Mauvaises Herbes, Dijon: 239-245
- Desplanque B, Viard F, Forcioli D, Bernard J, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Van Dijk H (in press) The linkage disequilibrium between cpDNA and mtDNA haplotypes in *Beta vulgaris* subsp *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies. *Molecular Ecology*,
- Desprez M (1980) Observations et remarques sur la montée à graine chez la betterave sucrière. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France.*, **66**, 44-53.
- Desprez M (1998) la sélection de la betterave. Objectifs: la résistance à la montée à graine. *Bulletin semences (FNAMS)*, **145**, (octobre novembre décembre), 39-42.
- Dhalluin K, Bossut M, Bonne E, Mazur B, Leemans J, Botterman J (1992) Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *BioTechnology*, **10**, 309-314.
- Dietz-Pfeilstetter A, Kirchner M (1998) Analysis of gene inheritance and expression in hybrids between transgenic sugar beet and wild beets. *Molecular Ecology*, **7**, 1693-1700.
- Dinan L, Whiting P, Scott AJ (1998) Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of the chenopodiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**, 553-576.
- Doebley j (1990) Molecular evidence for gene flow among *Zea* species ; genes transformed into maize through genetic engineering could be transferred to its wild relatives, the Teosintes. *Bioscience*, **40**, (6), 443-454.
- Ducos E, Touzet P, Saumitou-laprade P, Cuguen J, Boutry M, Eds. (1998) Analysis of mitochondrial protein expression in wild beet in relation to cytoplasmic male sterility. *Plant mitochondria: from gene to fonction*. Backhuys Publishers, Leiden
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineshi S, Le Corre V, Petit RJ (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the european continent. *Genetics*, **146**, 1475-1487.

- Dumolin-Lapegue S, Pemonge M-H, Petit RJ (1998) Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, (10), 1321-1331.
- Eber F, Chevre AM, Baranger A, Vallee P, Tanguy X, Renard M (1994) Spontaneous hybridization between a male-sterile oilseed rape and two weeds. *Theoretical and Applied Genetics*, **88**, 362-368.
- Ellstrand N, Hoffman CA (1990) Hybridization as an avenue of escape for engineered genes. *Bioscience*, **40**, 438-442.
- Ellstrand NC (in press) Gene flow between crops and weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **30**,
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, **72**, 250-259.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Fauré S, Noyer J-L, Carreel F, Horry JP, Bakry F, Lanaud C (1994) Maternal inheritance of chloroplast genome and paternal inheritance of mitochondrial genome in bananas (*Musa acuminata*). *Current Genetics*, **25**, 265-269.
- Forcioli D, Saumitou-Laprade P, Valero M, Vernet P, Cuguen J (1998) Distribution of chloroplast diversity within and among populations in gynodioecious *Beta vulgaris* ssp *maritima* (Chenopodiaceae). *Molecular Ecology*, **7**, 1193-1204.
- Ford-Lloyd BV (1998) Transgene risk is not too low to be tested. *Nature*, **394**, 715.
- Franco M, Silvertown J (1996) Life history variation in plants: an exploration of the fast slow continuum hypothesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **351**, 1341-1348.
- Freckleton RP, Watkinson AR (1998) Predicting the determinants of weed abundance: a model for the population dynamics of *Chenopodium album* in sugar beet. *Journal of Applied Ecology*, **35**, 904-920.
- Fredshavn JR, Poulsen GS (1996) Growth behavior and competitive ability of transgenic crops. *Field Crops Research*, **45**, 11-18.
- Free JB, Williams IH, Longden PC, Johnson MG (1975) Insect pollination of sugar beet (*Beta vulgaris*) seed crops. *Annals of Applied Biology*, **81**, 127-134.
- Garcia MC, Figueroa JM, Gomez RL, Townsend R, Schoper J (1998) Pollen control during transgenic hybrid maize development in Mexico. *Crop Science*, **38**, (6), 1597-1602.
- Giddings GD, Sackville Hamilton NR, Hayward MD (1997a) The release of genetically modified grasses. Part 1: pollen dispersal to traps in *Lolium perenne*. *Theoretical and Applied Genetics*, **94**, 1000-1006.
- Giddings GD, Sackville hamilton NR, Hayward MD (1997b) The release of genetically modified grasses. Part 2: influence of wind direction on pollen dispersal. *Theoretical and Applied Genetics*, **94**, 1007-1014.
- Gliddon C (1994) The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: biological models and theoretical perspectives. *Molecular Ecology*, **3**, 41-4.
- Gray A, Raybould A (1998) Reducing transgene escape routes. *Nature*, **392**, 653.
- Hancock JF, Grumet R, Hokanson SC (1996) The opportunity for escape of engineered genes from transgenic crops. *HortScience*, **31**, (7), 1080-1085.
- Harlan JR (1992) *Crops & man*. American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc, Madison, Wisconsin, USA.
- Harper JL (1977) *Population biology of plants*. London.
- Hautekèete NC (1995) Etude préliminaire des flux géniques entre betteraves mauvaises herbes et formes cultivées. Rapport de stage de Licence. Université Lille I.
- Hecker RJ (1988) Pollen characteristics of diploid and tetraploid sugarbeet. *J. Sugar Beet Res.*, **25**, (1), 55-62.
- Heiser CBJ (1973) Introgression re-examined. *The Botanical Review*, **39**, (4), 347-366.
- Horsney KG, Arnold MM (1979) The origin of weed beet. *Annals of Applied Biology*, **92**, 279.
- ITB (1997) La technique betteravière: variétés, agronomie, protection de la culture, machinisme. *Le betteravier Français*, **Hors série**, (décembre 1997).

- Jenczewski E, Prosperi J-M, Ronfort J (1999) Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. *American Journal of Botany*, **86**, (5), 677-687.
- Käppeli O, Auberson L (1998) How safe is safe enough in plant genetic engineering ? *Trends in Plant Science*, **3**, (7), 276-281.
- Kapteijns AJAM (1993) Risk assesment of genetically modified crops. Potential of four arable crops to hybridize with the wild flora. *Euphytica*, **66**, 145-149.
- Kareiva P, Morris W, Jacobi C (1994) Studying and managing the risk of cross fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology*, **3**, 15-21.
- Kareiva P, Parker IM, Pascual M (1996) Can we use experiments and models in predicting the invasiveness of genetically engineered organisms? *Ecology*, **77**, (6), 1670-1671.
- Keeler KH (1989) Can genetically engineered crops become weeds ? *Bio/technology*, **7**, 1134-1139.
- King RA, Ferris C (1998) Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology*, **7**, 1151-1161.
- Kling J (1998) Could transgenic supercrops one day breed superweeds ? *Science*, **274**, 180-181.
- Klinger T (1998) Biosafety assessment of genetically engineered organisms in the environment. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, (1), 5-6.
- Klinger T, Arriola PE, Ellstrand NC (1992) Crop-weed hybridization in radish (*Raphanus sativus*) : effects of distance and population size. *American Journal of Botany*, **79**, (12), 1431-1435.
- Koinange EMK, Singh SP, Gepts P (1996) Genetic control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Science*, **36**, (4), 1037-1045.
- Komarnitsky IK, Samoylov AM, Red'ko VV, Peretyayko VG, Gleba YY (1990) Intraspecific diversity of sugar beet (*Beta vulgaris*) mitochondrial DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, **80**, 253-257.
- Landbo L, Jorgensen RB (1997) Seed germination in weedy *Brassica campestris* and its hybrids with *B. napus* : implications for risk assesment of transgenic oilseed rape. *Euphytica*, **97**, 209-216.
- Langevin SA, Clay K, Grace JB (1990) The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oriza sativa*). *Evolution*, **44**, 1000.
- Laporte V (1998) Structure spatiale du polymorphisme cytonucléaire et de la restauration de la fertilité mâle chez une espèce gynodioïque: études théoriques et expérimentales sur *Beta vulgaris* ssp *maritima*. Thèse de doctorat. Université Paris 6.
- Laporte V, Merdinoglu D, Saumitou-Laprade P, Butterlin G, Vernet P, Cuguen J (1998) Identification and mapping of RAPD and RFLP markers linked to a fertility restorer gene for a new source of cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, 989-996.
- Lavigne C, Klein EK, Vallee P, Pierre J, Godelle B, Renard M (1998) A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, 886-896.
- Lavigne C, Manac'h H, Guyard C, Gasquez J (1995) The cost of herbicide resistance in white chicory: ecological implications for its commercial release. *Theoretical and Applied Genetics*, **91**, 1301-1308.
- Lefol E, Danielou V, Darmency H (1996a) Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Research*, **45**, 153-161.
- Lefol E, Danielou V, Darmency H, Boucher F, Maillet J, Renard M (1995) Gene dispersal from transgenic crops. I. Growth of interspecific hybrids between oilseed rape and the wild hoary mustard. *Journal of Applied Ecology*, **32**, 803-808.
- Lefol E, Fleury A, Darmency H (1996b) Gene dispersal from transgenic crops II. Hybridization between oilseed rape and the wild hoary mustard. *Sexual Plant Reproduction*, **9**, 189-196.
- Lefol E, Séguin-Schartz G, Downey RK (1997) Sexual hybridisation in crosses of cultivated *Brassica* species with the crucifers *Erucastrum gallicum* and *Raphanus raphanistrum*: Potential for gene introgression. *Euphytica*, **95**, 127-139.
- Lewontin RC (1964) The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics*, **49**, 49-67.
- Lewontin RC (1988) On measures of gametic disequilibrium. *Genetics*, **120**, 849-852.

- Linder C, Schmitt J (1994) Assessing the risks of transgene escape through time and crop -wild hybrid persistence. *Molecular Ecology*, **3**, 23-30.
- Linder CR, Taha I, Seiler GJ, Snow AA, Rieseberg LH (1998) Long-term introgression of crop genes into wild sunflower populations. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, (339-347),
- Longden PC (1989) Effects of increasing weed-beet density on sugar-beet yield and quality. *Annals of Applied Biology*, **114**, 527-532.
- Longden PC (1993) Weed beet: a review. *Aspects of Applied Biology*, **35**, 185-194.
- Lonsdale DM, Brears T, Hodge TP, Melville SE, Rottmann WH (1988) The plant mitochondrial genome: homologous recombinations as a mechanism for generating heterogeneity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*, **319**, 149-163.
- Luby JJ, McNicol RJ (1995) Gene flow from cultivated to wild raspberries in Scotland: developing a basis for risk assesment for testing and deployment of transgenic cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**, 1133-1137.
- Mannino MR, Expert P (1998) Radiographie des semences: les semences dévoilent leurs secrets. *Bulletin semences (FNAMS)*, **145**, 9-10.
- Marshall G (1998) Herbicide-tolerant crops - real farmer opportunity or potential environmental problem ? *Pesticide Science*, **52**, 394-402.
- Masood E (1998) Organic farmer takes gene battle to court. *Nature*, **394**, 8.
- McCauley DE (1995) The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, (5), 198-202.
- Meier FC, Artschwager E (1938) Airplane collections of sugar beet pollen. *Science*, **88**, (2291), 507-508.
- Metz PLJ, Jacobsen E, Nap JP, Pereira A, Stiekema WJ (1997) The impact on biosafety of the phosphinotricin-tolerance transgene in inter-specific *B. rapa* x *B. napus* hybrids and their successive backcrosses. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 442-450.
- Meyer U (1989) Technical problems in seed increase and germination tests: seed dormancy and hardseeded species. Report of an international workshop on *Beta* genetic resources, Centre for Genetic Resources, Wageningen, the Netherland, IBPGR: 56-64
- Mikkelsen TR, Andersen B, Jorgensen RB (1996) The risk of crop transgene spread. *Nature*, **380**, 31.
- Milligan BG (1992) Is organelle DNA strictly maternally inherited? Power analysis of a binomial distribution. *American Journal of Botany*, **79**, (11), 1325-1328.
- Moggensen HL (1996) The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany*, **83**, (3), 383-404.
- Mulugeta D, Stoltenberg DE (1998) Influence of cohorts on *Chenopodium album* demography.
- Munerati O (1931) L'eredità della tendenza alla annualità nella commune barbabietola coltivata. *Ztschr Züchtung, Reihe A. Pflanzenzüchtung*, (17), 84-89.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Olmstead RG, Palmer JD (1994) Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany*, **81**, (9), 1205-1224.
- Palmer JD, Ed. (1992) Mitochondrial DNA in plants systematics: applications and limitations. *Molecular systematics of plants*. Chapman and hall, New-York
- Parker IM, Bartsch D, Eds. (1996) Recent advances in ecological biosafety research on the risks of transgenic plants: a trans-continental perspective. *Transgenic organism - Biological and social implications*. Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland
- Paul EM, Capiou K, Jacobs M, Dunwell JM (1995) A study of gene dipersal via pollen in *Nicotiana tabacum* using introduced genetic markers. *Journal of Applied Ecology*, **32**, 875-882.
- Perrins J, Williamson M, Fitter A (1992) Do annual weeds have predictable characters? *Acta Oecologica*, **13**, (5), 517-533.
- Pohl-Orf M, Brand U, Driessen S *et al.* (1999) Overwintering of genetically modified sugar-beet, *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*, as a source for dispersal of transgenic pollen. *Euphytica*, **108**, (3), 181-186.

- Poncet V, Lamy F, Enjalbert J, Jolys H, Sarr H, Robert T (1998) Genetic analysis of the domestication syndrome in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L., Poaceae): inheritance of the major characters. *Heredity*, **81**, 648-658.
- Powles SB, Preston C, Bryan IB, Jutsum AR (1997) Herbicide resistance: impact and management. *Advances in Agronomy*, **58**, 57-93.
- Purrlington CB, Bergelson J (1997) Fitness consequences of genetically engineered herbicide and antibiotic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **145**, 807-814.
- Ran Z, Michaelis G (1995) Mapping of a chloroplast RFLP marker associated with the CMS cytoplasm of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theoretical and Applied Genetics*, **91**, 836-840.
- Raybould AF (1999) Transgenes and agriculture - going with the flow? *Trends in Plant Science*, **4**, (7), 247-248.
- Raybould AF, Gray AJ (1993) Review. Genetically modified crops and hybridization with wild relatives: a UK perspective. *Journal of Applied Ecology*, **30**, 199-219.
- Raybould AF, Gray AJ (1994) Will hybrids of genetically modified crops invade natural communities? *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, (3), 85-89.
- Raymond M, Rousset F (1995) Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Reboud X (1992) Les risques associés aux manipulations génétiques: le cas de la résistance aux herbicides. INA-PG.
- Reboud X, Zeyl C (1994) Organelle inheritance in plants. *Heredity*, **72**, 132-140.
- Regal P (1994) Scientific principles for ecologically based risk assessment of transgenic organisms. *Molecular Ecology*, **3**, 5-13.
- Rissler J, Mellon M (1996) *The ecological risk of engineered crops*. The MIT press, Cambridge, Massachusetts.
- Rogers HJ, Parkes HC (1995) Transgenic plant and the environment. *Journal of Experimental Botany*, **46**, (286), 467-488.
- Santoni S (1991) Etude des ADN satellites et des gènes ribosomiques nucléaires dans le genre *Beta*. Application à la mise au point de tests moléculaires d'homogénéité des lots de semences de betterave sucrière. Thèse. Université Claude Bernard Lyon I.
- Santoni S, Bervillé A (1992) Evidence for gene exchanges between sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and wild beets : consequences for transgenic sugar beets. *Plant Molecular Biology*, **20**, 578-580.
- Schneider S, Kueffer J-M, Roessli D, Excoffier L (1997) ARLEQUIN ver 1.1. A software for population genetic data analysis.
- Scott RK, Longden PC (1970) Pollen release by diploid and tetraploid sugar beet plants. *Annals of Applied Biology*, **66**, 129-135.
- Senda M, Onodera Y, Mikami T (1998) Cytoplasmic diversity in leaf beet cultivars as revealed by mitochondrial DNA analysis. *Hereditas*, **128**, 127-132.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **237**, 287-292.
- Snow A, Palma PM (1997) Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *BioScience*, **47**, (2), 86-97.
- Snow AA, Andersen B, Jorgensen RB (1999) Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Molecular Ecology*, **8**, 605-615.
- Stewart CN, All JN, Raymer PL, Ramachandran S (1997) Increased fitness of transgenic insecticidal rapeseed under insect selection pressure. *Molecular Ecology*, **6**, 773-779.
- Stewart CN, Prakash CS (1998) Chloroplast-transgenic plants are not a gene flow panacea. *Nature Biotechnology*,
- Strauss SH, Knowe SA, Jenkins J (1997) Benefits and risks of transgenic roundup ready cottonwoods. *Journal of Forestry*, **95**, (5), 12-19.
- Taberlet P, Gielly L, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105-1109.
- Ter Heerdt GNJ, Verweij GL, Bekker RM, Bakker JP (1996) An improved method for seed-bank analysis: seedling emergence after removing the soil by sieving. *Functional Ecology*, **10**, 144-151.

- Testolin R, Cipriani G (1997) Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia*. *Theoretical and Applied Genetics*, **94**, 897-903.
- Tiedje JM, Colwell RK, Grossman YL, Hodson RE, Lenski RN, Mack RN, Regal P (1989) The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology*, **70**, (2), 298-315.
- Timmons AM, Charters YM, Crawford JM *et al.* (1996) Risks from transgenic crops. *Nature*, **380**, 487.
- Ul'janova TN (1997) Segetal and ruderal relatives of cultivated plants and the problems of their conservation and use: a Russian perspective. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **44**, 5-8.
- Van Den Broecke A, De Riek J, Roldan-Ruiz I, Wauters A, Van Bockstaele E, De Loose M (1998) DNA markers, a tool for plant variety description, recognition and stability testing. *Proceedings of the 61st IIRB Congress*, 151-165.
- Van der Maesen LJG (1994) Systematics of crop-weed complexes. *Acta Botanica Neerlandica*, **43**, 78-79.
- Van Dijk H, Boudry P, McCombie H, Vernet P (1997) Flowering time in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) along a latitudinal cline. *Acta Oecologica*, **18**, (1), 47-60.
- Van Dijk H, Desplanque B (1998) Echange de gènes entre betteraves sauvages et cultivées: risques associés à l'utilisation de betteraves transgéniques. *Proceedings of the 61st IIRB Congress, Brussels (B)*: 195-204
- Van Raamsdonk LWD (1995) The effect of domestication on plant evolution. *Acta Botanica Neerlandica*, **44**, (4), 421-438.
- Van Raamsdonk LWD, Schouten HJ (1997) Gene flow and establishment of transgenes in natural plant populations. *Acta Botanica Neerlandica*, **46**, (1), 69-84.
- Van Raamsdonk LWD, Van Der Maesen LJG (1996) Crop-weed complexes: the complex relationship between crop plants and their wild relatives. *Acta Botanica Neerlandica*, **45**, (2), 135-155.
- Vleeshouwers LM, Bouwmeester HJ, Karssen CM (1995) Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology*, **83**, 1031-1037.
- Whitton J, Wolf DE, Arias DM, Snow AA, Rieseberg LH (1997) The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 33-40.
- Williamson M (1993) Risks from the release of GMOs: ecological and evolutionary considerations. *Environment Update*, **1**, 5-9.
- Williamson M (1994) Community response to transgenic plant release: predictions from British experience of invasive plants and feral crop plants. *Molecular Ecology*, **3**, 75-79.
- Williamson M, Fitter A (1996) The varying success of invaders. *Ecology*, **77**, (6), 1661-1666.
- Williamson M, Perrins J, Alastair F (1990) Releasing genetically engineered plants: present proposal and possible hazards. *Trends in Ecology and Evolution*, **5**, 417-419.
- Zemtra RS, Hansen J, Mallory-Smith CA (1998) Potential for gene transfer between wheat (*Triticum aestivum*) and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*). *Weed Science*, **46**, 313-317.

- Annexe 1 -

**Présentation du matériel biologique
et des techniques utilisées**

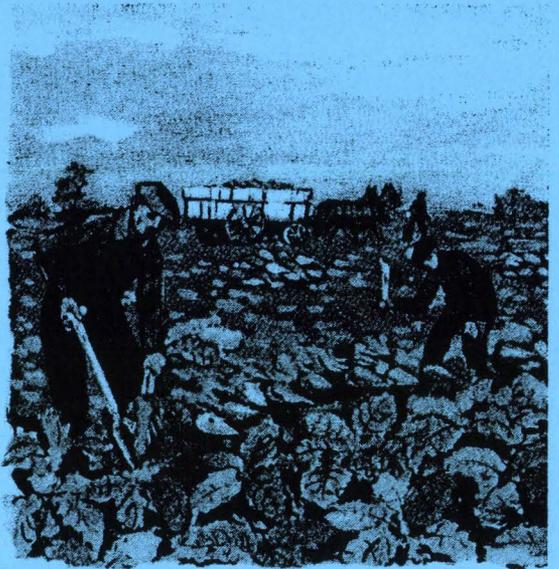
— Concluons - Retenons —

36. LA BETTERAVE ET LE SUCRE

La betterave est une plante que l'on sème au printemps. Au cours de l'été, elle fait des réserves de sucre dans sa racine. On l'arrache à l'automne car, la deuxième année, la plante utiliserait ce sucre pour former des graines.

■ **LA BETTERAVE SUCRIÈRE.** — Sa racine, très développée, contient une chair ferme et si sucrée qu'on utilise le jus de la racine de la betterave pour fabriquer du sucre.

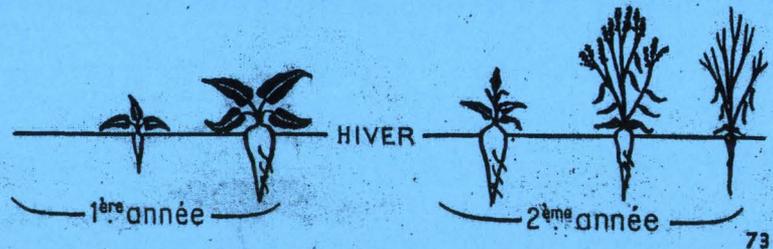
1. On fabrique du sucre avec le jus de la racine des betteraves sucrières.



L'arrachage des betteraves, en octobre

Travaillez en vous amusant

● **Reproduisez ces dessins.** Ils représentent la vie d'une betterave depuis le moment où l'on sème une graine de betterave jusqu'au moment où la plante donne de nouvelles graines. Coloriez vos dessins.



Encadré I. Place des Chenopodiaceae dans la classification

Règne des **Plantae**

Embranchement des **Magnoliophyta = Anthophyta** (Angiospermes)

Classe des **Magnoliopsida** (Dicotylédones)

Sous-classe des **Caryophyllidées**

La sous-classe des Caryophyllidées compte plus de 600 genres (> 10.000 espèces), ayant certaines caractéristiques en commun:

- Embryon courbe autour d'un péricarpe volumineux (l'albumen, tissu de réserve classique de beaucoup de graines est ici réduit, au profit du péricarpe dérivé du nucelle). On appelait autrefois les Caryophyllidées "curvembryales" ou "centrospermées" pour rendre compte de ce phénomène, qui devient flagrant lors de la levée de la betterave (Fig. 3).
- Présence de bêtaïnes et non d'anthocyanes.
- Caractères polliniques tendant vers des grains polyporés. Le pollen est toujours trinucé (caractère évolué).
- Les plantes adultes ont la possibilité de devenir crassulescentes, en liaison parfois avec une physiologie C₄ ou CAM. Elles ont la faculté remarquable de pouvoir vivre en milieux très secs (semi-déserts ou zones très salées).

L'existence et la délimitation de la sous-classe des Caryophyllidées n'ont été mis en cause par aucun auteur, même récemment. Elle comprend les ordres suivants:

- Polygonales (une famille: Polygonaceae)
- Plumbaginales (une famille: Plumbaginaceae)
- **Caryophyllales**: très nombreuses familles, dont :
 - Phytolaccaceae (p. ex. raisin d'Amérique)
 - Nyctaginaceae (p. ex. bougainvillées et belles de nuit)
 - Cactaceae
 - Amaranthaceae
 - Portulacaceae (p. ex. pourpiers)
 - Caryophyllaceae (p. ex. œillets, silènes, etc.)

...

Chenopodiaceae: cette famille comprend 4 sous-familles et 12 tribus (Dinan, 1998):

Chenopodioideae

Beteae (6 genres dont le plus important est *Beta*)

Chenopodiaceae

Atripliceae

Camphorosmeae

Scleronaeneae

Corispermeae

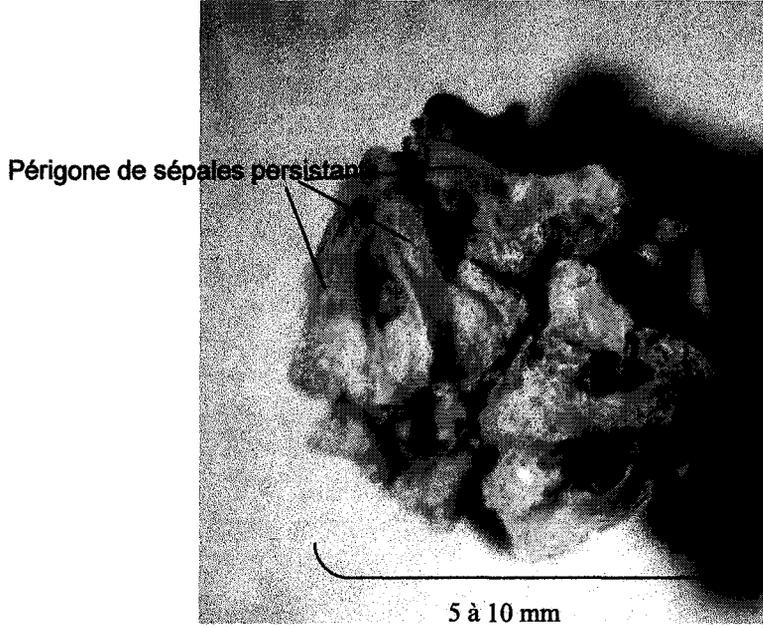
Salicornioideae (2 tribus)

Salsoloideae (3 tribus)

Polycnemoideae

Encadré II. Glomérules de betterave

Glomérule de betterave sauvage (ici 'trigerme')



Semences de sucrière: glomérules monogermes poncés, lavés, enrobés et pelliculés



I Matériel d'étude: la betterave

I-1 Systématique

I-1.1 La grande famille des Chenopodiaceae

L'encadré I situe la famille de la betterave dans un contexte systématique large. Il s'agit d'une **famille forte d'environ 120 genres et 1300 espèces**, de répartition mondiale et comprenant de nombreuses espèces d'importance agricole, qu'il s'agisse de cultures proprement dites ou de mauvaises herbes. Le genre *Chenopodium* en est le genre "type", et comprend plusieurs dizaines d'espèces, dont le très célèbre *Chenopodium album*, qui est l'une des cinq plantes les plus communes du monde. Le genre *Beta* est important économiquement, avec diverses formes cultivées: betteraves à sucre, fourragères, blette (et poirées), betteraves rouges. En outre, la betterave est depuis longtemps un modèle expérimental très prisé des biologistes pour l'étude des phénomènes physiologiques fondamentaux chez les plantes (voir Bell *et al.* 1997). On consomme aussi les feuilles de l'épinard (*Spinacia sp*) ou de l'arroche (*Atriplex sp*), ainsi que les graines de *Chenopodium quinoa*. D'autre part, on a longtemps extrait NaOH à partir des cendres des *Salsola*, *Sueda* (les "soudes" du bord de mer) ou des *Salicornia*.

