



HAL
open science

Rôle de la migration dans la gestion dynamique des ressources génétiques végétales

Yves Rousselle

► **To cite this version:**

Yves Rousselle. Rôle de la migration dans la gestion dynamique des ressources génétiques végétales. Génétique. Université Paris Sud 11, 2010. Français. NNT: . tel-02969719

HAL Id: tel-02969719

<https://hal.inrae.fr/tel-02969719v1>

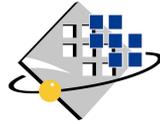
Submitted on 16 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ
PARIS-SUD 11



Faculté des Sciences d'Orsay



SCIENCES
DU VÉGÉTAL
ED 145



INRA



LE MOULON
Génétique
végétale UMR

THÈSE

Présentée par

Yves Rousselle

pour obtenir le

Diplôme de Docteur en Sciences de l'Université Paris Sud 11

Rôle de la migration dans la gestion dynamique
des ressources génétiques végétales

Soutenue le 21 mai 2010 devant le jury composé de :

Jane Lecomte
Joëlle Ronfort
Patrice David
Yvonne Willi
Jérôme Goudet
Isabelle Goldringer

Professeur, Université Paris Sud 11
Directrice de Recherche, INRA, Montpellier
Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier
Professeur, Université de Neuchâtel
Professeur, Université de Lausanne
Directrice de Recherche, INRA, Le Moulon

Examinatrice
Rapportrice
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directrice de thèse

A ma mère

Remerciements

La rédaction n'est pas mon fort mais j'espère que mes remerciements seront à la hauteur de ce que les différentes personnes m'ont apporté au cours de ma thèse.

Je souhaiterais tout d'abord remercier **Isabelle Goldringer** pour m'avoir accepté dans son équipe et pour m'avoir encadré avec brio pendant ma thèse. Elle a été d'une très grande patience et a su gérer ma "motivation" à travailler avec très grand calme même pendant la période délicate de la fin de thèse. J'ai beaucoup appris pendant ces 3 ans, merci pour avoir essayé de m'apprendre à rédiger correctement entre autres. Je voudrais la remercier particulièrement pour m'avoir montré que de faire rejoindre ses propres convictions et ses envies de recherches pouvait être tout à fait faisable et surtout très épanouissant. Enfin je la remercie pour sa sympathie tout au long de ces 3 ans. Elle a toujours été présente et compréhensive.

Frédéric Hospital m'a encadré pour la partie modélisation de ma thèse et faisait aussi partie de mon comité de thèse. Je voudrais le remercier pour son accueil : je ne suis pas un crack en programmation et en modélisation et il a été très patient pour répondre à mes questions souvent assez idiotes. Vu ma capacité à m'en sortir seul dans ce domaine, je le remercie de m'avoir fait collaborer avec **Jérôme Goudet** et **Samuel Neuenschwander** à Lausanne. Je remercie d'ailleurs **Jérôme** pour son accueil à l'Université de Lausanne et **Sam** pour sa patience face à mes questions sur son programme de simulations. Enfin, et ce n'est pas la moindre des choses, je remercie **Fred** pour m'avoir fait prendre la décision qu'il fallait concernant la partie modélisation de ma thèse. Merci d'avoir eu cette lucidité que je n'avais pas, j'ai pu finir ma thèse relativement dans les temps. Ce n'est que partie remise, j'espère pouvoir retravailler avec lui dans le futur. Merci enfin pour sa sympathie, les moments passés à Lausanne et pour m'avoir fait découvrir Dr House!

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse : **Ophélie Ronce**, **Sylvain Glémin**, **Jean-Louis Pham** et **Jacques David**. Les discussions que nous avons eu m'ont beaucoup aidé à organiser ma pensée et mon travail. Merci pour ce regard extérieur souvent salvateur.

Je remercie **Jane Lecomte**, **Yvonne Willi**, **Jérôme Goudet** pour avoir eu la gentillesse de participer à mon jury de thèse et je remercie particulièrement **Joëlle Ronfort** et **Patrice David** pour avoir accepté d'être mes rapporteurs.

Je voudrais remercier **Isabelle Bonnin** pour nos discussions mais surtout pour

avoir eu l'idée de lancer l'expérimentation de croisements qui a fourni le matériel de ma thèse. C'était une excellente idée et j'espère l'avoir exploitée au mieux. Je tiens à remercier au passage ceux qui ont réalisé tous ces croisements : **Isabelle Goldringer, Isabelle Bonnin, Nathalie Galic, Marie-Thérèse Marcombe et Michel Rousset.**

J'ai eu la chance de co-encadrer **Mathieu Thomas** pour son stage de M2. Je voulais le remercier pour m'avoir supporté en tant qu'"encadrant" (heureusement qu'Isabelle était là!), pour avoir fait des modèles d'ANOVA dans tous les sens après avoir passé quelques semaines à faire du battage, pour avoir lu beaucoup d'articles et pour les discussions en conséquences. Merci donc pour tout ce que tu as fait pour ma thèse. J'ai aussi encadré **Céline Dubos** qui a travaillé sur *VRN-1*. Je la remercie pour son sérieux et son efficacité.

