

50376  
2007  
155



N° D'ORDRE : 4125

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE 1**

**THESE**

*pour obtenir le grade de*  
**Docteur en Sciences de l'Université de Lille 1**  
**Spécialité : Sciences de la vie**

*présentée par*  
**Sarah VILLAIN**

*le 13 décembre 2007*

**HISTOIRE EVOLUTIVE DE LA SECTION *BETA***  
*Mise en évidence des phénomènes*  
*d'hybridation et de spéciation au sein de la Section*  
*dans le bassin méditerranéen*

*devant le jury suivant :*

<b>Jacques DAVID</b>	Rapporteur
<b>Christine DILLMANN</b>	Rapporteur
<b>Malika AÏNOUCHE</b>	Examineur
<b>Christophe THEBAUD</b>	Examineur
<b>Joël CUGUEN</b>	Directeur de thèse
<b>Pascal TOUZET</b>	Directeur de thèse



13/12/07



# RESUME / ABSTRACT

---

*B.v. maritima*, *B.v. adanensis*, *B. macrocarpa* 2X et *B. macrocarpa* 4X appartiennent à la section *Beta*, genre *Beta* (*Amaranthaceae*) dont l'aire de diversification s'est concentrée dans le bassin méditerranéen. La diversité des répartitions géographiques et des traits d'histoire de vie au sein de cette section engendre la possibilité d'étudier la phylogénie d'espèces proches, les effets des oscillations climatiques du Pléistocène et les événements de spéciation en sympatrie et en système insulaire.

Une phylogénie de la section a été construite afin d'appréhender la diversité génétique de chaque espèce et sous-espèce et les relations qu'elles partagent. De grandes différences de niveaux de diversité entre les taxons autogames (*B.v. adanensis* et *B. macrocarpa* 2X) et allogame (*B.v. maritima*) et une relation étroite entre *B.v. maritima* et *B.v. adanensis* ont été observés.

Les patrons de variabilité intraspécifique ont été examinés en détail chez l'espèce cosmopolite côtière *B.v. maritima* et des hypothèses quant à la localisation et au nombre de zones refuges ont été testées. Les résultats indiquent que *B.v. maritima* a probablement subi une contraction de son aire de distribution qui s'est ainsi restreinte à trois principales zones refuges puis s'est étendue vers le Nord, pour s'établir dans les régions qu'elle occupe actuellement.

Dans un de ces refuges potentiels, sur la péninsule ibérique, deux espèces diploïdes de la section, *B. macrocarpa* et *B.v. maritima*, sont trouvées en sympatrie. L'espèce allogame montre une structure génétique de ses populations très faible et de hauts niveaux de diversité génétique comparativement à l'espèce autogame chez laquelle la structuration génétique est très marquée et la diversité génétique très faible. Il a d'autre part été montré l'existence de plantes intermédiaires génétiquement entre les deux espèces, suggérant des événements rares d'hybridation en conditions naturelles.

Enfin, l'étude suggère une origine multiple de la forme allotétraploïde de *Beta macrocarpa*, une espèce de betterave endémique des Canaries qui dérive d'un croisement naturel entre ces deux espèces diploïdes continentales : *B.v. maritima* et *B. macrocarpa*.

*B.v. maritima*, *B.v. adanensis*, *B. macrocarpa* 2X et *B. macrocarpa* 4X belong to the *Beta* section, genus *Beta* (*Amaranthaceae*), which diversified in the Mediterranean basin.

The variety of geographic distributions and life history traits displayed among this section provide opportunities to test hypotheses concerning phylogeny of related species, effects of Pleistocene glaciation and speciation events in sympatry and in insular system.

A phylogeny of the section was constructed to apprehend the genetic diversity of species/subspecies and the relationships between them. Strong differences in level of diversity between autogamous (*B. v. adanensis* and *B. macrocarpa*) versus allogamous (*B. v. maritima*) taxa, and close relationship between the two subspecies *B.v. maritima* and *B.v. adanensis* were observed.

Patterns of intraspecific variation were examined for the widespread coastal species *B.v. maritima* and hypotheses concerning the location and number of glacial refugia were tested. Results indicate that *B.v. maritima* was probably restricted to three main refugia and has recently expanded northward from the refuges into its current distribution.

In one of these putative refuges, in the Iberic Peninsula, two species of the section, *B. macrocarpa* 2X and *B.v. maritima* are found in sympatric situation. The allogamous species, *B.v. maritima*, displays a low level of population structure and high levels of genetic diversity while autogamous species *B. macrocarpa* 2X shows a larger degree of population structure and lower genetic diversity levels. The occurrence of genetically intermediate genotypes suggest rare hybridization events in natural populations.

Finally, this study presents genetic evidence for the multiple origin of an allotetraploid form of *Beta macrocarpa*, an endemic beet species of Canary Islands, which derived from a natural cross between two diploid continental species: *B. v. maritima* and *B. macrocarpa*.

# REMERCIEMENTS

---

Je tiens à remercier en tout premier lieu Joel CUGUEN, directeur du laboratoire de Génétique et Évolution des Populations Végétales de l'Université de Lille 1, pour m'avoir accueillie, encadrée et fait découvrir de nouvelles contrées pendant ces trois années de thèse.

Mes remerciements vont également à Pascal TOUZET, codirecteur de ce travail, pour ses nombreux conseils, sa disponibilité (même outre-atlantique !) et ses encouragements incessants.

Je remercie très sincèrement les rapporteurs, Christine DILLMANN et Jacques DAVID, et les examinateurs Malika Aïnouche et Christophe THEBAUD, qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Ces travaux n'auraient pas pu être initiés sans la mise à disposition de matériel végétal par Lothar FRESE du « Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants » en Allemagne et Brian FORD-LLOYD de l'Université de Birmingham au Royaume-Uni.

Un peu plus près, à Capelle en Pévèle, l'aide très précieuse, récurrente et spontanée de Pierre DEVAUX concernant notamment la cytométrie de flux m'a particulièrement touchée. Qu'il en soit ici largement remercié.

Ce manuscrit n'aurait pas non plus vu le jour si le gros nounours du Canada ou le requin corail de l'Océan Indien ne m'avaient pas laissé la vie sauve lors de nos rencontres impromptues. Je tiens donc à les saluer, au cas où nos chemins viendraient à se recroiser...

Nombreux sont ceux qui ont fait de ces trois années une période de ma vie riche en émotions (si si Ticounette, tu en fais partie !!!), qu'il s'agisse de l'équipe de jour, de l'équipe de nuit ou de celle de toujours (figure ci-joint). Je me suis permis d'immortaliser ceux à qui j'avais très sincèrement envie d'exprimer ma plus profonde gratitude...

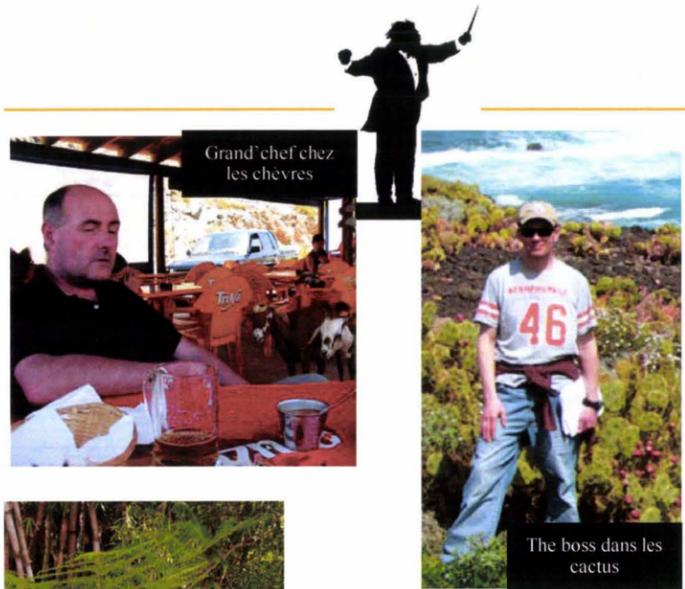
## **Merci à tous !**

PS : j'ai failli oublier de remercier deux éléments clés de ma thèse :

- mon ordinateur portable qui m'a permis d'amorcer la rédaction de cette thèse sous le soleil brulant des Maldives et qui, malgré mes craintes, a fait grève de bugs ces derniers temps, respects !
- les protagonistes déjantés de « Scrubs » (saison 1 à 6 !) qui m'ont égayé les très rares soirées restées libres !

PS du PS : je remercie énormément la *B. macrocarpa* 4X de s'être installée aux Canaries plutôt qu'aux Kerguelen.

PS du PS du PS : un grand merci aussi à toutes les personnes que j'ai oubliées de citer et qui ne m'en tiendront pas rigueur...



Grand'chef chez les chèvres

The boss dans les cactus



Fafa au pays des fougères géantes

Jeff chez les bedouines

... aux compagnons des expéditions en terres inconnues



A2

Merci de m'avoir supporté dans le bureau et tant fait rire, même dents serrées !



Ticounette

... aux deux goinfres des « pauses thé » que rien ne fait grossir, ELLES !

Merci pour les conseils et coups de main en BM malgré mes boubouteries à répétitions!



... à la joyeuse équipe des serres



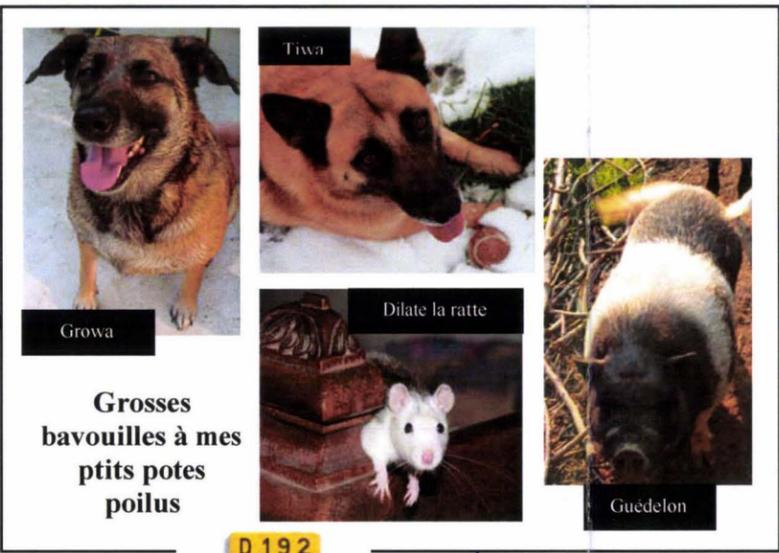
Le labo GEPV

A l'équipe de jour, et particulièrement...



A l'équipe de nuits (blanches, arghh)

Je m'abstiendrai de commentaire, mais c'était chouette, à la très prochaine !



Grosses bavouilles à mes ptits potes poilus

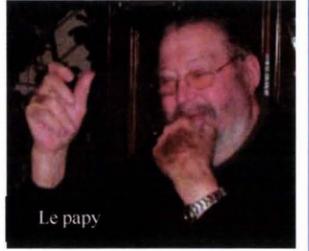


A l'équipe de toujours !



MERCI MERCI

Dans la famille VILLAIN, je remercie :



Le papy



Les mamies



Le papa et la maman



Le frangin et son bout'chou

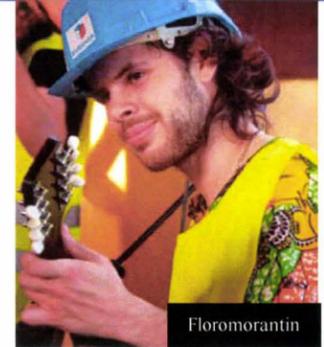
Oh vi, surtout les parents pour tant de choses, depuis tant de temps!



Pauline et Margaux



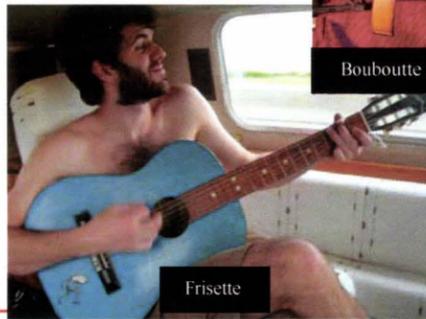
Tiennetienne



Floromorantin



Bouboutte number one



Frisette



Parkinsonne



Miko

Un merci tout particulier à mon Namoureux, euh et désolée pour la photo kitch... jle frai pu

# T ABLE DES MATIERES

RESUME / ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	6
INDEX DES TABLEAUX ET DES FIGURES	9
INTRODUCTION GENERALE	12
CADRE THEORIQUE DE L'ETUDE	13
A. PHYLOGEOGRAPHIE	13
A.I. Objectifs et Principes	13
A.II. Principaux modèles	15
B. PHYLOGENIES D'ESPECES ET MACROEVOLUTION	17
B.I. Impact des données moléculaires sur les études phylogénétiques	17
B.II. Arbres phylogénétiques	19
a) Les méthodes fondées sur les distances (phénéétiques)	19
b) Les méthodes fondées sur les caractères (cladistiques)	20
C. ORIGINES DE NOUVELLES LIGNEES EVOLUTIVES	21
C.I. Processus de spéciation	21
a) Le concept d'espèce	21
b) Les modèles de spéciation	22
c) Les mécanismes d'isolement reproducteur	23
d) La spéciation : une transition écologique	24
e) La spéciation : une transition génétique	26
f) La vitesse de spéciation	28
C.II. Spéciation par hybridation	29
a) Les phénomènes d'hybridation et d'introgession	29
b) Les fréquences et les conséquences de l'hybridation	30
c) L'exemple du Pouillot verdâtre ( <i>Phylloscopus trochiloides</i> )	31
C.III. Polyploidisation	32
a) Les processus menant à la polyploïdie	32
b) Les conséquences et le succès de la ploïdie	34
c) L'exemple de <i>Draba</i> (Brassicaceae)	35
d) L'exemple de <i>Spartina</i> (Poaceae)	36
C.IV. Cas des systèmes insulaires	38
D. MODELE BIOLOGIQUE D'ETUDE : LA SECTION BETA	39
D.I. Éléments de taxonomie	39
D.II. Distribution géographique	40
D.III. Habitats	41
D.IV. Régimes de reproduction et cycles de vie	41
D.V. Potentialités d'hybridation	42
<b>CHAPITRE I. RELATIONS EVOLUTIVES ENTRE ESPECES DE LA SECTION BETA (AMARANTHACEAE) MISES EN EVIDENCE PAR DES MARQUEURS NUCLEAIRES ET CHLOROPLASTIQUES</b>	<b>44</b>
A. INTRODUCTION	45
B. MATERIEL ET METHODES	46
B.I. Matériel biologique	46
B.II. Protocoles	47
a) Les séquences chloroplastiques	47
b) Les séquences nucléaires	48
B.III. Analyses phylogénétiques	49
a) L'étude des séquences chloroplastiques	49
b) L'étude des séquences nucléaires	49
C. RESULTATS	50

C.I.	<i>Diversité génétique dans la section Beta</i>	50
a)	Le polymorphisme chloroplastique	50
b)	Le polymorphisme nucléaire	51
C.II.	<i>Reconstruction de la phylogénie de la section</i>	52
a)	Le réseau d'haplotypes chloroplastiques	52
b)	Les arbres phylogénétiques	54
D.	DISCUSSION	57
D.I.	<i>B.v. maritima</i>	57
D.II.	<i>B.v. adanensis</i>	58
D.III.	<i>B. macrocarpa diploïde</i>	59
D.IV.	<i>B. macrocarpa tétraploïde : une nouvelle espèce?</i>	59

## CHAPITRE II. PHYLOGEOGRAPHIE D'UNE ESPECE COTIERE : LA STRUCTURE GENETIQUE DE *BETA VULGARIS MARITIMA* TEMOIGNE-T-ELLE DES PERIODES GLACIAIRES PASSES ? 61

A.	INTRODUCTION	62
B.	MATERIEL ET METHODES	63
B.I.	<i>Matériel biologique</i>	63
B.II.	<i>Protocole</i>	65
a)	Les séquences chloroplastiques	65
b)	Les marqueurs microsatellites	65
B.III.	<i>Analyses phylogéographiques</i>	65
a)	L'analyse des séquences chloroplastiques	65
b)	L'analyse des microsatellites nucléaires	66
C.	RESULTATS	66
C.I.	<i>Evènements démographiques révélés par les séquences chloroplastiques</i>	66
a)	L'analyse de variance moléculaire	66
b)	L'analyse NCA (Nested Clade Analysis)	67
C.II.	<i>Éléments de phylogéographie révélés par le polymorphisme nucléaire</i>	68
a)	La détermination du nombre de groupes génétiquement proches	69
b)	Le polymorphisme des marqueurs microsatellites	70
D.	DISCUSSION	72

## CHAPITRE III. EFFETS DE LA SYMPATRIE ET DU SYSTEME DE REPRODUCTION CHEZ DES TAXONS APPARENTES DE LA PENINSULE IBERIQUE, *BETA VULGARIS MARITIMA* ET *BETA MACROCARPA* (AMARANTHACEAE) 75

A.	INTRODUCTION	76
B.	MATERIEL ET METHODES	77
B.I.	<i>Matériel biologique</i>	77
B.II.	<i>Description écogéographique de la zone d'étude</i>	78
B.III.	<i>Protocoles</i>	80
a)	Les marqueurs microsatellites nucléaires	80
b)	Les marqueurs minisatellites mitochondriaux	80
c)	Les analyses de niveaux de ploïdie	81
B.IV.	<i>Analyses</i>	82
C.	RESULTATS	83
C.I.	<i>Diversité et structuration génétique de B.v. maritima et B. macrocarpa en Espagne</i>	83
a)	La diversité génétique au niveau nucléaire	83
b)	La structuration génétique des populations au niveau nucléaire	83
c)	La diversité génétique au niveau mitochondrial	86
d)	La structuration génétique des populations au niveau mitochondrial	88
C.II.	<i>Relations génétiques entre les deux espèces</i>	89
a)	Au niveau nucléaire	89
b)	Au niveau cytoplasmique	92
C.III.	<i>Caractérisation génotypique, phénotypique et cytométrique des hybrides</i>	93
D.	DISCUSSION	95
D.I.	<i>Diversité et structuration génétique de deux taxons à systèmes de reproduction distincts</i>	95
D.II.	<i>Relations génétiques entre les deux taxons</i>	95

## CHAPITRE IV. ORIGINES ET DIVERSITE DES *BETA MACROCARPA* TETRAPLOIDES ENDEMIQUES DES CANARIES 97

A.	INTRODUCTION	98
B.	MATERIEL ET METHODES	101

B.I.	Matériel biologique	101
B.II.	Méthode	102
a)	La détermination des niveaux de ploïdie	102
b)	Les marqueurs moléculaires	102
c)	Les conditions expérimentales de culture en serre	102
C.	RESULTATS	104
C.I.	Espèces présentes aux Canaries	104
a)	Le cas de <i>B.v. maritima</i>	104
b)	Le cas des <i>B. macrocarpa</i> 2X et 4X	104
C.II.	Diversité génétique des populations	105
a)	Le polymorphisme microsatellite	105
b)	La structuration géographique des génotypes, locus par locus	105
c)	La structuration génétique totale	108
d)	Le polymorphisme des marqueurs minisatellites mitochondriaux	109
C.III.	Différentiation morphologique et phénologiques entre <i>B. macrocarpa</i> 2X et 4X	109
a)	Les différences morphologiques en chambre de culture	110
b)	Les différences morphologiques et phénologiques en conditions naturelles	111
D.	DISCUSSION	112
D.I.	<i>B. macrocarpa</i> 2X canariennes	112
D.II.	Statut taxonomique de <i>B. macrocarpa</i> 4X	113
D.III.	Datation de l'émergence de <i>B. macrocarpa</i> 4X	113
D.IV.	Hypothèses quant à la dynamique de colonisation de l'archipel	114
a)	Scénario 1 : Hybridation in situ	114
b)	Scénario 2 : Hybridation in situ avec espèces parentales allopatriques	114
c)	Scénario 3 : Hybridation ex situ	115
D.V.	Hypothèses quant aux conditions d'établissement des populations	117
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>		<b>118</b>
A.	PROSPECTION AU MAROC	118
A.I.	Sites d'échantillonnage	118
a)	La répartition géographiques des échantillons	118
b)	Les habitats	119
A.II.	« Aspect » des espèces échantillonnées	120
a)	L'espèce <i>B.v. maritima</i>	120
b)	L'espèce <i>B. macrocarpa</i> 2X	121
B.	PROSPECTION SUR L'ARCHIPEL DE MADERE	121
B.I.	Sites d'échantillonnage	122
a)	La répartition géographique des échantillons	122
b)	Les habitats	123
B.II.	Espèces échantillonnées	123
a)	L'espèce <i>B.v. maritima</i>	123
b)	L'espèce <i>B. macrocarpa</i>	124
C.	PERSPECTIVES DE RECHERCHE	124
C.I.	Le système Macaronésie/Maroc	125
C.II.	Les conditions d'établissement et de maintien des populations <i>B. macrocarpa</i> 4X aux Canaries	125
C.III.	Les remaniements génomiques associés à la polyploïdisation et leurs vitesses	126
<b>ANNEXES</b>		<b>127</b>
A.	DESCRIPTION ET CONDITIONS D'AMPLIFICATION DES AMORCES UTILISEES	127
B.	TABLEAUX DE POLYMORPHISME NUCLEAIRE	128
B.I.	<i>Adh</i>	128
B.II.	<i>ITS</i>	128
C.	CLEF D'INFERENCE POUR LA NCA (2005)	129
D.	DIFFERENCES PHENOLOGIQUES ENTRE <i>B. MACROCARPA</i> 2X ET 4X AUX CANARIES	131
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>		<b>133</b>

# Index des tableaux et des figures

TABLEAU 1 : ÉCHELLE STRATIGRAPHIQUE DE L'ÈRE CENOZOÏQUE	16
TABLEAU 2: PRINCIPAUX MECANISMES D'ISOLEMENT REPRODUCTEUR (D'APRES MAYR (1974))	24
TABLEAU 3 : LOCALISATION ET ORIGINE DU MATERIEL BIOLOGIQUE DE L'ETUDE	46
TABLEAU 4 : POLYMORPHISME D'HAPLOTYPES	50
TABLEAU 5 : DIVERSITE NUCLEOTIQUE CHLOROPLASTIQUE ET NUCLEAIRE DES ESPECES DIPLOÏDES DE LA SECTION	52
TABLEAU 6 : RESULTATS DES ANALYSES DE MP ET ML	54
TABLEAU 7 : LOCALISATION ET ORIGINE DU MATERIEL BIOLOGIQUE DE L'ETUDE	64
TABLEAU 8 : DISTANCES ENTRE CLADES A L'INTERIEUR DU CLADOGRAMME TOTAL	68
TABLEAU 9 : POLYMORPHISME DES MICROSATELLITES NUCLEAIRES SELON LES AIRES GEOGRAPHIQUES	71
TABLEAU 10 : IDENTIFICATION ET LOCALISATION DES POPULATIONS	78
TABLEAU 11 : POLYMORPHISME DES MARQUEURS MICROSATELLITES PAR ESPECE	83
TABLEAU 12 : DIVERSITE GENETIQUE ET NIVEAU D'HETEROZYGOTIE DANS LES POPULATIONS DE <i>B. V. MARITIMA</i>	85
TABLEAU 13 : DIVERSITE GENETIQUE ET NIVEAU D'HETEROZYGOTIE DANS LES POPULATIONS DE <i>B. MACROCARPA</i>	86
TABLEAU 14 : POLYMORPHISME DES MARQUEURS MINISATELLITES CHEZ <i>B. V. MARITIMA</i>	86
TABLEAU 15 : POLYMORPHISME DES MARQUEURS MINISATELLITES CHEZ <i>B. MACROCARPA</i>	87
TABLEAU 16 : POLYMORPHISME DES MICROSATELLITES PAR ESPECE	89
TABLEAU 17 : PROPORTION DES HAPLOTYPES MINISATELLITES PAR ESPECE	92
TABLEAU 18 : DETAIL DES SITES D'EHANTILLONNAGE	101
TABLEAU 19 : DIVERSITE ALLELIQUE POUR CHAQUE LOCUS CHEZ <i>B. MACROCARPA</i> 2X ET 4X.	105
TABLEAU 20 : COORDONNEES DES SITES ECHANTILLONNES AU MAROC	118
TABLEAU 21 : COORDONNEES DES SITES D'ECHANTILLONNAGE	122

FIGURE 1: EVOLUTION DU NOMBRE DE PUBLICATIONS TRAITANT DE PHYLOGEOGRAPHIE DEPUIS 1990	13
FIGURE 2: RELATIONS PHYLOGENETIQUES ENTRE ESPECES OU POPULATIONS SPATIALEMENT DISJOINTES SOUS L'EFFET DE LA VICARIANCE ET DE LA DISPERSION (REDESSINE DE AVISE, 2000)	14
FIGURE 3 : LOCALISATION DES 3 PRINCIPAUX REFUGES MEDITERRANEENS (R1, R2 ET R3) ET DES 5 PLUS IMPORTANTES ZONES DE CONTACT ET D'HYBRIDATION DES EXPANSIONS POST-GLACIAIRES (H1 A H5) (SCHMITT, 2007)	15
FIGURE 4: PORTION DE L'UNIQUE ILLUSTRATION DE « L'ORIGINE DES ESPECES » (DARWIN, 1859)	17
FIGURE 5: ARBRE DU VIVANT SELON ERNST HAECKEL (1866)	18
FIGURE 6: PRINCIPAUX MODELES DE SPECIATION (D'APRES FUTUYMA (1997))	23
FIGURE 7: MODELE DE DOBZHANSKY-MULLER A DEUX LOCUS	24
FIGURE 8: RADIATION ADAPTATIVE DES PINSONS DES GALAPAGOS (ENCYCLOPAEDIA BRITANICA ONLINE, 2005)	25
FIGURE 9: DIFFERENCES ANATOMIQUES ENTRE <i>MIMULUS CARDINALIS</i> (EN HAUT) ET <i>M. LEWISII</i> (EN BAS) EN RELATION AVEC LEURS POLLINISATEURS RESPECTIFS	26
FIGURE 10: RELATIONS STRUCTURELLES ENTRE LES CHROMOSOMES DE TROIS ESPECES D' <i>HELIANTHUS</i> (RIESEBERG ET AL., 1995)	27
FIGURE 11: GRADUALISME PHYLETIQUE <i>VERSUS</i> EQUILIBRE PONCTUE (D'APRES O'NEIL, 2006)	28
FIGURE 12: SPECIATION PAR HYBRIDATION ET INTROGRESSION (RIDLEY, 1997)	29
FIGURE 13 : CARTE DE DISTRIBUTION DU COMPLEXE D'ESPECES DE POUILLOT VERDATRE EN ASIE ET DE LEURS SPECTROGRAMMES DE CHANTS RESPECTIFS (IRWIN ET AL., 2001A)	31
FIGURE 14: MODES DE FORMATION DES POLYPLOÏDES (D'APRES CAMPBELL & REECE, 2001)	33
FIGURE 15 : LE RAT VISCACHA ROUGE, <i>TYMPANOCTOMYS</i>	34
FIGURE 16: ARBRE DE PARCIMONIE DERIVE DE L'ANALYSE DE 636 PB DE SEQUENCES D'ITS CHEZ <i>D. AIZOIDES</i> , <i>D. DUBIA</i> ET <i>D. TOMENTOSA</i> (WIDMER & BALTISBERGER, 1999)	36
FIGURE 17: EFFET DES INTRODUCTIONS DE <i>S. ALTERNIFLORA</i> SUR LES HYBRIDATIONS RECENTES ET LA SPECIATION ALLOPOLYPLOÏDE DANS LA LIGNEE HEXAPLOÏDE DE LA SPARTINE (AÏNOUCHE ET AL., 2003)	37
FIGURE 18 : AQUARELLE DE <i>BETA V. MARITIMA</i> (MOSSBERG & STENBERG, 1992)	39
FIGURE 19: PHYLOGENIE DU GENRE <i>BETA</i> SECTION <i>BETA BASEE</i> SUR 10 LOCUS ALLOZYMIQUES (D'APRES LETSCHERT, 1993)	40

FIGURE 20: DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES 3 PRINCIPAUX TAXONS DE LA SECTION <i>BETA</i> : <i>B. V. MARITIMA</i> , <i>B. V. ADANENSIS</i> , <i>B. MACROCARPA</i>	40
FIGURE 21 : DISTRIBUTION DES INDIVIDUS ANALYSES	46
FIGURE 22 : LOCALISATION DES FRAGMENTS SEQUENCES	47
FIGURE 23 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REGION DE L'ADN RIBOSOMIQUE ITS (INTERNAL TRANSCRIBED SPACER) CHEZ LES ORGANISMES EUCARYOTES	48
FIGURE 24 : DIVERSITE NUCLEOTIDIQUE LE LONG DES FRAGMENTS NUCLEAIRES (RESPECTIVEMENT (A) ADH, (B) CAB5 ET (C) ITS)	51
FIGURE 25: RESEAU D'HAPLOTYPES CHLOROPLASTIQUES DE LA SECTION <i>BETA</i>	52
FIGURE 26 : ARBRES DE NJ (EN ML) OBTENUS RESPECTIVEMENT AVEC LES SEQUENCES D' <i>ADH</i> , <i>ITS</i> ET <i>CAB5</i>	56
FIGURE 27 : LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DES INDIVIDUS ANALYSES	63
FIGURE 28 : STRUCTURE DU RESEAU POUR LA NCA	67
FIGURE 29 : ASSIGNATION DES INDIVIDUS POUR <i>K=2</i> (RESULTATS OBTENUS AVEC LE LOGICIEL STRUCTURE)	69
FIGURE 30 : ASSIGNATION DES INDIVIDUS POUR <i>K=3</i> (RESULTATS OBTENUS AVEC LE LOGICIEL STRUCTURE)	70
FIGURE 31 : PRINCIPAUX REFUGES GLACIAIRES ET ROUTES MIGRATOIRES DE <i>B. V. MARITIMA</i> SUGGERES PAR LES DONNEES NUCLEAIRES	73
FIGURE 32 : ISOTHERMES CONTEMPORAINS (NORD DE L'EUROPE) ET RECONSTRUITS (SUD DE L'EUROPE) DU DERNIER MAXIMUM GLACIAIRE (LGM) (KADEREIT <i>ET AL.</i> , 2005)	73
FIGURE 33 : CARTOGRAPHIE DES POPULATIONS ECHANTILLONNEES	77
FIGURE 34 : DOMAINES ECOGEOGRAPHIQUES DE L'ESPAGNE ET DU PORTUGAL (RETRAVAILLE DE BLUMENSTOCK & THORNWAITE, 1941; EXTRAIT DE BOUMA, 2005)	79
FIGURE 35 : CYTOMETRE DE FLUX PA (WWW.PARTEC.COM)	81
FIGURE 36 : EXEMPLES DE PROFILS EN CYTOMETRIE DE FLUX POUR UN INDIVIDU DIPLOÏDE ET UN INDIVIDU TETRAPLOÏDE RESPECTIVEMENT (DEVAUX, PERS. COM.)	81
FIGURE 37 : ARBRE DE NJ SUR POPULATIONS DE <i>B. V. MARITIMA</i> ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES GROUPES GENETIQUES.	84
FIGURE 38 : ARBRE DE NJ SUR POPULATIONS DE <i>B. MACROCARPA</i> ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES GROUPES GENETIQUES.	85
FIGURE 39 : ARBRE DE NJ SUR POPULATIONS DE <i>B. V. MARITIMA</i> ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES GROUPES GENETIQUES.	88
FIGURE 40 : ARBRE DE NJ SUR POPULATIONS DE <i>B. MACROCARPA</i> ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES GROUPES GENETIQUES.	89
FIGURE 41 : ARBRE DE NJ DE POPULATIONS CONSTRUIT SUR LES DONNEES MICROSATELLITES INCLUANT LES 2 TAXONS	90
FIGURE 42 : PART RELATIVE D'ASSIGNATION DES INDIVIDUS POUR <i>K=2</i> (D'APRES LE LOGICIEL STRUCTURE)	91
FIGURE 43 : ARBRE DE NJ DE POPULATIONS CONSTRUIT SUR LES DONNEES MINISATELLITES INCLUANT LES 2 TAXONS	92
FIGURE 44 : GENOTYPES CLASSES PAR PROPORTION D'ASSIGNATION (Q) CROISSANTE A <i>B. V. MARITIMA</i>	93
FIGURE 45 : DISTRIBUTION ET ASSIGNATION DES INDIVIDUS DE L'ETUDE	94
FIGURE 46 : LOCALISATION ET PAYSAGES DES ILES CANARIES	98
FIGURE 47 : CARACTERISTIQUES GEODYNAMIQUES DU SECTEUR ETUDIE (CARRACEDO <i>ET AL.</i> , 2002)	99
FIGURE 48 : RELATIONS ENTRE LES 3 ESPECES D'ETUDE	100
FIGURE 49 : LOCALISATION DES SITES D'ECHANTILLONNAGE	101
FIGURE 50 : CONDITIONS EXPERIMENTALES DE CULTURE	103
FIGURE 51 : DISTRIBUTION ET PLOÏDIE DES POPULATIONS ECHANTILLONEES	104
FIGURE 52 : DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES GENOTYPES	106
FIGURE 53 : DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES GENOTYPES	107
FIGURE 54 : DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES GENOTYPES	107
FIGURE 55 : ASSIGNATION DE CHAQUE INDIVIDU AUX DEUX GROUPES GENETIQUES DEFINIS PAR LE LOGICIEL STRUCTURE	108
FIGURE 56 : GENOTYPES CLASSES PAR PROPORTION D'ASSIGNATION (Q) CROISSANTE AU GROUPE GENETIQUE JAUNE	108
FIGURE 57 : DISTRIBUTION ET ASSIGNATION DES <i>B. MACROCARPA</i> 4X	109
FIGURE 58 : TYPES DE PORT DES <i>B. MACROCARPA</i> 2X (A) ET 4X (B) EN CHAMBRE DE CULTURE	110
FIGURE 59 : FORME DES GLOMERULES CHEZ <i>B. MACROCARPA</i> 2X ET 4X	110
FIGURE 60 : TYPES DE PORT OBSERVES EN CONDITIONS NATURELLES	111
FIGURE 61 : TEMPETE DE POUSSIERES OBSERVEE PAR LE SATELLITE SEA WIFS FIN FEVRIER 2000 (NASA, 2007)	114
FIGURE 62 : DIAGRAMME SCHEMATIQUE ILLUSTRANT LES PRINCIPAUX MOUVEMENTS DES EAUX DE SURFACE EN MACARONESIE DURANT LA MAJEURE PARTIE DE L'ANNEE (PELEGRI <i>ET AL.</i> , 2005)	115

FIGURE 63 : COURANTS MARINS SUPERFICIELS DANS LA ZONE D'ETUDES (MOLINA <i>ET AL.</i> , 1996)	116
FIGURE 64: CORRELATION ENTRE LA GEOLOGIE (EN HAUT) ET LA LOCALISATION DES POPULATIONS (AU MILIEU).	117
FIGURE 65: ÉCHANTILLONNAGE DE <i>BETA</i> REALISE	118
FIGURE 66 : EXEMPLES DE "TYPES" D'HABITAT A <i>B. V. MARITIMA</i>	119
FIGURE 67 : APERÇU DES TROIS SITES A <i>B. MACROCARPA</i>	120
FIGURE 68 : EXEMPLES DE PORTS ET DE STADES PHENOLOGIQUES CHEZ <i>B. V. MARITIMA</i> AU MAROC EN AVRIL	120
FIGURE 69 : APERÇU DES <i>B. MACROCARPA</i> RENCONTREES DANS 3 SITES MAROCAINS	121
FIGURE 70 : LOCALISATION DE L'ARCHIPEL DE MADERE	121
FIGURE 71 : LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DES SITES D'ECHANTILLONNAGE DE <i>BETA SP.</i> SUR L'ARCHIPEL DE MADERE EN 2007	122
FIGURE 72 : EXEMPLES DE TYPES D'HABITATS DE <i>BETA</i> SUR L'ARCHIPEL DE MADERE	123
FIGURE 73 : EXEMPLES DE PORTS ET DE STADES PHENOLOGIQUES CHEZ <i>B. V. MARITIMA</i> A MADERE EN MAI	123
FIGURE 74 : EXEMPLES D'INDIVIDUS DIAGNOSTIQUES " <i>B. MACROCARPA</i> " A MADERE	124
FIGURE 75 : DIFFERENCES EN TERMES DE DATE DE GERMINATION (NOMBRE DE JOURS APRES PLANTATION) ENTRE <i>B. MACROCARPA</i> 2X ET 4X EN CHAMBRE DE CULTURE	131
FIGURE 76 : DIFFERENCES EN TERMES DE DATE DE FLORAISON (NB DE JOUR APRES GERMINATION) ENTRE <i>B. MACROCARPA</i> 2X ET 4X EN CHAMBRE DE CULTURE	132
FIGURE 77 : DIFFERENCES EN TERMES DE DATE DE FIN DE FLORAISON (NOMBRE DE JOURS APRES GERMINATION, QUAND IL N'Y A PLUS DE POLLEN VISIBLE) ENTRE <i>B. MACROCARPA</i> 2X ET 4X EN CHAMBRE DE CULTURE	132

# INTRODUCTION GENERALE

---

La compréhension de l'évolution du monde vivant nécessite une meilleure connaissance des processus selon lesquels les organismes se diversifient dans l'espace et dans le temps. Le sujet de la thèse ici présentée s'inscrit dans cette dynamique de recherche et tente d'apporter de nouveaux éléments de réponse à ces domaines de la biologie évolutive. Plus précisément, ce travail vise à éclaircir les relations phylogénétiques, les refuges glaciaires et les routes de colonisation post-glaciaire mais aussi les phénomènes d'hybridation et de spéciation qui ont opéré et/ou qui opèrent au sein de la section *Beta* (Genre *Beta* – Amaranthaceae).

Ce mémoire est organisé en six parties : une partie introductive, quatre chapitres de résultats et une dernière partie de perspectives.

La première partie présente le contexte théorique et conceptuel de l'étude. Elle propose une synthèse d'un certain nombre de concepts et définitions de termes utilisés en phylogénie, en phylogéographie et en biologie évolutive puis décrit le modèle biologique d'étude qu'est la section *Beta*.

Les résultats obtenus ont été assemblés en quatre chapitres distincts susceptibles de faire prochainement l'objet de publications.

Le premier chapitre de résultats présente la phylogénie des espèces de la section *Beta* et leurs diversités génétiques respectives basées sur des séquences d'ADN chloroplastique et nucléaire.

Le chapitre suivant détaille l'étude phylogéographique menée sur l'espèce côtière modèle *Beta vulgaris maritima* et en fait la comparaison avec les schémas phylogéographiques observés sur d'autres modèles afin d'identifier les processus et les contraintes impliqués dans l'évolution des taxons.

Le troisième chapitre de résultats tente de mettre en lumière les effets de la sympatrie et du système de reproduction sur la diversité et la structure génétique de deux taxons apparentés de la péninsule ibérique, *Beta vulgaris maritima* et *Beta macrocarpa*. Une analyse des potentialités d'hybridation naturelle entre ces deux taxons vient compléter cette description du polymorphisme génétique.

Une espèce allotétraploïde de la section, très peu décrite mais considérée jusqu'alors comme endémique de l'archipel des Canaries et issue d'une hybridation naturelle entre les espèces diploïdes *Beta vulgaris maritima* et *Beta macrocarpa*, a fait l'objet du chapitre IV. L'étude de cet allotétraploïde a été menée afin d'estimer la diversité génétique de l'espèce sur son aire de distribution et de retracer ses origines génétiques et géographiques.

De ces deux derniers chapitres sont nées de nouvelles questions auxquelles de récentes missions de prospections et d'échantillonnage, au Maroc et sur l'archipel de Madère, tenteront de répondre. La dernière partie de ce mémoire est donc consacrée aux résultats préliminaires de retour de prospection auxquels est adjointe une présentation sommaire des futures pistes de réflexion envisageables.

# CADRE THEORIQUE DE L'ETUDE

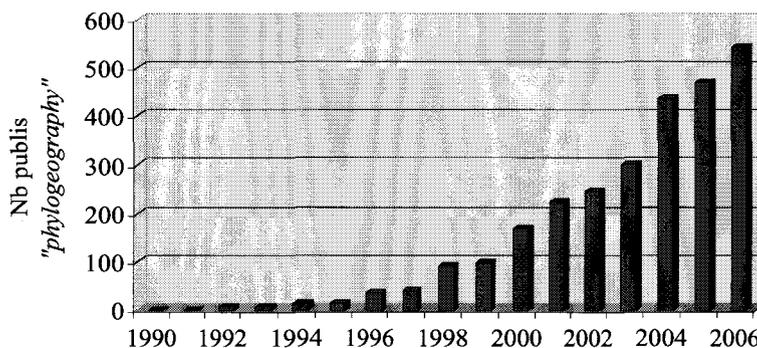
## A. PHYLOGEOGRAPHIE

### A.I. *OBJECTIFS ET PRINCIPES*

Dès le XVIII<sup>ème</sup> siècle, des naturalistes tels que Buffon (1761) et Linnaeus (1781) ont constaté que la biodiversité à l'échelle planétaire est irrégulièrement répartie et qu'il existe des paramètres communs aux distributions actuelles des espèces animales et végétales (Wallace, 1876). De Candolle (1820), dans le dictionnaire des Sciences Naturelles, fut le premier botaniste à proposer que la distribution géographique des organismes était soumise à des paramètres à la fois écologiques et historiques.

La phylogéographie est l'étude de ces principes et processus qui gouvernent la répartition des lignées généalogiques, notamment au sein et entre espèces apparentées. Elle permet de retracer l'histoire évolutive d'un taxon dans un espace géographique donné et fournit un cadre historique à la structuration spatiale des populations et à leur diversité génétique en identifiant les contraintes écologiques et historiques importantes (fragmentation, barrières géographiques, paléoclimat...). La comparaison de schémas phylogéographiques obtenus pour différents taxons (phylogéographie comparée) permet d'estimer s'ils dérivent vraisemblablement d'une histoire évolutive commune ou s'ils résultent de processus évolutifs indépendants (Sullivan *et al.*, 2000).

La phylogéographie est une jeune discipline qui a tout juste 20 ans puisque c'est en 1987 que le mot est utilisé pour la première fois par John Avise et ses collègues (Avise *et al.*, 1987). Pendant les dix premières années, cette discipline a eu un impact majeur dans les études consacrées aux animaux et au contraire très faible dans les domaines du végétal probablement à cause d'un manque de marqueurs suffisamment variables (Schaal *et al.*, 1998). Depuis lors, des outils moléculaires mieux adaptés ont permis l'établissement d'un nombre croissant de phylogéographies végétales (figure 1).



**Figure 1: Evolution du nombre de publications traitant de phylogéographie depuis 1990**

Source : ISI Web of Knowledge/Web of Science. Recherche effectuée le 02/07/07 sur le mot: « phylogeography »

La phylogéographie permet de proposer des scénarios historiques afin d'expliquer les arrangements spatiaux des organismes et leurs caractéristiques. Les processus générateurs de diversité dans une zone donnée sont nombreux mais les phénomènes de vicariance et de dispersion sont souvent deux processus évoqués pour expliquer les origines de taxons spatialement disjoints (Ronquist, 1997) et peuvent être classés en deux catégories : les facteurs historiques (vicariance, dispersion par delà une barrière, expansion de l'aire de distribution entraînant la formation de zones de contact...) et les facteurs écologiques (pressions de sélection). Ces processus peuvent amener à la formation de nouvelles espèces si des mécanismes d'isolement reproducteur se mettent en place.

On appelle « vicariance » la naissance de deux (ou plus) espèces à la suite de la fragmentation de l'aire de répartition de leur espèce-mère. Pour certains auteurs, c'est le clivage inégal des populations, entraînant une accumulation de caractères dérivés dans les « isolats périphériques », qui serait le principal facteur de spéciation (Croizat *et al.*, 1974; Bush, 1975) . Dans ce cas, la phylogénie des taxons peut refléter les événements de séparation des habitats, contrairement au cas de dispersion où les zones géographiques et les taxons peuvent montrer des relations historiques plus contrastées (figure 2). Cette dispersion (« dispersal » ou « jump dispersal » en anglais) désigne le franchissement d'une barrière géographique ou écologique préexistante à la disjonction.

Ce terme de la « dispersion » doit être distingué de la notion de dispersion des jeunes ou des gamètes par rapport à leurs parents (« dispersion » ou « range expansion » en anglais). Du fait de la rupture de flux génique associée à un effet de fondation (lié au faible effectif de fondateurs) et à une dérive génétique (liée à la faible diversité génétique au sein de la nouvelle population), la dispersion peut conduire à la spéciation.

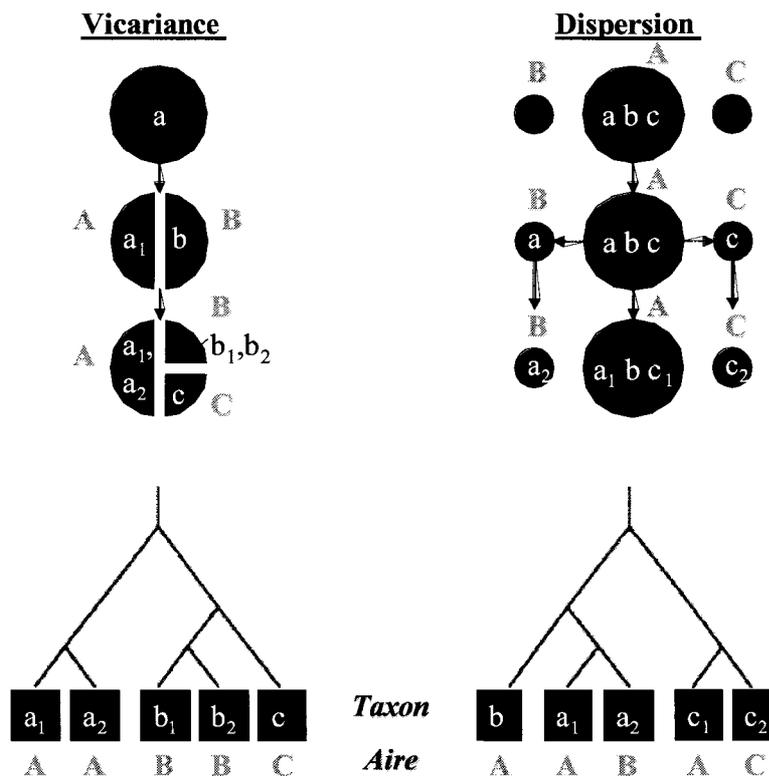


Figure 2: Relations phylogénétiques entre espèces ou populations spatialement disjointes sous l'effet de la vicariance et de la dispersion (redessiné de Avise, 2000)

Les lettres en minuscules blanches représentent les taxons, les majuscules grises, les aires géographiques.

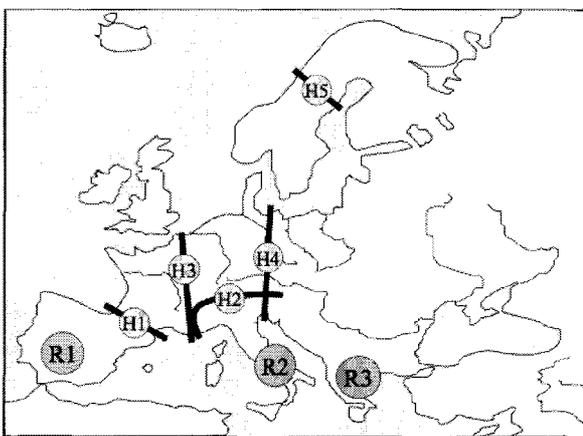
Les études phylogéographiques chez les animaux s'appuient surtout sur l'ADN mitochondrial alors que chez les plantes, c'est l'ADN chloroplastique qui est largement utilisé. Toutefois, pour ces deux types d'études, d'autres séquences d'ADN et d'autres types de marqueurs sont disponibles et de mieux en mieux adaptés.

Chaque séquence d'ADN possède sa propre généalogie et l'histoire évolutive des organismes est la somme de nombreuses généalogies de gènes différentes. L'utilisation conjointe de marqueurs cytoplasmiques et nucléaires a montré la potentialité qu'a l'analyse d'un seul marqueur à engendrer des conclusions erronées, notamment en cas d'hybridation antérieure. Ainsi, dans l'idéal, la reconstruction de l'histoire phylogéographique d'une espèce devrait inclure un maximum de types de séquences tel que nucléaires, cytoplasmiques, autosomales, liées au sexe, conservées et au contraire neutres etc...(Posada & Crandall, 2001; Hewitt, 2004).

D'autre part, un échantillonnage le plus proche de l'aire de distribution exhaustive de l'espèce réduit les risques d'erreur d'interprétation. Le nombre optimal d'individus à prendre en compte dépend à la fois des marqueurs génétiques employés et de leur polymorphisme mais aussi des traits d'histoire de vie de l'espèce (population clonale *versus* très variable par exemple).

## A.II. PRINCIPAUX MODELES

La distribution des espèces est très variable dans le temps et dans l'espace. En effet, les fortes oscillations climatiques du pléistocène (Williams *et al.*, 1998) ont, à plusieurs reprises, forcé beaucoup d'espèces à des changements majeurs dans leurs répartitions latitudinales et/ou altitudinales (Hewitt, 1996; Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1999; 2000; 2001; 2004).



La plupart des espèces européennes d'origine méditerranéenne ont trouvé un refuge glaciaire dans au moins une des trois péninsules européennes de la méditerranée (ibérique, italienne et balkanique) (figure 3) et la plupart des espèces cosmopolites ont profité de refuges glaciaires dans chacune des trois (Hewitt, 1996; Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2000). Dans la plupart des cas, les populations des trois péninsules n'ont pas connu d'échanges génétiques ou très peu pendant les glaciations et ont évolué indépendamment, menant souvent à la différenciation de trois principaux groupes génétiques.

Figure 3 : Localisation des 3 principaux refuges méditerranéens (R1, R2 et R3) et des 5 plus importantes zones de contact et d'hybridation des expansions post-glaciaires (H1 à H5) (Schmitt, 2007)

Il est, en général, admis que les refuges glaciaires sont plus riches en allèles que les aires colonisées entre ou après les glaciations (Hewitt, 1996; Widmer & Lexer, 2001). De ce fait, des clines géographiques de diminution de variation génétique sont interprétés comme des routes de migration, selon le modèle de dispersion d'Ibrahim *et al.* (1996) où de nouvelles populations sont fondées à partir de quelques génotypes de la population source.

Toutefois, ce modèle néglige la possibilité que les populations des refuges puissent se trouver maintenant en limite écologique d'aire de répartition et souffrir d'une réduction de variation génétique post-glaciaire (Coyer *et al.*, 2003) ou que des zones, carrefour de multiples voies de colonisation puissent montrer de très haut niveaux de diversité génétique (Olsen *et al.*, 2004).

D'autre part, la région méditerranéenne montre aussi, en général, des valeurs importantes de diversité génétique et une variété de patrons de distribution selon les espèces, incluant de fréquentes disjonctions dans ces distributions (Blondel & Aronson, 1999; Médail & Quézel, 1999; Thompson, 2005).

L'interprétation historique de tels patrons est souvent difficile car elle doit prendre en compte les effets, parfois combinés, de nombreux processus qui ont opéré à différentes échelles spatiales et temporelles.

D'un point de vue spatial, la région méditerranéenne est réputée pour sa grande diversité d'habitats (Blondel & Aronson, 1999) mais aussi pour l'impact négatif qu'a l'Homme sur certaines communautés de plantes depuis quelques centaines d'années (Martinez & Montero, 2004).

**Tableau 1 : Échelle stratigraphique de l'Ère Cénozoïque**

Les symboles rouges identifient les périodes évoquées ci-contre.

Âge (MA)	Période ou système		Époque ou série	Étage
2	QUATERNAIRE		Holocène	
			Pléistocène *	
			Pliocène *	
25	* TERTIAIRE	NEOGENE	Miocène	<i>Plaisancien</i>
				<i>Messinien</i>
				<i>Tortonien</i>
				<i>Hélvétien</i>
				<i>Burdigalien</i>
				<i>Aquitainien</i>
				<i>Chattien</i>
65	TERTIAIRE	PALEOGENE	Oligocène	<i>Stampien</i>
				<i>Bartonien</i>
			Éocène	<i>Lutétien</i>
				<i>Yprésien</i>
				<i>Thanétien</i>
			Pléocène	<i>Dano-Montien</i>

À une échelle temporelle, des processus à la fois géologiques et paléoclimatiques sont souvent évoqués tels que l'isolement de microplaques lors des mouvements tectoniques du Tertiaire, la crise saline du Messinien à la limite Miocène-Pliocène (il y a 5,96-5,33 millions d'années) (Hsü *et al.*, 1977; Krijgsman *et al.*, 1999), l'installation d'un climat de type méditerranéen à la limite Plio-Pléistocène (il y a 3,2-2,8 MA) (Suc, 1984) et les changements de niveaux de la mer associés aux glaciations du Pléistocène (Hewitt, 2000) (tableau 1).

La phylogéographie de plantes côtières n'a été que peu étudiée (Kadereit *et al.*, 2005) alors qu'elle offre de multiples avantages quand il s'agit de proposer des hypothèses quant à l'histoire de la distribution de l'espèce et de reconnaître les effets dus à la biologie intrinsèque de l'espèce sur les patrons géographiques de variation génétique. En effet, les espèces côtières ont souvent une distribution azonale avec à la fois de larges distributions latitudinales et longitudinales, et cette distribution est linéaire contrairement à celles des espèces continentales en général (Kadereit *et al.*, 2005). Cela réduit donc considérablement le nombre potentiel de routes migratoires.

Des études phylogéographiques de ce type de système linéaire ont montré, pour certaines, l'importance prépondérante des oscillations climatiques du Pléistocène sur la structure génétique des espèces (Clausing *et al.*, 2000; Kadereit *et al.*, 2005; Pineiro *et al.*, 2007), pour d'autres, l'histoire géologique des habitats est considérée comme primordiale (par ex. Tremetsberger *et al.*, 2004).

La comparaison d'études phylogéographiques est donc indispensable dans la caractérisation des effets relatifs des processus historiques *versus* biologiques à l'origine de la répartition actuelle des espèces.

## B. PHYLOGENIES D'ESPECES ET MACROEVOLUTION

### ***B.I. IMPACT DES DONNEES MOLECULAIRES SUR LES ETUDES PHYLOGENETIQUES***

Depuis Darwin et sa théorie de l'évolution sous sélection naturelle (1859), il est généralement admis que les êtres vivants « descendent » tous les uns des autres.

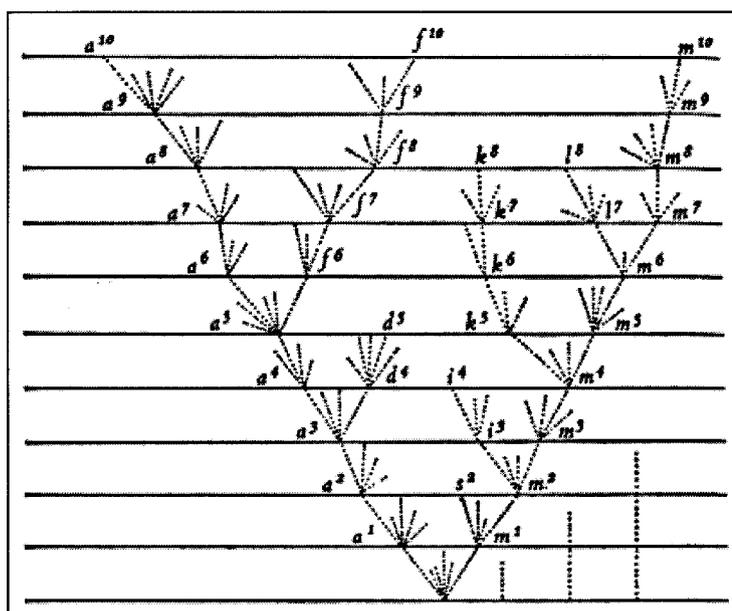


Figure 4: Portion de l'unique illustration de « l'Origine des Espèces » (Darwin, 1859)

Darwin illustre ici (figure 4) à la fois la divergence des variants à l'intérieur d'une espèce en montrant successivement l'accumulation des différences dans une lignée (de a<sup>1</sup> à a<sup>10</sup> par exemple), et la séparation en plusieurs lignées (m, s, i etc...) dont certaines vont devenir des nouvelles espèces. Dans ce modèle, il n'y a que l'héritage vertical qui est pris en considération, aucun échange de matériel génétique n'a lieu entre les taxons opposés sur l'arbre phylogénétique.

Ce terme de phylogénie, ou phylogenèse, (du grec phulon "race, tribu"), a été introduit par Haeckel en 1860, qui l'a défini comme "*l'histoire du développement paléontologique des organismes par analogie avec l'ontogénie ou histoire du développement individuel*".

Quelques années plus tard, il présenta le premier arbre universel du vivant représentant les grands groupes du vivant connus à l'époque (1866) (figure 5).

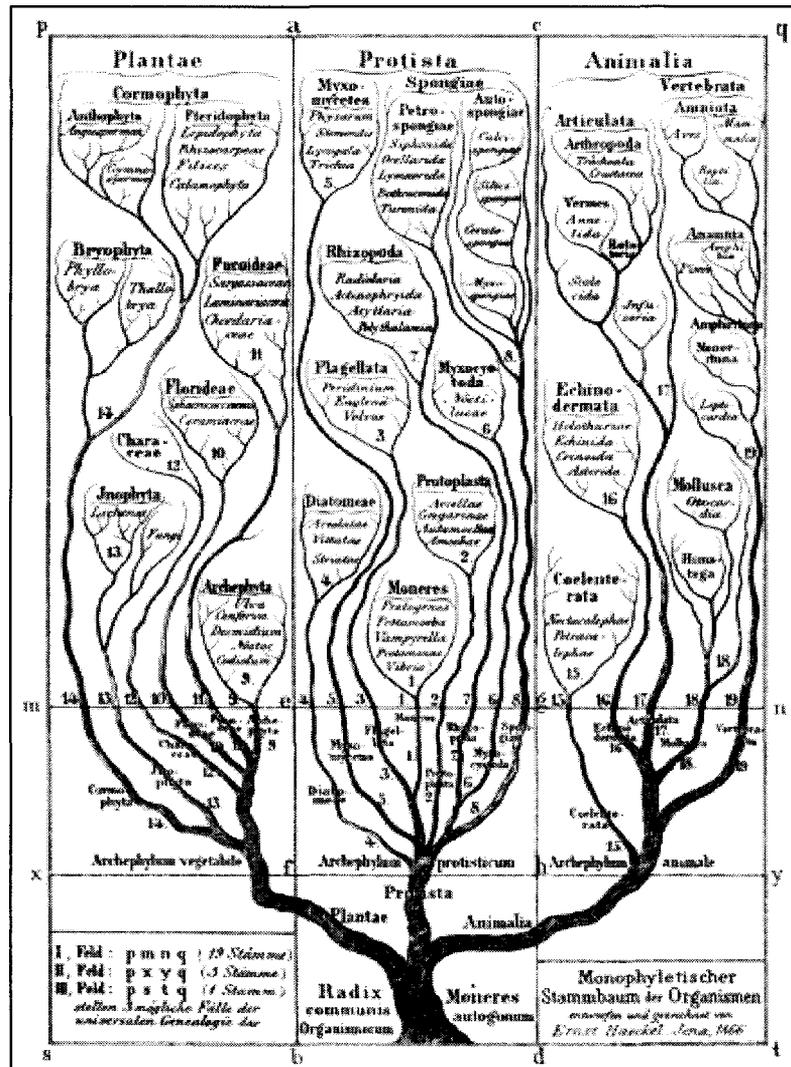


Figure 5: Arbre du vivant selon Ernst Haeckel (1866)

Après un siècle et demi de recherche, ce qui a changé dans la classification du vivant avant tout est la nature du caractère commun. Avant l'arrivée des données moléculaires, les comparaisons entre des morphologies (plans d'organisation, squelettes, dentitions, anatomie des organes...), des comportements et des répartitions géographiques des espèces étaient les seuls moyens disponibles pour construire des classifications d'espèces alors que les données moléculaires, par définition, permettent d'accéder à l'information génétique.