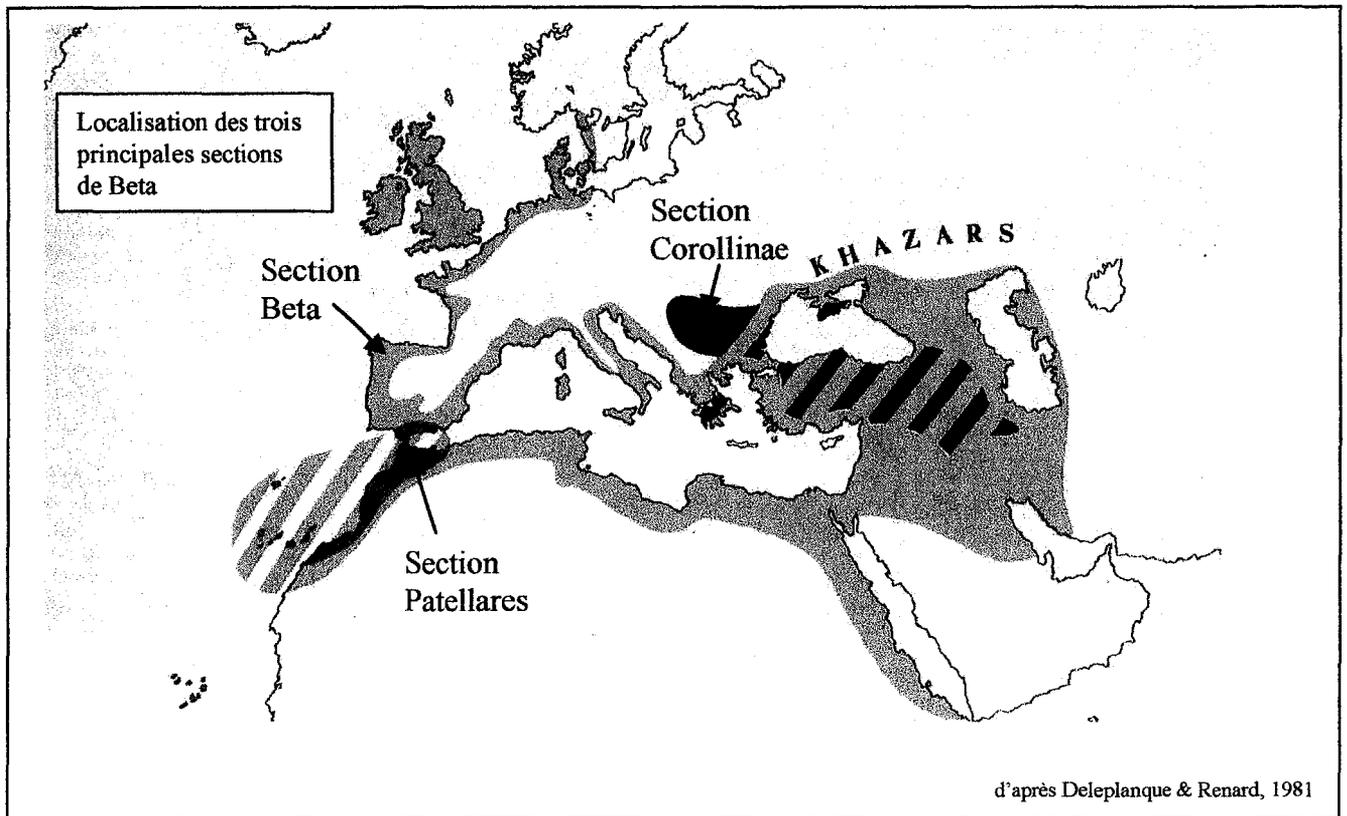
Les Chenopodiaceae sont des plantes herbacées, presque toutes **halophytes**, ce qui transparaît dans leur structure anatomique ou dans leur port extérieur. Leur physiologie est de type C₃ (*Beta*, *Atriplex*, *Chenopodium*, *Halimione*, *Salicornia*, *Salsola*, *Spinacia*, *Suaeda*, etc.) mais le type C₄ est aussi présent dans de nombreux genres (*Atriplex*, *Kochia*, *Salsola*, *Suaeda*). La famille est homogène du point de vue des caractères floraux. **Les fleurs sont minuscules ou petites, régulières, cycliques.** Elles sont souvent groupées en de **petites cymes**, contractées en glomérules. **La fleur est apétale, hermaphrodite et protandre:** on note en général 5 "sépales" verts (précisément un **périgone de 5 tépales**), 5 étamines et 2-3 carpelles, avec cependant de nombreuses variations autour de ce type. **Le pollen, trinué, est polyporé. Le gynécée est syncarpe**, supère (sauf chez *Beta* où il est **semi-infère**). **L'ovaire bicarpellé est uniloculaire, avec un seul ovule.** Le fruit est sec (non charnu), déhiscent ou non, avec parfois une coalescence des gynécées des fleurs adjacentes, qui se soudent pour former un fruit multiple, comme c'est le cas chez *Beta*¹. L'encadré II précise la description du fruit particulier (le glomérule) de *Beta vulgaris* (sauvages et cultivées).

I-1.2 Le genre *Beta*

Le genre *Beta* est originaire de l'ancien monde: sa répartition actuelle correspond surtout au bassin méditerranéen pris au sens large, mais remonte jusqu'en Scandinavie. On rencontre la betterave maritime sur les côtes atlantiques de l'Europe ainsi que partout dans le bassin

¹ En fait, le fruit des chénopodiacées est "toujours" un akène, ... sauf chez la betterave.

Fig. 1. Distribution géographique des trois principales sections du genre *Beta*



Méditerranéen. Son extension vers l'Est l'amène jusqu'au subcontinent Indien. Elle se fait discrète sur les côtes allemandes, néerlandaises et belges mais est abondante en Grande-Bretagne et en France.

Le genre *Beta* est subdivisible en groupes cohérents morphologiquement, ayant en sus une distribution géographique séparée, voire des préférences d'habitat marquées. Il est divisé en **quatre sections** (Ulbrich, 1934 in Coons 1954) dont la répartition est présentée Figure 1. (1) Section **Beta** (anciennement nommée Vulgares) (2) Section **Corollinae** (la plus proche de la section Beta morphologiquement et génétiquement; quelques hybridations avec les représentants de cette dernière section semblent possible (voir, Coons 1975) (3) Sections **Nanae** (4) Section **Procumbentes** (syn. Patellares). Une phylogénie par RAPD et séquençage (ITS rDNA) révèle trois grands groupes : Procumbentes, Beta puis Nanae-Corollinae, ce dernier groupe étant plus proches de Beta que de Procumbentes (revue dans Shen *et al.* 1998). L'analyse moléculaire (Senda *et al.* 1995) révèle aussi six grands types mitochondriaux pour l'ensemble des quatre sections, avec un seul type pour la section Beta (à l'exception de *B. patula*).

Les betteraves qui nous intéressent appartiennent à la section Beta, dont la taxonomie complexe a été revue fort à propos par Letschert (1993). Cette taxonomie corrige celle établie en 1989 par le Bureau International pour les Ressources Génétiques des Plantes (IBPGR).

1-1.3 La section *Beta* du genre Beta

La classification de ce groupe s'est toujours révélée difficile, et la coexistence d'espèces cultivées et sauvages a engendré beaucoup de confusions. Une importance trop grande était donnée à de nombreux variants mineurs, actuellement redescendus au rang de sous-espèces ou de variétés. Une première clarification des statuts de toutes les formes décrites est apparue avec une analyse morphométrique conduite en conditions contrôlées par Ford-Lloyd & Williams (1975, cités par Letschert 1993) sur des représentants sauvages, cultivés primitifs et cultivés modernes. Les auteurs ont conclu à une **variation continue entre les groupes** ainsi qu'à une **grande variation intra-accession**.

1-1.3.1 Appellations Linnéennes *Beta vulgaris* et *Beta maritima*

Letschert rapporte que Linné réunit au sein de *Beta vulgaris* les plantes cultivées et sauvages dans son protologue de *Species plantarum* en 1753. Linné reconnaissait les betteraves cultivées comme dérivées des betteraves sauvages et accordait une importance particulière à certaines formes, appelées var. *perennis*, *cicla* et *rubra*. La var. *perennis* était alors synonyme de *Beta sylvestris maritima*, décrite antérieurement par le botaniste Bauhin (1623). Dans la seconde édition de *Species plantarum* cependant, Linné éleva au rang d'espèce la var. *perennis* en lui accordant le nom de *Beta maritima*, séparant de fait les betteraves sauvages ("aux branches

décombantes") des variétés cultivées ("aux branches érigées"). Puis la var. *cicla* devint *Beta cicla* L. (on retrouve encore ce terme de *cicla* dans la littérature actuelle).

I-1.3.2 Taxonomie actuelle: sous-espèces vulgaris et maritima

Dans sa révision taxonomique, Letschert (1993) conçoit l'espèce comme un groupe d'individus qui partagent un ensemble de traits morphologiques différents de ceux d'autres groupes. Mais il souligne que si l'espèce est définie par des discontinuités morphologiques, il faut se garder de valider taxonomiquement des variations entre populations ou groupes de populations de différentes régions quand ils n'expriment que le potentiel de différenciation écotypique du groupe considéré (en revanche, la sous-espèce sera utilisée pour désigner des groupes de populations cohérents géographiquement et clairement discernables morphologiquement). La sous-espèce n'a cependant aucune pertinence géographique lorsqu'elle sert à placer formes cultivées et sauvages dans la même espèce, ce qui est le cas pour nos betteraves. En définitive, **trois espèces sont retenue pour la section Beta: *B. vulgaris*, *B. macrocarpa* et *B. patula***. Cette dernière espèce est une endémique de quelques îles Macaronésiennes (Madère) et se trouve isolée géographiquement des deux autres, qui à l'inverse sont parfois sympatriques.

B. vulgaris comprend les sous-espèces *adanensis* (Grèce et Turquie) et *maritima* (ensemble des côtes européennes). *B. vulgaris* subsp. *maritima* regroupe dorénavant quelques dizaines de sous-espèces ou variétés dont la taxonomie apparaissait trop fantaisiste. La tradition d'accorder aux plantes cultivées le rang de sous-espèce pour les lier à leurs apparentés sauvages est maintenue, pour ne pas perdre l'usage du nom de *B. vulgaris* subsp. *maritima* qui était devenu fort utilisé. Les betteraves cultivées sont donc étiquetées comme *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* même si Letschert eut préféré une classification en cultivars plutôt qu'en sous-espèces. D'autre part, il est actuellement considéré que les affinités évolutives entre ces "cultivars" sont suffisantes pour oublier toutes les autres catégories infraspécifiques utilisées dans les classifications passées. Ford-Lloyd (1986) proposa néanmoins le maintien d'une séparation en deux groupes qui rappelleraient des origines géographiques de domestication différentes. Cet auteur proposa *B. vulgaris* subsp. *cicla* pour regrouper l'ensemble des betteraves "feuilles" (blettes, poirées et autre cardes - ensemble génétique méditerranéen et ancien) en opposition avec *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* qui comprendrait les betteraves "racines" (sucrières, fourragères et rouges - domestication plus récente et nordique). Cette distinction au rang de sous-espèce semble cependant définitivement exagérée (Letschert, 1993).

I-2 La betterave sauvage littorale *B. vulgaris* ssp *maritima*

On rencontre la betterave maritime [*B. vulgaris* subsp *maritima* (L.) Arcangeli (1882)] sur les côtes atlantiques de l'Europe ainsi que partout dans le bassin Méditerranéen. Son extension vers

l'Est l'amène jusqu'au subcontinent Indien (Fig. 1) . Elle se fait discrète sur les côtes allemandes, néerlandaises et belges mais est abondante en Grande-Bretagne et en France.

Dans son aire nordique, la betterave maritime se cantonne dans une bande étroite autour de la laisse de mer. Les falaises rocheuses et les plages de sable grossier lui conviennent aussi tandis que les prairies salées denses, les plages sableuses, les marais salants et les sites perturbés lui sont moins favorables (Letschert, 1993). On retrouve la betterave dans la plupart des descriptions phytosociologiques concernant le littoral. La présence de *Beta* est fréquemment mentionnée dans les différentes classes et groupements définis par les phytosociologues. Gehu (1976) a proposé un schéma synsystématique des végétations de vase salées atlantiques françaises, basé sur 1600 relevés. La classe des *Cakiletea*, par exemple, est présente dans tous les estuaires. Elle est symptomatique d'un milieu où la betterave se rencontre dans son statut de "sauvage" au sens le plus strict. Cette classe caractérise la **végétation annuelle ou bisannuelle, halonitrophile, des bordures maritimes enrichies en dépôts organiques**. Elle comprend notamment le groupement *Beto-Atriplicetum littoralis*, qui caractérise une association annuelle **colonisant les paquets de laisse de mer au sommet du schorre**². *Beta vulgaris* subsp *maritima* y constitue une bonne différentielle d'association; on la rencontre alors sous forme de rosette. Cependant, si le milieu reste stable plusieurs années, un nouveau groupement lui succède, l'*Atriplici-Betetum maritimae*, très caractérisé par la fructification de la betterave. Ce groupement est aussi présent sur les falaises occupées par les oiseaux de mer.

Dans son aire Méditerranéenne, les populations sont toujours principalement maritimes mais les habitats plus diversifiés, et les populations non littorales ne sont pas rares (Letschert, 1993). On retrouve la betterave dans des sites rudéralisés. Les situations possibles comprennent les sites abrités sur sol perturbé, galets, ainsi que les marais salants.

1-3 La domestication des betteraves

C'est dans la section Beta qu'a eu lieu la domestication. Les quatre formes cultivées - sucrières, fourragères, blettes et rouges - sont dérivées les unes des autres (des données sur le polymorphisme de l'ADN ribosomal nucléaire semble confirmer l'hypothèse d'un ancêtre unique pour les quatre formes de cultivées actuelles, Santoni & Bervillé 1992). L'histoire lointaine de cette domestication est certes parcellaire, mais un historique plausible a pu être reconstitué en croisant des informations botaniques, agronomiques et ethnographiques (De Candolle 1883; Deleplanque & Renard 1981). Il apparaît que toutes les betteraves sauvages des sections Corollinae et Beta ont été consommées (feuilles et racines) par le bétail comme par l'homme, et représenteraient encore parfois une source de nourriture printanière non négligeable.

² schorre: partie haute d'un estuaire située entre le niveau moyen des pleines mers de morte-eau et le niveau moyen des pleines mers de vive-eau.

Encadré V. La multiplication des semences

Les semences des betteraves sucrières sont multipliées en France et en Italie (3 à 4500 ha dans chaque pays), ce qui couvre la quasi-totalité des besoins de l'Union Européenne. En France, la culture de porte-graines de sucrière intéresse 4500 ha, principalement dans le Sud-ouest (>3000 ha). La zone de multiplication du Sud-ouest est une zone majeure (70% de la production), très utilisée depuis les années 60. La vallée de la Durance, sollicitée depuis les années 80, se place en second (20% de la production), suivie de la Beauce-Val de Loire (500 ha). Toutes les firmes européennes sont présentes dans le Sud-ouest.

Les hybrides commerciaux sont croisés en bandes de lignées mâles stériles monogermes, avec des lignées pollinisatrices (6 x 2 rangs en général). Dans le Sud-ouest, les lignées sont mises en terre au printemps sous forme de plants vernalisés (les "planchons") tandis qu'elles sont issues de semis estival direct en Beauce et en Durance. Afin d'éviter des pollinisations indésirables par d'autres sucrières ou d'autres formes cultivées, la réglementation impose un isolement de 1000 m avec les betteraves "sauvages" ou non sucrières (distance réduite à 300 m en cas de variétés sucrières de même ploïdie et à 600 m si la ploïdie est différente). Des îlots de variétés sont même créés dans le Gers et le Lot-et-Garonne où se concentre une grande part de la multiplication des semences. Le GNIS¹ a établi des zonations précises, qui repoussent la multiplication des fourragères, des poirées et des rouges dans d'autres régions. Dans tous les cas, les lignées fournies aux multiplicateurs sont issues de "semences de bases", dont la multiplication par le sélectionneur est réalisées sur de petites parcelles, en logettes de chanvre. En 1997, 307 variétés ont été multipliées en France, dont 99 seulement sont inscrites au catalogue du CTPS² et destinées à la France: les 2/3 des variétés restantes, qui occupent 50% des surfaces de multiplication, sont destinées à l'exportation (Union Européenne, Maghreb, Europe de l'Est).

Portes-graines durant la maturation (les pollinisateurs ont été détruits)



¹ GNIS: Groupement National Interprofessionnel des Semences

² CTPS: Centre Technique Permanent de la Sélection

Encadré VI. Quelques éléments sur la sélection de la betterave sucrière

Avant la seconde guerre, les sucrières sont des "variétés populations" diploïdes, c'est à dire un ensemble de plantes génétiquement différentes. On en sème les glomérules contenant trois à quatre graines inséparables qui donnent autant de futures plantules qu'il faudra démarier en champ. En 1940, on découvre qu'un **hybride triploïde** entre deux parents, l'un diploïde, l'autre tétraploïde, apporte un rendement très supérieur (le parent tétraploïde n'ayant pas lui-même un rendement très différent du diploïde). La récolte des semences de ces hybrides triploïdes impose que les plantes maternelles soient mâles stériles (la betterave n'est pas aisément castrable au moment de la production commerciale des semences). Cela sera rendu possible grâce à la découverte de la **stérilité mâle cytoplasmique** par Owen en 1936. Les lignées sont maintenues stériles par des lignées conservatrices, dites "Type O" (en hommage à Owen). La première variété triploïde commerciale ne verra le jour qu'en 1961 (Middelburg 1989). Parallèlement, Savitsky découvre en 1948 la **monogermie génétique**, qui va permettre l'essor de la culture betteravière en supprimant le fastidieux démariage manuel des précédentes variétés multigermes. Les monogermes génétiques sont disponibles dans la décennie 1970-1980, qui voit l'abandon définitif du démariage (Defalque & Guyot 1987).

A ces trois "révolutions" (Thonon 1987) - variété triploïde, stérilité mâle et monogermie - vont s'ajouter les améliorations issues des biotechnologies (micropropagation, gynogenèse). De multiples sélections s'ensuivront, pour davantage de sucre, plus facilement extractible, des racines plus homogènes qui ne s'entourent pas de terre à la récolte, une plus grande tolérance aux maladies et aux ravageurs, un pouvoir germinatif et une levée améliorée, etc. **La betterave fut la première plante à bénéficier de la sélection généalogique, de l'utilisation à grande échelle de la stérilité mâle et de la polyploïdie** (Desprez & Desprez 1993). Déjà en 1883, De Candolle, citant les expériences fructueuses de Vilmorin, indique que **la betterave est une des plantes les plus faciles à améliorer par la sélection**. La teneur en sucre par exemple est passée de 7% de la matière fraîche en 1812 à plus de 17% aujourd'hui (gain dû à la génétique pour moitié selon Desprez). Les années 90 voient ensuite l'apparition de "prototypes" transgéniques.

L'amélioration des variétés met à contribution les ressources génétiques des anciennes variétés mais aussi de *B. vulgaris* subsp *maritima* (Santoni & Bervillé 1992). Des croisements avec des betteraves potagères à racine bien ronde ont ainsi été réalisés pour améliorer la forme racinaire et réduire la tare-terre (Thonon 1987). C'est par ailleurs une idée ancienne chez les sélectionneurs qu'il faut croiser les cultivées avec les sauvages pour augmenter la qualité des cultivées (Proskowitz 1890, cité par Coons 1975): on réalisa notamment des back-cross répétés avec des sauvages italiennes de la vallée du Pô et de la côte Adriatique, ainsi que des croisements avec des sauvages françaises pour lutter contre le *leaf spot* (Coons 1975). La mode se perdra ensuite pour être ravivée début 70. "La variabilité de la betteraves est telle qu'il existe toujours une population de par le monde qui possède des caractères agronomiques intéressants" (Laby 1991). On puise aussi dans d'autres sections que la section Beta, par exemple pour la résistance aux nématodes (section Procumbentes) ou au virus du curly-top (section Corollineae), voire pour améliorer la monogermie ou générer de l'apomixie.

Les betteraves **potagères** sont introduites en Grèce dès -3500 ans et en Italie vers -2000 ans, par des migrants venus de l'est du bassin méditerranéen. Il s'agirait des plus anciennes betteraves cultivées ; elles sont citées par Aristophane, Hippocrate et Plin (Deleplanque & Renard 1981). D'autre part, Aristote mentionne des betteraves à cardes rouges et Théophraste des cardes plus ou moins verts, quatre siècles avant J.C. (Campbell 1979). Les romains et leurs bêtes se nourrissent de betteraves, sans doute maritime (le terme de *Beta* leur est dû): la première description allemande de la betterave cultivée sera sous le terme de "betterave romaine".

La betterave **sucrière** est plus récente et serait issue d'une betterave "fourragère-potagère" circum-caucasienne, phénotypiquement assez proche de nos sucrières hormis sa racine plus gracile (Deleplanque & Renard 1981). Cette betterave aboutit enfin en Pologne et Silésie à la fin du XII^e siècle, accompagnant des groupes de migrants turco-mongols, les Khazars, dans leurs déplacements. Elle donnera la fameuse "Blanche de Silésie", qui passe pour être à l'origine de toutes nos variétés cultivées actuelles.

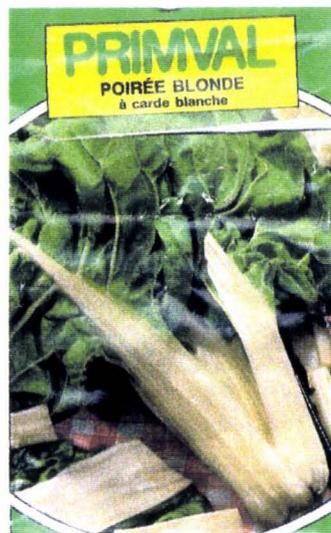
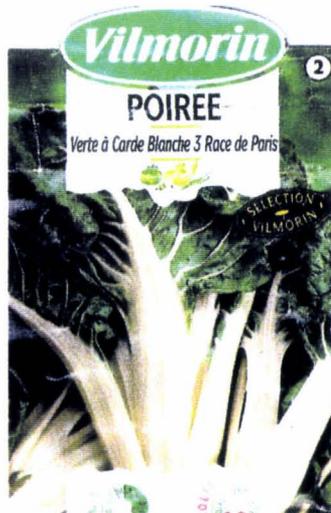
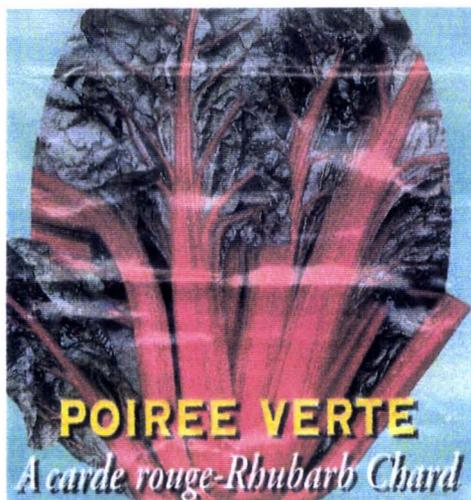
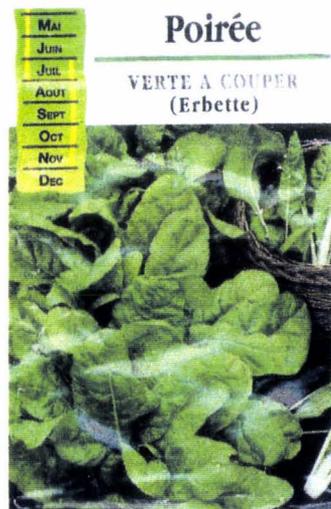
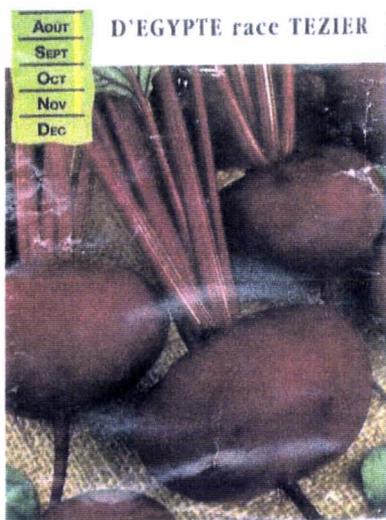
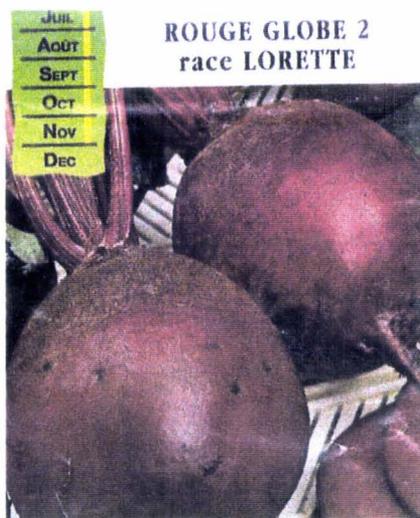
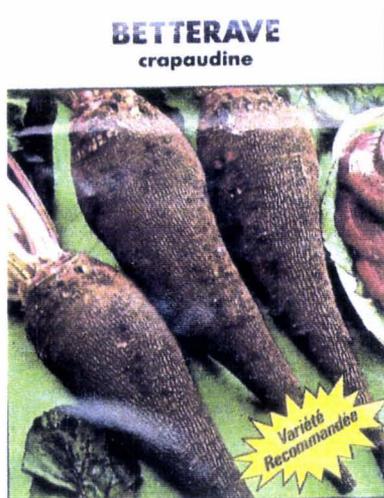
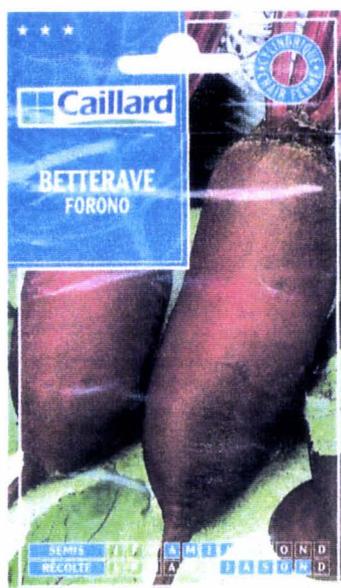
L'encadré III décrit l'apparition des sucrières en France. En 1800, la betterave quitte l'ancien monde pour les USA (aujourd'hui les premiers mondiaux en culture betteravière). Actuellement, de nombreux pays cultivent la betterave sucrière. La plupart des pays européens sont d'ailleurs susceptibles d'abriter aussi des betteraves sauvages sur leur façade maritime (Encadré IV).