Les résultats présentés dans cette thèse sont principalement issus de deux années d'expérimentation au champ. Je n'aurais pas pu accomplir ce travail sans l'aide de tous les techniciens et techniciennes qui ont permis que ces expés se passent parfaitement bien pendant 2 ans et sur 3 sites différents. Je tiens particulièrement à remercier **Nathalie Galic** pour son aide indispensable et sa rigueur dans la conduite des expés tout au long de ma thèse. J'ai appris beaucoup concernant le travail de terrain et le blé grâce à elle. Notre relation n'étant pas que professionnelle, je la remercie aussi pour m'avoir fourni différents breuvages et pour m'avoir emmené à cette magnifique compétition de badminton! Les périodes dans les champs que ce soit au Moulon, à Rennes ou à Toulouse étaient très sympas aussi! Je remercie aussi toute l'équipe de l'UE du Moulon qui a préparé le terrain, réalisé les semis et permis que les expés se déroulent dans de bonnes conditions. Je tiens à remercier particulièrement **Didier Tropée** pour nous avoir aidé à faire la récolte à Toulouse ainsi que **André Baron** et **Laurent Bonjean** qui nous ont aidé à finir la récolte à Rennes. Ces expés à Rennes et à Toulouse n'auraient pas pu se faire sans le très bon accueil que nous ont réservé les équipes techniques locales, je les remercie pour avoir hébergé nos blés.

J'ai aussi utilisé des résultats de biologie moléculaire. Je remercie tout d'abord **Matthieu Falque** pour m'avoir apporté le soutien de son équipe. Tout a commencé avec les extractions d'ADN. Je remercie **Xavier Raffoux** pour m'avoir montré la méthode d'extraction et avoir été patient : je suis pas un cadeau au labo. Je remercie d'ailleurs tous ceux qui travaillent au labo et qui m'ont aidé de près ou de loin dont **Valérie Combes** et **Delphine Madur**. Je remercie **Delphine Madur** et

Fabrice Dumas pour avoir terminé mes extractions. Toutes les données obtenues sur *VRN-1* sont le fruit du travail de **Carine Remoué**. Je la remercie pour son efficacité et pour sa rigueur. Je la remercie aussi pour sa patience pour m'expliquer son travail (notamment pour l'utilisation de BioEdit). Je remercie enfin **Charles Poncet**, **Karine Chevalier** et toute l'équipe de la plate-forme de génotypage de Clermont-Ferrand pour l'obtention de toutes les données de marquage microsatellite de ma thèse.

Je remercie toute l'équipe dans laquelle j'ai travaillé, anciennement GQMS et maintenant DEAP. Merci à **Alain** pour les discussions et à **Laurence** pour avoir entre autres surveillé mon niveau de fatigue et alerté Isabelle de mon besoin de vacances ;-). Merci à **Abdul** et à **Julie** pour les discussions et les relectures pour corriger mon anglais aléatoire. Merci encore à **Bénédicte** (marraine d'école et marraine de thèse ;-)) pour tous ses conseils pour ma thèse. Merci aussi à **Sophie** qui est arrivée dans l'équipe à la fin de ma thèse mais qui m'a aidé et qui a dû patienter pour pouvoir profiter de son bureau ;-). Et Merci enfin à **Jérôme Enjalbert**, "nouveau venu" au Moulon, qui a été la source de nombreuses discussions parfois déstabilisantes mais toujours instructives (je pense quand même qu'Isa avait raison pour la variance additive par additive non ? :-P). Merci aussi pour son programme qui nous a permis d'avoir une petite touche modélisation dans l'article.

Je tiens bien sûr à remercier toutes les personnes du Moulon pour leur accueil et leur aide au cours de ces 3 ans. Merci d'abord à **Dominique de Vienne** pour m'avoir accepté dans son unité. Merci à tous ceux avec qui j'ai discuté et merci à l'équipe des secrétaires pour leur patience et leur efficacité avec un thésard qui se réveillait à la dernière minute.