Désormais, ces caractères biochimiques permettent d'établir une phylogénie plus robuste des organismes et notamment des organismes procaryotes car les phylogénies faites à partir de caractères anatomiques et physiologiques n'ont pas été couronnées de succès. Le début des phylogénies moléculaires basées sur l'analyse comparée de séquences remonte aux années 60, aux travaux de Zuckerkandl et Pauling (1965) et Fitch et Margoliash (1967) sur les séquences protéiques de cytochrome C et de globines. Mais la véritable révolution moléculaire en phylogénie commence dans les années 1990, suite à l'invention de la PCR et au développement des techniques de séquençage. Depuis, les données moléculaires ont profondément modifié notre vision de l'arbre du vivant. L'étude des liens de parenté et la construction de l'arbre qui en découle se fait indirectement *via* l'étude de caractères.

Or l'information contenue dans un génome est énorme. Chaque base nucléotidique constituant un caractère qui peut être présent sous quatre états différents (correspondant aux quatre bases A, C, G, T), l'étude d'un seul gène offre l'accès à un très grand nombre de caractères.

À ceci s'ajoute le fait que les niveaux de variation à l'intérieur de la plupart des espèces sont eux aussi considérables (contrairement aux caractères anatomiques notamment). En résumé donc, les principaux avantages des données moléculaires (séquences d'ADN ou de protéines) par rapport aux données morphologiques sont l'universalité, la rapidité et l'objectivité.

Les études phylogénétiques modernes sont en grande majorité réalisées grâce à des données moléculaires et le séquençage complet ou partiel d'une proportion croissante d'espèces modèles est désormais disponible.

## ***B.II. ARBRES PHYLOGENETIQUES***

Il existe plusieurs types d'arbres (dendrogrammes) selon les méthodes avec lesquelles ils ont été construits.

- le phénogramme : obtenu par des méthodes de distance où les relations entre taxa expriment des degrés de similitude globale;
- le cladogramme : exprimant les relations phylogénétiques entre taxa et construit à partir de l'analyse cladistique;
- le phylogramme : possédant des branches de longueur proportionnelle au nombre de changements évolutifs

On distingue deux grands groupes de méthodes d'analyse phylogénétique:

- les méthodes basées sur les mesures de distances entre séquences prises deux à deux (la phénétique) ;
- les méthodes de caractères qui s'intéressent au nombre de mutations (substitutions/insertions/délétions) qui affectent chaque site de la séquence (la cladistique)

### a) LES METHODES FONDEES SUR LES DISTANCES (PHENETIQUES)

Les méthodes phénétiques se proposent de reconstruire des arbres en partant des ressemblances observées entre chaque paire d'unités évolutives. L'avantage de ces méthodes est leur rapidité et la qualité de leurs résultats pour des séquences proches.

Les méthodes les plus utilisées sont :

- l'UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean), utilisée pour reconstruire des dendrogrammes si les séquences ne sont pas trop divergentes. L'inconvénient majeur de cette méthode est sa sensibilité à des taux de mutations différents sur les différentes branches ;

- le NJ (Neighbor-Joining), développée par Saitou et Nei (1987) afin de corriger cet inconvénient de l'UPGMA.

Des méthodes dérivées ont aussi été mises au point afin d'inclure quelques corrections à ces constructions. Citons les corrections de Jukes et Cantor (1969) et celle de Kimura ou 2 paramètres (1980).

## b) LES METHODES FONDEES SUR LES CARACTERES (CLADISTIQUES)

Les principes de la cladistique ont été élaborés par l'entomologiste allemand Willi Hennig (1913-1976). La cladistique est la méthode de classification dans laquelle les espèces appartenant à un même taxon partagent un ancêtre commun plus récent que celui qu'elles en ont en commun avec d'autres espèces. Les méthodes de reconstruction cladistique sont très lentes mais précises.

- la parcimonie est un principe fondé sur le caractère improbable des changements évolutifs. Cette méthode a quelques inconvénients comme sa lenteur d'exécution ou le fait qu'elle n'amène aucune information sur la longueur des branches

- le maximum de vraisemblance évalue, en termes de probabilités, l'ordre des branchements et la longueur des branches d'un arbre sous un modèle évolutif donné. Cette méthode est considérée comme la plus fiable de toutes les méthodes phylogénétiques mais c'est aussi celle qui demande la plus grande puissance de calcul et prend le plus de temps.

La fiabilité des branches internes et donc celle de l'arbre tout entier est le plus souvent testée par la méthode de bootstrap (Felsenstein, 1985) qui consiste à fournir des indications statistiques sur la précision des estimations. Le bootstrap est applicable en principe à n'importe quelle méthode phylogénétique (parcimonie, distances,...). Il consiste à répéter la reconstruction phylogénétique plusieurs centaines de fois sur des séquences artificielles obtenues par ré-échantillonnage des sites des séquences réelles. Le bootstrap attribue à chaque branche interne de l'arbre un score égal au pourcentage des arbres déduits des séquences artificielles dans lesquels cette même branche interne a été retrouvée.

## C. ORIGINES DE NOUVELLES LIGNEES EVOLUTIVES

### C.I. *PROCESSUS DE SPECIATION*

#### a) LE CONCEPT D'ESPECE

Le terme « espèce » prend différentes définitions selon les différentes disciplines d'étude de la vie. Il n'existe actuellement pas de consensus absolu sur la définition d'une espèce, si bien que plusieurs concepts coexistent. La nomenclature, la description et la classification des espèces pour les taxonomistes est ainsi essentiellement basée sur des détails morphologiques observés sur des plantes d'herbiers et dans une moindre mesure sur du matériel vivant collecté dans la nature.

La définition la plus communément citée en biologie évolutive est due à Ernst Mayr (1942) bien que divers nouveaux concepts aient été proposés depuis (Otte & Endler, 1989). Cette définition est celle du concept d'espèce biologique (ou espèce isolée), les espèces sont des « groupes de populations naturelles, effectivement ou potentiellement interfécondes, qui sont génétiquement isolées d'autres groupes similaires ». Bien que cette définition ait l'avantage de fournir un critère simple pour caractériser l'appartenance de deux individus à des espèces différentes, elle a des limites et ne s'applique pas à l'ensemble des formes vivantes. En effet des difficultés persistent dans le cas d'espèces naissantes, c'est-à-dire dont la spéciation n'est pas terminée, ou d'espèces à reproduction clonale, mais aussi dans les cas où le critère d'interfécondité ne peut pas toujours être vérifié (fossiles, espèces rares...).

En 1950, Stebbins, insiste sur la notion d'isolement reproducteur qui sépare les espèces et, en s'inspirant des travaux de Dobzansky (1941), Mayr (1942) et Huxley (1938), il propose la définition suivante : " Les espèces consistent en des systèmes de populations séparées les unes des autres par des discontinuités complètes ou très grandes dans leur variation. Ces discontinuités doivent avoir une base génétique et refléter l'existence de mécanismes isolateurs qui empêche totalement ou presque le transfert de gènes d'un système de population à un autre ". Cette définition présente toutefois dans la pratique de nombreuses difficultés, en particulier celles liées à la mise en évidence des mécanismes isolateurs. Selon Gilmour (1940), qui refuse, comme plusieurs autres scientifiques, ce critère d'isolement, « l'espèce est un groupe d'individus se ressemblant les uns aux autres - par l'ensemble de leurs attributs phénogénotypiques - à un degré habituellement accepté comme spécifique, mais ce degré est déterminé en dernier ressort par le jugement plus ou moins arbitraire des taxinomistes ».

Même si l'isolement géographique des populations joue un rôle primordial dans le processus de spéciation, dans certains cas, la différenciation des populations qui en résulte ne va pas jusqu'au stade de l'isolement reproducteur. C'est le cas par exemple pour deux espèces de platanes, *Platanus occidentalis* L. et *Platanus orientalis* D.C.. Leurs distributions géographiques sont totalement disjointes puisque le premier occupe l'Est des États-Unis et le second l'Est de la région méditerranéenne. Bien que très différents morphologiquement, ils produisent par croisement artificiel un hybride fertile : *Platanus acerifolia* Willd.

*A contrario*, des taxons à formes très peu différenciées morphologiquement comme chez *Festuca glauca* Lamk présentent des populations inter-stériles (Bidault, 1968).

Les concepts d'espèces sont donc liés à des critères plus ou moins performants qui permettent le classement d'individus soit dans la même espèce, soit dans des espèces séparées mais les processus à l'origine de cet « état » à un instant  $t$  sont peu compris. Cette difficulté provient

en partie du fait que le processus de spéciation n'est pas instantané et requiert en général un certain nombre de générations avant que ses conséquences ne soient visibles, échappant ainsi à une possibilité directe d'observation du phénomène. Quoiqu'il en soit, parmi les exemples de spéciation récente qui ont été observés, on peut citer *Oenothera sp.* (Vries, 1905), *Mimulus sp.* (Macnair & Christie, 1983) ou le moustique *Culex sp.* (Nutall, 1998; Byrne & Nichols, 1999).

## b) LES MODELES DE SPECIATION

Les nouvelles espèces naissent à la suite de la transformation d'une population entière ou, plus fréquemment, à partir de petites populations isolées émergeant d'une espèce ancestrale. Même si la notion d'espèce est encore difficile à définir, sur la question de la spéciation, l'interfécondité reste le paramètre essentiel, puisque c'est au moment où deux « entités sœurs » vont cesser de se reproduire entre elles qu'elles donneront chacune une espèce à part entière.

« La spéciation, c'est la formation, à partir de l'ensemble fermé qu'est l'espèce, de deux ensembles n'ayant plus aucun échange génétique, c'est-à-dire deux espèces » (Solignac *et al.*, 1995).

Quel que soit le modèle de spéciation qui agit, trois phases interviennent généralement dans le processus, bien qu'on ne les observe pas toujours :

- ✓ Réduction ou arrêt des échanges génétiques ;
- ✓ Accumulation de différences génétiques, comportementales et morphologiques entre ce qui va devenir des espèces différentes ;
- ✓ Evolution des mécanismes d'isolement reproductif.

L'ordre ainsi que la vitesse de ces phases sont sujets à variation.

On distingue plusieurs types de spéciation, basés sur la répartition géographique des populations en divergence au cours du processus (figure 6):

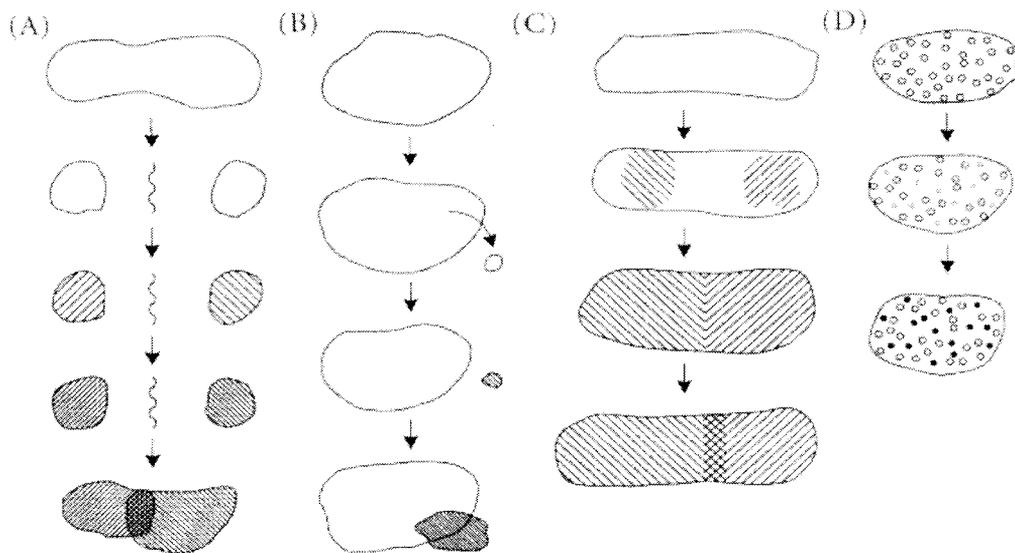
**La spéciation allopatrique** : une population scissionniste connaît une évolution différente de celle de sa population mère après en avoir été géographiquement isolée.

- ✓ Si la spéciation est due à une barrière géographique (rivières, montagnes, habitat fragmenté...), il s'agit d'une spéciation vicariante.
- ✓ Si une population périphérique se sépare de la population mère, on parle de spéciation péripatrique ou spéciation par effet fondateur (ex : colonisation d'une île)
- ✓ Si les populations en divergence possèdent un léger recouvrement géographique et des échanges génétiques limités (dans des zones dites « de tension » (ex : gradient climatique), il s'agit de spéciation parapatrique.

Ce dernier mode de spéciation se rapproche de la spéciation sympatrique.

**La spéciation sympatrique** : un segment de la population subit un changement génétique qui entraîne l'isolement reproductif bien que n'étant pas isolé géographiquement de la population mère. Ici la sélection naturelle joue un rôle crucial dans la divergence des populations. La spéciation sympatrique peut principalement avoir lieu par mutation génétique, polyploïdisation, différenciation éthologique ou différenciation écologique.

Ce modèle de spéciation se manifeste fréquemment dans le règne végétal où le changement génétique consiste le plus souvent en une multiplication du nombre de chromosomes. Il est plus rare chez les animaux.



**Figure 6: Principaux modèles de spéciation (d'après Futuyma (1997))**

(A) : *Allopatrique* : isolement reproductif dû à une barrière physique entre populations, (B) : *Péripatrique* : isolement reproductif développé dans une petite population séparé de la majeure partie de l'espèce, (C) : *Parapatric* : isolement reproductif développé progressivement dans une population à faible dispersion, (D) : *Sympatrique* : isolement reproductif installé dans une espèce existante à cause de propriétés biologiques particulières (ex : spécificité hôte-parasite)

Le temps de spéciation est extrêmement variable d'une espèce à l'autre et dépend également du mode de spéciation mais généralement, les spéciations sont un phénomène relativement rapide sur le plan évolutif.

On appelle « radiation adaptative » l'émergence de nombreuses espèces, en relativement peu de temps, à partir d'un ancêtre commun en liaison avec la colonisation d'habitats nouveaux ou d'habitats présentant des peuplements peu concurrentiels.

### c) LES MECANISMES D'ISOLEMENT REPRODUCTEUR

La sélection naturelle divergente qui agit sur les populations dans différents environnements engendre le développement de facteurs d'isolement reproducteur pré- et post-zygotiques (Mayr, 1942; Dobzhansky, 1951; Mayr, 1963). Les facteurs d'isolement reproducteur (tableau 2) peuvent se rencontrer de manière discrète ou se combiner.

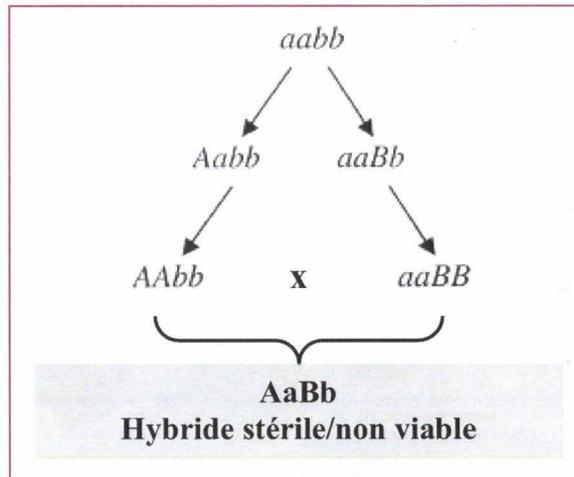
Un isolement prézygotique empêche l'accouplement, par isolement éthologique (parades nuptiales, chants...), anatomiques (incompatibilité des organes reproducteurs), phénologique (décalage dans le temps des périodes d'accouplement chez les animaux et floraison chez les végétaux) ou géographiques (milieux fragmentés). Si les deux partenaires se rencontrent, il peut aussi y avoir isolement reproducteur quand, malgré un transfert de gamètes, le zygote ne se développe ou ne survit pas.

Parmi les processus post zygotiques, il s'agit principalement des cas où, quand les hybrides surviennent, ceux-ci sont peu viables (mort prématurée, y compris au cours de l'embryogenèse), ceux-ci sont stériles ou bien s'ils sont fertiles, ce sont leurs descendants qui sont peu viables ou stériles.

**Tableau 2: Principaux mécanismes d'isolement reproducteur (d'après Mayr (1974))**

<u>Isolement prézygotique</u>	<u>Causes</u>
Les partenaires potentiels ne se rencontrent pas	Isolement écologique
Les partenaires potentiels se rencontrent mais ne se reproduisent pas	Isolement éthologique
La copulation se produit mais il n'y a pas de transfert de gamètes	Isolement mécanique
Le transfert de gamètes a lieu mais il n'y a pas fécondation	Mortalité gamétique
<u>Isolement postzygotique</u>	<u>Causes</u>
Les zygotes hybrides ont une viabilité nulle ou réduite	Incompatibilité cytoplasmique ou caryologique
Les hybrides se développent mais sont stériles	Stérilité hybride génétique ou chromosomique
La descendance des hybrides ou de leur backcross est faible ou stérile	Dépression hybride

La théorie selon laquelle des incompatibilités hybrides sont provoquées par des interactions épistatiques négatives entre des gènes qui ont fonctionnellement divergé dans les espèces respectives d'hybridation a été proposée pour la première fois en 1937 par Theodosius Dobzhansky et indépendamment quelques années plus tard par Hermann Joseph Muller (Dobzhansky, 1937; Mueller, 1940). Elle se trouve énoncée maintenant sous l'appellation de « modèle de Dobzhansky-Muller » (Figure 7).



**Figure 7: Modèle de Dobzhansky-Muller à deux locus**

Après une divergence entre deux populations, de nouvelles interactions épistatiques entre les gènes homologues apparaissent chez les hybrides et conduisent à la mort ou à la stérilité de ceux-ci.

Il a par exemple été montré que les interactions de deux gènes suffisaient pour expliquer la létalité hybride chez les drosophiles (Brideau *et al.*, 2006).

#### d) LA SPECIATION : UNE TRANSITION ECOLOGIQUE

Les transitions écologiques sont à la base de différents modes de spéciation. Les changements de préférence écologique des populations, et notamment ceux qui concernent l'habitat ou l'exploitation des ressources, représentent une part importante des phénomènes de spéciation (Levin, 2000).

Cette transition peut désormais être mise en évidence grâce aux récents outils de génétique et de génomique (Luikart *et al.*, 2003). En effet, les traits biologiques impliqués dans la

spéciation peuvent être associés à l'architecture et à la nature des gènes liés à ce processus (Hawthorne & Via, 2001).

Cette spéciation écologique implique une sélection divergente dans deux environnements différents entre lesquels les flux géniques freinent les processus d'adaptation locale. De l'équilibre de la balance entre ces flux de gènes et l'adaptation peut dépendre l'établissement de conditions favorables à la spéciation écologique (Schluter, 2000). Elle peut donc intervenir en situation d'allopatrie comme en sympatrie.

L'exemple des « pinsons de Darwin » aux Galápagos, *Geospiza ssp.* illustre l'initiation du changement dans des populations puisque 14 espèces de pinsons se sont différenciées en une période relativement courte à partir d'une seule espèce originelle qui aurait migré depuis le Costa Rica (figure 8).



Figure 8: Radiation adaptative des pinsons des Galápagos (Encyclopaedia Britannica Online, 2005)

Chaque espèce occupe une île ou un petit nombre d'îles et ayant subi des modifications qui lui permettent de s'adapter à son nouveau milieu, développe des traits adaptatifs particuliers comme une morphologie de bec « adaptée » à la nourriture disponible dans la niche écologique ou capable de vocalises nuptiales particulières (Ratcliffe & Grant, 1983; Podos, 2001).

Un exemple de transition écologique affectant les plantes peut être illustré par une étude de Bradshaw et Schemske (2003) sur *Mimulus sp* (figure 9): *Mimulus lewisii* est pollinisé par des bourdons tandis que *Mimulus cardinalis* est visité par des colibris.

Bien que les deux espèces s'hybrident rarement naturellement, en raison de leurs différences en termes de pollinisateurs, elles peuvent être croisées en conditions contrôlées afin d'engendrer des F1 qui peuvent à leur tour être croisés pour créer des F2.



**Figure 9: Différences anatomiques entre *Mimulus cardinalis* (en haut) et *M. lewisii* (en bas) en relation avec leurs pollinisateurs respectifs**

Photos de Toby Bradshaw (University of Washington) et Douglas Schemske (Michigan State University)

Les auteurs ont montré un effet de la sélection naturelle pour les phénotypes des espèces parentales. Une cartographie de QTL (quantitative trait loci) des principaux caractères floraux a mis en évidence une corrélation entre la sélection sur le phénotype et la sélection sur le génotype. Ainsi une mutation qui engendre un changement de couleur de fleur a un large effet sur les barrières reproductives entre ces deux espèces car elle a un effet sur le pollinisateur attiré par la plante. Les deux espèces ont donc pu évoluer en allopatrie où les proportions de chaque pollinisateur n'étaient pas les mêmes, sélectionnant par là-même des combinaisons génétiques différentes dans chaque espèce. Ceci donne une bonne image de la génétique et de l'évolution de l'isolement reproducteur pour cette paire d'espèces et suggère que les gènes à larges effets phénotypiques puissent jouer un grand rôle dans la spéciation.

#### e) LA SPECIATION : UNE TRANSITION GENETIQUE

Bien qu'il soit généralement admis que la sélection divergente est le mécanisme primaire de l'évolution adaptative, sa mise en évidence et l'explication de son rôle dans les cas de divergence adaptative sont souvent difficiles (Reeve & Sherman, 1993; Rieseberg *et al.*, 2002).

Cette difficulté est notamment rencontrée lorsqu'il s'agit d'établir un lien entre le rôle de la sélection sur le phénotype et la base héritable des traits adaptatifs (Rogers & Bernatchez, 2007).

On connaît, en effet, peu de choses sur l'architecture génétique des incompatibilités qui apparaissent chez les hybrides (nombre et nature des gènes impliqués, nature de leurs interactions), ou sur la nature des forces évolutives à l'origine de leur apparition (simple dérive, ou sélection naturelle, et type de sélection) (Orr & Smith, 1998; Orr, 2005b). C'est ainsi que l'on rencontre principalement deux méthodes d'étude qui tendent à répondre à ces questions :

- des études de recherche de QTL associés à des caractères qui diffèrent entre paires d'espèces :

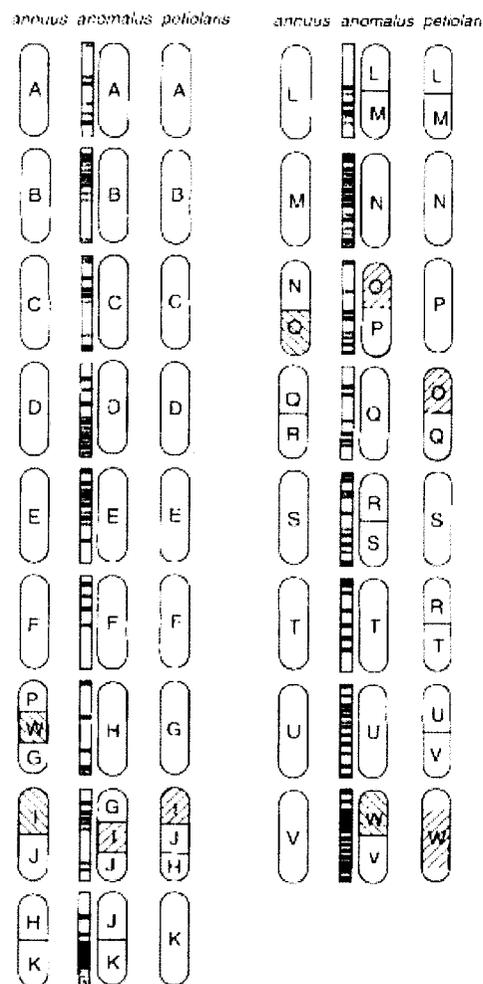
Les déterminants de l'incompatibilité des hybrides ont été identifiés avec quelque précision dans un très petit nombre de cas jusqu'à présent et semblent associés des interactions épistatiques entre de nombreux gènes, chacun de faible effet (Barton & Charlesworth, 1984; Coyne & Lande, 1985), ou peuvent impliquer peu de gènes à large effet phénotypique qui sont plus à même de répondre rapidement à la sélection (Gottlieb, 1984; Orr, 2005a).

- des analyses de baisse de fitness des hybrides en relation avec des mécanismes d'isolement reproducteur

Les zones hybrides où les différents taxons sont rencontrés en sympatrie sont souvent maintenues par un antagonisme entre la dispersion et la contre-sélection des hybrides (Barton & Hewitt, 1989).

Les traits adaptatifs divergents qui seraient impliqués dans la formation de barrières reproductives ont déjà fait couler beaucoup d'encre (Bradshaw *et al.*, 1998; Jones, 1998; Kim & Rieseberg, 1999; Sawamura *et al.*, 2000; Albertson *et al.*, 2003) et plusieurs travaux expérimentaux ont révélé l'importance des variations chromosomiques dans l'isolement reproducteur (par ex: Rieseberg *et al.*, 1999; Noor *et al.*, 2001a; 2001b; 2001).

Citons ceux de Rieseberg et de ses collègues (1995) sur *Helianthus* (*H. annuus*, *H. petiolaris* et leur hybride dérivé, *H. anomalus*) qui ont permis de générer une carte de liaison basée sur 212 locus chez *H. annuus* et 400 chez *H. petiolaris* (figure 10).



**Figure 10: Relations structurelles entre les chromosomes de trois espèces d'*Helianthus* (Rieseberg *et al.*, 1995)**

Les traits hachurés à l'intérieur des chromosomes indiquent les inversions. Les rectangles verticaux adjacents aux chromosomes de *H. anomalus* figurent la distribution des marqueurs des espèces parentales : *H. annuus* en noir et *H. petiolaris* en gris.

Les deux espèces parentales diffèrent par au moins 10 réarrangements structuraux dont 3 inversions et au moins 7 translocations réciproques. L'hybride F1 est semi-stérile et subit lui aussi des réarrangements (au moins 7).

D'autre part, «lorsqu'un sexe est absent, rare ou stérile chez les descendants F1 de deux races animales différentes, ce sexe est le sexe hétérozygote [hétérogamétique]». Ce mécanisme est connu sous le nom de règle de Haldane (1922) et implique une plus forte structuration génétique de marqueurs mâles-spécifiques que des marqueurs femelles-spécifiques (quand le mâle est hétérogamétique).

#### f) LA VITESSE DE SPECIATION

Le temps de spéciation est extrêmement variable entre les espèces et dépend également des modes de spéciation. Deux principales théories, basées sur des interprétations différentes du matériel fossile s'affrontent (figure 11):

- le gradualisme phylétique
- la théorie des équilibres ponctués

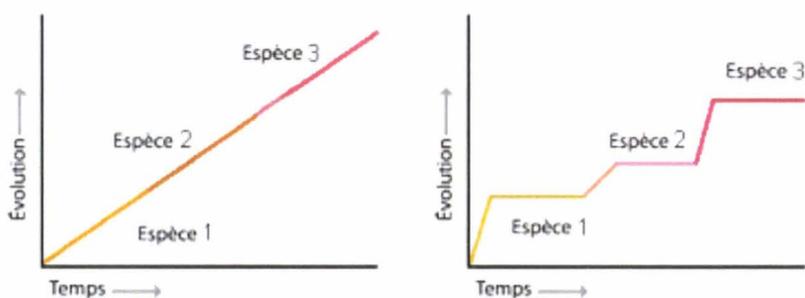


Figure 11: Gradualisme phylétique *versus* équilibre ponctué (d'après O'Neil, 2006)

Le gradualisme phylétique prévoit que l'évolution s'opère graduellement, selon des séquences lentes. Ces transformations lentes et régulières impliqueraient l'ensemble de la population sur toute son aire de répartition. Darwin, en partisan de cette théorie n'a cependant jamais éliminé la possibilité que d'autres transformations aient pu se faire selon une autre dynamique.

Depuis 1972, la théorie de l'équilibre ponctué (Eldredge & Gould) s'est développée. Elle prévoit de longues périodes de stase (peu de changements anagénétiques\*) alternées par des périodes de changements rapides, menant à la formation de nouvelles espèces. Ces changements rapides correspondent souvent à un changement écologique comme l'accessibilité nouvelle à une niche écologique vacante (ex : radiation adaptative après phase d'extinction massive d'espèces).

Eldredge et Gould suggèrent que le changement évolutif ne se fait pas dans l'entièreté de la population mais dans des sous-populations géographiquement isolées. La divergence dans ces isolats serait une des causes principales de l'augmentation de diversité.

Un débat important subsiste dans la communauté scientifique en ce qui concerne l'importance relative du gradualisme et des équilibres ponctués car dans chaque cas des exemples convaincants ont été mis en évidence.

Les deux prochains points vont s'intéresser à deux modes de spéciation qui ne s'effectuent pas à la même vitesse :

Dans les cas d'hybridation et d'introgession, la mise en place de l'isolement reproducteur se fait en général graduellement. L'hybridation est possible, mais difficile, puis devient impossible. Et parfois, une différence sur quelques gènes suffit à la rendre impossible immédiatement.

Dans les cas de polyploïdisation, la spéciation est immédiate car l'hybride néopolyploïde ne peut plus se croiser avec ses espèces parentales.

## C.II. SPECIATION PAR HYBRIDATION

Par son origine étymologique latine, *ibrida* : « sang mêlé », le terme « hybridation » évoque une fécondation qui ne suit pas les lois naturelles : c'est le fait de croiser deux taxons différents et d'ainsi engendrer la naissance d'hybrides présentant des caractères spécifiques des deux parents.

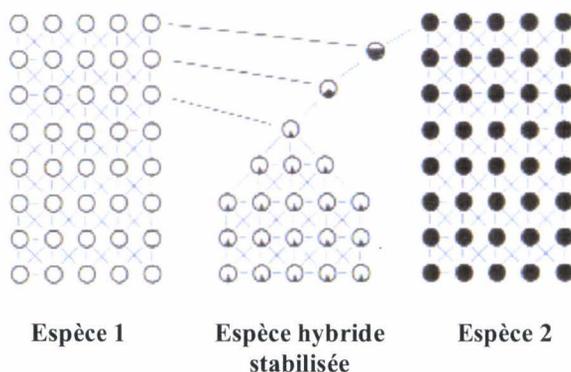
### a) LES PHENOMENES D'HYBRIDATION ET D'INTROGRESSION

L'hybridation, quand elle se produit, peut engendrer principalement deux processus dont les effets sont opposés :

- une diminution de l'intégrité génétique d'une espèce suite à l'introgession\* de gènes provenant d'une autre espèce (Rhymer & Simberloff, 1996) ;
- la formation de nouvelles espèces.

Dans les cas d'introgession, on peut noter, par exemple, des cas où une espèce a été introduite dans un milieu où une espèce indigène était déjà présente et où des flux de gènes entre les deux espèces ont pu se produire, de sorte qu'au fil des générations, il n'existe plus d'espèce indigène à l'état pur. Ce fut le cas lors de l'introduction répétitive de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) dans la rivière Kootenay en Colombie-Britannique (Canada) qui a causé l'extinction génétique de certaines populations de truites fardées indigènes de cette rivière (*O. clarki lewisi*) (Rubidge & Taylor, 2004).

Par contre, les zones hybrides peuvent aussi évoluer en barrières interspécifique par un mécanisme de renforcement des différences interspécifiques. Ce renforcement va survenir sous l'action de la sélection naturelle lorsque les hybrides sont désavantagés de manière à « étanchéifier » les barrières à la reproduction (Servedio, 2000).



Les hybrides F1 sont interfertiles avec au moins une des deux espèces parentales ce qui permet des croisements en retour. Au fil des générations, la population hybride peut diverger suffisamment des espèces parentales et subir un isolement reproductif tel qu'elle va constituer une nouvelle espèce (figure 12).

Figure 12: Spéciation par hybridation et introgression (Ridley, 1997)

Il est davantage admis que, dans de nombreux cas, la spéciation par hybridation implique plusieurs générations d'introgression, plutôt qu'une hybridation unique (Ridley, 1997) excepté dans les cas de polyploïdisation. En effet, les polyploïdisations entraînent presque toujours une spéciation instantanée, et ceci même en cas de sympatrie. L'isolement reproductif survient par un seul évènement mutationnel propagé par une période d'autofécondation.

## b) LES FREQUENCES ET LES CONSEQUENCES DE L'HYBRIDATION

Barton et Hewith (1989) recensent 170 zones hybrides et qualifient la plupart de « zones de tension » c'est-à-dire des zones où la fitness des hybrides est réduite par rapport à celle des deux populations adaptées à des milieux différents. Selon ces auteurs, ce sont les pressions de sélection endogènes (incompatibilités génétiques, épistasie négative, etc...) qui diminuent le succès reproducteur des hybrides par rapport aux individus « purs ». Le maintien de la zone hybride est alors possible seulement lorsqu'il y a un équilibre entre le succès reproducteur inférieur des hybrides et l'arrivée d'individus purs dans la zone hybride. Pourtant nombre de données sont contradictoires avec ce modèle.

D'autres auteurs soutiennent l'idée que le succès reproducteur de l'hybride dépend de l'environnement et qu'il peut donc se retrouver inférieur, égal ou supérieur à celui des parents en fonction de l'habitat (Moore, 1977; Harrison, 1986; Howard, 1986; Arnold, 1997)

La vigueur hybride qui peut être observée dans certains cas, appelée également « effet d'hétérosis », se traduit par la supériorité pour de nombreux caractères de l'individu hybride (résistance aux pathogènes, vigueur, précocité...) sur la moyenne des deux parents ou sur le meilleur des deux parents.

Des exemples de cette vigueur des hybrides de première génération (F1) sont communs dans la littérature (par ex Burke *et al.*, 1998; Campbell, 2003; Song *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 2005; Hoecker *et al.*, 2006; Kusterer *et al.*, 2007). Pourtant la majorité de ces études ne se focalise que sur la ou les premières générations d'hybrides ou lorsque plusieurs générations sont prises en compte, l'expérience est souvent menée en conditions contrôlées et non en milieu naturel.

Or, en plus de varier dans le temps et dans l'espace, le succès reproducteur relatif des hybrides peut aussi varier en fonction de la génération hybride (Arnold & Hodges, 1995).

Ainsi, les conséquences évolutives de l'hybridation à long terme et en milieu naturel sont loin d'être totalement élucidées, d'autant qu'elles dépendent de nombreux paramètres (espèces étudiées, divergence entre les espèces parentales, aires de répartition et écologie des espèces par exemple) et doivent donc bien souvent être traitées au cas par cas.

### c) L'EXEMPLE DU POUILLOT VERDATRE (*PHYLLOSCOPUS TROCHILOIDES*)

L'étude d'Irwin *et al.* (2005) sur le pouillot verdâtre (*Sylviidae*) représente un exemple de spéciation d'espèce « en anneau ». Les populations de ce petit passereau d'Asie forment une chaîne au sein de laquelle se rencontrent six sous-espèces dont les aires respectives ne se chevauchent que très partiellement et deux à deux (figure 13).

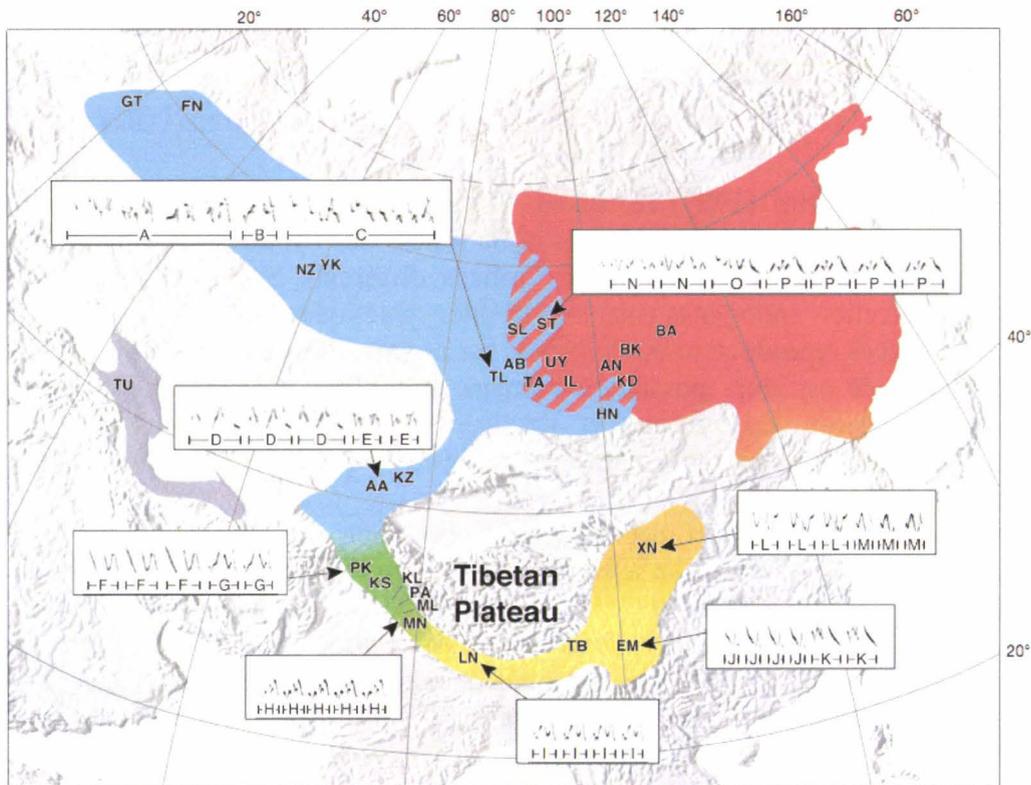


Figure 13 : Carte de distribution du complexe d'espèces de pouillot verdâtre en Asie et de leurs spectrogrammes de chants respectifs (Irwin *et al.*, 2001a)

Les différentes couleurs représentent les 6 différentes sous-espèces : *P.t. viridanus* en bleu, *ludlowi* en vert, *trochiloides* en jaune, *obscuratus* en orange, *plumbeitarsus* en rouge et *nitidus* en violet. Les dégradés de couleur indiquent des changements morphologiques graduels. Les spectrogrammes de chant sont représentés pour 8 sites.

Les deux sous-espèces extrêmes de la chaîne (*Phylloscopus trochiloides viridanus* et *P.t. plumbeitarsus*) cohabitent dans les monts de l'Altaï sans être inter-féconds (Irwin *et al.*, 2005). Ces formes sont connectées par une chaîne de populations par le sud qui encerclent les hauts plateaux tibétains désertiques.

Des traits tels que les couleurs, la morphologie et les comportements (chants et reconnaissance de chant) changent graduellement (Irwin *et al.*, 2001a). Une étude sur 105 oiseaux de 26 sites sur 62 marqueurs AFLP (Irwin *et al.*, 2005) montre que seuls les génotypes des individus ouest-sibérien (*P.t. viridanus*) et est-sibérien (*P.t. plumbeitarsus*) sont clairement différents. L'étude conclut qu'il n'y a pas de rupture de flux de gènes sur l'anneau de populations excepté pour les deux formes extrêmes.

Ticehurst (1938) suggère que les pouillots verdâtres furent confinés un moment dans l'Himalaya pour ensuite étendre leurs distributions vers le nord selon deux routes distinctes en Sibérie.

Les variations progressives de conditions écologiques durant les deux expansions vers le nord seraient responsables de l'adaptation évolutive rapide, de la divergence et de l'isolement reproductif des populations (Irwin, 2000; Irwin *et al.*, 2001a; Irwin *et al.*, 2001b).

### **C.III. POLYPLOIDISATION**

Un événement de polypléidisation est une forme extrême de mutation dont les conséquences affectent l'ensemble du génome.

Les hybrides interspécifiques sont habituellement stériles, en général parce que des paires de chromosomes issues des deux espèces parentales ne peuvent ségréger correctement à la méiose. Winge (1917) a proposé que le doublement spontané des chromosomes, à la suite d'un doublement somatique accidentel lors de la mitose ou à la suite d'une non-réduction à la méiose, peut conduire à la formation d'un hybride fertile.

La polypléidie propice à des réarrangements chromosomiques joue un rôle très important dans l'évolution des plantes et constitue un mécanisme de diversification et de création de variabilité génétique.

#### **a) LES PROCESSUS MENANT A LA POLYPLOÏDIE**

Trois mécanismes sont susceptibles d'engendrer un doublement du nombre de chromosomes : un doublement somatique (endomitose), une non-réduction des gamètes durant la méiose ou de la polyspermie (Grant, 1981; Ramsey & Schemske, 1998). Prenons le cas simple où les deux parents sont diploïdes :

- L'endomitose consiste en une duplication des chromosomes sans division du noyau lors de la mitose, résultant en un doublement du nombre de chromosomes à l'intérieur d'une cellule. Si ce doublement apparaît à un stade précoce du zygote, l'individu qui naîtra sera tétraploïde ;
- La production de gamètes non réduits (i.e., subissant uniquement la première division de méiose) conduit à la formation de gamètes diploïdes. Les individus tétraploïdes peuvent alors être issus d'une seule ou de deux étapes : dans le cas de l'implication d'une seule étape dans le processus, deux gamètes non réduits fusionnent et forment un individu tétraploïde ;

La figure 14 illustre ces deux cas.

- La polyspermie, c'est-à-dire la fécondation d'un même gamète femelle par plusieurs gamètes mâles, implique le plus souvent deux gamètes mâles et génère des individus triploïdes. Mais la polyspermie reste un cas rare dans les phénomènes de polypléidie.

La non-réduction gamétique semble le moyen « privilégié » qui conduit à la polypléidie (Thomson & Lumaret, 1992; Ramsey & Schemske, 1998).

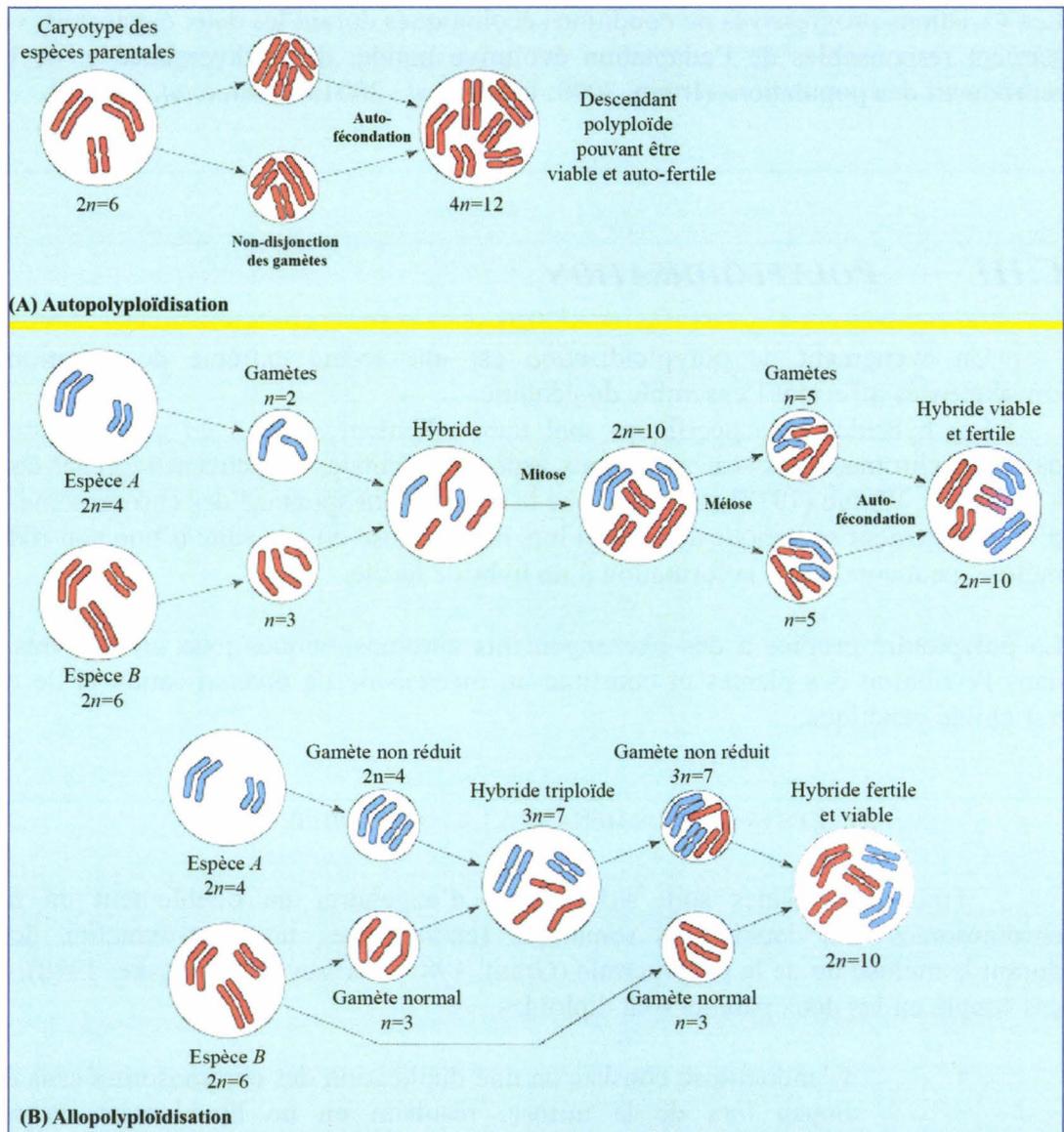


Figure 14: Modes de formation des polyplôïdes (d'après Campbell & Reece, 2001)

Il y a deux classes de polyplôïdes : celle issue d'un doublement d'un seul génome (l'autopolyploïdie) (figure 14 (a)) et celle issue de la fusion d'au moins deux génomes distincts (l'allopolyploïdie) (figure 14 (b) (Stebbins, 1971) :

- Les autopolyploïdes sont des polyplôïdes non hybrides issus d'une augmentation du nombre de copies du génome de l'espèce ;
- Les allopolyploïdes résultent d'au moins une hybridation interspécifique et combine les génomes des espèces parentales. Le doublement du stock chromosomique a souvent lieu à la faveur de gamètes non réduits, avant ou après l'hybridation interspécifique. Dans cette catégorie sont aussi cités des cas d'allopolyploïdie segmentaire (i.e. polyplôïde issu de la combinaison du génome de deux parents dont les stocks chromosomiques sont partiellement divergents engendrant donc lors de la méiose des bivalents et des multivalents), et des cas d'autoallopolyploïdie (i.e. polyplôïde issu à la fois d'auto et d'allopolyploïdisation) (Coyne & Orr, 2004).

Les espèces polyploïdes sont en majorité des allopolyploïdes bien que de plus amples analyses seraient susceptibles de révéler des cas supplémentaires d'autopolyploïdie (Soltis & Soltis, 2000).

Plusieurs estimations sont arrivées à la conclusion que la grande majorité des plantes à fleurs ont subi des événements de polyploïdisation au cours de leur histoire évolutive et chez nombre d'exemples, l'allopolyploïdisation a été récurrente (Soltis & Soltis, 1993; 1995).

Toutefois, les cas d'allotétraploïdes sont prédominants (ex : *Gossypium hirsutum* (Reinish *et al.*, 1994) et *Nicotiana tabacum* (Kenton *et al.*, 1993)). Les cas d'allohexaploïdes tels que le blé (Riley & Chapman, 1958) et l'avoine cultivé (Rajhathi & Thomas, 1974) sont moins nombreux. Les cas de ploïdie encore supérieure sont encore plus rares même si certaines espèces atteignent des niveaux exceptionnels comme *Sedum suaveolens*  $2n=80x=640$  (Uhl, 1978).

## b) LES CONSEQUENCES ET LE SUCCES DE LA PLOÏDIE

L'évènement de polyploïdisation est actuellement perçu comme un processus hautement dynamique et une force majeure dans l'évolution des plantes supérieures (Soltis & Soltis, 1995).

Wendel (2000) a déclaré que probablement plus de la moitié, voire plus de 70% des angiospermes ont subi au moins un événement de doublement chromosomique au cours de leur histoire évolutive. De même, plus de 95% des ptéridophytes seraient dotés d'un génome de nature polyploïde selon Grant (1981). Ces estimations attestent d'une polyploïdie largement répandue chez les végétaux à l'exception des gymnospermes (Delevoryas, 1980). Chez les animaux cette proportion de polyploïdes est aussi beaucoup plus faible (quelques centaines d'espèces (Otto & Whitton, 2000)) et les cas les plus connus concernent les reptiles, les amphibiens et les poissons.

Bien que la polyploïdie semblait inexistante chez les espèces mammaliennes (Orr, 1990), un rongeur tétraploïde, le *Tympanoctomys barrerae*,  $2n=4x=102$ , photo ci-contre) a été toutefois découvert (Gallardo *et al.*, 1999).



Figure 15 : Le rat Viscacha rouge, *Tympanoctomys barrerae* - Octodontidae (Ojeda *et al.*, 2007)

Otto et Witton (2000) estiment respectivement à 7 et 3% la proportion des spéciations associées à un événement de polyploïdisation chez les fougères et les angiospermes.

D'autre part, et contrairement à la pensée classique d'une origine unique de chaque espèce, il semble que les espèces polyploïdes contemporaines ont, pour une grande part, une origine multiple en ce sens que différentes populations des espèces ancestrales contribuent à leurs fonds génétiques (revue de Soltis & Soltis, 1999).

La polyploïdie se traduit par l'association des évènements évolutifs de chaque espèce parentale au sein de la nouvelle lignée hybride et elle entraîne une complexification dans la constitution du génome. L'interaction de génomes différenciés chez les allopolyploïdes déclenche une réorganisation rapide du noyau polyploïde (Soltis & Soltis, 1995; Leitch & Bennett, 1997; Matzke *et al.*, 1999; Soltis & Soltis, 1999; Otto & Whitton, 2000; Soltis & Soltis, 2000).

Les raisons du "succès" de la polypléidie chez les plantes ne sont pas claires car pour s'établir comme des nouvelles espèces, les polypléides nouvellement formés doivent supporter des biais d'appariement et de ségrégation chromosomique (Comai *et al.*, 2000; Ozkan *et al.*, 2001). En effet, ils risquent d'avoir une descendance principalement triploïde car les partenaires potentiels sont massivement diploïdes et, de ce fait, risquent d'être désavantagés dans la réalisation de leur méiose (Otto & Whitton, 2000).

Ainsi paraît-il essentiel que les individus qui se croisent soient de pléidie identique afin que la lignée se perpétue. Cette situation peut être favorisée par :

- le mode de reproduction (autofécondation et reproduction clonale)
- la production récurrente d'individus polypléides (Ramsey & Schemske, 1998)

Les effets additifs de l'accumulation de gènes ont des conséquences au niveau cellulaire, physiologique et morphologique : des cellules plus larges, une plus forte teneur en eau, un développement plus lent, et souvent une taille plus grande et des niveaux plus élevés de certaines enzymes, hormones et composants qui peuvent protéger la plante des herbivores et des pathogènes. Bénéficiant d'une hétérozygotie accrue (revue dans Soltis & Soltis, 2000), les polypléides ont une diversité très grande d'interactions génétiques et enzymatiques (Otto & Whitton, 2000) qui a pour conséquence une meilleure homéostasie vis-à-vis des variations environnementales et une plus grande possibilité d'exploitation du substrat (e.g. Uyeno & Smith, 1972).

Et cette capacité à investir de nouvelles niches écologiques pourrait avoir pour conséquence de compenser et/ou de réduire l'incidence de leur diminution de fitness causée par les croisements avec les espèces parentales (Futuyma, 1997). On observe en effet que la plupart des taxons polypléides diffèrent de leurs progéniteurs diploïdes en terme d'habitat et de distribution (Stebbins, 1950; Lewis, 1979; Martins *et al.*, 1998).

Stebbins (1950) observe, d'autre part, que bien que la pléidie confère de nouvelles capacités physiologique ou écologique, il n'en demeure pas moins qu'elle ne crée pas de nouvelles caractéristiques morphologiques majeures telles que des modifications de structure de fruit ou de fleur.

### c) L'EXEMPLE DE *DRABA* (BRASSICACEAE)

La polypléidie a eu une influence majeure sur la flore des régions arctiques (Brochmann *et al.*, 2004). Un de ces représentants a été largement étudié (par ex. Brochmann, 1993; Widmer & Baltisberger, 1999; Scheen *et al.*, 2002) du fait de sa grande diversité de niveaux de pléidie allant de 2X jusqu'à 16X. Il s'agit du genre *Draba* qui compte 16 espèces réparties dans trois sections : les sections *Draba*, *Chrysodraba* et *Drabella*.

Widmer et Baltisberger (1999) par exemple ont utilisé des séquences nucléaires d'ITS et des séquences chloroplastiques afin d'identifier les espèces parentales diploïdes à l'origine de l'espèce tétraploïde *Draba ladina*. Il s'est avéré que *Draba ladina* possède, pour ce qui est des séquences ITS, les mêmes haplotypes que ceux de *D. aizoides* et *D. tomentosa* (figure 16) mais seulement l'haplotype chloroplastique de *D. tomentosa*, identifiant ainsi cette dernière espèce comme le parent maternel dans l'hybridation et *D. aizoides* comme le donneur de pollen.

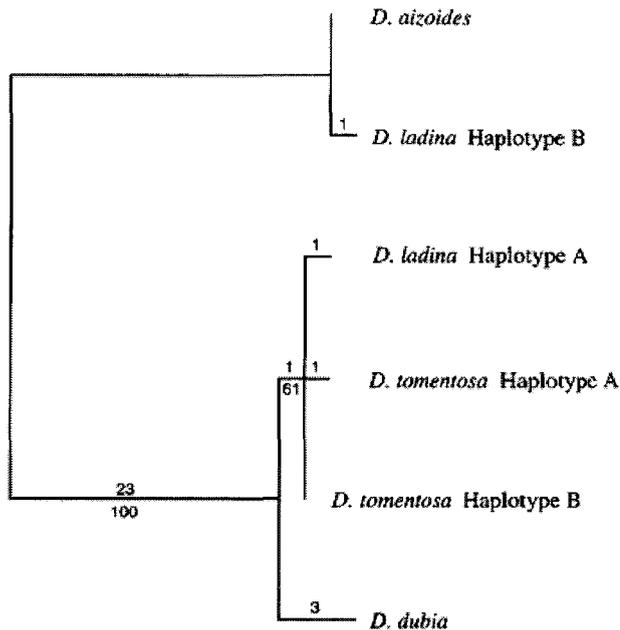


Figure 16: Arbre de parcimonie dérivé de l'analyse de 636 pb de séquences d'ITS chez *D. aizoides*, *D. dubia* et *D. tomentosa* (Widmer & Baltisberger, 1999)

Le nombre situé au-dessus de la branche indique le nombre de substitutions et celui qui est en dessous précise la valeur de bootstrap.

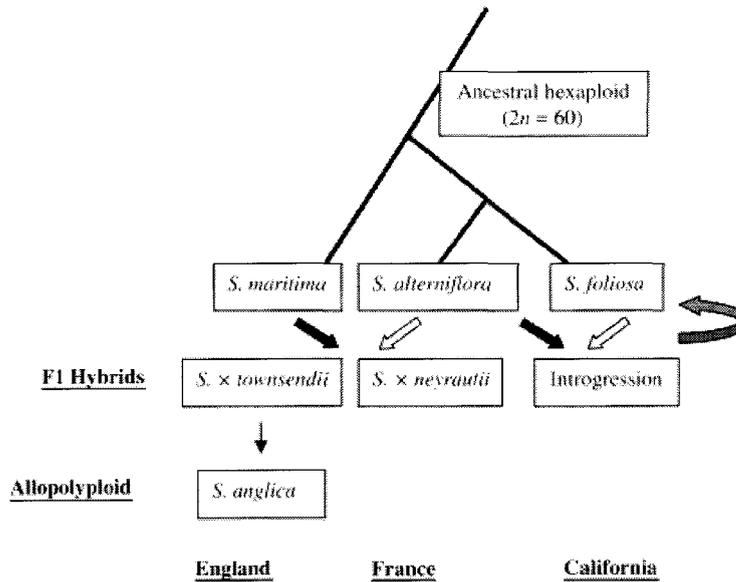
D'autre part, le patron de variation génétique de *Draba ladina* suggère que, contrairement à la majorité des cas d'alloploïdisation, l'espèce est issue d'un unique événement d'hybridation.

#### d) L'EXEMPLE DE *SPARTINA* (POACEAE)

Les phénomènes d'hybridation et de polyplôïdie sont aussi bien illustrés par le genre *Spartina*. En effet, ce genre offre l'opportunité d'étudier les processus génétiques qui agissent lors de la formation et de l'établissement d'une nouvelle espèce suite à une alloploïdisation (Thompson, 1991; Ferris *et al.*, 1997; Baumel *et al.*, 2002; Aïnouche *et al.*, 2004).

La spartine anglaise, *Spartina anglica*, est une graminée invasive issue d'une récente hybridation qui a eu lieu en deux étapes dans le sud de l'Angleterre. La première a eu lieu en 1870 et a consisté en l'émergence d'un hybride stérile, *Spartina x townsendii*, issu d'un croisement entre l'espèce locale *Spartina maritima* et l'espèce venue d'Amérique du Nord *Spartina alterniflora* (figure 17) (Thompson, 1991). Par doublement chromosomique naturel, cet hybride est devenu fertile et porte le nom de *Spartina anglica*.

Il est intéressant de noter que, contrairement à la plupart des cas, cet hybride invasif n'a pas subi de changements génomiques significatifs (Aïnouche *et al.*, 2003).



**Figure 17: Effet des introductions de *S. alterniflora* sur les hybridations récentes et la spéciation allopolyploïde dans la lignée hexaploïde de la spartine (Aïnouche *et al.*, 2003)**  
 Les flèches « vides » indiquent l'origine du génome maternel dans les phénomènes d'hybridation.

Parallèlement mais indépendamment, ces deux espèces *S. maritima* et *S. alterniflora* se sont aussi hybridées dans le sud-ouest de la France pour former un autre hybride stérile : *S. x neyrauttii* (Baumel *et al.*, 2003). Dans ces deux cas, l'hybride stérile F1 possède l'haplotype chloroplastique de *S. alterniflora*, l'identifiant ainsi comme le progéniteur maternel (Ferris *et al.*, 1997; Baumel *et al.*, 2003).

