

Marsilea strigosa Willd. : statut génétique et démographique d'une espèce menacée

Renaud Vitalis, Bruno Colas, Miquel Riba Rovira, Isabelle Olivieri

Abstract

Marsileaceae are aquatic heterosporeous ferns, well adapted to temporary ponds. The main goal of this study is to report on the genetic and demographic status of this species. We emphasize how the spatial structure of populations and temporal dynamics of the populations affect the amount of genetic variation observed.

Résumé

Les Marsileaceae sont des fougères hétérosporées, aquatiques, particulièrement adaptées aux mares temporaires. Le but principal de cette étude est de déterminer le statut démographique et génétique de cette espèce, en insistant sur les effets de la structure spatiale des populations et de leur dynamique sur la diversité génétique.

Citer ce document / Cite this document :

Vitalis Renaud, Colas Bruno, Riba Rovira Miquel, Olivieri Isabelle. *Marsilea strigosa* Willd. : statut génétique et démographique d'une espèce menacée. In: Ecologia mediterranea, tome 24 n°2, 1998. pp. 145-157;

doi : <https://doi.org/10.3406/ecmed.1998.1858>

https://www.persee.fr/doc/ecmed_0153-8756_1998_num_24_2_1858

Ressources associées :

Marsilea strigosa

Fichier pdf généré le 20/04/2020

***Marsilea strigosa* Willd. : statut génétique et démographique d'une espèce menacée**

***Marsilea strigosa* Willd. : genetic and demographic status of an endangered species**

Renaud VITALIS^{1,2}, Bruno COLAS^{1,2,3}, Miquel RIBA⁴ & Isabelle OLIVIERI^{2,3}

¹ Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, Castel S^{te} Claire, rue S^{te} Claire, 83418 Hyères Cedex, France

² Laboratoire Génétique et Environnement, C. C. 065, Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, UMR 5554, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France
Tél. : (33) 4 67 14 47 19 ; Fax. : (33) 4 67 14 20 32 ; E-mail : vitalis@isem.univ-montp2.fr

³ Station de Génétique et Amélioration des Plantes, Institut National de la Recherche Agronomique de Montpellier, Domaine de Melguil, 34130 Mauguio, France

⁴ Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Espagne

RESUME

Les *Marsileaceae* sont des fougères hétérosporées, aquatiques, particulièrement adaptées aux mares temporaires. Le but principal de cette étude est de déterminer le statut démographique et génétique de cette espèce, en insistant sur les effets de la structure spatiale des populations et de leur dynamique sur la diversité génétique.

Mots-clés : *Marsilea strigosa*, biologie de la conservation, génétique des populations, marqueurs enzymatiques, marqueurs RAPDs

ABSTRACT

Marsileaceae are aquatic heterosporeous ferns, well adapted to temporary ponds. The main goal of this study is to report on the genetic and demographic status of this species. We emphasize how the spatial structure of populations and temporal dynamics of the populations affect the amount of genetic variation observed.

Key-words: *Marsilea strigosa*, conservation biology, population genetics, enzymatic markers, RAPDs markers

ABRIDGED ENGLISH VERSION

Natural populations live in a temporally and spatially varying environments. They face short term threats (demographical, genetical and environmental stochasticity) and long term threats (loss of evolutionary potential), that eventually may lead to extinction. Effective population size and dispersal rates are key parameters to understand these threats. They can be evaluated by direct (demographic surveys) and indirect (measures of genetical variability) methods. The goal of this study is to report on the demographic and genetic status of an endangered species of fern *Marsilea strigosa*, Willd. (*Marsileaceae-Pteridophyta*). This knowledge is a necessary, but not sufficient prerequisite, to propose management clues for threatened species. We sampled three populations in the south of France and seven Spanish populations. The population of Roque-Haute (France) was surveyed in June 1994 and June 1995. For the Roque-Haute and Vendres populations, genetic variability was assessed at 11 enzymatic systems (17 putative loci) and 9 RAPDs loci. For all other populations, enzymatic polymorphism was assessed at 7 systems (12 loci). No polymorphism was detected, within and among sampled populations. Small population sizes and reduced colonisation ability are expected to reduce variability within population. The lack of polymorphism among populations can be interpreted in two ways : either there is still gene flow over long distances, or a single founder event was followed by successive colonisations, or both. All sampled populations could thus be issued from a single clone.

INTRODUCTION

Les populations naturelles vivent dans un environnement changeant, à la fois dans le temps et dans l'espace. Elles font face à deux catégories de menaces conduisant toutes deux éventuellement à l'extinction : une menace à court terme, liée aux variations stochastiques démographiques, génétiques et environnementales, et une menace à long terme, que représente la perte de potentiel évolutif (en l'absence de variabilité sur des caractères adaptatifs, la sélection naturelle ne peut en effet s'exercer pour promouvoir de nouvelles adaptations). Les variations continues du milieu menacent alors la persistance d'une espèce, incapable de faire face à de nouvelles conditions environnementales. Bien sûr, tous ces facteurs de risque sont étroitement interconnectés (Gilpin & Soulé, 1986).

Hormis les risques environnementaux (plusieurs années consécutives de sécheresse, incendies) les risques à court terme sont liés principalement aux incertitudes démographiques (dans une population de petite taille, il se peut que, par hasard, sans l'intervention de causes environnementales ou génétiques, aucun individu ne se reproduise une année) et aux incertitudes génétiques (la dérive génétique peut, parmi d'autres effets, conduire à la fixation d'allèles légèrement délétères et diminuer la valeur sélective des individus) (Shaffer, 1981 ; 1987). Dans ces deux cas, la taille efficace des populations ainsi que la capacité à coloniser de nouveaux sites favorables sont des facteurs primordiaux. La taille efficace peut être interprétée comme une mesure du taux auquel la variabilité génétique est perdue sous l'effet de la dérive génétique. De façon plus précise, on définit la taille efficace de variance comme étant la taille d'une population idéale, panmictique, qui retiendrait la même variance génétique

que la population étudiée. Elle est, dans une certaine mesure, corrélée au nombre d'individus qui participent à la reproduction. La capacité à coloniser de nouveaux sites, quant à elle, sera d'autant plus forte que les individus montrent beaucoup d'aptitude à la dispersion. Elle permet de contrebalancer l'effet des extinctions locales : c'est la dynamique à l'échelle de la métapopulation (Olivieri *et al.*, 1990).