Ma thèse s'est déroulée dans une ambiance très vivante et agréable grâce aux personnes avec qui j'ai travaillé mais aussi grâce à toutes celles avec qui je n'ai pas travaillé! Je vais bien sûr commencer par l'unique, le seul : **Jonathan** (Chabichou donc pour ceux qui ne l'auraient pas reconnu :-)). Merci pour m'avoir appris qu'on ne profitait vraiment d'un café qu'à la 10^{ème} tasse et que la bonne dose par tasse c'est bien 3 cuillères! Merci de m'avoir fourni ma drogue favorite aussi. Merci pour toutes nos discussions, les soirées, m'avoir remonté le moral, m'avoir écouté bref pour tout quoi! Merci à **Florian** pour toutes nos discussions et les quelques soirées et aussi pour son soutien en tant que membre du bureau de l'ED ;-). Merci à **Victor** pour m'avoir soutenu pendant le sprint final. Merci à toute l'équipe de pongistes avec qui j'ai pu me défouler de temps en temps : **Aymé** mon coéquipier virevoltant, **Pierre**,

Mathieu, Franck the Bubar, Fabio, Raphaël, Flavien... Merci aussi pour les soirées et toutes les discussions plus ou moins sérieuses et donc merci à **Julie** (merci pour le pot à crayons en mosaïques :-)), **Amandine, Marion, Thibault, Eléonore, Sophie, Véro, Olivier, Marlène**. Merci enfin à **Céline** pour les quelques séances de papotage et le reste.

Je voudrais remercier **Olivier Langella** pour m'avoir fait passer du côté lumineux de la Force grâce à Ubuntu et pour avoir assuré le service après installation avec une disponibilité sans faille. C'est grâce à lui que ma thèse est libre et rédigée en mode texte :-)!

Je n'oublie pas les gens qui m'ont soutenu et formé avant ma thèse. Merci à **André Gallais** pour m'avoir transmis sa passion de la génétique. Merci à mes directrices de stages à l'INRA de Montpellier : **Marie-Hélène Muller, Anne Tsitrone** et **Marie-France Ostrowski** pour avoir commencé à former le débutant que j'étais et m'avoir soutenu dans mes démarches pour trouver une thèse (merci aussi à **Joëlle**). Merci à **Jacques, Annabelle, Mathieu** et **Stéphane** bien sûr !

Je voudrais remercier **Anne** et ses parents pour leur soutien au cours de ces 3 ans. Ma vie a pris une autre direction mais ma gratitude envers eux est très importante.

Je remercie bien sûr tous mes amis pour être mes amis et tous les moments de détente qui m'ont fait décompresser pendant ma thèse.

Merci à ma famille et à **Dominique** et **Vincent** en particulier pour leur soutien. Merci encore à **Vincent** pour les "quelques" battages pendant ses boulot d'été ;-).

Enfin je remercie mon père et ma mère pour m'avoir encouragé et m'avoir donné le goût de la recherche. Merci à mon père pour m'avoir toujours soutenu dans cette direction et pour pleins d'autres choses difficiles à mettre en mots.

Résumé

La Gestion Dynamique (GD) des ressources génétiques est une stratégie de gestion de la diversité génétique dans laquelle des populations hétérogènes évoluent dans des environnements contrastés sous la pression de la sélection naturelle et des autres forces évolutives. La GD a pour but de permettre aux populations de s'adapter localement tout en conservant la diversité initiale sur l'ensemble du système. Afin d'étudier cette approche, des populations expérimentales de GD de blé ont été mises en place à l'INRA depuis 1984. Ces populations se sont différenciées pour des caractères de phénologie et de résistance aux pathogènes, montrant ainsi des indices d'adaptation locale. La sélection et la dérive ont eu pour conséquence une diminution de la diversité génétique intra-population ce qui peut conduire à une perte de valeur sélective ou du potentiel évolutif à plus ou moins long terme.

Le sauvetage génétique par migration peut limiter ce phénomène en augmentant la variabilité génétique dans ces populations. Cependant, la présence de dépression hybride peut contrecarrer les effets positifs du sauvetage génétique. L'objectif de la thèse est de répondre à la question suivante : "Comment gérer la migration dans un système de GD afin de maintenir le potentiel évolutif sans compromettre l'adaptation locale dans chaque population ?"

Nous avons analysé des descendance de croisements intra et inter-populations sur 2 générations. La deuxième génération a été évaluée sur les 3 sites d'origines des populations parentales des croisements (transplantations réciproques).

Dans l'expérimentation de transplantation, nous avons tout d'abord mis en évidence la présence d'adaptation locale dans les populations pour la hauteur de plante et le poids de 1000 grains. Grâce à une analyse conjointe de ces caractères avec la précocité de floraison, nous avons mis en évidence la contre-sélection des plantes tardives dans le Sud par l'intermédiaire du poids de 1000 grains notamment. Nous avons ensuite montré que le gène *FT* était impliqué dans la précocité de floraison dans les populations de GD et que sa structuration et l'évolution de sa diversité pouvaient être reliées à des pressions sélectives en relation avec l'adaptation climatiques.