De larges phénomènes d'introgression ont d'autre part pu être mis en évidence en Californie entre l'espèce invasive *S. alterniflora* et l'espèce native *S. foliosa* (Aïnouche *et al.*, 2003) (figure 17).

## **C.IV. CAS DES SYSTEMES INSULAIRES**

Les systèmes insulaires représentent des laboratoires naturels d'évolution au sein desquels les processus de spéciation peuvent être abordés de manière optimale en raison de la simplification des communautés et des interactions biotiques, notamment sur les îles de faible superficie.

Deux modèles principaux de biogéographie insulaires ont, depuis 40 ans, servi de cadre conceptuel et méthodologique dans les diverses études de peuplements insulaires :

Le modèle d'équilibre dynamique développé par MacArthur et Wilson (1967) s'attache à décrire les relations entre superficie de l'habitat et richesse spécifique et considère qu'il y a, sur les îles, un rapide turn-over entre les événements de colonisation et d'extinction impliquant des flux de gènes régulièrement élevés.

Le modèle de vicariance (ex: Rosen, 1978; Nelson & Platnick, 1981), par contre, suggère une grande stabilité des écosystèmes insulaires et s'intéresse aux processus de diversification avec une persistance des espèces sur le long terme et peu, voire pas, de phénomènes de colonisation/dispersion.

Ces deux modèles sont, pour chacun pris à part, incorrects et incomplets car ils ne prennent par exemple pas en compte l'hétérogénéité du paysage et donc la diversité des types d'îles, mais ils continuent de constituer la base conceptuelle de multiples orientations de recherches.

Quoiqu'il en soit, quelques principes généraux semblent constants dans les processus de colonisation des îles :

- plus l'île est proche du continent, plus la probabilité de colonisation est importante ;
- plus l'île est âgée, plus il est probable qu'elle ait été colonisée ;
- plus l'île est grande, plus les espèces ont de chances de s'établir ;
- plus l'île est isolée, plus les flux de gènes sont réduits ;
- plus le temps depuis la colonisation est grand et plus les populations de colonisateurs sont divergents génétiquement de leurs populations parentales du fait de la sélection naturelle, des mutations et/ou de la dérive génétique.

Les recherches phylogéographiques sont progressivement facilitées par le développement de nouvelles techniques très robustes comme les données de séquençage d'ADN et leurs capacités de datation des événements phylogénétiques (ex: Arbogast *et al.*, 2002), la disponibilité de matériel fossile daté avec précision, des reconstructions de plus en plus détaillées de l'histoire géologique des régions océaniques (ex: Hall, 1998), etc...

Heaney (2007) suggère un nouveau modèle biogéographique concernant les îles océaniques qui s'appuierait sur les 6 constats suivants :

- le phénomène de dispersion des organismes terrestres au-delà de « barrières aquatiques océaniques » est commun sur une échelle de temps géologique ;
- les flux de gènes entre plusieurs îles données varient significativement entre les espèces même si, en apparence, les organismes peuvent sembler « similaires » ;
- la diversification d'une lignée au sein de plusieurs îles océaniques est fréquente et mène souvent à une grande richesse spécifique et à un taux élevé d'endémisme dans les archipels ;

- les îles de formation géologique récente hébergent souvent des espèces plus récentes que les îles plus anciennes ;
- il est inhabituel mais pas rare que des lignées insulaires colonisent les continents.

Il apparaît dès lors essentiel de conduire de nouvelles investigations sur des taxons ou complexes de taxons insulaires afin d'identifier les implications conceptuelles de ces résultats et ainsi permettre d'optimiser le modèle biogéographique qui émerge.

## D. MODELE BIOLOGIQUE D'ETUDE : LA SECTION BETA

L'étymologie viendrait des Romains qui auraient donné ce nom par analogie entre la forme de la lettre grecque et celle prise par la tige chargée de graines.



Figure 18 : Aquarelle de *Beta v. maritima* (Mossberg & Stenberg, 1992)

### D.I. *ÉLÉMENTS DE TAXONOMIE*

La betterave est une espèce à polinisation anémogame et à dissémination barochore de la famille des Amaranthacées (APG, 2003).

Le terme « section » définit une subdivision taxonomique d'un genre. Il fut employé pour la première fois dans le genre *Beta* en 1927, dans une étude de Transhel. Depuis, différents auteurs ont modifié ces sections au fil des années (Ulbrich, 1934; Buttler, 1977; Ford-Lloyd, 1986; Letschert, 1993; Lange *et al.*, 1999; Hohmann *et al.*, 2006).

La classification actuelle reconnaît l'existence de deux sections dans le genre *Beta* : les sections *Beta* et *Corollinae* (Hohmann *et al.*, 2006).

Nous nous focalisons, dans ce mémoire, sur la section *Beta* qui comprend trois espèces : *Beta vulgaris* (regroupant les sous-espèces *maritima*, *adanensis* et *vulgaris* (forme cultivée), *Beta patula* et *Beta macrocarpa* (Letschert, 1993) (figure 19).

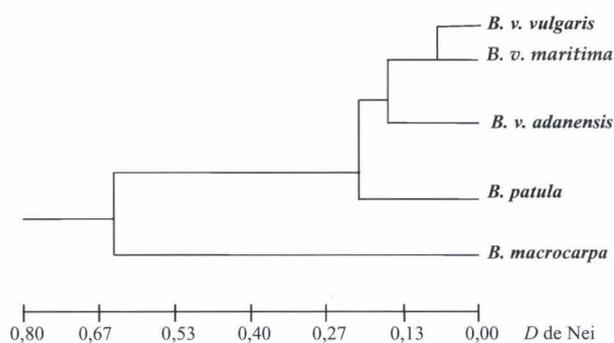


Figure 19: Phylogénie du genre *Beta* section *Beta* basée sur 10 locus allozymiques (d'après Letschert, 1993)

Chez *B. macrocarpa*, des cytotypes de deux sortes ont été rencontrés : des types diploïdes ( $2N=18$ ) et d'autres tétraploïdes ( $2N=36$ ). Ce dernier n'a été décrit qu'aux Canaries et serait un hybride naturel entre le type diploïde de *B. macrocarpa* et une espèce du complexe *B. vulgaris* indéterminée (Abe & Tsuda, 1987).

On considère que toutes les betteraves cultivées descendent de *B.v. maritima* (Mc Farlane, 1971).

## D.II. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

De nos jours, *B.v. maritima* se rencontre en Inde, en Asie centrale et européenne, le long des côtes méditerranéennes d'Europe et d'Afrique et sur les côtes européennes qui bordent l'océan Atlantique (figure 20). L'aire de répartition de *B. v. adanensis* est plus restreinte et se superpose à celle de *B.v. maritima* dans les îles de la mer Égée et au Proche-Orient. Celle du type diploïde de *B. macrocarpa* est centrée sur les régions méditerranéennes. La forme tétraploïde est endémique des Canaries.

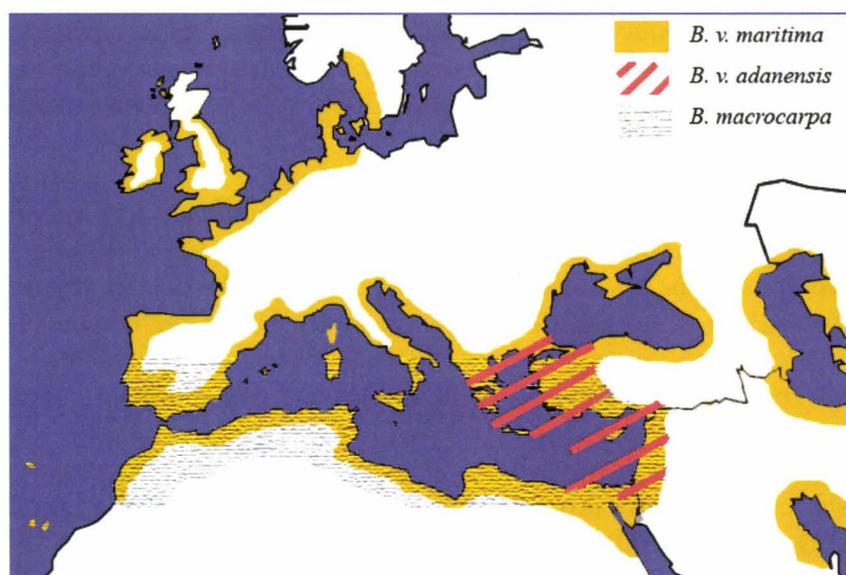


Figure 20: Distribution géographique des 3 principaux taxons de la section *Beta*: *B.v. maritima*, *B.v. adanensis*, *B. macrocarpa*

Et enfin, *B. patula* a une distribution très limitée puisqu'on ne la trouve que sur une petite île, « l'Ilheu dos Desembarcadouros » au large de l'archipel de Madère. Pour cette raison, elle n'est pas étudiée ici.

La section *Beta* présente de nombreuses caractéristiques d'intérêt pour la recherche. Outre l'originale diversité des aires de répartition de ces espèces et sous-espèces (*B.v. maritima* : cosmopolite, *Bv adanensis* et *B. macrocarpa* diploïde: distribution plus restreinte, *B. macrocarpa* : endémique des Canaries) et les situations sympatriques, parapatriques et allopatriques rencontrées (figure 20), on observe aussi une certaine diversité des régimes de reproduction.

### **D.III. HABITATS**

Les habitats les plus propices au développement de *B.v. maritima* sont les plages de sable ou de galets, les prairies de bords de mer, les falaises et les terrains rudéraux. Des latitudes faibles hébergent une plus grande proportion de populations à l'intérieur des terres que les latitudes plus élevées.

*Beta macrocarpa* 2X affectionne les bordures de champs ou de routes, par exemple, mais elle est aussi halophyte (= tolérante au sel) puisqu'on la retrouve dans certaines salines du Portugal. Peu d'indications sont disponibles quant à l'écologie du type tétraploïde.

*Beta patula* n'est rencontrée que sur une petite île au large de Madère, l'Ilheu Dos Desembarcadouros.

### **D.IV. REGIMES DE REPRODUCTION ET CYCLES DE VIE**

Le régime de reproduction est un facteur déterminant de la structure ainsi que de la diversité génétique des populations en ce qu'il influence directement les possibilités de brassage génétique entre individus (Hamrick & Godt, 1990) et les potentialités de spéciation (Sweigart & Willis, 2003).

*B.v. maritima* est pérenne lorsque les conditions climatiques sont favorables même si beaucoup de populations méditerranéennes sont annuelles. Il s'agit de la seule espèce gynodioïque de la section. Les populations des plages de la mer du Nord sont hautement autoincompatible (Dale & Ford-Lloyd, 1985) mais des variations peuvent exister (Bruun *et al.*, 1995).

La viabilité du pollen est estimée à 24H et dépend des conditions environnementales, principalement de l'humidité.

*B.v. adanensis* et *B. macrocarpa* sont autogames et annuelles (Letschert, 1993). *B. macrocarpa* présente en outre la particularité d'une phase végétative très courte.

*Beta patula* est autogame et pérenne sous conditions favorables (pas de gelées) (Letschert, 1993).

## ***D.V. POTENTIALITES D'HYBRIDATION***

Toutes les espèces de la section *Beta* peuvent potentiellement s'hybrider (Smith, 1980; Bartsch *et al.*, 1999a; Bartsch *et al.*, 1999b). Les hybrides sont viables et fertiles et ne montrent pas d'incompatibilités au niveau chromosomique.

La plupart des études sur les croisements dans la section *Beta* ont été réalisées entre l'espèce cultivée *Beta vulgaris vulgaris* et les espèces sauvages. Toutefois, étant donnée sa très proche parenté avec *Beta vulgaris maritima*, il est probable que les croisements décrits ci-dessous puissent donner les mêmes résultats avec *B.v. vulgaris* et *B.v. maritima*.

L'hybridation naturelle entre *B. macrocarpa* et *B.vulgaris ssp.* est rare du fait des différences de période de floraison des espèces parentales (Mc Farlane, 1975). D'autres études ont révélé l'existence de barrières génétiques entre ces deux espèces, entraînant la production d'un pollen partiellement stérile et l'avortement de l'embryon chez l'hybride (Abe *et al.*, 1986). De même, l'étude BRIDGE (1993) a relevé un faible taux d'hybridation entre les espèces en Californie.

Lange et De Bock (1989) ont produit des hybrides triploïdes et tétraploïdes entre des *B. macrocarpa* 4X et des types diploïdes et tétraploïdes de *B. vulgaris*. Les descendants triploïdes étaient stériles et les tétraploïdes un peu plus fertiles. La F2 s'est révélée partiellement fertile.



Au regard de cette bibliographie, il apparaît que la Section *Beta* représente un excellent modèle d'étude des phénomènes de colonisation, de spéciation et d'hybridation chez un complexe d'espèces d'affinité côtière. Toutefois, un certain nombre de zones d'ombre persistent quant à ces différents processus. Ils feront l'objet d'une étude particulière lors des différents chapitres ci-après développés.

Voici, pour chaque thème, les recherches qui ont été menées:

### **Phylogénie**

La phylogénie des espèces de la section *Beta* a été construite à la fois avec des données de séquences nucléaires et chloroplastiques sur un échantillon d'individus répartis sur les aires de distributions respectives de chaque espèce afin d'appréhender la diversité génétique qui caractérise chaque espèce et la proximité génétique qu'elles partagent (chap. I).

### **Distribution géographique**

La distribution géographique contemporaine des espèces de la Section est relativement bien cernée. Toutefois, il a fréquemment été observé que cette distribution actuelle des populations garde les stigmates des perturbations climatiques du Quaternaire. Une étude phylogéographique de l'espèce côtière *B.v. maritima* a ainsi été menée afin de mettre en évidence les potentiels refuges glaciaires qui auraient hébergé l'espèce et dans lesquels auraient pu voir le jour d'autres espèces de la Section (chapitre II).

### **Habitats**

Des prospections de terrains dans les archipels des Canaries et de Madère et au Maroc ont permis de caractériser les espèces de la section présentes dans cette zone et de préciser les habitats qu'elles affectionnent, notamment en ce qui concerne l'espèce *B. macrocarpa* tétraploïde endémique des Canaries pour laquelle les informations sont quasi inexistantes.

### **Régimes de reproduction et cycle de vie**

Une analyse morphologique et phénologique en conditions contrôlées d'individus de la section récoltés aux Canaries a été réalisée afin d'identifier les différences phénotypiques qui existent entre les différentes espèces (chapitre IV).

D'autre part, deux études de génétique des populations sur des marqueurs microsatellites nucléaires en Espagne et sur l'archipel des Canaries ont permis de préciser les régimes de reproduction des espèces *B. macrocarpa* diploïdes et tétraploïdes et surtout d'estimer la diversité génétique de chaque espèce dans ces régions.

### **Potentialités d'hybridation**

Ces deux études (chapitres III et IV), basées respectivement sur près de 850 et 145 individus ont permis, d'une part, d'évaluer la diversité génétique qu'il existe dans cette zone régulièrement citée comme refuge glaciaire, mais surtout, de mettre en évidence et de comprendre les mécanismes de spéciation qui opèrent dans la zone méditerranéenne.

# CHAPITRE I. RELATIONS EVOLUTIVES ENTRE ESPECES DE LA SECTION *BETA* (*AMARANTHACEAE*) MISES EN EVIDENCE PAR DES MARQUEURS NUCLEAIRES ET CHLOROPLASTIQUES



## RESUME

Nous tentons dans ce chapitre de retracer l'histoire évolutive de quatre membres de la section *Beta* (*Beta vulgaris maritima*, *Beta vulgaris adanensis*, les formes diploïdes et tétraploïdes de *Beta macrocarpa*), un groupe d'espèce de la famille des Amaranthacées réparti le long des côtes européennes et nord-africaines.

Différentes approches méthodologiques complémentaires, basées sur des données de séquences chloroplastiques et nucléaires, ont été combinées afin d'évaluer les patrons de diversité génétique de chaque taxon d'une part et de reconstruire la phylogénie de la section en l'interprétant dans un contexte biogéographique d'autre part. Cette analyse a été conduite sur 33 individus *B.v. maritima*, 12 *B.v. adanensis* et 12 *B. macrocarpa* échantillonnés sur les aires de répartition respectives de chaque taxon.

L'étude chloroplastique a été menée sur quatre fragments d'une taille totale de 1906 pb (*trnL-trnF*, *trnD-trnT*, *trnH-psbA* et une grande partie de *matK*) dont 20 était variables et 11 informatives. Les relations ainsi établies entre les taxons sont concordantes quelle que soit la méthode de reconstruction phylogénétique employée.

Etant donnée la suspicion d'une évolution réticulée au sein de la section *Beta*, la comparaison de ces résultats chloroplastiques avec des données de séquences nucléaires s'est avérée nécessaire.

De grandes différences dans les niveaux de diversité ont été observées entre les espèces autogames (*B.v. adanensis* et *B. macrocarpa*) et allogame (*B.v. maritima*). Les deux jeux de données mettent en évidence d'étroites relations génétiques entre *B.v. maritima* et *B.v. adanensis* et une différenciation plus ancienne de *B. macrocarpa* diploïde. Cette dernière espèce montre des niveaux de diversité génétique étonnamment faible, quelles que soient les régions génomiques explorées. La forme tétraploïde de *B. macrocarpa* a été identifiée comme étant très probablement la conséquence d'une hybridation entre les espèces diploïdes *B.v. maritima* et *B. macrocarpa*.

## A. INTRODUCTION

Ces dernières décennies ont vu l'explosion de nouvelles techniques moléculaires d'investigation de la diversité génétique au niveau populationnel, et, pendant le même temps, de récentes avancées tel que la théorie de la coalescence génèrent des outils puissants pour l'analyse de données intraspécifiques.

Ces développements font des phylogénies intraspécifiques des outils de choix dans l'interprétation de processus évolutif agissant au niveau populationnel (Posada & Crandall, 2001). Les caractéristiques particulières des données de niveaux intraspécifiques trouvent leur traitement adéquat dans plusieurs méthodes phylogénétiques et notamment dans les approches par réseaux où les gènes dérivés coexistent avec les ancestraux qui persistent et où les événements de recombinaison sont identifiables par la réticulation du réseau.

Dans la section *Beta* trois espèces sont dénombrées : *Beta vulgaris* (regroupant les sous espèces *maritima*, *adanensis* et *vulgaris* (forme cultivée)), *B. patula* et *B. macrocarpa* (Letschert, 1993). L'étude détaillée ici est réalisée sur les sous-espèces sauvages de *Beta vulgaris* et à *B. macrocarpa* diploïde et tétraploïde qui ont été présentées dans le chapitre précédent.

Différents aspects de l'écologie de la section *Beta* ont été bien étudiés (voir par ex Ford-Lloyd, 1986; Letschert, 1993; Van Dijk *et al.*, 1997; Hautekèete *et al.*, 2001; Boudry *et al.*, 2002), mais relativement peu d'études se sont attardées sur les patrons de diversité génétique chez chaque espèce et sous-espèce proprement dites.

L'objectif principal de cette recherche a donc été l'analyse approfondie des relations au sein de la section et l'étude comparée des diversités nucléotidiques intra et interspécifiques.

Le génome chloroplastique possède une structure relativement stable, probablement grâce aux séquences répétées inversées (Palmer & Thompson, 1982) mais des variations de séquences d'ADN chloroplastiques apparaissent à des niveaux intra et interspécifiques et font de ce génome un outil de choix pour des études phylogénétiques et biogéographiques (Mummenhoff *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2003).

Etant donnée la suspicion d'une évolution réticulée au sein de la section *Beta*, la comparaison de ces résultats chloroplastiques (3747pb) avec des données de séquences nucléaires (1815pb) s'est avérée nécessaire.

Nous avons ainsi tenté de construire la phylogénie de la section et de retracer les processus évolutifs à l'origine des patrons de diversité et de structure génétiques actuels.

## B. MATERIEL ET METHODES

### B.I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les graines de betteraves proviennent du « Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants of Braunschweig », de l'Université de Birmingham et de la collection du laboratoire. Le détail du matériel biologique utilisé et de son origine figure dans le tableau 3. Un total de 33 individus de *B.v.maritima*, 12 de *B.v. adanensis* et 12 de *B. macrocarpa* (figure 21) a été analysé.

Tableau 3 : Localisation et origine du matériel biologique de l'étude

No	IDBBNR	O COUNTRY	DISTRICT/LOCATION	DONOR
<b><i>B. v. maritima</i></b>				
1	5905	IRL	SLIGO	BGRC
2	5915	GBR	NORTH YORKSHIRE	BGRC
3		GBR	RAMSGATE	GEPV
4		GBR	LAND'S END	GEPV
5		NL	ZWIN	GEPV
6		FR	ROSCOFF	GEPV
7		FR	CHARENTE	GEPV
8		FR	ERROMARDIE	GEPV
9		ESP	FOZ	GEPV
10		ESP	PUNTA FOUXEIRA	GEPV
11		ESP	PLAYA DE LA LANZADA	GEPV
12	7069	PRT	OBIDOS	BGRC
13	8550	MAR	CASABLANCA	BGRC
14	8560	MAR	ESSAOUIRA	BGRC
15	8556	MAR	SAFI	BGRC
16	6069	PRT	MADEIRA	BGRC
17		PRT	PONTA DO PARGO	GEPV
18		ESP	LOS ARENETES	GEPV
19		FR	BAGES:LEUCATES	GEPV
20	9452	ITA	TOSCANA	BGRC
21	9461	ITA	LAZIO	BGRC
22	2205	ITA	SICILY	BGRC
23	8615	MLT		BGRC
24	3542	TUN	SFAX	BGRC
25	415	TUN	BOR. DJILIDJ	BGRC
26	9481	ITA	VENETO	BGRC
27	6952	YUG	ISTRIA	BGRC
28	139	GRC	LEVKAS	BGRC
29	208	GRC	KHALKIDHIKI	BGRC
30		GRC	CRETE	GEPV
31		GRC	LESBOS	GEPV
32	9742	EGY	MATRUH	BGRC
33	8440	TUR	HATAY	BGRC
<b><i>B. v. adanensis</i></b>				
a1		GRC	SAMOS	GEPV
a2	3010	TUR	CANAKKALE	BGRC
a3		GRC	LESBOS	GEPV
a4	3016	TUR	IZMIR	BGRC
a5		GRC	CHIOS	GEPV
a6		GRC	KOS	GEPV
a7		GRC	KOKINOS	GEPV
a8	7119	CYP	PAPHOS	BGRC
a9	8462	TUR	AYDIN	BGRC
a10	3798	ISR	PHILISTEAN PLAIN	BGRC
a11	8623	IRN	KHOUZESTAN	BGRC
a12	8622	IRN	HORMOZGAN	BGRC
<b><i>B. macrocarpa</i></b>				
m1	1570	USA	CALIFORNIA	Birmingham
m2	1631	ESP	FUERTEVENTURA	Birmingham
m3	1571	ESP	TENERIFE	Birmingham
m4	8569	ESP	GRAN CANARIA, N	BGRC
m5	8549	MAR	DRIOUCH	BGRC
m6	1771	DZA	MOSTAGANEM	Birmingham
m7		GRC	CHIOS	GEPV
m8	1188	TUR	IZMIT	BGRC
m9	6371	GRC	KARPATOS	BGRC
m10	7127	CYP	LIMASSOL	GEPV
m11	4779	PRT	ALCOCHETE	GEPV
m12	2212	ESP	LA HOYA RUINES	GEPV

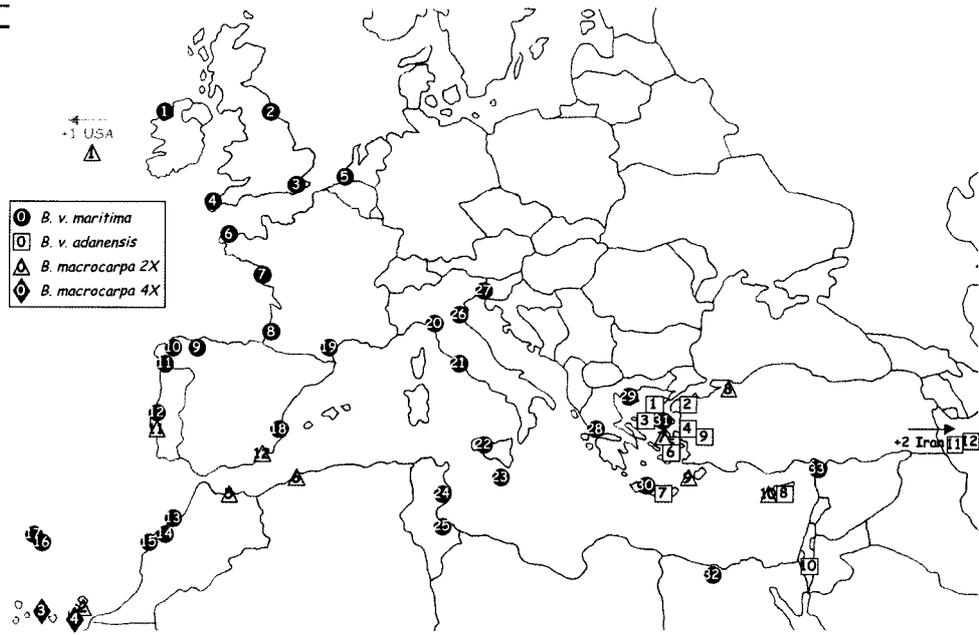


Figure 21 : Distribution des individus analysés

Les individus *B. v. maritima* sont figurés par des ronds noirs, *B. v. adanensis* par des carrés blancs, *B. macrocarpa* diploïdes par des triangles gris et *B. macrocarpa* tétraploïdes par des losanges gris foncé

La localisation de ces accessions a été choisie afin de couvrir au mieux les aires de répartition des différents taxons. Pour chaque site, l'ADN d'un seul individu a servi à l'étude.

Ce choix d'échantillonnage a été décidé afin d'appréhender la diversité totale de la section.

Toutefois cette stratégie empêchera de formuler des conclusions quant à la diversité intra-populationnelle.

**IDBBNR** : Numéro d'identification unique assigné à une accession par la Base de données Internationale pour la Betterave  
**BGRC** : Collection de la « Braunschweig Genetic Ressources Collection »  
**GEPV** : Graines du laboratoire GEPV, Lille  
**Birmingham** : Collection de l'université de Birmingham

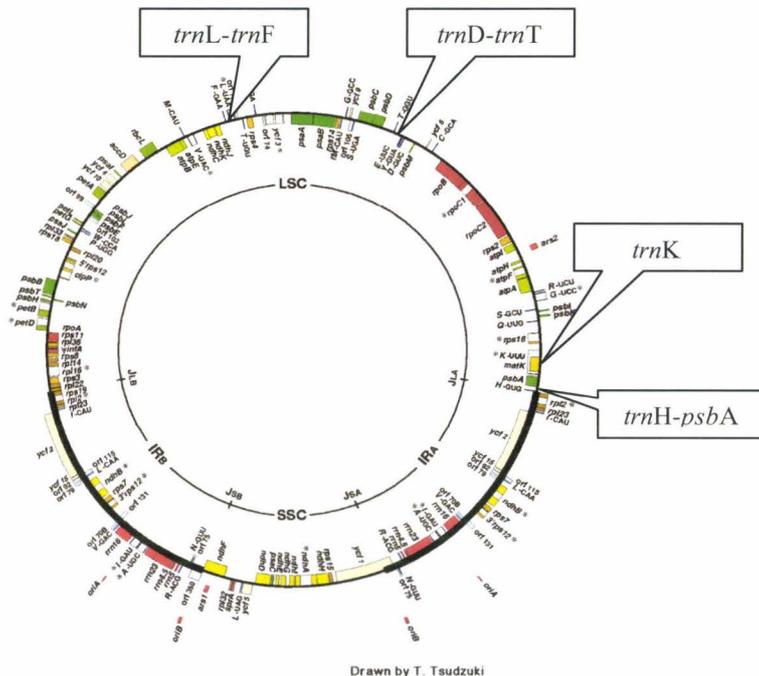
## B.II. PROTOCOLES

L'extraction d'ADN depuis les tissus de feuilles prélevées en serre et séchées à l'étuve (à 55°C) a été menée grâce à un kit Nucleospin®96Plant (Macherey-Nagel) sur un robot Microlab®Star (Hamilton).

### a) LES SEQUENCES CHLOROPLASTIQUES

Le choix des fragments chloroplastiques à séquencer s'est porté sur les régions décrites comme très polymorphes :

- une large partie de l'intron *trnK*, contenant l'exon *matK* (Olmstead & Palmer, 1994; Shi *et al.*, 2000), d'une taille totale de 1906 pb ;
- l'espaceur intergénique DT séparant les introns *trnD* et *trnT* (Grivet, 2002) d'une taille de 909 pb ;
- l'espaceur intergénique LF, compris entre *trnL* et *trnF* (Rova *et al.*, 2002; Zimmer *et al.*, 2002) de 300 pb ;
- la partie 5' de l'espaceur intergénique HK compris entre *trnH* et *psbA* (Ingvarsson & Taylor, 2002) long de 600 pb.



**Figure 22 : Localisation des fragments séquencés**

Le schéma a été repris de celui du génome chloroplastique du tabac.

Ces séquences sont localisées dans la grande région simple copie (LSC) du génome chloroplastique (Schinozaki *et al.*, 1986) (figure 22).

Un tableau en annexe A recense les amorces utilisées pour chaque fragment.

Les amplifications d'ADN par PCR ont été réalisées dans un volume de 100µL contenant 20µL d'échantillon d'ADN (25ng/µL), 10 µL de tampon 10X (Perking-Elmer, Norwalk, CT, USA), 0.2µM de chaque amorce, 200 µM de chaque dNTP et 0.625 U/µL de Taq polymérase (AmpliTaq, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

Des conditions standard de PCR ont été utilisées pour amplifier l'ADN.

Les produits PCR de taille comprise entre 100 et 10 000 pb sont ensuite purifiés avec un kit QIAquick PCR Purification (QUIAGEN®) ou avec un kit PCR clean-up Gel extraction Nucleospin®ExtractII (Macherey-Nage).

La réaction de séquence a nécessité un kit big Dye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing et son tampon de dilution (Applied Biosystems). Les séquences ont été générées sur un séquenceur automatique ABI 3100 (Applied Biosystems).

## b) LES SEQUENCES NUCLEAIRES

De même que pour les séquences chloroplastiques, le choix des régions génomiques nucléaires séquencées s'est porté sur des gènes largement utilisés dans les études phylogénétiques:

- Adh (Alcohol dehydrogenase) (Yokoyama & Harry, 1993; Clegg *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1999; Wendel, 2000; Fukuda *et al.*, 2005) d'une taille de 349 pb ;
- Cab5 (Chlorophyl a/b binding protein) (Demmins *et al.*, 1989; Stahl *et al.*, 2004) longue de 797 pb ;
- et les 3 régions de l'ADN ribosomique ITS 1 et ITS 2 (Internal Transcribed Spacers) et la sous unité 5,8S (figure 23) (par exemple Baldwin *et al.*, 1995; Hershkovitz & Zimmer, 1996; Shen *et al.*, 1998b; Neves & Watson, 2003; Levin *et al.*, 2005) d'une taille totale de 669pb.

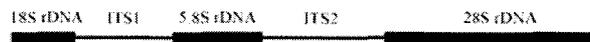


Figure 23 : Représentation schématique de la région de l'ADN ribosomique ITS (Internal Transcribed Spacer) chez les organismes eucaryotes

Cette dernière région a au moins un double intérêt : d'une part elle s'est montrée d'une grande utilité dans l'exploration des relations évolutives à des niveaux taxonomiques très bas, notamment au niveau intra-genre (Baldwin *et al.*, 1995), mais aussi dans l'identification de l'origine hybride des espèces polyploïdes chez les Angiospermes (van Houten *et al.*, 1993; Kim & Jansen, 1994; Wendel *et al.*, 1995; Roelofs *et al.*, 1997).

Les produits PCR ont été directement séquencés dans le cas des espèces autogames diploïdes *B.v. adanensis* et *B. macrocarpa*. Pour l'allogame *B.v. maritima* et l'allotétraploïde *B. macrocarpa*, les produits PCR ont été clonés grâce à un kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, Carlsbad, CA) avant leur séquençage. Un minimum de six clones a été séquencé afin de faire la part des choses entre le polymorphisme d'haplotypes et les erreurs générées par la polymérase lors de la PCR.

### **B.III. ANALYSES PHYLOGENETIQUES**

Les séquences nucléotidiques ont été alignées par le logiciel BIOEDIT v 7.0 (Hall, 1999), et vérifiées visuellement.

*DNASP* v. 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) a permis d'obtenir les différentes valeurs de polymorphisme pour chaque taxon.

Les analyses phylogénétiques des séquences d'ADN nucléaires et chloroplastiques ont été effectuées séparément.

#### a) L'ETUDE DES SEQUENCES CHLOROPLASTIQUES

Typiquement, les données intraspécifiques montrent des séquences très similaires, certaines pouvant être ancestrales, et leurs relations phylogénétiques sont parfois plus clairement représentées par un réseau (Posada & Crandall, 2001; Caicedo & Schaal, 2004). Cela peut être notamment le cas pour l'étude de séquences chloroplastiques car l'information peut se trouver limitée par le faible niveau de variation du génome chloroplastique et le taux d'évolution relativement lent (Schaal *et al.*, 1998; Ennos *et al.*, 1999; Avise, 2000; Schaal & Olsen, 2000).

Nous avons donc reconstruit une généalogie d'haplotypes chloroplastiques avec le programme TCS v. 1.13 (Clement *et al.*, 2000). Les connections ambiguës dans ce réseau ont été résolues en utilisant des approches de parcimonie maximale.

#### b) L'ETUDE DES SEQUENCES NUCLEAIRES

Etant donné que les séquences nucléaires sont sujettes à hétérozygotie et montrent des niveaux de diversité plus élevés, il a été préféré un traitement de ces données sous forme plus traditionnelle d'arbres, ceci permettant d'exploiter ainsi deux approches complémentaires pour un même échantillon d'individus. Chaque individu est donc identifié par une séquence consensus issue des deux allèles qu'il héberge afin de tracer une phylogénie d'individus et non d'haplotypes (dans le cas de séquences chloroplastiques une telle distinction n'a pas lieu d'être du fait de l'hérédité uniparentale du génome chloroplastique).

Les analyses de Parcimonie Maximale (MP) et Vraisemblance Maximale (ML) sont menées avec le logiciel PAUP\* version 4.0b10 (Swofford, 2002)

L'algorithme de Neighbor-Joining (NJ) a été choisi afin de reconstruire un arbre phylogénétique à partir des distances de Maximum de Vraisemblance (ML). Dans les analyses de Maximum de Parcimonie (MP), les phylogénies sont reconstruites selon le critère de parcimonie de Fitch (Fitch, 1971) (= états de caractère non ordonnés, poids égaux).

Le codage des « gaps » en tant que cinquième état de caractère a été préféré à celui d'un traitement comme donnée manquante car les indels (insertion-délétion) se révèlent très informatifs. Les recherches des arbres les plus parcimonieux ont été réalisées avec les options « random stepwise additions followed by tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping » et « MULPARS ». L'option « ACCTRAN » a servi à l'optimisation des caractères.

En plus de la mesure standard de concordance entre les caractères et les arbres produits (Consistency Index (CI) (Kluge & Farris, 1969) et Retention Index (RI) (Farris, 1989)), la fiabilité des branches individuelles des arbres a été estimée par « fast bootstrapping » (Felsenstein, 1985) avec 1000 répliqués.

Pour les analyses de Maximum de Vraisemblance (ML), des séries hiérarchiques de tests, disponibles dans le programme MODELTEST v. 3.06 (Huelsenbeck & Rannala, 1997), ont été conduits afin d'identifier le modèle de substitution nucléotidique approprié.

## C. RESULTATS

### C.I. DIVERSITE GENETIQUE DANS LA SECTION BETA

#### a) LE POLYMORPHISME CHLOROPLASTIQUE

La totalité du jeu de données chloroplastiques (3747 pb), concernant toute la section *Beta*, contient 20 sites polymorphes dont 11 sont informatifs. La proportion de bases GC (33%) est concordante avec les proportions généralement observées sur des fragments chloroplastiques. Les estimations de diversité nucléotidiques (Pi) et de diversité haplotypique (Hd) sont détaillées dans le tableau 4 ci-dessous.

**Tableau 4 : Polymorphisme d'haplotypes**

Pour chaque site nucléotidique polymorphe (la position est notée au dessus des séquences), l'état du nucléotide observé (A, T, C ou G) pour chaque accession est donnée par rapport à la séquence de *B. v. maritima* la plus commune. Les préfixes « a » ou « m » respectivement identifient les individus *B.v. adanensis* et *B. macrocarpa* (2X et 4X). Un nombre sans préfixe est utilisé pour *B.v. maritima*.

Position sur le fragment (après l'amorce) ▶	<i>trnK1-trnK2</i>										<i>trnL-trnF</i>					<i>trnD-trnT</i>			<i>trnH-psbA</i>	
	54-66	181	294	318	812	1212	1416	1499	1768	85	118	124	125-130	139	137	239-248	443	909	199	550
<b>Identifiants</b>	(A) <sub>12</sub>	T	G	A	C	G	A	C	G	C	G	G	(T) <sub>5</sub>	C	TTT	(A) <sub>6</sub>	A	C	G	G
2, 5, 7, 12, 16, 17, 25, 28, 29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1, 20	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15, 22	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A	.
3, 6, 10, 13, 14	(A) <sub>15</sub>	.	.	.	.	.	G	.	.	.	T	.	.	AAA	.	.	.	.	.	.
24	(A) <sub>14</sub>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	(T) <sub>6</sub>	.	AAA	(A) <sub>10</sub>	.	.	.	.	.
26	(A) <sub>14</sub>	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	(T) <sub>6</sub>	.	AAA	(A) <sub>10</sub>	.	.	.	.	.
21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	AAA	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	AAA	.	.	.	G	.	.
11	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.	.	AAA	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.	.	AAA	.	.	G	.	.	.
19	(A) <sub>15</sub>	.	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.	T	AAA	.	.	.	.	.	.
23	(A) <sub>13</sub>	C	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.	.	AAA	.	.	.	.	.	.
33	(A) <sub>13</sub>	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27, 31, a1, a3, a5, a6, a7, a8, a10, a11	(A) <sub>13</sub>	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
a2	(A) <sub>13</sub>	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
a4	(A) <sub>13</sub>	.	.	.	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
a9	(A) <sub>13</sub>	.	.	A	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30, m3, m4	(A) <sub>13</sub>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
m1, m2, m5, m6, m7, m8, m11, m12	(A) <sub>11</sub>	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
m10	(A) <sub>11</sub>	.	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
m9	(A) <sub>11</sub>	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A
Taille séquencée (pb)	1906										300					911			630	
Nombre d'haplotypes, h	9										5					4			3	
Diversité haplotypique, Hd	0,813±0,00065										0,670±0,00097					0,399±0,00477			0,323±0,00464	
Diversité nucléotidique (par site), Pi	0,00067										0,00288					0,00051			0,00052	

Selon les fragments, la diversité nucléotidique ( $Pi$ ) passe d'une valeur de 0,00051 pour l'espaceur intergénique *trnD-trnT* à une valeur de 0,00288 pour *trnL-trnF* alors que la diversité haplotypique ( $Hd$ ) varie de 0,323 pour l'espaceur *trnH-psbA* à 0,813 pour *K1K2* (mais cette diversité est liée aussi à la taille du fragment séquencé).

La majorité du polymorphisme observé est due à des substitutions nucléotidiques, aucune grosse insertion ou délétion n'est mise en évidence.

#### b) LE POLYMORPHISME NUCLEAIRE

La diversité nucléotidique totale varie selon les fragments avec une diversité nucléotidique pour *Cab5* (0,00823) environ deux fois celles des séquences d'*Adh* et d'*ITS* (respectivement 0,00411 et 0,00471). La diversité haplotypique est elle aussi la plus élevée sur *Cab5* (0,892), comparable à la diversité haplotypique chloroplastique (tableau 5).

Les séquences de *Adh* ont une taille de 349 pb. Pour la totalité de la section, ces séquences contiennent un total de 10 sites ségrégeants définissant 11 haplotypes distincts pour une diversité haplotypique totale de 0,749 et une diversité nucléotidique de 0,00413.

Les séquences de *Cab5* sont longues de 797 pb et hébergent un total de 35 sites polymorphes. 28 haplotypes différents sont dénombrés menant à une diversité haplotypique de 0,892 et une diversité nucléotidique de 0,00823.

Les séquences des espaceurs intergéniques *ITS* ont une longueur totale de 669 pb dont 11 sites polymorphes définissant 4 haplotypes pour une diversité haplotypique de 0,650 et une diversité nucléotidique de 0,00471.

L'analyse de ces différentes séquences a révélé que la plupart des sites variables sont situés dans les introns (figure 24).

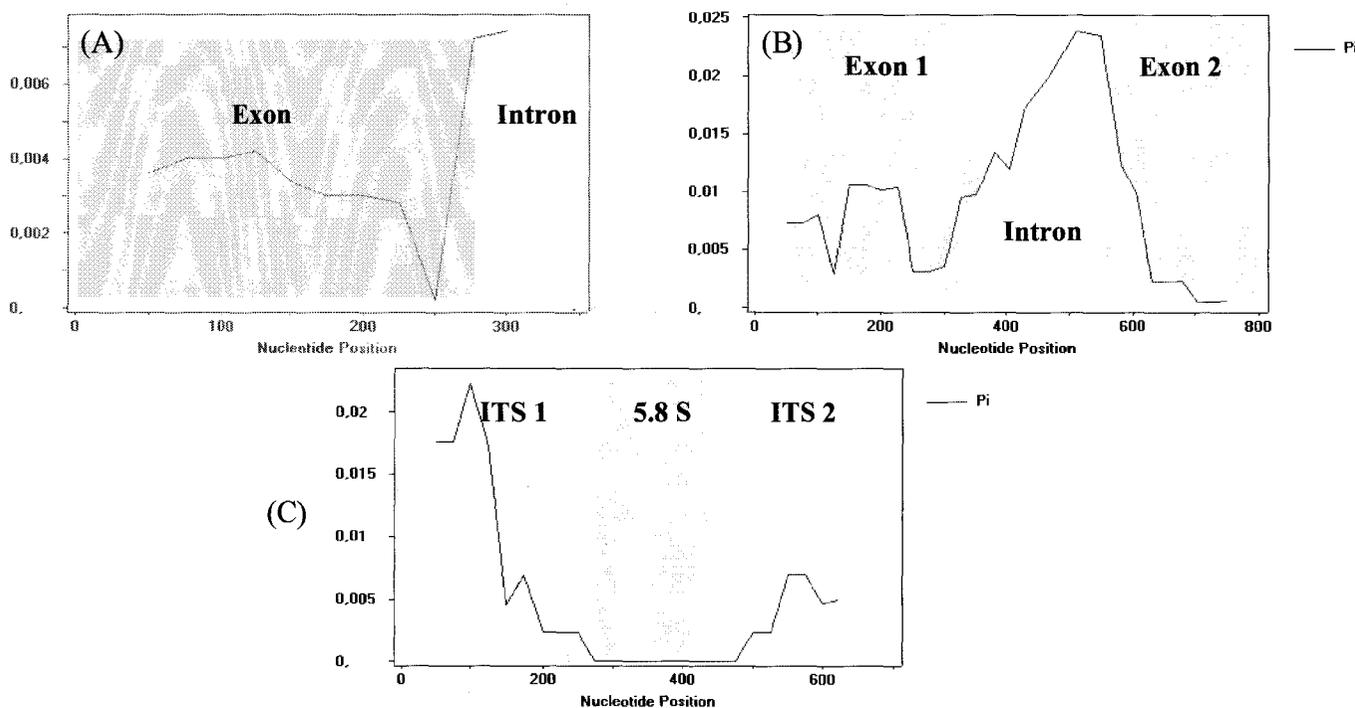


Figure 24 : Diversité nucléotidique le long des fragments nucléaires (respectivement (A) *Adh*, (B) *Cab5* et (C) *ITS*)

De profondes différences en termes de niveaux de diversité entre les taxons autogames (*B.v. adanensis* et *B. macrocarpa*) et allogame (*B.v. maritima*) sont observés (tableau 5) et concordent avec les attendus théoriques.

**Tableau 5 : Diversité nucléotidique chloroplastique et nucléaire des espèces diploïdes de la section**

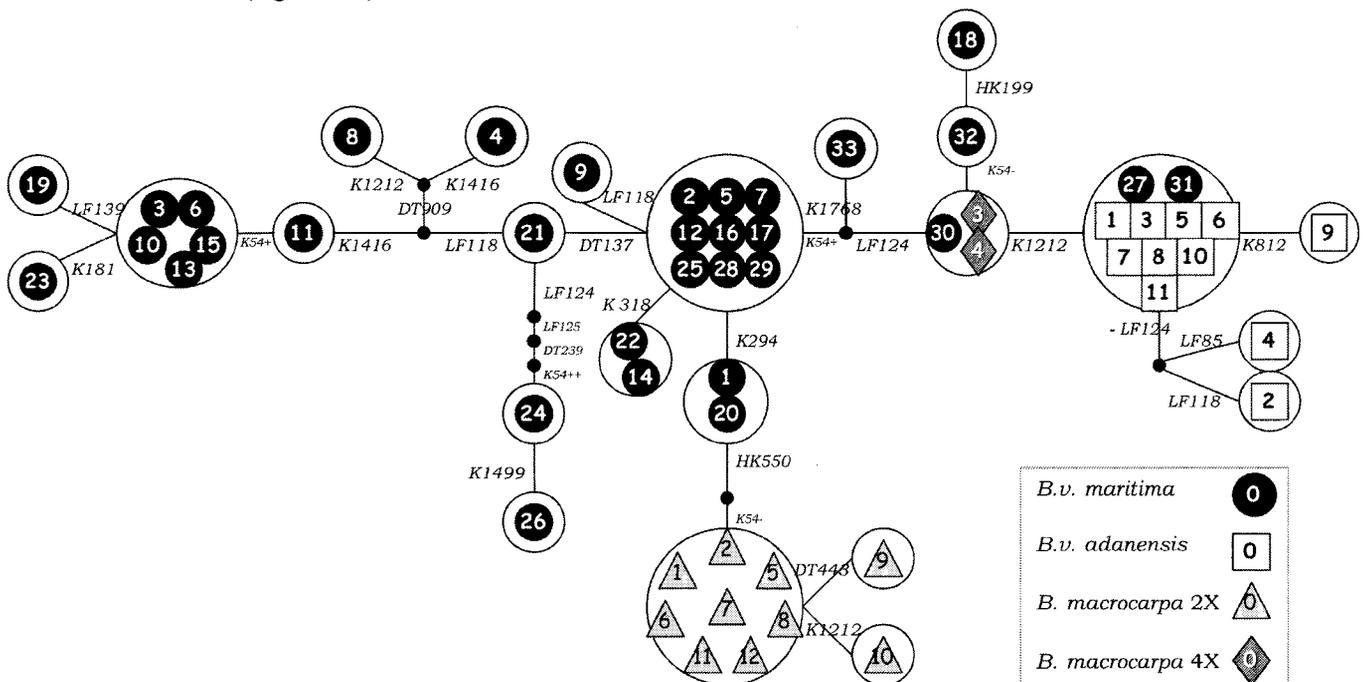
	total cpDNA			<i>Adh</i>			<i>Cab5</i>			<i>ITS</i>		
	h	Hd	Pi	h	Hd	Pi	h	Hd	Pi	h	Hd	Pi
<i>B. v. maritima</i>	18	0.896±0.038	0.00097	9	0.398±0.078	0.00126±0.00028	26	0.940±0.014	0.00970±0.00053	2	0.507±0.012	0.00228±0.00005
<i>B. v. adanensis</i>	5	0.576±0.163	0.00026	2	0.522±0.030	0.00149±0.00009	1	0	0	2	0.391±0.091	0.00058±0.00014
<i>B. macrocarpa</i>	3	0.378±0.181	0.00011	1	0	0	1	0	0	1	0	0

L'espèce tétraploïde ne figure pas dans le tableau ci-dessus car seuls deux individus ont servi à cette étude. Le chapitre 4, par contre, s'attardera à détailler la diversité génétique originale de cette espèce avec un échantillonnage plus étendu.

## C.II. RECONSTRUCTION DE LA PHYLOGENIE DE LA SECTION

### a) LE RESEAU D'HAPLOTYPES CHLOROPLASTIQUES

Un réseau d'haplotype a été construit à la main en utilisant le principe de parcimonie statistique et a été confirmé par les résultats obtenus avec le programme TCS (Clement *et al.*, 2000). Un total de 24 haplotypes relativement proches les uns des autres a ainsi pu être décrit dans la section (figure 25).



**Figure 25: Réseau d'haplotypes chloroplastiques de la section Beta**

### **B.v. maritima :**

Les haplotypes les plus anciens sont souvent les plus courants et ceux que l'on retrouve sur une large distribution géographique. Ces haplotypes ancestraux, lorsqu'ils sont représentés dans le réseau, se situent en général plus à l'intérieur du réseau que les haplotypes qui leur sont dérivés (Donnelly & Tavaré, 1986; Crandall & Templeton, 1993; Schaal *et al.*, 1998; Schaal & Olsen, 2000).

D'après ce critère, il est possible d'identifier un haplotype ancestral de *B.v. maritima* dont la répartition géographique étendue et la position au centre du réseau suggèrent qu'il était présent dans une population ancestrale et qu'il aurait pu s'étendre vers de nouvelles aires lors de phénomènes d'expansions géographiques (cette analyse est développée dans le chapitre suivant).

Cette topologie est concordante avec celle qui avait été réalisée par Fénart *et al.* (2006) sur 25 chlorotypes de *B. vulgaris ssp.* en relation avec leurs mitotypes respectifs. L'haplotype ancestral à large distribution identifié dans notre étude correspond à celui qui avait été décrit comme très fréquent et de type *Nvulg* dans cette étude antérieure.

### **B.v. adanensis :**

La configuration du réseau étaye l'hypothèse d'une proche relation génétique entre *B.v. adanensis* et *B.v. maritima*, du fait du partage d'un haplotype en commun. Les accessions de *B.v. maritima* impliquées dans ces similitudes d'haplotypes sont rencontrées dans l'est du bassin méditerranéen.

Plusieurs hypothèses quant à l'origine et la dynamique de *B.v. adanensis* sont énoncées dans la discussion de cette étude (cf D.II).

### **B.macrocarpa 2X (=diploïdes):**

Chez *B. macrocarpa*, dont la différenciation par rapport aux autres espèces de la section paraît ancienne, un haplotype majeur a été identifié, distribué depuis l'île canarienne de Fuerteventura jusqu'en Turquie. La diversité génétique de cette espèce est étonnamment faible (tableau 5) malgré une répartition géographique très étendue des individus.

Une mutation diagnostique sur le fragment *trnH-psbA* (au site « HK 550 ») permet, par ailleurs, de différencier les individus *Beta vulgaris ssp.* des individus *Beta macrocarpa 2X*.

### **B.macrocarpa 4X (=tétraploïdes):**

Etant donné que la transmission maternelle de l'ADN chloroplastique a été mise en évidence chez la majorité des Angiospermes, le parent qui transmet l'ADN chloroplastique à l'hybride est très probablement le parent maternel (Corriveau & Coleman, 1988; Harris & Ingram, 1991; Mogensen, 1996).

Les deux individus *B. macrocarpa 4X* de l'étude partagent le même haplotype chloroplastique que des individus *B. v. maritima*, ce qui suggère fortement que cette dernière espèce est probablement le parent maternel à l'origine de l'espèce hybride *B. macrocarpa 4X*.

## b) LES ARBRES PHYLOGENETIQUES

Au total, 1815 pb des trois gènes nucléaires ont été séquencés : 349 pb de *Adh*, 797 pb de *Cab5* et 669 pb de *ITS*. Le modèle d'évolution de ces séquences identifié par le logiciel MRMODELTEST v. 2.2 (Nylander, 2004) pour tous les fragments et incorporé aux recherches de Maximum de Vraisemblance (ML) a été : GTR+G+I.

Les proportions de nucléotides ainsi que le bilan des statistiques des analyses de Maximum de Parcimonie (MP) pour chaque jeu de données sont décrits dans le tableau 6. Les indices de cohérence (*consistency index* CI), l'indice des homoplasies (*homoplasy index* HI), l'indice de rétention (*retention index* RI) et le produit de l'indice de cohérence et de l'indice de rétention, le *rescaled consistency index* (RC) ont été développés afin de mesurer le taux d'homoplasie et d'évaluer la confiance que l'on peut avoir dans un arbre.

L'indice des homoplasies varie de 0 (pas d'homoplasie) à 1 (beaucoup d'homoplasie), l'indice de cohérence est un indice similaire sommé sur tous les caractères et celui de rétention mesure le degré de synapomorphie des arbres de 0 à 1.

**Tableau 6 : Résultats des analyses de MP et ML**

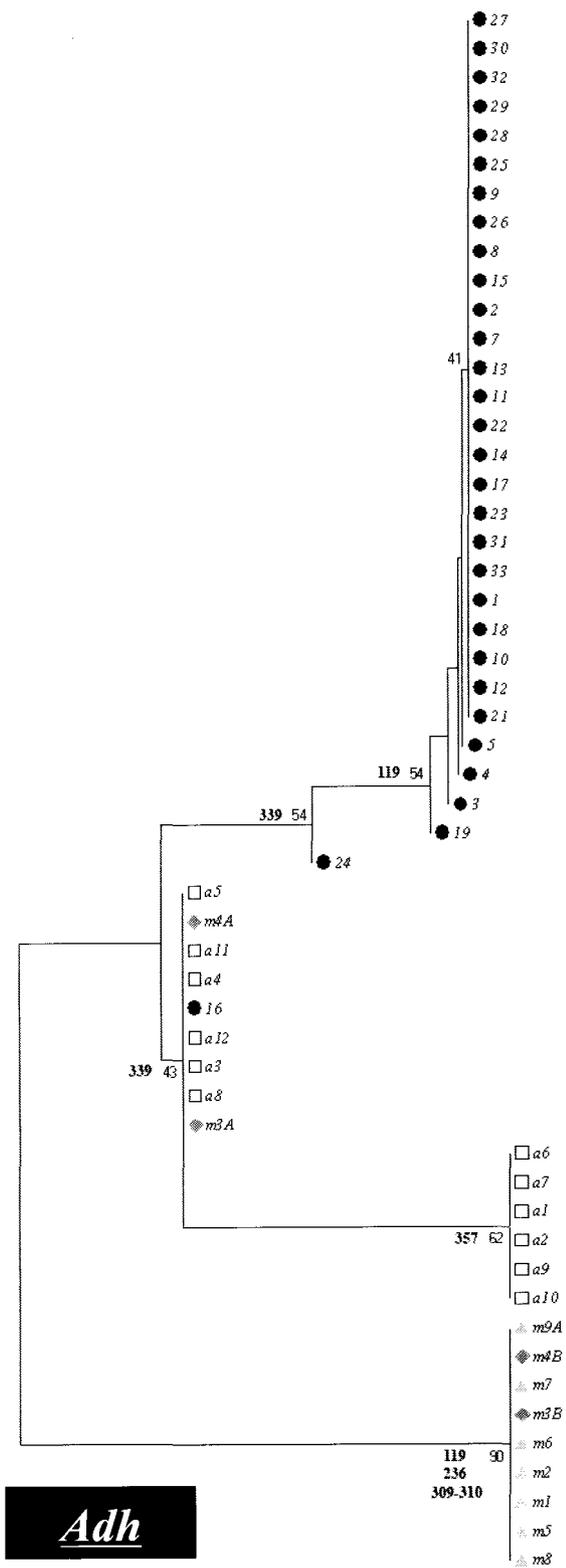
Analyses de MP	Adh	Cab5	ITS
Nombre de caractères informatifs	6	35	12
Indice de cohérence (CI)	0.692	0.894	0.943
Longueur de l'arbre	26	284	35
Indice de rétention (RI)	0.833	0.892	0.982
Indice d'homoplasie (HI)	0.5	0.665	0.657
<i>Rescaled consistence index</i> (RC)	0.577	0.798	0.926

Analyses de ML	GTR+G+I	GTR+G+I	GTR+G+I
Modèle sélectionné par MrModeltest (AIC criteria)	GTR+G+I	GTR+G+I	GTR+G+I
Meilleure Score (-ln L)	500,695	1387,223	996.694
Proportions nucléotidiques	A=0.27	A=0.28	A=0.23
	C=0.18	C=0.20	C=0.28
	G=0.23	G=0.22	G=0.30
	T=0.32	T=0.30	T=0.20

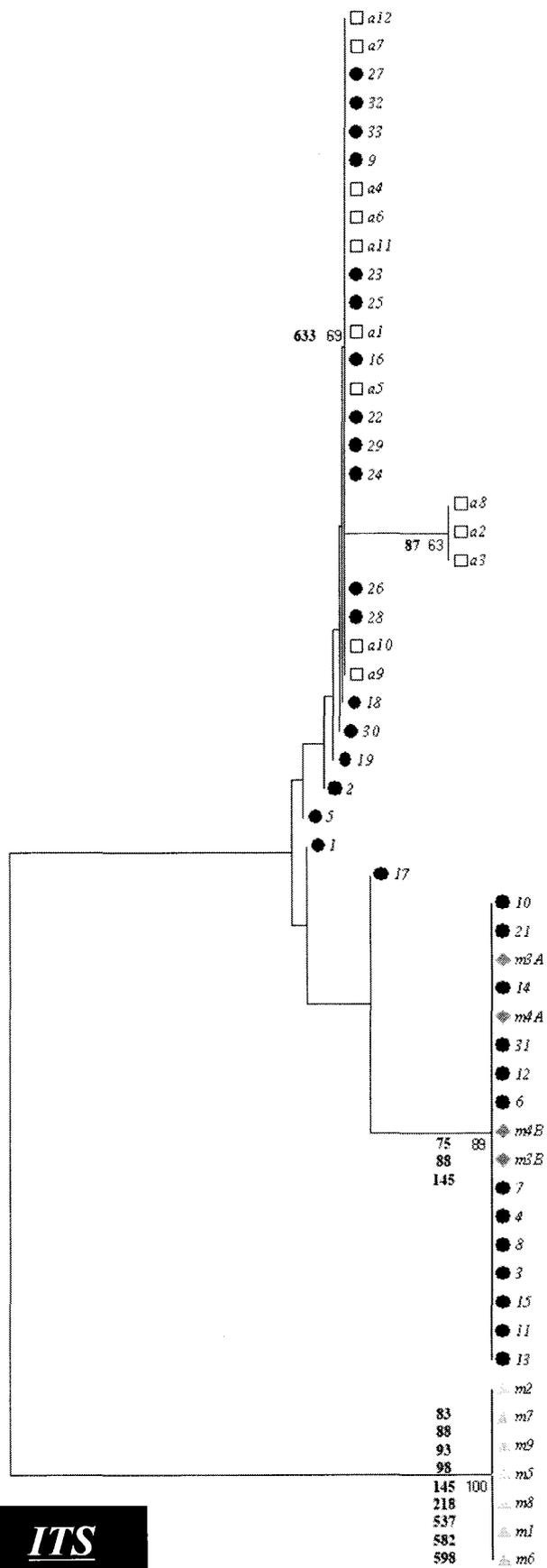
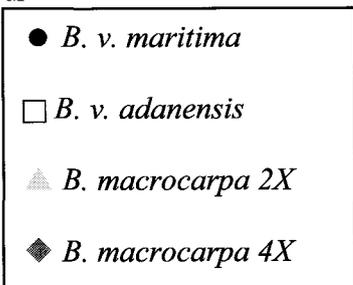
La comparaison des arbres phylogénétiques générés depuis les données de *Adh*, *Cab5* et *ITS* sont présentées dans la figure 26. Pour chaque analyse, l'arbre est enraciné avec *B. macrocarpa* étant donné que les précédentes études suggèrent fortement que cette espèce est un taxon basal dans la section *Beta*. La résolution et la puissance des nœuds des arbres sont plus faibles chez *Adh* et *ITS* par rapport à *Cab5* du fait de la quantité réduite de sites informatifs dans ces jeux de données.