Ces paramètres clés que sont la taille efficace et le taux de dispersion peuvent être estimés par des approches directes (suivis démographiques des populations) et indirectes (mesures de la variabilité génétique). L'approche indirecte repose sur le fait que la diversité génétique mesurée sur des marqueurs neutres vis-à-vis de la sélection naturelle est avant tout un reflet de l'histoire démographique des populations.

L'objectif de cette étude est de documenter le statut démographique et génétique de *Marsilea strigosa* Willd. (*Marsileaceae-Pteridophyta*), fougère aquatique rare, inscrite dans le Livre Rouge des Espèces Menacées de France (Olivier *et al.*, 1995), ainsi que dans la Directive Européenne "Habitats", où elle bénéficie de la mention d'espèce vulnérable. L'aire de répartition de cette espèce est disjointe. On la trouve sur le pourtour méditerranéen (France, Espagne, Baléares, Algérie, Maroc, Egypte, Italie, Sardaigne) et dans le delta de la Volga, au nord de la mer Caspienne (Tutin *et al.*, 1964).

Les *Marsileaceae* sont particulièrement adaptées aux habitats de mares temporaires. La fécondation des spores et la germination des sporophytes semblent avoir lieu au début du printemps, dans les mares inondées. Dans les mares en eau (10 à 50 cm de profondeur), les plantes adultes sont caractérisées par leurs frondes glabres, flottant à la surface de l'eau. Avec l'avancement de la saison, les mares s'assèchent et les

Marsilea développent des frondes pubescentes, plus prostrées. Sur le stolon, se forment les sporocarpes, organes contenant les spores, qui constituent ainsi un organe particulier de résistance à la sécheresse. Les spores que renferment ce sporocarpes sont sexuées. Les microspores et les macrospores vont former respectivement les gamétophytes mâles et femelles, qui contiennent les gamètes mâles (libérés dans le milieu aquatique) et femelles. Ce système de reproduction particulier des fougères dites hétérosporées, empêche l'autofécondation intra-gamétophytique.

Dans la perspective de proposer un plan de gestion d'une espèce menacée telle que *Marsilea strigosa*, la connaissance de son statut démographique et génétique constitue un pré-requis nécessaire, bien que non-suffisant. La combinaison des deux approches, directes et indirectes, nous informe sur la démographie de cette espèce et donc sur les risques qu'elle encourt à court terme (Ellstrand & Elam, 1993 ; Lande & Barrowclough, 1987 ; Ewens *et al.*, 1987). Dans une perspective de gestion à plus long terme, le choix de stratégies de conservation, de réintroduction de nouvelles populations, ou de renforcement des populations existantes reposera entre autres sur la connaissance de la variabilité génétique des populations qui composent l'espèce (Gilpin & Soulé, 1986).

METHODES

Echantillonnage

L'échantillonnage de *Marsilea strigosa* concerne trois populations françaises et sept populations espagnoles (Figure 1). Les seules populations françaises connues au début de l'étude se trouvaient en région Languedoc-Roussillon, dans la réserve naturelle de Roque-Haute (population connue depuis au moins 150 ans) et à Vendres (population connue depuis environ 40 ans), près de Béziers (Prelli & Boudrie, 1992). L'échantillonnage de ces deux populations a été réalisé en 1994. Une troisième population a été découverte à Saint Estève (Pyrénées-Orientales) par James Molina en juillet 1996, à la suite d'une prospection près d'un site d'où la plante avait apparemment disparu en 1982 (Amigo, 1987). Les populations espagnoles (Menorca, Mallorca, Sinarcas, Ciudad Real, Valdepeñas, Guadalajara, Huesca) ont été échantillonnées au printemps 1996. Les individus récoltés ont été maintenus en serre, à la station expérimentale de Mauguio de l'Institut National de Recherche Agronomique

(I.N.R.A.) Centre de Montpellier, sous un régime de reproduction végétative obligatoire.

La population de Roque-Haute est extrêmement fragmentée. Parmi les quelques 200 mares que l'on dénombre sur le site, *Marsilea strigosa* n'en occupe qu'une quinzaine. La population de Vendres est, quant à elle, continue dans l'espace, relativement dense, et s'étale sur environ deux hectares dans les friches d'une ancienne vigne, inondée en hiver. Trois sous-populations, relativement denses et distantes de quelques dizaines de mètres composent la population de Saint Estève. Les populations espagnoles présentent également des situations contrastées : la population de Huesca couvre de façon dense et continue 7 ha d'une légère dépression dans le sol et rappelle, par sa structure spatiale continue, la population de Vendres. A Mallorca, *M. strigosa* n'a été observée que dans 2 des dizaines de petites mares creusées dans le calcaire d'un site s'étendant sur plusieurs hectares. La population de Sinarcas est constituée de deux mares distantes de quelques mètres. Dans cette population, comme dans les autres (Menorca, Ciudad Real, Valdepeñas, Guadalajara), *M. strigosa* a généralement été observée en bordure de mare, occupant peu densément l'espace.

Suivi de la population de Roque-Haute

Nous avons effectué un suivi démographique de la population de Roque-Haute, qui a consisté à déterminer la présence ou l'absence de la plante dans les différentes mares qui composent le site. Ce suivi a été réalisé de façon exhaustive sur l'ensemble des mares en juin 1994 et juin 1995.

Electrophorèse enzymatique

Quelques frondes de chaque individu ont été broyées à 4°C dans le tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH=7,6 ; 4% Thioglycolate de Sodium, 2% Polyéthylène glycol 20000) et les extraits enzymatiques obtenus dans le surnageant après centrifugation ont été absorbés sur des mèches de papier filtre conservées par la suite à -80°C. Les électrophorèses enzymatiques ont été réalisées sur gels horizontaux d'amidon 12,5%. Quatre systèmes de tampon ont été utilisés : Histidine-Citrate 6,5 (Kephart, 1990), Lithium-Borate modifié de Soltis *et al.* (1983) et Kephart (1990 ; tampon de gel : 39 mM LiOH.H₂O, acide borique 188 mM, pH=8,3 ; tampon d'électrodes : 4

mM LiOH, 19 mM acide borique, 45 mM Tris, 7 mM acide citrique H₂O, pH=8,3). Tris-Borate-EDTA modifié de Soltis *et al.* (1983) et Wendel & Weeden (1989) ; tampon de gel : 180mM Tris, 4 mM EDTA, 100 mM acide borique, pH=8,6 ; tampon d'électrodes : 45 mM Tris, 1 mM EDTA, 25 mM acide borique, pH=8,6) et Tris-Citrate 7,2 (Soltis *et al.*, 1983). 33 systèmes enzymatiques ont été testés. 11 systèmes ont présenté une activité suffisante pour une lecture et une interprétation claires : 6-phosphogluconate déshydrogénase, aspartate aminotransférase, aldolase, estérase, β -galactosidase, malate déshydrogénase, enzyme malique, phosphatase acide, phosphoglucose isomérase, phosphoglucomutase et shikimate déshydrogénase (Tableau 1). Les systèmes de tampon utilisés pour chaque système enzymatique sont indiqués dans le tableau 1. Le génotype de 60 individus des populations de Roque-Haute et de Vendres ont été génotypés pour l'ensemble de ces systèmes enzymatiques (Tableau 2). Parmi ces 11 systèmes enzymatiques, 7 systèmes (AAT, EST, MDH, ME, PGI, PGM et SkDH) ont été résolus sur la population de Saint Estève, ainsi que sur 138 individus échantillonnés en Espagne, à Menorca, Mallorca, Sinarcas, Ciudad Real, Valdepeñas, Guadaluajara et Huesca (Tableau 2).