1-3.1 Betterave sucrière

(parfois appelée *B. vulgaris* var '*altissima*')

La betterave sucrière est un hybride, dont les semences sont multipliées principalement dans le Sud-ouest (Encadré V). Cette plante bisannuelle accumule des réserves de saccharose dans une énorme racine pivotante lors de la phase végétative: (le feuillage ne représente que 20% du poids en matière sèche, Bell *et al.* 199?). La deuxième année serait une phase de reproduction si la récolte n'intervenait pas avant. L'encadré VI donne un aperçu de la sélection qu'a subit la betterave sucrière. Le niveau de ploïdie des variétés est particulièrement important à considérer (chap. 4 & 5): **Les hybrides triploïdes ont été longtemps prépondérants en Europe** (contrairement aux USA où on leur a toujours préféré les diploïdes): entre 1988 et 1991, ils représentent 87% de l'offre variétale française (Laby 1991) mais chutent à 75% en 1996. **La tendance à la baisse se confirme, et la variété la plus vendue depuis quelques années est diploïde. L'augmentation des diploïdes s'accélère avec le développement des nouvelles variétés, tolérantes aux nématodes ou résistantes à la rhizomanie** (les surfaces touchées par la rhizomanie ont triplé de 1993 à 1995): ces variétés, qui doivent être mises au point le plus rapidement possible, sont quasiment toutes diploïdes, et sont très conseillées aux planteurs. La triploïdie aurait permis de compenser les faibles performances agronomiques des premières lignées maternelles -monogermes génétiques diploïdes- par croisement avec un pollinisateur tétraploïde. Leur intérêt s'émousse donc au fil de l'amélioration

Fig. 2. Quelques exemples de la diversité des betteraves rouges et des blettes (poirées)



des diploïdes monogermes (campbell 75). Les hybrides diploïdes récents sont jugés capables de rivaliser vers la fin des années 1980 (Bosemark 1989). D'autre part, l'avantage des triploïdes aurait résidé jusque maintenant dans le bon usage de l'hétérozygoté, qui dépendait du nombre de gènes quantitativement différents apportés par le pollinisateur tétraploïde. Mais depuis trente ans les tétraploïdes sont des diploïdes doublés à la colchicine, de sorte que ce potentiel d'hétérozygoté a déjà été largement exploité ; les améliorations futures dépendront donc de la qualité apportée à la sélection des nouveaux pères. Il faudra évidemment éviter les hybrides diploïdes formés à partir de deux lignées hautement consanguines (les sélectionneurs retrouvent ici une raison "d'incorporer du neuf" à partir de *B. maritima*).

1-3.2 Betterave fourragère

(parfois appelée *B. vulgaris* var '*crassa*')

Sa culture n'est pas industrielle comme dans le cas de la sucrière mais concerne de petites surfaces destinées à nourrir le bétail. Les fourragères semblent plus susceptibles à la montée à graine que les sucrières et sont par ailleurs souvent moins désherbées que ces dernières. Beaucoup de variétés sont encore multigermes même si les variétés récentes sont monogermes, avec une offre totale de 34 variétés en 1995 (ADBFM: Association pour le Développement de la Betterave Fourragère Monogermes). Les variétés se répartissent en 'Fourragère', 'Fourragère Sucrière' et 'Sucrière Fourragère', ce qui témoigne là encore que les frontières entre les formes cultivées sont loin d'être étanches.

1-3.3 Betteraves potagères (blettes et betteraves rouges)

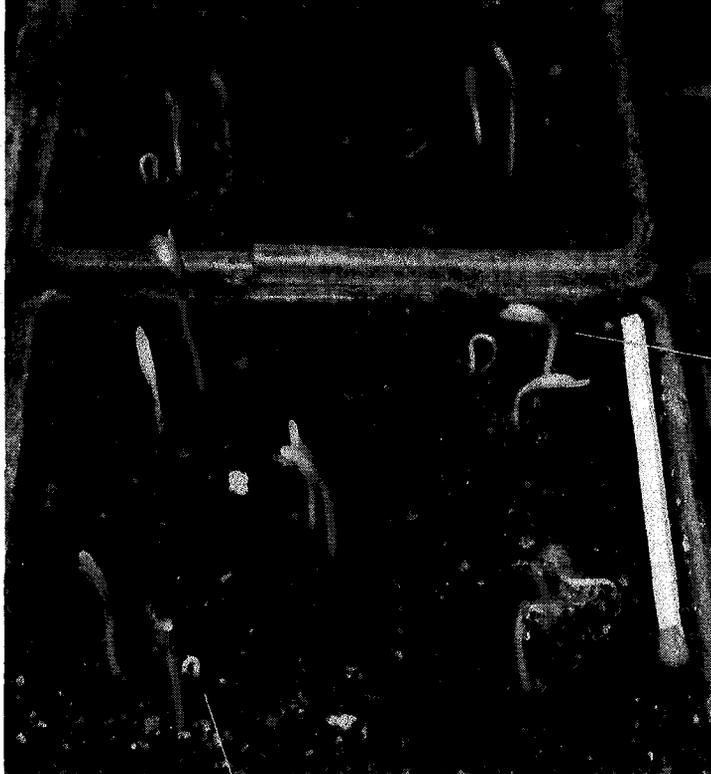
(parfois appelées respectivement *B. cicla* var '*cicla*' et *B. vulgaris* var '*conditiva*')

Betteraves "feuilles": ce sont les blettes, dites aussi bettes, cardes ou poirées. On les consomme pour leur grandes feuilles et/ou leur cardes blancs (le cardé correspond à l'ensemble pétiole + grosse nervure principale du limbe de la feuille). Certaines variétés ornementales qui possèdent des cardes "multicolores" (rouge, rose, jaune-orangé...) sont de plus en plus utilisées dans les parterres municipaux (Obs. Pers.).

Betteraves rouges: il s'agit des betteraves potagères dont on mange la racine cuite. La couleur rouge est donnée par un gène dont l'allèle dominant R sert aussi de marqueur en sélection chez les autres formes. Une des variétés de cette forme est la "betterave d'Egypte", dont un ancêtre aurait nourri les constructeurs des pyramides. En général la racine est ronde, bien que certaines variétés anciennes présentent une racine allongée (e.g. la Crapaudine). La figure 2 donne un aperçu de la diversité des blettes et des betteraves rouges.

Fig. 3. Germinations (glomérules multigermes)

Semis de cinq glomérules par pot



Trois plantules
pour un glomérule

L'embryon des Chenopodiaceae est courbe:
la racicule et les cotylédons sont encore dans la graine
quand l'hypocotyle apparaît

II Techniques utilisées

II-1 Culture en milieu contrôlé

Les graines récoltées sur le terrain sont mises en culture pour permettre l'observation des traits de vie des plantes. Le semis a toujours lieu en serre puis les plantes sont repotées, et éventuellement déplacées à l'extérieur ou repiquées en pleine terre.

II-1.1 En serre

Les serres du laboratoire garantissent une température constante de 20-22°C et une photopériode de 16 h (jour long). Les plantes non vernalisées qui montent à fleur dans ces conditions sont supposées avoir l'allèle B du gène du *bolting*.

II-1.1.1 Semis

Les glomérules sont traités contre la fonte de semis par un trempage dans un bain de Rovral® (Rhone-Poulenc) juste avant leur semis en pots ou en barquettes dans du terreau (terreau pour semis et bouturage de Kanifrance). La profondeur de semis est de moins d'1 cm de profondeur (environ la hauteur du glomérule concerné). Le terreau est aspergé avec un second fongicide immédiatement après le semis (Dericlor® de La Quinoleine). Tous les arrosages ultérieurs sont faits avec l'eau du réseau urbain.

II-1.1.2 Levée de "dormance"

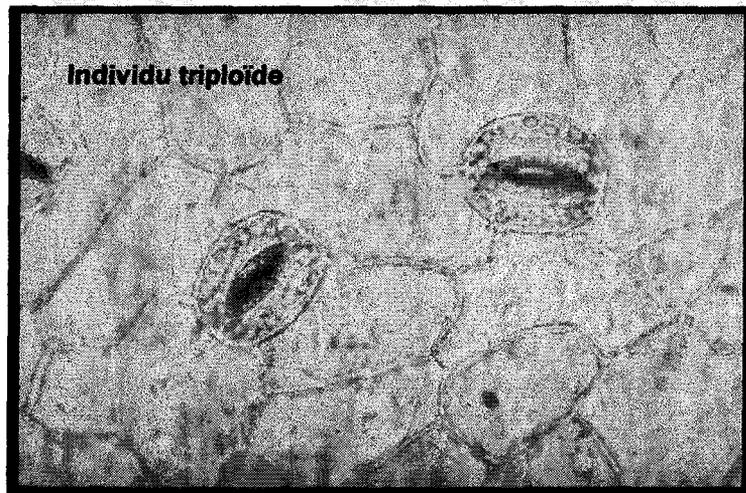
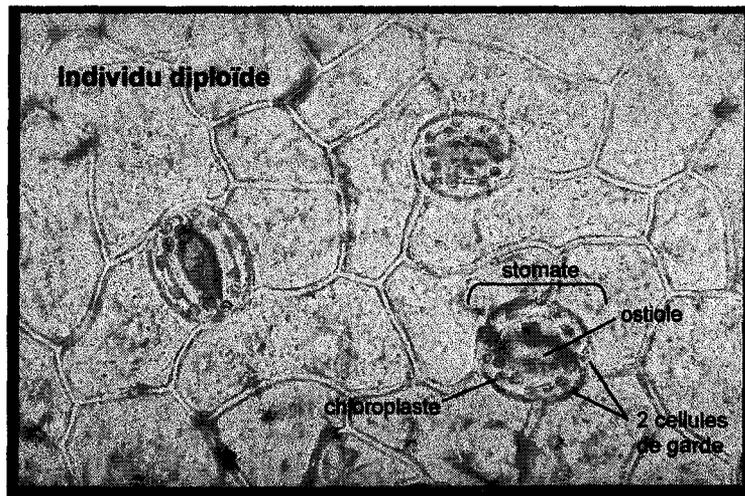
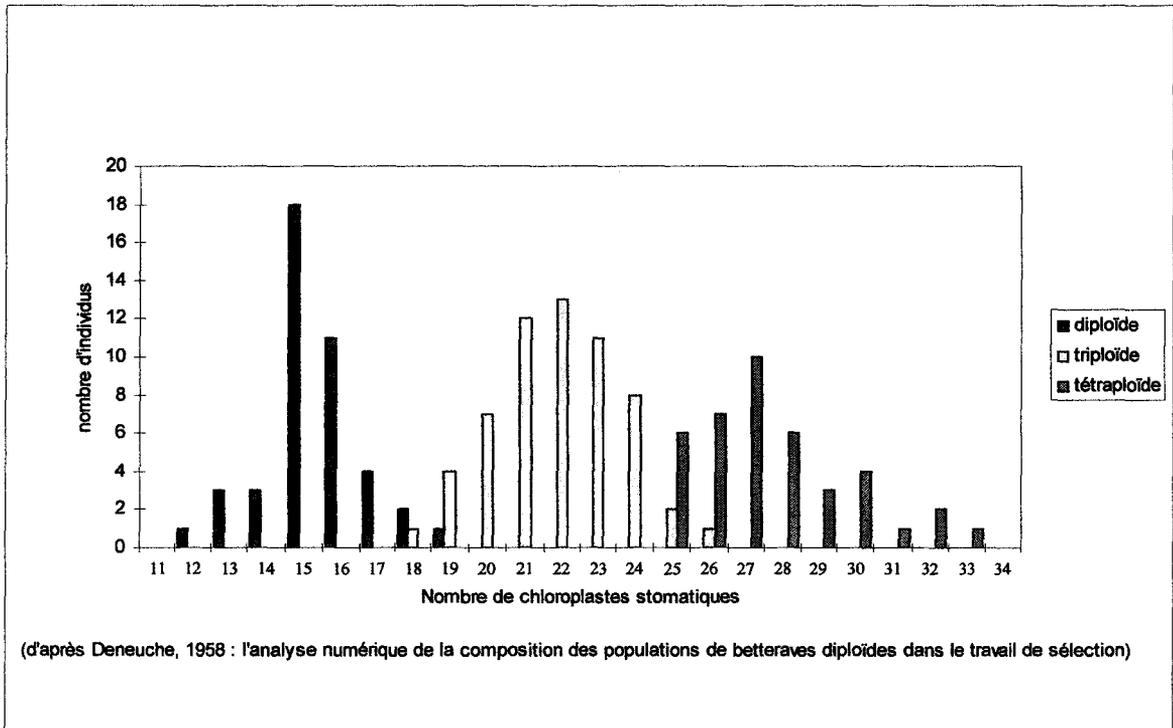
Le relevé de germination³ est quotidien jusqu'au 20^{ème} jour environ. De nombreux glomérules semés ne présentent pas de plantule. Dans le cas de semis en pot, les pots sans aucune germination peuvent être placés tel quels pendant 4 semaines en atmosphère sèche, sans arrosage. Ils sont ensuite ré-humidifiés comme pour un semis normal: on note alors une seconde vague de germination, et éventuellement par la suite une troisième après un second traitement au sec. Il semble que le séchage agisse mécaniquement sur le péricarpe du fruit, qui est épais et peut gêner l'absorption d'eau.

II-1.1.3 Rempotage et suivi des plantes

Les plantules sont repiquées en pot de 17 cm de diamètre, dans un terreau de rempotage (Kanifrance). L'opération a lieu environ 21 jours après la levée (le rempotage est échelonné, de la même façon que la germination s'est échelonnée selon les individus). Une seule plantule, au hasard, est repiquée dans le cas où un glomérule en donne plusieurs (cas général ; exemple Fig. 3). Lorsque plusieurs glomérules de la même descendance maternelle ont été semés, les plantules repiquées sont également choisies au hasard, sans sélection quant à leur précocité de germination. Les plantes sont régulièrement traitées contre les maladies cryptogamiques (dont l'oïdium), et les ravageurs

³ Il s'agit en fait de levée (apparition de l'hypocotyle incurvé à la surface du terreau) et non de germination proprement dite (émission de la racine à travers le tégument de la graine).

Fig. 4. Distribution du nombre de chloroplastes en fonction du niveau de ploïdie réel



(pucerons, thrips et araignées rouges essentiellement). Les pots sont périodiquement déplacés pour éviter d'éventuels gradients thermiques ou lumineux pouvant fausser les mesures de trait de vie. Selon les cas, un engrais solide à dissolution lente peut être apporté.

II-1.2 A l'extérieur

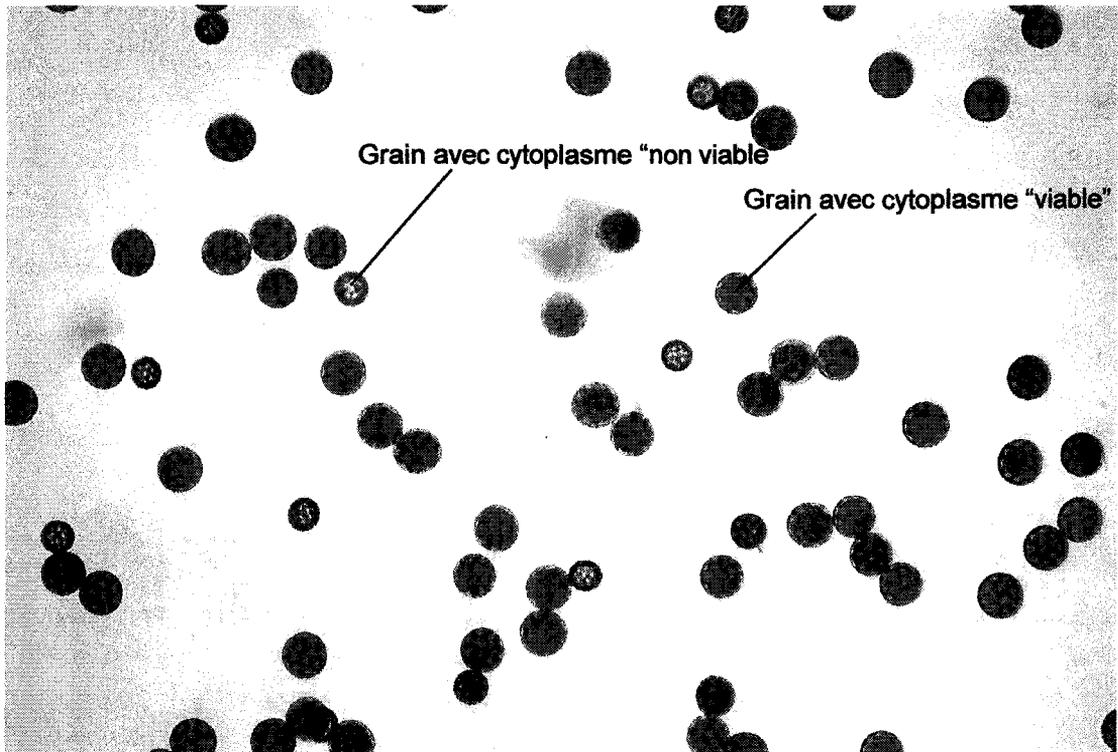
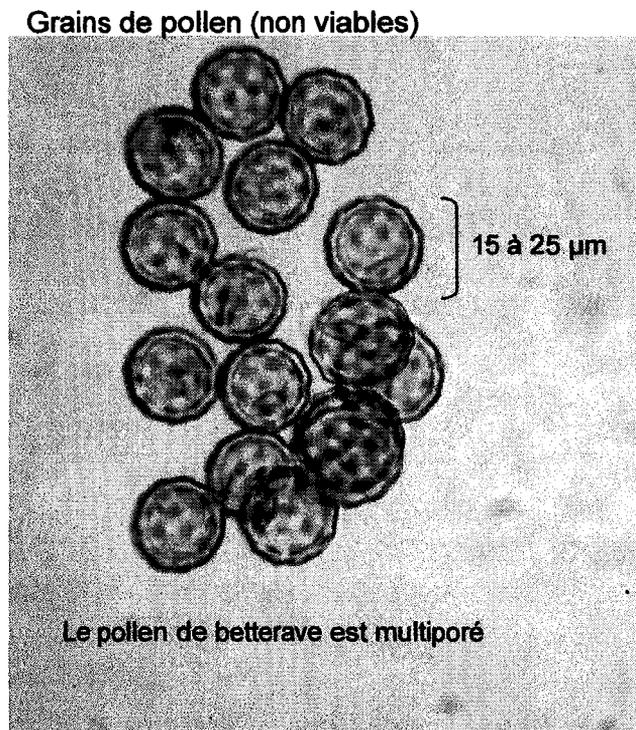
Les plants repotés ont pour certains été placés à l'extérieur après acclimatation de 15 jours des jeunes plants en serre non thermo-régulée (la température y varie entre 5 et 30°C en fonction de la température extérieure). Certaines plantes furent aussi repiquées directement en pleine terre, dans une sol franc, profond, supposé homogène en structure et uniformément riche en nutriments. Dans les deux cas, les plantes sont tributaires des conditions météorologiques, c'est à dire surtout de la pluviométrie. Les betteraves en pleine terre disposent d'une réserve en eau conséquente et ne souffrent pas d'excès ni de carence en eau. Les plantes peuvent alors présenter un développement spatial considérable, sans comparaison avec celui présenté en pot pour les même provenances de graines. Les plantes en pot doivent être arrosées quotidiennement en été, mais souffrent surtout d'excès d'eau en cas de précipitations excessives et continues, ce qui entraîne un pourrissement de la racine dans bien des cas, sans que l'expérimentateur ne puisse y remédier.

II-2 Détermination du niveau de ploïdie

Nous avons estimé le niveau de ploïdie de façon indirecte, par comptage du nombre de chloroplastes dans les cellules de garde stomatiques (Jahier 1992). Cette technique est couramment utilisée par les sélectionneurs de betterave (Brown *et al.* 1991). L'alternative serait la mesure directe, au cytomètre de flux (Dolezel 1998).

La technique consiste à prélever un fragment d'épiderme inférieur de feuille fraîche, et à réaliser un montage entre lame et lamelle dans une solution de nitrate d'argent à 1%. L'AgNO₃, qui mets en évidence les régions riches en "flux de protons", colore les chloroplastes en orangé-brun, dans les minutes qui suivent le montage (exposition à la lumière du jour). Les chloroplastes des deux cellules de garde de chaque stomate sont ensuite comptés au microscope, grandissement 400-600. Pour chaque individu, la valeur retenue est la moyenne des comptages sur 10 stomates. Chaque niveau de ploïdie (*i.e.* diploïde, triploïde et tétraploïde) est associé à une fourchette différente du nombre de chloroplastes (Fig. 4). La limite majeure de la méthode est le léger recouvrement des trois courbes de Gauss, qui ne permet pas de conclure pour certaines valeurs. Par exemple, la valeur '19 chloroplastes' peut correspondre à un individu diploïde ayant beaucoup de chloroplastes ou à un individus triploïdes qui en aurait peu. Cette ambiguïté est générale et intervient aussi lorsqu'on estime le niveau de ploïdie par d'autres méthodes indirectes comme la mesure de la taille des chloroplastes (e.g. Misset & Gourret 1996). D'autre part, la coloration est parfois capricieuse, ou l'épiderme peu translucide pour cause de mésenchyme adhérent, ce qui gêne singulièrement la lecture (ces limites semblent tributaires de l'état physiologique de la plante, en

Fig. 5. Observation du pollen (coloration d'Alexander)



relation avec les conditions météorologiques, sans qu'il ne m'ait été possible d'en tirer une règle générale). Ces réserves mises à part, la technique est fiable et facile à mettre en œuvre. Elle reste cependant assez fastidieuse et impose de revenir rapidement au laboratoire pour l'analyse lorsque les feuilles sont prélevées sur le terrain (analyse de matériel sec impossible).

II-3 Fertilité pollinique

Une quantification simplifiée de la stérilité mâle a été menée par observation de la viabilité du pollen et de sa quantité par anthère, à partir de plantes cultivées en pot, à l'extérieur (la culture en serre tend à biaiser par excès la stérilité mâle ; R. Lahousse, Com. Pers.).

II-3.1 Viabilité du grain de pollen

La viabilité des grains de pollen est estimée après coloration par la méthode d'Alexander. Les grains ayant un cytoplasme "vivant" se colorent en rouge et sont supposés viables, tandis que les grains stériles ne montrent que leur paroi dont l'exine est colorée en vert (Fig. 5). Les prélèvements ont été effectués sur des fleurs encore fermées, mais à moins d'un jour de l'anthèse: ce sont les fleurs situées juste au dessus d'une fleur ouverte sur la hampe florale. Pour chaque individu, trois étamines de trois fleurs différentes ont été utilisées. En général, les fleurs étaient les fleurs centrales (les plus grandes) de trois cymes différentes. Les étamines prélevées ont été directement dilacérées dans le colorant. Les débris de l'anthère sont retirés et la lamelle de recouvrement est lutée avec du vernis incolore. La préparation peut ainsi être conservée à l'obscurité plusieurs semaines avant observation au microscope (grandissement 400-600). Le comptage a été réalisé sur deux fleurs par individu, la troisième préparation n'étant comptée que si les deux premières montraient des valeurs très différents. Pour chaque préparation, les grains des deux catégories sont comptés à l'aide de deux compteurs à main, jusqu'à un total de 300 grains minimum pour l'ensemble des grains fertiles et stériles. La limite de la méthode est son approche indirecte: en effet, la présence de cytoplasme ne préjuge pas de la capacité réelle du grain de pollen à germer (les grains vides sont cependant forcément stériles).

II-3.2 Production de pollen

La quantité de pollen par anthère est estimée par comptage en cellule de Thoma: Une étamine de chacune des fleurs précédemment examinées (coloration d'Alexander) est déposée en tube Eppendorf dans 500 μ l d'éthanol. L'étamine est ensuite soigneusement déchiquetée à l'aide d'un piston calibré, de façon à ce que tous les grains de pollen soient en suspension dans le médium. Le tube est ensuite vortexé 30 secondes pour homogénéisation et une fraction en est prélevé immédiatement avec une pipette Pasteur, puis déposée dans les deux loges calibrées de la cellule de Thoma. La somme des deux comptages est ensuite notée. Compte tenu de la lourdeur du travail, seule une étamine par individu a pu être analysée.

Encadré VIII. Protocole d'extraction de l'ADN total (selon Dellaporta et al. 1983 modifié)

- ◆ Broyer au mortier 1 gramme de feuille fraîche dans l'azote liquide.
- ◆ Transférer la poudre en tube *Falcon* 50 ml. avec 10 ml. de tampon d'extraction (Tris 0.1 M, EDTA 0.5 M, NaCl 0.05 M, pH 8), 20 µl de β-MercaptoEthanol, 2% de PVP (PolyVinyl-Polypyrrolidone) et 1 ml de SDS 20% (v/v).
- ◆ Placer sous agitation modérée 20 min. à 65°C.
- ◆ Transférer en tube *Nalgène* 30 ml. avec 2 ml. de K Acétate 5M
- ◆ Placer dans la glace 1 heure avec quelques agitations : les protéines et les polysaccharides précipitent sous forme d'un complexe avec le K Dodécyl-sulfate
- ◆ Centrifuger 20 min. à 10000 rpm.-Filtrer sur papier *Miracloth*.
- ◆ Ajouter 1 volume (10 ml.) d'Isopropanol et mélanger délicatement les 2 phases (les acides nucléiques précipitent) ; placer 1 heure à - 20°C.
- ◆ Centrifuger 30 min. à 10000 rpm, si possible avec un rotor de type « swinging ».
- ◆ Jeter le surnageant et sécher à l'air sur papier, tubes retournés
- ◆ Reprendre le culot dans 5 ml. de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM)
- ◆ Précipiter avec 5 ml. d'Isopropanol glacé. Cette seconde précipitation se fait 0.5 ml de Na Acétate 3.3M.
- ◆ Placer une heure à - 20 °C.
- ◆ Centrifuger 30 min. à 10000 rpm.
- ◆ Laver le culot deux fois avec 5 ml. d'Ethanol 70 % glacé
- ◆ Sécher le culot sous vide 10 min.
- ◆ Reprendre les culots avec 1 ml. de TE 1 X.

Encadré IX: protocole d'extraction de l'ADN selon Edwards (pour amplification par PCR).

- ◆ Placer dans la glace les tubes *Eppendorf* de 1.5 ml avec 10 à 50 mg de matériel frais.
- ◆ Ajouter 200 µl de tampon d'extraction.
- ◆ Ecraser avec un piston calibré.
- ◆ Laisser 20 min sur la pailleasse.
- ◆ Centrifuger 4 min. à 14000 rpm (20°C).
- ◆ Reprendre 300 µl de surnageant dans un nouveau tube.
- ◆ Ajouter 300 µl d'isopropanol (4°C). Mélanger doucement et incubé dans la glace (minimum 5 min).
- ◆ Centrifuger 5 min à 14000 rpm (4°C).
- ◆ Vider le surnageant.
- ◆ Sécher le culot au speed-vacuum.
- ◆ Reprendre le culot dans 100 µl de TE (un nuit).
- ◆ Centrifuger et reprendre le surnageant dans une nouvelle série de tubes.

Tampon d'extraction:

Tris HCl pH 8.0	100 mM
EDTA	25 mM
NaCl	250 mM
PVP40	1%
SDS	0.5%

La variance entre les comptages des deux loges de la cellule est assez forte. Nul doute que notre mode opératoire est perfectible, notamment lors de la dilacération de l'anthere, qui gagnerait peut-être à être réalisée aux ultrasons plutôt qu'avec un piston (N. Hautekeete, Com. Pers.) et dans le choix du médium de suspension. Après plusieurs essais réalisés au laboratoires avec différentes concentrations de glycerol, nous avons cependant opté pour la solution simple de l'alcool pur, en partie pour éviter l'agglomération des grains.