Les topologies sont relativement similaires : un premier clade est défini par tous les individus *B. macrocarpa* 2X et présente très peu de polymorphisme. Un deuxième clade, le plus diversifié n'inclut que des individus *B.v. maritima*. Un troisième est composé exclusivement d'individus *B.v. adanensis* et le dernier contient à la fois des échantillons de *B.v. adanensis* et de *B.v. maritima* à répartition géographique généralement est-méditerranéenne.



***Adh***

0.2



***ITS***

1



**Figure 26 : Arbres de NJ (en ML) obtenus respectivement avec les séquences d'*Adh*, *ITS* et *Cab5***

Les valeurs de bootstrap supérieures à 10 sont indiquées à proximité des nœuds qu'ils soutiennent. Les valeurs en gras (indiquées pour *Adh* et *ITS*) proches des bootstraps précisent les positions des mutations qui « créent » cette divergence de branches par rapport au génotype le plus courant (cf annexe B pour le détail). Le fragment de *Cab5* étant beaucoup plus polymorphes, cette notation supplémentaire n'est pas aisée.

Pour *B. macrocarpa* 4X, les analyses mettent en évidence l'origine hybride de l'espèce : les régions d'*Adh* et *Cab5* montrent que les séquences des deux espèces parentales ont été maintenues avec un allèle que l'on retrouve dans le clade des *B. macrocarpa* 2X et l'autre dans celui des *B. v. maritima*.

Par contre, pour la région des *ITS*, les séquences des allotétraploïdes ont été homogénéisées, suggérant une évolution concertée. Seules sont identifiées des séquences proches de celles de *B. v. maritima*. Cette évolution concertée (Arnheim, 1983; revue dans Elder & Turner, 1995) apparaît quand les différences de séquences entre des copies réitérées dans le génome qui devraient accumuler leurs propres mutations, s'homogénéisent par des mécanismes tels des crossing-over inégaux en grande fréquence ou de la conversion génique. Il est d'autre part à noter que chez l'allotétraploïde, l'allèle d'origine maternelle est souvent retrouvé à proximité génétique des allèles de *B. v. maritima* marocaines.

## D. DISCUSSION

Les différents arbres phylogénétiques et réseaux d'haplotypes obtenus dans cette étude sont en accord avec les taxonomies publiées sur la section (Letschert, 1993; Shen *et al.*, 1998a; Lange *et al.*, 1999; Fénart *et al.*, 2006; Hohmann *et al.*, 2006) au regard des relations interspécifiques des taxons qui la composent et leur ajoutent une dimension géographique et historique.

### **D.I. B.V. MARITIMA**

*B. v. maritima* montre les plus hauts niveaux de diversité de la section. Cela est probablement associé d'une part à sa longue histoire évolutive qui a permis aux mutations génétiques de s'accumuler au sein des populations et d'autre part à son système allogame de reproduction propice à la formation de nouvelles combinaisons génétiques.

Cette première étude a eu pour but d'estimer les degrés de variabilité génétique au sein des espèces de la section et de mettre en évidence les affinités géographiques et génétiques entre taxons. Mais à la vue de ces résultats, une étude plus approfondie de *B. v. maritima* s'est montrée nécessaire.

Un échantillonnage un peu plus dense, notamment en région méditerranéenne, et des marqueurs moléculaires supplémentaires, ont permis de conduire une recherche phylogéographique sur cette espèce afin de mettre en évidence les facteurs responsables de sa répartition géographique actuelle et de sa diversité génétique. Cette recherche est développée dans le chapitre suivant.

## **D.II. B.v. ADANENSIS**

Ce taxon montre de faibles niveaux de polymorphisme tant au niveau chloroplastique que nucléaire qui peuvent refléter à la fois une récente différenciation de cette sous-espèce depuis un nombre limité de fondateurs et les effets différents du système de reproduction autogame par rapport à celui, allogame, de *B.v. maritima*.

Les deux sous-espèces *B.v. maritima* et *B.v. adanensis* sont peu différenciées taxonomiquement d'après les données allozymatiques de Letschert (1993). Nos données de séquences le confirment.

Deux causes sont suggérées :

- la structure du réseau d'haplotypes et les arbres phylogénétiques pourraient être la signature d'une récente différenciation de *B.v. adanensis* à partir d'individus de *B.v. maritima* situés dans le bassin méditerranéen oriental. Dans ce cas, c'est une hypothèse de spéciation sympatrique qui est considérée.
- une autre hypothèse est qu'une (ou quelques) population de *B.v. maritima* aurait pu se trouver isolée dans un refuge balkanique pendant les ères glaciaires, peut-être suffisamment longtemps pour que la spéciation puisse s'initier. Une proto subséciation de *B.v. adanensis* aurait ainsi débuté. Mais si les flux de gènes entre les deux sous-espèces réapparaissent avant que la spéciation soit complète, les deux formes différenciées peuvent à nouveau s'hybrider. Dans ce cas le processus de spéciation n'aurait pas été achevé en allopatrie et le devenir des deux sous-espèces dépendrait de l'issue de leur interaction en situation de sympatrie.

Nos données actuelles ne sont pas suffisantes pour se situer dans la dynamique du processus en cours dans cette région. Est-ce le début d'une spéciation de *B.v. adanensis* depuis *B.v. maritima* en situation de sympatrie ou au contraire un contact secondaire entre deux formes qui n'auraient pas suffisamment divergé en allopatrie pour être totalement isolées sur le plan reproductif ?

*B.v. maritima* est allogame et autoincompatible tandis que *B.v. adanensis* est décrite comme autogame mais des croisements naturels entre ces deux sous-espèces ont déjà été mentionnés à plusieurs reprises. Nos résultats vont aussi dans le sens d'hybridations récurrentes entre ces deux sous-espèces.

Des investigations plus complètes de cette zone géographique ainsi qu'une analyse des barrières pré et post-zygotiques seraient dès lors très utiles. La possibilité d'hybridation entre ces taxons peut en effet promouvoir un contexte de renforcement de l'isolement prézygotique dans les zones de sympatrie.

D'autre part, même en cas de rares événements d'hybridation, les deux formes n'en formeront à terme qu'une si les hybrides ne sont pas contre sélectionnés. Une autre issue serait l'extinction progressive de l'une ou l'autre espèce, probablement dans notre cas de *B.v. adanensis* étant donnée sa plus faible aire de distribution.

Une cartographie des zones hybrides pourrait apporter des informations quant à l'origine et à la dynamique de *B.v. adanensis* en mer Egée.

### **D.III. B. MACROCARPA DIPLOÏDE**

Malgré une aire de distribution étendue, *B. macrocarpa* 2X montre de très faibles niveaux de polymorphisme. Cela peut refléter une diversité génétique effectivement très limitée ou une limitation due aux marqueurs génétiques utilisés. Afin d'éviter ce biais dû aux marqueurs, nous avons utilisé un panel de marqueurs complémentaires et indépendants : 4 fragments chloroplastiques ( $\pi=0.00011$ ) et trois fragments de gènes nucléaires ( $\pi=0$  pour chaque fragment). Dix marqueurs microsatellites nucléaires et quatre marqueurs minisatellites mitochondriaux ont révélé des résultats identiques (résultats non décrits ici).

Une raison probable de cette faible diversité génétique serait l'existence d'évènements démographiques ayant affecté l'histoire évolutive de *B. macrocarpa* 2X. Un goulet d'étranglement auquel aurait succédé une expansion géographique rapide est ainsi suggéré par nos résultats et supporté par l'aire de répartition très étendue de l'espèce. Néanmoins, ces très faibles niveaux de polymorphisme inhabituels pourraient être, en partie, attribués à la stratégie et au biais d'échantillonnage car seuls douze individus répartis sur le pourtour méditerranéen sont pris en compte dans l'étude.

Étant données la densité de population de *B. macrocarpa* en Espagne et les situations récurrentes de sympatrie avec *B.v. maritima* rencontrées, il a été décidé de mener une étude populationnelle sur près de 1000 individus de la section dans cette péninsule. Ces résultats font l'objet du troisième chapitre de ce mémoire.

D'autre part, alors que n'était décrit aux Canaries que le type tétraploïde de *B. macrocarpa*, cette étude met en évidence la présence inattendue d'individus *B. macrocarpa* diploïdes. Les interactions entre ces deux types et leurs proportions relatives dans les îles canariennes sont inconnues et ont donc fait l'objet d'une investigation plus poussée.

### **D.IV. B. MACROCARPA TETRAPLOÏDE : UNE NOUVELLE ESPECE?**

Les deux accessions tétraploïdes canariennes de l'étude partagent leur haplotype chloroplastique avec des individus *B.v. maritima* ce qui suggère une origine hybride de ces accessions 4X issue de la fécondation d'individus *B.v. maritima* par du pollen de *B. macrocarpa* 2X. Cette origine génétique est confirmée par les données de séquences nucléaires qui apportent par ailleurs une information quant à l'origine géographique putative de l'hybridation en identifiant une proximité génétique de l'allèle maternelle des allotétraploïdes avec des allèles de *B.v. maritima* situés en Macaronésie et au Maroc.

Les conséquences génomiques de la polyploïdie, et particulièrement de l'allopolyploïdie ne sont pas entièrement connues (Song *et al.*, 1995; Osborne *et al.*, 2003). Bien qu'un des avantages présumé de l'allopolyploïdie soit la diversité génétique associée à l'hétérozygotie fixée des locus homéologues, le devenir de ces locus après polyploïdisation peut être complexe et impliquer des phénomènes tels que des régulations épigénétiques de l'expression des gènes (Lee & Chen, 2001) ou la perte complète d'un des allèles homéologues (revues de Soltis & Soltis, 1999; Wendel, 2000; Pikaard, 2001).

Un phénomène d'évolution concertée opère apparemment dans le génome de *B. macrocarpa* 4X étant donné le haut degré d'homogénéité des séquences d'*ITS* chez cette espèce et la similarité avec le parent maternel *B.v. maritima*.

Cette proximité « phylogénétique » entre les séquences d'*ITS* de l'hybride avec l'espèce parentale maternelle a aussi été démontrée chez d'autres espèces dont *Begonia taipeiensis*, hybride naturel entre *B. formosa* et *B. aptera* à Taïwan (Chiang *et al.*, 2001). Il est toutefois à noter que différentes études sur le devenir des locus de l'ADN nucléaire après polyploïdisation ont montré un grand nombre de patrons d'évolution, depuis le maintien des deux allèles homéologues (ex chez *Peonia*, Sang *et al.*, 1995) jusqu'à la disparition rapide d'un allèle ou l'homogénéisation interlocus homéologues (ex chez *Gossypium*, Wendel *et al.*, 1995). Le sens de cette homogénéisation peut différer entre plusieurs « races » d'une même espèce ou entre plusieurs accessions d'une même race (ex chez *Glycine tomentella*, Rauscher *et al.*, 2004).

Dans cette présente étude, seuls deux individus ont été analysés sur Fuerteventura et Gran Canaria. Il serait d'un grand intérêt de compléter cette étude sur tout l'échantillonnage qui a été réalisé sur les îles afin de comprendre les mécanismes d'évolution génomique qui opèrent à différentes échelle d'observation (population, île, espèce).

En outre, le stade avancé de la conversion génique d'*ITS* peut suggérer une allotétraploïdisation relativement ancienne mais le cycle de vie annuel de *B. macrocarpa* 4X peut rendre plus rapide l'évolution concertée par rapport à une espèce à longues générations. Le maintien dans l'allotétraploïde d'allèles parentaux (chloroplastiques et nucléaires) sans accumulation de nombreuses nouvelles mutations supporte aussi l'hypothèse selon laquelle le (ou les) évènement de spéciation ne sont pas extrêmement anciens.

Ces résultats illustrent l'importance d'une analyse de variabilité intraspécifique à la fois au niveau de séquences chloroplastiques et nucléaires et préconisent de ne pas se baser uniquement sur des séquences d'*ITS* dans les études phylogénétiques.

Les individus *B. macrocarpa* de ces îles étaient décrits comme exclusivement tétraploïdes, mais une étude cytogénétique et un échantillonnage *in situ* ont mis en évidence des zones de sympatrie où coexistent des *B. macrocarpa* 2X et 4X, et où aucun hybride triploïde ou aneuploïde n'a été détecté. L'étude approfondie au niveau populationnel de ce système canarien où l'endémisme et les processus de spéciation ont été régulièrement décrits dans la littérature fait l'objet du quatrième chapitre.

Le niveau d'interaction entre cette espèce et ses espèces parentales ainsi que la phylogéographie de l'hybride sont discutés dans les chapitres suivants.

# CHAPITRE II. PHYLOGEOGRAPHIE

## D'UNE ESPECE COTIERE : LA STRUCTURE GENETIQUE DE *BETA VULGARIS MARITIMA* TEMOIGNE-T-ELLE DES PERIODES GLACIAIRES PASSEES ?

---

### RESUME



Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à la structure génétique et aux patrons phylogéographiques de l'espèce côtière *B.v. maritima* le long des côtes européennes et nord-africaines.

L'étude de cette diversité génétique, de sa structure et de son organisation est une des approches privilégiées dans la compréhension de la distribution actuelle et de la dynamique d'une espèce.

Bien que la distribution paléogéographique de *B.v. maritima* ne soit pas connue, des dislocations majeures et des extinctions régionales de populations ont probablement accompagné les cycles des glaciations et laissé leur empreinte sur la structure génétique et géographique de l'espèce.

Cette présente étude a été réalisée grâce aux séquences chloroplastiques obtenues dans le chapitre précédent relatif à la phylogénie de la section *Beta*, et complétée par des marqueurs microsatellites nucléaires sur un échantillon de 52 accessions (un individu analysé par population).

Les signaux obtenus des haplotypes chloroplastiques et des génotypes microsatellites ont apporté de nouvelles informations quant à l'histoire et à l'origine des populations contemporaines et ont identifié deux zones refuges ayant marqué la structure phylogéographique de l'espèce. Les génotypes issus de ces deux refuges auraient colonisé l'Europe après les glaciations et leurs distributions actuelles reflètent plusieurs voies de colonisation.

## A. INTRODUCTION

La distribution de la variation génétique chez une espèce est gouvernée à la fois par des processus extrinsèques à l'espèce tel que des événements écologiques ou des pressions de sélection, et par des facteurs intrinsèques comme le mode de reproduction.

Si l'on se place dans un contexte phylogéographique, le patron de variation génétique est le produit des échanges génétiques contemporains au sein de l'espèce mais aussi des relations historiques entre les populations. Les isolements géographique, reproductif et temporel sont les principales barrières aux flux de gènes mais le système côtier est un système essentiellement linéaire qui réduit le nombre de variables ou de barrières historiques influençant la structure génétique d'une espèce.

L'espèce *B.v. maritima* (Amaranthacée) serait originaire du Proche-Orient et plus précisément des vallées du Tigre et de l'Euphrate (Cook & Scott, 1993). Elle se serait diversifiée sur le pourtour méditerranéen avant de coloniser les côtes atlantiques. Les oscillations climatiques du quaternaire sont soupçonnées d'avoir affecté secondairement la distribution actuelle des populations car ces événements ont largement laissé leurs signatures génomiques sur les taxons animaux et végétaux (Hewitt, 1996; Comes & Kadereit, 1998; Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1999; 2000). Beaucoup d'espèces ont été « poussées » vers des régions tempérées plus propices pendant les périodes glaciaires ce qui a provoqué l'isolement de certaines espèces dans différents refuges, entraînant par là même une différenciation vers différentes lignées génétiques (Hewitt, 1996; Comes & Kadereit, 1998; Hewitt, 2000). Puis, les expansions post-glaciaires se sont multipliées et ont généralement été couplées avec une diminution de la variabilité génétique (Hewitt, 1996; Comes & Kadereit, 1998). Elles ont généralement débuté depuis quatre refuges majeurs localisés au sud des péninsules ibérique, italienne et balkanique et dans la région Ponto-caspienne (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1999; Kotlik *et al.*, 2004).

Une grande part des études phylogéographiques chez les plantes vasculaires a été menée sur des espèces d'arbres pour lesquelles d'excellentes données fossiles sont disponibles mais, en comparaison, peu d'entre elles ont été réalisées sur des taxons herbacés (Comes & Kadereit, 1998).

Notre choix de l'espèce modèle *B.v. maritima* a donc été justifié d'une part par le manque de données phylogéographiques sur les espèces herbacées et d'autre part, par la distribution côtière de ses populations qui permet de réduire le nombre de variables historiques influençant la répartition actuelle de l'espèce (cf chapitre A.2. du Cadre théorique).

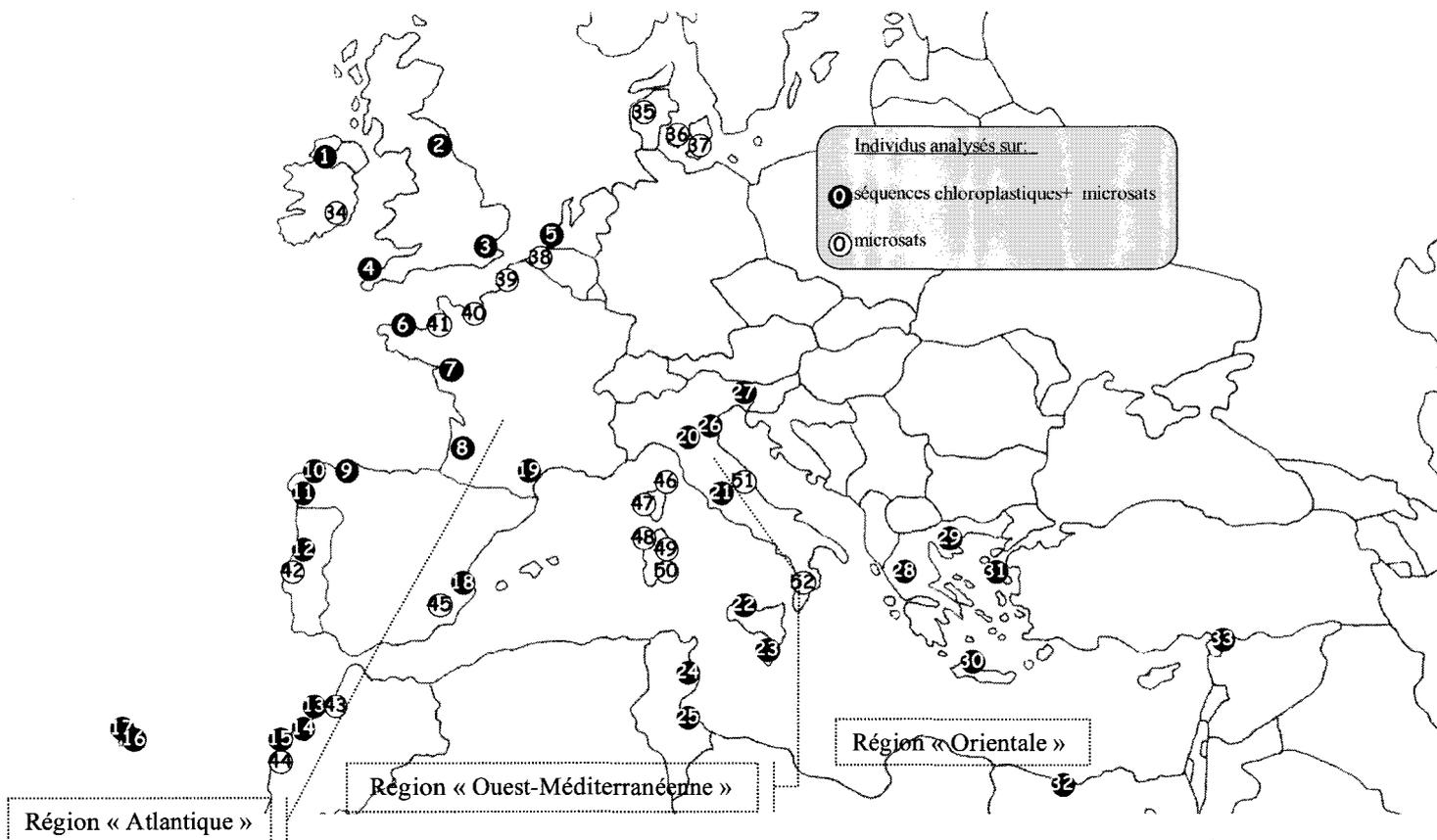
Les plantes côtières sont, en outre, particulièrement appropriées lorsque l'on s'intéresse aux patrons de structuration génétique et particulièrement aux comparaisons entre la variation génétique au centre et en marge de l'aire de distribution du fait de leur habitat naturellement fragmenté qui s'étend en longueur et peu en largeur (Franks *et al.*, 2004).

Ce chapitre a pour objectifs, à travers l'analyse de la diversité chloroplastique et nucléaire, de caractériser les patrons de diversité génétique de *B.v. maritima* sur son aire de distribution afin de mettre en évidence les processus évolutifs impliqués dans la structure génétique actuelle de l'espèce.

## B. MATERIEL ET METHODES

### ***B.I. MATERIEL BIOLOGIQUE***

Aux 33 individus de *B.v. maritima* analysés dans le chapitre précédent ont été ajoutés 19 individus afin de conduire une étude phylogéographique plus fine. La carte ci-dessous (figure 27) recense les localités des individus qui ont été analysés au niveau chloroplastique et ceux qui l'ont été à la fois au niveau chloroplastique et nucléaire (grâce à des marqueurs microsatellites).



**Figure 27 : Localisation géographique des individus analysés**

Les ronds blancs identifient les individus sur lesquels ont été passés exclusivement des marqueurs microsatellites nucléaires et les ronds noirs ceux qui ont, en plus, été analysés au niveau de séquences chloroplastiques

Le tableau 7 détaille les origines de ces individus. Cette stratégie d'échantillonnage a été choisie afin de déterminer s'il était possible d'inférer des patrons phylogéographiques à partir de données génétiques nucléaires et chloroplastiques.

Tableau 7 : Localisation et origine du matériel biologique de l'étude

No	IDBBNR	O_COUNTRY	DISTRICT	DONOR
1	5905	IRL	SLIGO	BGRC
2	5915	GBR	NORTH YORKSHIRE	BGRC
3		GBR	RAMSGATE	GEPV
4		GBR	LAND'S END	GEPV
5		NL	ZWIN	GEPV
6		FR	ROSCOFF	GEPV
7		FR	CHARENTE	GEPV
8		FR	ERROMARDIE	GEPV
9		ESP	FOZ	GEPV
10		ESP	PUNTA FOUXEIRA	GEPV
11		ESP	PLAYA DE LA LANZADA	GEPV
12	7069	PRT	OBIDOS	BGRC
13	8550	MAR	ATLANTIC SEA COAST	BGRC
14	8560	MAR	ATLANTIC SEA SHORE	BGRC
15	8556	MAR	ATLANTIC SEA SHORE	BGRC
16	6069	PRT	MADEIRA	BGRC
17		PRT	PONTA DO PARGO	GEPV
18		ESP	LOS ARENETES	GEPV
19		FR	BAGES:LEUCATES	GEPV
20	9452	ITA	TOSCANA	BGRC
21	9461	ITA	LAZIO	BGRC
22	2205	ITA	SICILY	BGRC
23	8615	MLT		BGRC
24	3542	TUN		BGRC
25	415	TUN		BGRC
26	9481	ITA	VENETO	BGRC
27	6952	YUG	ISTRIA	BGRC
28	139	GRC	LEVKAS	BGRC
29	208	GRC	KHALKIDHIKI	BGRC
30		GRC	CRETE	GEPV
31		GRC	LESBOS	GEPV
32	9742	EGY	MATRUH	BGRC
33	8440	TUR	HATAY	BGRC
34	5873	IRL	WEXFORD	BGRC
35		DNK		GEPV
36	7268	DNK	FYN	BGRC
37	7274	DNK	LOLLAND	BGRC
38	7279	BEL	WEST VLAANDEREN	BGRC
39	7256	FRA	PAS-DE-CALAIS	BGRC
40	7245	FRA	CALVADOS	BGRC
41	7230	FRA	MANCHE	BGRC
42	7067	PRT	MAFRA	BGRC
43	8555	MAR	ATLANTIC SEA COAST	BGRC
44	8558	MAR	ATLANTIC SEA COAST	BGRC
45	5657	ESP	MURCIA	BGRC
46	5759	FRA	CORSICA	BGRC
47	5750	FRA	CORSICA	BGRC
48	5710	ITA	SARDINIA	BGRC
49	5745	ITA	SARDINIA	BGRC
50	5735	ITA	SARDINIA	BGRC
51	5598	ITA		BGRC
52	5677	ITA	CALABRIA	BGRC

IDBBNR : Numéro d'identification unique assigné à une accession par la Base de données Internationale pour la Betterave

BGRC : Collection de la « Braunschweig Genetic Resources Collection »

GEPV : Graines du laboratoire GEPV, Lille

Birmingham : Collection de l'université de Birmingham

## **B.II. PROTOCOLE**

L'extraction d'ADN a été réalisée selon les mêmes méthodes que dans l'étude précédente, à savoir avec un kit Nucleospin®96Plant kit (Macherey-Nagel) sur un robot Microlab®Star (Hamilton).

### a) LES SEQUENCES CHLOROPLASTIQUES

Les séquences utilisées ici sont celles qui ont été obtenues dans l'étude précédente sur 33 individus de *B.v. maritima* (cf chapitre I). Ces 33 individus (et 19 nouveaux individus supplémentaires) ont été de plus analysés au niveau de marqueurs microsatellites nucléaires afin d'affiner l'étude.

### b) LES MARQUEURS MICROSATELLITES

Deux multiplex de PCR contenant respectivement cinq et quatre marqueurs microsatellites (Gaa1, SB04, SB06, SB07, SB15, Bvm3, Caa1, Gcc1, Gtt1) ont été amplifiés et caractérisés.

La PCR a été menée sur 20 ng d'ADN génomique dans une solution de réaction de 8 µL de tampon 1X, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP, 0,2 mg/mL de BSA, 2% de DMSO, 0,1 µM de chaque amorce et 5U/µL de *Taq* polymérase.

Les paramètres d'amplifications ont été les suivants : une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, suivant par 40 cycles de 94°C pendant 40s, 54°C pendant 40s et 72°C pendant 40s. Les allèles microsatellites ont été détectés grâce à un séquenceur automatique ABI 3100 (Applied Biosystems).

## **B.III. ANALYSES PHYLOGEOGRAPHIQUES**

### a) L'ANALYSE DES SEQUENCES CHLOROPLASTIQUES

Pour compléter l'analyse de diversité réalisée dans le chapitre précédent, et afin d'étudier l'influence des événements historiques et démographiques sur la structure génétique et phylogéographique de l'espèce, les affinités phylogénétiques des haplotypes ont été mises en relation avec la distribution géographique des individus. Le réseau d'haplotypes chloroplastiques précédemment construit a dès lors permis d'identifier la distribution géographique des principaux assemblages généalogiques.

La proportion de variance distribuée entre ces assemblages a été testée par une procédure d'analyse hiérarchique de variance moléculaire (AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992)) avec le programme ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000).

Une analyse de type NCA (Nested Clade Analysis) a été menée afin de tester s'il existe une relation entre les patrons de variation génétique et la géographie. Ces analyses d'associations géographiques ont été conduites avec le logiciel GEODIS ver 2.0 (Posada *et al.*, 2000). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sur 10 000 répliques.

Les associations significatives entre les distances génétiques et géographiques (respectivement  $D_c$  et  $D_n$ ) ont ensuite été interprétées suivant la clé de Templeton (2004) afin de déduire les causes biologiques responsables des associations observées.

#### b) L'ANALYSE DES MICROSATELLITES NUCLEAIRES

Les marqueurs microsatellites nucléaires (passés sur 52 individus) apportent une information additionnelle dans la compréhension des routes de colonisation de l'espèce.

Le polymorphisme a été analysé pour chacun des 9 loci. Le nombre d'allèles différents par locus et la diversité des gènes ont été utilisés comme indices représentatifs de la diversité génétique.

Des méthodes bayésiennes récentes ont été proposées pour estimer le degré de différenciation populationnelle et l'assignation des individus à des populations. Le programme STRUCTURE v.2.0 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003) a été désigné afin d'estimer le nombre d'ensembles génétiquement proches dans notre aire d'étude. Ce logiciel calcule la vraisemblance  $[\ln \Pr(X|K)]$  d'un nombre prédéterminé de groupes génétiques (K) dans le jeu de données. Pour déterminer le nombre le plus probable de groupes dans notre échantillon, nous avons conditionné nos données microsatellites pour différentes valeurs de K, variant de 1 à 5. Chaque coefficient d'appartenance (Q) d'un individu aux groupes identifiés selon la méthode décrite précédemment est dès lors calculé.

Enfin, la différenciation génétique entre domaines biogéographiques a été calculée avec le logiciel ARLEQUIN et testée sur 10 000 permutations.

## C. RESULTATS

### ***C.I. EVENEMENTS DEMOGRAPHIQUES REVELES PAR LES SEQUENCES CHLOROPLASTIQUES***

#### a) L'ANALYSE DE VARIANCE MOLECULAIRE

Des analyses de structuration géographique ont été menées sur l'aire de distribution de l'espèce. Pour cela, les accessions ont été groupées selon trois domaines géographiques (figure 27):

- un groupe atlantique comprenant les individus de l'Irlande, de la Grande-Bretagne, de l'ouest de la France, de l'Espagne, du Portugal et du Maroc ;
- un groupe ouest-méditerranéen avec les individus prélevés dans l'ouest du bassin méditerranéen ;

- un groupe oriental qui comprend les individus distribués à l'est de la péninsule italienne.

(NB : Ce choix de regroupement s'est fait au vu de la topologie du réseau d'haplotypes chloroplastiques révélée dans le chapitre I (figure 25) et discutée lors de l'analyse NCA ci-après (figure 28).)

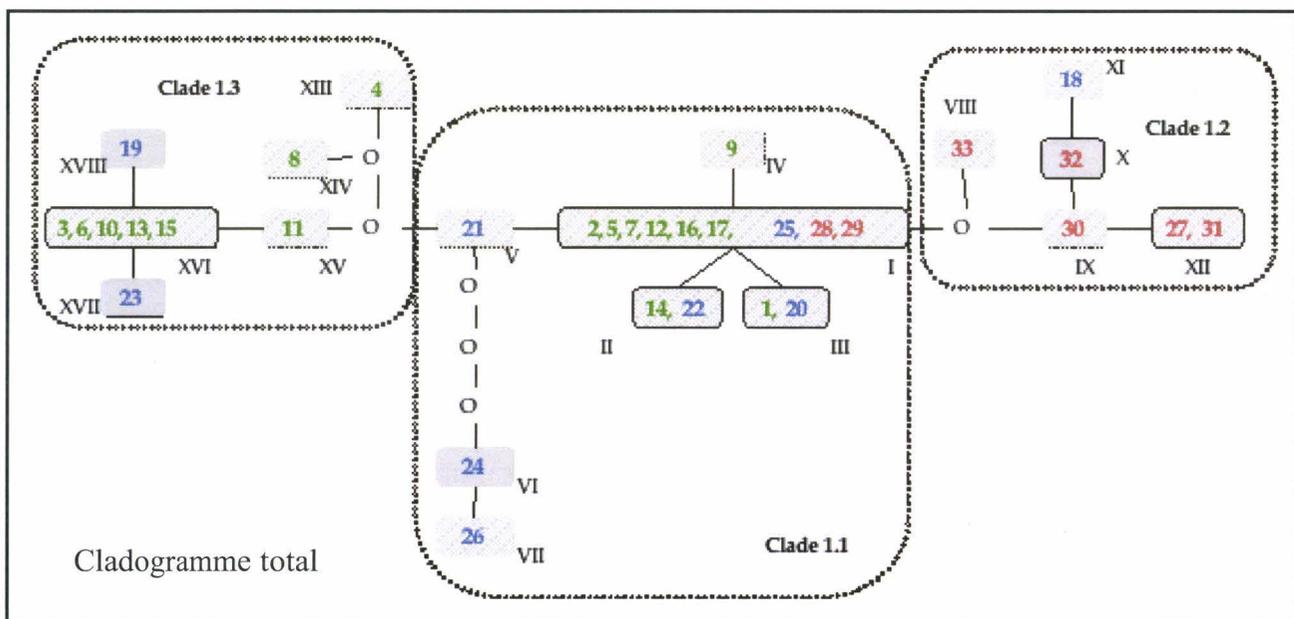
Les plus haut niveaux de diversité sont observés dans le secteur ouest-méditerranéen où tous les haplotypes chloroplastiques sont rencontrés en un seul exemplaire.

Une structuration géographique entre les secteurs a été mise en évidence par une analyse de variance moléculaire (AMOVA). La majorité de la variation s'explique par des différences à l'intérieur de chaque domaine (82,37%) et 17,62% de la variation totale est due à des différences entre secteurs. Néanmoins, cette proportion de polymorphisme entre secteurs est significative ( $P < 0,01$ ) et indique des flux de gènes (passés ou présents) restreints entre les régions.

### b) L'ANALYSE NCA (NESTED CLADE ANALYSIS)

L'analyse NCA introduit de la rigueur statistique dans l'analyse phylogéographique en différenciant l'effet des événements passés (par exemple : fragmentation passée, colonisation, ou expansion de l'aire de distribution) de celui des processus contemporains (réduction des flux de gènes par exemple) (Templeton & Georgiadis, 1996; Templeton, 1998).

La distribution des haplotypes chloroplastiques (figure 28) permet l'identification de plusieurs lignées évolutives à partir d'un haplotype ancestral (haplotype I) qui apparaît dans chaque aire biogéographique.



**Figure 28 : Structure du réseau pour la NCA**

Les haplotypes sont représentés par des rectangles gris et identifiés par des chiffres romains. Chaque ligne entre haplotypes représente un pas de mutation. Le «O» indique un état d'haplotype intermédiaire entre des haplotypes observés mais qui était absent dans notre échantillon. Les chiffres verts représentent les individus échantillonnés dans le domaine atlantique, les bleus ceux rencontrés dans l'ouest du bassin méditerranéen et les chiffres rouges identifient les individus les plus orientaux.

Ce réseau qui montre les relations généalogiques entre 18 haplotypes chloroplastiques a été subdivisé en 3 clades correspondants aux trois domaines géographiques prédéterminés. L'hypothèse nulle est qu'il n'y a pas d'association entre la position d'un haplotype dans le cladogramme et sa position géographique.

Comme l'analyse NCA nécessite que la majorité des localités géographiques incluent plus d'un individu, nous avons groupé les individus par domaine et utilisé les coordonnées géographiques du centre de chaque domaine.

Les valeurs de  $D_c$  et  $D_n$  et leurs probabilités d'être significativement grande (L) ou petite (S) pour le cladogramme sont indiquées dans le tableau ci-dessous (tableau 8) :

**Tableau 8 : Distances entre clades à l'intérieur du cladogramme total**

Clade	$D_c$	Probabilité	$D_n$	Probabilité
Clade 1-1	1847,0076	0,078	1968,8069	0,119
Clade 1-2	1270,4186	<b>S0,001</b>	1916,7669	0,137
Clade 1-3	1379,5059	<b>S0,009</b>	2407,8169	<b>L0,002</b>

$D_c$ = « clade distance : dispersion »,  $D_n$ = « nested clade distance : déplacement », L : probabilité d'une plus grande valeur que celle attendue, S : probabilité d'une plus petite valeur que celle attendue. Les probabilités significatives sont en gras.

Cette méthode d'analyse est discutée en détail dans les articles de Templeton et *al.* (1995) et Templeton (1998). La clé d'interprétation est présentée en annexe C.

L'hypothèse nulle n'a pas pu être rejetée au sein de chaque clade suggérant ainsi que les flux de gènes à l'intérieur de chaque domaine sont suffisants pour créer une population virtuellement panmictique. Par contre, ces analyses réalisées sur 1000 rééchantillonnages révèlent une association significative entre structures géographique et génétique pour le cladogramme total.

L'interprétation des processus impliqués dans cette structure géographique a été réalisée avec la clé révisée de Templeton (2004) présentée en annexe C.

L'analyse NCA a ainsi conclu que le processus biologique probablement impliqué dans la répartition des haplotypes serait de la fragmentation des populations à laquelle aurait succédé une expansion de l'aire de distribution.

## ***C.II. ÉLÉMENTS DE PHYLOGEOGRAPHIE REVELES PAR LE POLYMORPHISME NUCLEAIRE***

Un supplément d'échantillonnage a ensuite été réalisé afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats phylogéographiques et de les affiner.

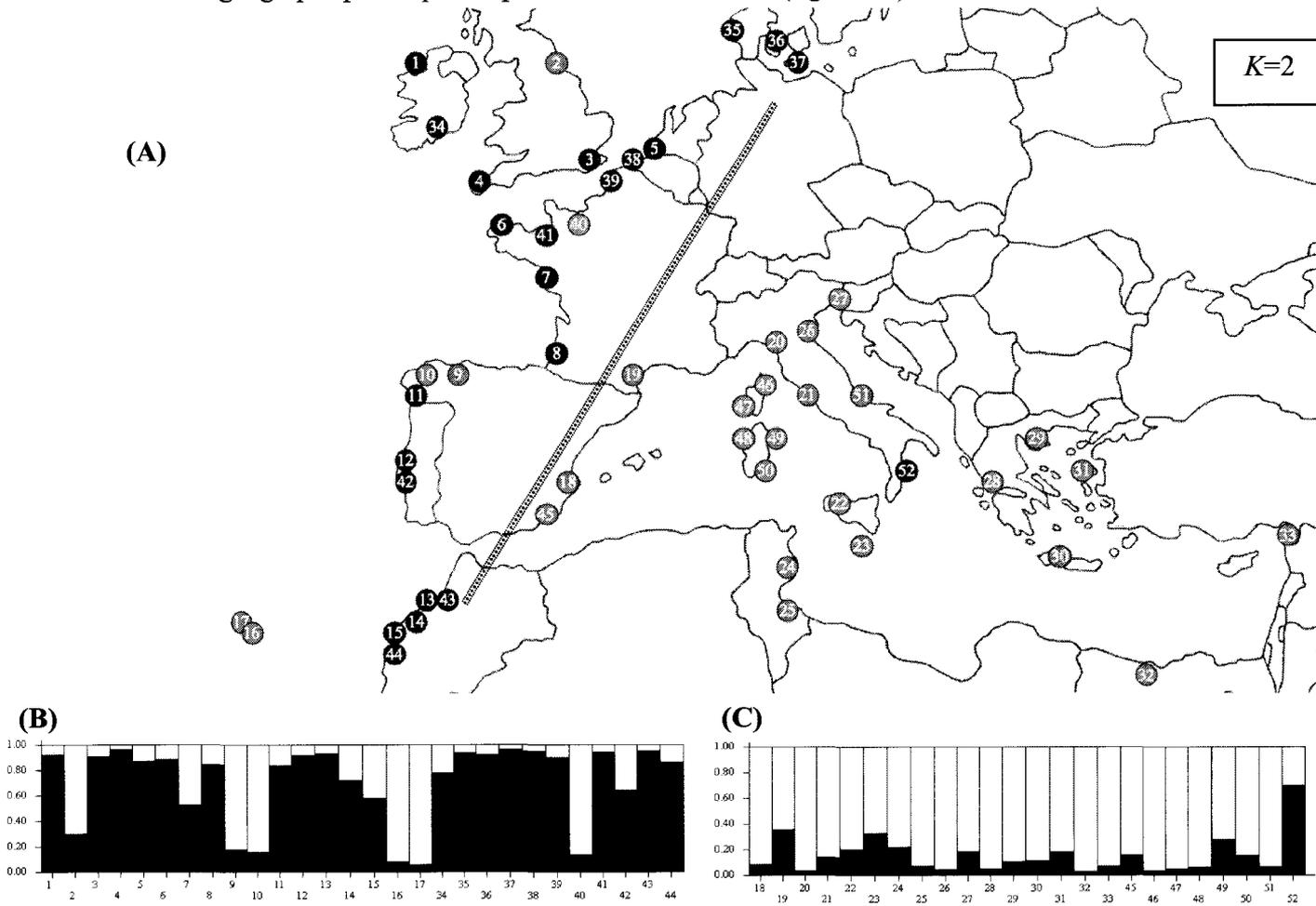
En effet, bien que des efforts aient été réalisés afin d'éviter au maximum les biais d'échantillonnage, la petite taille de l'échantillon peut affecter l'interprétation des patrons de structure phylogéographique. Ce biais sera plus faible avec des marqueurs microsatellites car la facilité à détecter un signal avec certitude est augmentée par le grand nombre de locus indépendants (Waples, 1998).

a) LA DETERMINATION DU NOMBRE DE GROUPES GENETIQUEMENT PROCHES

Une analyse de regroupement génétique a été réalisée avec le logiciel STRUCTURE afin de connaître le nombre de groupes génétiques proches au niveau nucléaire.

Les tests ont été réalisés pour  $K=2, 3, 4$  et  $5$ . La plus grande valeur de vraisemblance a été observée quand  $K=2$  ( $\text{LnP}(D) = -1704,8$ ) et diffère peu de celle de  $K=3$  ( $\text{LnP}(D) = -1723,1$ ). Pour  $K=4$  et  $5$ , la vraisemblance est encore plus faible, respectivement  $-1775,5$  et  $-2072,8$ .

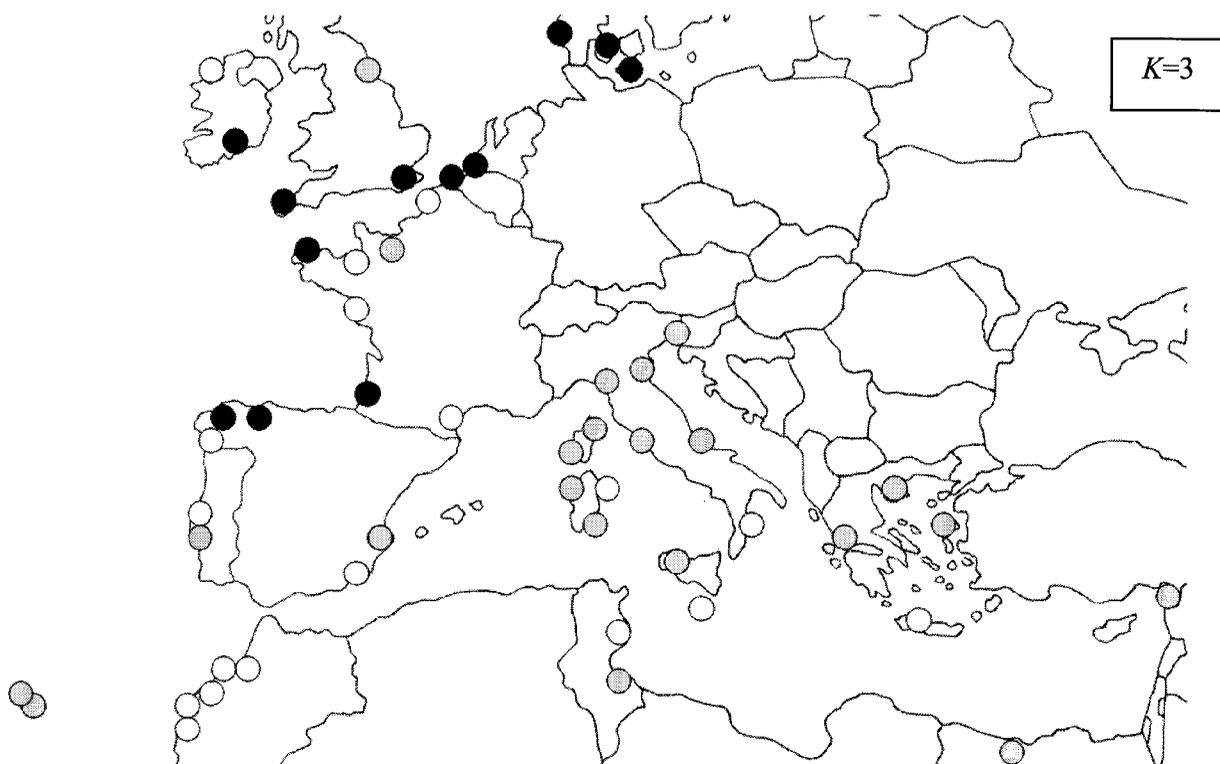
Les deux groupes génétiques définis quand  $K=2$  correspondent en grande partie aux deux aires géographiques séparées par le trait de Gibraltar (figure 29).



**Figure 29 : Assignment des individus pour  $K=2$  (résultats obtenus avec le logiciel STRUCTURE)**

(A) : carte montrant l'assignation majeure de chaque individu au groupe « ouest » (rond noir) ou au groupe « est » (cercle gris). (B) et (C) : histogrammes des valeurs d'assignation (Q) de chaque individu dans les groupes « ouest » (noir) et « est » (gris) respectivement.

Le même type de représentation pour le cas  $K=3$  divise le secteur Ouest en 2 groupes génétiques principaux, l'un comprenant une majeure partie des individus du Nord (individus figurés par les ronds noirs) et l'autre par des individus d'affinité plus méridionale (ronds blancs). L'Est de l'aire d'échantillonnage héberge une majorité d'individu appartenant au groupe génétique dont les individus sont figurés par des ronds gris. Le groupe génétique composé des individus figurés par les cercles blancs a une très large distribution géographique (figure 30).



**Figure 30 : Assignation des individus pour  $K=3$  (résultats obtenus avec le logiciel STRUCTURE)**

#### b) LE POLYMORPHISME DES MARQUEURS MICROSATELLITES

Un total de 118 allèles a été détecté sur les 9 locus microsatellites pour les 52 individus analysés. Tous les locus sont polymorphes avec un nombre d'allèles par locus allant de 4 à 22 à l'ouest et de 4 à 15 à l'est. La diversité génétique par locus varie entre 0,313 et 0,938 à l'ouest et entre 0,233 et 0,933 à l'est (tableau 9).

**Tableau 9 : Polymorphisme des microsatellites nucléaires selon les aires géographiques**

	Nombre d'allèles échantillonnés			Diversité génétique $H_e$	
	Ouest	Est	Total	Ouest	Est
Gaa1	4	4	4	0,313	0,233
SB04	7	9	10	0,801	0,846
SB06	8	6	8	0,831	0,754
SB07	19	15	25	0,923	0,933
SB15	11	13	14	0,742	0,893
Bvm3	22	15	27	0,910	0,911
Caa1	15	14	21	0,938	0,864
Gcc1	4	4	5	0,553	0,427
Gtt1	4	4	4	0,592	0,639
<b>Moyenne</b>	<b>10,44</b>	<b>9,33</b>	<b>13,11</b>	<b>0,734</b>	<b>0,722</b>

Des tests t pour échantillons appariés ont été effectués afin de tester si le domaine « Ouest » était statistiquement plus riche en allèle et révélait une diversité génétique plus élevée que celui de l'Est.

Les résultats (respectivement  $t=1,15$ ,  $p=0,282$  et  $t=0,40$ ,  $p=0,701$ ) n'ont mis en évidence aucune différence significative entre ces deux domaines en termes de nombres d'allèles et de diversité génétique.

## D. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons examiné la distribution des variations génétiques chez *B.v. maritima* afin de mieux comprendre l'histoire phylogéographique de cette espèce.

Le patron de distribution des haplotypes n'est pas concordant avec une hypothèse d'expansion rapide où une phylogénie d'haplotypes « en étoile » serait attendue.

La diversité que l'on observe dans le secteur ouest de la Méditerranée est plus importante que dans les autres secteurs. D'autre part, la forme du réseau d'haplotypes et plus particulièrement la présence d'haplotypes « en bout de branches » d'origine méditerranéenne (haplotypes n°18, 19 et 23) qui dérivent d'haplotypes des deux autres secteurs pourraient être la signature de la recolonisation des côtes ouest méditerranéennes à partir de refuges glaciaires.

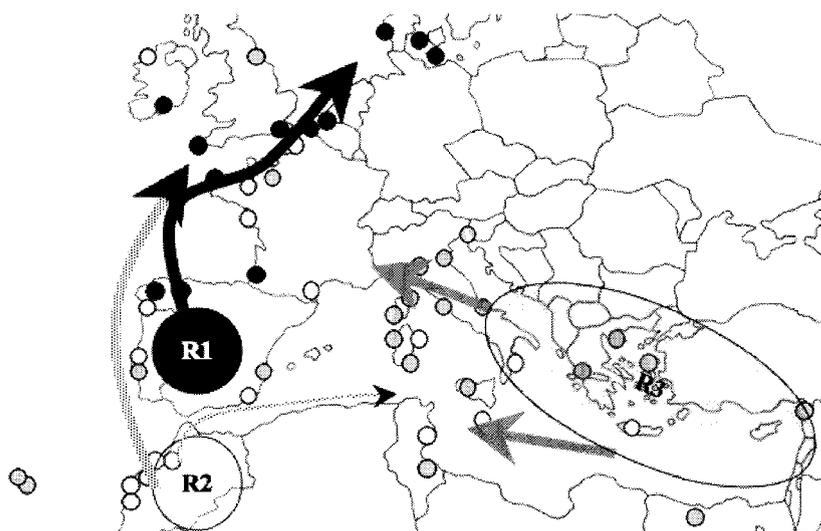
L'analyse NCA complète cette hypothèse en identifiant une fragmentation passée comme ayant des effets significatifs sur la structure géographique de *B.v. maritima*. Deux lignées génétiques sont dérivées d'un haplotype ancestral, le plus commun, qui a pu se trouver séparé dans des refuges distincts. La structuration génétique de cette espèce est donc probablement le vestige des effets des glaciations du quaternaire.

La division du bassin méditerranéen au niveau de la Sicile suggérée par les données chloroplastiques a déjà été mise en évidence dans nombre d'études, à la fois chez des organismes terrestres et marins (ex Markgraf, 1934; Rikli, 1946; Zohary, 1973; Borsa *et al.*, 1997; Garibaldi & Caddy, 1998; Bianchi & Morri, 2000).

Le patron phylogéographique dressé depuis les similarités de marqueurs microsatellites nucléaires sur un échantillonnage plus dense est en grande partie congruent avec celui que suggèrent les séquences chloroplastiques. Toutefois, l'analyse des proximités génétiques au niveau nucléaire identifie surtout deux groupes génétiquement proches : un groupe est constitué par les individus de distribution Atlantique et Nord, et concorde avec celui qui ressort des analyses chloroplastiques, le deuxième groupe est composé des individus assignés aux domaines ouest-méditerranéen et oriental par les données de séquences chloroplastiques. Ces résultats confirment une plus grande propension à la structuration génétique des données cytoplasmiques par rapport aux données nucléaires. Chez la betterave maritime, les nuages polliniques sont principalement véhiculés par les vents sur de longues distances alors que les graines trouvent leur principal vecteur dans les courants marins, courants relativement complexes en méditerranée mais principalement de direction ouest-est au niveau de Gibraltar.

L'analyse des marqueurs microsatellites nucléaires pour  $K=2$  révèle donc des routes de colonisation contrastée. Elle présente en effet les populations de *B.v. maritima* comme étant dérivées de deux principales sources probables : une source située au sud-ouest de l'Europe ou en Afrique du Nord et une source balkanique ou italienne.

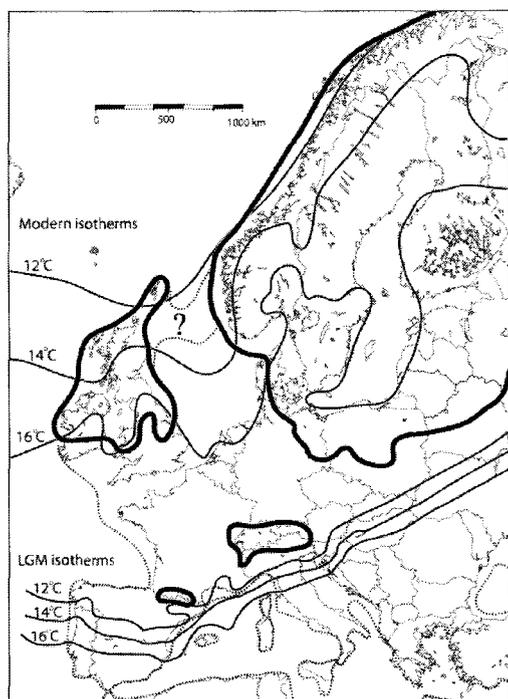
Si l'on s'intéresse aux résultats obtenus pour  $K=3$  dont la vraisemblance est proche de celle estimée pour  $K=2$ , la région la plus occidentale de l'aire d'échantillonnage apparaît comme la plus diversifiée et héberge probablement les descendants d'individus issus de deux refuges (R1 et R2 sur la figure) qui aurait pu être séparés par le détroit de Gibraltar.



**Figure 31 : Principaux refuges glaciaires et routes migratoires de *B.v. maritima* suggérés par les données nucléaires**

R1, 2 et 3 identifient les zones probables ayant servi de refuge glaciaire. Les flèches représentent les trajectoires et intensité des flux de gènes ayant probablement eu lieu depuis la dernière glaciation.

Les côtes de l'Atlantique et du Nord ont donc probablement été colonisées depuis deux zones refuges au sud-ouest séparées par le détroit de Gibraltar alors que les populations plus orientales auraient moins souffert des glaciations et seraient génétiquement plus homogènes.



Le haut niveau de congruence entre les patrons phylogéographiques de *B.v. maritima* et ceux d'autres espèces côtières à même *preferendum* climatique telles que *Salsola kali* et *Eryngium maritimum* (Kadereit *et al.*, 2005) suggère que les conditions climatiques ont joué un plus grand rôle dans la distribution actuelle de ces espèces que leur biologie spécifique.

La distribution nord actuelle de *B.v. maritima* est limitée par l'isotherme de 14°C en juillet (figure 32) pour les individus du « groupe génétique noir » (figure 31) et par celui de 16°C pour la majorité des autres individus. Au regard de ces isothermes pendant le dernier maximum glaciaire, il paraît clair que les populations à répartition nordiques actuelles (cercles noirs) ont effectivement pu survivre aux conditions espagnoles durant les glaciations d'une part, et d'autre part, que les populations ont dû être « poussées » davantage vers le sud dans l'ouest de la région méditerranéenne que dans l'est.

**Figure 32 : Isothermes contemporains (nord de l'Europe) et reconstruits (sud de l'Europe) du dernier maximum glaciaire (LGM) (Kadereit *et al.*, 2005)**

Les isothermes indiqués correspondent aux moyennes 12°C, 14°C et 16°C de juillet (courbe actuelle au nord), et aux isothermes de juin/juillet/août de dernier maximum glaciaire (LGM).

Les populations de l'Est ont donc été probablement moins affecté par les oscillations climatiques du quaternaire que celles de l'Ouest et ont pu plus rapidement recoloniser les zones propices à leur établissement à l'est de la péninsule ibérique.

Cette étude présente donc pour la première fois une analyse phylogéographique de l'espèce côtière *B.v. maritima* et identifie les refuges glaciaires les plus probables desquels se seraient initiées différentes voies de colonisation. En plus d'avoir apporté quelques éclaircissements quant à l'histoire évolutive de *B.v. maritima*, elle peut désormais aider à la compréhension des routes de colonisations empruntées par les plantes côtières.

# CHAPITRE III. EFFETS DE LA SYMPATRIE ET DU SYSTEME DE REPRODUCTION CHEZ DES TAXONS APPARENTES DE LA PENINSULE IBERIQUE, *BETA VULGARIS MARITIMA* ET *BETA MACROCARPA* (AMARANTHACEAE)

## RESUME



L'étude du polymorphisme nucléaire (14 marqueurs microsatellites) et cytoplasmique (4 marqueurs minisatellites) de populations naturelles de *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* le long des côtes de la péninsule ibérique a permis d'établir les relations génétiques qu'il existe entre ces deux espèces à systèmes de reproduction contrastés.

L'estimation du degré d'intégrité des espèces et de l'effet du système de reproduction sur la structure génétique des populations a été réalisée sur près de 850 individus en situation parapatrique et sympatrique.

Le polymorphisme des locus montre une diversité génétique chez l'espèce autogame *B. macrocarpa* beaucoup plus faible que chez l'espèce allogame *B.v. maritima*, mais ces deux taxons botaniques restent fortement apparentés avec une forte proportion d'allèles de *B. macrocarpa* partagés avec des allèles rencontrés chez *B.v. maritima*. Bien qu'une analyse bayésienne d'admixture ait mis en évidence que les 2 taxons forment des entités génétiques clairement distinctes, plus de 7% des individus étudiés montre des génotypes intermédiaires entre ces deux entités.

Ce diagnostic peut être expliqué par une récente divergence des deux taxons avec rétention du polymorphisme ancestral et/ou par de rares mais récurrents phénomènes d'hybridation asymétrique. Par ailleurs, qu'il y ait eu introgression ou séparation récente, la divergence des systèmes de reproduction contribue probablement pour beaucoup à l'intégrité de ces deux espèces.

## A. INTRODUCTION

L'identification et la quantification des facteurs agissant sur la distribution de la variabilité génétique est un prérequis indispensable dans l'analyse des relations entre les populations ou les espèces. Le système de reproduction est un de ces facteurs en ce qu'il influence directement le niveau et la distribution de la variation génétique et peut amener, lorsqu'il change, à un isolement reproducteur et éventuellement à des phénomènes de spéciation (Charlesworth & Charlesworth, 1995; Hamrick & Godt, 1997). En effet, une différence de système de reproduction peut affecter les flux de gènes à l'intérieur et entre populations conspécifiques (Costich & Meagher, 1992; Dorken *et al.*, 2002) et entre espèces proches qui peuvent potentiellement s'hybrider (Sweigart & Willis, 2003).

Les premières études du système de reproduction des deux espèces *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* et des croisements contrôlés interspécifiques ont montré que l'hybridation est possible entre ces deux espèces. Mais jusqu'à présent, leur propension à l'hybridation naturelle n'a ni été quantifiée ni caractérisée par des marqueurs moléculaires.

Le développement récent, chez *B.v. maritima* et *B. macrocarpa*, de marqueurs microsatellites nucléaires (Mörchen *et al.*, 1996; Viard *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2004; McGrath *et al.*, 2007) et de marqueurs minisatellites mitochondriaux (Nishizawa *et al.*, 2000) polymorphes procure des outils de choix pour la détection efficace d'entités génétiques spécifiques étant donné que ce type de marqueur a déjà permis de différencier des espèces très proches potentiellement interfertiles là où d'autres types de marqueurs avaient échoué (Muir *et al.*, 2000 chez les chênes; Engel *et al.*, 2005 chez les *Fucus*).