L'analyse de la 1^{ère} et de la 2^{ème} génération de descendance des croisements nous a permis de mettre en évidence de la dépression de consanguinité dans les populations mais peu de fardeau génétique (faible composante inter-populations de l'hétérosis). Nous n'avons pas trouvé de dépression hybride pour aucun type de croisements analysés. Ce dernier résultat peut être expliqué par deux hypothèses : (i) il n'y a pas de complexes de gènes co-adaptés cassés par les croisements et l'adaptation locale n'a pas un impact important sur les valeurs en croisements ou (ii) les effets positifs d'hétérosis et négatifs de dépression hybride se compensent ce qui conduit à une faible composante inter-populations de l'hétérosis.

Abstract

Dynamic management (DM) of genetic resources is a strategy for the conservation of genetic diversity in which heterogeneous populations evolve in contrasted environments under natural selection pressure and other evolutionary forces. The aim of the DM is to let individual populations become locally adapted while maintaining the initial diversity over the whole system. In order to study this approach, DM experimental wheat populations were developed by INRA starting in 1984. These populations became differentiated for flowering time and disease resistance, thereby showing indices of local adaptation. Selection and drift led to a decrease of within-population genetic diversity, which could lead to a decrease of fitness or evolutionary potential in the mid to long term.

Genetic rescue by migration can limit this phenomenon by increasing within-population genetic variability. However, outbreeding depression can counteract the positive effects of genetic rescue. The aim of this thesis is to answer to the question: "What is the best strategy to manage migration in a DM system in order to maintain evolutionary potential without compromising local adaptation within each population?"

We have analysed within and between-population cross progeny over two generations. The second generation was evaluated in the three sites of origin of the parental populations of the crosses (reciprocal transplants).

In the transplant experiment, we have shown that local adaptation occurred in the populations for plant height and thousand-kernel weight. Using an analysis of covariance of this trait with flowering time, we showed that late genotypes were selected against in the South because of their low thousand-kernel weight. We then showed that *VRN1* gene was involved in flowering time in the DM populations and that its structuration and the evolution of its diversity could be linked to selective pressures related to climatic adaptation.

Analysis of the 1st and 2nd progeny generations allowed us to show that there was inbreeding depression within populations but only small genetic loads (small between-population components of heterosis). We did not find outbreeding depression for any type of cross. This last result could be explained by two hypotheses: (i) there were no co-adapted genes complexes broken by outcrossing and local adaptation had only weak effects on the cross progeny values or (ii) the positive effects of heterosis and the negative effects of outbreeding depression compensated for each other which led to weak between-populations component of heterosis.

Table des matières

Table des matières	9
1 Introduction	13
1.1 Gestion de la biodiversité	13
1.1.1 Gestion de la biodiversité cultivée	15
1.1.1.1 Conservation statique <i>ex situ</i> des ressources génétiques	16
1.1.1.2 Gestion dynamique <i>in situ</i> des ressources génétiques	18
1.1.2 Gestion dynamique des ressources génétiques et gestion de la biodiversité sauvage : des problématiques partagées	22
1.2 Mécanismes génétiques des populations fragmentées et/ou de petite taille	23
1.2.1 Évolution du fardeau génétique et dépression de consanguinité	23
1.2.2 Variabilité génétique et potentiel adaptatif	26
1.3 Le sauvetage génétique : avantages et inconvénients	26
1.3.1 Aspects positifs du sauvetage génétique	27
1.3.1.1 Augmentation de la variabilité génétique	27
1.3.1.2 Effets d'hétérosis	27
1.3.2 Aspects négatifs du sauvetage génétique : la dépression hybride	29
1.3.2.1 Mise en évidence expérimentale de la dépression hy- bride	29
1.3.2.2 Mécanismes génétiques à l'origine de la dépression hybride	30
1.3.3 Notion de distance optimale de croisement	32
1.3.4 Gérer la quantité de migrants pour le sauvetage génétique . .	33