II-4 Analyses moléculaires

II-4.1 Extraction de l'ADN

Toutes les analyses par marqueurs moléculaires ont été réalisées à partir d'ADN génomique total, extrait des feuilles.

II-4.1.1 Méthode pour RFLP et amplification

Cette méthode (encadré VIII), modifiée d'après Dellaporta, fournit de l'ADN en quantité suffisante pour réaliser plusieurs dépôts destinés à l'analyse par RFLP. Les amplification par PCR sont possibles après dilution (de 10 à 40 fois). La qualité de l'ADN est correcte pour la restriction par enzymes, mais cela se paye par une procédure assez. Le protocole utilisé est précisé Encadré VII. On obtient 1 ml d'ADN total à 100 ng/ μ l environ, à partir de 1 g. de feuilles fraîches. Nous avons également réalisé des extractions à partir de feuilles séchées en étuve à 50°C ou avec du silica-gel (Chase & Hills 1991). La quantité d'ADN obtenue après extraction à partir de feuilles sèches (0.3 à 0.4 g.) est cependant moindre et sa digestibilité légèrement inférieure, mais le séchage est le seul moyen de ramener du matériel du terrain ou de le conserver.

II-4.1.2 Méthode pour amplification

Nous avons utilisé un protocole (voir Encadré IX) permettant une extraction sommaire de faible quantité d'ADN en vue d'amplification par PCR. La procédure est très rapide et permet de traiter 96 individus en quelques heures, à partir de très peu de matériel: on peut par exemple refermer le couvercle d'un tube Eppendorf sur une feuille fraîche de façon à emprisonner un disque de feuille dans le tube. Ce disque est ensuite directement écrasé dans le tampon d'extraction avec un piston approprié. Ce protocole a été utilisé pour les individus dont seul le génotypage par marqueurs dérivés de la technique de PCR était nécessaire.

II-4.2 Marqueurs nucléaires

II-4.2.1 RFLP simple-copie

Cette technique de type *Southern blotting* a été utilisée au début de ma thèse pour compléter une étude initiée par P. Boudry et K. Broomberg. L'ADN extrait selon Dellaporta est digéré par *EcoRI*, *EcoRV* ou *HindIII* et hybridé avec une sonde nucléaire (voir Desplanque *et al.* 1999), choisie pour le polymorphisme et le caractère simple copie des signaux révélés (exemple Fig. 6). Cinq sondes ont été utilisées, réparties sur quatre des neuf groupes de liaison de la

Fig. 6. Exemple de profil obtenu par hybridation de la sonde nucléaire pk753 sur ADN génomique total digéré par *EcoRV*

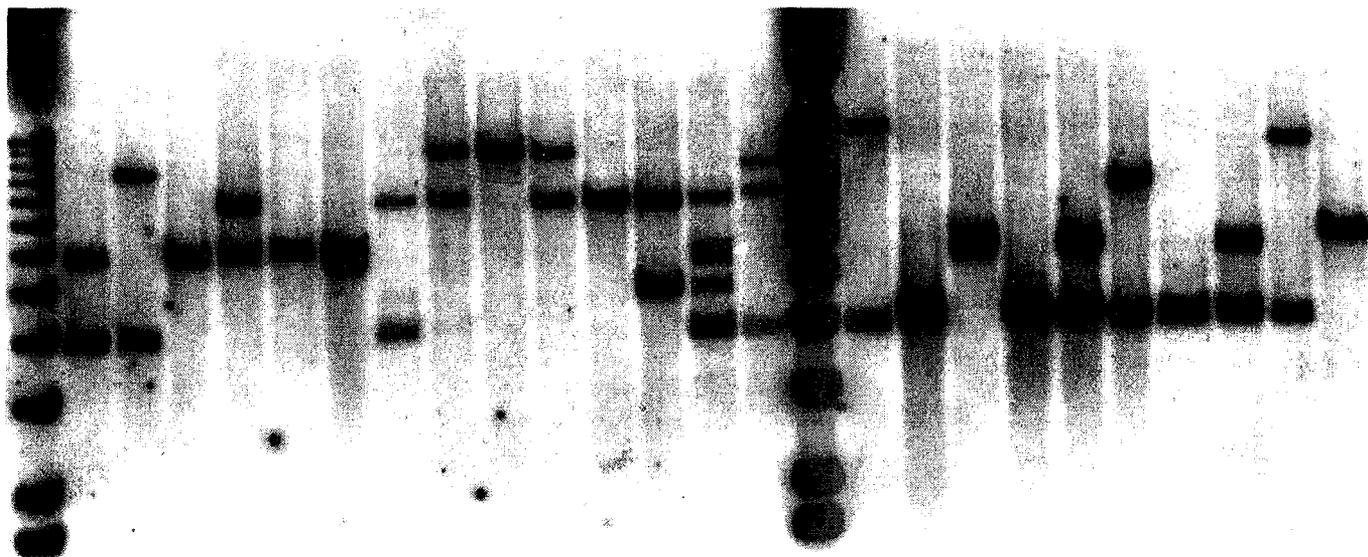
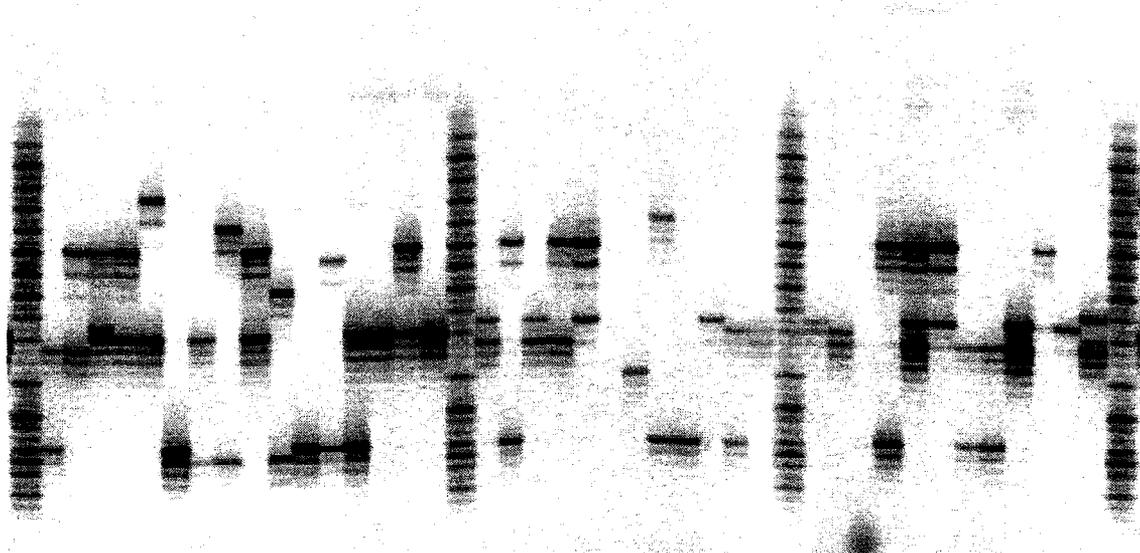


Fig. 7. Exemple de profil obtenu avec le locus microsatellite Bvm3



betterave. La révélation des profils utilise un mécanisme de chimio-luminescence: les sondes sont des sondes froides (i.e. non radioactives), marquées à la Digoxigénine par PCR (pour les fragments de taille <4kb) ou par *Random Priming* ; on révèle les signaux avec des anticorps anti-Dig, couplés à une phosphatase alcaline capable de dégrader un substrat approprié (p. ex. le CSPD) avec émission de photons pouvant impressionner un film sensible. La taille des fragments est estimée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire à l'aide du logiciel DensyLab™ (de Bioprobe™). Le système est performant (il est sensible et fiable). Il a cependant en sa défaveur la lourdeur des *Southern* (digestion, migration sur gel d'agarose, transfert sur membrane, hybridation, lavages, révélation, exposition, etc.).

II-4.2.2 Microsatellites

Nous avons utilisé le locus microsatellite Bvm3 mis au point au laboratoire par Mörchen *et al.* (1996). Les amplifications ont été réalisées sur thermo-cycleurs GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) à partir d'amorces marquées avec des fluorochromes en 700 ou 800 nm. La migration des produits de PCR est réalisée sur séquenceur automatique Licor 4200L en gel dénaturant de 25 cm (ex. Fig. 7)

II-4.3 Marqueurs cytoplasmiques

II-4.3.1 Haplotypes mitochondriaux

La variabilité mitochondriale a été analysée par RFLP (Southern) après digestion de l'ADN génomique total par *EcoRI* et hybridation par trois sondes: ATP6 (sous-unité 6 du maïs), pBV4 (séquence mitochondriale non codante de betterave sucrière) et "NvulgN2". La sonde NvulgN2 est un fragment de 12.5 kb isolé du profil de restriction *EcoRI* de l'ADN mitochondrial de betterave. Elle est entièrement construite au laboratoire (P. Saumitou-Laprade), à partir d'ADN mitochondrial pur extrait de racines de betteraves. Le marquage et la procédure RFLP est identique à ceux décrits pour les RFLP nucléaires. Les différents mitotypes observés sont décrits Tableau 1; la figure 8 donne un exemple de profil obtenu. Bien sur, la technique est lourde (voir plus haut) même si dans ce cas précis une seule membrane d'ADN digéré par *EcoRI* peut être hybridée successivement par les trois sondes nécessaires. Mais elle présente un avantage majeur: elle permet la comparaison des nouveaux résultats avec la banque de données du laboratoire, forte du typage de près de deux cents betteraves littorales sauvages réparties sur l'ensemble des côtes Françaises (Cuguen *et al.* 1994). D'autres accessions se sont ensuite ajoutées à cette banque, en plus de celles amenées par cette thèse. En outre, la stérilité mâle cytoplasmique implique la mitochondrie et plusieurs types mitochondriaux sont connus être associés à une telle stérilité, alors que cette information se perdrait en cas de changement de technique. Enfin, le type Sv, révélé par RFLP, est le seul haplotype diagnostique des betteraves sucrières dont nous disposons.

Tableau 1. Définition des haplotypes mitochondriaux (mitotypes).

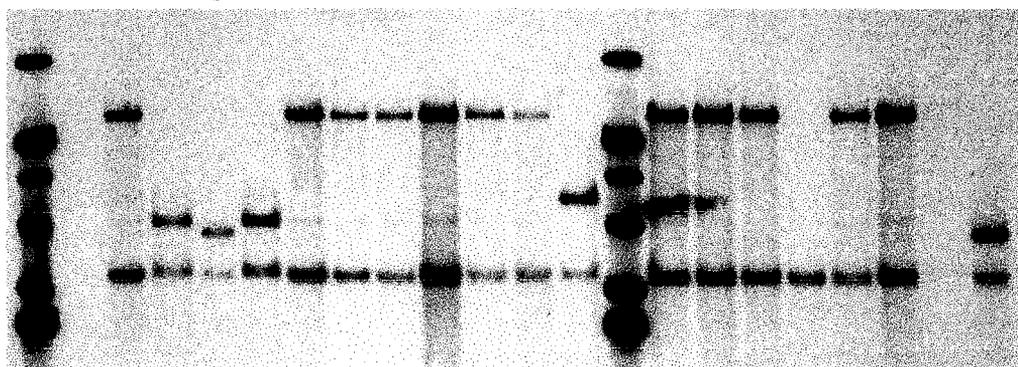
Chaque mitotype est défini par la combinaison des variants observés avec trois sondes (voir texte).

Mitotype	"phénotype"		
	<i>EcoRI</i> / ATP6	<i>EcoRI</i> / pBV4	<i>EcoRI</i> / NvulgN2
A	2	2	1
B	2	3	2
C	2	4	3
D	2	5	1
E	1	2	4
F	3	3	2
G	2	1	5
H	2	3	6
I	2	3	3
J	2	4	8
K	2	3	1
L	2	5	8
M	3	3	1
N	3	3	6
Nv	2	4	1
O	3	3	3
P	1	3	4
Q	3	5	4
R	3	7	9
S	2	3	9
Sv	1	6	7
T	4	6	7
U	2	8	1

Taille des fragments discriminants pour chaque variant (le phénotype – en gras – est suivi de la taille en kb):

EcoRI/ATP6: 1: 3.0; 2: 4.0; 3: 3.2; 4: 2.5 *EcoRI*/pBV4: 1: 3.0; 2: 3.7, 3.0; 3: 4.4, 3.0; 4: 7.2, 3.0; 5: 4.4; 6: 5.1; 7: 4.4, 2.6; 8: 4.6, 3.0 *EcoRI*/NvulgN2: 1: 15.1, 12.5, 10.9, 10.2; 2: 15.1, 10.9, 10.2, 8.3; 3: 15.1, 10.9, 10.2, 9.6; 4: 15.1, 10.9, 10.2; 5: 15.1, 10.2; 6: 15.1, 13.2, <10.9, 10.2; 7: 15.1, <10.9, 10.2; 8: 15.1, >10.9, 10.9, 10.2; 9: 15.1, 15.0, 10.9, 10.2

Fig. 8. Exemple de profil obtenu par hybridation de la sonde mitochondriale pBV4 sur ADN génomique total digéré par *EcoRI*.



II-4.3.2 Haplotypes chloroplastiques

La variabilité chloroplastique a été révélée par PCR-RFLP. Les amorces universelles utilisées pour cette technique sont majoritairement des séquences non-codantes, réputées plus variables que les séquences codantes. Ils s'agit des amorces mises au point à Bordeaux (Demesure *et al.* 1995; Dumolin-Lapegue *et al.* 1997). Nous en avons retenu sept pour leur bonne amplification et le polymorphisme obtenu, après un test de 15 amorces et 2 enzymes de restriction sur 21 individus (test réalisé par P. Saumitou-Laprade et J. Bernard). Tous les produits d'amplifications sont digérés par *HinfI*, sauf un par *AluI*. Ce jeu d'amorce ne révélait cependant qu'un seul chlorotype associé au deux mitotypes présentés par les betteraves sucrières 'Nv' et 'Sv'. Nous avons donc ajouté à notre panoplie une amorce définie sur le cpDNA d'une betterave sucrière par Ran & Michaelis (1995). Cette amorce permet de mettre en évidence l'apparition d'un site de restriction *HindIII*, spécifique de la sucrière mâle stérile (CMS de Owen, mitotype 'Sv'). Les tableaux 2 et 3 détaillent les chlorotypes observés. Les figures 9 a, b, c illustrent respectivement les résultats obtenus avec les loci *PsaA-trnS*, *trnV2-rbcL2* et *x87637*.

Références

- Bell CI, Milford GJF, Leigh RA (199?) Sugar beet.
- Bosemark NO (1989) Prospects for beet breeding and use of genetic resources. Report of an international workshop on *Beta* genetic resources, Centre for Genetic Resources, Wageningen, the Netherland, IBPGR: 89-97
- Brown SC, Devaux P, Marie D, Bergounioux C, Petit PX (1991) Analyse de la ploïdie par cytométrie en flux. *Biofutur*, **105**, (47), 2-17.
- Campbell GKG (1979) Sugar beet. In: *Evolution of crop plants* (N. W. Simmonds). Longman,
- Chase MW, Hills HH (1991) Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, **40**, 215-220.
- Coons GH (1954) The wild species of *Beta*. *P.Ass. Soc. Sugar Beet Technol.*, **8**, 142-147.
- Coons GH (1975) Interspecific hybrids between *Beta vulgaris* L. and the wild species of *Beta*. *Journal of the Am.Soc. Sugar. Beet Technol.*, **18**, (4), 281-305.
- Cuguen J, Wattier R, Saumitou-Laprade P, Forcioli D, Mörchen M, Van Dijk H, Vernet P (1994) Gynodioecy and mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Genetics Selection Evolution*, **26**, 87-101.
- De Candolle A (1883) *L'origine des plantes cultivées*. Diderot Multimedia 1998,
- Deleplanque JP, Renard O (1981) Les origines lointaines de la betterave. *Cultivar*, **144**, 22-25.

Demesure B, Sodzi N, Petit R (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, **4**, 129-131.

Desplanque B, Boudry P, Broomberg K, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Van Dijk H (1999) Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**, (8), 1194-1201.

Dolezel J (1998) Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetic*, **38**, (3), 285-302.

Dumolin-Lapegue S, Pemonge MH, Petit RJ (1997) An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, **6**, 393-397.

Ford-Lloyd BV (1986) Intraspecific variation in wild and cultivated beets and its effect upon infraspecific classification of wild and cultivated plants. *The systematic association*, **29**, 331-334.

Jahier J, Ed. (1992) Techniques de cytogénétique végétale. INRA, Paris

Laby H (1991) Sélection de la betterave: une multitude de petites améliorations. *Cultivar*, **289**, 56-59.

Letschert JPW (1993) *Beta* section *Beta*: biogeographical patterns of variation and taxonomy. *Wageningen Agric. Univ. Papers*, **93**, (1), 1-155.

Misset MT, Gourret JP (1996) Flow cytometric analysis of the different ploidy levels observed in the genus *Ulex* L. Faboideae-Genisteae in Brittany (France). *Botanica Acta*, **109**, 72-79.

Mörchen M, Cuguen J, Michaelis J, Hänni G, Saumitou-Laprade P (1996) Abundance and length polymorphisms of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 326-333.

Santoni S, Bervillé A (1992) Characterization of the nuclear ribosomal DNA units and phylogeny of *Beta* L. wild forms and cultivated beets. *Theoretical and Applied Genetics*, **83**, 533-542.

Senda M, Onodera Y, Kinoshita T, Mikami T (1995) Mitochondrial gene variation and phylogenetic relationships in the genus *Beta*. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**, 914-919.

Shen Y, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (1998) Genetic relationships within the genus *Beta* determined using both PCR-based marker and DNA sequencing techniques. *Heredity*, **80**, 624-632.

Tableau 2. Variants chloroplastiques.

La taille du produit de PCR est accompagnée de la description des variants observés pour chaque locus (voir texte).

Amorces	Code amorce	Taille du produit de PCR (pb)	Enzyme	Variants						
				1	2	3	4	5	9	
PsaA-trnS ¹	AS ₂	3260	<i>Hinf</i> I	232						125+107
TrnH-trnK1 ¹	HK	1520	<i>Alu</i> I	346						232+114
X87637 ³	X	563	<i>Hind</i> III	563						454+109
PsaA-trnS ¹	AS ₁	3260	<i>Hinf</i> I	346	328					
TrnT-psbC ²	TC	3380	<i>Hinf</i> I	240	235					
TrnS-trnM1 ¹	SfM	1220	<i>Hinf</i> I	148	144					
TrnD-trnT ¹	DT	970	<i>Hinf</i> I	98	97					
TrnK2-trnQ ²	KQ	2700	<i>Hinf</i> I	94	93	91				
TrnV2-rbcl2 ²	VL	3700	<i>Hinf</i> I	113	112	110	108	105		

¹: Demesure *et al.* (1995); ²: Dumolin-Lapègue *et al.* (1997); ³: Ran & Michaelis (1995)

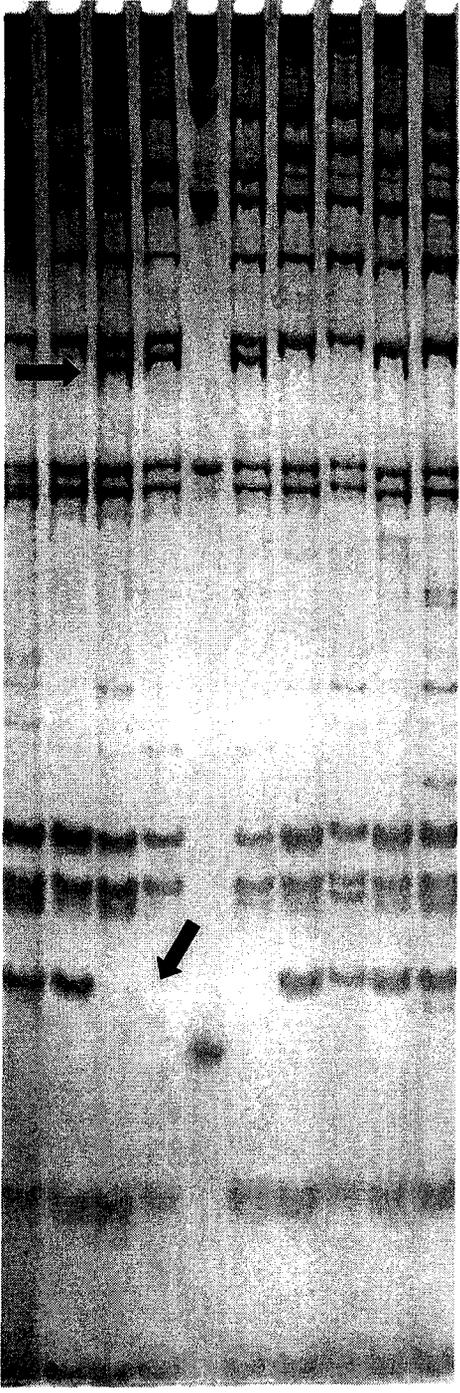
Tableau 3. Haplotypes chloroplastiques.

Chaque chlorotype est défini comme la combinaison des variants obtenus avec 6 loci en utilisant 8 paires d'amorces (voir texte). Le codage 'bis' fait référence à la définition des haplotypes sans les amorces DT, KQ et VL.

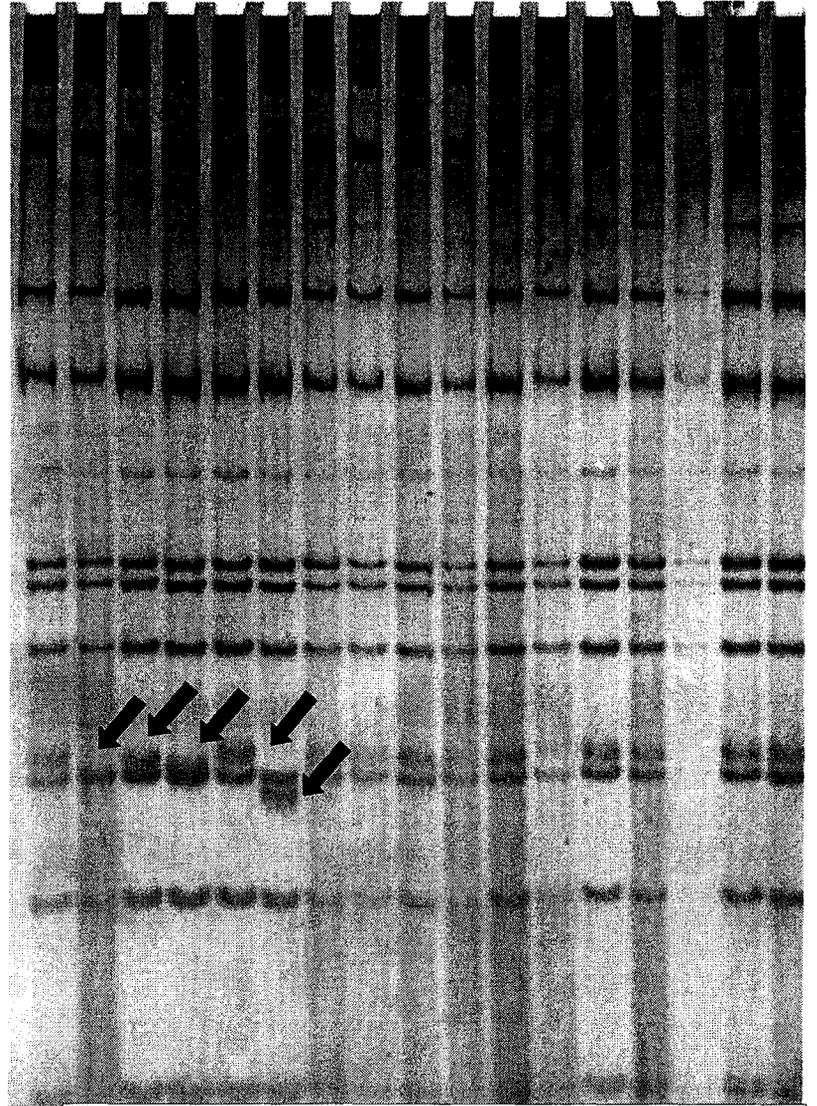
Haplotype		Code de l'amorce								
Code	Code bis	AS ₂	HK	X	AS ₁	TC	SfM	DT	KQ	VL
I	VI bis	9	1	1	2	1	1	1	3	4
II	I bis	9	1	1	1	1	1	2	2	1
III	I bis	9	1	1	1	1	1	2	2	2
IV	I bis	9	1	1	1	1	1	2	3	5
V	II bis	9	1	1	1	1	2	2	3	2
VI	III bis	9	1	9	1	1	2	2	3	2
VII	II bis	9	1	1	1	1	2	2	3	3
VIII	II bis	9	1	1	1	1	2	2	3	4
IX	II bis	9	1	1	1	1	2	2	3	5
X	IV bis	9	9	1	1	1	2	2	3	2
XI	V bis	1	1	1	2	1	1	2	2	4
XII	VI bis	9	1	1	2	1	1	2	2	4
XIII	VI bis	9	1	1	2	1	1	2	3	4
XIV	VII bis	9	1	1	2	2	2	2	3	2

Fig. 9. Exemples de profils obtenus avec trois loci chloroplastiques.
(a) et (b) Digestion par *Hinf*I. Gels d'acrylamide à 8% et 10% respectivement.

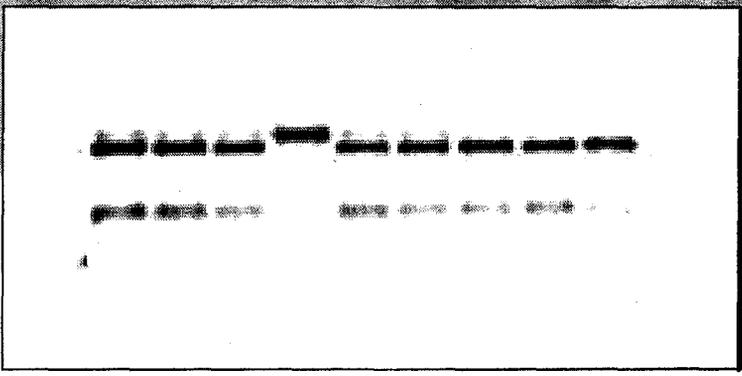
(a) Locus *PsaA-trnS*.
Les variants correspondent à une modification de site de restriction.



(b) Locus *trnV2-rbcL2*.
Les variants correspondent à de petites insertions-délétions (voir texte).



(c) Exemple de profil obtenu avec le locus chloroplastique x87637. Digestion par *Hind*III. Gel d'agarose à 1.2%.



- Annexe 2 -

Desplanque, B. Viard, F. Forcioli, D. Bernard, J. Saumitou-Laprade, J. Cuguen, J. Van Dijk, H.

**The linkage disequilibrium between cpDNA and mtDNA haplotypes
in *Beta vulgaris* subsp *maritima* (L.):**

the usefulness of both genomes for population genetic studies.