Polymorphisme RAPD

La technique des ADNs polymorphes amplifiés aléatoirement (Randomly Amplified Polymorphic DNAs, RAPDs) a été décrite par Williams *et al.* (1990). Il s'agit de l'amplification par une réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR) de fragments « anonymes » du génome, par l'utilisation de courtes amorces oligonucléotidiques générées de façon aléatoire. Le polymorphisme observé est analysé en terme de présence ou d'absence de produit d'amplification (l'absence d'amplification pouvant être due, par exemple, à une mutation ponctuelle dans le site d'amorçage). Ce sont donc des marqueurs dominants, en général très polymorphes.

L'ADN génomique total a été extrait à partir de quelques frondes de chaque individu, selon le protocole suivant : Les frondes sont broyées dans l'azote liquide (-196°C). Le broyat est rapidement mélangé au tampon d'extraction (2% CTAB, 1% PVP, 100 mM Tris HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.2% v/v β -mercapto-éthanol) et incubé au bain-marie à 65°C pendant 30 min. Après l'ajout d'un volume de chloro-

forme/alcool isoamylique (24/1) et centrifugation (13000 trs/min), la phase aqueuse est récupérée et l'ADN est précipité par l'ajout de 3/4 de volume d'isopropanol froid (-20°C). Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot d'ADN est rincé à l'éthanol 70° et resuspendu dans 100 μ L H₂O. Parmi les 30 amorces testées (Opéron), 3 ont donné un profil électrophorétique interprétable et répétable (tableau 3). Les PCRs ont été réalisées sur un thermocycleur Crocodile II (Appligene), dans un volume final de 25 μ L contenant 25 ng d'ADN, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1 U GoldStar DNA Polymérase (Eurogentec), 30 ng d'amorces. Après une dénaturation initiale de 4 min à 94°C, les PCRs ont consisté en 41 cycles d'1 min de dénaturation à 93°C, 2 min d'hybridation des amorces à 40°C et 2 min 30 s d'élongation à 72°C, suivi d'une élongation finale de 6 min à 72°C. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gels d'agarose 1.5 %, Tris-Borate-EDTA (TBE) 0.5 X colorés au Bromure d'Ethidium (BET) et visualisés sous Ultra Violet. 43 individus des populations de Roque-Haute et Vendres ont été génotypés pour les 3 amorces RAPDs (Tableau 2).

RESULTATS

Suivi de la population de Roque-Haute

Marsilea strigosa n'occupe qu'un faible nombre de mares qui composent le site de la réserve de Roque-Haute. En 1994 la plante a été observée dans seize mares. En 1995, la plante n'a été recensée que dans onze des seize mares où elle était présente en 1994, et dans une seule autre mare (Figure 2).

Polymorphisme génétique

Onze systèmes enzymatiques ont été analysés sur les populations de Roque-Haute et Vendres (Tableau 2). Le nombre de bandes observé (Tableau 1) correspond dans presque tous les cas au nombre maximum de locus (isozymes) trouvé chez les plantes (Wendel & Weeden, 1989). Seul le système SkDH fait l'exception, puisque trois bandes ont été observées, alors que l'on n'attend en général pas plus de deux locus isozymiques chez les plantes pour ce système (Wendel & Weeden, 1989).

Système enzymatique	Acronyme	Numéro E.C (1)	Systèmes de tampon	Solutions de révélation	Nombre de locus
6-phosphogluconate déshydrogénase	6-PGD	1.1.1.44.	Histidine-Citrate 6.5	Wendel & Weeden, 1989	1
Aspartate aminotransférase	AAT	2.6.1.1.	Lithium-Borate modifié	Vallejos, 1983	1
Aldolase	ALD	4.1.2.13.	Tris-Citrate 7.2	Soltis <i>et al.</i> , 1983	2
Estérase	EST	3.1.1.1.	Tris-Borate EDTA modifié	Wendel & Weeden, 1989	2
β -galactosidase	GAL	3.2.1.23.	Lithium-Borate modifié	Wendel & Weeden, 1989	1
Malate déshydrogénase	MDH	1.1.1.37.	Tris-Citrate 7.2	modifié de Wendel & Weeden, 1989 (2)	2
Enzyme malique	ME	1.1.1.40.	Tris-Borate EDTA modifié	modifié de Wendel & Weeden, 1989 (2)	1
Phosphatase acide	ACP	3.1.3.2.	Lithium-Borate modifié	Soltis <i>et al.</i> , 1983	1
Phosphoglucose isomérase	PGI	5.3.1.9.	Lithium-Borate modifié	modifié de Wendel & Weeden, 1989 (2)	1
Phosphoglucomutase	PGM	2.7.5.1.	Tris-Borate EDTA modifié	modifié de Wendel & Weeden, 1989 (2)	2
Shikimate déshydrogénase	SkDH	1.1.1.25.	Tris-Citrate 7.2	modifié de Wendel & Weeden, 1989 (2)	3

(1) Enzyme Commission number

(2) c.f. Annexe

Tableau 1. Systèmes de tampon utilisés pour les électrophorèses enzymatiques et nombre de locus isozymiques résolus
Table 1. Buffer systems used for enzymes electrophoresis and number of isozymes loci observed