1.4	Présentation du projet	34
2	Matériel et Méthodes	37
2.1	Matériel végétal	37
2.1.1	Conduite des populations de Gestion Dynamique	37
2.1.2	Schéma de croisement	40
2.2	Dispositif expérimental pour la caractérisation des descendances . . .	44
2.2.1	Première génération	44
2.2.2	Deuxième génération	44
2.3	Génotypage des parents des croisements	45
2.3.1	Marquage microsatellite	45
2.3.2	Génotypage des gènes <i>VRN-1</i>	47
3	Adaptation locale dans les populations de GD	49
3.1	Introduction	49
3.2	Utilisation de différentes approches pour étudier l'adaptation locale dans les populations de gestion dynamique	50
3.3	Comportement des croisements dans la réponse à l'adaptation locale .	77
3.3.1	Matériels et Méthodes	77
3.3.1.1	Matériel végétal	77
3.3.1.2	Analyses statistique des caractères quantitatifs . . .	77
3.3.2	Résultats	78
3.3.3	Discussion	80
4	Rôle dans l'adaptation locale de l'adaptation climatique et d'un gène impliqué dans la précocité de floraison, <i>VRN-1</i>	83
4.1	Introduction	83
4.1.1	Importance de la précocité de floraison dans l'adaptation locale	83
4.1.2	<i>VRN-1</i> et la réponse à la vernalisation chez le blé	84
4.1.3	<i>VRN-1</i> et son impact sur la précocité au champ	84
4.2	Matériels et Méthodes	85
4.2.1	Matériel végétal	85
4.2.2	Génotypage et analyse de la diversité du gène <i>VRN-1</i>	86
4.2.2.1	Génotypage des 3 copies du gènes <i>VRN-1</i>	86
4.2.2.2	Analyse de la diversité des 3 copies du gène <i>VRN-1</i> .	87

4.2.3	Analyse de la variabilité de la précocité dans les populations de GD	89
4.2.4	Association entre <i>VRN-1</i> et la précocité	90
4.2.4.1	Analyses des descendance d'autofécondations	90
4.2.4.2	Analyses de l'ensemble des croisements	90
4.3	Résultats	91
4.3.1	Diversité et structuration des gènes <i>VRN-1</i>	91
4.3.1.1	Diversité des gènes <i>VRN-1</i>	91
4.3.1.2	Structuration de la diversité de <i>VRN-1</i>	92
4.3.2	Variabilité de la précocité de floraison dans les populations de GD	100
4.3.3	Association entre <i>VRN1</i> et la précocité	106
4.3.3.1	Analyses des autofécondations	106
4.3.3.2	Analyse des effets de <i>VRN-1</i> en croisement	107
4.4	Discussion	110
4.4.1	Apparition de nouveaux allèles	110
4.4.2	Sélection de <i>VRN-1B_{int1}</i> en relation avec l'adaptation climatique	110
4.4.3	Importance des interactions épistatiques intra et inter génomes	111
4.4.4	Cohérence des résultats entre les descendance d'autofécondation et de croisement	112
4.4.5	Interaction entre la précocité de floraison et le développement de l'appareil végétatif	112
5	Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes	115
5.1	Introduction	115
5.2	Première génération de descendance	117
5.2.1	Dépression de consanguinité et faible hétérosis inter-populations	117
5.2.2	Résultats complémentaires sur la première génération	131
5.3	Deuxième génération de descendance dans un dispositif multilocal	135
5.3.1	Matériels et méthodes	135
5.3.1.1	Matériel végétal	135
5.3.1.2	Dispositif expérimental	135
5.3.1.3	Analyses des caractères quantitatifs	136
5.3.2	Résultats	138

5.3.2.1	Effets des croisements entre populations	138
5.3.2.2	Effets des croisements avec une variété non apparen- tée : 'Piko'	144
5.4	Discussion	150
5.4.1	Hétérosis intra-population	150
5.4.2	Hétérosis intra-site d'origine	151
5.4.3	Absence de dépression hybride	151
5.4.4	Hétérosis entre sites d'origine et adaptation locale	152
5.4.5	Impact du site d'expérimentation sur les estimations d'hétérosis	153
5.4.6	Croisements avec une variété non apparentée	153
6	Discussion générale	155
6.1	L'adaptation locale dans les populations de Gestion Dynamique . . .	155
6.2	Adaptation locale et modélisation	157
6.3	Présence de dépression de consanguinité mais pas de fardeau géné- tique dans la GD	158
6.4	Absence de dépression hybride dans une espèce autogame adaptée localement ?	158
6.5	Conséquences pour la migration dans les systèmes de gestion <i>in situ</i> des ressources génétiques	159
	Bibliographie	163
A	Protocoles de biologie moléculaire	177
A.1	Protocole d'extraction d'ADN	177
A.2	Protocoles de révélation du polymorphisme de <i>VRN-1</i>	183

Chapitre 1

Introduction

1.1 Gestion de la biodiversité

La biodiversité est devenue un enjeu majeur depuis le Sommet de la Terre de Rio en 1992. Les pays de l'ONU se sont mis d'accord sur le fait que la protection de la biodiversité était une priorité car elle est considérée comme un des piliers du développement durable. Ce sommet a conduit à la rédaction de la Convention sur la Diversité Biologique (CBD). Le sommet européen de Göteborg en 2001 a fixé un objectif clair : stopper le déclin de la biodiversité en Europe d'ici 2010. Enfin, l'ONU a décidé en 2008 la création d'un groupe intergouvernemental d'experts de la biodiversité sur le même principe que le GIEC (Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat) pour le climat.