Molecular Ecology. (sous presse)

The linkage disequilibrium between chloroplast DNA # 843 and mitochondrial DNA haplotypes in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies

B. DESPLANQUE,* F. VIARD,* J. BERNARD,* D. FORCIOLI,† P. SAUMITOU-LAPRADE,* J. CUGUEN* and H. VAN DIJK*

*Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, UPRESA CNRS 801, Bât. SN2, Université de Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France, †Department of Zoology & Weed Science, Swiss Federal Research Station, CH-8820 Wädenswil, Switzerland

Abstract

The structure and evolution of the plant mitochondrial genome may allow recurrent appearance of the same mitochondrial variants in different populations. Whether the same mitochondrial variant is distributed by migration or appears recurrently by mutation (creating homoplasmy) in different populations is an important question with regard to the use of these markers for population genetic analyses. The genetic association observed between chloroplasts and mitochondria (i.e. two maternally inherited cytoplasmic genomes) may indicate whether or not homoplasmy occurs in the mitochondrial genome. Four-hundred and fourteen individuals sampled in wild populations of beets from France and Spain were screened for their mitochondrial and chloroplast polymorphisms. Mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism was investigated with restriction fragment length polymorphism (RFLP) and chloroplast DNA (cpDNA) polymorphism was investigated with polymerase chain reaction (PCR)-RFLP, using universal primers for the amplification. Twenty and 13 variants for mtDNA and cpDNA were observed, respectively. Most exhibited a widespread geographical distribution. As a very strong linkage disequilibrium was estimated between mtDNA and cpDNA haplotypes, a high rate of recurrent mutation was excluded for the mitochondrial genome of beets. Identical mitochondrial variants found in populations of different regions probably occurred as a result of migration. We concluded from this study that mtDNA is a tool as valuable as cpDNA when a maternal marker is needed for population genetics analyses in beet on a large regional scale.

Keywords: cpDNA, mtDNA, organellar genome association, PCR-RFLP, wild beet

Received 11 July 1999; revision received 14 September 1999; accepted 14 September 1999

Introduction

Organellar genomes – chloroplast DNA (cpDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA) – have been increasingly used in the past few years as markers to assess maternal or paternal gene flow because of their uniparental mode of inheritance (McCauley 1995). Nevertheless, the joint use of both markers is uncommon in the literature (but see Dumolin-Lapegue *et al.* 1998) although such an approach is of marked interest: (i) to detect paternal

leakage of genomes assumed to be maternally inherited; (ii) to give insights into the usefulness of cpDNA vs. mtDNA for population genetics studies; and (iii) to evaluate the role played by recurrent mutations in organellar genomes. A particular mitochondrial haplotype found in several geographically distinct areas may result from either migration or recurrent mutational events. In the latter case (recurrent mutation), the geographical pattern is a result of homoplastic events (i.e. identity in state but not by descent). What is known so far of the plant mitochondrial genome structure strongly suggests the occurrence of such events among plant species.

Correspondence: F. Viard. Fax: +33-320-436979; E-mail: frederique.viard@univ-lille1.fr

Homoplasmy has been found, for example, in *Pinus* and *Hevea* (Strauss *et al.* 1993; Luo *et al.* 1995). Plant mitochondrial genomes differ markedly in size and structure from their animal counterparts. They vary in size from 200 to 2500 kb, with a complex multicircular structure (Fauron *et al.* 1995; Backert *et al.* 1997). Conversely to plant nuclear and chloroplast genomes, the plant mitochondrial genome displays a low rate of nucleotide substitution (Wolfe *et al.* 1987) and seems to evolve mainly in structure by intragenomic recombination through small repeated sequences dispersed within the genome (Lonsdale *et al.* 1988; Palmer 1992). However, because the number of small repeated sequences through which recombination events occur is rather low (five for *Beta*, see Lonsdale *et al.* 1988), the number of possible conformations of the mitochondrial genome will be limited. The same mtDNA genotypes could thus arise independently in distant populations. According to theoretical models (Atlan & Couvet 1993), several stable states, corresponding to different equilibria, could be reached, depending on the replication rates of the different subgenomic molecules created by recombination. However, a slight modification in the replication rate of one of the subgenomic molecules could shift the entire population of molecules to another equilibrium state, which may already be present in other plants. Because of such frequent structural mutations, mtDNA polymorphisms are frequently suspected of homoplasmy, which has led to doubt regarding their usefulness for population biology studies (Parker *et al.* 1998). Conversely, the chloroplast genome is well characterized and its structure is very stable (Clegg *et al.* 1994). It has been widely used as a phylogenetic marker (Olmstead & Palmer 1994) but also, more recently, for within-species population genetics studies (see for example Taberlet *et al.* 1991; Ennos 1994; McCauley 1995; Dumolin-Lapegue *et al.* 1997a; Forcioli *et al.* 1998).

An important question is whether mtDNA could be as useful as cpDNA for population biology studies. First, it should be known whether a mtDNA genotype found in several populations is the result of migration among these populations, or has appeared independently in each population through independent mutations. In most higher plants, chloroplasts and mitochondria are both maternally inherited (Milligan 1992; Reboud & Zeyl 1994). As a result, if a given mtDNA type appears independently in different populations through recurrent mutations, it would probably be associated with different chloroplast genotypes. Conversely, the occurrence of the same combination (i.e. a given cpDNA haplotype together with a given mtDNA haplotype) in different populations is a strong indication for a low mutational process in both cpDNA and mtDNA genomes. As a consequence, the linkage disequilibrium between the two organellar genomes should be near its maximum value.

This does not apply to gymnosperms, as they mostly show maternal transmission of mitochondria but paternal transmission of chloroplasts (e.g. Dong & Wagner 1994). In angiosperms, studies concerning the association between the two organellar genomes are very scarce. When both organellar genomes have been investigated, one of the two genomes often exhibited a limited polymorphism (an example is shown in Laurent *et al.* 1993), if not monomorphism (Wolf *et al.* 1997). Moreover, as pointed out by Dumolin-Lapegue *et al.* (1998), even when information on the two organellar genomes has been obtained in a species, 'the association between the two lineages has been not explicitly studied'.

B. vulgaris ssp. *maritima* is a biological model that is well suited for testing the usefulness of cpDNA and mtDNA as population genetics markers, and for investigating the association between both genomes. On the one hand, the use of mtDNA polymorphism is very common in beets, and large data sets are already available (Komamitsky *et al.* 1990; Boudry *et al.* 1993; Cuguen *et al.* 1994; Senda *et al.* 1995). In addition, the occurrence of cytoplasmic male sterility involving the mtDNA genome has led to an increase in the use of mtDNA markers in this species, as well as in other gynodioecious species (e.g. Saumitou-Laprade *et al.* 1993; Ronfort *et al.* 1995). On the other hand, polymorphic cpDNA markers are also available in *B. vulgaris*. In a previous study, cpDNA was investigated by using restriction fragment length polymorphism (RFLP) Southern variants (Forcioli *et al.* 1998). For the present study, as the RFLP Southern method requires a large quantity of DNA, we developed the use of polymerase chain reaction (PCR)-RFLP markers in *B. vulgaris*. We investigated the joint cpDNA and mtDNA polymorphism over a large geographical area, covering Mediterranean regions of France and Spain, to assess the polymorphism of both genomes on such a geographical scale and to estimate the linkage disequilibrium value between the two organellar genomes. We draw conclusions on the mechanism (migration vs. mutation) by which the same mtDNA variant occurs over large distances and finally on the usefulness of both genomes for population genetics studies.

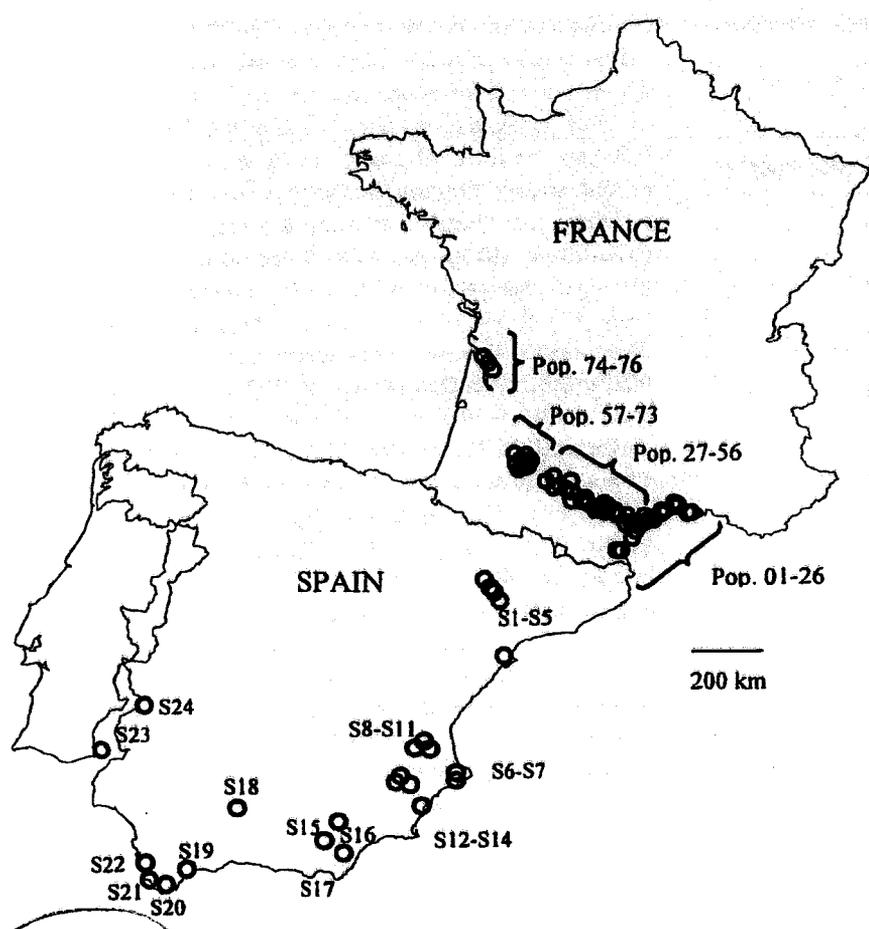
Materials and methods

Plant material

Beta vulgaris is a gynodioecious species that is widely distributed in Europe. Natural populations of sea beets (*B. vulgaris* ssp. *maritima*) are widespread along European coastlines. In the western part of the Mediterranean area, they are also present in human-disturbed inland habitats. In addition, cultivated beets (*B. vulgaris* ssp. *vulgaris*) are commonly found in several European countries. We

ASSOCIATION BETWEEN cpDNA AND mtDNA IN BEETS 3

Fig. 1 Location of the natural populations (Pop.) sampled.



1 sampled 414 individuals of *B. vulgaris* ssp. *maritima* on a regional scale (Fig. 1, Appendix I) from the southern Mediterranean regions of France (293 plants from 76 populations) and Spain (121 plants from 24 populations). Plants were collected from different ecological situations (coastal and inland). The mean number of individuals sampled per population was 4.5 ± 0.2 , as we chose to increase the number of populations rather than the number of plants per population (see a discussion about the sampling strategy in Pons & Petit 1995).

Laboratory analysis

Total genomic DNA was extracted from young leaves (1 g) following a modified Dellaporta procedure (as described in Saumitou-Laprade *et al.* 1991). The plants used were grown in a greenhouse from seeds collected from natural populations, except for 13 Spanish populations, for which fresh leaf material was collected in the field and dried over silica gel before DNA extraction. Each individual was analysed for both mtDNA and cpDNA polymorphism.

mtDNA polymorphism

The mitochondrial genome was investigated using RFLP

(Southern blotting). For each individual sample, $\approx 5 \mu\text{g}$ of DNA was digested with *EcoRI* (2 U/ μg). DNA fragments were separated on 0.7% agarose gels in TAE buffer and blotted onto a Nylon membrane (Allefs *et al.* 1990). Three mitochondrial probes were used: ATP6 (the ATPase subunit 6 from maize); pBV4 (a noncoding mitochondrial sequence from sugar beet); and NvulgN2 (a 12.5-kb fragment isolated from *EcoRI* digestion of mtDNA of beets). Probes were labelled, hybridized with total DNA and detected as described in Cuguen *et al.* (1994). Polymorphic phenotypes were then determined by analysis of the *EcoRI* restriction fragments. Mitotypes (i.e. mitochondrial haplotypes) were subsequently determined according to the phenotypes obtained with the three probes and named from A to U, plus Nvulg and Svulg (Table 1), using the same nomenclature as described in Cuguen *et al.* (1994).

cpDNA polymorphism

Recent studies demonstrated, for many plants, the usefulness of universal primers for assessing chloroplast polymorphism among populations of a given species (see for example Demesure *et al.* 1996; El Mousadik & Petit 1996a; Dumolin-Lapegue *et al.* 1997b; King & Ferris 1998;

Table 1 Definition of the mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes

Mitotype	Hybridization pattern		
	<i>EcoRI</i> /ATP6	<i>EcoRI</i> /pBV4	<i>EcoRI</i> /NvulgN2
A	2	2	1
B	2	3	2
C*	2	4	3
D*	2	4	1
E	1	2	4
F	3	3	2
G	2	1	5
H	2	3	6
I	2	3	3
J*	2	4	8
K	2	3	1
L	2	5	8
M	3	3	1
N	3	3	6
Nvulg	2	4	1
O	3	3	3
P	1	3	4
Q	3	5	4
R	3	7	9
S	2	3	9
Svulg	1	6	7
T	4	6	7
U	2	8	1

Each mitotype is defined by the combination of variants observed by using three probes (see the Materials and methods for details).

*C, D and J were not observed in the present data set but occur in beets from other French areas (Cuguen *et al.* 1994).

Length of the discriminant fragments of each variant (the hybridization pattern, in boldface) is followed by the size (in kbp). *EcoRI*/ATP6: 1, 3.0; 2, 4.0; 3, 3.2; 4, 2.5. *EcoRI*/pBV4: 1, 3.0; 2, 3.7, 3.0; 3, 4.4, 3.0; 4, 7.2, 3.0; 5, 4.4; 6, 5.1; 7, 4.4, 2.6; 8, 4.6, 3.0. *EcoRI*/NvulgN2: 1, 15.1, 12.5, 10.9, 10.2; 2, 15.1, 10.9, 10.2, 8.3; 3, 15.1, 10.9, 10.2, 9.6; 4, 15.1, 10.9, 10.2; 5, 15.1, 10.2; 6, 15.1, 13.2, < 10.9, 10.2; 7, 15.1, < 10.9, 10.2; 8, 15.1, > 10.9, 10.9, 10.2; 9, 15.1, 15.0, 10.9, 10.2.

Marchelli *et al.* 1998). These universal primers are located in coding regions of cpDNA, separated by potentially more variable noncoding regions (mostly intergenic regions, see Demesure *et al.* 1995; Dumolin-Lapegue *et al.* 1997a). We applied this method for the first time in *B. vulgaris*. A set of 15 pairs of primers was used for a first screening of 21 plants. Seven pairs of primers were chosen because of their good amplification pattern and polymorphism. An additional primer pair (hereafter referred to as locus X), specific for *B. vulgaris*, was used, as this specific primer pair is known to distinguish the cytoplasm associated with Owen's male sterility (commonly found in cultivated European sugar beets) from cytoplasm

of wild accessions (Ran & Michaelis 1995). PCR amplifications were performed in a DNA thermal cycler (Perkin Elmer). Reactions were carried out in a total volume of 15 μ L using PCR buffer (1 \times), MgCl₂ (3.5 mM), dNTPs (100 μ M), primers (2 pmol), DNA polymerase (0.5 U), bovine serum albumin (0.2 μ g/ μ L) and genomic DNA (\approx 25 ng). An initial 5-min denaturation at 94 $^{\circ}$ C was followed by 30 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 45 s, annealing for 45 s and elongation at 72 $^{\circ}$ C for 2–4 min. Annealing temperature was dependent upon the primers used and the extension time was dependent upon the length of the PCR product (see Demesure *et al.* 1995; Dumolin-Lapegue *et al.* 1997a). A final elongation for 10 min at 72 $^{\circ}$ C was performed. PCR products (5 μ L) were digested with a 4-bp cutting restriction enzyme, *Hinf*I or *Alu*I (Table 2), for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. Restriction digests were separated by electrophoresis in 8–10% polyacrylamide gels using Tris-borate EDTA buffer (0.5 \times) at 100 V for 19–24 h and visualized by silver staining. The size of the bands associated with each variant were scored according to the measurements obtained using the DENSILABTM software (BioprobeTM Systems). More precisely, to assess size differences as small as 1 bp on 10% acrylamide gels, we chose an appropriate molecular weight marker (marker X from Boehringer Mannheim). After a first measure of the absolute size, the different variants for each polymorphic locus were rescreened on the same gel to ascertain the relative size differences. For locus X, amplifications were carried out in a total volume of 15 μ L according to the method described by Ran & Michaelis (1995). PCR products were digested with *Hind*III and restriction digests were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. cpDNA variants at each locus were numbered in order of decreasing molecular weight. The length fragments were recorded from 1 to 5, 9 being reserved for the occurrence of a restriction site (Table 2). The numbers increase from the highest to the lowest molecular weight fragments to simplify the notation but this does not imply any sequence of mutational events.

Statistical analysis

Haplotype diversity (expected heterozygosity, H_e) values were calculated according to Nei (1987). The association (hereafter referred to as cytotype) between one mitotype and one chlorotype was designated by the mitotype code followed by the chloroplast code (for example: Nvulg-V is the combination of the mitotype Nvulg and the chlorotype V). Linkage disequilibrium between the two organellar genomes was calculated according to Lewontin's normalized D' (Lewontin 1964; see Lewontin 1988 for a discussion on gametic disequilibrium) by using the ARLEQUIN software (Schneider *et al.* 1997).

Table 2 Cytoplasmic DNA (cpDNA) variants

Primers	Primer code	Size of PCR product (bp)	Enzyme	Variants					
				1	2	3	4	5	9
PsaA-trnS*	AS ₂	3260	HinfI	232					125 + 107
TrnH-trnK1*	HK	1520	AluI	346					232 + 114
X87637†	X	563	HindIII	563					454 + 109
PsaA-trnS*	AS ₁	3260	HinfI	346	328				
TrnT-psbC‡	TC	3380	HinfI	240					
TrnS-trnM1*	SfM	1220	HinfI	148	144				
TrnD-trnT*	DT	970	HinfI	98	97				
TrnK2-trnQ‡	KQ	2700	HinfI	94	93	91			
TrnV2-rbcL‡	VL	3700	HinfI	113	112	110	108	105	

The total length of the polymerase chain reaction (PCR) product is given together with a description of the different variants observed for each primer pair and locus. The size of the bands associated with each variant is given according to the measurements obtained with the DENSILAB™ software (Bioprobe™ Systems).

*Demesure *et al.* (1995); †Ran & Michaelis (1995); ‡Dumolin-Lapegue *et al.* (1997).

Results

Extent of cytoplasmic variation

mtDNA and cpDNA haplotypes The mtDNA and cpDNA haplotypes found in each population and the mean number of haplotypes per population are detailed in Appendix I. For the mitochondrial genome, 20 mitotypes were observed over the whole sample (the RFLP fragment patterns according to the EcoRI/mtDNA probes combinations are displayed in Table 1). All the mitotypes were widely distributed (Fig. 2), except the mitotypes L, O, P, Q, S and U, which were limited to a single population. The haplotype diversity for mtDNA markers was 0.65 ± 0.02 . Despite the limited number of individuals analysed per population (4.5 ± 0.2), 53% of the populations (having more than two individuals sampled) exhibited two or more mitotypes.

The number of cpDNA variants found for each primer pair is given in Table 2. Primer pair TC exhibited only one variant from the present data set, although this primer pair was known to be polymorphic from preliminary studies involving populations from northern France. All the other primer pairs exhibited only one polymorphic locus, except for AS, which had two loci. Three of these displayed a restriction site mutation. The others were assumed to be insertions or deletions (indels). The size of the bands associated with these indels is given in Table 2: they ranged from 4 to 18 bp except for the loci DT, KQ and VL. These three cpDNA loci exhibited a different mutational pattern. More precisely, they were characterized by small indels (less than 4 bp) and/or by a larger number of variants (five variants for VL). Such a pattern may be the result of polymorphism of long stretches of mononucleotides A/T, as has been observed in other

species (e.g. Gielly & Taberlet 1994). Owing to a different mutational rate when compared with restriction sites or larger indels, the results we obtained using these loci should be interpreted with caution. Thirteen haplotypes were detected over the whole study area (Table 3, Fig. 2). Chlorotypes I and XII were the only ones to be restricted to a single population. The chlorotype diversity value was 0.63 ± 0.03 , not significantly different from the mitotype diversity. Here again, more than 50% (actual value 54%) of the populations exhibited two or more chlorotypes (when more than two individuals were sampled).

Association between mtDNA and cpDNA haplotypes

Twenty-six associations (cytotypes) between chlorotypes and mitotypes were observed (upper part of Table 4). The mean number of mtDNA types per cpDNA type was 1.86 ± 0.69 . The mean number of cpDNA types per mtDNA type was 1.29 ± 0.27 . Four mitotypes out of 20 (namely A, G, I and Nvulg) were associated with several chlorotypes. We also conducted an analysis of the association without the three loci DT, KQ and VL, owing to their aforementioned particularity. When chlorotypes were defined without the contribution of these loci, the number of chlorotypes changed into six (Table 3) and the number of cytotypes decreased to 21. Consequently, only mitotype I was found to be associated with more than one chlorotype (Table 4, lower part). The mean number of mtDNA types per cpDNA types then reached 3.14 ± 1.72 , with 1.05 ± 0.10 cpDNA types per mtDNA. A strong linkage disequilibrium between the two organellar genomes was found. The D' value was 0.965 when all the chloroplast loci were taken into account and reached 0.995 when DT, KQ and VL were excluded. Variation at the locus S_{mt} was characterized by only two alleles that were separated

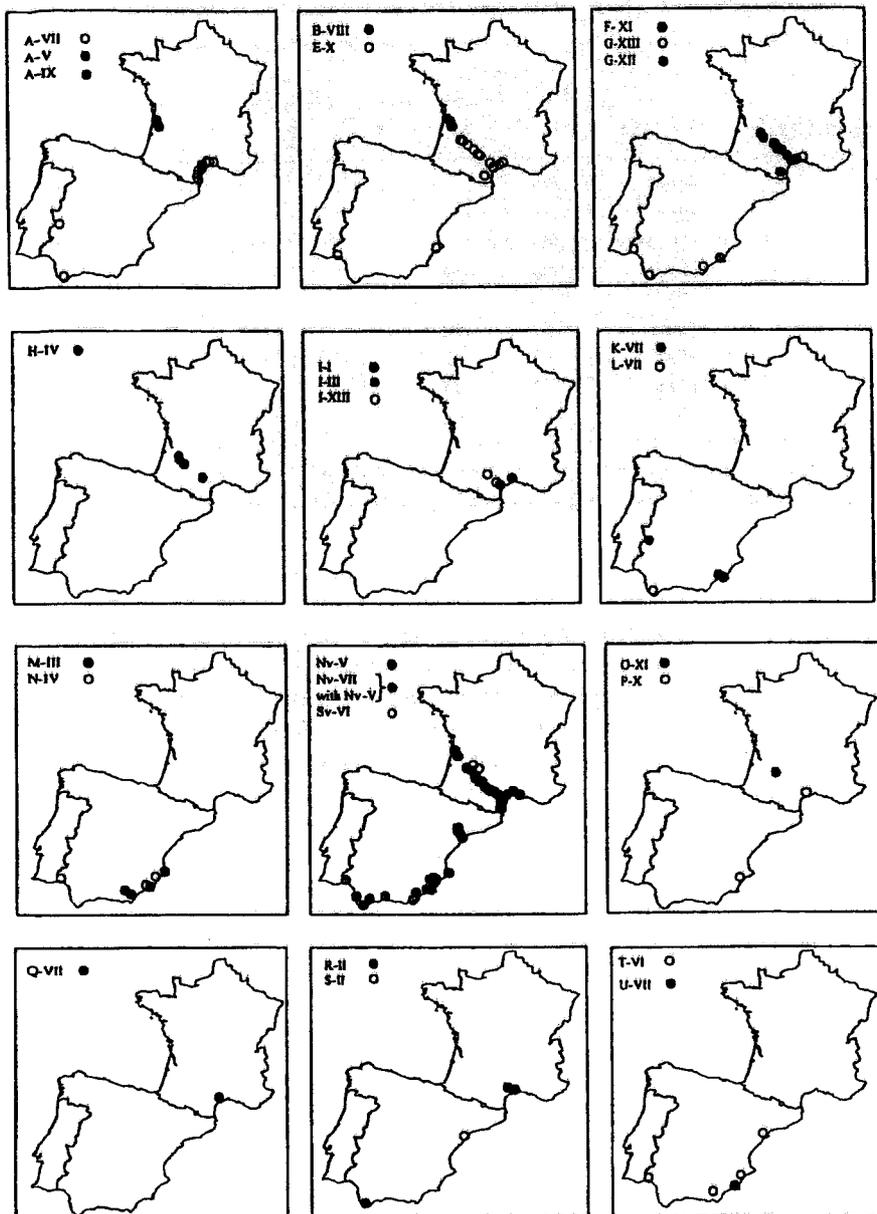


Fig. 2 Geographical location of the different associations between mitochondrial DNA and chloroplast DNA haplotypes observed in beets. The association between one mitotype and one chlorotype is designated by the mitotype code followed by the chloroplast code. Nv, *N. vulg.*; Sv, *S. vulg.*

: N :

by 4 bp. Such a pattern could perhaps also be caused by a microsatellite repeat, although a smaller size difference or a larger number of variants would be expected at a within-species level. When *S₁₁* was also removed from the analysis, chlorotypes Ibis and IIbis were pooled together but this did not change the results observed when only DT, KQ and VL were removed (in particular, mitotype I was still associated with two chlorotypes).

Discussion

mtDNA diversity

From our study, 20 mitotypes have been observed among

414 individuals sampled from widely distributed populations (1000 km between the most remote populations). This level of polymorphism is in agreement with previous studies on higher plant mitochondria. The mtDNA genome is known to exhibit extraordinary plasticity (Fauron *et al.* 1995), generating high levels of polymorphism. In *Thymus vulgaris*, for example, more than 50 mitotypes have been found among ≈ 400 individuals (Belhassen *et al.* 1993; Manicacci *et al.* 1996). In *Daucus carota* ssp. *carota*, 25 mtDNA RFLP variants were identified from 80 plants (Ronfort *et al.* 1995). In *Hevea brasiliensis*, 212 mtDNA RFLP variants were revealed in a sample of 395 accessions (Luo *et al.* 1995). A high mitochondrial polymorphism has also been found in three *Pinus* species (Strauss *et al.* 1993).

ASSOCIATION BETWEEN cpDNA AND mtDNA IN BEETS 7

Table 3 Chloroplast DNA (cpDNA) haplotypes for *Beta vulgaris*

Haplotype code	Haplotype code bis	Primer code								
		AS ₂	HK	X	AS1	TC	SfM	DT	KQ	VL
I	VI bis	9	1	1	2	1	1	1	3	4
II	I bis	9	1	1	1	1	1	2	2	1
III	I bis	9	1	1	1	1	1	2	2	2
IV	I bis	9	1	1	1	1	1	2	3	5
V	II bis	9	1	1	1	1	2	2	3	2
VI	III bis	9	1	9	1	1	2	2	3	2
VII	II bis	9	1	1	1	1	2	2	3	3
VIII	II bis	9	1	1	1	1	2	2	3	4
IX	II bis	9	1	1	1	1	2	2	3	5
X	IV bis	9	9	1	1	1	2	2	3	2
XI	V bis	1	1	1	2	1	1	2	2	4
XII	VI bis	9	1	1	2	1	1	2	2	4
XIII	VI bis	9	1	1	2	1	1	2	3	4

Each cpDNA haplotype is defined by the combination of variants obtained with nine loci and using eight primer pairs (see the Materials and methods for details).