Populations	Systèmes enzymatiques											Marqueurs RAPDs		
	AAT	FST	MDH	ME	PGI	PGM	SkDH	6-PGD	ALD	GAL	ACP	B13	C18	P6
Roque-Haute	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	22	22	22
Vendres	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	21	21	21
St Estève	20	20	20	20	20	20	20	-	-	-	-	-	-	-
Menorca	14	14	14	14	14	14	14	-	-	-	-	-	-	-
Mallorca	6+4	6+4	6+4	6+4	6+4	6+4	6+4	-	-	-	-	-	-	-
Sinarcas	15+14	15+14	15+14	15+14	15+14	15+14	15+14	-	-	-	-	-	-	-
Ciudad Real	15	15	15	15	15	15	15	-	-	-	-	-	-	-
Valdepeñas	20	20	20	20	20	20	20	-	-	-	-	-	-	-
Guadajara	18	18	18	18	18	18	18	-	-	-	-	-	-	-
Huesca	32	32	32	32	32	32	32	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 2. Nombre d'individus échantillonnés dans chaque population pour chaque locus
Table 2. Number of sampled individuals for each population at each locus

Amorce	Séquence (5'-3')	Nombre de locus
B13	TTCCCCCGCT	2
C18	TGAGTGGGTG	2
P6	GTGGGCTGAC	5

Tableau 3. Séquences des amorces utilisées pour les RAPDs et nombre de locus détectés
Table 3. Primers sequences used for RAPDs and number of detected loci

Il faut cependant noter que l'étude de Wendel & Weeden (1989) a essentiellement porté sur des données obtenues sur des gymnospermes ou des angiospermes, très peu d'études de ce type ayant été menées sur les fougères. Au total, 17 bandes monomorphes pour l'ensemble des individus échantillonnés ont été observées. Il n'existe donc aucune variation génétique à ces 17 locus présumés, ni à l'intérieur de ces deux populations, ni entre elles. Le polymorphisme RAPD testé sur les populations de Roque-Haute et Vendres (Tableau 2) a permis l'identification de neuf bandes amplifiées au total, pour les trois amorces utilisées (Tableau 3). Chaque bande étant assimilée à un locus, ce sont neuf locus supplémentaires qui se sont avérés monomorphes au sein de ces deux populations, comme entre elles. Les sept systèmes enzymatiques analysés pour l'ensemble des autres populations (Tableau 2) ont permis la détection de 12 locus isozymiques (Tableau 1), qui se sont avérés monomorphes au sein des populations ainsi qu'à l'échelle de l'ensemble des populations, et ont révélé la présence des mêmes allèles que ceux observés dans les populations françaises.

DISCUSSION

Marsilea strigosa fonctionne-t-elle en métapopulation à Roque-Haute ?

Cette étude est encore préliminaire et le recensement des mares occupées par *M. strigosa* doit se poursuivre pour comprendre la dynamique de la population de Roque-Haute. L'objectif de cette étude est de déterminer si cette population fonctionne en métapopulation (population subdivisée soumise à une dynamique d'extinctions et de recolonisations locales : Olivieri et al., 1990) et donc de quantifier les taux d'extinction locaux ainsi que la dynamique de recolonisation. L'analyse de la relation entre la distance à la mare occupée la plus proche et la probabilité de recolonisation après une extinction locale pourrait, par exemple, nous permettre de comprendre si la recolonisation se fait par dispersion de propagules d'une mare à une autre, ou bien par refondation à partir d'un stock de sporocarpes des années antérieures. Dans ce dernier cas, la dynamique observée serait la résultante de la dynamique de mise en eau des différentes mares et

refléterait la variabilité inter-annuelle des conditions hydrologiques. Il faut cependant souligner la difficulté d'estimer la densité ou le nombre de plantes présentes sur un site (forte densité d'*Isoetes* aux périodes de recensement), d'autant plus que l'existence d'un régime de reproduction clonal rend plus difficile l'interprétation du nombre d'individus observés. Bien que ces données soient encore incomplètes, elles suggèrent une capacité de dispersion réduite, étant donné le faible nombre de mares occupées, et donc une faible aptitude à la colonisation de nouveaux sites. Ce dernier point peut être appuyé par le fait que le seul organe qui puisse permettre la dispersion est le sporocarpie, qui reste accroché sur le stolon. La zoochorie pourrait donc être le seul moyen de dispersion de cette espèce. Il n'existe en revanche aucune preuve de son existence.

L'absence de polymorphisme génétique : un syndrome de la rareté ?

Mises à part les populations de Vendres et Huesca, les populations de *M. strigosa* échantillonnées sont de petite taille, en terme de nombre d'individus observés. La faible taille des populations, leur degré d'isolement (Figure 1) et une faible aptitude à la dispersion (suggérée par le suivi de la population de Roque-Haute) sont autant de facteurs qui limitent le maintien d'un polymorphisme intra-population. L'absence de polymorphisme sur l'ensemble des populations françaises et espagnoles peut s'interpréter en invoquant deux hypothèses, non mutuellement exclusives : soit il existe des flux de gènes sur de longues distances, soit un événement de fondation unique a été suivi d'événements de colonisation successifs dans les différentes populations. En considérant la faible capacité de colonisation supposée à Roque-Haute, la seconde hypothèse devrait être privilégiée. Etant donnée la capacité de reproduction végétative de cette espèce, toutes les populations échantillonnées pourraient alors être issues d'un même clone.

Les espèces rares présentent en général un polymorphisme génétique neutre réduit, bien que cela ne soit pas une règle absolue (Avisé, 1994 ; Young et al., 1993).



Figure 1. Répartition géographique des populations françaises et espagnoles de *Marsilea strigosa* échantillonnées entre 1994 et 1996
 Figure 1. Geographical distribution of french and spanish populations of *Marsilea strigosa* sampled between 1994 and 1996



Figure 2. Suivi démographique de la population de Roque-Haute entre 1994 et 1995. Les mares sont numérotées de 1 à 198. Les mares dans lesquelles *Marsilea strigosa* a été observée en 1994 sont colorées en gris clair, les mares dans lesquelles *M. strigosa* a été observée en 1994 et en 1995 sont colorées en gris foncé et la mare 56, dans laquelle la plante n'a été observée qu'en 1995, est colorée en noir. Les lignes pointillées représentent des chemins secondaires.

Figure 2. Demographic survey of Roque-Haute population between 1994 and 1995. Ponds are numbered from 1 to 198. The ponds in which *Marsilea strigosa* was observed in 1994 are filled with light grey. The ponds in which *M. strigosa* was observed in 1994 and 1995 are filled with in dark grey and the pond 56, in which the plant was only observed in 1995, is filled with black. Dotted lines figure secondary pathways.