L'apparition du terme "biodiversité" et son importance sur la scène politique internationale vient d'une prise de conscience de la disparition des espèces et de l'érosion génétique au cours du XX^{ème} siècle. La véritable explosion en terme de publications scientifiques, indiquant le développement des recherches dans ce domaine, a commencé dès 1992 après le sommet de Rio (cf. Fig. 1.1).

La biodiversité est structurée en trois niveaux :

- la diversité écosystémique qui correspond à la diversité des écosystèmes
- la diversité spécifique qui correspond au nombre d'espèces d'un groupe et à leur répartition spatiale
- la diversité génétique qui est définie par la variabilité des gènes au sein d'une même espèce

La diversité génétique est le réservoir sur lequel repose la capacité future des espèces à répondre aux nouvelles contraintes que leur imposera leur environnement au sens

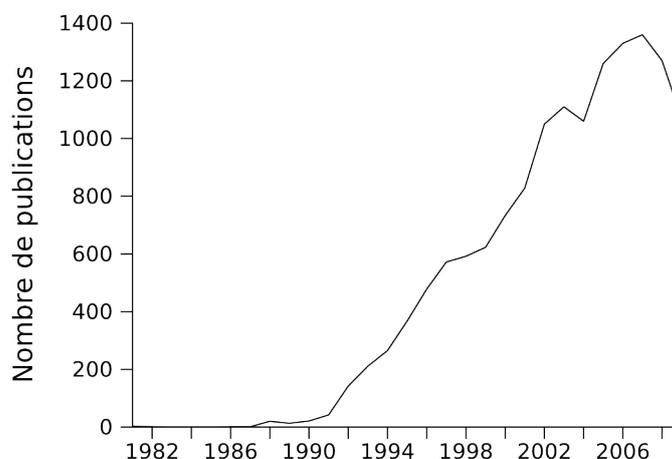


Figure 1.1: Nombre de publications scientifiques dont le titre contient “*biodiversity*”. Recherche faite dans Google Scholar.

large, c’est à dire incluant l’Homme. Dans le cadre de ma thèse, c’est à ce niveau de la biodiversité, la diversité génétique, que je m’intéresserai.

La biodiversité a historiquement été divisée en 2 “branches” : la diversité cultivée et la diversité sauvage selon les espèces qui étaient prises en compte. Cette dichotomie correspond à deux grandes disciplines académiques différentes, l’agronomie d’une part et l’écologie d’autre part. La communication entre ces deux disciplines n’est pas toujours facile, les objectifs des uns étant souvent en contradiction avec ceux des autres jusqu’à récemment. Preuve en est, deux organismes se partageaient la gestion de la biodiversité en France jusqu’à récemment :

- le BRG (Bureau des Ressources Génétiques) pour les espèces cultivées
- l’IFB (Institut Français pour la Biodiversité) pour les espèces sauvages.

Ce n’est qu’en 2009 que ces deux organismes ont été rassemblés pour former la FRB (Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité).

Cependant, les questions de gestion reliées aux aspects génétiques peuvent être rapprochées et chaque “communauté” de chercheurs peut profiter des résultats de l’autre groupe. C’est pourquoi, dans cette introduction, nous allons d’abord détailler les aspects de la gestion de la diversité cultivée et ensuite mettre en évidence les rapprochements possibles que nous pouvons établir avec la gestion de la diversité sauvage.

1.1.1 Gestion de la biodiversité cultivée

L'Homme a domestiqué environ 7000 espèces végétales principalement pour se nourrir mais aussi pour se vêtir ou pour se soigner. Au cours de la domestication, plusieurs phénomènes ont contribué à une perte de la diversité initiale dans les espèces domestiquées. Tout d'abord, un petit nombre de populations sauvages ont été utilisées comme source au début de la domestication, ce qui a conduit à un effet d'échantillonnage fort de la diversité de l'espèce sauvage pour produire les premières populations soumises à la domestication. Cet effet de goulot d'étranglement a notamment pu être mis en évidence sur le blé dur à l'aide de marqueurs microsatellites (Thuillet *et al.*, 2005) et sur le maïs (Eyre-Walker *et al.*, 1998).

Ensuite, l'Homme a sélectionné les plantes qui présentaient le plus d'intérêt pour l'utilisation qu'il voulait en faire. Cette longue phase de sélection massale a potentiellement contribué à diminuer la diversité des espèces cultivées. Cependant, les mouvements de migration humaine ont transporté les plantes en cours de domestication dans des environnements variés. Cette phase de dispersion des plantes cultivées a permis une diversification génétique des espèces cultivées par adaptation locale aux différents environnements rencontrés.