Haplotype code 'bis' refers to the definition of a haplotype without primers DT, KQ and VL (see the Results for details).

Table 4 Association between cytoplasmic DNA (cpDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes (number of occurrences): the chlorotypes were defined with all cpDNA loci (upper part of the table) or without the cpDNA loci DT, KQ and VL (lower part of the table; see text for details). Nv stands for Nvulg and Sv for Svulg, respectively

cpDNA	mtDNA																			Total	
	H	N	Sv	T	E	P	R	S	F	O	B	M	K	L	Q	U	Nv	A	G		I
II							3	6													9
IV	10	5																			15
XI									30	1											31
VIII											8										8
VI			2	8																	10
X					26	2															28
V																	233	2			235
VII													6	1	1	2	14	26			50
IX																		2			2
XII																				1	1
III											7										3
I																					3
XIII																					10
Total	10	5	2	8	26	2	3	6	30	1	8	7	6	1	1	2	247	30	11	8	414
IIIbis			2	8																	10
IVbis					26	2															28
Vbis								30	1												31
IIbis											8		6	1	1	2	247	30			295
Ibis	10	5					3	6			7										34
VIbis																				11	5
Total	10	5	2	8	26	2	3	6	30	1	8	7	6	1	1	2	247	30	11	8	414

From the literature, the distribution of the mitochondrial genetic diversity does not exhibit a common feature. On the one hand, the DNA mitochondrial polymorphism appears to be geographically highly struc-

tured at a local scale (e.g. *T. vulgaris* in Manicacci *et al.* 1996) or a regional scale (*H. brasiliensis* in Luo *et al.* 1995, e.g. *D. carota* ssp. *carota* in Ronfort *et al.* 1995; *F. crenata* in Tomaru *et al.* 1998; *Abies* sp. in Tsumura & Suyama 1998).

On the other hand, large geographical distributions of some ubiquitous mitochondrial haplotypes may also be found (*Theobroma cacao* in Laurent *et al.* 1993, e.g. *F. crenata* in Koike *et al.* 1998; *Glycine soja* in Tozuka *et al.* 1998). A widespread distribution of haplotypes was also observed in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* in a previous study carried out by Cuguen *et al.* (1994). By using a sample of 200 plants collected from 38 French populations, it was observed that most of the 14 mitochondrial RFLP patterns were ubiquitous at the scale studied and that the mitotype Nvulg (shared by 23% of the individuals) was widely distributed. Finally, many cases of species exhibiting frequent mtDNA variants distributed over a large geographical repartition were reported, suggesting that recurrent mutations could be suspected. Indeed, in three *Pinus* species, a phylogenetic study revealed, together with a high mitochondrial polymorphism, frequent homoplasious events (Strauss *et al.* 1993).

The structure of the mitochondrial genome is actually represented as a population of small circular molecules (subcircles) created from a master circle through intragenomic recombination (Andre *et al.* 1992; Palmer 1992; Fauron *et al.* 1995). As the substitution rate of nucleotides is very low in this genome (Wolfe *et al.* 1987; Palmer & Herbon 1988), differences between mtDNA restriction profiles within the same species are more likely to be caused by rearrangements than by point mutations. The genome seems therefore to evolve mainly by intragenomic recombination through small repeated sequences dispersed within the genome (Lonsdale *et al.* 1988, e.g. in Lelandais *et al.* 1998). In *B. vulgaris*, the mitochondrial genome is known to include short dispersed repeated sequences through which intragenomic recombination is thought to occur (see Senda *et al.* 1998a for an example). Kubo *et al.* (1995) have shown that higher order repeats could be found within the mitochondrial genome associated with the mitotype Nvulg of *B. vulgaris*. The hypothesis of recurrent appearance of a given mtDNA genotype in different populations therefore cannot be rejected only from the examination of mitochondrial RFLP phenotypes.

From the present study, nine mitotypes out of the 20 observed were reported for the first time. The mitotypes F, K and L, which were rarely found by Cuguen *et al.* (1994), were found at a higher frequency in the present study, but the mitotypes C, D and J were not observed in the area studied. Conversely, some new, rare mitotypes were found (for example O, P, Q, S and U). In agreement with previous studies in beets (Saumitou-Laprade *et al.* 1993; Cuguen *et al.* 1994), as well as in other species, it appears that the same mitotypes can be found over a large geographical scale in *B. vulgaris*. In addition, the populations usually exhibited more than one mtDNA haplotype, even when a small number of individuals was sampled. For these reasons, recurrent mutations in *B.*

vulgaris cannot be *a priori* excluded to explain the geographical distribution of mitotypes in beets.

cpDNA diversity

We identified 13 cpDNA haplotypes, three of which involved a point mutation in a restriction site, the others being assumed to be indels. The chloroplast genome is known to evolve mainly through point mutations or small deletions (Clegg *et al.* 1992). Clegg *et al.* (1994) reported that the frequency of indels was higher than that of point mutations. The patterns of polymorphism presented here, as well as in other studies using PCR-RFLP methods (e.g. Demesure *et al.* 1996; Dumolin-Lapegue *et al.* 1997b; Petit *et al.* 1997) are in agreement with that report (nevertheless, technical approaches used here have a higher probability of revealing indels than point mutations, owing to the low number of restriction enzymes used).

Investigations of other species conducted using the same sampling and molecular tools (i.e. a screening of 100–450 individuals at a regional scale, using six to 12 universal primer pairs and one to eight restriction enzymes) revealed a comparable number of haplotypes. For example, 11 haplotypes were found in *Fagus* (Demesure *et al.* 1996), 13 in *Alnus* (King & Ferris 1998), 11 in *Argania* (El Mousadik & Petit 1996a) and up to 23 haplotypes in the white oaks species complex (Dumolin-Lapegue *et al.* 1997b), but over a larger geographical scale. From our results, it appeared that cpDNA diversity can be efficiently investigated in beets by PCR-RFLP using universal primers. Most of the species mentioned above also showed a strong regional differentiation of cpDNA haplotypes (Demesure *et al.* 1996; El Mousadik & Petit 1996b; Dumolin-Lapegue *et al.* 1997b; Wolf *et al.* 1997; King & Ferris 1998; Marchelli *et al.* 1998) or a patchy structure when investigated within a region (Petit *et al.* 1997). In *B. vulgaris*, three haplotypes out of 13 were each restricted to one or two populations. The other haplotypes were found both in France and Spain, with no obvious geographical structure, which contrasts with species where cpDNA haplotypes are geographically localized, even at a finer scale (Wolf *et al.* 1997; King & Ferris 1998; Marchelli *et al.* 1998). Populations of beets were found to be far from fixation for their chlorotypes and exhibited 1.74 ± 0.17 chlorotypes per population. These results are in close agreement with those previously reported by Forcioli *et al.* (1998) in a study of the cpDNA diversity of the French populations of beets from the Atlantic and Channel coasts, using a similar sampling strategy but involving a Southern RFLP analysis: eight haplotypes were found, 80% of the populations appeared polymorphic, with a mean number of haplotypes of 2.17 ± 0.66 . We can therefore conclude that there is a substantial within-

population diversity in *B. vulgaris* ssp. *maritima* as shown previously in several other species (McCauley 1994; El Mousadik & Petit 1996a; Raspe 1998), although it is not a general feature (Demesure *et al.* 1996; Marchelli *et al.* 1998).

The association between cpDNA and mtDNA haplotypes

The chloroplast and the mitochondrial genomes are both maternally transmitted in beets (Corriveau & Coleman 1988), as is the case for the majority of angiosperms (Reboud & Zeyl 1994). Very high values of haplotypic disequilibrium were observed between the cpDNA and mtDNA genomes ($D' = 0.97$ by using all the cpDNA loci and $D' = 0.99$ without DT, KQ and VL). Our results are in agreement with the expectation of a maximum linkage between the two organellar genomes, owing to their co-transmission. The linkage value is expected to be weakened: (i) if some paternal transmission takes place (Moggensen 1996); or (ii) if recurrent mutations occur in one or both genomes.

The number of individuals of a single progeny that have to be investigated to detect paternal leakage is high (Milligan 1992). In the present study, the sampling over progeny and populations was not well designed for this purpose. Nevertheless, the high value of the disequilibrium estimate is not in agreement with a frequent reshuffling of both genomes. By investigating the occurrence of paternal leakage of cpDNA or mtDNA in oaks, Dumolin-Lapegue *et al.* (1998) observed nine cpDNA and three mtDNA variants, which defined 12 cytotypes. The strong association observed between the two cytoplasmic polymorphisms suggested no well-established paternal leakage. The partial independence between the two genomes was caused only by one mtDNA haplotype. They suggested that this haplotype may have arisen from recurrent homoplastic mutation.

The observed linkage disequilibrium value estimated from the present study was also inconsistent with a high rate of homoplastic recombination of mtDNA in beets. For that reason, the wide geographical distribution of a particular mitotype, as we observed in *B. vulgaris*, will probably be a result of migration. This finding does not contradict the models of mitochondrial evolution through recombination and frequency shifts (Atlan & Couvet 1993) but seems to exclude frequent homoplastic mutations. The few cases of departure from a strict association have to be carefully examined. Some mitotypes (A, G, I and Nvulg) were found to be associated with up to three chlorotypes. This phenomenon was mainly caused by three cpDNA loci (DT, KQ and VL), which exhibited very small indels. It totally disappeared (except for mitotype I) when DT, KQ and VL were excluded from the definition of the chlorotypes. For each of the mitotypes A, G and

Nvulg, a given chlorotype (VII, XIII and V, respectively) was always predominant, together with one or two other rare chlorotypes. The geographical distribution of unusual associations was clearly not random (see Fig. 2). For example, we found three cytotypes involving mitotype A in 30 individuals from 14 French and Spanish populations. Twenty-six were characterized by the widely distributed cytotype A-VII. Two individuals from one single French Mediterranean population showed cytotype A-V and, finally, two individuals who exhibited cytotype A-IX were restricted to two adjacent populations of the Atlantic coast. The same feature was observed for the cytotypes involving mitotypes G. Another interesting observation is that, except for mitotype Nvulg, there were no populations characterized by several individuals sharing the same mitotype but different chlorotypes. Out of 100 populations analysed, 84 populations exhibited individuals with the mitotype Nvulg. In all of those populations Nvulg was found to be associated with the chlorotype V. However, in seven (out of 84) populations from Spain, Nvulg was also found to be associated with chlorotype VII (see Fig. 2). Chlorotypes V and VII differed only by a small indel at locus VL. Such small indels can be caused by mononucleotide repeats. Such stretches are commonly found in the cpDNA genome and have been increasingly used in the past few years for population biology studies (Powell *et al.* 1995; Vendramin *et al.* 1996; Echt *et al.* 1998; Provan *et al.* 1998, 1999; Vendramin *et al.* 1998). The mutation rate of such repeats is substantially higher than for other anonymous regions (Powell *et al.* 1995) and could explain the high variability that we observed at locus VL compared with the other loci used. This may also hold for the loci DT and KQ, for which indels of less than 4 bp were observed. Sequencing of the variants that differ by few base pairs has to be conducted in order to precisely determine the type and number of mutations involved. If the implication of microsatellite loci is confirmed, the high level of polymorphism exhibited could be of great interest for further population genetics studies at a fine geographical scale in wild beets.

Events of recurrent recombination in the mitochondrial genome could not always be excluded in our study. This was the case for mitotype I, which was associated with three chlorotypes, at the same frequency, when using nine loci for defining the chlorotypes. It still presented two chlorotypes when the loci DT, KQ and VL were excluded from the analysis.

The strong association observed here may also give some insights into the relatedness between mitotypes. In a previous study, Cuguen *et al.* (1994) discussed the correlation between mitotype and cytoplasmic male sterility in gynodioecious populations of *B. vulgaris* ssp. *maritima*: four mitotypes (Svulg, E, G and H) out of 14 were found to be associated with male sterility. Sugar beets are

6

characterized by the mitotype Svulg (Senda *et al.* 1998b) and the chlorotype VI (unpublished data; present study). Here, we observed a new mitotype, T, also associated with chlorotype VI. The observation that Svulg and T share a common chlorotype may indicate that both mitotypes are closely related. The same feature holds for mitotypes P and N, which share the same chlorotype as E and H, respectively. The sexual phenotypes associated with mitotypes T, P and N have not been observed previously and further investigations obviously need to be carried out.

Finally, the restricted association of mitotype Svulg with chlorotype VI and, more specifically, with variant 9 of primer X, is of special interest for investigating the presence of Svulg in natural populations. Because mitotype screening is laborious and requires a large quantity of DNA, the use of the primer X may be useful for the rapid detection of Svulg in natural populations. Once chlorotype VI has been identified, a limited mtDNA RFLP analysis has to be conducted to check that Svulg is involved, as this cpDNA pattern is shared by the rare mitotype T, only observed in Spain. The occurrence of Svulg in the wild can be used as an indicator of seed dispersal from crops to wild populations. Such investigation can be of great value in the context of risk assessment of Genetically Modified Organisms (GMOs).

Conclusion

Cytoplasmic markers are now commonly used by population geneticists. Their application, to estimate the relative importance of seed and pollen dispersal within or among populations, is now widespread (Cruzan 1998). However, contrary to cpDNA variation, mtDNA polymorphism has frequently been viewed with caution when studying plant population differentiation. In this study, we demonstrated the occurrence of a particularly strong association between the two cytoplasmic haplotypes in beets. In only a few cases, at a large geographical scale, a given mitotype was not associated with a single chlorotype. The geographical distribution of such peculiar cases was clearly not random. Our results strongly suggest that mutations in the cpDNA will probably be involved in these cases, and that recurrent mitochondrial mutations could be excluded. Consequently, it appears that distribution of the mtDNA haplotypes in *B. vulgaris* can be mainly explained by migration. Seed migration in beets at various geographical scales is mainly caused by tides, for coastal populations, and human activities (e.g. roadworks), for inland populations (Van Dijk & Desplanque, *in press*). We conclude that mitotypes could be as valuable as chlorotypes when investigating population genetic structure, phylogeographical patterns or seed dispersal in natural populations.

(Fonds Européen de Développement Régional)

843,10

(Centre National de la Recherche Scientifique)

Acknowledgements

The authors thank Drs I. Bonnin, P. Touzet and M. Valero for their helpful comments on the manuscript. They are also grateful to C. Blassiau and R. Dron for their technical assistance. This work was partially funded by the Région Nord-Pas-de-Calais and the FEDER. B. Desplanque was funded by the CNRS as a BD PhD student.

(Boursier Docteur Ingénieur)

References

- Allefs JJHM, Salentijn EMJ, Krenz FA, Rouwendal GJA (1990) Optimization of non radioactive Southern blot hybridization, single copy detection and reuse of blots. *Nucleic Acids Research*, **18**, 3099–3100.
- Andre C, Levy A, Walbot V (1992) Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes. *Trends in Genetics*, **8**, 128–132.
- Atlan A, Couvet D (1993) A model simulating the dynamics of plant mitochondrial genomes. *Genetics*, **135**, 213–222.
- Backert S, Nielsen BL, Börner T (1997) The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends in Plant Science*, **2**, 477–483.
- Belhassen E, Atlan A, Couvet D, Gouyon PH, Quetier F (1993) Mitochondrial genome of *Thymus vulgaris* L. (Labiata) is highly polymorphic between and among natural populations. *Heredity*, **71**, 462–472.
- Boudry P, Mörchen M, Saumitou-Laprade P, Vernet P, Van Dijk H (1993) The origin and evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide-resistant transgenic sugar beets. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**, 471–478.
- Clegg MT, Learn GH, Golenberg EM (1992) Molecular evolution of chloroplast DNA. In: *Evolution at the Molecular Level* (eds Selander RK, Clark AG, Whittam TS), pp. 1009. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Clegg MT, Gaut BS, Learn GH, Morton BR (1994) Rates and pattern of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 6795–6801.
- Corriveau JL, Coleman AW (1988) Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *American Journal of Botany*, **75**, 1443–1458.
- Cruzan MB (1998) Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology*, **79**, 400–412.
- Cuguen J, Wattier R, Saumitou-Laprade P *et al.* (1994) Gynodioecy and mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Genetics Selection Evolution*, **26**, 87–101.
- Demesure B, Sodzi N, Petit R (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, **4**, 129–131.
- Demesure B, Comps B, Petit RJ (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, **50**, 2515–2520.
- Dong J, Wagner DB (1994) Paternally inherited chloroplast polymorphism in *Pinus*: estimation of diversity and population subdivision, and tests of disequilibrium with a maternally inherited mitochondrial polymorphism. *Genetics*, **139**, 1187–1194.
- Dumolin-Lapegue S, Pemonge MH, Petit RJ (1997a) An enlarged

- set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, 6, 393-397.
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineshi S, Le Corre V, Petit RJ (1997b) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, 146, 1475-1487.
- Dumolin-Lapegue S, Pemonge M-H, Petit RJ (1998) Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 1321-1331.
- Echt CS, DeVerno LL, Anzidei M, Vendramin GG (1998) Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology*, 7, 307-316.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996a) Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Molecular Ecology*, 5, 547-555.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996b) High level of genetic differentiation of allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 832-839.
- Ernos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72, 250-259.
- Fauron CMR, Moore BD, Casper M (1995) Maize as a model of higher plant mitochondrial genome plasticity. *Plant Science*, 112, 11-32.
- Forcioli D, Saumitou-Laprade P, Valero M, Vernet P, Cuguen J (1998) Distribution of chloroplast diversity within and among populations in gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (Chenopodiaceae). *Molecular Ecology*, 7, 1193-1204.
- Gielly L, Taberlet P (1994) The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 769-777.
- King RA, Ferris C (1998) Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology*, 7, 1151-1161.
- Koike T, Kato S, Shimamoto Y *et al.* (1998) Mitochondrial DNA variation follows a geographic pattern in Japanese beech species. *Botanica Acta*, 111, 87-92.
- Komarnitsky IK, Samoylov AM, Red'ko VV, Peretyayko VG, Gleba YY (1990) Intraspecific diversity of sugar beet (*Beta vulgaris*) mitochondrial DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 80, 253-257.
- Kubo T, Satoh Y, Muro T, Kinoshita T, Mikami T (1995) Physical and gene organization of mitochondrial DNA from the fertile cytoplasm of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Current Genetics*, 28, 235-241.
- Laurent V, Risterucci AM, Lanaud C (1993) Chloroplast and mitochondrial DNA diversity in *Theobroma cacao*. *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 81-88.
- Lelandais C, Albert B, Gutierrez S *et al.* (1998) Organization and expression of the mitochondrial genome in the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant. *Genetics*, 150, 873-882.
- Lewontin RC (1964) The interaction of selection and linkage. I. general considerations; heterotic models. *Genetics*, 49, 49-67.
- Lewontin RC (1988) On measures of gametic disequilibrium. *Genetics*, 120, 849-852.
- Lonsdale DM, Brears T, Hodge TP, Melville SE, Rottmann WH (1988) The plant mitochondrial genome: homologous recombinations as a mechanism for generating heterogeneity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*, 319, 149-163.
- Luo H, Van Coppenolle B, Seguin M, Boutry M (1995) Mitochondrial DNA polymorphism and phylogenetic relationships in *Hevea brasiliensis*. *Molecular Breeding*, 1, 51-63.
- Manicacci D, Couvet D, Belhassen E, Gouyon P-H, Atlan A (1996) Founder effects and sex ratio in the gynodioecious *Thymus vulgaris* L. *Molecular Ecology*, 5, 63-72.
- Marchelli P, Gallo L, Scholtz F, Ziegenhagen B (1998) Chloroplast DNA markers revealed a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 642-646.
- McCaughey DE (1994) Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91, 8127-8131.
- McCaughey DE (1995) The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 10, 198-202.
- Milligan BG (1992) Is organelle DNA strictly maternally inherited? Power analysis of a binomial distribution. *American Journal of Botany*, 79, 1325-1328.
- Moggensen HL (1996) The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany*, 83, 383-404.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Olmstead RG, Palmer JD (1994) Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany*, 81, 1205-1224.
- Palmer JD (1992) Mitochondrial DNA in plants systematics: applications and limitations. *Molecular Systematics of Plants* (eds ~~Nei M, Li W-H, Nevo E, Li W-H~~), pp. 99-108. Chapman & Hall, New York. *Soltis PS, Soltis DE, Doyle JD* 36-45
- Palmer JD, Herbon LA (1988) Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *Journal of Molecular Evolution*, 28, 87-97.
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79, 361-382.
- Petit RJ, Pineau E, Demesure B *et al.* (1997) Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94, 9996-10001.
- Pons O, Petit RJ (1995) Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. I. haploid locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 462-470.
- Powell W, Morgante M, McDevitt R, Vendramin GG, Rafalski JA (1995) Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92, 7759-7763.
- Provan J, Soranzo N, Wilson NJ *et al.* (1998) Gene-pool variation in Caledonian and European Scot pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*, 265, 1697-1705.
- Provan J, Russell JR, Booth A, Powell W (1999) Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Molecular Ecology*, 8, 505-511.
- Ran Z, Michaelis G (1995) Mapping of a chloroplast RFLP marker associated with the CMS cytoplasm of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 836-840.
- Raspe O (1998) *Biologie de la reproduction et variation génétique d'un arbre entomophile: Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae). PhD Thesis. Université catholique de Louvain (B).
- Reboud X, Zeyl C (1994) Organelle inheritance in plants. *Heredity*, 72, 132-140.
- Ronfort J, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Couvet D (1995) Mitochondrial DNA diversity and male-sterility in natural populations

- of *Daucus carota* ssp. *carota* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 150–159.
- Saumitou-Laprade P, Pannenbecker G, Boutin-Stadler V, Michaelis G, Vernet P (1991) Plastid DNA diversity in natural populations of *Beta maritima* showing additional variation in sexual phenotype and mitochondrial DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 81, 533–536.
- Saumitou-Laprade P, Rouwendal GJA, Cuguen J, Krens FA, Michaelis G (1993) Different CMS sources found in *Beta vulgaris* ssp. *maritima*: mitochondrial variability in wild populations revealed by a rapid screening procedure. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 529–535.
- 16 Schneider S, Kueffer J-M, Roessli D, Excoffier L (1997) ARLEQUIN, Version 1.1. A software for population genetic data analysis.
- Senda M, Onodera Y, Kinoshita T, Mikami T (1995) Mitochondrial gene variation and phylogenetic relationships in the genus *Beta*. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 914–919.
- Senda M, Onodera Y, Mikami T (1998a) Recombination events across the *atpA*-associated repeated sequences in the mitochondrial genomes of beets. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 964–968.
- Senda M, Onodera Y, Mikami T (1998b) Cytoplasmic diversity in leaf beet cultivars as revealed by mitochondrial DNA analysis. *Hereditas*, 128, 127–132.
- Strauss SH, Hong YP, Hipkins VD (1993) High levels of population differentiation for mitochondrial DNA haplotypes in *Pinus radiata*, *muricata*, and *attenuata*. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 605–611.
- Taberlet P, Gielly L, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105–1109.
- Tomaru N, Takahashi M, Tsumura Y, Takahashi M, Ohba K (1998) Intraspecific variation and phylogeographic patterns of *Fagus crenata* (Fagaceae) mitochondrial DNA. *American Journal of Botany*, 85 (5), 629–636.
- Tozuka A, Fukushi H, Hirata T et al. (1998) Composite and clinal distribution of *Glycine soja* in Japan revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 170–176.
- Tsumura Y, Suyama Y (1998) Differentiation of mitochondrial DNA polymorphisms in populations of five Japanese *Azida* species. *Evolution*, 52 (4), 1031–1042.
- Van Dijk H, Desplanque B (1998) European *Beta*: crops and their wild and weedy relatives. *Proceedings of the VIIth International Symposium: Plant Evolution in Man-Made Habitats*. August 10–15, 1998, Universiteit van Amsterdam, the Netherlands.
- Vendramin GG, Lelli L, Rossi P, Morgante M (1996) A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5, 595–598.
- Vendramin GG, Anzidei M, Madaghiale A, Bucci G (1998) Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 456–463.
- Wolf PG, Murray RA, Sipes SD (1997) Species-independent geographical structuring of chloroplast haplotypes in a montane herb *Ipomopsis* (Polemoniaceae). *Molecular Ecology*, 6, 283–291.
- Wolfe KH, Li W-H, Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84, 9054–9058.

One of the research programmes of the laboratory 'Génétique et Evolution des Populations Végétales' is currently investigating the evolution of the reproductive system and life history traits in the genus *Beta*. B. Desplanque is a PhD student in evolutionary genetics under the supervision of H. Van Dijk, with particular interest in the relationships between wild and cultivated beets. For the present study, his work was also supervised by F. Viard, a CNRS researcher involved in the study of population genetics, reproductive systems and population dynamics in *Beta* species.