De nombreuses espèces végétales endémiques ou presque endémiques se sont révélées monomorphes pour un nombre comparable de locus enzymatiques. C'est le cas de *Harperocallis flava* Mc Daniel (*Liliaceae*) (Godt *et al.*, 1997), *Malacothamus fasciculatus* (Nutt.) Greene var. *nesioticus* (Rob.) Kearn. (*Malvaceae*) (Swensen *et al.*, 1995), et *Bensoniella oregona* (*Saxifragaceae*) (Soltis *et al.*, 1992). *Pedicularis furbishiae* (*Scrophulariaceae*) (Waller *et al.*, 1987), *Howellia aquaticus* (*Campanulaceae*) (Lesica *et al.*, 1988), et *Trifolium reflexum* (*Fabaceae*) (Hickey *et al.*, 1991), toutes des espèces rares ou menacées, se sont également révélées monomorphes à l'échelle intra- comme inter-populationnelle. D'autres espèces rares ou menacées ont montré un polymorphisme enzymatique très faible. C'est le cas de *Trifolium stoloniferum* (Hickey *et al.*, 1991), *Helonias bullata* (*Liliaceae*) (Godt *et al.*, 1995) ainsi que pour *Geum radiatum* (*Rosaceae*), *Carex misera* (*Cyperaceae*), *Trichophorum cespitosum* (*Cyperaceae*) et *Calamagrostis cainii* (*Poaceae*) (Godt *et al.*, 1996). Dans toutes ces études, les auteurs ont invoqué l'effet de la dérive génétique qui suit une réduction brutale de la taille de la population (goulot d'étranglement) pour expliquer le faible polymorphisme enzymatique observé. Le pourcentage de locus polymorphes ainsi que le nombre moyen d'allèles par locus (richesse allélique) sont généralement corrélés positivement à la taille des populations (Fréville *et al.*, 1998 ; Sun, 1996 ; van Treuren *et al.*, 1991 ; Raijmann *et al.*, 1994 ; Prober & Brown, 1994 ; Young *et al.*, 1996). En menant une méta-analyse sur les données de la littérature, Frankham (1996) a montré que non seulement ces derniers paramètres, mais également l'hétérozygotie, étaient corrélés positivement et de façon significative à la taille des populations. Il a également montré que la variabilité génétique neutre est significativement plus faible chez les espèces rares que chez les espèces répandues.

Quels sont les risques d'extinction associés à la génétique des petites populations ?

Des modèles théoriques montrent que l'hétérozygotie estimée à partir d'un échantillon de locus neutres est positivement corrélée à l'hétérozygotie moyenne du génome, lorsque l'hétérozygotie moyenne de la population est faible (Chakraborty, 1981 ; Mitton & Pierce, 1980). Ceci

suggère que le faible polymorphisme mesuré sur des marqueurs moléculaires neutres dans les populations d'espèces rares peut refléter un faible polymorphisme à l'échelle du génome. On observe fréquemment une diminution de la valeur adaptative des individus dans les populations de petite taille. Chez *Lolium multiflorum* Lam., Polans & Allard (1989) ont mesuré une diminution de la variabilité de caractères liés à la vigueur végétative et au succès reproducteur. Une étude menée sur deux espèces menacées de poissons a montré des résultats similaires : chez *Poeciliopsis monacha* (*Poeciliidae*), la perte de variation subie après des diminutions brutales d'effectif était associée avec une diminution de la stabilité développementale, de la tolérance au stress, de l'habileté compétitrice et une augmentation de la charge parasitaire, tandis que chez *P. occidentalis*, la variabilité résiduelle mesurée sur des marqueurs enzymatiques était associée à une plus grande survie, une meilleure croissance, une plus forte fécondité et une plus grande stabilité développementale (Vrijenhoek, 1994). Une diminution de la valeur adaptative des descendants d'individus appartenant à des populations de petite taille a été observée chez *Gentiana pneumonanthe* (*Gentianaceae*) (Oostermeijer *et al.*, 1994 ; 1995). Dans dix populations naturelles d'*Ipomopsis aggregata* (*Polemoniaceae*), Heschel & Paige (1995) ont démontré que la valeur adaptative des individus appartenant à des populations de petite taille était réduite. Bijlsma *et al.* (1994) ont observé le même phénomène chez *Scabiosa columbaria* L. (*Dipsacaceae*) et *Salvia pratensis* L. (*Labiatae*). Ces derniers auteurs nomment l'ensemble du processus « érosion génétique » (augmentation de la consanguinité dans les populations de petite taille, diminution de la valeur adaptative des individus de ces populations).

Toutes ces observations peuvent être interprétées comme étant la conséquence du « fardeau de mutation », qui désigne la réduction des performances des individus par l'accumulation de mutations délétères (Haldane, 1937). L'expression de mutations légèrement délétères récessives augmente en effet avec la consanguinité : C'est la « dépression de consanguinité ». Des modèles théoriques ont montré que la consanguinité, en augmentant l'expression des allèles délétères récessifs, et les exposant donc à la sélection, pouvait ainsi diminuer le fardeau (Barret & Charlesworth, 1991 ; Hauser *et al.*, 1994). D'autres auteurs

ont insisté sur le fait que le fardeau dépendait de la taille des populations : dans le cas des populations de petite taille, la sélection devient moins efficace, la fixation de nouvelles mutations est facilitée et la taille des populations diminue sous l'effet de la diminution de la valeur adaptative des individus (Lynch & Gabriel, 1990 ; Gabriel & Bürger, 1994). Ce processus décrit sous le terme de « fonte mutationnelle » peut finalement conduire à l'extinction (van Noodwijk, 1994 ; Lande, 1994 ; Lynch *et al.*, 1995a ; 1995b).

Des données tirées de la littérature ont permis à Frankham (1995 ; 1998) de trouver une corrélation positive entre le risque d'extinction et la consanguinité pour des populations de laboratoire de souris et de drosophiles. Mais un très bel exemple a été publié récemment par une équipe finlandaise qui démontre pour la première fois sur des populations naturelles que le risque d'extinction augmente avec la consanguinité (Saccheri *et al.*, 1998).

Quelles sont les conséquences pour la gestion à long terme des espèces menacées ?

Pour certains auteurs, identifier et maîtriser les risques d'extinction liés à la stochasticité environnementale est de première importance et doit l'emporter sur les considérations génétiques (Lande, 1988 ; Goodman, 1987 ; Shaffer, 1987 ; Menges, 1992 ; Gilligan *et al.*, 1997). A plus long terme, il s'agit également de préserver le potentiel adaptatif des espèces (Avisé, 1996). Préserver la variabilité génétique des populations naturelles menacées constitue donc un enjeu majeur pour les préserver d'un risque d'extinction accru.