Au cours du XX^{ème} siècle, l'intensification de l'agriculture a été permise grâce à la mécanisation du travail, l'apport d'intrants chimiques et à une accélération du progrès génétique. Cette "révolution verte" a eu comme conséquences une homogénéisation des espèces cultivées ainsi qu'une érosion de leur diversité génétique. Les populations de pays utilisées par les agriculteurs (populations hétérogènes issues de la longue première phase de domestication/migration) ont été petit à petit remplacées par des variétés élites (variétés homogènes). Cette perte de diversité a pu être mise en évidence à l'aide de marqueurs neutres comme par exemple sur le blé tendre Roussel *et al.* (2004). D'autres espèces ont vu leur diversité génétique s'éroder au cours de cette phase de sélection moderne comme le blé dur (Autrique *et al.*, 1996; Maccaferri *et al.*, 2003; Thuillet *et al.*, 2005), l'orge (Russell *et al.*, 2000) ou le maïs (Allard, 1996).

La prise de conscience de cette érosion et de son impact sur l'avenir de l'agriculture s'est faite dans les années 70 notamment à la suite d'épidémies importantes comme par exemple celle due à l'hélmintosporiose qui ravagea la culture de maïs aux États-Unis en 1970. En réponse, l'Académie des Sciences des États-Unis publia un rapport mettant en avant l'importance de collecter et de conserver la diversité des plantes cultivées et des espèces apparentées Horsfall (1972). Une des conséquences

de ce rapport fût la création du CGIAR (*Consultative Group for International Research in Agriculture* en 1971 qui représente à l'heure actuelle 15 organismes de recherche internationaux. La diversité génétique est alors devenue une ressource qu'il fallait protéger. En 1992, la CBD prend en compte la diversité cultivée mais il faudra attendre 2003 et le Traité International sur les Ressources Phytogénétiques pour l'Alimentation et l'Agriculture (TIRPAA) pour avoir des recommandations spécifiques quant à sa protection et sa conservation.

La gestion des ressources génétiques peut se concevoir sous deux formes :

- la conservation statique *ex situ*
- la gestion dynamique *in situ*

Ces deux modes de gestion de la diversité génétique cultivée n'apportent pas les mêmes réponses techniques, elles doivent donc être considérées comme complémentaires.

1.1.1.1 Conservation statique *ex situ* des ressources génétiques

La première réponse suite à cette prise de conscience a été la mise en place de système de conservation statique des ressources génétiques. Le principe est de conserver des organes permettant la production de nouveaux individus. Pour la plupart des espèces ce sont les graines qui sont conservées à 4°C pour de la conservation à court terme ou à -20°C pour la conservation à long terme. Certaines espèces à graines dites non orthodoxes ne sont pas conservables à ces températures car elles ne peuvent pas être suffisamment déshydratées, elles sont alors cryoconservées à -180°C après un traitement protecteur. La conservation du pollen est plus pratiquée pour les arbres car elle permet de pouvoir utiliser le matériel conservé directement, en croisement par exemple, sans avoir à attendre la croissance et la maturité d'un arbre. Enfin pour les espèces à reproduction clonale, ce sont des organes végétatifs qui sont conservés mais ce type de conservation est beaucoup plus difficile et se fait à court terme en général. Aujourd'hui, 6 millions d'accessions sont conservées dans les différentes banques de gènes à travers le monde.

Cependant, certaines limites de ce mode de conservation ont été soulevées.

Tout d'abord, la petite taille des lots de semences représentant chaque accession implique que la diversité au sein de la variété population correspondante est souvent mal représentée. Cette diversité peut être relativement importante dans le cas de variétés populations par exemple.

De plus, les graines perdent leur pouvoir germinatif à long terme, il est donc

nécessaire de régénérer les lots de semences régulièrement. La fréquence de régénération est très variable selon les espèces et selon les banques de gènes : entre 2 et 14 ans pour le colza (Soengas *et al.*, 2009) ou pour le seigle (Chebotar *et al.*, 2003). Chaque lot est donc régulièrement semé et les graines produites constituent le nouveau lot. Cette procédure induit plusieurs problèmes. D'une part certaines graines perdent leur viabilité plus rapidement que prévu et ne germant plus, ne participent pas à la production du nouveau lot : il en découle un échantillonnage aléatoire de la diversité intra-accession. D'autre part, cette génération de reproduction se fait dans un environnement donné qui est souvent différent de celui d'origine de l'accession, on peut imaginer que ce nouvel environnement opère une sélection qui diminue encore la diversité intra-accession et, de plus, modifie les caractéristiques de l'accession. Ces effets ont été observés sur l'orge (Parzies *et al.*, 2000) et sur les deux autres espèces citées précédemment (Chebotar *et al.*, 2003; Soengas *et al.*, 2009).