Genetics and Biometry Laboratory,
University of Geneva, Switzerland. h

ASSOCIATION BETWEEN cpDNA AND mtDNA IN BEETS 13

Appendix I Mitochondrial DNA (mtDNA) and chloroplast DNA (cpDNA) haplotypes for the wild populations of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* studied

Code	Name of the population	A			Haplotype code (number of haplotypes)	
		n	mtDNA	cpDNA	mtDNA	cpDNA
1	Stes Maries de la mer	4	1	1	Nv (4)	V(4)
2	La Grande-Motte	4	1	1	Nv (4)	V (4)
3	Palavas les flots	4	1	2	Nv (4)	V (3), VII (1)
4	Maurin	3	2	2	A (1), Nv (2)	V (1), VII (2)
5	Lattes	6	2	2	G (4), Nv (2)	V (2), XIII (4)
6	Villeneuve les Maguelones	5	4	3	A (1), E (2), Nv (1), R (1)	II (1), V (3), VII (1)
7	St Jean de Vedas (1)	3	1	1	A (3)	VII (3)
8	St Jean de Vedas (2)	3	1	1	I (3)	III (3)
9	Balaruc les Bains	4	1	1	Nv (4)	V (4)
10	Meze (1)	5	2	2	A (3), Nv (2)	V (2), VII (3)
11	Meze (2)	5	2	2	A (4), Nv (1)	V (1), VII (4)
12	Meze (3)	3	2	2	Nv (2), Q (1)	V (1), VII (2)
13	Sete	2	2	2	E (1), Nv (1)	V (1), X (1)
14	Marseillan	5	3	3	A (2), F (1), Nv (2)	V (2), VII (2), XI (1)
15	Agde	2	1	1	A (2)	V (2)
16	Bezier	5	2	2	Nv (4), R (1)	V (4), II (1)
17	Valras plage	4	2	2	A (3), Nv (1)	V (1), VII (3)
18	St Pierre/Mer	5	2	2	E (1), Nv (4)	V (4), IX (1)
19	Bages	4	2	2	A (2), Nv (2)	V (2), VII (2)
20	Fleury	4	1	1	Nv (4)	V (4)
21	Gruissan	5	2	2	F (4), Nv (1)	V (1), XI (4)
22	Leucate	5	2	2	A (4), Nv (1)	V (1), VII (4)
23	Toulouge	5	1	1	Nv (5)	V (5)
24	Millas	4	1	1	E (4)	X (4)
25	Portel les Corbières	5	2	2	F (3), Nv (2)	V (2), XI (3)
26	Ferrals	5	2	2	I (3), Nv (2)	I (3), V (2)
27	Conhitac	4	1	1	Nv (4)	V (4)
28	Marseillette	2	1	1	Nv (2)	V (2)
29	Conques/Orbiel (1)	4	2	2	E (2), Nv (2)	V (2), X (2)
30	Conques/Orbiel (2)	5	3	3	F (3), I (1), Nv (1)	V (1), XI (3), XII (1)
31	Carcassone (1)	3	1	1	Nv (3)	V (3)
32	Carcassone (2)	4	1	1	F (4)	XI (4)
33	Lastour	2	1	1	Nv (2)	V (2)
34	Villegailhenc	4	1	1	Nv (4)	V (4)
35	Alzonne	2	1	1	Nv (2)	V (2)
36	Prouille	4	1	1	Nv (4)	V (4)
37	Bram	4	3	3	H (1), I (1), Nv (2)	IV (1), V (2), XIII (1)
38	Villepinte (1)	5	1	1	F (5)	VI (5)
39	Villepinte (2)	5	1	1	Nv (5)	V (5)
40	Villeneuve la Comptal	3	1	1	F (3)	XI (3)
41	Estambigou	3	1	1	Nv (3)	V (3)
42	Castelnaudary (1)	3	1	1	Nv (3)	V (3)
43	Castelnaudary (2)	1	1	1	Nv (1)	V (1)
44	Montmaur (1)	3	2	2	F (1), Nv (2)	V (2), XI (1)
45	Montmaur (2)	3	1	1	Nv (3)	V (3)
46	Avignonnet en Lauragais	5	2	2	E (4), F (1)	X (4), XII (1)
47	Cintegabelle	4	1	1	Nv (4)	V (4)
48	Baziège	3	2	2	E (2), Nv (1)	V (1), X (2)
49	Lagardelles/Ceze	5	2	2	F (2), Nv (3)	V (3), XI (2)
50	Isle	1	1	1	Nv (1)	V (1)
51	Verfeil	5	1	1	Nv (5)	V (5)
52	Castanet Tolosan	3	2	2	E (2), Nv (1)	V (1), X (2)
53	Plaisance du Touch	3	2	2	E (2), F (1)	X (2), XI (1)
54	St Lys	3	1	1	Nv (3)	V (3)
55	Grenades/Garonne	5	1	1	Nv (5)	V (5)
56	Montaigu/Save	5	3	2	H (1), Nv (3), O (1)	V (3), XI (2)
57	Mestre	1	1	1	H (1)	IV (1)

Appendix I Continued

Code	Name of the population	A			Haplotype code (number of haplotypes)	
		n	mtDNA	cpDNA	mtDNA	cpDNA
58	Montestruc	5	3	3	F (1), Nv (3), Sv (1)	V (3), VI (1), XI (1)
59	Fleurance	2	2	2	H (1), Sv (1)	IV (1), VI (1)
60	Merens	4	2	2	E (1), Nv (3)	V (3), X (1)
61	Lavardens (1)	3	1	1	Nv (3)	V (3)
62	Lavardens (2)	3	2	2	E (2), Nv (1)	V (1), X (2)
63	Lectoure (1)	5	1	1	Nv (5)	V (5)
64	Lectoure (2)	1	1	1	Nv (1)	V (1)
65	Castelnau d'Arbieu	4	2	2	H (2), Nv (2)	IV (2), V (2)
66	St Puy (1)	4	1	1	Nv (4)	V (4)
67	St Puy (2)	10	2	2	H (5), Nv (5)	IV (5), V (5)
68	La Romieu	4	1	1	Nv (4)	V (4)
69	Ayguetinte	3	1	1	Nv (3)	V (3)
70	Nerac	1	1	1	Nv (1)	V (1)
71	Vic Férensac	1	1	1	Nv (1)	V (1)
72	Condom (1)	9	1	1	Nv (9)	V (9)
73	Condom (2)	5	1	1	Nv (5)	V (5)
74	St Seurin d'Buzet	5	2	2	A (1), B (4)	IX (1), VIII (4)
75	Talmont	4	2	2	B (3), Nv (1)	V (1), VIII (3)
76	Suzac	4	3	3	A (1), B (1), Nv (2)	IX (1), V (2), VIII (1)
S1	Ell muntels	8	2	2	S (6), T (2)	II (6), VI (2)
S2	Raval de Christ	5	1	1	Nv (5)	V (5)
S3	Bitem	5	1	1	Nv (5)	V (5)
S4	Tivenys	4	1	1	Nv (4)	V (4)
S5	Benifallet	5	1	1	Nv (5)	V (5)
S6	Los Arenetes	5	1	1	Nv (5)	V (5)
S7	Benissa	5	2	2	M (4), Nv (1)	III (4), V (1)
S8	Paula del este	4	2	3	Nv (3), T (1)	V (2), VI (1), VII (1)
S9	Crevillente	4	2	3	Nv (3), P (1)	V (1), VII (2), X (1)
S10	Cox	5	2	2	N (1), Nv (4)	IV (1), V (4)
S11	Rafal	5	1	1	Nv (5)	V (5)
S12	Llomas de alburon	5	4	4	G (1), K (1), M (1), Nv (2)	III (1), V (2), VII (1), XII (1)
S13	Sierra Espuna	4	2	2	K (1), N (3)	IV (3), VII (1)
S14	La Hoya	5	3	3	E (1), Nv (2), U (2)	V (2), VII (2), X (1)
S15	Albox	5	2	2	M (1), T (4)	III (1), VI (4)
S16	Agua amarga	6	2	3	M (1), Nv (5)	III (1), VII (4), XIII (1)
S17	Cabo de gata	6	2	3	G (1), Nv (5)	V (1), VII (4), XIII (1)
S18	Almayate	5	1	2	Nv (5)	V (3), VII (2)
S19	Estepona	6	1	1	Nv (6)	V (6)
S20	Tarifa	4	3	2	A (2), Nv (1), R (1)	II (1), VII (3)
S21	Vega	5	2	2	G (4), L (1)	VII (1), XIII (4)
S22	Puerto real	4	1	1	Nv (4)	V (4)
S23	Cartaya	6	5	5	E (2), G (1), N (1), Nv (1), T (1)	IV (1), VI (1), VII (1), X (2), XIII (1)
S24	Elvas	5	2	1	A (1), K (4)	VII (5)
	Mean ± SE	4.10 ± 0.30	1.65 ± 0.16	1.67 ± 0.16		
	Mean* ± SE	4.50 ± 0.25	1.72* ± 0.17	1.74* ± 0.17		
	Total	414	20	13		

The codes are the same as those used in Fig. 1. *n*, sample size, *A*, number of haplotypes per population. Nv denotes for Nvulg and Sv, Svulg, respectively.

*Estimates based on populations having a sample size of three or more individuals.

- Annexe 3 -

Desplanque, B. Boudry, P. Broomberg, K.

Saumitou-Laprade, P. Cuguen, J. Van Dijk, H. (1999)

**Genetic diversity and gene flow between
wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae)
assessed by RFLP and microsatellite markers.**

Theoretical and Applied Genetics, 98: 1194-1201

B. Desplanque · P. Boudry · K. Broomberg
P. Saumitou-Laprade · J. Cuguen · H. Van Dijk

Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers

Received: 8 June 1998 / Accepted: 8 October 1998

Abstract Beets belonging to the species *Beta vulgaris* L. can be found in crop, wild and weedy forms, all of which are interfertile. We studied the intra-specific genetic relationships of about 300 individuals from 54 populations of various French geographic origins using nuclear molecular markers (five single-copy RFLP loci and one microsatellite locus). The patterns of diversity were congruent for both types of markers. Genetic diversity in wild beets appeared to be high, both in term of allele number and observed heterozygosity, whereas the narrowness of the cultivated-beet gene pool was confirmed. Genetic distances between all forms showed that weed beets in northern France are intermediates between sugar beet and inland wild beets in south-western France. This analysis allowed us to infer the paternal origin of weed beets and furthermore, is in agreement with a previous study which focused on their maternal origin: weed beet infesting sugar-beet fields originated from accidental and recurrent hybridization between cultivated lines and ruderal inland wild beets during the production of commercial seeds in south-western France. Inland wild beets are genetically close to Mediterranean coastal wild beets, but differ from other coastal forms (from Biscay, Brittany and

northern France). The study of gene flow in the beet complex contributes to the risk assessment of transgenic beets.

Key words RFLPs · Microsatellite · Gene flow · Genus *Beta* · Transgenic sugar beet

Introduction

Many domestic species have wild relatives, the geographical distribution of which sometimes overlaps with parts of their own distribution area (see Van Raamsdonk and Van Der Maesen 1996 for a crop-weed complex definition). Crop-to-wild hybridizations are well described for many genera such as *Brassica* (Lefol et al. 1991; Kerlan et al. 1992; Darmency 1994; Baranger et al. 1996; Mikkelsen et al. 1996), *Helianthus* (Cronn et al. 1997), *Lactuca* (De Vries 1997), *Penisetum* (Till-Bottraud et al. 1992), *Raphanus* (Klinger et al. 1992), *Sorghum* (Arriola and Ellstrand 1996) and *Zea* (Doebly 1990). The interest for studies on gene flow in crop-weed complexes has recently increased with the possibility of producing transgenic crops (Rogers and Parkes 1995; Snow and Palma 1997). The dispersion of a transgene can be assessed via modelling and computer simulation (Lavigne et al. 1996; Timmons et al. 1996), field experiments (see Conner and Dale 1996 for an example), or by in situ analysis of gene flow between crops and wild relatives using genetic markers (Raybould and Gray 1993; Gliddon 1994; Linder and Schmitt 1994; Luby and McNicol 1995; reviewed in Kareiva et al. 1996).

In this context, the beet complex is of particular interest as crop, wild and weedy forms can all be found in Europe. Moreover, these taxa are all interfertile and can easily be found in sympatry (Santoni and Bervillé 1992 a; Boudry et al. 1993). Consequently, the probability for hybridization to occur in *Beta* sp. is expected to be high (Kapteijns 1993; Raybould and Gray 1993).

Communicated by G. Wenzel

B. Desplanque · P. Boudry¹ · K. Broomberg
P. Saumitou-Laprade · J. Cuguen · H. Van Dijk (✉)
Laboratoire de Génétique et Evolution des
Populations Végétales, UPRESA 8016,
Université de Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France
Fax: 33-3.20.43.69.79
E-mail: henk.van-dijk@univ-lille1.fr

Present address:

¹IFREMER, Laboratoire de Génétique, Aquaculture
et Pathologie, BP 133, Ronce-les-Bains,
F-17390 La Tremblade, France

Herbicide-resistant transgenic sugar beet lines already exist (Dhalluin et al. 1992; Tsaftaris 1996) and hybrids between transgenic sugar beet and wild relatives have been obtained experimentally (Bartsch and Pohl-Orf 1996; Fredshavn and Poulsen 1996).

Interspecific relationships within the genus *Beta* have been described in detail by Letschert (1993) and by Jung et al. (1993). Several interfertile forms coexist within the species *Beta vulgaris* (De Bock 1986; Ford-Lloyd 1986; Ford-Lloyd and Hawkes 1986). According to their habitats, four groups can be defined: (1) sea beets [*B. vulgaris* subsp. *maritima* (L.) Arcangeli] mostly found along the western European coasts; (2) cultivated beets (*B. vulgaris* subsp. *vulgaris* L.), i.e. sugar beet, but also privately grown table beet (red beet) or leaf beet (Swiss chard) and fodder beet for cattle; (3) weed beets, which infest sugar-beet fields in northern France and have led to severe agronomic problems since the seventies (Horsney and Arnold 1979); (4) inland beets, which are typical of man-disturbed habitats and qualify as ruderal beets, are particularly common in the seed-production area of sugar beet in southern France. The genetic origin of weed beets and south-western inland beets is still poorly known. Inland wild forms in the seed-production area may originate from either natural non-coastal forms of *B. vulgaris* subsp. *maritima* (De Bock 1986) or from feral forms (for a review see Bartsch et al. 1993).

Weed beets are believed to result from accidental pollination between cultivated lines and ruderal pollen donors in the seed-production area of sugar beet (Santoni and Bervillé 1992 b). Their maternal cultivated origin was suggested by the analysis of cytoplasmic RFLP markers (Boudry et al. 1993); weed beets carry the typical cultivated mitochondrial haplotype associated with Owen cytoplasmic male sterility (CMS), while this character is never found among wild populations in France (Cuguen et al. 1994). Paternal origin was only postulated on the basis of vernalization requirement. Variation for this trait is determined by the polymorphism of a major gene (Munerati 1931): the dominant B allele enables bolting within the year the plant was sown without any vernalization and is suspected to cause the invasive character of weed beet. The B allele is highly selected in weeds because of the fast crop turnover. While this allele is absent in the cultivated beets, it is extremely frequent among both the ruderal populations in the seed-production area (Boudry et al. 1993) and the natural coastal populations of Biscay and the Mediterranean (Van Dijk et al. 1997). In addition, because the penetrance of the B allele is incomplete, the efficiency of its detection is reduced (Owen 1954; Boudry et al. 1994 a). Therefore, neutral genetic markers are needed to clearly identify the paternal origin of weed beet.

The present study addresses three major issues. By using co-dominant markers, we analysed the genetic diversity within and between the different groups refer-

red to above in order to: (1) genetically characterize the groups defined on a habitat basis and, more specifically, (2) determine the paternal origin of the weeds and, consequently, (3) discuss the risks associated with the use of transgenic sugar-beet cultivars.

Materials and methods

Collection of plant material

Previous analyses suggested that weed beets in northern France could result from hybridization events between both ruderal and cultivated beets within the seed-production area (Boudry et al. 1993). Weed beets are easily found in sugar-beet crops from northern France. In this area, most of the crop seeds sown [between 70 and 90%, M. Monjarret (GNIS), personal communication] are produced in south-western France, where ruderal beets are also present. Therefore we chose to sample mainly ruderal beets from this geographic area.

We analysed a total of about 300 individuals (see Table 1) from 82 populations separately (mostly between two and five individuals per population but, exceptionally, higher or lower numbers). The populations (Fig. 1) fell into the following categories: (1) cultivated beets for which the seeds were multiplied in most cases in the south-western seed production area: 28 cultivars of sugar beet and seven breeder's lines; two cultivars of fodder beet, one leaf beet and one table beet; (2) rural inland beets from the same south-western seed-production area; (3) weed beets from sugar-beet fields, and (4) wild coastal beets, which were mainly found along the French coast (from the Netherlands to the Mediterranean) and classified according to their geographical origin (Channel, Brittany, Biscay and Mediterranean). All non-cultivated accessions were sown in a greenhouse from seeds sampled in natural populations.

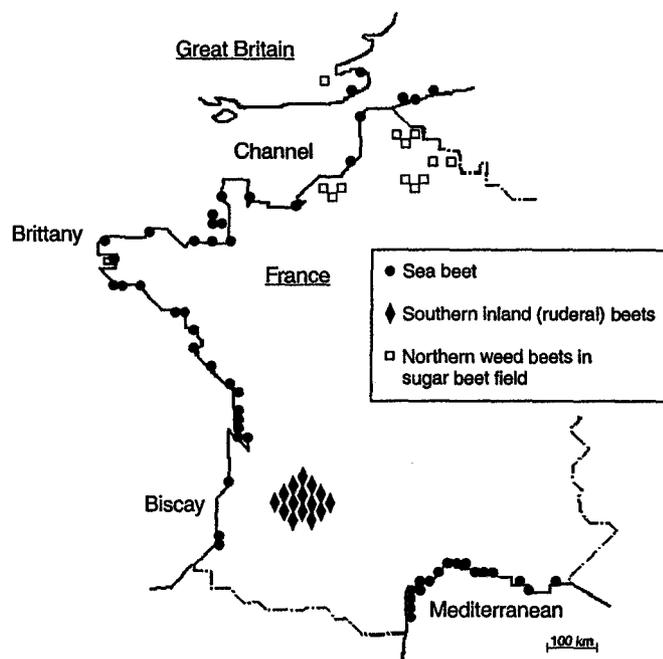


Fig. 1 Location of the beet populations studied

DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from 2 g of young leaves with a modified Dellaporta protocol as described in Saumitou-Laprade et al. (1991).

Nuclear RFLPs

A preliminary test was conducted on 12 individuals with 42 enzyme/probe combinations (four restriction enzymes: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *XbaI* and 18 RFLP probes). This led us to select five combinations (three enzymes and five probes) according to the following criteria: unambiguous reading and strictly single-copy markers. The selected probes (see Table 1) were derived from four of the nine linkage groups in the beet genome (Pillen et al. 1992). For each individual, 5 µg of total DNA were digested with *EcoRI* (2 U/µg), *EcoRV* (4 U/µg) and *HindIII* (8 U/µg). Restriction DNA fragments were separated by electrophoresis for 16 h at 30 V on an 0.8% agarose gel using TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 20 mM Na acetate, 2 mM EDTA, 18 mM NaCl at pH 8). The DNA was transferred onto a Nylon membrane (Biodyne A from Pall) using the vacuum-blot system of Pharmacia. After transfer, DNA was UV cross-linked (1.2 J/cm²) to the Nylon support.

Labelling of 10 ng of plasmid DNA containing a sugar-beet probe was performed with PCR using the "Dig labelling Mix" (Boehringer Mannheim) and 1 unit of *Taq* Standard (Perkin Elmer). Half of the resulting labelled probe was hybridized overnight at 68°C. Membranes were then washed and hybridization signals detected according to the chemiluminescence method of Allefs (1990).

Microsatellite locus

A polymerase chain reaction with primers for the *Beta* microsatellite Bvm3 locus (Mörchen et al. 1996) was carried out in a Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600, using 0.75 units of Perkin Elmer standard DNA *Taq* polymerase and about 50 ng of total DNA in a final volume of 15 µl. Further conditions were 1.5 mM MgCl₂, 50 µM of each nucleotide, and 0.2 µM of each primer (purchased at MWG Biotech). One of the primers was labeled with the infra-red fluorescent dye IRD41. Due to the sensitivity of the detection system, only 19 cycles at an annealing temperature of 60°C were necessary. After the addition of half a volume of loading buffer, 0.5–1 µl of each reaction was loaded onto a 25-cm denaturing 'LongRanger' gel (polyacrylamide derivative, FMC Bioproducts). Electrophoresis and detection were performed on an LI-COR automated sequencer model 4000L (LI-COR Inc., Nebraska, USA). Fragment size (between 96 and 128 nucleotides) was first determined by a pUC 19 sequence, and then by a mixture of alleles of known nucleotide numbers.

Data analysis

The number of alleles, as well as the observed and expected heterozygosity (H_o and H_e , respectively), were calculated using GENETIX V. 3.0 software (Belkhir et al. 1996). A Mantel-test was also performed using this software. F -statistics were estimated using GENEPOP V. 3.0 (Raymond and Rousset 1995), following Weir and Cockerham (1984). By partitioning the variance of allele frequencies between populations, among individuals within a population, and within individuals, this estimation procedure allows the analysis of the heterozygote deficiency within populations (F_{is} estimates) and the genetic differentiation among populations (F_{st} estimates) (see Hartl and Clark 1989). Exact tests for gene differentiation and genotypic linkage-disequilibrium, as well as for other tests of independence, were performed using GENEPOP V. 3.0. The genetic

distance between groups was calculated using Reynolds' distance (Reynolds et al. 1983). The loci were all pooled together except for the microsatellite locus, and two genetic distance matrices were calculated from the allelic frequencies: one for the RFLP loci and one for the microsatellite locus. These two matrices were then compared in order to check the congruence between the two different markers employed. Since the two matrices appeared to be highly positively correlated (Mantel test significance probability level = 0.002 with 1000 re-samplings) we combined them. A resulting unrooted tree was performed using the Neighbour-Joining method. These analyses were carried out with the PHYLIP V. 3.52 package (Felsenstein 1993).

Results

Levels of polymorphism within groups

All six loci turned out to be highly polymorphic (Table 1): 26 alleles were identified for the microsatellite locus while there was a mean number of 10.2 (SD = 0.2) for the five RFLP loci. When analysing each locus separately, every group showed a similar number of alleles, except for the cultivated beet group which exhibited a smaller value (this applied also for Biscay beets, although the difference was not as pronounced). Values for the observed and expected heterozygosity, as well as the fixation index F_{is} , are provided in Table 1. The H_o values appear to be high and more or less equivalent for all the groups. The F_{is} estimates were tested by an exact test based upon deviations from Hardy-Weinberg expectations: except for the cultivated beets, all the deviations were significant for both RFLP and microsatellite loci.

Relationships among groups

When all groups were pooled, no linkage disequilibrium was found for each pair of loci over all groups (exact test, data not shown). The overall F_{st} value is significant ($P < 0.01$) and is estimated as 0.10 (SE = 0.02, based on a jackknife procedure performed with GENETIX). Table 2 displays the matrix of Weir and Cockerham F_{st} estimates when groups were compared two by two (loci were not considered individually here). An exact test on allelic differentiation (allelic frequency distribution) was performed for each locus and each pair of populations: the only non-significant case concerns the comparison of Biscay versus Channel and Brittany. All the other values attributed to group couples showed a significant allelic differentiation for five out of six loci (data not shown).

Reynolds' genetic distances are given in Table 2, and Fig. 2 shows their graphic representation using a Neighbour-Joining method. Weed beets clearly appeared to be intermediate between cultivated and ruderal beets from south-western France. The latter are closer to Mediterranean beets than to the beets of Biscay. Mediterranean beets are isolated from the other

Table 1 Levels of polymorphism within groups for the five RFLP loci and the microsatellite locus. H_o : observed heterozygosities; H_e : expected heterozygosities

Groups	Number of populations	Number of individuals	Number of alleles						
			RFLP loci (probe/restriction enzyme) ^a						Microsat. locus
			pk495/ <i>EcoRI</i>	pk753/ <i>EcoRV</i>	pk815/ <i>HindIII</i>	pk851/ <i>EcoRV</i>	pk967/ <i>EcoRV</i>	Unweighted mean (and SD) over RFLP loci	BVM3 ^b
Cultivated beets	39 var.	39	6	6	2	4	3	4.2(1.8)	9
Southern inland (ruderal) beets	15	82	10	10	10	9	8	9.4(0.9)	16
Northern weed beets	12	71	10	7	7	9	6	7.8(1.6)	13
Mediterranean sea beets	18	47	8	9	7	8	9	8.2(0.8)	19
Sea beets of Biscay	10	24	7	6	6	7	6	6.4(0.5)	10
Sea beets of Channel and Brittany	27	54	9	9	4	10	8	8.0(2.3)	18
Over all groups of beets	82 (without cultivated)	319	10	11	10	10	10	10.2	26

$P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

^a Nomenclature according to Pillen et al. 1992

^b Nomenclature according to Mörchen et al. 1996

coastal beets of the same group (Biscay, Brittany and Channel). The relative position of each group to the other was tested by bootstrapping (10 000 re-samplings): the only value below 98% concerned the southwestern ruderal beets, which seems to be closer to the coastal beets of Biscay than to Mediterranean beets in 20% of the trees (data not shown).

Discussion

Genetic diversity

Nuclear RFLPs are commonly used for gene-flow analysis within a given species, as in the case of *Hordeum* (Zhang et al. 1993) and *Triticum* (Le Corre and Bernard 1995). They are also appropriate for studies of crop-weed complexes, as was the case for *Brassica* (Crouch et al. 1995), *Hevea* (Besse et al. 1993), *Sorghum* (Aldrich and Doebley 1992), *Aegilops* (Sasanuma et al. 1996), etc. Currently, the use of microsatellites is rapidly expanding and is no longer exceptional for plants. For a partial review see Morgante and Olivieri (1993), as well as examples in Awadalla and Rietland (1997), Streiff et al. (1998); and for *Beta* see Mörchen et al. (1996), Raybould et al. (1998). The number of alleles is usually high: in the present study, all five RFLPs, chosen for their high polymorphism, exhibited about ten alleles whereas the microsatellite locus displayed 26. This microsatellite locus demonstrated patterns that were identical to those obtained with the five RFLP loci.

This finding is based on only one locus but is nevertheless compatible with the results of recently published studies on RFLPs versus microsatellites: see for example *Oryza* (Wu and Tanksley 1993), *Solanum* (Provan et al. 1996), and *Pisum* (Lu et al. 1996). The physical independence of 4 out of 5 RFLP markers, as well as the congruence between the six loci analysed, strongly suggest that the use of additional markers would not significantly increase the reliability of the population genetic estimates (see the review by Bossart and Pashley Prowell 1998 for a more detailed discussion).

A high degree of polymorphism was observed within all the groups, except for cultivated beets. In terms of genetic resources, this suggests that wild *B. vulgaris* presents a significant genetic diversity. The small number of alleles found in the cultivated group confirmed the narrowness of the cultivated gene pool in *B. vulgaris* (Jung et al. 1993). Indeed, in most species genetic diversity is greater among wild populations than among crop populations in terms of numbers of alleles (see Saghai Maroof et al. 1994 for an example with microsatellite data). The high values of the F_{is} estimator may be due to a Wahlund effect, since different populations were pooled in each group. Conversely, we did not observe any deviation from Hardy-Weinberg expectation and the F_{is} was low for the cultivated beets, which is an additional argument for the genetic homogeneity of cultivated beets.

In addition, our study showed that the different groups we defined according to habitat and

Table 1 Continued

H_o (SD)		H_e (SD)		Weir and Cockerham F_{is} estimator (SD)	
RFLPs	BVM 3	RFLPs	BVM 3	RFLPs	BVM 3
0.538 (0.255)	0.657	0.480 (0.250)	0.719	-0.069 ^{ns} (0.170)	0.100 ^{ns}
0.634 (0.094)	0.766	0.724 (0.091)	0.867	0.165 ^{***} (0.094)	0.122 [*]
0.497 (0.153)	0.609	0.632 (0.153)	0.823	0.261 ^{***} (0.111)	0.267 ^{***}
0.655 (0.083)	0.659	0.772 (0.044)	0.900	0.163 ^{***} (0.099)	0.278 ^{***}
0.508 (0.211)	0.609	0.644 (0.180)	0.867	0.251 ^{**} (0.164)	0.318 ^{**}
0.556 (0.244)	0.796	0.609 (0.265)	0.862	0.222 ^{***} (0.155)	0.085 [*]
		0.725	0.894		

geographical characteristics have a genetic basis: coastal wild beets are genetically distinct from the other groups and, within the coastal beets, one can easily distinguish between Mediterranean and Atlantic (Biscay) or Northern coastal types. The only non-significant genetic differentiation concerns the comparison of Channel and Biscay populations. Along these coasts, populations of sea beets are continuously distributed and gene flow is likely to take place. The lack of significant genetic differentiation between these areas can also be due to the limited power of the present study, as only 78 individuals were sampled.