Malheureusement la relation entre polymorphisme neutre et potentiel adaptatif n'est pas démontrée (Lynch, 1996). D'autre part, une réduction brutale de l'effectif d'une population (goulot d'étranglement) peut avoir d'autres conséquences sur la variance additive, c'est-à-dire la part de la variance sur laquelle s'exerce la sélection naturelle. Notamment, la variance additive peut augmenter après la réduction d'effectif lorsqu'il existe des interactions entre allèles à un locus (dominance) ou entre locus (épistasie) (Carson, 1990) : malgré la diminution de viabilité qu'accompagne un goulot d'étranglement (dépression de consanguinité), on peut observer une conversion de la variance de dominance en variance additive (Wang *et al.*, 1998b). Les écarts à l'équilibre de Hardy-

Weinberg qui suivent un goulot d'étranglement (Wang, 1996), ou les déséquilibres de liaison qui s'ensuivent peuvent aussi conduire à une augmentation de la variance additive (Wang *et al.*, 1998a). La réduction d'effectif permet également la conversion de certains types de variance dus aux interactions entre locus, en variance additive (Goodnight, 1988 ; Whitlock *et al.*, 1993). Ces études théoriques peuvent permettre d'interpréter les résultats obtenus en laboratoire, qui montrent une augmentation de la variance additive avec la consanguinité sur des caractères morphologiques chez la mouche domestique (Bryant *et al.*, 1986) ou sur des mesures de viabilité chez la drosophile (López-Fanjul & Villaverde, 1989). Widén & Andersson (1993) ont mesuré une plus forte variance additive et une plus grande héritabilité sur des caractères quantitatifs liés à la valeur adaptative dans les plus petites populations de *Senecio integrifolius* (Asteraceae), espèce rare et menacée en Suède. On peut donc s'attendre à des changements importants dans l'organisation de la variabilité neutre et sélectionnée dans les petites populations subissant des réductions importantes de leurs effectifs. Malheureusement, les relations entre l'une et l'autre ne sont pas triviales et dépendent fortement du déterminisme de la variabilité adaptative.

Pourquoi chercher des marqueurs neutres plus polymorphes ?

L'analyse de la variabilité génétique neutre et de sa distribution spatiale n'est donc pas directement extrapolable à la variabilité pour des caractères adaptatifs, seuls soumis par définition à l'action de la sélection naturelle. Bien qu'un effet de fondation important affectera aussi bien des locus neutres que des locus soumis à la sélection, il est possible que la mesure de la variabilité sur des caractères quantitatifs ne soit pas corrélée avec la mesure de variabilité sur des gènes neutres, en raison du déterminisme génétique de ces caractères adaptatifs (nombre de gènes impliqués, interactions entre ces gènes, type de sélection exercée sur ces gènes). En revanche, ces mesures indirectes peuvent nous permettre de faire des inférences précises sur la biologie de l'espèce, en termes de système de reproduction et de capacité de dispersion. Des marqueurs de type microsatellite (courtes séquences dispersées dans les génomes, constituées de répétitions de motifs de 1 à 5 nucléotides) sont actuellement en

cours de mise au point au laboratoire. Ces marqueurs sont parmi les plus polymorphes connus à l'heure actuelle, en raison de leur taux de mutation élevé (Jarne & Lagoda, 1996). Si ces marqueurs microsatellites permettent de détecter de la variabilité génétique entre les populations de *M. strigosa*, nous serons en mesure de quantifier les flux de gènes entre les populations échantillonnées. En terme de gestion des populations, nous pourrions ainsi savoir si une des causes de la rareté de cette espèce est sa faible capacité de dispersion, comme c'est par exemple le cas pour *Centaurea corymbosa* Pourret (*Asteraceae*) (Colas *et al.*, 1997). Une mesure de gestion pourrait alors être la création de nouvelles populations. Si en outre, ces marqueurs sont variables à l'échelle intra-populationnelle, nous pourrions caractériser le régime de reproduction (végétatif, autogamie partielle ou totale) de cette espèce.

Enfin, en guise de perspective, la présence d'échantillons de *M. strigosa* dans les herbiers de Montpellier nous offre une occasion rare d'un suivi génétique temporel de populations sur une échelle de temps assez importante. Des travaux préliminaires ont en effet montré qu'il était possible d'obtenir des germinations à partir de sporocarpes âgés de plus d'un siècle (Colas *et al.*, 1996). Le suivi de la population de Roque-Haute à l'échelle de ce siècle permettrait de tester l'hypothèse selon laquelle la diversité génétique aurait diminué au cours du temps.

Remerciements

Ces travaux ont été financés par la Région Languedoc-Roussillon et la collaboration entre les universités de Montpellier et de Barcelone a été financée par le Ministère des Affaires Etrangères (Programme PICASSO). Nous remercions l'Institut National de Recherche Agronomique, Centre de Montpellier, qui a permis la culture de spécimens en serre. Nous remercions Sylvie Muratorio qui a participé à la recherche de polymorphisme RAPD, James Molina pour son aide lors des prospections et des échantillonnages en France, Josep Lluís Gradaille Tortella et Magdalena Vicens (Jardí Botànic de Sóller) pour leur aide à Mallorca, Joël Mathez ainsi que P. A. Schäffer, pour l'accès aux Herbiers de l'Institut de Botanique de Montpellier. Merci à Hassan Souheil et Philippe March (Association de la Réserve Naturelle de Roque-Haute) pour nous avoir donné accès aux versions informatiques des cartes de la réserve. Nous remercions