La méthode bayésienne de Pritchard *et al.* (2000) basée sur les génotypes multilocus est un outil statistique efficace qui permet de grouper les individus génétiquement proches sans *a priori* sur leur affiliation taxinomique. Ainsi, dès lors que les groupes sont définis, les individus sont assignés à un ou plusieurs groupes selon différentes proportions individuelles.

Ainsi, en tenant compte des systèmes de reproduction contrastés et de la potentialité probable de flux de gènes interspécifiques, nous tentons de caractériser la diversité génétique et de conforter la position taxinomique des individus prélevés en Espagne et au Portugal grâce à 14 marqueurs microsatellites nucléaires et 4 marqueurs minisatellites mitochondriaux. Les génotypes sont analysés avec la méthode d'assignation bayésienne de Pritchard *et al.* (2000) afin :

- d'évaluer l'existence de deux entités génétiques (= 2 espèces) distinctes,
- de détecter d'éventuels génotypes « intermédiaires »,
- d'estimer la fréquence et la nature des phénomènes d'hybridation entre *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* .

## B. MATERIEL ET METHODES

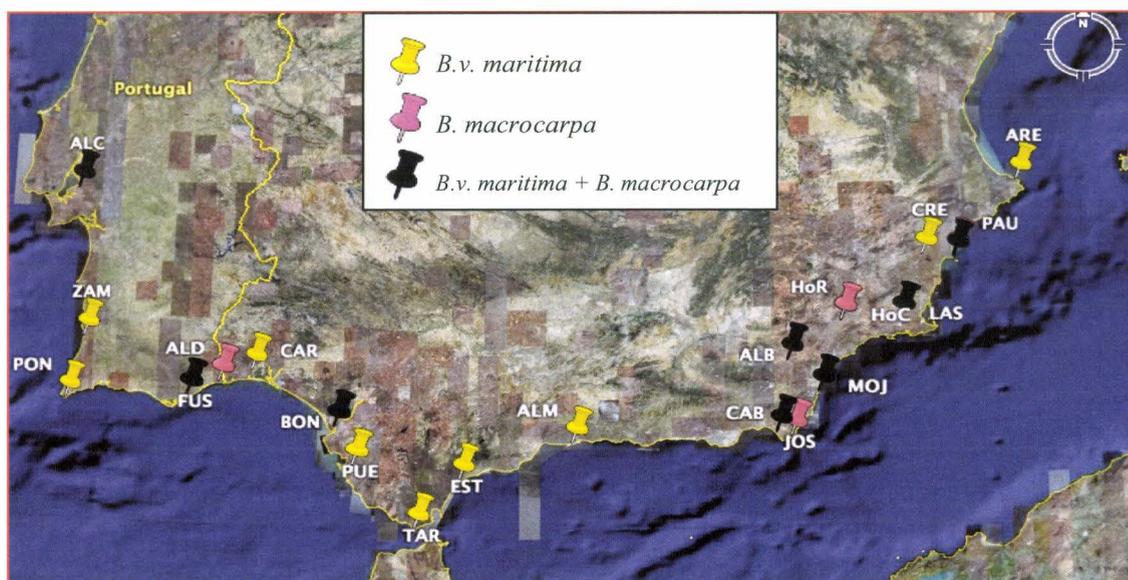
### B.I. *MATERIEL BIOLOGIQUE*

Au sein de la section *Beta*, *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* sont deux espèces dont les distributions géographiques sont chevauchantes sur le pourtour méditerranéen. Dans cette zone, *B.v. maritima* est rencontrée essentiellement en zone littorale, mais on la trouve également parfois à l'intérieur des terres (Toll & Hendricksen, 1982; Frese *et al.*, 1990). Les populations de *B. macrocarpa* sont localisées en zones rudérales et supportent des milieux relativement secs et à taux de salinité élevés. Les deux espèces sont toutefois relativement souvent trouvées en sympatrie.

*B.v. maritima* est une espèce allogame autoincompatible et gynodioïque caractérisée par la co-existence en proportions variables d'individus hermaphrodites et d'individus mâles stériles (=femelle), le pourcentage de femelles variant de 0 à 76% le long des côtes françaises (Cuguen *et al.*, 1994). *B. macrocarpa* est une espèce hermaphrodite, autocompatible et fortement autogame (Letschert, 1993).

Des différences remarquables sont par ailleurs observées entre ces deux taxons au niveau du cycle de vie et du port de la plante. Aux environs de la mi-mai, les graines de *B. macrocarpa* sont presque complètement mures alors que celles de *B.v. maritima* n'atteignent ce stade que vers juillet/août. Les individus de *B. macrocarpa* sont plus petits et annuels alors que *B.v. maritima* est pérenne sous bonnes conditions environnementales.

Suite à une prospection en 1998, réalisée par F. VIARD et J. CUGUEN le long des côtes espagnoles et portugaise de Valence à Lisbonne, 22 populations ont été choisies pour cette étude parmi lesquelles, d'après le diagnostic de terrain qu'il en avait été fait, 9 semblaient composées exclusivement d'individus *B.v. maritima*, 4 d'individus exclusivement *B. macrocarpa* et 9 populations hébergeraient les 2 espèces en sympatrie pour un total de près de 850 individus analysés (environ 550 individus *B.v. maritima* et 300 *B. macrocarpa*) (figure 33).



**Figure 33 : Cartographie des populations échantillonnées**

Les marqueurs jaunes indiquent les populations composées exclusivement d'individus *B.v. maritima*, les marqueurs roses celles composées exclusivement d'individus *B. macrocarpa* et les marqueurs noirs identifient les populations où coexistent des individus *B. macrocarpa* et *B.v. maritima*.

Les caractéristiques biologiques, écologiques et géographiques des populations sont détaillées dans le tableau 10.

**Tableau 10 : Identification et localisation des populations**

Les populations constituées à la fois d'individus *B. v. maritima* et *B. macrocarpa* sont grisées dans le tableau.

Espèce(s)	Identifiant	Nom de la population	Pays	District	Latitude	Longitude	Habitat
<i>B. v. mari/B. macro</i>	ALC	Alcochete	Portugal	Alcochete	38°45',09 N	8°55',19 W	Salines abandonnées
<i>B. macrocarpa</i>	ALD	Aldeia Nova	Portugal	Tavira	37°11',30 N	7°27',68 W	Ruines, remblais
<i>B. v. mari/B. macro</i>	FUS	Fuseta	Portugal	Olhao	37°03',80 N	7°45',08 W	Saline en activité
<i>B. v. maritima</i>	PON	Ponta de Sagres	Portugal	Vila Do Bospo	37°00',28 N	8°56',65	Talus de bord de route et parking
<i>B. v. maritima</i>	ZAM	Zambujeira de mar	Portugal	Odemira	37°31',41 N	8°47',10 W	Talus de bord de plage
<i>B. v. mari/B. macro</i>	ALB	Albox	Espagne	Almeria	37°23',24 N	2°07',86 W	Talus en contrebas d'un jardin, milieu sec
<i>B. v. maritima</i>	ALM	Almayate	Espagne	Malaga	36°43',37 N	4°08',63 W	Bord de route en front de mer
<i>B. v. maritima</i>	ARE	Los Arenetes	Espagne	Alicante	38°49',52 N	0°09',58 E	Talus et rochers en bord de mer
<i>B. v. mari/B. macro</i>	BON	Bonanza	Espagne	Cadiz	36°50',25 W	6°20',60 W	Bord de route traversant une saline abandonné
<i>B. v. mari/B. macro</i>	CAB	Cabo de Gata	Espagne	Almeria	36°48',08 N	2°14',68 W	Champ abandonné
<i>B. v. maritima</i>	CAR	Cartaya	Espagne	Huelva	37°17',24 N	7°08',74 W	Terrain vague (milieu fermé)
<i>B. v. maritima</i>	CRE	Crevillente	Espagne	Alicante	38°13',81 N	0°49',17 W	Oliveraie plus ou moins à l'abandon
<i>B. v. maritima</i>	EST	Estepona	Espagne	Malaga	36°25',12 N	5°10',71 W	Terrain et champs abandonnés + bord de chemin
<i>B. v. mari/B. macro</i>	HoC	La Hoya-champ	Espagne	Murcia	37°42',24 N	1°36',06 W	Talus près d'un champ plus ou moins abandonné
<i>B. macrocarpa</i>	HoR	La Hoya-ruines	Espagne	Murcia	37°42',36 N	1°36',01 W	Près d'un champ, terrain sec
<i>B. macrocarpa</i>	JOS	San José	Espagne	Almeria	36°46',09 N	2°06',22 W	Talus et terrain vague sous des eucalyptus
<i>B. v. mari/B. macro</i>	LAS	Las lomas de Albujon	Espagne	Murcia	37°42',25 N	1°03',41 W	Champ abandonné
<i>B. v. mari/B. macro</i>	MOJ	Mojacar	Espagne	Almeria	37°70' N	1°50' W	Remblai de terre derrière un camping
<i>B. v. mari/B. macro</i>	PAU	Paula del Este	Espagne	Alicante	38°12',13 N	0°30',65 W	Bord de route rocheux de bord de mer
<i>B. v. maritima</i>	PUE	Puerto Real	Espagne	Puerto Real	36°31',53 N	6°10',56 W	Laisse de mer
<i>B. macrocarpa</i>	SAN	Santa Paula	Espagne	Alicante	38°13',01 N	0°30',36 W	Talus en bord de route, de bord de mer
<i>B. v. maritima</i>	TAR	Tarifa	Espagne	Cadiz	36°0',57 N	5°36',38 W	Arrière dunes

Excepté pour quelques rares sites, les différences entre les deux types sont caractéristiques et peu de morphotypes intermédiaires sont dénombrés (excepté pour la population de Fuseta – Portugal).

## ***B.II. DESCRIPTION ECOGEOGRAPHIQUE DE LA ZONE D'ETUDE***

La description des zones éco-géographiques permet de faire une synthèse des événements climatiques sur une période suffisamment longue pour que s'établisse un ensemble de propriétés caractéristiques à une zone et indépendantes des événements ponctuels (Essenwanger, 2001). Ces conditions climatiques sont ici prises en compte dans l'analyse des populations afin de quantifier la part de la structuration de ces populations qui peut être expliquée par l'écogéographie.

La zone méditerranéenne est caractérisée par des hivers doux relativement humides et des étés chauds et secs.

La zone d'étude s'étend sur 5 types de subclimats comme décrits par Blumenstock et Thornwaite (1941) et Thran et Broekhuizen (1965) (figure 34) : les subclimats 50, 51, 54, 55, 56. Ces subclimats ont en commun des températures hivernales élevées (>8°C) et diffèrent pour ce qui est des conditions de température et d'hygrométrie l'été.

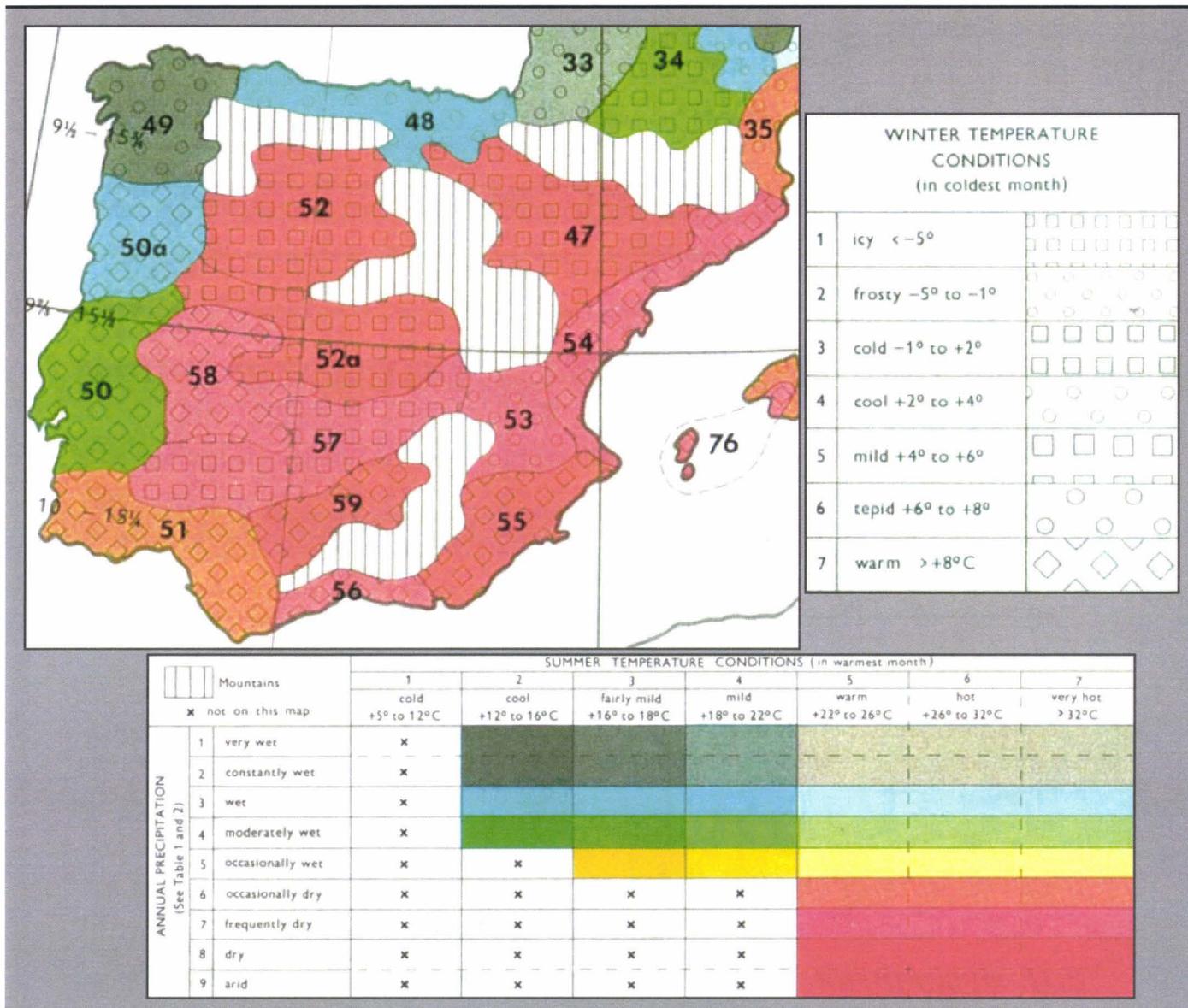


Figure 34 : Domaines écogéographiques de l'Espagne et du Portugal (retravaillé de Blumenstock & Thornwaite, 1941; extrait de Bouma, 2005)

Toutefois, à une échelle locale, des déviations par rapport au subclimat décrit peuvent parfois être observées comme sur certains sites de la côte ouest du Portugal où les vents de l'Atlantique peuvent considérablement diminuer la température sur la côte alors qu'à quelques kilomètres dans les terres, elle reste très élevée (Frese *et al.*, 1990).

La prospection n'a mis en évidence, dans les zones de subclimats 54 et 56 (caractérisés par des étés relativement chauds et fréquemment secs), que des populations de *B.v. maritima*. Par contre, dans tous les autres subclimats, les deux espèces sont rencontrées.

Les sols sont variés (ranker, rendzines, gley, sol méditerranéen rouge, pseudogley, salines...) mais il est à noter que les populations de *B. macrocarpa* sont souvent rencontrées sur les sols salins argileux alors que *B.v. maritima* colonise les sols plus pauvres et moins salés (Frese *et al.*, 1990).

### **B.III. PROCOLES**

L'étude nucléocytoplasmique des taxons *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* a été menée grâce à deux types de marqueurs :

- des marqueurs nucléaires, des microsatellites
- des marqueurs mitochondriaux, les minisatellites

#### **a) LES MARQUEURS MICROSATELLITES NUCLEAIRES**

Les individus ont été génotypés sur quatorze locus microsatellites : BVM3 (Mörchen *et al.*, 1996), GAA1, GCC1, GTT1, CAA1, CA2, CT4, CT12 (Viard *et al.*, 2002), SB04, SB06, SB07, SB15 (Richards *et al.*, 2004), FDSB1027 et FDSB1029 (McGrath *et al.*, 2007). Ces microsatellites ont été amplifiés en deux multiplex de PCR. Le premier multiplex a été réalisé dans un mix de 10,5µL contenant : 25 ng de l'échantillon d'ADN, 1 µL de tampon 10X (PerkinElmer), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µg/µL de serum d'albumine bovine (BSA), 2% de dimethyl sulfoxide (DMSO), 0,1 µM de chaque amorce GTT1, BVM3, CAA1, FDSB1027, FDSB1029 et 0,05µM des amorces du locus GCC1, 200 µM de dNTP et 5 U/µL de *Taq* polymérase (PerkinElmer). Le second multiplex a été amplifié dans les mêmes conditions avec 0,1µM de chaque primer des locus GAA1 et SB06 et 0,05 µM chaque primer des locus SB15, SB07, SB04 et CT4. Les PCR ont été menées sur un thermocycler 9700 (PerkinElmer) selon les conditions suivantes : 5 min de dénaturation à 94°C et 40 cycles de 45s de dénaturation à 94°C, 45s d'hybridation à 54°C, 45s d'extension à 72°C et une extension finale de 10 min à 72°C. Après un ajout de 10 µL de Formamide (Applied Biosystems) et 4% de produit GeneScan-500LIZE taille standart (Applied Biosystems) dans 2,5 µL de produit PCR, les produits sont visualisés sur un séquenceur ABI 3100 (Applied Biosystems).

Les données brutes d'électrophorèse ont été lues avec le logiciel GENEMAPPER v. 3.7 (Applied Biosystems). Les individus pour lesquels des données manquantes ou incertaines ont été obtenues ont été génotypés une seconde fois. Quand l'incertitude n'est pas levée sur ces individus, ils sont exclus de l'étude.

#### **b) LES MARQUEURS MINISATELLITES MITOCHONDRIAUX**

Les individus ont parallèlement été génotypés sur 4 locus minisatellites nommés TR1, TR2, TR3, TR4 (Nishizawa *et al.*, 2000). Les amplification PCR du multiplex ont été réalisées dans un volume de 10,5 µL contenant 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 285 µM de chaque dNTP, 10 mg/ml de BSA, 0,095 µM de chaque primer, 50 ng d'ADN et 0,085 unités de *Taq* polymérase (Perkin Elmer).

Les conditions de PCR ont consisté en une dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivie de 30 cycles de 30s à 94°C, 60s à 62°C et 30s à 72°C. L'extension finale a duré 10 min à 72°C.

### c) LES ANALYSES DE NIVEAUX DE PLOÏDIE

Les analyses en cytométrie de flux ont été réalisées par P. DEVAUX, responsable de laboratoire aux établissements Florimond-Desprez de Capelle en Pévèle comme suit :



- environ 1 cm<sup>2</sup> de feuilles fraîches par individu cultivé en serre (récolte < 24h) est dilacéré dans un tampon Partec Cystain UV contenant un fluochrome (DAPI, par exemple)
- l'échantillon est ensuite filtré
- après une attente de 5 à 10 min à température ambiante, l'échantillon est passé sur un cytomètre Partec (soit le modèle CAII ou PAII) (figure 35).

Figure 35 : Cytomètre de flux PA ([www.partec.com](http://www.partec.com))

L'étalonnage se fait avec des témoins connus pour leurs niveaux de ploïdie (figure 36) chez *B. macrocarpa* et un témoin de pois. Cette méthode est détaillée dans l'article de Brown et *al.* (1991)

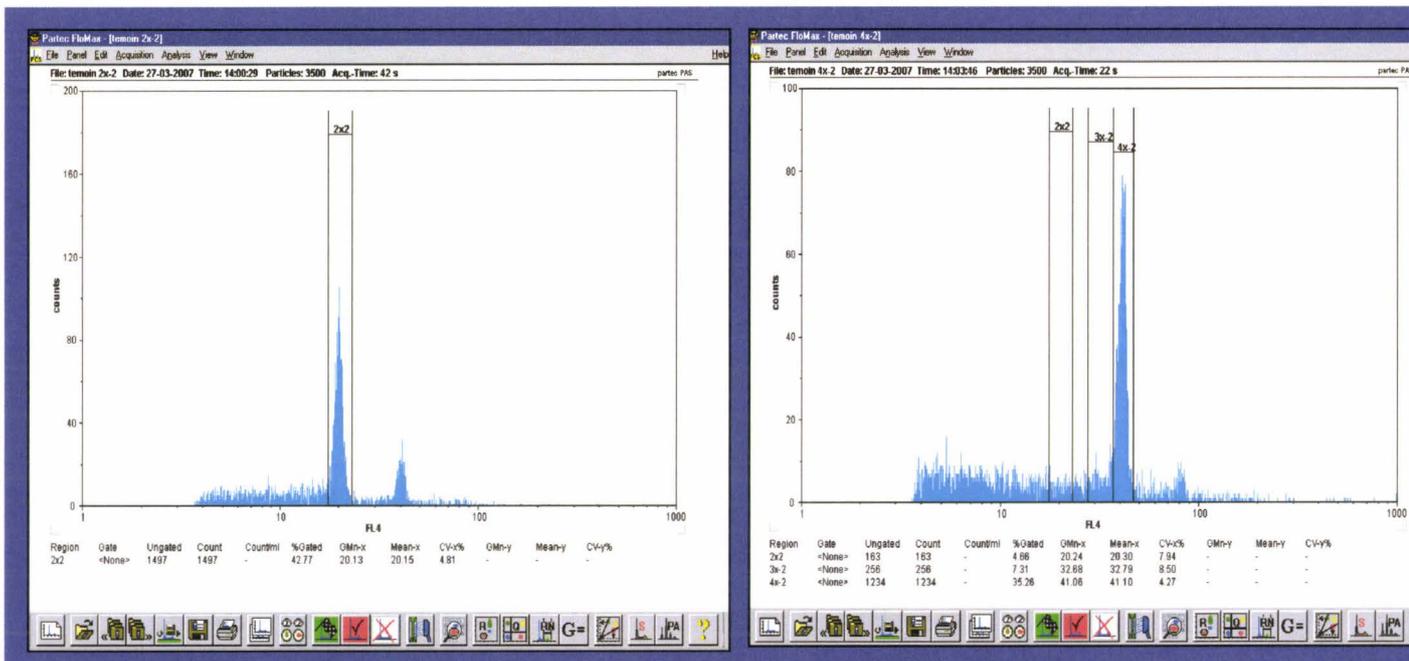


Figure 36 : Exemples de profils en cytométrie de flux pour un individu diploïde et un individu tétraploïde respectivement (Devaux, pers. com.)

## **B.IV. ANALYSES**

Le déséquilibre de liaison génotypique est testé par le logiciel GENEPOP v. 4.0 (Raymond & Rousset, 1995).

Le polymorphisme génotypique des individus et la structuration des populations ont été évalués par deux logiciels complémentaires :

- les données de diversité génétique et d'hétérozygotie observée et attendue ont été évaluées avec le logiciel POP100GENE (disponible à l'adresse : <http://www.ensam.inra.fr/URLB/pop100gene/pop100gene.Html>)
- les estimations de  $F_{is}$ ,  $F_{it}$  et  $F_{st}$  (Weir & Cockerham, 1984) ont été réalisées avec le programme FSTAT v. 2.9 (Goudet, 1995). Leurs seuils de significativité ont été testés sur 10 000 permutations comme suggéré par Goudet (1996).

L'isolement par la distance a été testé avec un test de Mantel.

La construction de la matrice de distance génétique entre populations a été réalisée avec le logiciel POPULATIONS v. 1.2.28 (Langella, 2002). La visualisation de l'arbre phylogénétique non enraciné, basé sur les distances de Cavalli-Sforza et Edwards (1967), à partir de cette matrice, a nécessité le logiciel TREEVIEW v. 1.6.6 (PAGE, 1996).

Le programme STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) a été utilisé afin d'estimer l'assignation génétique de chaque individu échantillonné à l'espèce *B.v. maritima* ou *B. macrocarpa*, sans *a priori* sur sa position taxinomique (10 000 « burn-in période », 10 000 répétitions MCMC et paramètres par défaut).

Le support cartographique permettant de visualiser les différentes populations et leurs caractéristiques génétiques provient du logiciel GOOGLE EARTH v. 4.0.13 (2007). Les coordonnées GPS des populations ont été relevées lors de la prospection des échantillons.

## C. RESULTATS

### C.I. DIVERSITE ET STRUCTURATION GENETIQUE DE *B.v. MARITIMA* ET *B. MACROCARPA* EN ESPAGNE

#### a) LA DIVERSITE GENETIQUE AU NIVEAU NUCLEAIRE

Les tests d'indépendance entre locus n'ont montré aucun déséquilibre de liaison chez *B.v. maritima* contrairement à *B. macrocarpa*.

Les marqueurs microsatellites présentent des niveaux de polymorphisme variables (tableau 11).

**Tableau 11 : Polymorphisme des marqueurs microsatellites par espèce**

Nb all= nombre d'allèles, Nb d'all moyen= nombre d'allèles moyen par population, Ho= hétérozygotie observée, He= hétérozygotie attendue

Locus	<i>B. v. maritima</i> ; N=537								<i>B. macrocarpa</i> ; N=295							
	Nb all	Richesse allélique	Nb d'all moyen	Ho	He	Fit	Fst	Fis	Nb all	Richesse allélique	Nb d'all moyen	Ho	He	Fit	Fst	Fis
Bvm3	46	39,68	14,28	0,82	0,88	0,138***	0,072	0,072***	10	9,29	2,00	0,03	0,05	0,46***	-0,001	0,462***
Ca2	11	10,08	4,83	0,57	0,64	0,156***	0,055	0,107***	4	3,84	1,62	0,03	0,04	0,423***	0,002	0,423***
Caa1	34	30,22	11,61	0,82	0,85	0,108***	0,058	0,053**	12	10,73	2,54	0,05	0,18	0,905***	0,703	0,72***
Ct4	16	15,40	8,17	0,64	0,77	0,254***	0,085	0,185***	8	7,79	2,31	0,02	0,21	0,926***	0,732	0,83***
Gaa1	11	10,96	5,33	0,43	0,42	0,044*	0,060	-0,016	5	4,79	1,77	0,04	0,07	0,556***	0,254	0,414***
Gcc1	11	9,82	3,61	0,51	0,53	0,064*	0,063	0,001	2	2,00	1,31	0,02	0,02	-0,008	0,004	-0,013
Gtt1	9	7,79	4,39	0,61	0,62	0,069**	0,055	0,015	5	4,66	1,62	0,04	0,06	0,258***	0,011	0,25**
SB04	20	17,86	8,00	0,73	0,78	0,113***	0,067	0,049*	10	9,92	2,23	0,06	0,06	0,156**	0,031	0,129*
SB06	15	12,48	6,89	0,70	0,78	0,119***	0,055	0,067**	7	6,96	2,08	0,05	0,06	0,182***	0,024	0,163*
SB07	29	26,68	10,67	0,78	0,85	0,132***	0,069	0,068***	8	8,00	1,92	0,05	0,05	0,128*	0,004	0,126*
SB15	22	19,33	8,94	0,77	0,78	0,114***	0,106	0,009	7	7,00	2,00	0,05	0,05	0,121*	0,015	0,108
Moyenne	20,36	18,21	7,88	0,67	0,72	0,122***	0,067	0,059***	7,09	6,82	1,94	0,04	0,08	0,755***	0,473	0,503***
Déviation standard	11,66	10,08	3,33		0,15	0,016	0,005	0,016	2,95	2,73	0,35		0,06	0,152	0,148	0,126

Chez *B.v. maritima* sont dénombrés entre 9 et 46 allèles par locus et chez *B. macrocarpa* de 2 à 12. Le nombre moyen d'allèles par population est près de 4 fois plus élevé chez *B.v. maritima* que chez *B. macrocarpa*. Les fréquences d'hétérozygotes observées (Ho) et attendues (He) sont élevées et les  $F_{is}$  sont relativement faibles mais la plupart du temps toutefois significatifs chez *B.v. maritima*. Chez l'espèce autogame, par contre, les estimations d'hétérozygotie sont très faibles et celle des  $F_{is}$  confirme ce déficit en hétérozygotes (certains  $F_{is}$  non significatifs sont dus au manque de variabilité génétique).

#### b) LA STRUCTURATION GENETIQUE DES POPULATIONS AU NIVEAU NUCLEAIRE

La différenciation entre populations de *B.v. maritima* ( $F_{st}=0,09$ ) est beaucoup plus faible qu'entre populations de *B. macrocarpa* ( $F_{st}=0,35$ ).

- *B.v. maritima*

Ci-dessous est présenté l'arbre de Neighbor-Joining réalisé sur les populations de *B.v. maritima* (figure 37) grâce aux données de polymorphisme des microsatellites.

Du fait de la nature des données, les valeurs de bootstrap sont faibles (et n'ont pas été indiquées ci-dessous) mais néanmoins, 4 regroupements génétiques apparaissent (figurés chacun par une couleur qui a été reportée sur la carte de distribution des populations) et une population, celle de « Los Arenates » (ARE) au Nord-Est de l'Espagne, se trouve plus isolée génétiquement.

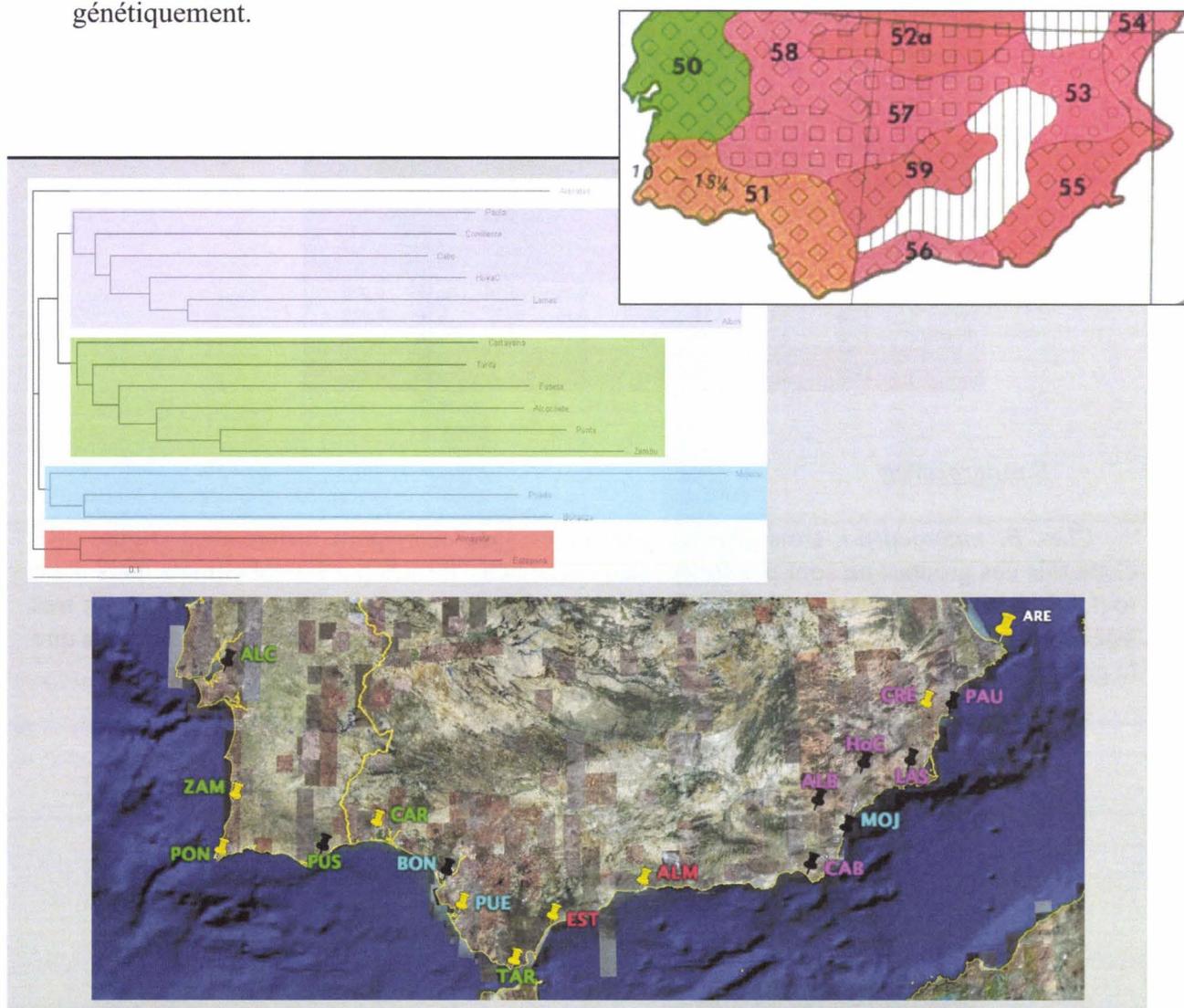


Figure 37 : Arbre de NJ sur populations de *B.v. maritima* et distribution géographique des groupes génétiques.

L'encart en haut à droite rappelle les domaines écogéographiques mis en évidence sur la péninsule ibérique.

Toutes les populations du « regroupement génétique violet » sont situées à l'est de la péninsule, sous l'influence du subclimat 55. Les deux populations méridionales « EST » et « ALM » figurées en rouge appartiennent au subclimat 56 et celles figurées en vert sont localisées sur la côte ouest, sous les subclimats 51 et 50. L'arbre phylogénétique montre d'autre part que deux des trois populations figurées en bleu « BON » et « PUE » sont très proches génétiquement et localisées dans le subclimat 51. La troisième, « MOJ », est un peu plus distante et se situe sous un subclimat plus aride (n°55). La population qui semble s'isoler des autres sur l'arbre de NJ (ARE) est aussi la seule à se trouver dans la zone n°54.

Le polymorphisme nucléaire populationnel ne montre pas de différence significative entre groupes précédemment mis en évidence (tableau 12).

**Tableau 12 : Diversité génétique et niveau d'hétérozygotie dans les populations de *B.v. maritima***

N = Nombre d'individus dans la population ; Nb moy d'all= Nombre moyen d'allèles ; Ho= Hétérozygotie observée ; He= Hétérozygotie attendue. L'étoile après le nom de population identifie celles qui hébergent les deux taxons en sympatrie.

Pop	N	Nb moy d'all	Deviation std du nb d'all	Ho	Deviation std de Ho	He	Deviation Std de He	Fis
Arenates	38	7,50	2,53	0,62	0,18	0,68	0,12	0,076
Paula*	29	8,36	3,10	0,67	0,15	0,77	0,15	0,127***
Crevillente	40	10,71	4,68	0,71	0,14	0,76	0,13	0,067
Cabo*	39	9,71	4,03	0,65	0,16	0,76	0,13	0,155***
HoyaC*	37	10,00	4,02	0,66	0,22	0,74	0,19	0,113***
Lamas*	39	10,36	5,09	0,59	0,26	0,65	0,19	0,095***
Albox*	17	4,21	1,89	0,54	0,31	0,54	0,27	-0,003
Cartayena	38	10,57	4,75	0,74	0,20	0,76	0,15	0,036
Tarifa	36	12,64	6,92	0,71	0,17	0,78	0,15	0,089***
Fuseta*	13	7,14	2,85	0,62	0,16	0,76	0,16	0,190***
Alcochete*	37	9,43	4,80	0,63	0,19	0,70	0,19	0,097***
Ponta	35	9,57	4,29	0,61	0,17	0,69	0,18	0,114***
Zambu	16	6,21	2,89	0,59	0,19	0,68	0,20	0,144***
Mojacar*	4	4,57	1,51	0,71	0,29	0,76	0,20	0,070
Puerto	38	7,14	3,35	0,69	0,16	0,71	0,16	0,028
Bonanza*	6	4,79	1,72	0,63	0,18	0,74	0,16	0,156***
Almayate	39	8,57	3,32	0,71	0,09	0,78	0,09	0,089***
Estepona	36	6,86	2,80	0,65	0,13	0,69	0,13	0,050

- *B. macrocarpa*

Chez *B. macrocarpa*, trois groupes génétiques sont clairement différenciés (figure 38). Cette fois ces groupes ne sont pas concordants avec ceux formés par les subclimats mais il est toutefois à noter que les populations figurées en blanc sont retrouvées sur des substrats très salés (salines) et celles figurées en mauve sont souvent situées plus à l'intérieur des terres que le groupe génétique coloré en vert.

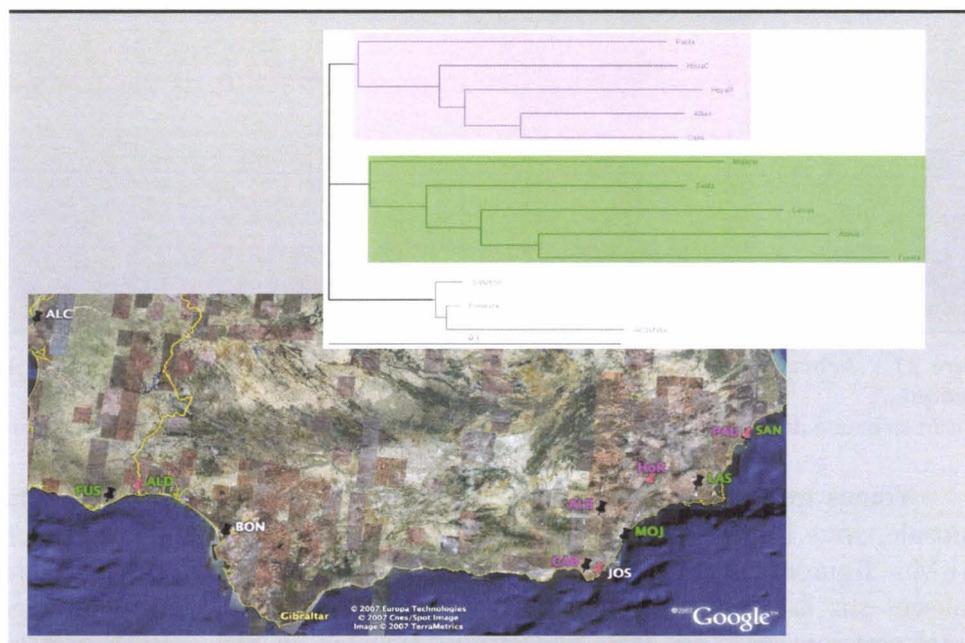


Figure 38 : Arbre de NJ sur populations de *B. macrocarpa* et distribution géographique des groupes génétiques.

Les niveaux d'hétérozygotie ( $H_o$ ) des populations de *B. macrocarpa* sont pour la quasi totalité nuls chez les deux groupes génétiques figurés en mauve et en blanc. Par contre, pour les populations figurées en vert, la diversité génétique et les taux d'hétérozygotie sont significativement plus élevés et par conséquent, les données de  $F_{is}$  sont plus faibles (tableau 13).

**Tableau 13 : Diversité génétique et niveau d'hétérozygotie dans les populations de *B. macrocarpa***

N = Nombre d'individus dans la population ; Nb moy d'all = Nombre moyen d'allèles ;  $H_o$  = Hétérozygotie observée ;  $H_e$  = Hétérozygotie attendue

Pop	N	Nb moy d'all	Dev std du nb d'all	$H_o$	Dev std de $H_o$	$H_e$	Dev std de $H_e$	$F_{is}$
Paula	2	1,09	0,30	0,00	0,00	0,03	0,12	1,000***
HoyaC	29	1,09	0,30	0,00	0,00	0,19	0,32	1,000***
HoyaR	25	1,91	0,54	0,03	0,02	0,21	0,30	0,425***
Albox	29	1,18	0,41	0,00	0,00	0,22	0,34	1,000***
Cabo	14	1,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,33	NA
Mojacar	25	2,55	0,52	0,05	0,04	0,14	0,15	0,551***
Santa	18	2,19	0,60	0,05	0,04	0,17	0,19	0,646***
Lamas	28	3,82	1,47	0,14	0,06	0,18	0,08	0,230***
Aldeia	15	3,18	1,08	0,16	0,07	0,22	0,11	0,303***
Fuseta	55	4,18	2,23	0,08	0,04	0,15	0,06	0,446***
SanJose	14	1,09	0,30	0,00	0,00	0,01	0,04	1,000***
Bonanza	33	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
Alcochete	4	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA

c) LA DIVERSITE GENETIQUE AU NIVEAU MITOCHONDRIAL

- Chez *B.v. maritima*

Le tableau 14 recense les différents allèles minisatellites rencontrés dans les populations de *B.v. maritima*.

**Tableau 14 : Polymorphisme des marqueurs minisatellites chez *B.v. maritima***

Les allèles sont numérotés arbitrairement de « 1 » jusqu'à un maximum de « 9 ».

		Are	Pau	Cre	Lam	HoC	Alb	Moj	Cab	Alm	Est	Tar	Pue	Bon	Car	Fus	Pon	Zam	Alc	Moyenne	TOTAL	
N		38	29	40	41	37	17	4	39	39	36	36	38	6	38	13	35	17	37			
Locus	Allèles																					
TR1	Nombre d'allèles	2	3	3	7	8	1	2	6	4	2	5	2	1	7	6	4	5	7	4,167		
	"1"	0	0	0	0,118	0,028	0	0,5	0	0,128	0	0	0,184	0	0,143	0,091	0	0	0,031	0,06		
	"2"	0	0,034	0	0	0,111	1	0	0	0	0	0,114	0	0	0,143	0	0	0	0	0,06		
	"3"	0	0	0	0	0,194	0	0	0,029	0	0	0,4	0	0	0,143	0,091	0,314	0,235	0,094	0,09		
	"4"	0,895	0,724	0,526	0,118	0,139	0	0	0,353	0,282	0,629	0,229	0,816	1	0,029	0,364	0	0	0,156	0,35		
	"5"	0	0,241	0,211	0,147	0,278	0	0	0,382	0,487	0	0,114	0	0	0,143	0,182	0	0,235	0,281	0,17		
	"6"	0	0	0	0,029	0	0	0	0	0	0	0,143	0	0	0	0,091	0,114	0,118	0,375	0,05		
	"7"	0	0	0	0,294	0,111	0	0	0,029	0,103	0	0	0	0	0,114	0,182	0,514	0,176	0,031	0,09		
	"8"	0	0	0,263	0,088	0,056	0	0,5	0,118	0	0	0	0	0	0,286	0	0,057	0,235	0	0,07		
	"9"	0,105	0	0	0,206	0,083	0	0	0,088	0	0,371	0	0	0	0	0	0	0	0,031	0,06		
	Diversité génétique	0,191	0,423	0,618	0,825	0,842	0	0,571	0,716	0,665	0,474	0,752	0,305	0	0,835	0,814	0,629	0,813	0,756	0,568		
TR2	Nombre d'allèles	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1,222		
	"1"	1	1	1	0,941	0,972	1	1	0,971	1	1	1	1	1	1	0,886	1	1	1	1	0,98	
	"2"	0	0	0	0,059	0,028	0	0	0,029	0	0	0	0	0	0,114	0	0	0	0	0,02		
	Diversité génétique	0	0	0	0,112	0,055	0	0	0,058	0	0	0	0	0	0,205	0	0	0	0	0,024		
TR3	Nombre d'allèles	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	3	2	1	3	1	3	2	2	1,833		
	"1"	0	0,034	0,053	0,029	0,278	1	0	0	0,026	0	0,143	0,026	0	0,286	0	0,571	0,235	0,031	0,14		
	"2"	1	0,966	0,947	0,971	0,722	0	1	0,971	0,974	1	0,829	0,974	1	0,686	1	0,371	0,765	0,969	0,85		
	"3"	0	0	0	0	0	0	0	0,029	0	0	0,029	0	0	0,029	0	0,057	0	0	0,01		
	Diversité génétique	0	0,068	0,101	0,058	0,407	0	0	0,058	0,051	0	0,296	0,052	0	0,454	0	0,54	0,371	0,062	0,14		
TR4	Nombre d'allèles	1	2	1	3	4	1	1	2	2	1	3	1	1	4	2	4	3	4	2,222		
	"1"	0	0	0	0,059	0,028	0	0	0,029	0	0	0	0	0	0,114	0	0	0	0	0,02		
	"2"	1	0,966	1	0,647	0,778	0	1	0,971	0,897	1	0,771	1	1	0,629	0,727	0,514	0,824	0,906	0,82		
	"3"	0	0	0	0,294	0,083	0	0	0	0,103	0	0,114	0	0	0,114	0,273	0,257	0,059	0,031	0,08		
	"4"	0	0,034	0	0	0,111	1	0	0	0	0	0,114	0	0	0,143	0	0,171	0,118	0,031	0,08		
	"5"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,057	0	0,031	0,01		
	Diversité génétique	0	0,068	0	0,499	0,38	0	0	0,058	0,186	0	0,384	0	0	0,566	0,416	0,646	0,314	0,179	0,205		
	Nombre d'haplotypes	2	3	4	8	13	1	2	8	4	2	6	2	1	13	6	8	7	7		25	

Le locus TR1 se montre le plus polymorphe avec 9 allèles parmi les individus de l'aire d'échantillonnage et il est rencontré jusqu'à 8 allèles différents par population (population de « Hoya-champ »). D'autres populations comme Bonanza ou Albox sont fixées pour ce locus.

Le locus TR2 est le moins polymorphe avec seulement deux allèles identifiés dont un largement majoritaire.

Les locus TR3 et TR4 possèdent respectivement 3 et 5 allèles différents mais pour ces locus aussi, un allèle est en général largement majoritaire.

### - Chez *B. macrocarpa*

Le polymorphisme de marqueurs mitochondriaux est très réduit chez *B. macrocarpa* (tableau 15) puisqu'un seul locus est polymorphe, le locus TR1. Ce locus ne comporte que deux allèles (nommés « 4 » et « 5 » car ce sont les mêmes allèles que ceux rencontrés chez *B.v. maritima* sous les numéros 4 et 5).

**Tableau 15 : Polymorphisme des marqueurs minisatellites chez *B. macrocarpa***

		N	San	Pau	Lam	HoC	HoR	Moj	Alb	Jos	Cab	Bon	Ald	Fus	Alc	Moyenne	TOTAL
		20	4	28	29	25	25	29	14	14	33	15	55	4			
Locus	Allèles																
TR1	Nombre d'allèles	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1,231	2
	"4"	0,7	1	1	0,929	1	1	0,96	1	1	1	1	1	1	1	0,96	
	"5"	0,3	0	0	0,071	0	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0,03	
	Diversité génétique	0,431	0	0	0,135	0	0	0,078	0	0	0	0	0	0	0	0,05	
TR2	Nombre d'allèles	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	"1"	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00	1
	Diversité génétique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TR3	Nombre d'allèles	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	"1"	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00	1
	Diversité génétique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TR4	Nombre d'allèles	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	"1"	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00	1
	Diversité génétique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nombre d'haplotypes		2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1		2

Seules 3 populations ont une diversité génétique mitochondriale non nulle : il s'agit des populations de Santa Paula, La Hoya Champ et Albox.

#### d) LA STRUCTURATION GENETIQUE DES POPULATIONS AU NIVEAU MITOCHONDRIAL

Les mesures de  $F_{st}$  entre populations, au sein de chaque taxon, sont hautement significatives ( $p < 0,001$ ).

##### - Chez *B.v. maritima*

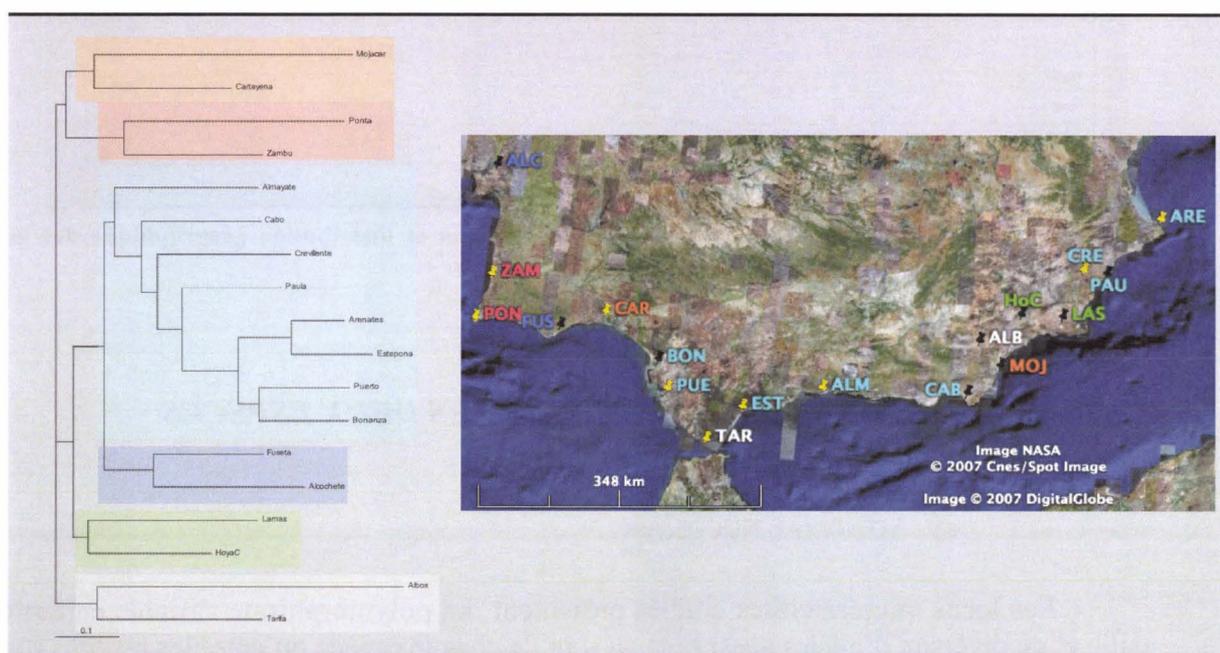


Figure 39 : Arbre de NJ sur populations de *B.v. maritima* et distribution géographique des groupes génétiques.

Des haplotypes relativement proches génétiquement entre eux (groupe « bleu clair ») ont une large distribution depuis le détroit de Gibraltar jusqu'au Nord-Est de l'Espagne (figure 39). Parmi les populations regroupées sur l'arbre phylogénétique, la plupart sont aussi très proches géographiquement (cas des groupes rouges, bleu foncé, et vert), mais cette corrélation n'est pas observable pour les groupes orange et blanc.

##### - Chez *B. macrocarpa*

Chez *B. macrocarpa*, la diversité mitochondriale est très faible. Un haplotype est majoritaire à plus de 96% (représenté en bleu) et l'autre, en proportion variable dans les 3 populations de Paula del Este, Santa Paula et Albox, est visualisé en rouge (figure 40).

Cet haplotype plus rare est retrouvé à la fois dans des populations où coexistent des individus *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* (populations de Paula del Este et Albox), et dans des populations n'hébergeant que des individus *B. macrocarpa* (population de Santa Paula).

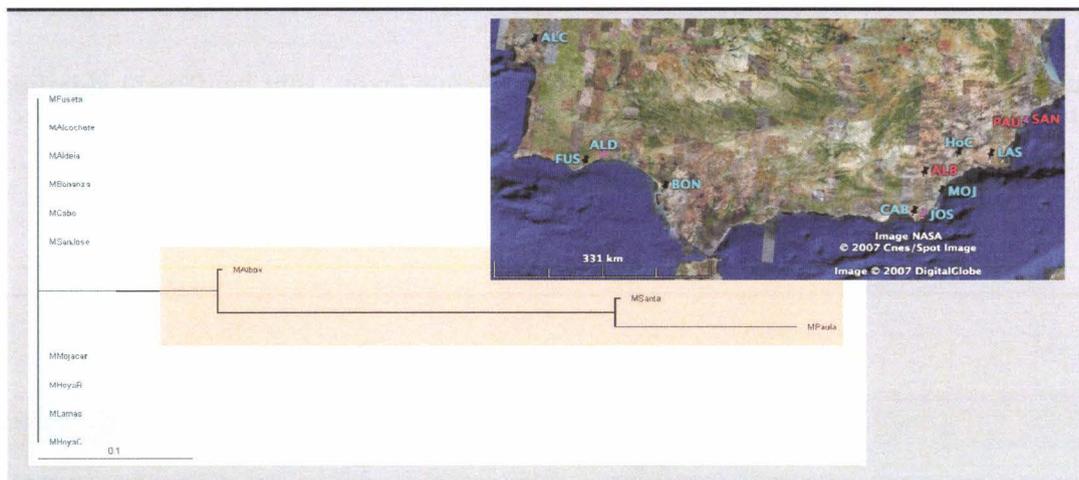


Figure 40 : Arbre de NJ sur populations de *B. macrocarpa* et distribution géographique des groupes génétiques.

## C.II. RELATIONS GENETIQUES ENTRE LES DEUX ESPECES

### a) AU NIVEAU NUCLEAIRE

Les locus microsatellites étudiés présentent un polymorphisme variable en termes de taille et de diversité d'allèles aussi bien au sein de chaque espèce qu'entre les espèces (tableau 16).

Tableau 16 : Polymorphisme des microsatellites par espèce

Nb all = nombre d'allèles ; m-M = nombre minimum et maximum d'allèles au niveau intra-populationnel ; Taille = gamme de taille des allèles en paires de bases ; Asp = nombre et pourcentage d'allèles spécifiques

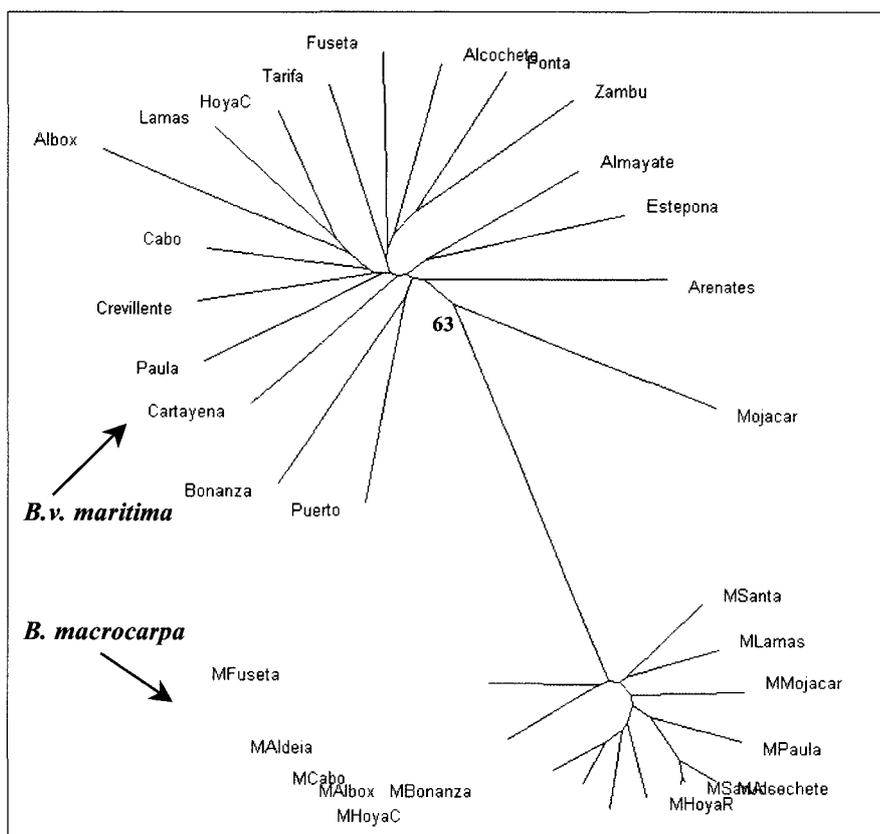
Locus	<i>B. v. maritima</i> ; N=537					<i>B. macrocarpa</i> ; N=295					TOTAL Nb all
	Nb all	m-M	Taille (pb)	Asp (nb ; %)		Nb all	m-M	Taille (pb)	Asp (nb ; %)		
Bvm3	46	5-26	91-212	36	0,78	10	1-7	97-129	0	0,00	46
Ca2	11	3-8	180-206	7	0,64	4	1-3	194-199	0	0,00	11
Caa1-B	34	5-22	128-202	22	0,65	12	1-6	137-171	0	0,00	34
Ct4	16	3-13	145-160	8	0,50	8	1-8	148-159	0	0,00	16
Gaa1	11	2-9	175-224	6	0,55	5	1-4	175-204	0	0,00	11
Gcc1	11	2-7	90-105	9	0,82	2	1-2	96-99	0	0,00	11
Gtt1	9	2-8	109-127	5	0,50	5	1-3	106-121	1	0,10	10
SB04	20	4-13	165-199	11	0,52	10	1-7	164-190	1	0,05	21
SB06	15	3-10	136-174	8	0,53	7	1-5	145-168	0	0,00	15
SB07	29	5-15	238-290	21	0,72	8	1-4	238-269	0	0,00	29
SB15	22	5-13	129-179	15	0,68	7	1-5	130-157	0	0,00	22
CT12	34	2-14	96-153	18	0,51	17	1-10	99-153	1	0,03	35
1027	22	3-12	164-200	9	0,36	16	1-10	167-211	3	0,12	25
1029	48	3-26	200-263	20	0,40	30	1-15	191-257	2	0,04	50
Moyenne	23,43			13,93	0,58	10,07			0,57	0,02	24,00
Dev std	12,95			8,66	0,14	7,15			0,94	0,04	13,21

*B. macrocarpa* est beaucoup plus pauvre en nombre d'allèles que *B.v. maritima*, et ce, quelque soit le locus ou la population analysé(e). Le polymorphisme du locus 1029 est étonnamment élevé, notamment chez *B. macrocarpa* avec trois fois plus d'allèles que la moyenne des autres locus.

Pour la majorité des locus, la gamme de taille des allèles de *B. macrocarpa* est incluse dans celle des allèles de *B.v. maritima* excepté pour GTT 1, SB04, 1027 et 1029.

Les allèles rencontrés chez *B. macrocarpa* sont en quasi-totalité partagés avec des allèles de *B.v. maritima*. Seuls 2% des allèles (=7 allèles) rencontrés chez *B. macrocarpa* sont spécifiques de cette espèce alors que chez *B.v. maritima*, ce chiffre s'élève à 58% en moyenne.