Origin of weed beets

Our study demonstrated the intermediate position of weed beets between the cultivated and south-western ruderal inland gene pools of beets. Weed beets clearly appeared to be produced by accidental hybridization of cultivated lines and ruderal-beet pollen donors in the seed-production area. This result confirms the previous study (Boudry et al. 1993) which identified their maternal origin. Indeed, the genetic distances used here are based on nuclear markers with a biparental transmission. This, in turn, makes it possible to infer the paternal contribution, which had been previously determined on the sole basis of the transmission of the bolting gene's B allele. Another interesting result that emerges from the present study is the high genetic diversity of weed beets despite their recent evolutionary

history. Their high nuclear genetic diversity contrasts with the previously found uniformity of mtDNA (Boudry et al. 1993). This suggests that: (1) pollen flow from inland to cultivated beets is likely to be both frequent and recurrent, and (2) the transportation of crop-wild hybrids from the seed-production area to the sugar-beet fields in Northern France is also likely to be a recurrent phenomenon rather than the result of a single introgressive event followed by local expansion in sugar-beet fields.

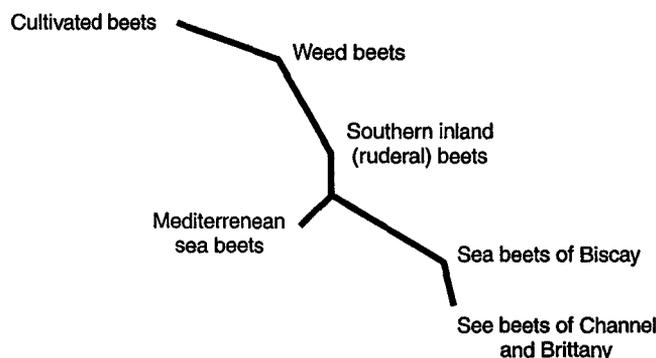
By using greenhouse studies on life-history traits, Bartsch and Schmidt (1997) suggested that a similar scenario occurs in northern Italy, the other important European seed-production area. Introgression between cultivated and wild beets could therefore be a general trend but one which has to be ascertained more accurately by fine-scale genetic analyses in crop-wild sympatric areas.

Origin of ruderal beets

The origin of south-western rural inland beets is less obvious. Their genetic diversity appeared to be high, since one can find as many alleles in this group as among coastal forms. In addition, their closest relatives appeared to be the coastal beets, in particular those of the Mediterranean, but not the Atlantic beets despite the latter's closer geographic proximity. Genetic proximity is corroborated by the fact that many ruderal populations occur all along a geographic

Table 2 Relationships among groups: Reynolds' genetic distance matrix (below diagonal) and F_{st} estimator values over six loci (above diagonal)

Groups of beets	Cultivated beets	Southern inland (ruderal) beets	Northern Weed beet	Mediterranean sea beets	Sea beets of Biscay	Sea beets of Channel and Brittany
Cultivated beets	0	0.115	0.043	0.174	0.186	0.199
Southern inland (ruderal) beets	0.115	0	0.042	0.022	0.079	0.112
Weed beet	0.052	0.049	0	0.088	0.128	0.157
Mediterranean sea beets	0.176	0.034	0.099	0	0.067	0.102
Sea beets of Biscay	0.186	0.093	0.142	0.087	0	0.002
Sea beets of Channel and Brittany	0.204	0.120	0.166	0.113	0.020	0

**Fig. 2** Unrooted dendrogram inferred from Reynolds' genetic distance matrix between the different forms of beet, based on six nuclear loci (Neighbor-Joining method)

continuum, linking up the south-western seed-production area to the Mediterranean coastlines, while no populations were observed when moving towards the Atlantic coasts (data not shown). Although these ruderal populations seem to be of wild origin, their position in the tree (Fig. 2) indicated an introgression with cultivated forms. Further studies are needed to clarify this point.

Gene flow between beet populations and risk assessment

Crops which are cultivated annually for their seeds often have companion weed races (Harlan 1992), which, among other characteristics, shatter their seeds more readily. Crop-weed gene exchange is generally easy, especially among allogamous species. Sugar beet belongs to that category of species that is cultivated for its vegetative biomass only. Weed beets can only persist in annual cultures if they complete their reproduction before crop harvesting. For beets, crop-weed gene exchange is far more difficult. It is only possible when some crop individuals reproduce early, although this can be prevented by selection (Longden et al. 1975). The fact, however, that beets are grown from seed requires large-scale seed production. Gene exchange is in fact restricted to crop-wild hybridization during seed production, the wild (ruderal) forms being, however,

already rather 'weedy'. Beets are in a special situation because of the presence of a dominant gene in ruderal beets which has a very strong effect on early flowering (Boudry et al. 1994 b). This leads directly to weedy forms in the sugar-beet fields.

Multiple interactions seem to occur between the different forms of beet. On the one hand, weed beets in the sugar-beet fields of northern France are sometimes in parapatry with coastal beets. But, up to now, there is no evidence for gene exchange between them, as shown by their F_{st} value which is among the highest (Table 2). On the other hand, there are frequent gene exchanges in the seed-production area. These hybridization events need to be examined in greater detail because in one direction, from ruderal to cultivated beets, weed beets are generated: if a transgene is introduced via the maternal route then transgenic weeds will be produced. In the other direction, from cultivated lines to ruderal beets, hybridization events could cause the transgene to escape to the wild if it is introduced by the paternal route. The other seed-production areas in Europe are obviously submitted to the same risks because of the presence of coastal wild beets near the cultivated lines, especially in England and Northern Italy (Bartsch et al. 1996). Thus, evaluating every possible gene flow is a pre-requisite for the risk assessment of transgenic beets.

Acknowledgements We thank R. Dron for technical assistance, M. Mörchen for help on microsatellite data, as well as Dr. F. Viard and Pr. Ph. Vernet. The authors are grateful to Pr. Ch. Jung (Institute of Crop Science and Plant Breeding, Kiel, Germany) and Dr. G. Steinrücken (A. Dieckmann Company) for providing the RFLP probes. This work was funded by the French Ministry of Environment (grant No. 94153), the Région Nord Pas-De-Calais and FEDER. B. Desplanque was supported by a CNRS fellowship.

References

- Aldrich PR, Doebley J (1992) Restriction fragment length variation in the nuclear and chloroplast genomes of cultivated and wild *Sorghum bicolor*. *Theor Appl Genet* 85: 293-302
- Allefs JJHM, Salentijn EMJ, Krenz FA, Rouwendal GJA (1990) Optimization of non-radioactive Southern-blot hybridization, single-copy detection and re-use of blots. *Nucleic Acids Res* 18: 3099-3100

- Arriola PE, Ellstrand NC (1996) Crop-to-weed gene flow in the genus *Sorghum* (Poaceae): spontaneous interspecific hybridization between johnsongrass, *Sorghum halepense*, and crop sorghum, *S. bicolor*. *Am J Bot* 83:1153-1160
- Awadalla P, Ritland K (1997) Microsatellite variation and evolution in the *Mimulus guttatus* species complex with contrasting mating systems. *Mol Biol Evol* 14:1023-1034
- Baranger A, Chèvre AM, Eber F, Renard M (1996) Effects of oilseed rape genotype on the spontaneous hybridization rate with a weedy species: an assessment of transgene dispersal. *Theor Appl Genet* 91:956-963
- Bartsch D, Pohl-Orf M (1996) Ecological aspects of transgenic sugar beet: transfer and expression of herbicide resistance in hybrids with wild beets. *Euphytica* 91:55-58
- Bartsch D, Schmidt M (1997) Influence of sugar beet breeding on populations of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* in Italy. *J Veg Sci* 8:81-84
- Bartsch D, Sukopp H, Sukopp U (1993) Introduction of plants with special regard to cultigens running wild. Transgenic organisms. Birkhäuser Verlag, Switzerland
- Bartsch D, Schmidt M, Pohl-Orf M, Haag C, Schuphan I (1996) Competitiveness of transgenic sugar beet resistant to beet necrotic yellow vein virus and potential impact on wild beet populations. *Mol Ecol* 5:199-205
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (1996) GENETIX, logiciel sous Window TM pour la génétique des populations. Version 3.0
- Besse P, Seguin M, Chevallier MH, Nicolas D, Lanaud C (1993) Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theor Appl Genet* 70:237-244
- Bossart JL, Pashley Prowell D (1998) Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends Ecol Evol* 13:202-206
- Boudry P, Mörchen M, Saumitou-Laprade P, Vernet P, Van Dijk H (1993) The origin and evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide-resistant transgenic sugar beets. *Theor Appl Genet* 87:471-478
- Boudry P, Broomberg K, Saumitou-Laprade P, Mörchen M, Cuguen J, Van Dijk H (1994a) Gene escape in transgenic sugar beet: what can be learned from molecular studies of weed beet populations. 3rd Int Symp on Biosafety Results of Fields Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Monterey, California, Published by the University of California, Oakland, California, USA, pp 45-88
- Boudry P, Wieber R, Saumitou-Laprade P, Vernet P, Van Dijk H (1994b) Identification of RFLP markers closely linked to the bolting gene B and their significance for the study of the annual habit in beets (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 88:852-858
- Conner AJ, Dale PJ (1996) Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes. *Theor Appl Genet* 92:505-508
- Cronn R, Brothers M, Klier K, Bretting PK (1997) Allozyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives. *Theor Appl Genet* 95:532-545
- Crouch JH, Lewis BG, Lydiate DJ, Mithen R (1995) Genetic diversity of wild, weedy and cultivated forms of *Brassica rapa*. *Heredity* 74:491-496
- Cuguen J, Wattier R, Saumitou-Laprade P, Forcioli D, Mörchen M, Van Dijk H, Vernet P (1994) Gynodioecy and mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Gen Selec Evol* 26:87-101
- Darmency H (1994) The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their relatives species: introgression and weediness. *Mol Ecol* 3:27-40
- De Bock TSM (1986) The genus *Beta*: domestication, taxonomy and interspecific hybridization for plant breeding. *Acta Hort* 182:335-343
- De Vries IM (1997) Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genet Res Crop Evol* 44:165-174
- Dhalluin K, Bossut M, Bonne E, Mazur B, Leemans J, Botterman J (1992) Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *BioTechnology* 10:309-314
- Doebley J (1990) Molecular evidence for gene flow among *Zea* species; genes transformed into maize through genetic engineering could be transferred to its wild relatives, the Teosintes. *Bioscience* 40:443-454
- Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.5p
- Ford-Lloyd BV (1986) Intraspecific variation in wild and cultivated beets and its effect upon intraspecific classification of wild and cultivated plants. *Systematic Assoc* 29:331-334
- Ford-Lloyd BV, Hawkes JG (1986) Weed beets, their origin and classification. *Acta Hort* 82:399-404
- Fredshavn JR, Poulsen GS (1996) Growth behavior and competitive ability of transgenic crops. *Field Crops Res* 45:11-18
- Gliddon C (1994) The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: biological models and theoretical perspectives. *Mol Ecol* 3:41-44
- Harlan JR (1992) Crops and man. American Society of Agronomy Inc, Crop Science Society of America Inc, Madison, Wisconsin, USA
- Hartl DL, Clark AG (1989) Principles of population genetics. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts
- Horsney KG, Arnold MM (1979) The origin of weed beet. *Ann Appl Biol* 92:279
- Jung C, Pillen K, Frese L, Fähr S, Melchinger AE (1993) Phylogenetic relationships between cultivated and wild species of the genus *Beta* revealed by DNA "fingerprinting". *Theor Appl Genet* 86:449-457
- Kapteijns AJAM (1993) Risk assesment of genetically modified crops. Potential of four arable crops to hybridize with the wild flora. *Euphytica* 66:145-149
- Kareiva P, Parker IM, Pascual M (1996) Can we use experiments and models in predicting the invasiveness of genetically engineered organisms? *Ecology* 77:1670-1671
- Kerlan MC, Chèvre AM, Eber F, Baranger A, Renard M (1992) Risk assesment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species. I. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica* 62:145-153
- Klinger T, Arriola PE, Ellstrand NC (1992) Crop-weed hybridization in radish (*Raphanus sativus*): effects of distance and population size. *Am J Bot* 79:1431-1435
- Lavigne C, Godelle B, Reboud X, Gouyon PH (1996) A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. *Theor Appl Genet* 93:1319-1326
- Le Corre V, Bernard M (1995) Assessment of the type and degree of restriction fragment length polymorphism (RFLP) in diploid species of the genus *Triticum*. *Theor Appl Genet* 90:1063-1067
- Lefol E, Danielou V, Darmency H, Kerlan MC, Vallee P, Chevre A, Renard M, Reboud X (1991) Escape of engineered genes from rapeseed to wild *Brassicaceae*. Crop Protection Conference, Brighton UK, no. 7, pp 1049-1056
- Letschert JPW (1993) *Beta* section *Beta*: biogeographical patterns of variation and taxonomy. Wageningen Agric Univ Papers 93:1-155
- Linder C, Schmitt J (1994) Assessing the risks of transgene escape through time and crop-wild hybrid persistence. *Mol Ecol* 3:23-30
- Longden PC, Scott RK, Tyldesley JB (1975) Bolting of sugar beet grown in England. *Outlook Agric* 8:188-193
- Lu J, Knox MR, Ambrose MJ, Brown JKM, Ellis THN (1996) Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theor Appl Genet* 93:11031111
- Luby JJ, McNicol RJ (1995) Gene flow from cultivated to wild raspberries in Scotland: developing a basis for risk assesment for

- the testing and deployment of transgenic cultivars. *Theor Appl Genet* 90:1133-1137
- Mikkelsen TR, Andersen B, Jorgensen RB (1996) The risk of crop transgene spread. *Nature* 380:31
- Mörchen M, Cuguen J, Michaelis J, Hänni G, Saumitou-Laprade P (1996) Abundance and length polymorphisms of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. *Theor Appl Genet* 92:326-333
- Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Jour* 3:175-182
- Munerati O (1931) L'eredità della tendenza alla annualità nella commune barbabietola coltivata. *Ztschr Züchtung, Reihe A. Pflanzenzüchtung*: 84-89
- Owen JW (1954) The significance of single reactions in sugar beets. *J Am Soc Sugar Beet Technol* 18:245-251
- Pillen K, Steinrücken G, Wricke G, Herrmann RG, Jung C (1992) A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 84:129-135
- Provan J, Powell W, Waugh R (1996) Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor Appl Genet* 92:1078-1084
- Raybould AF, Gray AJ (1993) Genetically modified crops and hybridization with wild relatives: a UK perspective. *J Appl Ecol* 30:199-219
- Raybould AF, Mogg RJ, Aldam C, Gliddon CJ, Thorpe RS, Clarke RT (1998) The genetic structure of sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) populations. III. Detection of isolation by distance at microsatellite loci. *Heredity* 80:127-132
- Raymond M, Rousset F (1995) Population genetics software for exact tests and ecumenism. *J Hered* 86:248-249
- Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105:767-779
- Rogers HJ, Parkes HC (1995) Transgenic plants and the environment. *J Exp Bot* 46:467-488
- Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc Nat Acad Sci USA* 91:5466-5470
- Santoni S, Bervillé A (1992a) Characterization of the nuclear ribosomal DNA units and phylogeny of *Beta* L. wild forms and cultivated beets. *Theor Appl Genet* 83:533-542
- Santoni S, Bervillé A (1992b) Evidence for gene exchanges between sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and wild beets: consequences for transgenic sugar beets. *Plant Mol Biol* 20:578-580
- Sasanuma T, Miyashita NT, Tsunewaki K (1996) Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA. 3. Intra- and Inter-specific variations of five *Aegilops sitopsis* species. *Theor Appl Genet* 92:928-934
- Saumitou-Laprade P, Pannenberg G, Boutin-Stadler V, Michaelis G, Vernet P (1991) Plastid DNA diversity in natural populations of *Beta maritima* showing additional variation in sexual phenotype and mitochondrial DNA. *Theor Appl Genet* 81:533-536
- Snow A, Palma PM (1997) Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *BioScience* 47:86-97
- Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkellner J, Kremer A (1998) Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Mol Ecol* 7:317-328
- Till-Bottraud I, Reboud X, Brabant P, Lefranc, Rherissi, Vedel, Darmency H (1992) Outcrossing and hybridization in wild and cultivated foxtail millet: consequences for the release of transgenic crops. *Theor Appl Genet* 82:11-16
- Timmons AM, Charters YM, Crawford JM, Burn D, Scott SE, Dubbels SJ, Wilson NJ, Robertson A, O'Brien ET, Squire GR, Wilkison MJ (1996) Risks from transgenic crops. *Nature* 380:487
- Tsiftaris A (1996) The development of herbicide-tolerant transgenic crops. *Field Crops Res* 45:115-123
- Van Dijk H, Boudry P, McCombie H, Vernet P (1997) Flowering time in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) along a latitudinal cline. *Acta Oecol* 18:47-60
- Van Raamsdonk LWD, Van Der Maesen LJG (1996) Crop-weed complexes: the complex relationship between crop plants and their wild relatives. *Acta Bot Neerlandica* 45:135-155
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370
- Wu KS, Tanksley SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 241:225-235
- Zhang Q, Saghai Maroof MA, Kleinhofs A (1993) Comparative diversity analysis of RFLPs and isozymes within and among populations of *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. *Genetics* 134:909-916



Appendice A-1. Liste des populations sauvages (France uniquement) ou mauvaises herbes étudiées.

Type	département	localité	n°pop chap. 3	n°pop chap. 1	code	coordonnées "Nord"	(coord. ville selon IGN.fr)	coordonnées "Ouest"	(coord. ville selon IGN.fr)
Littorale Atlant.	33	Andemos (port de cassy)	86		CAS	-01	05	44	44
Littorale Atlant.	85	Bonhomme (port le); beauvoir sur mer	91		BON	-02	02	46	54
Littorale Atlant.	64	Erromardie	83		ERR	-01	39	43	23
Littorale Atlant.	40	Hossegor	85		HOS	-01	23	43	40
Littorale Atlant.	33	Marechale (la), lesparre medoc	92		MRC	-00	56	45	18
Littorale Atlant.	79	Niort (marant)	89		MARA	-00	27	46	19
Littorale Atlant.	85	Olonne (les sables)	90		OLO	-01	47	46	29
Littorale Atlant.	17	Rivedoux plage	88		RIV	-01	16	46	09
Littorale Atlant.	17	St Seurin d'Euzet	80	74	SEUR	00	49	45	31
Littorale Atlant.	17	St Trojan les bains	87		TROJ	-01	12	45	50
Littorale Atlant.	40	St Vincent de Tyrosse (port d'albret)	84		ALB	-01	18	43	39
Littorale Atlant.	17	Suzacb (coord. De St G. de Didonne)	82	76	SUZ	-01	00	45	36
Littorale Atlant.	17	Talmont sur gironde	81	75	TAL	-00	54	45	32
Littorale médit.	11	Bages	20	19	BAG	02	59	43	07
Littorale Médit.	34	Cap Agde (coord. de Agde)	15		CAP	03	28	43	18
Littorale Médit.	34	La Grande- Motte	2	2	PON	04	05	43	33
Littorale Médit.	11	Leucate plage	23	22	LEU	03	01	42	54
Littorale Médit.	34	Meze a	10	12	MEZ	03	26	43	25
Littorale Médit.	34	Meze b	11	12	MEZ	03	26	43	25
Littorale Médit.	34	Palavas	3	3	PAL	03	56	43	31
Littorale Médit.	13	Salins de Giraud (coord. de Arles)			SAL	04	37	43	40
Littorale Médit.	34	Sète	13	13	SET	03	41	43	24
Littorale Médit.	11	St Pierre sur mer (coord. de Narbonne)	19	18	PIER	03	00	43	11
Littorale Médit.	13	Stes maries de la mer	1	1	MARI	04	25	43	27
Littorale Médit.	34	Valras	18	17	VAL	03	17	43	14
Littorale Médit.	34	Villeneuve-les-Maguelones	6	6	MAG	03	51	43	31
Rudérale côtière	34	Agde	16	15	AGD	03	28	43	18
Rudérale côtière	34	Balaruc	9	9	BAL	03	40	43	26
Rudérale côtière	34	Beziers	17		BEZ	03	13	43	20
Rudérale côtière	11	Ferrals les Corbières	27	26	FER	02	43	43	08
Rudérale côtière	11	Fleury	21	20	FLY	03	08	43	13
Rudérale côtière	11	Gruissan	22		GRUI	03	05	43	06
Rudérale côtière	11	Gruissan (sec)	22		GRUI	03	05	43	06
Rudérale côtière	34	Lattes (route de la mer)	5		LAT	03	54	43	34
Rudérale côtière	34	Lattes / thot	4	4	THOT	03	54	43	34
Rudérale côtière	34	Marseillan	14	14	MSN	03	31	43	21
Rudérale côtière	34	Meze c	12	12	MEZ	03	26	43	25
Rudérale côtière	34	St jean de Védas	7	7	ORT	03	49	43	34
Rudérale côtière	34	St jean de Védas	8	8	TER	03	49	43	34
Rudérale intérieure	11	Alzonne	35	35	ALZ	02	10	43	15
Rudérale intérieure	31	Avignonet en lauragais	46	46	AVI	01	47	43	21
Rudérale intérieure	31	Baziège	48	48	BAZ	01	36	43	27
Rudérale intérieure	11	Bram	37	37	BRAM	02	06	43	14
Rudérale intérieure	11	Carcassonne	31	31	CAR	02	20	43	13
Rudérale intérieure	11	Carcassonne (route de Trèbes)	32		CAR	02	20	43	13
Rudérale intérieure	31	Castanet Tolosan	52	52	TOL	01	30	43	31
Rudérale intérieure	32	Castelnau d'arbieu	68	65	CST	00	42	42	53
Rudérale intérieure	11	Castelnaudary	41	41	ESTAM	01	57	43	19
Rudérale intérieure	11	Castelnaudary (champ tournesol)	43		CAST	01	57	43	19
Rudérale intérieure	11	Castelnaudary (parking SOS)	42		CAST	01	57	43	19
Rudérale intérieure	31	Cintegabelle	47	47	CIN	01	31	43	18
Rudérale intérieure	11	Conilhac-Corbières	28	27	CANI	02	42	43	11
Rudérale intérieure	11	Conques sur orbiel	29	29	CQU	02	24	43	16
Rudérale intérieure	11	Conques sur orbiel (mines)	30	30	CQM	02	24	43	16
Rudérale intérieure	32	Grenade sur garonne	55	55	GSG	01	17	43	46
Rudérale intérieure	32	Isle Jourdain		50	ISLE	01	04	43	36

Rudérale intérieure	31	Lagardelle sur Leze	50	49	LAG	01	23	43	24
Rudérale intérieure	11	Lastour	33		LAS	02	22	43	20
Rudérale intérieure	11	Marseillette		27	MST	02	32	43	12
Rudérale intérieure	66	Millas	25	24	MIL	02	41	42	41
Rudérale intérieure	32	Montaigut sur save	56		MGU	01	13	43	41
Rudérale intérieure	31	Montgiscard	49		MGI	01	33	43	27
Rudérale intérieure	11	Montmaur	44	44	MON	01	50	43	23
Rudérale intérieure	11	Montmaur (château)	45	45	MON	01	50	43	23
Rudérale intérieure	31	Plaisance du Touch	53	53	PLAI	01	17	43	34
Rudérale intérieure	11	Portel les corbières	26	25	POR	02	55	43	03
Rudérale intérieure	11	Prouille	36		PRO	02	05	43	10
Rudérale intérieure	11	Puicheric			PUI	02	37	43	13
Rudérale intérieure	31	St Lys	54	54	LYS	01	10	43	30
Rudérale intérieure	66	Toulouse	24	23	TOU	02	49	42	40
Rudérale intérieure	31	Verfeil	51	51	VER	01	39	43	39
Rudérale intérieure	11	Villegailhenc	34	34	VILG	02	21	43	16
Rudérale intérieure	11	Villeneuve la comptal	40	40	VLC	01	55	43	17
Rudérale intérieure	11	Villepinte	38	38	VILP	02	05	43	16
Rudérale intérieure	11	Villepinte	39	39	VIL	02	05	43	16
Rudérale Agen	32	Aubiet			AUB	00	47	43	38
Rudérale Agen	32	Ayguetinte	75	69	AIG	00	25	43	50
Rudérale Agen	32	Condom	78	72	CON	00	22	43	57
Rudérale Agen	32	Condom (route de St Orens)	79	73	CON	00	22	43	57
Rudérale Agen	32	Fleurance	60	59	FLEU	00	39	43	51
Rudérale Agen	82	Gimat	57		GIM	00	56	43	51
Rudérale Agen	32	La Romieu	71	68	ROM	00	29	43	58
Rudérale Agen	32	La Romieu (dech 96)	72		ROM	00	29	43	58
Rudérale Agen	32	La Romieu (dech 97)	73		ROM	00	29	43	58
Rudérale Agen	32	La Romieu (tournesol)	74		ROM	00	29	43	58
Rudérale Agen	32	La Sauvetat (Mestres)	58		MES	00	31	43	51
Rudérale Agen	32	Lavardens	62		LAV	00	30	43	45
Rudérale Agen	32	Lavardens (sec)	64		LAV	00	30	43	45
Rudérale Agen	32	Lavardens (tournesol)	63		LAV	00	30	43	45
Rudérale Agen	32	Lectoure	65	63	LEC	00	37	43	56
Rudérale Agen	32	Lectoure (63)	67		LEC	00	37	43	56
Rudérale Agen	32	Lectoure (64+)	66	64	LEC	00	37	43	56
Rudérale Agen	32	Merens	61	60	MER	00	32	43	45
Rudérale Agen	32	Montestruc sur gers	59	58	MUC	00	37	43	47
Rudérale Agen	47	Nérac	76	70	NER	00	20	48	08
Rudérale Agen	32	St Puy (0)	69	66	PUY	00	27	43	52
Rudérale Agen	32	St Puy (1)	70		PUY	00	27	43	52
Rudérale Agen	32	Vic Fézensac	77	71	VICFER	00	18	43	45
Mauvaise herbe	59	Bugnicourt			BUG	03	09	50	17
Mauvaise herbe	51	Chalon sur marne			CHA	04	21	48	57
Mauvaise herbe	59	Cysoing			CYS	03	12	50	34
Mauvaise herbe	60	Esquennoy			ESQ	02	16	49	39
Mauvaise herbe	60	Gournay sur aronde			GOU	02	40	49	29
Mauvaise herbe	59	Gruson			GRU	03	12	50	35
Mauvaise herbe	02	Laon			LAON	03	37	49	34
Mauvaise herbe	59	Lesquin			VOY	03	06	50	35
Mauvaise herbe	59	Lezenne			LER	03	06	50	36
Mauvaise herbe	59	Lezenne			LEZ	03	06	50	36
Mauvaise herbe	80	Poulainville			POU	02	18	49	56
Mauvaise herbe	60	Saint Just			JUST	02	25	49	30
Mauvaise herbe	02	saint Quentin			QUEN	03	17	49	50
Mauvaise herbe	59	Toufflers			TOU	03	13	50	39
Mauvaise herbe	59	Vendeville			VEN	03	04	50	34
Mauvaise herbe	59	Villeneuve d'Ascq			4CANT	03	08	50	37
Mauvaise herbe	59	Villeneuve d'Ascq			POMP	03	08	50	37
Mauvaise herbe	59	Villeneuve d'Ascq			PPMS	03	08	50	37
Mauvaise herbe	59	Villeneuve d'Ascq			PPpro	03	08	50	37
Mauvaise herbe	59	Villeneuve d'Ascq			PPR	03	08	50	37
Mauvaise herbe	59	Villeneuve d'Ascq			PPTS	03	08	50	37
Mauvaise herbe	59	Wattignies			WATT	03	02	50	35