Frédéric Médail, Hélène Fréville ainsi qu'un lecteur anonyme pour leurs commentaires sur la version précédente de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- Amigo, J.J., 1987. Exit la mare temporaire de San-Estève (Saint Estève, Pyrénées-Orientales, France). *Naturalia Ruscinonensia*, 1 : 71-136.
- Avise J.C., 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York. 511 p.
- Avise, J.C., 1996. Introduction : The scope of conservation genetics. In Avise J.C. & Hamrick J.L. (eds) *Conservation Genetics. Case histories from nature*. Chapman & Hall, New York : 1-9.
- Barret S.C.H. & Charlesworth D., 1991. Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature*, 352 : 522-524.
- Bijlsma R., Ouborg N.J. & Treuren R. van, 1994. On genetic erosion and population extinction in plants : A case study in *Scabiosa columbaria* and *Salvia pratensis*. In : Loescke V., Tomiuk J. & Jain S.K. (eds), *Conservation genetics*. Birkhäuser Verlag, Basel : 255-271.
- Bryant E.H., McCommas S.A. & Combs L. M., 1986. The effect of an experimental bottleneck upon the quantitative genetic variation in the housefly. *Genetics*, 114 : 1191-1211.
- Carson, H.L., 1990. Increased genetic variance after a population bottleneck. *Trends Ecol. Evol.*, 5 : 228-230.
- Chakraborty R., 1981. The distribution of the number of heterozygous loci in an individual in natural populations. *Genetics*, 98 : 461-466.
- Colas B., Riba M. & Molina J., 1996. Statut démographique de *Centaurea corymbosa* Pourret (*Asteraceae*), *Hormatophylla pyrenaica* (Lapcyr.) Cullen & Dudley (*Brassicaceae*), et *Marsilea strigosa* Willd. (*Marsileaceae-Pteridophyta*), trois plantes rares dans le sud de la France. *Acta bot. Gallica*, 143 : 191-198.
- Colas B., Olivieri I. & Riba M., 1997. *Centaurea corymbosa*, a cliff-dwelling species tottering on the brink of extinction : A demographic and genetic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 : 3471-3476.
- Ellstrand N.C. & Elam D. R., 1993. Population genetic consequences of small population size : Implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 24 : 217-242.
- Ewens W.J., Brockwell P.J. Gani J.M. & Resnick S.I., 1987. Minimum viable population size in the presence of catastrophe. In : Soulé M. E. (ed.), *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge : 59-68.
- Frankham R., 1995. Inbreeding and extinction : A threshold effect. *Conserv. Biol.*, 9 : 792-799.
- Frankham R., 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.*, 10 : 1500-1508.
- Frankham R., 1998. Inbreeding and extinction : Island populations. *Conserv. Biol.*, 12 : 665-675.
- Fréville H., Colas B., Riba M., Ronfort J. & Olivieri I., 1998. Predicting endemism from population structure of

- a widespread species : Case study in *Centaurea maculosa* Lam. (Asteraceae). *Conserv. Biol.*, 12 : 1-10.
- Gabriel W. & Bürger R., 1994. Extinction risk by mutational meltdown: synergistic effects between population regulation and genetic drift. In : Loeschcke V., Tomiuk J. & Jain S. K. (eds), *Conservation genetics*. Birkhäuser Verlag, Basel : 69-84.
- Gilligan D.M., Woodworth L.M., Montgomery M.E., Briscoe D.A. & Frankham R., 1997. Is mutation accumulation a threat to the survival of endangered populations ?. *Conserv. Biol.*, 11 : 1235-1241.
- Gilpin M.E. & Soulé M.E., 1986. Minimum viable populations : Processes of species extinction. In : Soulé M.E. (ed.), *Conservation biology : The science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Sunderland : 19-34.
- Godt M.J.W., Hamrick J.L. & Bratton S., 1995. Genetic diversity in a threatened wetland species, *Helionas bullata* (Liliaceae). *Conserv. Biol.*, 9 : 596-604.
- Godt M.J.W., Johnson B.R. & Hamrick J.L., 1996. Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species. *Conserv. Biol.*, 10 : 796-805.
- Godt M.J.W., Walker J. & Hamrick J.L., 1997. Genetic diversity in the endangered lily *Harpetocallis flava* and a close relative, *Tofieldia racemosa*. *Conserv. Biol.*, 11 : 361-366.
- Goodnight C.J., 1988. Epistasis and the effect of founder events on the additive genetic variance. *Evolution*, 42 : 441-454.
- Haldane J.B.S., 1937. The effect of variation on fitness. *Am. Nat.*, 71 : 337-349.
- Hauser T.P., Damgaard C. & Loeschcke V., 1994. Effects of inbreeding in small plant populations : Expectations and implications for conservation. In : Loeschcke V., Tomiuk J. & Jain S.K. (eds), *Conservation genetics*. Birkhäuser Verlag, Basel : 115-129.
- Heschel M.S. & Paige K.N., 1995. Inbreeding depression, environmental stress, and population size variation in Scarlet Gilia (*Ipomopsis aggregata*). *Conserv. Biol.*, 9 : 126-133.
- Hickey R.J., Vincent M.A. & Guttman S.I., 1991. Genetic variation in running buffalo clover (*Trifolium stoloniferum*, Fabaceae). *Conserv. Biol.*, 5 : 309-316.
- Jarne P. & Lagoda P., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, 11 : 424-429.
- Kephart S.R., 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes : A comparative analysis of techniques. *Am. J. Bot.*, 77 : 693-712.
- Lande R., 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241 : 1455-1460.
- Lande R., 1994. Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. *Evolution*, 48 : 1460-1469.
- Lande R. & Barrowclough G.F., 1987. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In : Soulé M.E. (ed.), *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge : 87-123.
- Lesica P., Leary R.F., Allendorf F.W. & Bilderback D.E., 1988. Lack of genetic diversity within and among populations of an endangered plant. *Howellia aquatilis*. *Conserv. Biol.*, 2 : 275-282.
- López-Fanjul C. & Villaverde A., 1989. Inbreeding increases genetic variance for viability in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 43 : 1800-1804.
- Lynch M., 1996. A quantitative-genetic perspective on conservation issues. In Avise J.C. & Hamrick J.L. (eds) *Conservation Genetics. Case histories from nature*. Chapman & Hall, New York : 471-501.
- Lynch M., Conery J. & Bürger R., 1995a. Mutation accumulation and the extinction of small populations. *Am. Nat.*, 146 : 489-518.
- Lynch M., Conery J. & Bürger R., 1995b. Mutational meltdowns in sexual populations. *Evolution*, 49 : 1067-1080.
- Lynch M. & Gabriel W., 1990. Mutation load and the survival of small populations. *Evolution*, 44 : 1725-1737.
- Menges E.S., 1992. Stochastic modeling of extinction in plant populations. In : Fiedler P.L. & Jain S.K. (eds), *Conservation biology : The theory and practice of nature conservation, preservation and management*. Chapman and Hall, London : 253-275.
- Mitton J.B. & Pierce B.A., 1980. The distribution of individual heterozygosity in natural populations. *Genetics*, 95 : 1043-1054.
- van Noordwijk A.J., 1994. The interaction of inbreeding depression and environmental stochasticity in the risk of extinction of small populations. In : Loeschcke V., Tomiuk J. & Jain S. K. (eds), *Conservation genetics*. Birkhäuser Verlag, Basel : 131-146.
- Olivier L., Galland J.P. & Maurin, H., 1995. *Livre rouge de la flore menacée de France. Tome 1. Espèces prioritaires*. M. N. H. N., Service du Patrimoine Naturel, Conservatoire Botanique National de Porquerolles, Ministère de l'Environnement, Direction de la Nature et des Paysages. Paris, 486 p.
- Olivieri I., Couvet D. & Gouyon P.-H., 1990. The genetics of transient populations : Research at the metapopulation level. *Trends Ecol. Evol.*, 5 : 207-210.
- Oostermeijer J.G.B., van Eijck M.W., van Leeuwen N.C. & den Nijs J.C.M., 1995. Analysis of the relationship between allozymic heterozygosity and fitness in the rare *Gentiana pneumonanthe* L. *J. Evol. Biol.*, 8 : 739-759.
- Oostermeijer J.G.B., van Eijck M.W. & den Nijs J.C.M., 1994. Offspring fitness in relation to population size and genetic variation in the rare perennial plant species *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae). *Oecologia*, 97 : 289-296.
- Polans N.O. & Allard R.W., 1989. An experimental evaluation of the recovery potential of ryegrass populations from genetic stress resulting from restriction of population size. *Evolution*, 43 : 1320-1324.
- Prelli R. & Boudrie M., 1992. *Atlas écologique des fougères et plantes alliées*. Editions Lechevalier, Paris.
- Prober, S.M. & Brown, A.H.D., 1994. Conservation of the grassy white box woodlands : Population genetics and fragmentation of *Eucalyptus albens*. *Conserv. Biol.*, 8 : 1003-1013.
- Raijmann, L.E., van Leeuwen, N.C., Kersten, R., Oostermeijer, J.G.B., den Nijs, H.C.M. & Menken, S.B.J., 1994. Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conserv. Biol.*, 8 : 1014-1026.
- Saccheri I., Kuussaari M., Kankare M., Vikman P., Fortelius W. & Hanski I., 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly population. *Nature*, 392 : 491-494.