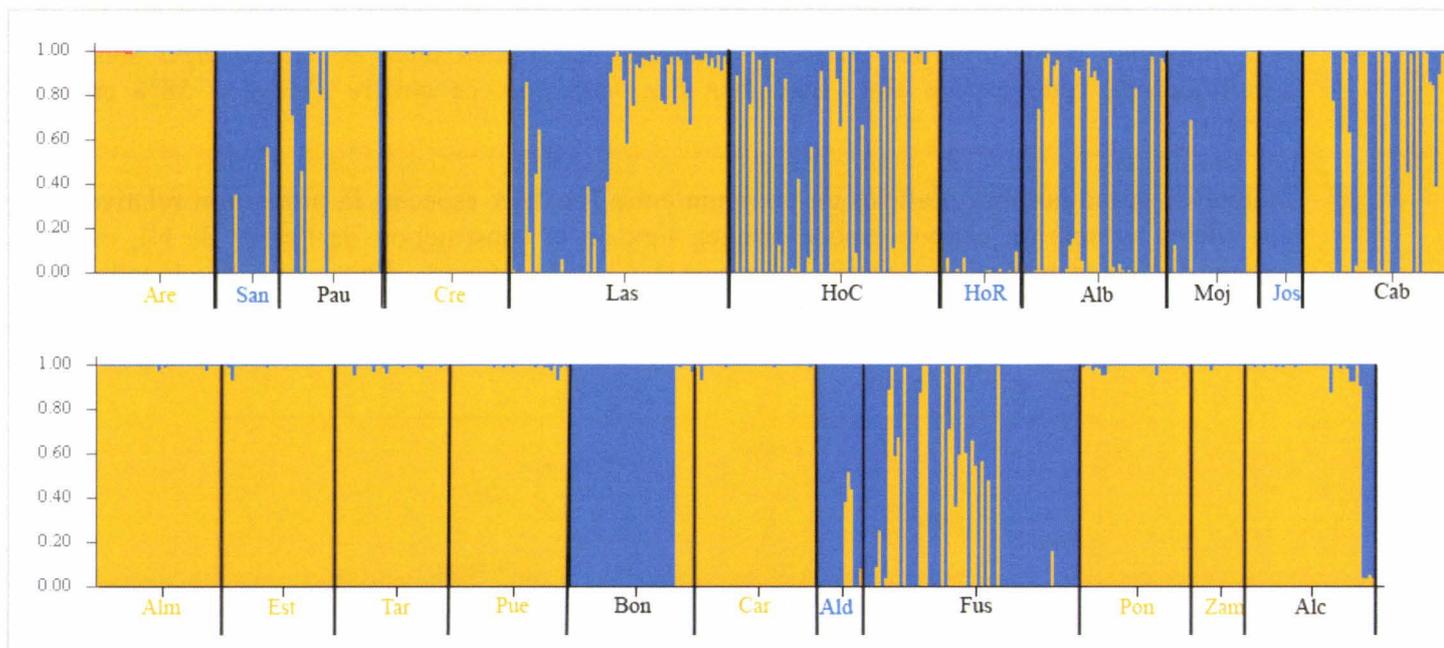
Malgré ce grand nombre d'allèles en commun entre les deux espèces, la proportion relative des allèles au sein de chaque espèce permet, lors de la construction de l'arbre de NJ, de séparer distinctement les deux espèces (figure 41). Cet arbre montre, d'autre part, que la taille des branches reliant les populations à l'intérieur de chaque espèce est plus élevée chez *B.v. maritima*.



**Figure 41 : Arbre de NJ de populations construit sur les données microsatellites incluant les 2 taxons**  
 Les noms de populations précédés d'un « M » indiquent qu'il s'agit de populations de *B. macrocarpa*.

Au vu des génotypes identifiés, un test d'assignation a été mené avec le logiciel STRUCTURE (figure 42) afin de déterminer si, pour  $K=2$  :

- les deux groupes génétiques formés (visualisés par les couleurs orange et verte) correspondent aux deux taxons *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* ;
- l'assignation réalisée sur des caractères génétiques est concordante avec celle qui avait été faite, pour chaque individu, en milieu naturel sur des caractères morphologiques.
- des génotypes de type intermédiaire peuvent être détectés.



**Figure 42 : Part relative d'assignation des individus pour  $K=2$  (d'après le logiciel STRUCTURE)**

Chaque individu (= barre verticale) est assigné selon ses ressemblances génétiques à *B.v. maritima* (proportion de couleur orange) et/ou *B. macrocarpa* (bleue). La couleur du nom de population renseigne sur l'assignation qui avait été faite sur le terrain, selon les caractères morphologiques (orange = population *B.v. maritima*, bleu = population de *B. macrocarpa*, noir = sympatrie).

À quelques très rares exceptions près, la détermination de l'espèce via des caractères morphologiques (notamment par le port général de la plante, la disposition, la forme et la taille des glomérules et l'état phénologique de la plante), est congruente avec l'assignation génétique présentée ci-dessus. Les individus représentés par une barre verticale orange étaient taxonomiquement classés dans l'espèce *B.v. maritima* et ceux visualisés par une barre verticale bleue étaient classés chez *B. macrocarpa*.

Ceux pour lesquels il n'y avait pas concordance ont été cultivés en serre afin de réajuster leur classement le cas échéant.

Quelques individus montrent des barres verticales « hybrides » c'est à dire qu'ils sont assignés génétiquement aux deux espèces en proportions  $>40\%$ . Ils font l'objet d'un traitement particulier dans le point suivant C.III.

b) AU NIVEAU CYTOPLASMIQUE

Étant donné le caractère non recombinant des marqueurs minisatellites, la diversité mitochondriale à l'échelle de l'espèce a été analysée au niveau des haplotypes et non plus des locus pris séparément. Un total de 25 haplotypes mitochondriaux a été rencontré sur l'aire d'étude chez *B.v. maritima* (tableau 17).

Tableau 17 : Proportion des haplotypes minisatellites par espèce

Haplotype	<i>B.v. maritima</i> (%)	<i>B. macrocarpa</i> (%)
1112	0,58	
1122	4,09	
1123	0,39	
2114	5,65	
2124	0,19	
2144	0,19	
3112	4,29	
3122	4,68	
4122	35,87	96,89
5112	1,17	
5122	15,59	3,11
6122	3,90	
6123	0,78	
6142	0,19	
7112	0,19	
7113	0,19	
7114	1,75	
7115	0,39	
7122	0,39	
7123	6,24	
8122	5,07	
8142	0,58	
8221	1,56	
9122	5,85	
9125	0,19	

Deux haplotypes sont majoritaires, l'un représenté par plus d'un tiers des individus (haplotype « 4122 ») et l'autre par le quart (haplotype « 5122 »). Ces deux haplotypes majoritaires chez *B.v. maritima* sont aussi les deux seuls que l'on a identifié chez *B. macrocarpa*.

L'haplotype « 4122 » chez *B. macrocarpa* est présent dans toutes les populations et retrouvé dans près de 97% des individus. L'haplotype « 5122 » est relativement rare et uniquement présent dans les populations d'Albox, Santa Paula et Paula del Este (Est de l'Espagne).

Étant donnée la faible diversité mitochondriale chez *B. macrocarpa*, la plupart des populations se trouvent regroupées sur une même branche de l'arbre (figure 43). La population de *B.v. maritima* de Bonanza partage cette place.

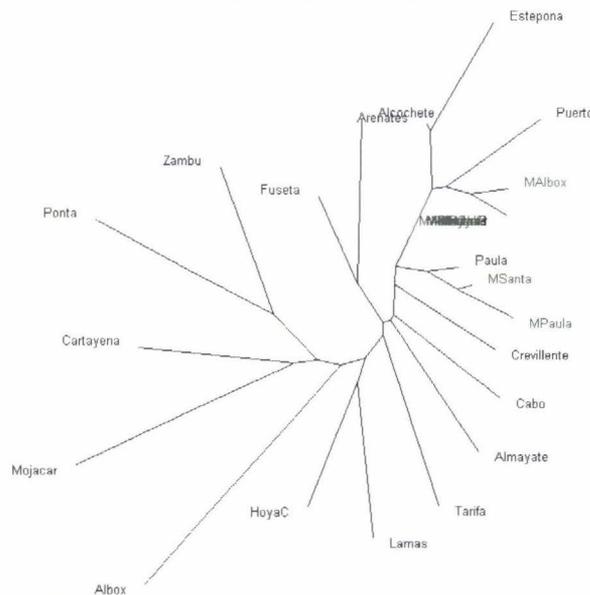
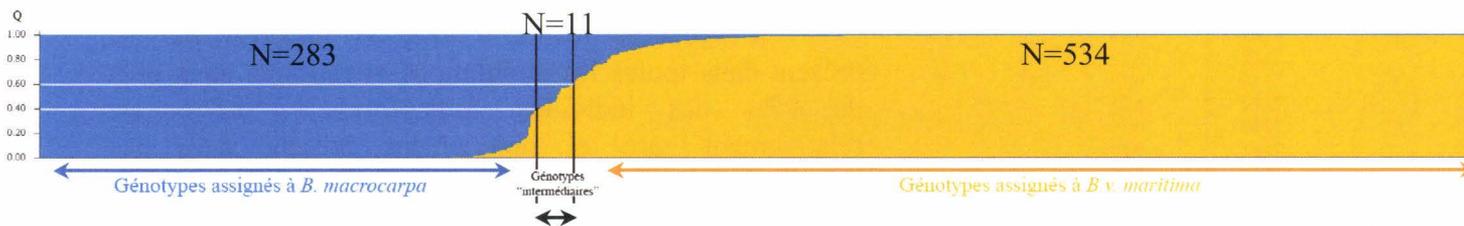


Figure 43 : Arbre de NJ de populations construit sur les données minisatellites incluant les 2 taxons. Les noms de populations précédés d'un « M » et encadrés en gris indiquent qu'il s'agit de populations de *B. macrocarpa*.

Contrairement à l'arbre obtenu avec des données nucléaires, celui-ci ne permet pas de différencier distinctement les deux espèces. Il n'y a, en effet, aucun haplotype spécifique de l'espèce *B. macrocarpa*.

### C.III. CARACTERISATION GENOTYPIQUE, PHENOTYPIQUE ET CYTOMETRIQUE DES HYBRIDES

Les individus pour lesquels le génotype n'est pas assigné à plus de 60% à l'une ou l'autre des espèces (figure 44) seront dans la suite de ce chapitre nommés « génotypes intermédiaires ».



**Figure 44 : Génotypes classés par proportion d'assignation (Q) croissante à *B.v. maritima***

Les individus présentant une valeur d'assignation (Q) à *B.v. maritima* < 40% sont assignés à *B. macrocarpa* ; entre 40 et 60%, ils sont considérés comme de génotype « intermédiaire » ; et > 60%, ils sont assignés à *B.v. maritima*.

Les taux d'hétérozygotie observée ( $H_o$ ) de chacun de ces trois « groupes » (= *B.v. maritima*, *B. macrocarpa* et intermédiaires) ont été estimés par le logiciel FSTAT (Goudet, 1995) à respectivement 0,67, 0,04 et 0,69.

N'ont été pris en compte, dans l'analyse, que les génotypes pour lesquels il n'y avait pas plus d'un locus (sur les 14) de données manquantes. L'espèce *B.v. maritima* (assignation > 90%) représente 60% de l'échantillonnage et *B. macrocarpa* 33% (assignation à *B.v. maritima* < 10%), les 7% restants n'ont pas une assignation « pure ». Étant donnée la méthode de prospection qui s'est voulue la plus exhaustive possible sur ce secteur, ces proportions relatives d'espèces reflètent, pour une bonne part, celles qui existent en milieu naturel.

Un peu plus de 1% des individus échantillonnés montrent un génotype intermédiaire qui reflète à la fois des caractéristiques de *B.v. maritima* et de *B. macrocarpa* en grande proportion (entre 40 et 60% de chaque espèce).

La répartition géographique de tous les individus, désormais assignés génétiquement à *B.v. maritima*, à *B. macrocarpa* ou de génotype « intermédiaire » ( $40 < q < 60$ ), est illustrée ci-dessous (figure 45).

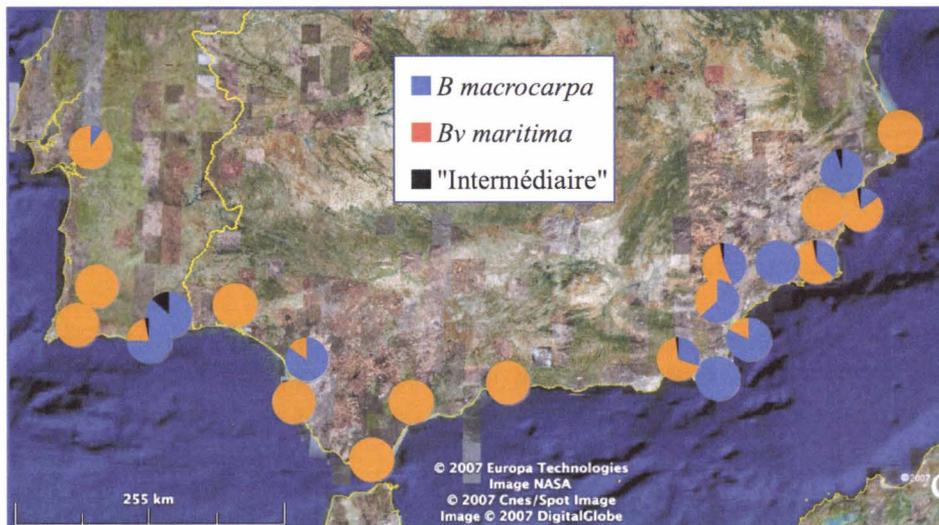


Figure 45 : Distribution et assignation des individus de l'étude

Les individus de génotype hybride sont rares et localisés dans deux foyers : un à l'ouest (au sud du Portugal) qui concerne les populations de Fuseta et Aldeia Nova et un à l'Est de l'Espagne. Certains avaient été diagnostiqués sur le terrain de type *B.v. maritima*, d'autres de type *B. macrocarpa*.

Ces individus « intermédiaires » ne se rencontrent jamais dans les populations où ne vivent que des individus *B.v. maritima*.

Leurs haplotypes minisatellites sont de type « 4122 » sauf pour un individu de Santa Paula qui est de type « 5122 ». Ces deux types sont rencontrés à la fois chez *B. macrocarpa* et chez *B.v. maritima* (ce sont les plus courants) (tableau 17).

Des hybrides allotétraploïdes naturels issus de croisements entre les espèces diploïdes *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* sont connus dans les îles des Canaries. Afin de déterminer si un tel événement d'hybridation se serait produit sur la péninsule ibérique, il a été réalisé une analyse en cytométrie de flux permettant d'évaluer le niveau de ploïdie des individus. Tous les individus analysés sont diploïdes excepté un individu qui s'est révélé tétraploïde dans la population de Fuseta, population pour laquelle le diagnostic morphologique n'était pas toujours aisé, avec beaucoup de formes « intermédiaires ».

Cet individu tétraploïde a une assignation de 0,484-0,516 aux espèces respectivement *B. macrocarpa* et *B.v. maritima* (d'après le logiciel STRUCTURE). Les allèles qu'il renferme sont rencontrés chez les individus diploïdes de la population ou de la population adjacente. Sa morphologie est hybride entre celle des deux espèces supposées parentales. Son cytoplasme est celui que l'on observe le plus fréquemment à la fois chez *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* ce qui ne permet pas de trancher sur le sens de l'hybridation.

## D. DISCUSSION

### **D.I. DIVERSITE ET STRUCTURATION GENETIQUE DE DEUX TAXONS A SYSTEMES DE REPRODUCTION DISTINCTS**

Un fort contraste en termes de diversité et de structure génétique a été observé entre les taxons *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* sur la base de données nucléocytoplasmiques (9 locus microsattellites et 4 locus minisatellites).

Conformément aux attendus théoriques pour des espèces autogames (cf Cadre théorique), les populations de *B. macrocarpa* présentent un faible polymorphisme associé à une très forte structure génétique alors qu'inversement, celles de *B.v. maritima* sont caractérisées par une forte diversité et une faible structure génétique. Cette dernière espèce montre toutefois d'importants déficits en hétérozygotes qui pourraient résulter de microstructuration à une échelle locale comme cela a déjà été démontré chez cette espèce (Raybould *et al.*, 1998; Laporte *et al.*, 2001; Viard, 2001 ). Cette hypothèse se trouve étayée par la concordance entre les proximités génétiques des populations et leurs proximités écogéographiques qui suggérerait un rôle important de la microadaptation locale des individus aux conditions édaphiques et climatiques.

### **D.II. RELATIONS GENETIQUES ENTRE LES DEUX TAXONS**

Excepté pour de très rares cas, aucun type morphologique intermédiaire n'avait été recensé lors de la prospection. La distribution sympatrique des deux taxons, les différences morphologiques sans ambiguïté et l'assignation presque exhaustive (93%) des individus à l'un ou l'autre des taxons ( $q > 90\%$ ) depuis les données nucléaires confirment que ces deux taxons sont bien des espèces distinctes reproductivement isolées.

Toutefois 7% des individus ont montré des génotypes de types intermédiaires n'excluant pas l'hypothèse de rares cas d'hybridation entre les deux espèces. Il est à noter que les bornes définies arbitrairement (entre 40% et 60% d'assignation aux 2 groupes) mettent en lumière les génotypes hybride probablement les plus récemment formés, ce que défend d'autre part des taux d'hétérozygotie élevés pour ces hybrides. Ce choix reste réducteur s'il n'est pas, dans un deuxième temps, complété par un focus sur tous les génotypes pour lesquels l'assignation n'est pas totale à l'un ou à l'autre groupe.

Parmi les individus assignés à plus de 60% à *B.v. maritima*, 6,74% le sont en dessous de 90% dénotant une introgression de *B. macrocarpa* vers *B. v. maritima*. De même, mais dans une moindre mesure, 4,24% des individus à assignation majoritaire à *B. macrocarpa* révèle une ressemblance de plus de 10% à *B.v. maritima*.

Etant donné que les haplotypes mitochondriaux de *B. macrocarpa* sont partagés avec les plus courants chez *B.v. maritima*, il est, à l'heure actuelle, impossible de savoir si l'hybridation implique toujours la même espèce parentale productrice de graines.

D'autre part, la distribution des proportions d'assignation pour les individus « non purs » (= assignation < 100% à chaque espèce) (figure 44) est relativement asymétrique

suggérant que les phénomènes d'introggression ont lieu plus souvent de *B. macrocarpa* vers *B.v. maritima*. La forme continue de la courbe montre que ces phénomènes d'introggression ont lieu sur plusieurs générations.

Il en est de même pour l'individu tétraploïde rencontré dans la commune de Fuseta. Des données de séquences chloroplastiques, par exemple, permettraient de trancher quant à l'espèce à laquelle appartient le parent receveur de pollen. En effet, les séquences chloroplastiques réalisées dans le premier chapitre de ce mémoire ont montré qu'il était aisé de différencier des cytoplasmes de *B.v. maritima* et des cytoplasmes *B. macrocarpa*.

# CHAPITRE IV. ORIGINES ET DIVERSITE DES *BETA MACROCARPA* TETRAPLOIDES ENDEMIQUES DES CANARIES

## RESUME



L'espèce *Beta macrocarpa* tétraploïde endémique des Canaries est un hybride naturel issu d'un croisement entre *Beta v. maritima* et *Beta macrocarpa* diploïde. Cette espèce n'avait été jusqu'à présent que très peu étudiée comme le confirme son identification taxonomique ambiguë.

Des prospections sur l'archipel canarien en 2005 et des analyses en cytométrie de flux ont permis de mettre en évidence la présence sur ces îles d'une des deux espèces parentales, notamment sur les îles les plus orientales et, pour près de la moitié des cas, elle est rencontrée en sympatrie avec l'espèce allotétraploïde.

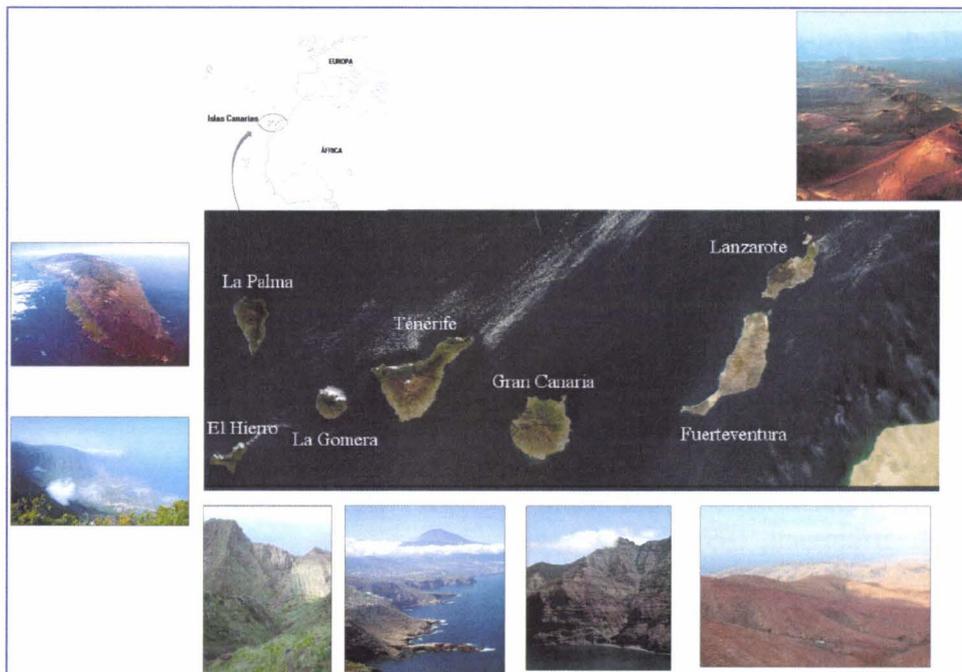
Une analyse génétique (de 9 locus microsattellites nucléaires et 4 locus minisattellites mitochondriaux) conduite sur 145 individus issus de 30 populations canariennes n'a révélé aucun polymorphisme pour l'espèce parentale *B. macrocarpa* 2X et a mis en évidence deux groupes génétiques largement contrastés chez *B. macrocarpa* 4X suggérant au moins deux voies distinctes de colonisation de l'archipel. L'établissement durable de ces populations semble étroitement lié à la nature du substrat colonisé.

L'analyse en conditions contrôlées de ces mêmes individus a permis d'identifier les caractères diagnostiques dans la reconnaissance des espèces *B. macrocarpa* 2X et *B. macrocarpa* 4X morphologiquement proches.

## A. INTRODUCTION

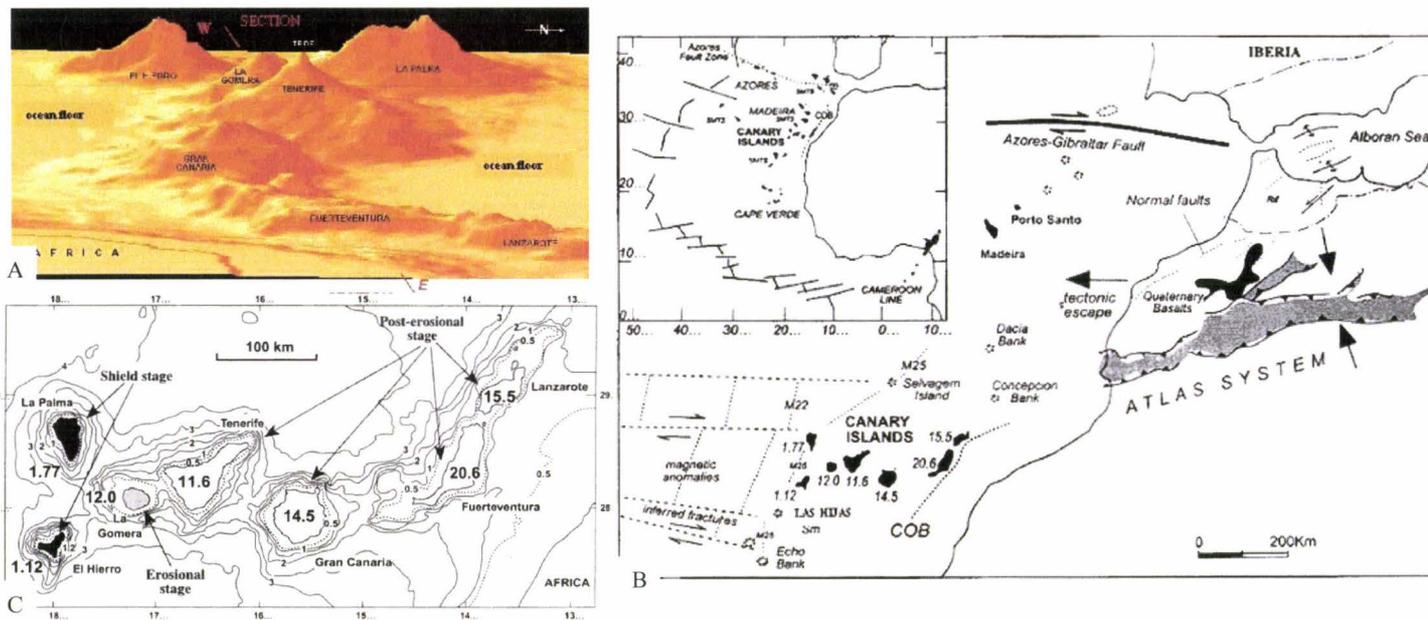
Les systèmes insulaires ont depuis longtemps captivé les évolutionnistes du fait de leurs conditions expérimentales exceptionnelles dans l'étude de la spéciation (Mayr, 1967; Wagner & Funk, 1995; Grant, 1998; Juan *et al.*, 2000; Bidegaray-Batista *et al.*, 2007) ou dans les études phylogéographiques (Francisco-Ortega *et al.*, 1996; Emerson *et al.*, 2000a; Hewitt, 2001; Gomez *et al.*, 2003).

L'archipel des Canaries, localisé au Nord-Ouest des côtes africaines, est composé de sept îles principales: Lanzarote, Fuerteventura, Gran Canaria, Ténérife, La Goméra, La Palma et El Hierro (figure 46). Les îles de l'Est sont caractérisées par des habitats plus arides que celles de l'ouest étant donné l'effet cumulé d'une érosion intensive qui empêche la rétention des vents humides du Nord-Est, et de l'action des vents secs chargés de poussières provenant du désert Saharien tout proche (Juan *et al.*, 2000).



**Figure 46 : Localisation et paysages des îles Canaries**

Cet archipel volcanique a été formé sur un point chaud, d'où un alignement de ces îles et un cline dans leurs âges relatifs : les îles de l'est sont plus anciennes que celles de l'ouest (Carracedo *et al.*, 1998). Fuerteventura et Lanzarote ont été formées il y a 15-20 millions d'années, Gran Canaria il y a 13,5-15 MA, Ténérife et La Gomera il y a 11-12 MA, La Palma et El Hierro moins de 2 MA (figure 47). Les cycles éruptifs ont été séparés par de longues périodes d'inactivité propices à une érosion intense.



**Figure 47 : Caractéristiques géodynamiques du secteur étudié (Carracedo *et al.*, 2002)**

A : Relief de l'archipel selon une section Est-Ouest (simulation sans l'océan); B : Caractéristiques géodynamiques de la Macaronésie ; C : Age relatif du volcanisme sur chaque île de l'archipel des Canaries



Aucune de ces îles ne semble avoir été connectée au continent africain même si les distances entre îles ou entre îles-continent ont pu être plus courtes pendant les âges glaciaires étant donné un niveau des mers plus faible.

Au vu des courants aériens et marins majeurs (du Nord-Est au Sud-Ouest), les Canaries ont potentiellement deux sources principales possibles de colonisateurs : le Nord-Ouest de l'Afrique et la péninsule ibérique (Juan *et al.*, 2000).

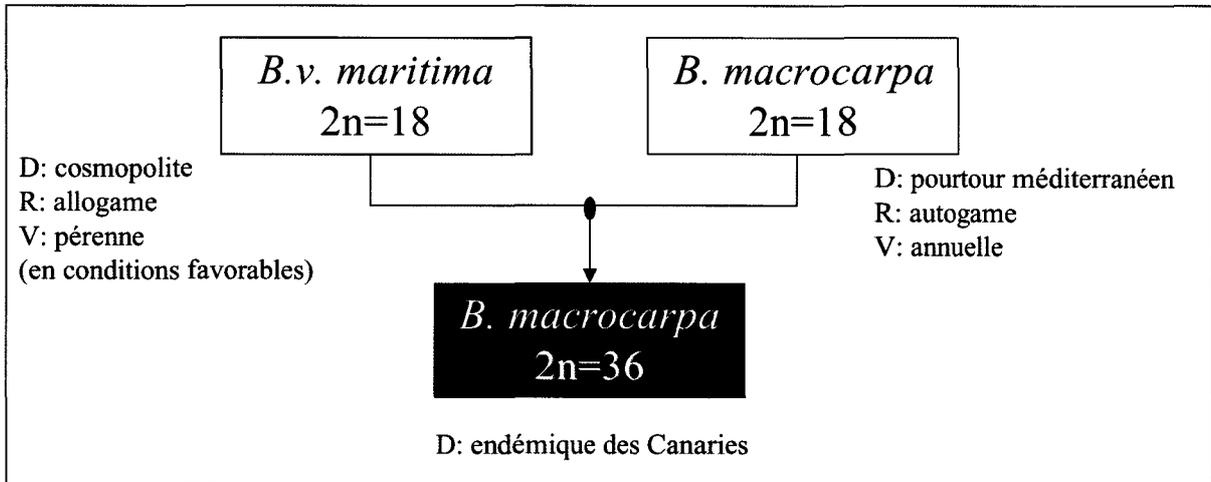
D'autre part, l'endémisme de cet archipel est très élevé puisqu'il concerne 25 à 45% de la flore native (Bramwell, 1990).

Ces différentes caractéristiques font de cet archipel océanique un excellent système d'étude de phénomènes de colonisation et de diversification des organismes. Ainsi, plusieurs scénarios évolutifs ont été proposés quant au modèle de colonisation des îles, et différent selon les organismes :

- un modèle en « stepping stones » des îles les plus anciennes vers les plus récentes (le lézard *Gallotia galloti*, Thorpe *et al.*, 1994; des insectes du genre *Pimelia*, Juan *et al.*, 1995; la mouche *Drosophila subobscura*, Pinto *et al.*, 1997; l'olivier cultivé *Olea europea*, Hess *et al.*, 2000) ;
- un modèle où les phénomènes d'extinction et de recolonisation des périodes d'intense activité volcanique sont les principaux facteurs régissant la distribution de la diversité génétique (un lézard du genre *Chalcides* Brown & Pestano, 1998) ;
- un modèle de colonisations multiples indépendantes depuis le continent (la graminée *Dactylis glomerata*, Sahuquillo & Lumaret, 1999; des coléoptères du genre *Calathus*, Emerson *et al.*, 2000b; des astéracées du genre *Tolpis*, Park *et al.*, 2001; la malvacée *Lavatera*, Fuertes-Aguilar *et al.*, 2002).

Ainsi, la région méditerranéenne a servi de source génétique pour la plupart des introductions, en Macaronésie mais quelques groupes proviendraient de sources plus lointaines : *Silene* L. et *Saxifraga* L. depuis la Sibérie (Clement *et al.*, 1997; Vargas *et al.*, 1999) et *Pericallis* D. (Panero *et al.*, 1999) depuis l'Amérique du Nord.

*Beta macrocarpa* 4X est endémique des Canaries (bien qu'un individu ait été retrouvé au Portugal, cf chapitre précédent). Les analyses moléculaires récentes (cf chapitre I) confirment l'origine allotétraploïde de cette espèce (figure 48), issue d'un croisement entre *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* 2X donneur de pollen.



**Figure 48 : Relations entre les 3 espèces d'étude**

D= distribution géographique ; R= régime de reproduction ; V= cycle de vie

Ce chapitre présente une étude phylogéographique des espèces de la section *Beta* présentes aux Canaries. Les trois objectifs majeurs ont été les suivants :

- la détermination des espèces de la section *Beta* présentes aux Canaries ;
- l'analyse de la diversité et de la structuration génétique des individus au sein de l'archipel ;
- l'émission d'hypothèses quant aux sources génétiques et aux voies de colonisation des îles depuis le continent ;
- l'identification de critères morphologiques et phénologiques diagnostiques dans la détermination des différentes espèces.

## B. MATERIEL ET METHODES

### B.I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Une campagne de prospection des 3 espèces d'études (*B.v. maritima*, *B. macrocarpa* 2X et *B. macrocarpa* 4X) menée par J. CUGUEN, F. ROUX et moi-même sur les 7 îles que compte l'archipel des Canaries en mai 2005 a permis de récolter des graines de 30 populations d'une vingtaine d'individus minimum sur les 5 îles les plus orientales (figure 49).

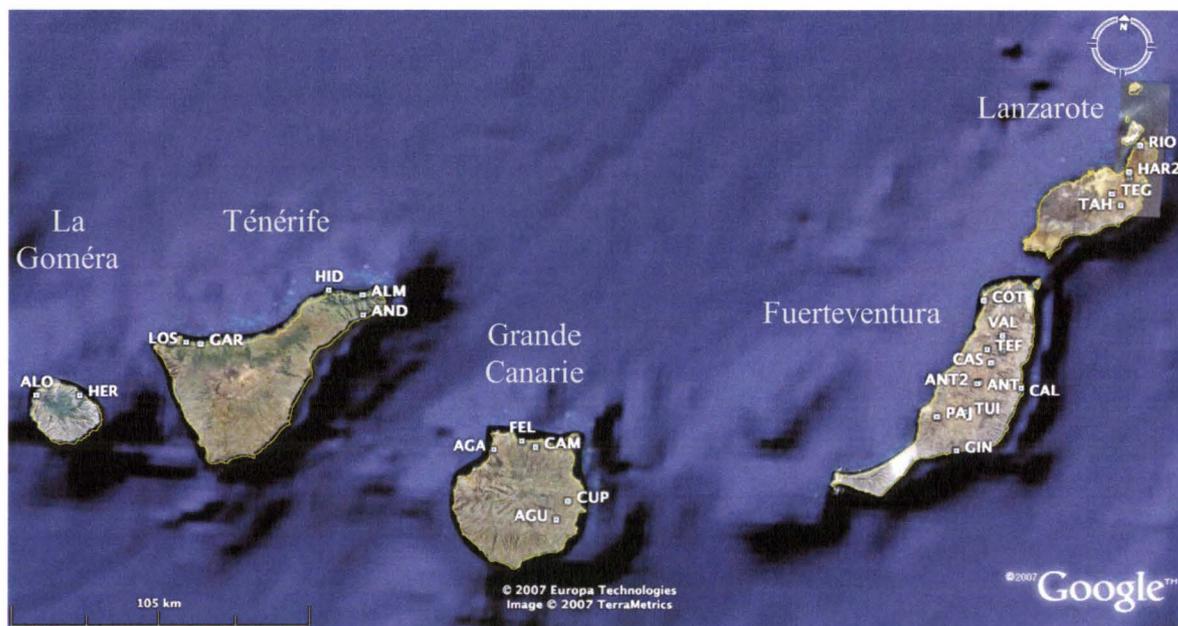


Figure 49 : Localisation des sites d'échantillonnage

Le détail géographique et écologique de ces sites est synthétisé dans le tableau 18.

Tableau 18 : Détail des sites d'échantillonnage

N= Nb d'individus ayant servi à la présente étude.

Nom	N	Island	Site	Coord N	Coord WO	Elevation	Habitat
ANT	6	Fuerteventura	Antigua	N 28°25,504'	WO 14°00,711'	280 m	Bord de route, rudéral
ANT2	5	Fuerteventura	Exit Antigua	N 28°25,315'	WO 14°01,098'	271 m	Terrain vague, fond de jardin
CAL	3	Fuerteventura	Caleta de Fuste	N 28°24,825'	WO 13°51,341'	61 m	Rond point, terrain vague
CAS	5	Fuerteventura	Castillas del Angel	N 28°29,413'	WO 13°58,274'	233 m	Talus sec derrière maisons
COT	8	Fuerteventura	El Cotillo	N 28°41,257'	WO 14°00,745'	19 m	Entre plage et route
GIN	2	Fuerteventura	Ginjinar	N 28°12,118'	WO 14°04,456'		Remblais. Bord de route
PAJ	5	Fuerteventura	Pajara	N 28°18,479'	WO 14°08,962'	196 m	Sur sable derrière bord de route
TEF	6	Fuerteventura	Tefia	N 28°31,965'	WO 13°59,391'	175 m	Remblais, milieu naturel
TET	7	Fuerteventura	Tetir	N 28°31,877'	WO 13°55,901'	289 m	Mari sur bords de routes, sympatrie sur terrain vague
TUI	5	Fuerteventura	Tuineje	N 28°19,670'	WO 14°03,116'	224 m	Terrain vague
VAL	5	Fuerteventura	Vallebron	N 28°34,746'	WO 13°56,137'	261 m	Ancien champ
AGA	5	Gran Canaria	Agaete	N 28°06,604'	WO 15°41,926'	106 m	Talus rouge friable bord de route
AGU	1	Gran Canaria	Aguimes	N 27°54,129'	WO 15°27,453'	332 m	Talus sable rouge
BL	4	Gran Canaria	Cambalud	N 28°07,661'	WO 15°32,865'	235 m	Sabloneux
CUP	3	Gran Canaria	Cuatro puertas	N 27°57,762'	WO 15°25,396'	244 m	Talus rouge friable bord de route
FEL	6	Gran Canaria	San Felipe	N 28°08,644'	WO 15°35,857'	24 m	Butte, talus rouge friable près plage (sale!)
ALO	4	La Gomera	Alojera	N 28°09,883'	WO 17°19,928'	133 m	Talus rouge caillasseux
HER	5	La Gomera	Playa de Hermigua	N 28°10,674'	WO 17°10,715'	14 m	Fond talweg sec
HAR	3	Lanzarote	Near Haria	N 29°06,462'	WO 13°30,805'	550 m	Remblais bord de route
HAR2	1	Lanzarote	Near Haria	N 29°07,545'	WO 13°30,903'	582 m	Remblais
RIO	6	Lanzarote	Mirador del Rio	N 29°12,789'	WO 13°28,838'	468 m	Naturel, ravine
TAH	5	Lanzarote	Tahiche	N 29°01,168'	WO 13°32,308'	168 m	Talus rouge
TEG	7	Lanzarote	Teguis	N 29°03,237'	WO 13°34,272'	249 m	Remblais bord de route
ALM	7	Tenerife	Almaciga	N 28°34,263'	WO 16°11,943'	77m	Talus sable rouge friable
AND	6	Tenerife	San Andres	N 28°30,516'	WO 16°11,531'	36 m	Talus rouge friable assez gras
BUE	5	Tenerife	Playa de Buena Vista	N 28°22,253'	WO 16°52,264'	18 m	Plage galets/sable noir, rocailles
BUE2	2	Tenerife	Golf de Buena Vista	N 28°22,153'	WO 16°51,551'	106 m	Terre meuble
GAR	5	Tenerife	Garachico	N 28°22,459'	WO 16°45,483'	22 m	Rochers/galets face à la mer + terrain vague derrière
HID	5	Tenerife	Punta del Hidalgo, playa	N 28°34,668'	WO 16°19,164'	17 m	Plage de galets
LOS	5	Tenerife	Playa Los Silos	N 28°22,563'	WO 16°48,540'	106 m	Talus et plage de galet (et + plus haut sur talus rouge friable belle pop)

Parmi la vingtaine d'individus échantillonnés par population, 8 ont été semés en serre afin d'en extraire l'ADN (pour les analyses moléculaires) et d'en prélever des feuilles fraîches (pour l'analyse en cytométrie de flux). Dans le tableau 15, N représente le nombre d'individus s'étant développés et dont l'ADN a servi pour les études génétiques. Ainsi, toutes espèces confondues, 145 individus issus de 30 populations ont été analysés.

## **B.II. METHODE**

### **a) LA DETERMINATION DES NIVEAUX DE PLOÏDIE**

Les analyses en cytométrie de flux ont été réalisées comme précédemment, par P. DEVAUX.

### **b) LES MARQUEURS MOLECULAIRES**

Des feuilles de ces mêmes individus issus de graines canariennes ont été prélevées en serre puis séchées à l'étuve à 55°C pendant 24H. L'extraction d'ADN sur 10 mg de feuilles sèches a été réalisée selon les mêmes protocoles que décrits dans les chapitres précédents.

Deux types de marqueurs ont été utilisés :

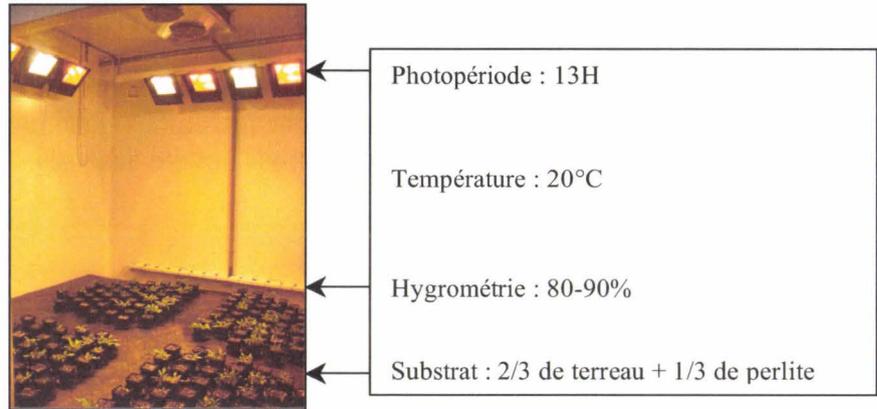
- dix marqueurs microsatellites nucléaires : BVM3 (Mörchen *et al.*, 1996), GAA1, GCC1, GTT1, CAA1, (Viard *et al.*, 2002), SB04, SB06, SB07, SB15 (Richards *et al.*, 2004), et FDSB1027 (McGrath *et al.*, 2007) ;
- quatre marqueurs minisatellites mitochondriaux : TR1, TR2, TR3, TR4 (Nishizawa *et al.*, 2000).

Les protocoles de manipulations de ces marqueurs et les logiciels d'analyses sont les mêmes que ceux décrits dans le chapitre précédent pour ces mêmes marqueurs.

### **c) LES CONDITIONS EXPERIMENTALES DE CULTURE EN SERRE**

Parallèlement aux analyses génétiques, une étude des différences morphologiques et phénologiques a été réalisée (sur les mêmes individus) en conditions contrôlées.

Ces conditions ont été déterminées afin de recréer au mieux les conditions naturelles rencontrées aux Canaries durant la période pendant laquelle les individus réalisent leur cycle de vie (début de germination aux environs de début avril, sénescence vers juin). La salle de culture (figure 50) a donc été éclairée 12H/jour. Deux phases d'éclairement plus faible de 30 min chacune précèdent et succèdent à cette phase afin de simuler le lever et le coucher du soleil. Le substrat rencontré en conditions naturelles n'étant pas disponible en France, il a été réalisé un mélange de 2/3 de terreau et 1/3 de perlite afin de s'approcher des conditions de « porosité » du substrat naturel.



**Figure 50 : Conditions expérimentales de culture**

Le placement des individus dans la salle s'est fait selon la numérotation aléatoire des individus par le logiciel EXCEL.

Le plateau sur lequel sont disposés les pots subit une rotation continue limitant ainsi les effets « environnement » sur le développement des plantes.

Les caractères qui ont été évalués sont les suivants :

- port général de la plante (un numéro, de 1 à 4 a été attribué aux 4 types de port rencontrés, 1=grosses feuilles, tiges épaisses et cannelées, aspect Beta cultivée, 2= pas de hampe principale, hampes dressées très hautes cf figure 58.A, 3= une petite hampe principale dressée, les autres rampantes cf figure 58.B de gauche, 4= plante rampante cf figure 58.B de droite),
- hauteur totale de la plante en fin de floraison,
- hauteur du premier glomérules,
- nombre de glomérules total par plante,
- taille du plus gros glomérule,
- date de germination (nombre de jours après plantation),
- date de floraison (nombre de jours après germination),
- date de fin de floraison (nombre de jours après germination).

La majorité des caractères morphologiques avaient été décrits comme diagnostiques des espèces dans la section *Beta* par Letschert (1993).

## C. RESULTATS

### C.I. ESPECES PRESENTES AUX CANARIES

Le diagnostic sur caractères morphologiques est relativement aisé en conditions naturelles pour différencier *B.v. maritima* et *B. macrocarpa*. Toutefois, aucune donnée bibliographique n'est disponible quant aux particularités morphologiques de *B. macrocarpa* 4X par rapport à *B. macrocarpa* 2X.

#### a) LE CAS DE *B.V. MARITIMA*

Seuls quelques individus de *Beta vulgaris* sp ont été observés sur les îles de Ténérife et Fuerteventura. Étant donné leur proximité avec des jardins potagers ou des champs et leur aspect, il est très probable qu'il s'agisse d'« échappées de jardin » issue d'anciennes *Beta vulgaris vulgaris* (betterave cultivée) et non de betterave sauvage maritime.

#### b) LE CAS DES *B. MACROCARPA* 2X ET 4X

Les données concernant les espèces présentes aux Canaries sont très succinctes et n'y était consignée que *B. macrocarpa* 4X.

Il a donc été réalisé dans un deuxième temps une analyse en cytométrie de flux sur les individus échantillonnés (tous diagnostiqués « *B. macrocarpa* ») afin d'en connaître la ploïdie.

Étonnamment, le type tétraploïde n'est pas l'unique présent aux Canaries mais coexiste avec l'espèce parentale diploïde comme cela avait été suggéré suite aux résultats du chapitre I. Une carte de répartition de ces niveaux de ploïdie chez *B. macrocarpa* est présentée ci-dessous (figure 51).

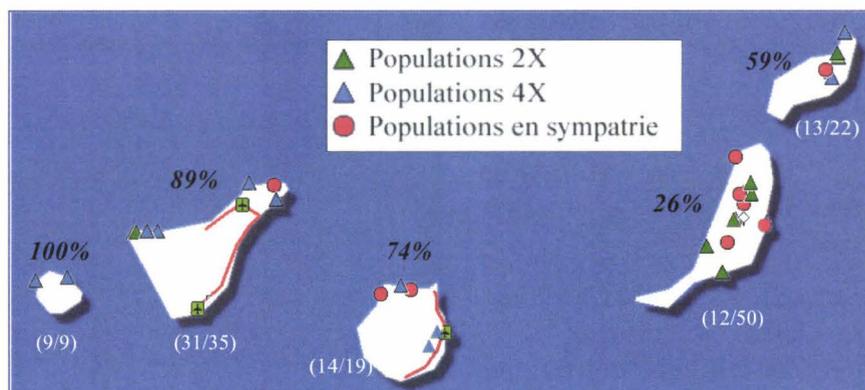


Figure 51 : Distribution et ploïdie des populations échantillonnées

Le nombre en blanc indique la proportion d'individus 4X sur le nombre total d'individus *B. macrocarpa* échantillonnés et le pourcentage figuré en noir correspond au pourcentage résultant de ce ratio.

Une tendance à l'augmentation des niveaux de ploïdie est observée d'Est en Ouest. Les populations « pures » de *B. macrocarpa* 4X sont en général rencontrées à une altitude inférieure à 200 m alors que les diploïdes sont souvent situées entre 200 et 400 et parfois jusqu'à 600 mètres. Les populations sympatriques sont rencontrées jusqu'à 300 mètres.

## C.II. DIVERSITE GENETIQUE DES POPULATIONS

### a) LE POLYMORPHISME MICROSATELLITE

Tableau 19 : Diversité allélique pour chaque locus chez *B. macrocarpa* 2X et 4X.  
N= nombre d'individus analysés

Le tableau ci-contre (tableau 19) recense les allèles et leurs proportions relatives dans les populations diploïdes et tétraploïdes canariennes pour chaque locus.

Le polymorphisme nucléaire chez les 56 *B. macrocarpa* 2X analysées est nul sur les 9 marqueurs microsateellites.

L'analyse de diversité génétique qui suit ne concernera donc plus que l'espèce tétraploïde.

Tous les individus sont hétérozygotes pour tous les locus excepté pour le locus Gtt1 et possèdent 2 allèles. La diversité allélique est très faible, le nombre d'allèles variant de 2 à 6 selon le locus. Excepté pour le locus SB07, tous les individus ont un allèle en commun, quel que soit le locus.

### b) LA STRUCTURATION GEOGRAPHIQUE DES GENOTYPES, LOCUS PAR LOCUS

Les 9 marqueurs microsateellites peuvent être classés en 3 groupes :

- ceux pour lesquels le génotype est le même pour tous les individus ;
- ceux pour lesquels les individus possèdent tous un allèle en commun ;
- celui pour lequel aucun allèle n'est rencontré chez tous les individus.

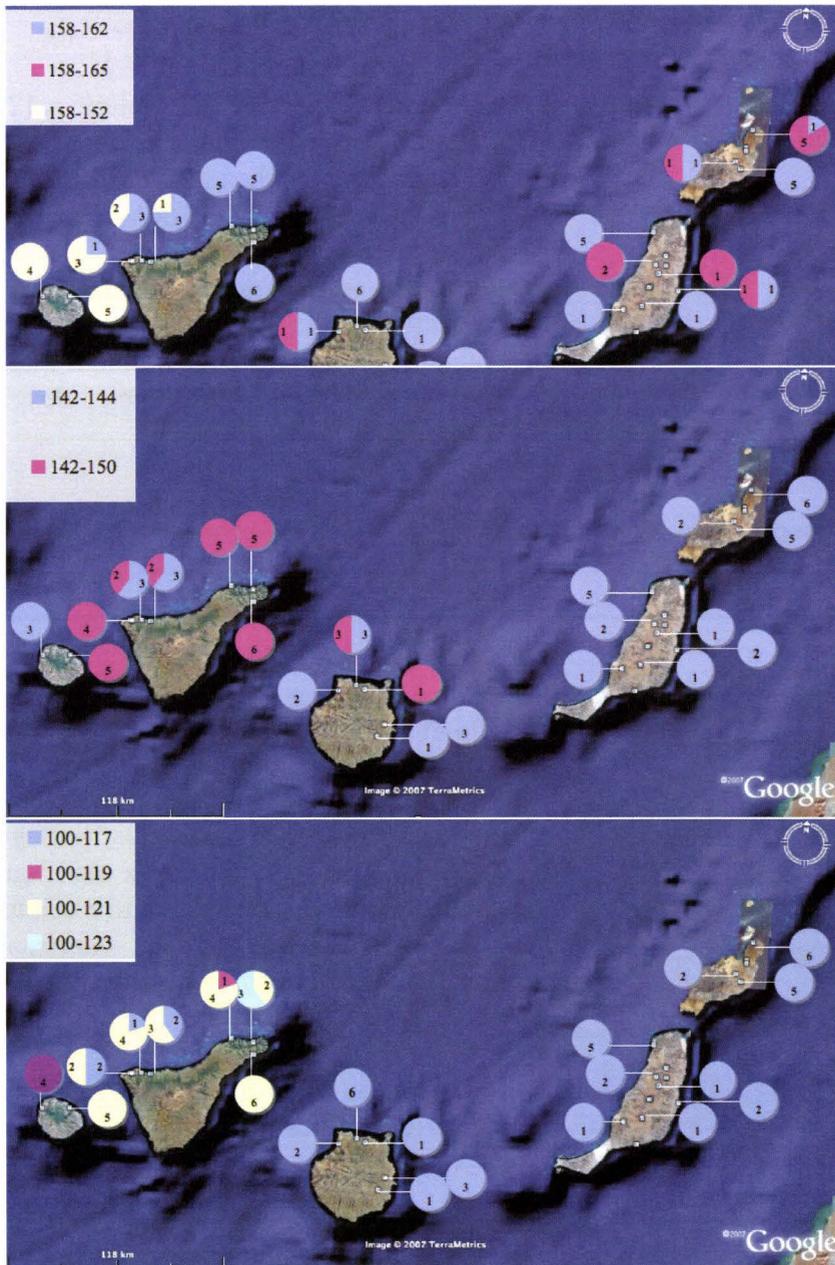
	<i>B. macrocarpa</i> 2X							<i>B. macrocarpa</i> 4X															TOTAL 77									
	TOTAL 56	FCAL 2	FCAS 1	FCOT 5	FPAJ 1	FTEF 2	FTUI 1	Fuerteventura 12	LRIO 6	LTAA 5	LTEG 2	Lanzarote 13	GCAGA 2	GCAGU 1	GCBL 1	GCCUP 3	GCFEL 6	Gran Canaria 13	TALM 5	TAND 6	TBUE 4	TGAR 5		THID 5	TLOS 5	Ténérife 30	GOALO 4	GOHER 5	La Goméra 9			
Gaa1																																
175	100,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50,00	50,00	50,00	50,00	
184		50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50,00	50,00	50,00	50,00	
SB04																																
173		50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50,00	50,00	50,00	50,00	
180	100,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50,00	50,00	50,00	50,00	
SB06																																
152																																
158	100,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	37,5	12,5		20	10,34	50	50	50,00	50,00	50,00	9,87	
162		25		50	50		50	33,33	8,3333	50	25	26,92	25	50	50	50	50	46,15	50	50	12,5	37,5	50	30	50,00	50	50	39,66	50,00	50,00	50,00	
165		25	50				50	16,67	41,667		25	23,08	25				3,85														7,24	
SB07																																
263		25	50			25	50	16,67	41,667	40	25	38,46	25		50	50	50	42,31	50	50	87,5	60	50	50	56,67	50	50	50,00	50,00	50,00	44,16	
264	100,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	25	25	23,08	50	50	12,5		20	10	16,67	50	50	50,00	50,00	50,00	32,47	
267		25		50	50	25		33,33	8,3333	10	25	11,54	25	50	50	25	25	34,62	50	50		40	30	40	26,67	50	50	50,00	50,00	50,00	23,38	
SB15																																
142	100,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50,00	50,00	50,00	50,00	
144		50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50		50	25	34,62	50	50		30	30		10,00	50	50	50,00	50,00	50,00	28,29	
150		50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50		50	25	15,38	50	50	50	20	50	20		40,00	50	50	50,00	50,00	50,00	21,71	
1027																																
175		50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50,00	50,00	50,00	50,00	
191	100,00	50	50	10		50		16,67																								2,60
201		50		40	50		50	33,33	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50		41,67	50	50	50,00	50,00	50,00	44,16	
202																								50		8,33					3,25	
Bvm3																																
100	100,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50,00	50,00	50,00	50,00	
111																																2,60
117		50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00			25	10		20	8,33						27,92	
119																															0,65	
121																															16,88	
123																															1,95	
Caa1																																
128		50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50		16,667	30,77	30,77	50	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50,00	50,00	21,43	
152																																28,57
156		50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50	50	50	50	50,00	50	50	50,00	50,00	50,00	50,00	
159	100,00																															
Gtt1																																

### Aux locus *Gaa1*, *SB04* et *Gtt*

Pour les locus *Gaa1* et *SB04*, tous les individus 4X ont le même génotype hétérozygote à deux allèles. Un des allèles est semblable à celui qui est rencontré chez toutes les *B. macrocarpa* 2X, l'autre est identique à un allèle rencontré chez des *B.v. maritima* continentales (analysées dans le chapitre I).

Le locus *Gtt1* suit ce schéma même si, pour certaines populations, les individus sont homozygotes (l'allèle à l'état homozygote est à la fois celui que l'on rencontre chez *B. macrocarpa* 2X et un de ceux identifiés chez *B.v. maritima*).

### Aux locus *SB06*, *SB15* et *Bvm3*



**Figure 52 : Distribution géographique des génotypes aux locus *SB06*, *Bvm3* et *SB15* respectivement**

Les chiffres correspondent aux nombres d'individus partageant le même génotype

Les locus *SB06*, *SB15* et *Bvm3* ne présentent que 2 allèles.

Les génotypes *B. macrocarpa* 2X et 4X partagent tous un allèle (sous réserve qu'ils soient effectivement identiques par séquençage mais ce résultat n'est pas disponible à l'heure actuelle).

Ainsi pour le locus *SB06*, tous les individus *B. macrocarpa* 2X sont de génotype 158-158, pour *SB15* ils sont de génotype 142-142 et pour *Bvm3* 100-100.

Les génotypes des individus 4X sont de type : allèle de *B. macrocarpa* 2X + 1 des allèles rencontrés chez *B.v. maritima* continentales.

Leur distribution est figurée ci-contre (figure 52). Dès à présent, il est clairement observable une différenciation dans la nature et la proportion des génotypes entre les îles de l'est et celles de l'ouest. Cette différenciation sera testée plus loin en tenant compte de tous les locus.

Les allèles de 4X « d'origine *B.v. maritima* » d'affinité occidentale (ex : allèle « 152 » au locus *SB06*, « 150 » au locus *SB15* ou « 123 » au locus *Bvm3*) sont souvent rencontrés chez les *B.v. maritima* de la face Atlantique/Mer du Nord. Ceux d'affinité orientale (ex : « 165 » au locus *SB06*, « 117 » au locus *Bvm3*) sont principalement rencontrés en méditerranée.

### Aux locus Caa1 et 1027

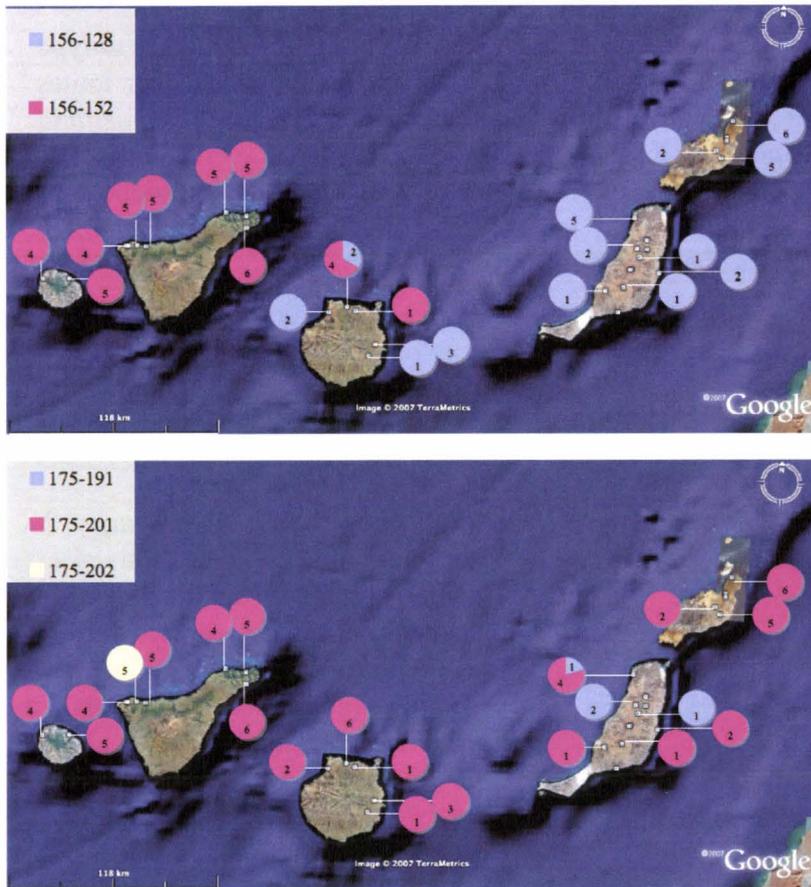


Figure 53 : Distribution géographique des génotypes aux locus Caa1 et 1027 respectivement

Les génotypes aux locus Caa1 et 1027 ont tous un allèle en commun (figure 53) mais cette fois il ne s'agit pas de l'allèle commun à toutes les *B. macrocarpa* 2X canariennes.

En effet, pour le locus Caa1, toutes les *B. macrocarpa* 2X canariennes sont de génotype 159-159 et pour le locus 1027, 191-191.

Il est toutefois à noter que certaines *B. macrocarpa* 2X espagnoles sont de génotype 175-175 au locus 1027.

Concernant le locus Caa1, l'allèle « 128 » n'avait jamais été identifié, ni chez les *B.v. maritima*, ni chez les *B. macrocarpa*. Les allèles « 152 » et « 156 » avaient par contre déjà été trouvés chez des *B.v. maritima* d'Espagne et du Maroc respectivement.