- Shaffer M., 1981. Minimum population sizes for species conservation. *Bioscience*, 31 : 131-134.
- Shaffer M., 1987. Minimum viable populations : coping with uncertainty. In : Soulé M.E. (ed.), *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge : 69-86.
- Soltis D.E., Haufler C.H., Darrow D.C. & Gastony G.J., 1983. Starch gel electrophoresis of ferns : A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Am. fern. J.*, 73 : 9-27.
- Soltis P.S., Soltis D.E., Tucker T.L. & Lang F.A., 1992. Allozyme variability is absent in the narrow endemic *Bensoniella oregona* (Saxifragaceae). *Conserv. Biol.*, 6 : 131-134.
- Sun M., 1996. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. *Conserv. Biol.*, 10 : 785-795.
- Swensen S.M., Allan G.J., Howe M., Elisens W.J., Junak S.A. & Rieseberg L.H., 1995. Genetic analysis of the endangered island endemic *Malacothamus fasciculatus* (Nutt.) Greene var. *nesioticus* (Rob.) Kearns. (Malvaceae). *Conserv. Biol.*, 9 : 404-415.
- van Treuren, R., Bijlsma, R., van Delden, W. & Ouborg, N.J., 1991. The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity*, 66 : 181-189.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M. & Webb D.A., 1964. *Flora Europaea*. Vol. 1, Cambridge University Press, Cambridge.
- Vrijenhoek R.C., 1994. Genetic diversity and fitness in small populations. In : Loeschcke V., Tomiuk J. & Jain S.K. (eds), *Conservation genetics*. Birkhäuser Verlag, Basel : 37-53.
- Waller D.M., O'Malley D.M. & Gawler S.C. 1987. Genetic variation in the extreme endemic *Pedicularis furbishiae* (Scrophulariaceae). *Conserv. Biol.*, 1 : 335-340.
- Wang J., 1996. Deviation from Hardy-Weinberg proportions in finite diploid populations. *Genet. Res.* 68 : 249-257.
- Wang J., Caballero A. & Hill W.G., 1998a. The effect of linkage disequilibrium and deviation from Hardy-Weinberg proportions on the changes in genetic variance with bottlenecks. *Heredity*, 81 : 174-186.
- Wang J., Caballero A., Keightley, P.D. & Hill W.G., 1998b. Bottleneck effect on genetic variance : A theoretical investigation of the role of dominance. *Genetics*, 150 : 435-447.
- Wendel J.F. & Weeden N.F., 1989. Visualisation and interpretation of plant isozymes. In : Soltis D.E. & Soltis P.S. (eds), *Isozymes in plant biology*. Chapman and Hall, London : 5-45.
- Whitlock M.C. Phillips P.C. & Wade M.J., 1993. Gene interaction affects the additive genetic variance in subdivided populations with extinction and migration. *Evolution*, 47 : 1758-1769.
- Widén, B. & Andersson, S., 1993. Quantitative genetics of life-history and morphology in a rare plant, *Senecio integrifolius*. *Heredity*, 70 : 503-514.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak J., Rafalski J.A. & Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18 : 6531-6535.
- Young A., Boyle T. & Brown T., 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 11 : 413-418.
- Young, A.G., Merriam, H.G. & Warwick, S.I., 1993. The effect of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. *Heredity*, 71 : 277-289.

ANNEXE 1

Solutions de révélation des systèmes enzymatiques, modifiées de Wendel & Weeden (1989)

Malate déshydrogénase	
Tris Hcl 0,1 M pH=9,1	5 ml
Malate de sodium	10 ml
H ₂ O	q.s.p. 50 ml
NAD	20 mg
PMS 0.2%	1 ml
NBT 1%	1 ml
Enzyme malique	
Malate de sodium 0,4 M pH=7,0	10 ml
Tris HCl 1M pH=8,0	5 ml
H ₂ O	q.s.p. 50 ml
MgCl ₂	100 mg
NADP	10 mg
NBT 1%	1 ml
PMS 0,2%	1 ml
Glucose 6-phosphate déshydrogénase	10 U.
Phosphoglucose isomérase	
Tris HCl 1M pH=8,0	50 ml
Fructose 6-phosphate	30 mg
MgCl ₂	100 mg
NADP	10 mg
MTT 1%	1 ml
PMS 0.2%	1 ml
Phosphoglucomutase	
Tris Hcl 0,1 M pH=8,0	50 ml
D glucose 1-phosphate	20 mg
MgCl ₂	100 mg
NADP	10 mg
MTT 1%	1 ml
PMS 0,2%	1 ml
Glucose 6-phosphate déshydrogénase	10 U.
Shikimate déshydrogénase	
Tris Hcl 0,1 M pH=8,0	50 ml
Acide shikimique	25 mg
NADP	10 mg
MTT 1%	1 ml
PMS 0,2%	1 ml