Aucune donnée n'est disponible à l'heure actuelle sur les génotypes des *B. macrocarpa* marocaines.

### Au locus SB07



Figure 54 : Distribution géographique des génotypes aux locus SB07

Aucun allèle au locus SB07 n'est partagé par tous les individus (figure 54). Toutefois, il est à noter que tous les individus des îles orientales partagent l'allèle « 264 » et tous ceux de l'ouest l'allèle « 263 ». Celle du centre (Grande Canarie) en héberge des deux « sortes ». Les *B. macrocarpa* 2X sont toutes de génotype 264-264.

Les allèles 263 et 267 ont déjà été identifié chez des individus *B.v. maritima* du Maroc.

### c) LA STRUCTURATION GENETIQUE TOTALE

Un test d'assignation basé sur l'ensemble des locus a été conduit avec le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) afin de connaître le nombre de groupes génétiquement proches ( $K$ ) et l'assignation de chaque individu à ces groupes.

Le maximum de vraisemblance a été obtenu pour une valeur de  $K$  égale à 2 ( $\text{LnP}(D) = -1188,5$ ). Pour des  $K$  supérieurs, cette vraisemblance est inférieure à  $-1196,4$ . La part d'assignation à l'un et à l'autre groupe (bleu et jaune) de chaque individu est illustrée par la figure 55.

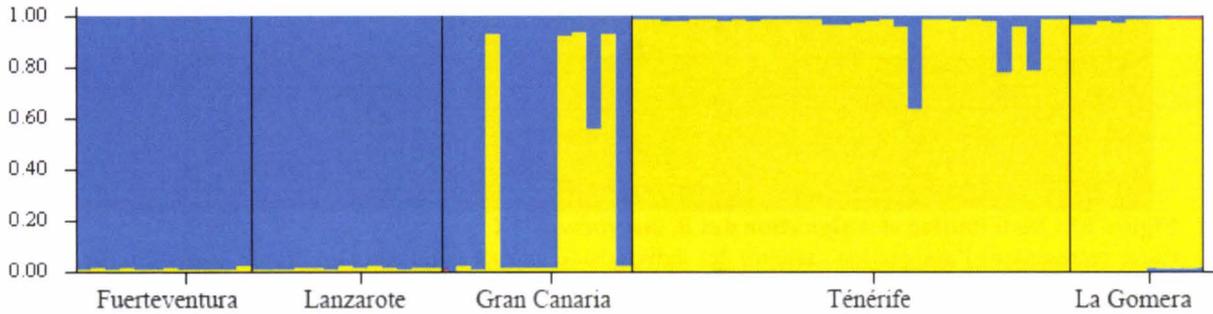


Figure 55 : Assignation de chaque individu aux deux groupes génétiques définis par le logiciel STRUCTURE

Excepté pour un individu de Gran Canaria, il n'existe pas de génotype intermédiaire (figure 56) et chaque individu est assigné à l'un ou à l'autre des groupe avec un  $Q$  proche de 1.

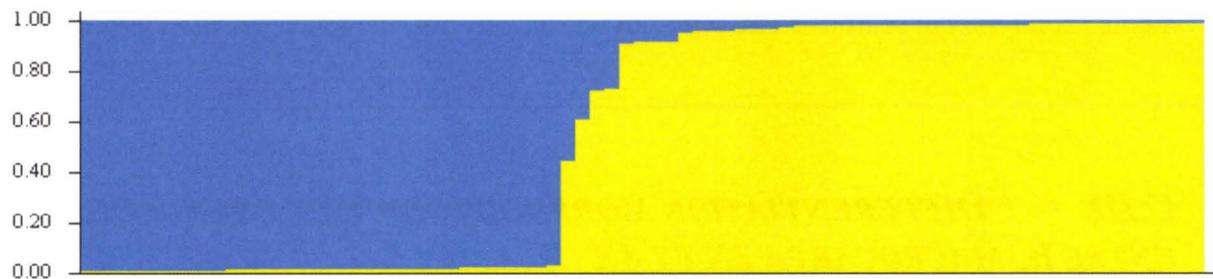
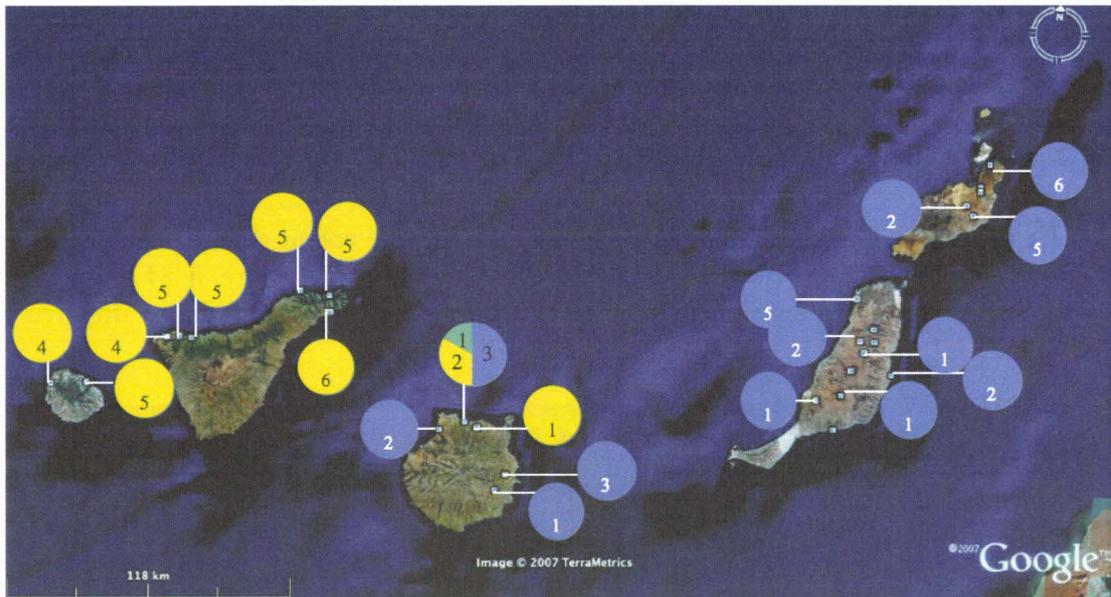


Figure 56 : Génotypes classés par proportion d'assignation ( $Q$ ) croissante au groupe génétique jaune

Les îles de l'Est, Fuerteventura et Lanzarote sont très proches génétiquement et clairement différenciées du groupe de l'Ouest représenté par les îles de Ténérife et La Gomera. Celle du centre, Gran Canaria, héberge des génotypes des deux groupes et un génotype d'assignation mixte (figure 57).



**Figure 57 : Distribution et assignation des *B. macrocarpa* 4X**

Carte représentant l'assignation majeure des individus de chaque population au groupe « Ouest » (en jaune), ou au groupe « Est » (en bleu), ou d'assignation mixte (en vert). Le chiffre représente la quantité d'individus au sein de la population qui partagent la même assignation.

#### d) LE POLYMORPHISME DES MARQUEURS MINISATELLITES MITOCHONDRIAUX

Sur les 4 marqueurs minisatellites mitochondriaux analysés, un seul s'est révélé polymorphe pour ce qui est des 2 espèces canariennes, il s'agit de TR1. Toutefois, au niveau intraspécifique, les haplotypes sont fixés. Ainsi, toutes les *B. macrocarpa* 2X possèdent le même haplotype qui se trouve être différent de celui qu'ont fixé toutes les *B. macrocarpa* 4X.

### **C.III. DIFFERENTIATION MORPHOLOGIQUE ET PHENOLOGIQUES ENTRE *B. MACROCARPA* 2X ET 4X**

Tous les caractères présentés dans le paragraphe « Matériel et Méthodes » ont été mesurés en conditions contrôlées sur près de 200 plantes.

Il s'avère, malheureusement et *a posteriori*, que ces conditions n'étaient pas optimales (lumière artificielle, problème de gestion de l'hygrométrie, développement de champignons, présence d'aleurodes...) et qu'elles ont apparemment beaucoup affecté la phénologie et le port de la plante. Il a donc été décidé de ne présenter que succinctement ces résultats, les résultats concernant la phénologie des individus sont déplacés en annexe.

## a) LES DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES EN CHAMBRE DE CULTURE

### - Port de la plante

En chambre de culture, le port des plantes est caractéristique de l'espèce. Les *B. macrocarpa* 2X n'ont pas de hampe principale mais des hampes très hautes non ramifiées (figure 58.A). *A contrario*, les *B. macrocarpa* 4X ont des hampes ramifiées et sont de plus petite taille même si les ports sont assez variés (rampant, une hampe dressée et ramifiée...) (figure 58.B).

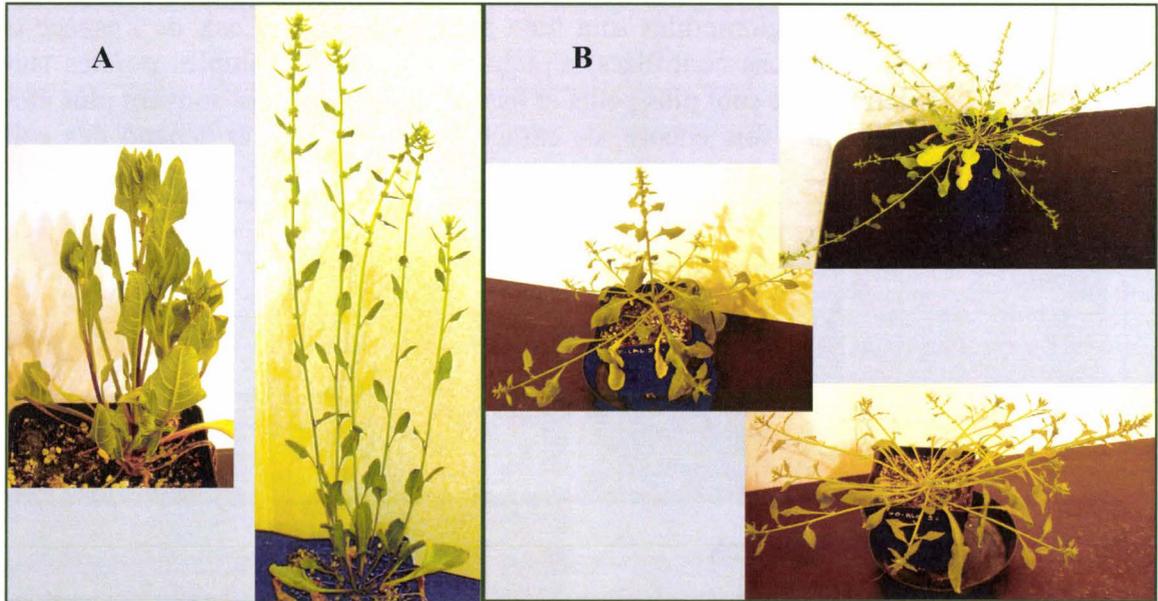
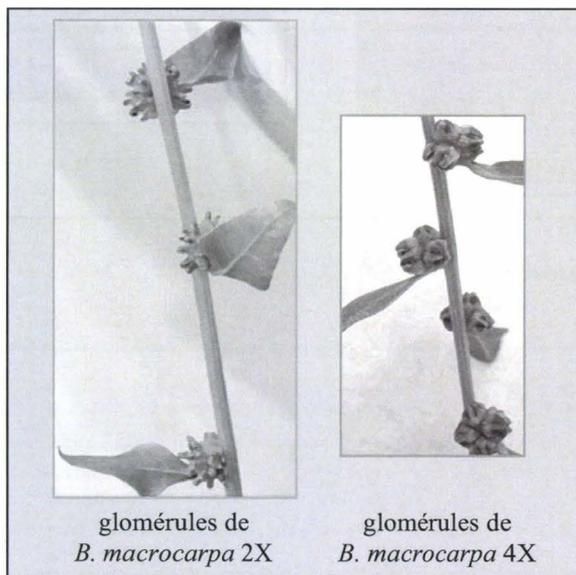


Figure 58 : Types de port des *B. macrocarpa* 2X (A) et 4X (B) en chambre de culture

### - Glomérules



Les glomérules sont caractéristiques de l'espèce : ceux de *B. macrocarpa* 2X sont très significativement plus gros et « griffés » que ceux de *B. macrocarpa* 4X (figure 59). Ils sont aussi significativement moins nombreux par plante.

Pris individuellement, les glomérules montrent une taille et une forme très fortement corrélées à celles des glomérules de la plante mère prélevés aux Canaries.

Les glomérules des *B. macrocarpa* 4X ressemblent beaucoup plus à ceux de *B.v. maritima* (nombreux, petite taille, forme non griffée) qu'à ceux de *B. macrocarpa* 4X.

Figure 59 : Forme des glomérules chez *B. macrocarpa* 2X et 4X

b) LES DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES ET PHENOLOGIQUES EN CONDITIONS NATURELLES

En conditions naturelles, la distinction entre *B. macrocarpa* 2X et 4X est peu aisée. Même si l'espèce diploïde semble un peu plus précoce dans sa floraison que la tétraploïde, une forte variabilité est observée en fonction des sites et la phénologie ne peut donc, à elle seule permettre d'identifier l'espèce. Le port est lui aussi très sujet à variation en fonction du milieu.

Finalement, les deux espèces ne sont clairement discernables qu'au stade final de fructification, lorsque les glomérules sont bien secs (figure 60). Ceux de l'espèce diploïde sont, comme sous conditions contrôlées, « piquants » avec de multiples pointes tandis que ceux de l'espèce tétraploïde sont plus petits et lisses. Leur nombre est souvent plus élevé chez les tétraploïdes mais, une fois encore, ce caractère est plastique et dépend des conditions environnementales.

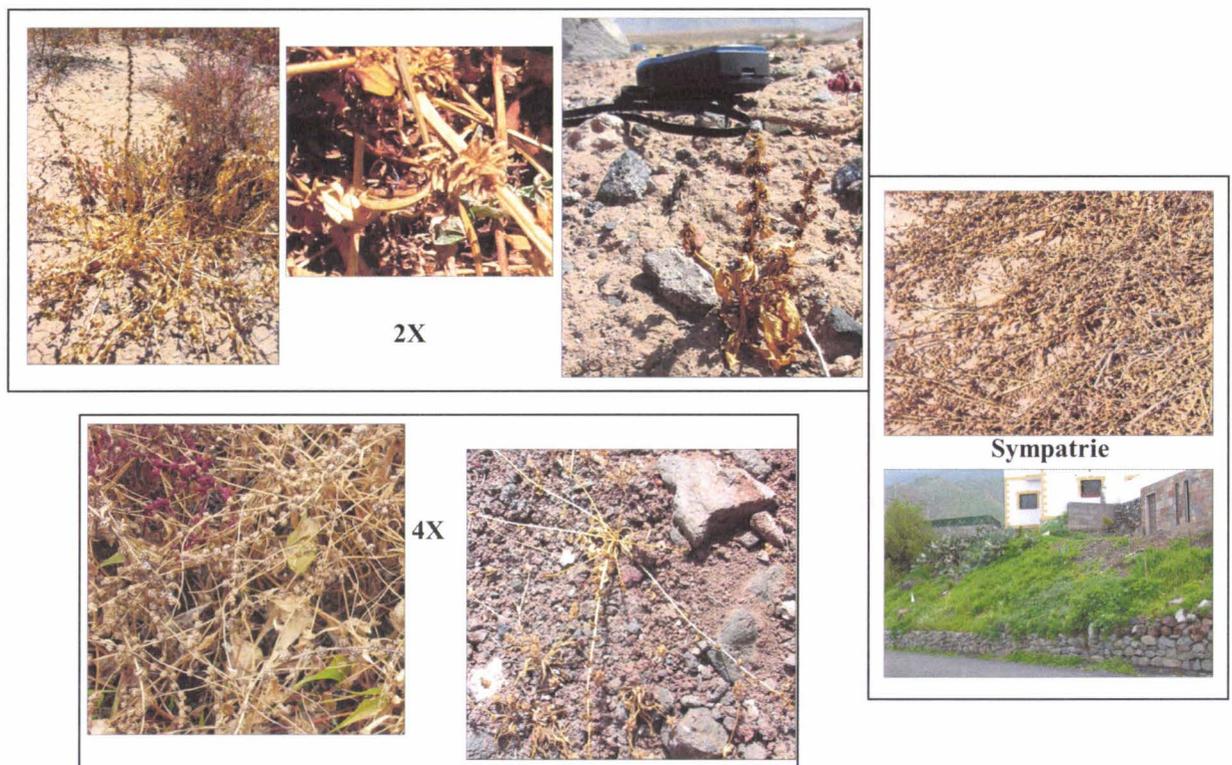


Figure 60 : Types de port observés en conditions naturelles

## D. DISCUSSION

### D.I. *B. MACROCARPA 2X CANARIENNES*

Les niveaux de polymorphisme de *B. macrocarpa 2X* se sont révélés très faibles dans les chapitres précédents, à la fois en Espagne (chapitre III) et sur le pourtour méditerranéen (chapitre I). Aux Canaries, aucun polymorphisme n'a été détecté sur les 9 locus des 56 individus diploïdes. Les allèles fixés canariens sont les mêmes que les allèles continentaux les plus courants.

Lors d'un événement rare, il est statistiquement plus probable que les allèles hébergés par le(s) colonisateur(s) soient ceux que l'on rencontre en plus grand nombre dans la population d'origine. Par contre, si la colonisation est récurrente depuis une source polymorphe, on peut s'attendre à observer des allèles plus rares aux Canaries.

*B. macrocarpa 2X* est présente sur les quatre îles les plus orientales de l'archipel, en proportion décroissante de l'Est vers l'Ouest. Dès lors, deux scénarios principaux sont envisageables qui pourraient expliquer ce patron de diversité :

- une source telle que l'Espagne aurait pu coloniser les îles les plus orientales de manière unique ou très rare ce qui expliquerait qu'aucun polymorphisme n'est détecté actuellement.

Une colonisation d'Est en Ouest se serait dès lors amorcée et le cline en terme de quantité d'individus recensés entre l'Ouest et l'Est ne serait dû qu'à l'« inachèvement » actuel du processus de colonisation des îles les plus occidentales.

- d'autres régions, plus proches, telles que l'archipel de Madère ou le Maroc sont également des sources potentielles d'individus. Il s'agirait désormais de connaître la présence/absence de populations de *B. macrocarpa 2X* dans ces régions et d'en estimer les caractéristiques génétiques. Une diversité génétique équivalente à celle rencontrée sur l'archipel canarien (=faible) et une forte affinité génétique entre ces sources et les Canaries n'excluerait pas l'hypothèse de flux de gènes récurrents entre ces régions.

Une sous-représentation des individus *B. macrocarpa 2X* sur les îles de l'Ouest pourrait s'expliquer à nouveaux par une arrivée de migrants principalement par l'Est ou par une plus faible proportion d'habitats favorables à cette espèce sur les îles d'influence océanique marquée.

Il serait intéressant désormais de séquencer les allèles microsattellites continentaux et insulaires afin de confirmer qu'il s'agit effectivement exactement des mêmes allèles.

En outre, deux prospections ont été réalisées au printemps de cette année au Maroc et à Madère afin de pouvoir trancher sur le scénario privilégié quant à la phylogéographie de *B. macrocarpa 2X*. Elles sont présentées ci-après dans le chapitre « Perspectives » .

## **D.II. STATUT TAXONOMIQUE DE *B. MACROCARPA* 4X**

Nos résultats confirment l'origine génétique de *B. macrocarpa* 4X, espèce allotétraploïde issu d'un croisement entre *B.v. maritima* 2X et *B. macrocarpa* 2X et l'absence de croisements en retour avec les espèces parentales.

La nomenclature actuelle est toutefois ambiguë car l'hybride et une des deux espèces parentales ont la même dénomination taxonomique, « *Beta macrocarpa* ». Cette appellation fait référence à la taille relativement imposante des glomérules par rapport aux autres espèces du genre *Beta*. Elle est donc tout à fait justifiée chez l'espèce diploïde, mais chez l'espèce tétraploïde, les glomérules sont significativement plus petits, de taille intermédiaire entre ceux de *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* 2X.

Une dénomination taxonomique basée sur le caractère endémique de la distribution de l'espèce tétraploïde, se verrait plus adaptée car caractéristique de cette espèce. Ainsi, par exemple, une appellation de type *Beta canariensis* pour identifier l'espèce *Beta macrocarpa* 4X leverait l'ambiguïté sur les relations entre les deux espèces.

## **D.III. DATATION DE L'EMERGENCE DE *B. MACROCARPA* 4X**

La proximité génétique des allèles microsatellites nucléaires canariens et continentaux suggère que les phénomènes d'allopolyploïdisation sont relativement récents. Il s'agirait désormais de séquencer ces allèles afin de savoir s'il s'agit exactement des mêmes mais apparemment, il n'y a pas d'accumulation de « nouveaux » allèles (apparus par mutation) chez les individus tétraploïdes depuis leur émergence. Il en est de même pour les allèles minisatellites mitochondriaux.

Le premier chapitre de ce mémoire a lui aussi permis de conclure que, sur la base de près de 2000 pb d'ADN chloroplastique, les cytoplasmes des 2 individus canariens tétraploïdes analysés sont partagés avec des cytoplasmes de *B.v. maritima*. Les analyses de séquences d'ADN nucléaires ont, elles aussi, conclu à la très forte proximité de séquences entre les espèces parentales diploïdes et l'espèce allotétraploïde.

Bien que cette série de marqueurs complémentaires ait été définie à la base pour évaluer le polymorphisme génétique chez *B. vulgaris* sp, il est peu probable que ce biais, à lui seul, soit responsable de la très faible diversité génétique de *B. macrocarpa* 2X et de la relation très étroite qui perdure entre les allèles des individus *B. macrocarpa* 4X de l'archipel et les allèles de *Beta* continentaux.

#### **D.IV. HYPOTHESES QUANT A LA DYNAMIQUE DE COLONISATION DE L'ARCHIPEL**

Les deux missions de prospection de 2005 et 2006 n'ont pas mis en évidence de populations naturelles de *B.vulgaris maritima* bien que quelques individus *B. vulgaris vulgaris* (forme cultivée) aient été observés de façon sporadique à proximité de jardins ou de cultures sur les îles de Fuerteventura et Ténérife.

Dès lors trois scénarios peuvent être évoqués pour expliquer la présence de l'espèce allotétraploïde aux Canaries :

##### **a) SCENARIO 1 : HYBRIDATION IN SITU**

L'hybridation a pu se réaliser *in situ* entre *B. macrocarpa* 2X et *B.v. maritima* et cette dernière espèce aurait par la suite disparu, du fait de la compétition avec l'espèce hybride néoformée par exemple. Pourtant, les observations contemporaines de terrain montrent une grande quantité d'habitats habituellement appréciés par *B.v. maritima* (laisses de mer, terrain rudéral...) et laissés vacants. Le climat pourrait aussi avoir joué un rôle dans l'absence de persistance de *B.v. maritima* aux Canaries car l'espèce est généralement rencontrée à des latitudes plus élevées.

D'autre part, sur plusieurs locus, les individus *B. macrocarpa* 4X et 2X ne sont pas fixés sur les mêmes allèles suggérant dès lors que le ou les individus diploïdes à l'origine des tétraploïdes ne sont pas ou plus sur l'île non plus, ou extrêmement rares.

##### **b) SCENARIO 2 : HYBRIDATION IN SITU AVEC ESPECES PARENTALES ALLOPATRIQUES**

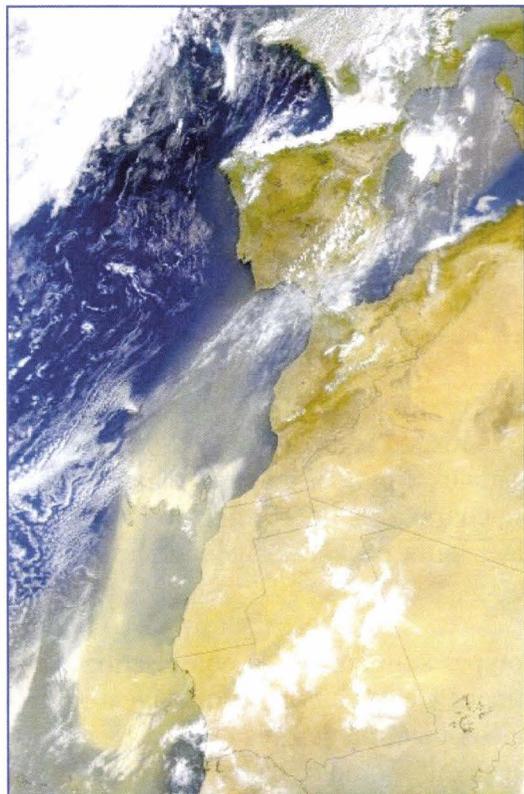


Figure 61 : Tempête de poussières observée par le satellite SeaWiFS fin février 2000 (NASA, 2007)

L'océan atlantique borde une des régions aride et semi-aride des plus actives au monde : l'Afrique du Nord-Ouest, source de la majorité des tempêtes de sable qui sont fréquemment transportées sur plusieurs milliers de kilomètres au large de l'Atlantique (ex, figure 61). La période d'activité la plus intense de ces tempêtes se situe entre la fin du printemps et la fin de l'été.

Il n'est donc pas à exclure que des nuages polliniques de *B.v. maritima* marocaines soient régulièrement emportés jusqu'aux Canaries.

Les deux individus tétraploïdes (de Ténérife et Gran Canaria) analysés dans le chapitre I ont, par contre, révélé un cytoplasme partagé avec *B.v. maritima* proposant donc que le donneur de pollen aurait été l'espèce *B. macrocarpa* 2X. D'autre part, les analyses de marqueurs minisatellites mitochondriaux sur tous les individus de cette présente étude montrent que les espèces *B. macrocarpa* 2X et *B. macrocarpa* 4X aux Canaries sont chacune « fixées » pour un haplotype différent. (Il est à noter que ces deux haplotypes sont aussi les plus couramment rencontrés à la fois chez *B.v. maritima* et chez *B. macrocarpa* 2X en Espagne).

Ces deux types d'analyses cytoplasmiques ne supportent donc pas l'hypothèse d'une hybridation par fécondation d'individu *B. macrocarpa* 2X canariens par du pollen *B.v. maritima* marocain.

### c) SCENARIO 3 : HYBRIDATION EX SITU

L'hybridation a aussi pu se réaliser *ex situ* et l'hybride aurait alors colonisé l'archipel dans un deuxième temps via les courants marins (figure 62).

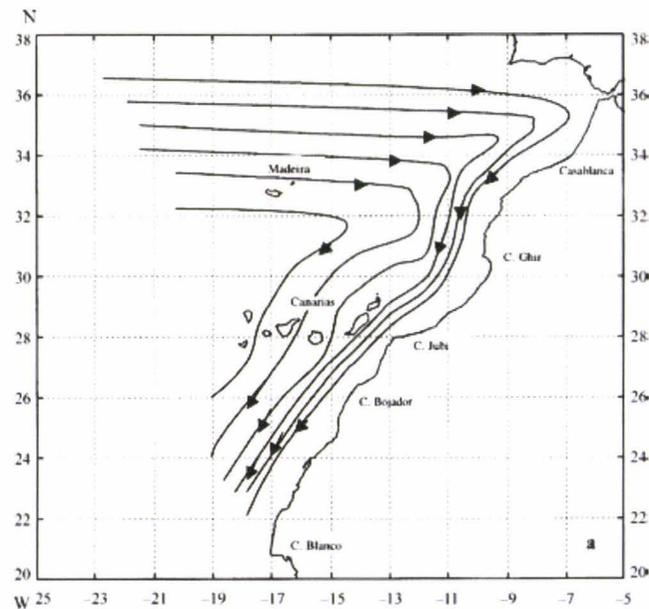


Figure 62 : Diagramme schématique illustrant les principaux mouvements des eaux de surface en Macaronésie durant la majeure partie de l'année (Pelegri et al., 2005)

Les deux espèces parentales sont couramment observées en sympatrie sur les côtes ibériques et marocaines et dans une moindre mesure sur tout le pourtour méditerranéen. Même si des phénomènes d'hybridation homoploïde semblent récurrents entre *B.v. maritima* et *B. macrocarpa* 2X (1% par an sur la péninsule ibérique, cf chapitre précédent), les cas d'allopolyplôidisation sont très rares (1 seul cas identifié, à Fuseta-Portugal) mais existent.

De récentes prospections dans des zones susceptibles d'être la source des populations canariennes ont été entreprises en avril et en mai 2007, respectivement au Maroc et sur l'archipel de Madère. Il semble que les deux espèces parentales diploïdes y soient rencontrées et les analyses génétiques de ces populations sont en cours afin de confirmer le statut taxonomique des individus échantillonnés et de déterminer leurs proximités génétiques avec celles des individus canariens.

La distribution Ouest *versus* Est particulière des génotypes suggère que la colonisation de l'archipel s'est réalisée lors de plusieurs événements distincts. Cette configuration suggère un rôle primordial des courants marins dans les processus de colonisation des îles étant donnée la concordance entre la distribution des groupes génétiquement homogènes et les courants majeurs de surface qui affectent les îles.

En effet, des courants cycloniques se détachant des flancs ouest des îles occidentales de La Palma, La Gomera et Ténérife ont été identifiés par observations satellites (Hernandez-Guerra *et al.*, 1993; Pacheco & Hernandez-Guerra, 1999) et de Gran Canaria par observations satellites et *in situ* (Hernandez-Guerra *et al.*, 1993; Aristegui *et al.*, 1997; Pacheco & Hernandez-Guerra, 1999; Barton *et al.*, 2000; Marrero-Diaz *et al.*, 2001; Basterretxea *et al.*, 2002). Des courants anticycloniques se détachant des flancs Est des îles ont, d'autre part, été observés pour Ténérife et Gran Canaria par observations satellites et *in situ* (Molina *et al.*, 1996; Aristegui *et al.*, 1997; Pacheco & Hernandez-Guerra, 1999; Barton *et al.*, 2000; Barton *et al.*, 2001)(figure 63).

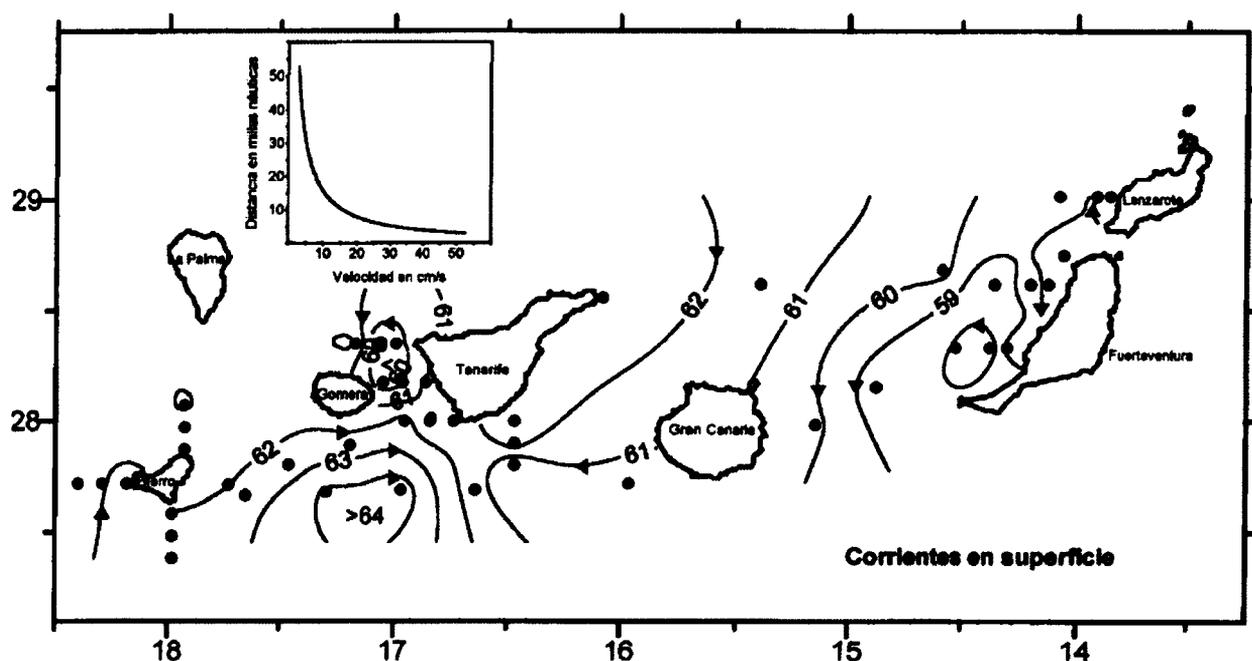


Figure 63 : Courants marins superficiels dans la zone d'études (Molina *et al.*, 1996)  
Les points identifient les stations océanographiques de mesure.

La faible diversité génétique des individus allotétraploïdes tend à supposer que la colonisation de l'archipel s'est réalisée lors de plusieurs événements distincts mais peu nombreux. En effet, la diversité allélique des individus 4X qui peut être imputée au parent *B.v. maritima* est très faible comparée à celle rencontrée dans les populations de *B.v. maritima* ibériques. Néanmoins, il est indispensable de connaître la diversité et la composition génétique des populations de Madère et du Maroc afin de connaître leur impact potentiel dans la composition des populations canariennes. Il est par exemple possible que l'archipel de Madère soit une (voire la) source récurrente d'individus émigrants vers les Canaries (principalement vers les îles de l'Ouest) mais que la faible diversité allélique locale ne « produise » que des individus génétiquement très homogènes.

La combinaison d'allèles dans les génotypes 4X est elle aussi très faible et étaié l'hypothèse d'un régime de reproduction fortement autogame chez cette espèce, comme cela a souvent été mentionné chez les individus allopolyploïdes (Otto & Whitton, 2000).

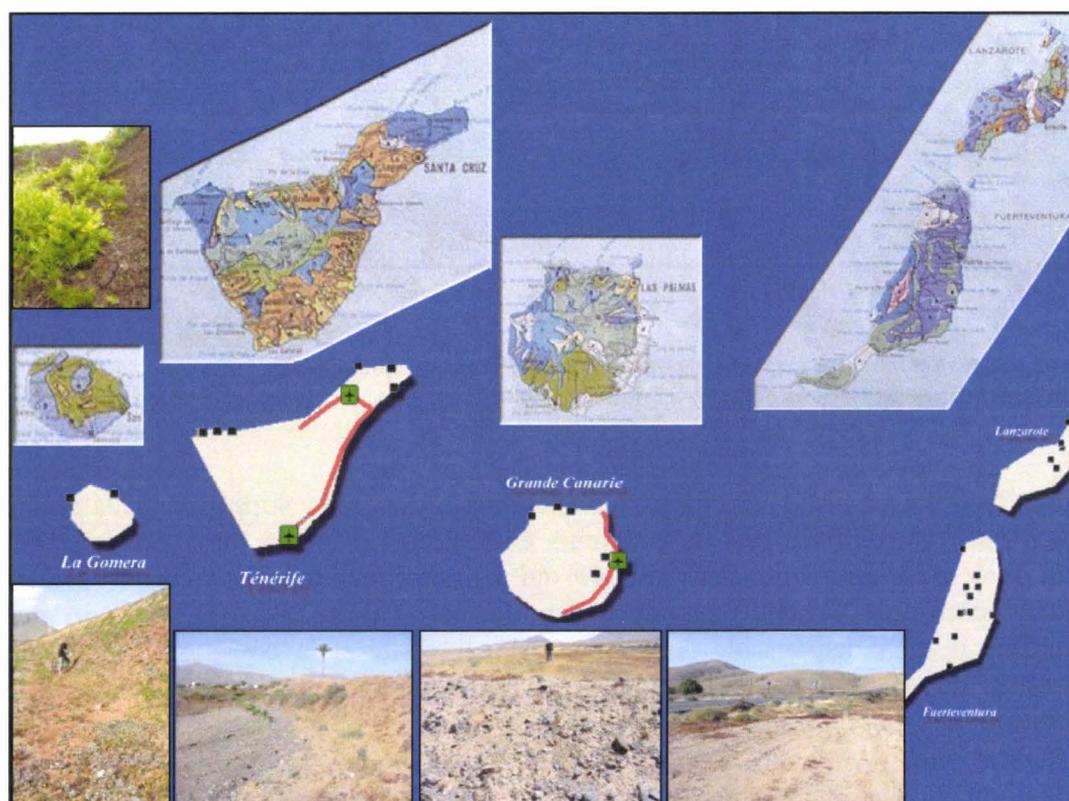
## ***D.V. HYPOTHESES QUANT AUX CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DES POPULATIONS***

Les prospections de terrains ont tenté de cribler le plus exhaustivement possible l'archipel sans *a priori* sur les *preferendum* écologiques des espèces afin de caractériser l'aire de distribution des espèces.

Les individus tétraploïdes sont rencontrés sur les 5 îles les plus orientales. Ce succès par rapport aux diploïdes pourrait provenir d'une meilleure résistance aux différents climats (océaniques à l'Ouest et de plus en plus arides vers l'Est) mais resterait inexplicquée l'absence de cette espèce sur les îles occidentales de La Palma et El Hierro.

La nature géologique des sols canariens est variée du fait de l'activité volcanique récurrente qui les a affectés. Il est à noter que les sites sur lesquelles se développent des populations de betteraves sont souvent caractérisés par des sols volcaniques très anciens (en bleu foncé et en bleu-vert sur la figure 64) riches en éléments minéraux biodisponibles (nitrates, phosphates, potasse...) et repérables sur le terrain par leur couleur ocre. Ces sites sont absents des îles plus récentes de La Palma et El Hierro.

La diversité en espèces sur ces terrains très secs est d'autre part très souvent réduite.



**Figure 64: Corrélation entre la géologie (en haut) et la localisation des populations (au milieu).**

Les photos de terrain illustrent le type de sol le plus fréquemment rencontré sur lequel l'on trouve des populations de *Beta macrocarpa*.

Il serait désormais intéressant d'analyser plus précisément ce sol afin d'en connaître la composition chimique et de comprendre si elle peut être responsable de la rareté des espèces rencontrées. Des mesures de fitness des espèces parentales et hybrides sur ces terrains seraient elles aussi d'un grand intérêt afin d'identifier un effet « hétérosis » par exemple.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

## A. PROSPECTION AU MAROC

Une prospection sur les côtes marocaines a été menée en avril 2007 (par J.F. ARNAUD et moi-même) afin d'identifier et de caractériser les populations présentes. Une petite incursion, plus à l'intérieur des terres, jusqu'à Marrakech a permis de compléter cet échantillonnage avec des populations plus « continentales ».

### A.I. SITES D'ÉCHANTILLONNAGE

#### a) LA REPARTITION GEOGRAPHIQUES DES ECHANTILLONS

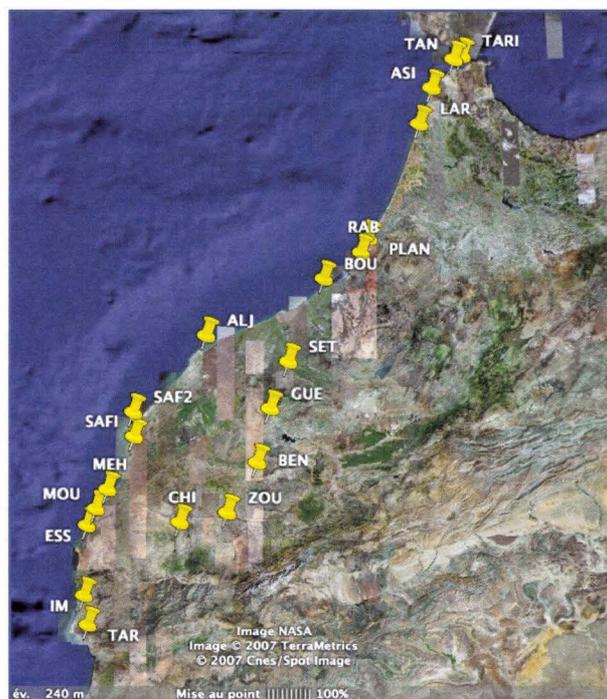


Tableau 20 : Coordonnées des sites échantillonnés au Maroc

Nom	Ville	Diag espèce	Latitude	Longitude	Altitude
ALJ	El Jadida	<i>B. v. mari</i>	N 33°15,361	W 8°30,055	10m
ASI	à 10km d'Asilah	<i>B. v. mari</i>	N 35°31,918	W 6°00,411	0m
BEN	Ben Guerrir	<i>B. v. mari</i>	N 32°05,711	W 7°57,119	432m
BOU	Bouznika	<i>B. v. mari</i>	N 33°46,677	W 7°13,960	43m
CHI	Chichoua	<i>B. v. mari</i>	N 31°32,153	W 8°45,876	373m
ESS	Essaouira	<i>B. v. mari</i>	N 31°29,527	W 9°45,882	2m
GUE	El Guelb	<i>B. v. mari/macro</i>	N 32°35,417	W 7°48,896	292m
IM	Imessouane	<i>B. v. mari</i>	N 30°50,431	W 9°47,218	300m
LAR	Larache	<i>B. v. mari</i>	N 35°11,911	W 6°09,232	0m
MEH	El Mehata	<i>B. v. mari</i>	N 31°49,779	W 9°32,595	18m
MOU	Moulay-Bouzerktour	<i>B. v. mari</i>	N 31°38,814	W 9°40,170	7m
PLAN	Bouknadel	<i>B. v. mari</i>	N 34°08,798	W 6°44,259	23m
RAB	Rabat	<i>B. v. mari</i>	N 34°01,124	W 6°49,205	18m
SAFI	Safi	<i>B. v. mari</i>	N 32°19,410	W 9°15,680	100m
SAFI 2	Sidi Moussa	<i>B. v. mari</i>	N 32°32,820	W 9°16,375	50m
SET	Settat	<i>B. v. mari</i>	N 33°01,052	W 7°37,228	346m
TAN	Cap Malabata	<i>B. macro</i>	N 35°47,923	W 5°45,047	0m
TAR	N de Tarhazoute	<i>B. macro</i>	N 30°34,155	W 9°44,668	9m
TARI	Ksar as Seghir	<i>B. v. mari</i>	N 35°49,673	W 5°39,419	0m
ZOU	20 km de M. Zoudia	<i>B. v. mari</i>	N 31°37,735	W 8°15,968	386m

Figure 65: Échantillonnage de *Beta* réalisé au Maroc en 2007

Les feuilles et/ou les graines d'environ 20 individus de chacune des 20 populations ont été prélevées et séchées. Un premier diagnostic de terrain a mis en évidence 3 populations susceptibles d'héberger des *B. macrocarpa*. Il s'agit de « TAR », « GUE » et « TAN ». Les autres sont composées de *B. v. maritima*.

Les populations qui subissent l'influence océanique sont en général situées à de faibles altitudes alors que les populations plus « continentales » se retrouvent à des altitudes d'environ 300-400m.

## b) LES HABITATS

### - *B. v. maritima*

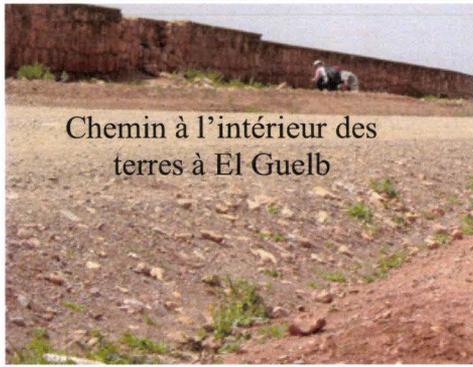
Les populations de *B.v. maritima* sont en général rencontrées dans les zones rudérales où les terrains sont sablonneux ou sur les plages (figure 66). La pression d'herbivorie est très forte en raison de la méthode de paturage et de la rareté des espèces végétales comestibles.



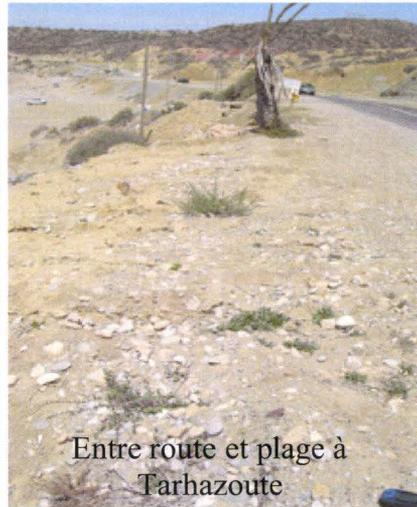
Figure 66 : Exemples de "types" d'habitat à *B.v. maritima*

### - *B. macrocarpa*

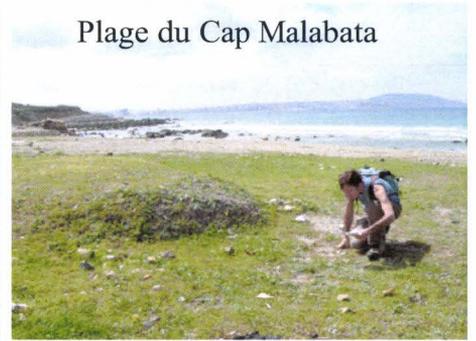
Les populations diagnostiquées comme « *B. macrocarpa* » ont été rencontrées à la fois sur la côte et à l'intérieur des terres, sur des terrains ressemblants à ceux sur lesquels elles ont été identifiées aux Canaries (figure 67).



Chemin à l'intérieur des terres à El Guelb



Entre route et plage à Tarhazoute



Plage du Cap Malabata

Figure 67 : Aperçu des trois sites à *B. macrocarpa*

## A.II. « ASPECT » DES ESPECES ECHANTILLONNEES

### a) L'ESPECE *B. v. MARITIMA*

Les individus présentent une grande plasticité morphologique selon l'environnement dans lequel ils se développent. D'autre part, certains n'étaient pas encore en fleur (notamment au Nord) alors que d'autres montraient déjà de jeunes graines (figure 68).



Dans les terrains vagues



Dans les dunes



Dans les galets



Dans les mains des bédouines

Figure 68 : Exemples de ports et de stades phénologiques chez *B.v. maritima* au Maroc en avril

## b) L'ESPECE *B. MACROCARPA* 2X

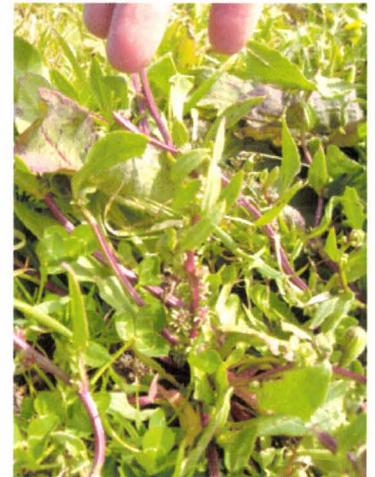
Les individus sont rencontrés de manière éparse et non sous forme de « tapis » comme c'est le cas pour certaines stations de *B.v. maritima*. Les graines sont plus grosses et plus « griffées » que celles de *B.v. maritima*. Les plantes étaient au stade « glomérule vert » pour les stations du sud (« TAR ») et de l'intérieur des terres (« GUE ») et à un stade un peu moins avancé pour celle du Nord (« TAN ») (figure 69).



À Tarhazoute



À El Guelb



À Ksar

Figure 69 : Aperçu des *B. macrocarpa* rencontrées dans 3 sites marocains

## B. PROSPECTION SUR L'ARCHIPEL DE MADÈRE



Figure 70 : Localisation de l'archipel de Madère  
(source : <http://www.ile-madere.com/geographie.htm>)

L'archipel de Madère est composé de l'île du même nom (797m<sup>2</sup>) surnommée « l'île aux fleurs » et de plusieurs autres petites îles dont, principalement, Porto Santo et les Îles Désertes.

L'île de Madère, d'origine volcanique, est située dans l'océan atlantique, à l'ouest du Maroc (à la latitude de Casablanca). Plus proche de l'Afrique (600km) et des Canaries (400km) que du Portugal (900km) (figure 70), l'archipel est baigné par un climat subtropical.

## B.I. SITES D'ÉCHANTILLONNAGE

### a) LA REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES ÉCHANTILLONS

Étant donnée l'inaccessibilité des Iles Désertes, la mission de prospection, réalisée en avril 2007 par F. ROUX et moi-même, n'a concerné que les îles de Madère et de Porto Santo (figure 71). Un total de 7 populations de *B. v. maritima* (sur l'île de Madère) et de 2 populations susceptibles d'être composées de *B. macrocarpa* (sur l'île de Porto Santo) a été échantillonné (~ 20 individus/population).



Figure 71 : Localisation géographique des sites d'échantillonnage de *Beta sp.* sur l'archipel de Madère en 2007

Le tableau 21 synthétise la localisation et la composition probable de ces populations.

Tableau 21 : Coordonnées des sites d'échantillonnage

Nom	Ville	Diag espèce	Latitude	Longitude	Altitude
BAI	Caniço de Baixa	<i>B. v. mari</i>	N 32°38,758	W16°49,466	14m
CAM	Camara de Lobos	<i>B. v. mari</i>	N 32°38,559	W16°57,276	16m
EMB	Ponta de Buraco	<i>B. v. mari</i>	N 32°44,594	W16°42,089	80m
JAR	Jardim do Mar	<i>B. v. mari</i>	N 32°44,133	W17°12,535	24m
LOR	Sao Lourenço	<i>B. v. mari</i>	N 32°44,568	W16°42,502	23m
MON	Porto Moniz	<i>B. v. mari</i>	N 32°51,986	W17°09,980	32m
PARG	Ponta do Pargo	<i>B. v. mari</i>	N 32°48,856	W17°15,773	300m
ADE	Adega das Levadas	<i>B. v. mari/macro</i>	N 33°02,188	W16°22,645	93m
PIC	Serra de Dentra	<i>B. v. mari/macro</i>	N 33°05,300	W16°18,612	66m

## b) LES HABITATS

Les betteraves sauvages sont relativement rares sur l'archipel du fait probablement d'un relief très prononcé et, en conséquence, de la rareté des plages.

Les habitats propices ont été identifiés en majorité à proximité de l'océan et donc à de faibles altitudes (sauf pour le phare « Ponta do Pargo »). Il s'agit en général de terrains rudéraux qui montrent à peu près les mêmes caractéristiques que les terrains canariens (terrains ocres et sablonneux) (figure 72).

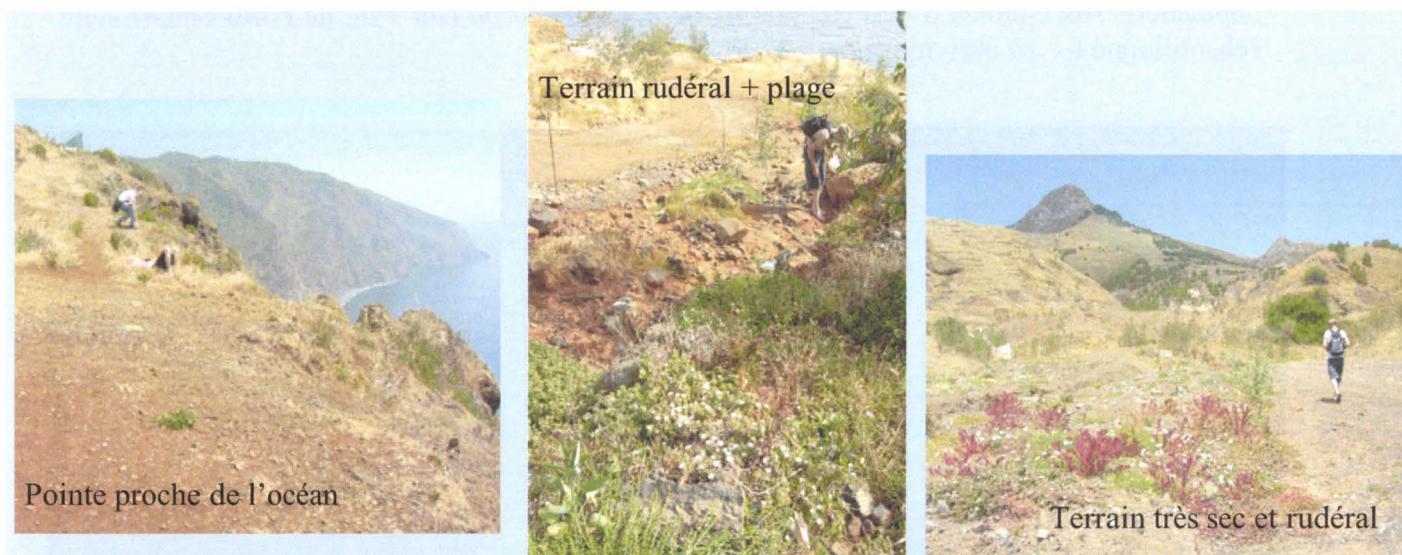


Figure 72 : Exemples de types d'habitats de *Beta* sur l'archipel de Madère

## B.II. ESPECES ECHANTILLONNEES

### a) L'ESPECE *B.v. MARITIMA*

Les individus rencontrés sont souvent relativement gros et se rencontrent sous forme d'individus isolés ou en tapis (figure 73). Les stades phénologiques sont variés mais, à cette époque, la majorité des individus était au stade « pollen ».



Figure 73 : Exemples de ports et de stades phénologiques chez *B.v. maritima* à Madère en mai

## b) L'ESPECE *B. MACROCARPA*

L'espèce *B. macrocarpa* n'est pas décrite sur l'archipel. Pourtant deux stations sur l'île de Porto Santo montrent des individus à très grosses graines griffues et au port assez caractéristique de *B. macrocarpa* (figure 74).

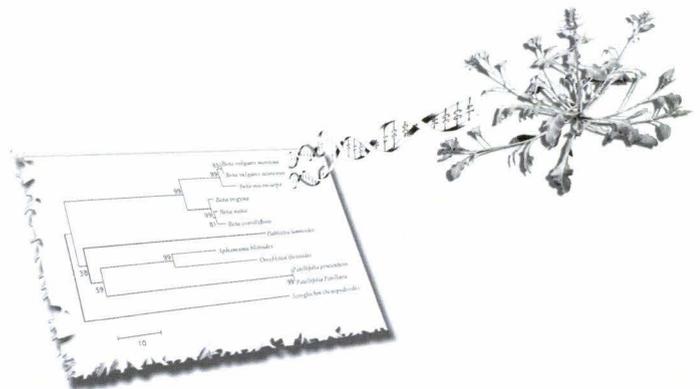


Figure 74 : Exemples d'individus diagnostiqués "*B. macrocarpa*" à Madère

Ces individus sont rencontrés de manière éparse dans des environnements très secs. Leur stade phénologique est plus avancé que celui des *B.v. maritima*. L'analyse moléculaire permettra de confirmer ou d'infirmer ce diagnostic taxonomique.

## C. PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Cette thèse a ainsi permis d'approfondir les connaissances de la diversité et des relations phylogénétiques qu'il existe au sein de la section *Beta*. Il s'avère que cette section représente un excellent modèle biologique à la fois pour des études phylogéographiques d'espèces côtières, mais surtout pour l'étude des phénomènes de spéciation en milieu insulaire.



En effet, de nouveaux éléments ont été apportés concernant l'origine des allopolyploïdes canariens, mais de nombreuses questions restent encore sans réponse, principalement au niveau des processus génomiques qui accompagnent ce phénomène *a priori* potentiellement récurrent.

Ci-dessous sont évoquées quelques pistes de recherche qu'il serait possible de poursuivre dans un avenir proche, étant données les techniques actuellement maîtrisées au laboratoire et la disponibilité du matériel végétal.

## ***C.I. LE SYSTEME MACARONESIE/MAROC***

Étant donnés les stades phénologiques variés rencontrés, le diagnostic de terrain réalisé pendant les missions de prospections n'est peut-être pas parfait. Il serait donc intéressant de confirmer ce diagnostic d'une part par une analyse de la morphologie des individus préalablement plantés en serre ou sur un terrain expérimental, et d'autre part d'effectuer une analyse en cytométrie de flux sur ces individus afin de détecter le cas échéant des polyploïdes. Ceci permettrait d'obtenir une image assez précise des différentes espèces présentes au Maroc et à Madère et de leurs répartitions respectives car peu de données concernant les espèces sauvages de betteraves sont à l'heure actuelle disponibles pour ces régions.

L'analyse de la diversité génétique au niveau des marqueurs moléculaires déjà disponibles (séquences chloroplastiques, nucléaires, microsattellites nucléaires et minisatellites mitochondriaux) permettrait principalement, dans la thématique de cette thèse:

- de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une zone marocaine refuge pendant les oscillations climatiques du quaternaire ;
- d'estimer les flux de gènes qui se déploient en Macaronésie ;
- de quantifier la récurrence ou la rareté des phénomènes d'allopolyploidisation et de colonisation de l'archipel canarien (une diversité génétique élevée dans les zones sources potentielles supporterait l'hypothèse de la rareté de ces phénomènes par exemple);
- de préciser l'origine génétique et géographique des *B. macrocarpa* 4X

## ***C.II. LES CONDITIONS D'ETABLISSEMENT ET DE MAINTIEN DES POPULATIONS B. MACROCARPA 4X AUX CANARIES***

Cette question mériterait d'être traitée selon plusieurs approches.

L'une d'entre elles consisterait, comme il a été décrit précédemment, à analyser les particularités du substrat sur lesquels se développent les populations tétraploïdes, mais aussi à réaliser des transplantations expérimentales de populations di et tétraploïdes afin de mieux comprendre les raisons du succès des tétraploïdes aux Canaries et peut-être celles de l'absence d'une des deux espèces parentales.

Des croisements expérimentaux en conditions contrôlées des 3 espèces *B.v. maritima*, *B. macrocarpa* 2X et *B. macrocarpa* 4X avec des « rôles » de donneurs ou receveurs de pollen alternés permettraient de tester la « faisabilité » et la viabilité des hybrides d'une part, et si d'autre part un sens d'hybridation est privilégié. Une analyse de croissance du tube pollinique compéterait cette expérience en cherchant une possible cause pré-zygotique à l'absence d'hybrides.

Cette précédente approche apporterait de nouvelles lumières quant au maintien de l'intégrité de l'espèce allopolyploïde en situation de sympatrie. L'analyse en chambre de culture de près de 200 individus canariens durant ma thèse avait en outre consisté à prélever 3 anthères par plante (= anthères situées dans la fleur fermée située juste au-dessus de la première fleur ouverte, le 1er jour de la floraison). Il est désormais possible, grâce au compteur à particules récemment acquis par le laboratoire, d'estimer la quantité de pollen des fleurs de chaque espèce. Les premiers résultats montrent que l'espèce allogame *B.v. maritima* contient près de 10 fois plus de grains de pollen par anthère que l'espèce autogame *B. macrocarpa* 2X. L'espèce allotétraploïde montre des niveaux comparables à l'espèce parentale autogame. Ces résultats appuieraient l'hypothèse très probable d'un régime de reproduction très autogame de l'espèce allotétraploïde mais nécessite que tous les échantillons prélevés soient maintenant comptés.

Parmi les graines qui avaient été prélevées aux Canaries et plantées en serre, certaines n'ont jamais germé (malgré des réplicats, des passages au sec/froid...). Anecdotiquement, l'ADN de feuilles prélevées aux Canaries d'un individu dont les graines étaient « récalcitrantes » à la germination ont été analysées sur les marqueurs microsatellites et ont montré jusqu'à 3 allèles par locus. Ces observations ne permettent pas d'exclure l'hypothèse selon laquelle des hybrides interspécifiques pourraient apparaître régulièrement sur l'archipel mais des taux de stérilité élevés seraient responsables de leur disparition rapide. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer l'existence de cet individu triallélique serait qu'il existe des croisements entre *B. macrocarpa* 4X mais il reste alors la question, dans ce cas, de savoir pourquoi il est stérile.

Une analyse en cytométrie de flux sur le terrain, en conditions naturelles, serait dès lors très utile dans la quantification de ces événements et permettrait d'estimer la part de l'isolement reproducteur post-zygotique.

### **C.III. LES REMANIEMENTS GENOMIQUES ASSOCIES A LA POLYPLOÏDISATION ET LEURS VITESSES**

Des techniques encore non maîtrisées au laboratoire telles que le GISH ou d'autres méthodes de cytogénétique pourraient se révéler d'un grand intérêt dans l'analyse des remaniements génomiques qui ont affecté les individus allotétraploïdes depuis leurs formations.

Les mêmes expériences menées sur des allopolyploïdes synthétiques lors des quelques premières générations permettraient d'autre part de mettre en évidence les premiers remaniements, régulièrement décrits comme les plus intenses.

Trois ans de thèse c'est long, surtout vers la fin lorsqu'il s'agit de les résumer dans ce manuscrit. Et pourtant, au regard de toutes les questions qui restent encore en suspens (et qui, je l'espère, trouveront leurs réponses dans les prochains travaux de l'équipe « Beta » !), trois ans çà passe vraiment vite. C'est donc ici que mon petit bout de route très agréable avec les betteraves sauvages s'arrête, et j'espère de tout cœur qu'elles continueront à livrer leurs secrets aux futurs petits thésards.

# ANNEXES

## A. DESCRIPTION ET CONDITIONS D'AMPLIFICATION DES AMORCES UTILISEES

Nom	Amorce forward	5'	Sequence	3'	Amorce reverse	5'	Sequence	3'	Taille du fragment amplifié (pb)	Tm (°C)	Temps d'élongation (min)	Référence
<i>K<sub>1</sub>K<sub>2</sub></i>	<i>K<sub>1</sub></i>		GTTGCCCGGGATTTCGAA		<i>matK<sub>1</sub></i>		ATTAGGGCATCCCATTAGTA		657	54	1'	a
	<i>matK<sub>2</sub></i>		CTAGCACAAGAAAGTCGAAG		<i>matK<sub>6b</sub></i>		GGATTTCTAACCATCTTGTT		1521	50	1'30"	b
<i>DT</i>	<i>trnD</i>		ACCAATTGAACTACAATCCC		<i>trnT</i>		CTACCACTGAGTTAAAAGGG		1024	56.5	1'	b
<i>LF</i>	<i>trnL</i>		GGTTCAAGTCCCTCTATCCC		<i>trnF</i>		ATTTGAAGTGGTGACACGAG		395	57.5	1'	c
<i>HK</i>	<i>trnH</i>		CACGACGTTGTA AACGACCG ACCAAATAACCATGAGC		<i>trnK</i>		GGATAACAATTCACACAGGG CTATGCATGGTTCCTTGGT		750	57	1'	

a : modifié de Grivet (2002)

b : Grivet (2002)

c : Grielly & Taberlet (1994)

Nom	Amorce F	5'	Séquence	3'	Amorce R	5'	Séquence	3'	Taille du fragment amplifié (pb)	Tm (°C)	Tps d'élongation	Réf
Adh	BvAdh F2		TGTCCTGCCTGTTTTCACTG		BvAdh R		TACTGCTCCTAGGCCGAAAA		434	61	1'	a
Cab5	Cab5 F		CTTGGCATTAGCTGAGGACC		Cab5 R		GCTCTGTACATTGGAAACCC		769	55	1'	a
ITS	ITS 5		GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		ITS 4		TCCTCCGCTATATGATGC		798	53	1'	b

a : élaborées au laboratoire GEPV

b : White et al. (1990)

## B. TABLEAUX DE POLYMORPHISME NUCLEAIRE

### B.I. ADH

	95	119	130	143	197	200	236	295	309-310	339	357
	C	C	T	C	G	C	C	G	AT	G	C
30	C et T		A et T								
3,4,5,19		A et C									
m1,m2,m3B,m4B,m5,m6,m7,m8,m9		T					T		--		
2				C et T							
27				C et T	A et G						
23						C et T					
22								A et G			
16,a3,a4,a5,a8,a11,a12,m3A,m4A										T	
a1,a2,a6,a7,a9,a10										T	T
24										G et T	

### B.II. ITS

	75	83	87	88	93	98	145	218	537	582	598	633
	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	C	-
1,2,5,17,18,19,30	C et A			A et G			G et T					
9,16,22,23,24,25,26,27,28,29,32,3	A			A			G					A
3,a1,a4,a5,a6,a7,a9,a10,a11,a12				A	T	A	G	G	T	T	A	
m1,m2,m5,m6,m7,m8,m9		T		A	T	A	G	G	T	T	A	
a2,a3,a8	A		G	A			G					A

## C. CLEF D'INFERENCE POUR LA NCA (2005)

1. Are all clades within the nesting clade found in separate areas with no overlap?
  - NO – Go to step 2.
  - YES - Go to step 19.
  
2. Is at least one of the following conditions satisfied?
  - a. The Dc's for one or more tips are significantly small and the Dc's for one or more of the interiors are significantly large or non-significant.
  - b. The Dc's for one or more tips are significantly small or non-significant and the Dc's for some but not all of the interiors are significantly small.
  - c. The Dc's for one or more interiors are significantly large and the Dc's for the tips are either significantly small or non-significant
  - d. The I-T Dc is significantly large.
    - NO - Go to step 11.
    - YES - Go to step 3.
    - Tip/Interior Status Cannot be Determined - Inconclusive Outcome.
  
3. Is at least one of the following conditions satisfied?
  - a. Some Dn and/or I-T Dn values are significantly reversed from the Dc values.
  - b. One or more tip clades show significantly large Dn's.
  - c. One or more interior clades show significantly small Dn's.
  - d. I-T has a significantly small Dn with the corresponding Dc value non-significant.
    - NO - Go to step 4.
    - YES - Go to step 5.
  
4. Are both of the following conditions satisfied?
  - a. The clades (or 2 or more subsets of them) with significantly small Dc or Dn values have ranges that are completely or mostly non-overlapping with the other clades in the nested group (particularly interiors).  
2
    - b. The pattern of completely or mostly non-overlapping ranges in the above condition represents a break or reversal from lower level trends within the nested clade series (applicable to higher-level clades only).
      - NO - Restricted Gene Flow with Isolation by Distance (Restricted Dispersal by Distance in Non-sexual species). This inference is strengthened if the clades with restricted distributions are found in diverse locations, if the union of their ranges roughly corresponds to the range of one or more clades (usually interiors) within the same nested group (applicable only to nesting clades with many clade members or to the highest level clades regardless of number), and if the Dc values increase and become more geographically widespread with increasing clade level within a nested series (applicable to lower level clades only).
      - YES - Go to step 9.
  
5. Are both of the following conditions satisfied?
  - a. The clades (or 2 or more subsets of them) with significantly small Dc values have ranges that are completely or mostly non-overlapping with the other clades in the nested group (particularly interiors).
  - b. The pattern of completely or mostly non-overlapping ranges in the above condition represents a break or reversal from lower level trends within the nested clade series (applicable to higher-level clades only).
    - NO - Go to step 6.
    - YES - Go to step 15.
  
6. Do clades (or haplotypes within them) with significant reversals or significant Dn values without significant Dc values define two or more geographically concordant subsets.
  - No - Go to step 7.
  - YES - Go to step 13.
  - TOO FEW CLADES (< 2) TO DETERMINE CONCORDANCE - Insufficient Genetic Resolution to Discriminate between Range Expansion/Colonization and Restricted Dispersal/Gene Flow - Proceed to step 7 to determine if the geographical sampling is sufficient to discriminate between short versus long distance movement.
  
7. Are the clades with significantly large Dn's (or tip clades in general when Dn for I-T is significantly small) separated from the other clades by intermediate geographical areas that were sampled?
  - NO - Go to step 8.
  - YES - Restricted Gene Flow/Dispersal but with some Long Distance Dispersal.
  
8. Is the species absent in the non-sampled areas?
  - NO - Sampling Design Inadequate to Discriminate between Isolation by Distance (Short Distance Movements) versus Long Distance Dispersal  
3
    - YES - Restricted Gene Flow/Dispersal but with some Long Distance Dispersal over Intermediate Areas not Occupied by the Species; or Past Gene Flow Followed by Extinction of Intermediate Populations.
  
9. Are the different geographical clade ranges identified in step 4 separated by areas that have not been sampled?
  - NO - Allopatric Fragmentation. (If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.)
  - YES - Go to step 10.
  
10. Is the species absent in the non-sampled areas?
  - NO - Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation and Isolation By Distance.

• YES - Allopatric Fragmentation. (If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.)

11. Is at least one of the following conditions satisfied?

- The Dc value(s) for some tip clade(s) is/are significantly large.
- The Dc value(s) for all interior(s) is/are significantly small.
- The I-T Dc is significantly small.

• NO - Go to step 17

• YES - Range Expansion, go to step 12.

12. Are the Dn and/or I-T Dn values significantly reversed from the Dc values?

• NO - Contiguous Range Expansion.

• YES - Go to step 13.

13. Are the clades with significantly large Dn's (or tip clades in general when Dn for I-T is significantly small) separated from the geographical center of the other clades by intermediate geographical areas that were sampled?

• NO - Go to step 14.

• YES - Long Distance Colonization Possibly Coupled with Subsequent Fragmentation (subsequent fragmentation is indicated if the clades displaying restricted but at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps) or Past Fragmentation Followed by Range Expansion. To see if secondary contact is involved, perform the supplementary tests given in Templeton, *Molecular Ecology* 10: 779-791, 2001. To discriminate the type of movement leading to this pattern, go to step 21.

14. Is the species present in the intermediate geographical areas that were not sampled?

4

• YES - Sampling Design Inadequate to Discriminate between Contiguous Range Expansion, Long Distance Colonization, and Past Fragmentation.

• NO - Long Distance Colonization and/or Past Fragmentation (not necessarily mutually exclusive). If inferred at a high clade level, fragmentation rather than colonization is inferred if the clades displaying restricted but at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps. If the branch lengths are short, a colonization event is inferred, perhaps associated with recent fragmentation. To discriminate the type of movement leading to this pattern, go to step 21.

15. Are the different geographical clade ranges identified in step 5 separated by areas that have not been sampled?

• NO - Past Fragmentation and/or Long Distance Colonization (not necessarily mutually exclusive). If inferred at a high clade level, fragmentation rather than colonization is inferred if the clades displaying restricted but at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps. If the branch lengths are short, a colonization event is inferred, perhaps associated with recent fragmentation. To discriminate the type of movement leading to this pattern, go to step 21.

• YES - Go to step 16.

16. Is the species present in the intermediate geographical areas that were not sampled?

• YES - Go to step 18.

• NO - Allopatric Fragmentation. If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.

17. Are either of the following conditions satisfied?

- The Dn values for tip or some (but not all) interior clades are significantly small.
- The Dn for one or more interior clades is/are significantly large.
- The I-T Dn value is significantly large.

• NO - Inconclusive Outcome.

• YES - Go to step 4.

18. Are the clades found in the different geographical locations separated by a branch length with a larger than average number of mutational steps.

• NO - Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation, Range Expansion, and Isolation By Distance.

• YES - Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation and Isolation By Distance.

19. Is the species present in the areas between the separated clades?

• NO - Allopatric Fragmentation. If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.

• YES - Go to step 20.

20. Was the species sampled in the areas between the separated clades?

• NO - Inadequate Geographical Sampling.

• YES - Go to step 2.

21. Are all of the following true?

a. Is it biologically realistic that the organism could have undergone long-distance movement?

b. Are the nested haplotypes that mark a potential long-distance colonization event within a clade that shows evidence of population growth by other methods (such as mismatch distributions)?

c. At the level of the entire cladogram, does the clade not inferred to have produced long-distance colonization not show evidence of past population growth with other methods?

• YES - Long-distance movement.

• NO - Insufficient evidence to discriminate between long-distance movements of the organism and the combined effects of gradual movement during a past range expansion and fragmentation. If the case against long-distance movement is compelling, then the inference is past gradual range expansion followed by fragmentation.

## D. DIFFERENCES PHENOLOGIQUES ENTRE *B. MACROCARPA* 2X ET 4X AUX CANARIES

Trois caractères phénologiques ont été mesurés en chambre de culture sur des *B. macrocarpa* issues de graines canariennes : la date de germination, la date de floraison et la date de fin de floraison.

Les dates de germination ne montrent pas de différences significatives entre les *B. macrocarpa* 2X et 4X, elles germent en majorité au bout d'une semaine environ (figure 75).

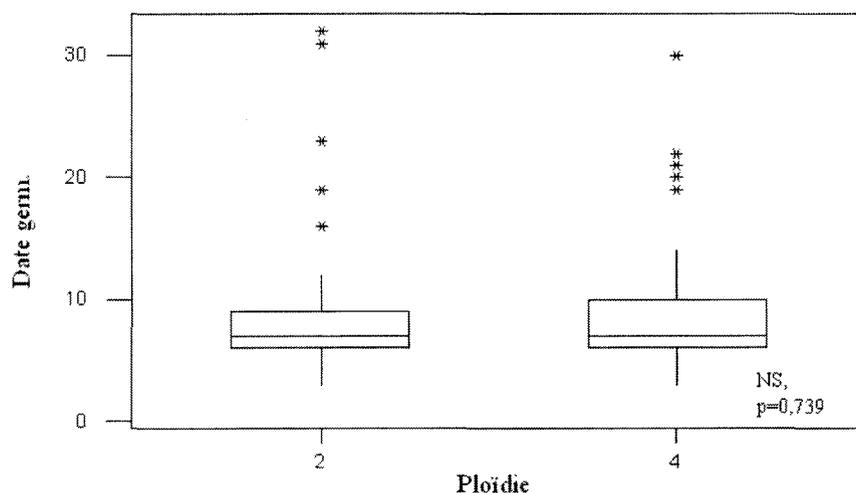
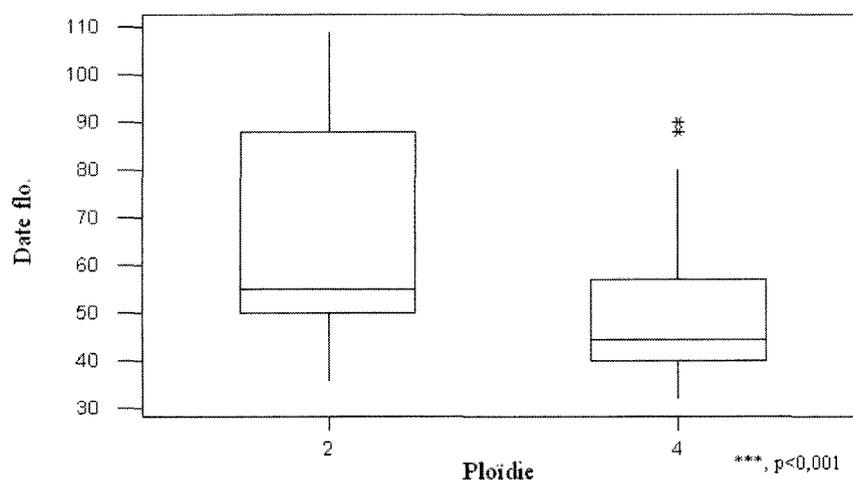


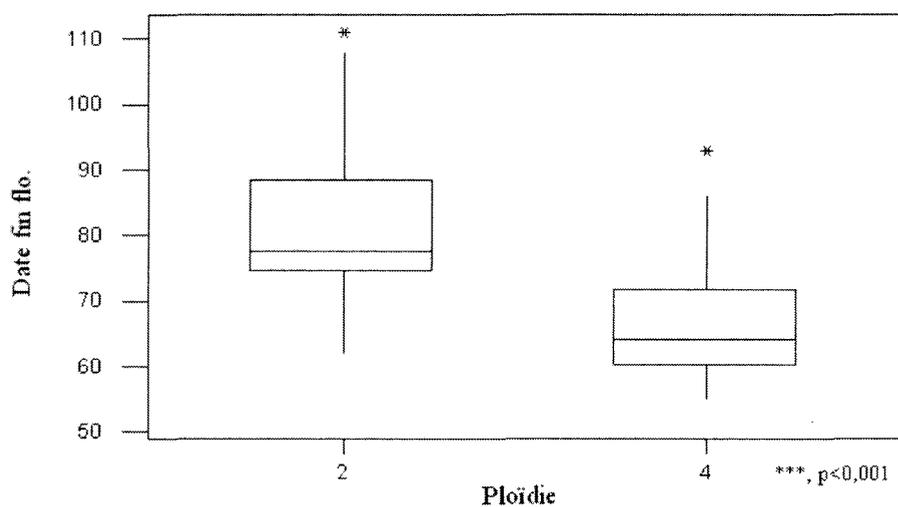
Figure 75 : Différences en termes de date de germination (nombre de jours après plantation) entre *B. macrocarpa* 2X et 4X en chambre de culture

Par contre, la date de floraison, en chambre de culture, est significativement plus tardive chez les 2X (de 66 jours en moyenne) que chez les 4X (49 jours), et montre de plus grande différences entre individus (figure 76). Les fenêtres de floraison se chevauchent.



La date de fin de floraison est, elle aussi, significativement différente entre les deux espèces (figure 77), avec une fin de floraison en moyenne à 81 jours après germination chez l'espèce diploïde et à 66 jours pour l'espèce tétraploïde.

**Figure 76 : Différences en termes de date de floraison (nb de jour après germination) entre *B. macrocarpa* 2X et 4X en chambre de culture**



**Figure 77 : Différences en termes de date de fin de floraison (nombre de jours après germination, quand il n'y a plus de pollen visible) entre *B. macrocarpa* 2X et 4X en chambre de culture**

Ces différences n'ont pas du tout été mises en évidence en conditions naturelles, l'environnement semblait en effet jouer un rôle primordial (latitude, ensoleillement, hygrométrie...)

# BIBLIOGRAPHIE

- Abe J, Tsuda C (1987) Genetic analysis for isozyme variation in the section *Vulgares*, genus *Beta*. *Japan. J. Breed* **37**, 253-261.
- Abe J, Yoshikawa H, Tsuda C (1986) Reproductive barriers in sugar beet and its wild relatives of the section *Vulgares*, the genus *Beta*. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ* **63**, 40-48.
- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A (2004) *Spartina anglica* C.E. Hubbard: a natural model system for analysing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**, 475-484.
- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A, Yannic G (2003) Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New Phytologist* **161**, 165-172.
- Albertson RC, Streelman JT, Kocher TD (2003) Directional selection has shaped the oral jaws of Lake Malawi cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**, 5252-5257.
- Aoki K, Suzuki T, al e (2003) Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA among the component species of evergreen broad-leaved forests in Japan. *Journal of Plant Research* **116**, 337-344.
- APG (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Biological Journal of the Linnean Society* **141**, 399-436.
- Arbogast BS, Edwards SV, Wakeley J, Beerli P, J.B. S (2002) Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. *Annual Review of Ecology & Systematics* **33**, 707-740.
- Aristegui J, Tett P, Hernandez-Guerra A, et al. (1997) The influence of island-generated eddies on chlorophyll distribution: a study of mesoscale variation around Gran Canaria. *Deep-Sea Res.* **44**, 71-96.
- Arnheim N (1983) Concerted evolution of multigene families. In: *Evolution of genes and proteins* (ed. Sinauer S, Mass.). M. Nei and R.K. Koehn, eds.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution* Oxford University Press, Oxford.
- Arnold ML, Hodges SA (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents. *Trends in Ecology & Evolution* **10**, 67-71.
- Avise J (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species* Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Avise J, Arnold J, Ball RM, et al. (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology & Systematics* **18**, 489-522.
- Baldwin BG, Sanderson JM, Porter JM, et al. (1995) The its Region of Nuclear Ribosomal DNA : a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**, 247-277.
- Barton ED, Basterretxea G, Flament P, et al. (2000) Lee region of Gran Canaria. *Journal of Geophys. Res.* **105**, 17173-17193.
- Barton ED, Flament P, Dodds H, Mitchelson-Jacob EG (2001) Mesoscale structures viewed by SAR and AVHRR near the Canary Islands. *Scientia Marina* **65 (S1)**, 167-175.
- Barton NH, Charlesworth B (1984) Genetic revolutions, founder effects, and speciation. *Annual Review of Ecology & Systematics* **15**, 133-164.
- Barton NH, Hewitt G (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* **341**, 497-503.
- Bartsch D, Clegg J, Ellstrand NC (1999a) Origin of wild beet and gene flow between *Beta vulgaris* and *B. macrocarpa* in California. In: *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops* (ed. Council BCP), pp. 269-274. Proceedings/Monograph Series.
- Bartsch D, Lehnen M, Clegg J, et al. (1999b) Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Molecular Ecology* **8**, 1733-1741.
- Basterretxea G, Barton ED, Tett P, et al. (2002) Eddy and deep chlorophyll maximum response to wind-shear in the lee of Gran Canaria. *Deep-Sea Res.* **49**, 1087-1101.
- Baumel A, Ainouche ML, Bayer RJ, al e (2002) Molecular phylogeny of hybridizing species from the genus *Spartina* Schreb (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **22**, 303-314.
- Baumel A, Ainouche ML, Misset MT, al e (2003) Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the introduced *Spartina alterniflora* (Poaceae) in south-west France: *Spartina x neyrautii* re-examined. *Plant Systematics and Evolution* **237**, 87-97.
- Bianchi N, Morri C (2000) Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Mar. Pollut. Bull* **40**, 367-376.

- Bidault M (1968) Essai de taxinomie expérimentale et numérique sur *Festuca ovina* L. dans le Sud-Est de la France. *Rev. Cytol. & Biol. Vég.* **31**, 217-356.
- Bidegaray-Batista L, Marcias-Hernandez N, Oromi P, Arnedo MA (2007) Living on the edge: demographic and phylogeographical patterns in the woodlouse-hunter spider *Dysdera lancerotensis* Simon, 1907 on the eastern volcanic ridge of the Canary Islands. *Molecular Ecology* **16**, 3198-3214.
- Blondel J, Aronson J (1999) *Biology and wildlife of the mediterranean region*. Oxford University Press, New York.
- Blumenstock DI, Thornwaite CW (1941) *Climate and Word Pattern*, Washington (US).
- Borsa P, Naciri M, Bahiri L, et al. (1997) Zoogéographie infra-spécifique de la mer Méditerranée. Analyse des données génétiques populationnelles sur seize espèces atlanto-méditerranéennes (Poissons et Invertébrés). *Vie Milieu* **47**, 295-305.
- Boudry P, McCombie H, Van Dijk H (2002) Vernalization requirement of wild beet *Beta vulgaris* ssp. *maritima*: among population variation and its adaptive significance. *Journal of Ecology* **90**, 693-703.
- Bouma E (2005) Development of comparable agroclimatic zones for the international exchange of data on the efficacy and crop safety of plant protection products. *Bulletin OEPP/EPP* **35**, 233-238.
- Bradshaw HD, Otto KG, Frewen BE, Mc Kay JK, Schemske DW (1998) Quantitative trait loci affecting differences in floral morphology between two species of monkeyflower (*Mimulus*). *Genetics* **149**, 367-382.
- Bradshaw HD, Schemske DW (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* **426**, 176-178.
- Bramwell D (1990) Conserving biodiversity in the Canary Islands. *Annual of the Missouri Botanical Garden* **77**, 28-37.
- Brideau NJ, Flores HA, Wang J, al. e (2006) Two Dobzhansky-Muller genes interact to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *Science* **314**, 1292-1295.
- BRIDGE (Biotechnologie Research for Innovation DaGiE (1993) Safety assessment of the deliberate release of two model transgenic plants. Oilseed rape and sugar beet. European Community funded BRIDGE project BIOT-910298.
- Brochmann C (1993) Reproductive strategies of diploid and polyploid populations of arctic *Draba* (Brassicaceae). *Plant Systematics and Evolution* **185**, 55-83.
- Brochmann C, Brysting AK, Alsos IG, al. e (2004) Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**, 521-536.
- Brown RP, Pestano J (1998) Phylogeography of skinks (Chalcides) in the Canary Islands inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* **7**, 1183-1191.
- Brown SC, Devaux P, Marie D, Bergounioux C, Petit PX (1991) Analyse de la ploïdie par cytométrie en flux. *Biofutur* **105**, 1-16.
- Bruun L, Haldrup A, Petersen SG, et al. (1995) Self-incompatibility reactions in wild species of the genus *Beta* and their relation to taxonomical classification and geographical origin. *Genetic Resources and Crop Evolution* **293-301**.
- Buffon (1761) Histoire naturelle tome IX (Animaux communs aux deux continents). In: *Oeuvres philosophiques de Buffon* (ed. Piveteau J).
- Burke JM, Carney SE, Arnold ML (1998) Hybrid fitness in the Louisiana irises: Analysis of parental and F<sub>1</sub> performance. *Evolution* **52**, 37-43.
- Bush GL (1975) Modes of animal speciation. *Annual Review of Ecology & Systematics* **6**, 339-364.
- Buttler KP (1977) Variation in wild populations of annual beet (*Beta*, Chenopodiaceae). *Plant Systematics and Evolution* **128**, 123-136.
- Byrne K, Nichols RA (1999) *Culex pipiens* in London underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. *Heredity* **82**, 7-15.
- Caicedo A, Schaal B (2004) Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Molecular Ecology* **13**, 1871-1882.
- Campbell DR (2003) Natural selection in *Ipomopsis* hybrid zones: implications for ecological speciation. *New Phytologist* **161**, 83-90.
- Campbell NA, Reece JB (2001) *Biology Benjamin Cummings*.
- Carracedo JC, Day S, Guillou H, al. e (1998) Hotspot volcanism close to a passive continental margin: the Canary Islands. *Geological Magazine* **135**, 591-604.
- Carracedo JC, Perez FJ, Ancochea E, et al. (2002) Cenozoic volcanism II: The Canary Islands. In: *The Geology of Spain* (ed. By Gibbons WaM, T.), pp. 439-472. Geological Society of London.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* **19**, 233-257.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1995) Quantative genetics in plants: the effect of the breeding system on genetic variability. *Evolution* **49**, 911-920.
- Chiang TY, Hong KH, Peng CI (2001) Experimental hybridization reveals biased inheritance of the internal transcribed spacer of the nuclear

- ribosomal DNA in *Begonia x taipeiensis*. *Journal of Plant Research* **114**, 343-351.
- Clausing G, Vickers K, Kadereit JW (2000) Historical biogeography in a linear system: genetic variation of Sea Rocket (*Cakile maritima*) and Sea Holly (*Eryngium maritimum*) along European coasts. *Molecular Ecology* **9**, 1823-1833.
- Clegg MT, Gaut BS, Morton BR (1996) Evolution of alcohol dehydrogenase genes in the Palm and Grass families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 11735-11739.
- Clement JS, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Jansen RK (1997) Relationships of the Canary Islands endemic species of *Silene* (Caryophyllaceae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany* **84** (Suppl.), 182.
- Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1660.
- Comai L, Tyagi AP, Winter K, et al. (2000) Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell* **12**, 1551-1567.
- Comes HP, Kadereit JW (1998) The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* **3**, 432-438.
- Cook DA, Scott RK (1993) *The Sugar beet crop* Chapman and Hall, Publishers.
- 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.
- Costich D, Meagher TR (1992) Genetic variation in *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae): Breeding system and geographic distribution. *Journal of Evolutionary Biology* **5**, 589-601.
- Coyer JA, Peters AF, Stam WT, Olsen JL (2003) Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Fucaceae: Phaeophyta) populations in Northern Europe. *Molecular Ecology* **12**, 1817-1829.
- Coyne JA, Lande R (1985) The genetic basis of species differences in plants. *American Naturalist* **126**, 141-145.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation* Sunderland, Massachusetts, USA.
- Crandall KA, Templeton AR (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with application to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* **134**, 959-969.
- Croizat L, Nelson G, Rosen DE (1974) Centres of origin and related concepts. *Systematic Zoology* **23**, 265-287.
- 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.
- Dale MFB, Ford-Lloyd BV (1985) The significance of multigerm seedballs in the genus *Beta*. *Watsonia* **15**, 265-267.
- Darwin C (1859) *The origin of species by means of natural selection* Murray, London.
- De Candolle AP (1820) Géographie botanique. In: *Dictionnaire des Sciences Naturelles*, pp. 359-422.
- Delevoryas T (1980) Polyploidy in gymnosperms. In: *Polyploidy-biological relevance* (ed. W.H. Lewis e), pp. 215-218. Plenum, New York.
- Demmins DS, Stockinger EJ, Chang YC, Walling LL (1989) Phylogenetic relationships between the chlorophyll a/b binding protein (CAB) multigene family: an intra- and interspecies study. *Journal of Molecular Evolution* **29**, 266-279.
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the Origin of Species* Columbia University Press, New York.
- Dobzhansky T (1941) *Genetics and the Origin of Species. Revised* Columbia Univ. Press, New York.
- Dobzhansky T (1951) *Genetics and the Origin of Species, 3rd ed.* Columbia University Press, New York.
- Donnelly P, Tavaré S (1986) The ages of alleles and a coalescent. *Advances in Applied Probability* **18**, 1-19.
- Dorken ME, Friedman J, Barrett SCH (2002) The evolution and maintenance of monoecy and dioecy in *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). *Evolution* **56**, 31-41.
- Elder JF, Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quarterly Review of Biology* **70**, 297-320.
- Eldredge N, Gould SJ (1972) Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. In: *Models in Paleobiology* (ed. Schopf TJM), pp. 82-115. Freeman, Cooper, & Co., San Francisco.
- Emerson BC, Oromi P, Hewitt GM (2000a) Colonisation and diversification of the species *Brachyderes rugatus* (Coleoptera) on the Canary Islands: evidence from mtDNA COII gene sequences. *Evolution* **54**, 911-923.
- Emerson BC, Oromi P, Hewitt GM (2000b) Interpreting colonization of the *Calathus* (Coleoptera: Carabidae) on the Canary Islands and Madeira through the application of the parametric bootstrap. *Evolution* **54**, 2081-2090.
- Encyclopaedia Britannica Online (2005) Adaptive radiation. Online Art.
- Engel CR, Daguin C, Serrao EA (2005) Genetic entities and mating system in hermaphroditic *Fucus spiralis* and its close dioecious relative *F.*

- vesiculosus (Fucaceae, Phaeophyceae). *Molecular Ecology* **14**, 2033-2046.
- Ennos RA, Sinclair WT, Hu X-S, Langdon A (1999) Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: *Molecular systematics and plant evolution* (ed. P. M. Hollingsworth RMB, and R. J. Gornall), pp. 1-19. Taylor & Francis, London, UK.
- Essenwanger O (2001) Classification of climates. In: *World Survey of Climatology, vol 1c, General Climatology*, Elsevier, Amsterdam (NL).
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587.
- Farris JS (1989) The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* **5**, 417-419.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fénart S, Touzet P, Arnaud J-F, Cuguen J (2006) Emergence of gynodioecy in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima* L.): a genealogical approach using chloroplastic nucleotide sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B, Series B* **273**, 1391-1398.
- Ferris C, King RA, Gray AJ (1997) Molecular evidence for the maternal parentage in the hybrid origin of *Spartina anglica* CE Hubbard. *Molecular Ecology* **6**, 185-187.
- Fitch WM (1971) Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**, 406-416.
- Ford-Lloyd BV (1986) Intraspecific variation in wild and cultivated beets and its effects upon intraspecific classification. In: *The systematic association* (ed. (Eds) BTS), pp. 331-344, Oxford.
- Francisco-Ortega J, Jansen RK, Santos-Guerra A (1996) Chloroplast DNA evidence of colonization, adaptive radiation, and hybridization in the evolution of the Macaronesian flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 4085-4090.
- Franks SJ, Richards CL, Gonzales E, Cousins JE (2004) Multi-scale genetic analysis of *Uniola paniculata* (Poaceae): a coastal species with linear fragmented distribution. *American Journal of Botany* **91**, 1345-1351.
- Frese L, De Meijer E, Letschert JPW (1990) New wild beet genetic resources from Portugal and Spain. *Zuckerindustrie* **115**, 950-955.
- Fuertes-Aguilar J, Ray MC, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Jansen RK (2002) Molecular evidence from chloroplast and nuclear markers for multiple colonizations of *Lavatera* (Malvaceae) in the Canary Islands. *Systematic Biology* **27**, 74-83.
- Fukuda T, Yokoyama J, Nakamura T, et al. (2005) Molecular phylogeny and evolution of alcohol dehydrogenase (Adh) genes in legumes. *BMC Biotechnology*.
- Futuyma DJ (1997) *Evolutionary Biology* Sinauer Associates.
- Gallardo M, Bickham JW, Honeycutt RL, Ojeda RA, Kohler N (1999) Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* **401**, 341.
- Garibaldi L, Caddy JF (1998) Biogeographic characterization of Mediterranean and Black Seas faunal provinces using GIS procedures. *Ocean Coast Manag.* **139**, 211-227.
- Gilmour JSL (1940) Taxonomy and phylosophy. In: *The New Systematics* (ed. Huxley JS), pp. 461-474. Oxford Univ. Press.
- Gomez A, Gonzalez-Martinez SC, Collada C, Climent J, Gil L (2003) Complex population genetic structure in the endemic Canary Island pine revealed using chloroplast microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 1123-1131.
- Gottlieb LD (1984) Genetics and morphological evolution in plants. *American Naturalist* **123**, 681-709.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2). A computer program to calculate *F*-Statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.
- Goudet J, Raymond M, De Meeüs T, Rousset F (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**, 1933-1940.
- Grant PR (1998) Evolution on islands. In: *Evolution on Islands* (ed. Grant PR). Oxford University Press, Oxford, UK/New York.
- Grant V (1981) *Plant speciation* Columbia University Press, New York.
- Grielly L, Taberlet P (1994) The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* **11**, 769-777.
- Grivet D (2002) *Phylogéographie et évolution moléculaire comparée d'arbres forestiers à l'aide de marqueurs chloroplastiques* Thesis, Université Raymond Poincaré.
- Haldane JBS (1922) Sex ratio and unisexual sterility in animal hybrids. *Journal of Genetics* **12**, 101-109.
- Hall R (1998) The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea. In: *Biogeography and geological evolution of SE Asia* (eds. Hall R, Holloway JD), pp. 99-132. Backhuys Publishers, Leiden.
- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis

- program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series (London)* **41**, 95-98.
- Hamrick JL, Godt MJW (1990) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, pp. 43-63. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hamrick JL, Godt MJW (1997) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. In: *Plant Life Histories: Ecology, Phylogeny, and Evolution* (eds. Silvertown J, Franco M, Harper JL). University Press, Cambridge.
- Harris PA, Ingram R (1991) Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* **40**, 393-412.
- Harrison RG (1986) Pattern and process in a narrow hybrid zone. *Heredity* **56**, 337-349.
- Hautekèete N-C, Piquot Y, Van Dijk H (2001) Investment in survival and reproduction along a semelparity-iteroparity gradient in the *Beta* species complex. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 795-804.
- Hawthorne DJ, Via S (2001) Genetic linkage of ecological specialization and reproductive isolation in pea aphids. *Nature* **412**, 904-907.
- Heaney LR (2007) Is a new paradigm emerging for oceanic island biogeography. *Journal of Biogeography* **34**, 753-757.
- Hernandez-Guerra A, Aristegui J, Canton M, Nykjaer L (1993) Phytoplankton pigments patterns in the Canary Islands as determined using Coastal Zone Colour Scanner Data. *International Journal of Remote Sens.* **14**, 1431-1437.
- Hershkovitz MA, Zimmer EA (1996) Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. *Nucleic Acids Research* **24**, 2857-2867.
- Hess J, Kadereit JW, Vargas P (2000) The colonization history of *Olea europea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Molecular Ecology* **9**.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**, 537-549.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **359**, 183-195.
- Hoecker N, Keller B, Piepho HP, Hochholdinger F (2006) Manifestation of heterosis during early maize (*Zea mays* L.) root development. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 421-429.
- Hohmann S, Kadereit JW, Kadereit G (2006) Understanding Mediterranean-Californian disjunctions: molecular evidence from Chenopodiaceae-Betoideae. *Taxon* **55**, 67-78.
- Howard DJ (1986) A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution* **40**, 34-43.
- Hsü KJ, Montadert L, Bernoulli D, al. e (1977) History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* **267**, 399-403.
- Huelsenbeck JP, Rannala B (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* **276**, 227-232.
- Huxlet J (1938) Clines: an auxiliary taxonomic principle. *Nature* **142**, 219.
- Ibrahim KM, Nichols RA, Hewitt GM (1996) Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* **7**, 282-291.
- Ingvarsson PK, Taylor DR (2002) Genealogical evidence for epidemics of selfish genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 11265-11269.
- Irwin DE (2000) Song variation in an avian ring species. *Evolution* **54**, 998-1010.
- Irwin DE, Bensch S, Irwin JH, Price TD (2005) Speciation by distance in a ring species. *Science* **307**, 414-416.
- Irwin DE, Bensch S, Price TD (2001a) Speciation in a ring. *Nature* **409**, 333-337.
- Irwin DE, Irwin JH, Price TD (2001b) Ring species as bridges between microevolution and speciation. *Genetica* **112**, 223-243.
- Jones CD (1998) The genetic basis of *Drosophila sechellia*'s resistance to a host plant toxin. *Genetics* **149**, 1899-1908.
- Juan C, Emerson BC, Oromi P, Hewitt GM (2000) Colonization and diversification: towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. *Trends in Ecology & Evolution* **15**, 104-109.
- Juan C, Oromi P, Hewitt GM (1995) Mitochondrial DNA phylogeny and sequential colonization of Canary islands by darkling beetles of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae). *Proceedings of the Royal Society of London B* **261**, 173-180.
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: *Mammalian protein metabolism* (ed. Munro HN). Academic Press, New York.
- Kadereit JW, Arafeh R, Somogyi G, Westberg E (2005) Terrestrial growth and marine dispersal? Comparative phylogeography of five coastal plant species at a European scale. *Taxon* **54**, 861-876.
- Kenton A, Parokony AS, Gelab YY, Bennet MD (1993) Characterization of the Nicotiana

- tabacum L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular Genetics and Genomics* **240**, 159-169.
- Kim SC, Rieseberg LH (1999) Genetic architecture of species differences in annual sunflowers: implications for adaptive trait introgression. *Genetics* **153**.
- Kim Y-J, Jansen RK (1994) Characterization and phylogenetic distribution of a structural change in chloroplast DNAs of Berberidaceae. *Plant Systematics and Evolution* **193**, 107-114.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- Kirk H, Vrieling K, Klinkhamer PGL (2005) Maternal effects and heterosis influence the fitness of plants hybrids. *New Phytologist* **166**, 685-694.
- Kluge G, Farris JS (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* **18**, 1-32.
- Kotlik P, Bogutskaya N, Ekmekçi F (2004) Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. *Molecular Ecology* **13**, 87-96.
- Krijgsman W, Hilgen FJ, Raffi I, Sierro FJ, Wilson DS (1999) Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* **400**, 652-655.
- Kusterer B, Muminovic J, Utz HF, et al. (2007) Analysis of a triple testcross design with recombinant inbred lines reveals a significant role of epistasis in heterosis for biomass-related traits in *Arabidopsis*. *Genetics* **175**, 2009-2017.
- Lange W, Brandenburg WA, De Bock TSM (1999) Taxonomy and cultonony of beet (*Beta vulgaris* L.). *Botanical Journal of the Linnean Society* **130**, 81-96.
- Lange W, De Bock TSM (1989) The diploidised meiosis of tetraploid *Beta macrocarpa* and its possible application in breeding sugar beet. *Plant Breeding* **103**, 196-206.
- Langella O (2002) Population 1.2.28. Logiciel de génétique des populations (ed. Laboratoire Population géé, CNRS UPR 9034), Gif-sur-Yvette.
- Laporte V, Viard F, Bena G, Valero M, Cuguen J (2001) The spatial structure of sexual and cytonuclear polymorphism in the gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima*: I/ at a local scale. *Genetics* **157**, 1699-1710.
- Lee HS, Chen ZJ (2001) Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 6753-6758.
- Leitch JI, Bennett MD (1997) Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* **2**, 470-476.
- Letschert JPW (1993) *Beta* section *Beta* : biogeographical patterns of variation and taxonomy. *Wageningen Agricultural University Papers* **93**, 1-137.
- Levin DA (2000) *The origin, expansion, and demise of plant species* NY, USA: Oxford University Press, New York.
- Levin RA, Watson K, Bohs L (2005) A four-gene study of evolutionary relationships in *Solanum* section *Acanthophora*. *American Journal of Botany* **92**.
- Lewis WH (1979) Polyploidy in species populations. In: *Polyploidy: Biological relevance* (ed. W.H. Lewis e), pp. 103-144. Plenum, New York.
- Luikart G, England PR, Tallmon DA, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat Rev Genet* **4**, 981-994.
- MacArthur RH, Wilson EO (1967) *The theory of island biogeography* Princeton University Press, Monographs in Population Biology.
- Macnair MR, Christie P (1983) Reproductive isolation as a pleiotropic effect of copper tolerance in *Mimulus guttatus*? *Heredity* **50**, 295-302.
- Markgraf F (1934) Genetische Beziehungen der Mittelmeerflora. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **52**, 68-79.
- Marrero-Diaz A, Pelegri JL, Rodriguez-Santana A, Sangra A (2001) Applicability of T-S algorithms to the Canary Islands region. *Scientia Marina* **65** (S1), 195-204.
- Martinez F, Montero G (2004) The *Pinus pinea* L. woodlands along the coast of southwestern Spain: data for a new geobotanical interpretation. *Plant Ecology* **175**, 1-18.
- Martins MJ, Collares-Pereira MJ, Cowx IG, Coelho MM (1998) Diploids vs triploids of *Rutilus alburnoides*: spatial segregation and morphological differences. *Journal of Fish Biology* **52**, 817-828.
- Matzke MA, Mittelsten SO, Matzke AJM (1999) Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. *BioEssays* **21**, 761-767.
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species* Columbia University Press, New York.
- Mayr E (1963) *Animal species and evolution* Belknap Press, Cambridge, Mass.
- Mayr E (1967) The challenge of island faunas. *Australian Natural History* **15**, 359-374.
- Mayr E (1974) *Populations, espèces et évolution* Hermann, Paris.
- Mc Farlane JS (1971) Variety development. In: *Advances in Sugar beet production: principles and practices* (eds. Johnson RT, Alexander JT, Rush GE, Hawkes GM). Iowa State Univ. Press, Ames.

- Mc Farlane JS (1975) Naturally occurring hybrids between sugar beet and *Beta macrocarpa* in the Imperial Valley of California. *Journal of the A.S.S.B.T.* **18**, 245-251.
- McGrath JM, Trebbi D, Fenwick A (2007) An open-source first-generation molecular genetic map from a sugarbeet x table beet cross and its extension to physical mapping. *Crop Science* **47**, 27-44.
- Médail F, Quézel P (1999) Biodiversity hotspots in the Mediterranean basin: setting global conservation priorities. *Conservation Biology* **13**, 1510-1513.
- Mogensen HL (1996) The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany* **83**, 383-404.
- Molina R, Cabanas JM, Laatzén FL (1996) Corriente e hidrografía en la región Canaria: Campana Canaria 9205. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* **12**, 43-52.
- Moore WS (1977) An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review of Biology* **53**, 263-277.
- Mörchen M, Cuguen J, Michaelis G, Hanni C, Saumitou-Laprade P (1996) Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics* **92**, 326-333.
- Mossberg M, Stenberg L (1992) *Den nordiska floran* W & W.
- Mueller HJ (1940) *Bearing of the Drosophila work on systematics* New York.
- Muir G, Fleming CC, Shlötterer C (2000) Species status of hybridizing oaks. *Nature* **405**, 1016.
- Mummenhoff K, Bruggemann H, al e (2001) Chloroplast DNA phylogeny and biogeography of *Lepidium* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **88**, 2051-2063.
- NASA (2007) Canary\_sand2. In: [http://daac.gsfc.nasa.gov/oceancolor/images/Canary\\_sand2.jpg](http://daac.gsfc.nasa.gov/oceancolor/images/Canary_sand2.jpg).
- Nelson G, Platnick N (1981) *Systematics and biogeography* Columbia University Press, New York.
- Neves SS, Watson MF (2003) Phylogenetic relationship in *Bupleurum* (Apiaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence data. *Annals of Botany (London)* **5**, 827-834.
- Nishizawa S, Kubo T, Mikami T (2000) Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets. *Current Genetics* **37**, 34-38.
- Noor MA, Grams KL, Bertucci LA, al. e (2001a) The genetics of reproductive isolation and the potential for gene exchange between *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis* via backcross hybrid males. *Evolution* **55**, 512-521.
- Noor MA, Grams KL, Bertucci LA, Reiland J (2001b) Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 12084-12088.
- Nutall N (1998) Stand clear of the Tube's 100-year-old super-bug. In: *Times (London)*.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2 (ed. author Pdbt), Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. .
- O'Neil D (2006) Micro and macro evolution.
- Ojeda RA, Diaz GB, Campos CM, et al. (2007) La rata vizcacha colorada, *Tympanoctomys barrerae* (RODENTIA, OCTODONTIDAE): un modelo para el estudio de especializaciones al desierto.
- Olmstead RG, Palmer JD (1994) Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany* **8**, 1205-1224.
- Olsen JL, Stam WT, Coyer JA, et al. (2004) North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. *Molecular Ecology* **13**, 1923-1941.
- Orr HA (1990) 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants' revisited. *American Naturalist* **136**, 1475-1480.
- Orr HA (2005a) The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nature Reviews Genetics* **6**, 119-127.
- Orr HA (2005b) The genetic basis of reproductive isolation: insights from *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**, 6522-6526.
- Orr M, Smith T (1998) Ecology and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **13**, 502-506.
- Osborne TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* **19**, 141-147.
- Otte D, Endler JA (1989) *Speciation and its consequences* Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* **34**, 401-437.
- Ozkan H, Levy AA, Feldman M (2001) Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group.
- Pacheco M, Hernandez-Guerra A (1999) Seasonal variability of recurrent phytoplankton pigment patterns in the Canary Islands area. *International Journal of Remote Sens.* **29**, 1405-1418.
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display pylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.

- Palmer JD, Thompson WF (1982) Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost. *Cell* **29**, 537-550.
- Panero JL, Francisco-Ortega J, Jansen RK, Santos-Guerra A (1999) Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a New World biogeographic connection of the Macaronesian Island endemic *Pericallis* (Asteraceae: Senecioneae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 13886-13891.
- Park S-J, Korompai EJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Jansen RK (2001) Phylogenetic relationships of *Tolpis* based on *ndhF* sequence data. *Plant Systematics and Evolution* **226**, 23-33.
- Pelegri JL, Aristegui J, Cana L, *et al.* (2005) Coupling between the open ocean and the coastal upwelling region off northwest Africa: water recirculation and offshore pumping of organic matter. *Journal of Marine Systems* **54**, 3-37.
- Pikaard CS (2001) Genomic change and gene silencing in polyploids. *Trends in Genetics* **17**, 675-677.
- Pineiro R, Fuertes-Aguilar J, Draper Munt D, Nieto Feliner G (2007) Ecology matters: Atlantic-Mediterranean disjunction in the sand-dune shrub *Armeria pungens* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology* **16**, 2155-2171.
- Pinto FM, Brehm A, Hernandez M, *et al.* (1997) Population genetic structure and colonization sequence of *Drosophila subobscura* in the Canaries and Madeira Atlantic islands as inferred by autosomal, sex-linked and mtDNA traits. *Journal of Heredity* **88**, 108-114.
- Podos J (2001) Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches. *Nature* **409**, 185-188.
- Posada D, Crandall K (2001) Interspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 37-45.
- Posada D, Crandall K, Templeton A (2000) GeoDis: A program for the Cladistic Nested Analysis of the Geographical Distribution of Genetic Haplotypes. *Molecular Ecology* **9**, 487-488.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Rajhathi T, Thomas H (1974) Cytogenetics of oats (*Avena L.*). *Misc. publ. genet. soc. can.* **no. 2**.
- Ramsey J, Schenck DW (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology & Systematics* **29**, 467-501.
- Ratcliffe LM, Grant PR (1983) Species recognition in Darwin's finches (*Geospiza*, Gould). II: geographic variation in mate preference. *Animal Behaviour* **31**, 1154-1165.
- Rauscher JT, Doyle JJ, Brown AHD (2004) Multiple origins and nrDNA internal transcribed spacer homeologue evolution in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) allopolyploid complex. *Genetics* **166**, 987-998.
- Raybould AF, Mogg RJ, Aldam C, *et al.* (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) GENEPOP (Version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Reeve HK, Sherman PW (1993) Adaptation and the goals of evolutionary research. *Quarterly Review of Biology* **68**, 1-32.
- Reinisch AJ, Dong JM, Brubaker CL, *et al.* (1994) A detail RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics* **138**, 829-847.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology & Systematics* **27**, 83-109.
- Richards CM, Brownson M, Mitchell SE, Kresovich S, Panella L (2004) Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*). *Molecular Ecology Notes* **4**, 243-245.
- Ridley M (1997) *Evolution biologique* De Boeck Université, Paris.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 351-358.
- Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* **83**, 363-372.
- Rieseberg LH, Van Fossen C, Desrochers AM (1995) Hybrid speciation accompanied by genomic reorganization in wild sunflowers. *Nature* **375**, 313-316.
- Rieseberg LH, Widmer A, Arntz AM, Burke J (2002) Directional selection is the primary cause of phenotypic diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 12242-12245.
- Rikli M (1946) *Das Pflanzenkleid der Mittelmeerländer*, Bern.
- Riley R, Chapman V (1958) Genetic control of the cytological diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* **182**, 713-715.
- Roelofs D, van Velzen J, Kuperus P, Bachmann K (1997) Molecular evidence for an extinct parent of the tetraploid species *Microseris acuminata* and *M. campestris* (Asteraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology* **6**, 641-649.
- Rogers SM, Bernatchez L (2007) The genetic architecture of ecological speciation and the association with signatures of selection in natural lake whitefish (*Coregonus* sp.

- Salmonidae) species pairs. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1423-1438.
- Ronquist R (1997) Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* **46**, 195-203.
- Rosen D (1978) Vicariant patterns and historical explanations in biogeography. *Systematic Zoology* **27**, 159-188.
- Rova JHE, Delprete PG, Andersson L, Albert VA (2002) A trnL-F cpDNA sequence study of the Condamineae-Rondeletieae-Sipaneae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. *American Journal of Botany* **89**, 145-159.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.
- Rubidge EM, Taylor EB (2004) Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*). *Molecular Ecology* **13**, 3735-3749.
- Sahuquillo E, Lumaret R (1999) Chloroplast DNA variation in *Dactylis glomerata* L. taxa endemic to the Macaronesian islands. *Molecular Ecology* **8**, 1797-1803.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1995) Documentation of reticulate evolution in peonies (*Peonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**, 6813-6817.
- Sawamura K, Davis A, Wu C (2000) Genetic analysis of speciation by means of introgression into *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 2652-2655.
- Schaal BA, Haywood DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* **7**, 465-474.
- Schaal BA, Olsen KM (2000) Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 7024-7029.
- Scheen AC, Elven R, Brochmann C (2002) A molecular-morphological approach solves taxonomic controversy in arctic *Draba* (Brassicaceae). *Canadian Journal of Botany* **80**, 59-71.
- Schinozaki K, Ohme M, Tanaka M (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organisation and expression. *EMBO J.* **5**, 2043-2049.
- Schluter D (2000) *The ecology of adaptive radiation* Oxford University Press, Oxford, UK.
- Schmitt T (2007) Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Servedio MR (2000) Reinforcement and the genetics of nonrandom mating. *Evolution* **54**, 21-29.
- Shen Y, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (1998a) Genetic relationships within the genus *Beta* determined using both PCR-based marker and DNA sequencing techniques. *Heredity* **80**, 624-632.
- Shen Y, Newbury HJ, Ford-Lloyd BV (1998b) Identification of Taxa in the Genus *Beta* using ITS1 Sequence Information. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**, 147-155.
- Shi S, Jin H, Zhong Y, et al. (2000) Phylogenetic relationships of the *Magnoliaceae* inferred from cpDNA *matK* sequences. *Theoretical and Applied Genetics* **101**, 925-930.
- Smith GA (1980) Sugar beet. In: *Hybridization of Crop Plants* (ed. Agronomy ASf). Crop Science Society of America.
- Solignac M, Periquet G, Anxolabehere D, Petit C (1995) *Génétique et évolution. Tome 1 et 2* Hermann, Paris.
- Soltis DE, Soltis PS (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**, 243-273.
- Soltis DE, Soltis PS (1995) The dynamic nature of polyploid genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**, 8089-8091.
- Soltis DE, Soltis PS (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 348-352.
- Soltis PS, Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 7051-7057.
- Song G, Sang T, Lu B-R, Hong D-Y (1999) Phylogeny of rice genomes with emphasis origins of allotetraploid species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 14400-14405.
- Song K, Lu P, Tang K, Osborne TC (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**, 7719-7723.

- Song ZP, Lu B-R, Wang B, Chen JK (2004) Fitness estimation through performance comparison of *F1* hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O. sativa*. *Annals of Botany (London)* **93**, 311-316.
- Stahl DJ, Kloos DU, Hehl R (2004) A sugar beet chlorophyll a/b binding protein promoter void of G-box like elements confers strong and leaf specific reporter gene expression in transgenic sugar beet. *BMC Biotechnology* **4**, 31.
- Stebbins GL (1950) *Variation and evolution in plants* Columbia university press, New York.
- Stebbins GL (1971) *Chromosomal evolution in higher plants* Edward Arnold, London.
- Suc JP (1984) Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. *Nature* **307**, 429-432.
- Sullivan J, Arellano E, Rogers Ds (2000) Comparative phylogeography of mesoamerican highland rodents: concerted vs independent response to past climatic fluctuations. *American Naturalist* **155**, 755-768.
- Sweigart AL, Willis JH (2003) Patterns of nucleotide diversity in two species of *Mimulus* are affected by mating system and asymmetric introgression. *Evolution* **57**, 2490-2506.
- Swofford DL (2002) *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, Sunderland, MA.
- Taberlet P, Fumagalli L, A-G W-S, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* **7**, 381-397.
- Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* **13**, 789-809.
- Templeton AR, Georgiadis NJ (1996) A landscape approach to conservation genetics: conserving evolutionary processes in the African Bovidae. In: *Conservation Genetics: Case Histories From Nature* (eds. Avise JC, Hamrick JL), pp. 398-430. Chapman & Hall, New York.
- Templeton AR, ROUTMAN E, PHILLIPS CA (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* **140**, 767-782.
- Thompson JD (1991) The biology of an invasive plant: what makes *Spartina anglica* so successful? *BioScience* **41**, 393-401.
- Thompson JD (2005) *Plant evolution in the Mediterranean* University of Oxford Press, Oxford.
- Thomson JD, Lumaret R (1992) The evolutionary dynamics of polyploid plants: Origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology & Evolution* **7**, 302-307.
- Thorpe RS, McGregor DP, Cumming AM, Jordan WC (1994) DNA evolution and colonization sequence of island lizards in relation to geological history: mtDNA, RFLP, cytochrome B, cytochrome oxidase, 12S rRNA and nuclear RAPD analysis. *Evolution* **48**, 230-240.
- Thran P, Broekhuizen S (1965) Agro-ecological atlas of cereal growing in Europe. In: *Vol I: Agro-Climatic Atlas of Europe*, Wageningen.
- Ticehurst CB (1938) *A systematic review of the genus Phylloscopus*, New York.
- Toll J, Hendricksen A (1982) Collecting Beta in Sicily. *Plant Genetics Ressources Newsletters* **49**, 2-4.
- Transhel V (1927) Obzor vida roda Beta. *Trudy prikl Bot Genet Selek* **17**, 203-223.
- Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, al. e (2004) Relationship of *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae, Lactucaceae), an endangered species of the Iberian Peninsula, to *H. radicata* and *H. glabra* and biogeographical implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* **146**, 79-95.
- Uhl CH (1978) Chromosome of Mexican Sedum, II Section Pachysedum. *Rhodora* **80**, 491-512.
- Ulbrich E (1934) Beta. In: *Engler A, Prantl V. Die Natürlichen Pflanzenfamilien. 2nd edition*, pp. 379-584.
- Uyeno T, Smith GR (1972) Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes. *Science* **175**, 644-646.
- 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**, 47-60.
- van Houten WJH, Scarlett N, Bachmann K (1993) Nuclear DNA markers of the Australian tetraploid *Microseris scapigera* and its North American diploid relatives. *Theoretical and Applied Genetics* **87**, 498-505.
- Vargas P, Morton CM, Jury SL (1999) Biogeographic patterns in Mediterranean and Macaronesian species of *Saxifraga* (Saxifragaceae) inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. *American Journal of Botany* **86**, 724-734.
- Viard F (2001) Structure génétique dans des réseaux de populations subdivisées: influence de la migration et des systèmes de reproduction. (Rapport d'HDR) Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq.
- Viard F, Bernard J, Desplanque B (2002) Crop-weed interactions in the *Beta vulgaris* complex at a local scale: allelic diversity and gene flow within sugar beet fields. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 688-697.

- Vries Hd (1905) *Species and varieties. Their origin by mutation* ed. Daniel Trembly MacDougal (Chicago: Open Court), Chicago.
- Wagner WL, Funk VA (1995) *Hawaiian biogeography: evolution on a hot spot archipelago* Smithsonian Institution Press, Washington/London.
- Wallace AR (1876) *The geographical distribution of animals: with a study of the relations of living and extinct faunas as elucidating the past changes of the earth's surface* Macmillan, London.
- Waples RS (1998) Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* **89**, 438-450.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* **42**, 225-249.
- Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T (1995) Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**, 280-284.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications* (eds. Innes M, Gelfand D, Sninsky J, White T), pp. 315-322. Academic Press.
- Widmer A, Baltisberger M (1999) Molecular evidence for allopolyploid speciation and a single origin of the narrow endemic *Draba ladina* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **86**, 1282-1289.
- Widmer A, Lexer C (2001) Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 267-269.
- Williams D, Dunkerley D, DeDecker P, Kershaw P, Chappell M (1998) *Quaternary environments* Arnold, London.
- Winge Ö (1917) The chromosomes: Their number and general importance. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **13**, 131-275.
- Yokoyama, Harry M (1993) Molecular phylogeny and evolutionary rates of Alcohol Dehydrogenase in Vertebrates and Plants. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 1215-1226.
- Zimmer EA, Roalson EH, Skog LE, Boggan JK, Idnurm A (2002) Phylogenetic relationships in the Gesnerioideae (Gesneriaceae) based on nrDNA ITS and cpDNA trnL-F and trnE-T spacer region sequences. *American Journal of Botany* **89**, 296-311.
- Zohary M (1973) *Geobotanical Foundations of the Middle East*, Stuttgart.