Ces deux modes de fonctionnement des banques de semences ont pour conséquence une relative mauvaise représentation et conservation de la diversité intra-accession Esquinas-Alcázar (2005).

Au delà de ces aspects techniques, le nombre élevé d'accessions dans chaque banque conduit souvent à une mauvaise caractérisation des accessions ce qui les rend difficilement utilisables. En effet, les données passeport collectées en même temps que les semences sont souvent pauvres et relativement peu de caractérisations phénotypiques sont faites sur ce matériel (Lefort *et al.*, 1998; Esquinas-Alcázar, 2005). L'implication des acteurs potentiellement intéressés par l'utilisation des ressources génétiques a longtemps été faible (Lefort *et al.*, 1998). Ces deux phénomènes conduisent au fait que les ressources génétiques conservées de façon statique sont trop peu valorisées.

De plus, ce manque d'information empêche de pouvoir quantifier précisément le niveau de redondance au sein et entre les banques de gènes. Les 6 millions d'accessions conservées dans le monde pourraient ainsi peut-être se réduire à 1 à 2 millions d'accessions uniques (Hammer *et al.*, 2003).

Cependant la principale limite généralement invoquée est le fait que le matériel génétique ainsi conservé subit un "gel évolutif" (Esquinas-Alcázar, 2005). En effet, la conservation statique s'affranchit (ou du moins tente de s'affranchir) de toute pression de sélection imposée par un environnement biotique ou abiotique. Le problème du potentiel évolutif et de l'adaptation d'un tel matériel dans un environnement qui évolue au cours du temps est donc posé. De plus, à plus court terme, l'utilisation du

matériel génétique issu des banques de semences peut nécessiter une longue phase de réadaptation.

La conservation statique a donc été une bonne réponse d'urgence au problème de la conservation de la diversité des espèces cultivées mais une autre approche semble être indispensable et complémentaire pour la gestion de la diversité à long terme : la gestion dynamique (Henry *et al.*, 1991).

1.1.1.2 Gestion dynamique *in situ* des ressources génétiques

La gestion dynamique des ressources génétiques consiste à gérer les ressources génétiques sous forme de populations maintenues dans l'environnement où leur diversité est apparue et où elle a évolué (UNCED, 2000). Ce mode de conservation est ainsi qualifié de *in situ* contrairement au mode statique qui, lui est qualifié de *ex situ*. Les populations évoluent en s'adaptant à leur environnement et en s'adaptant aux changements de leur environnement (Prescott-Allen and Prescott-Allen, 1982; Brush, 1991).

Le maintien de grandes populations permet d'éviter les effets d'échantillonnage à chaque génération et ainsi de conserver la diversité intra-population.

Enfin, la mise en place de ces populations implique, en général, les acteurs intéressés par la gestion des ressources génétiques et donc permet une meilleure interaction entre les ressources génétiques et les utilisateurs potentiels.

Deux approches de gestion dynamique existent à l'heure actuelle :

- la gestion de populations hétérogènes, en général mises en places par les instituts de recherche
- la gestion de populations à la ferme faite par les agriculteurs directement.

Gestion dynamique en populations hétérogènes

Les prémices de la gestion dynamique sont illustrées par l'expérience sur les populations d'orge aux Etats-Unis et ensuite en Grande-Bretagne menées par Allard *et al.* (1992). Ce genre d'expériences était mené sur un site uniquement et était appelé "*evolutionary breeding*".

La gestion dynamique de populations hétérogènes est, quant à elle, basée sur le principe de la métapopulation. Une population hétérogène initiale est mise en place dans un réseau de sites qui diffèrent par leurs conditions biotiques et abiotiques. Les

populations sont maintenues de génération en génération sans sélection humaine consciente en utilisant les semences produites par croisements libres au sein de la population.

En 1984, un dispositif de gestion dynamique a été initié sur le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) par l'INRA. Le réseau de départ comptait plus d'une vingtaine de sites en France et l'étude de ces populations a permis d'étudier l'évolution des caractères quantitatifs et de la diversité neutre au cours des 17 premières générations.

L'adaptation des populations à leur environnement a été montrée pour 2 caractères principalement. D'une part, les populations se sont différenciées pour la précocité de floraison selon un gradient latitudinal. Les populations cultivées dans le sud de la France sont devenues génétiquement plus précoces que les populations cultivées dans le nord (Goldringer *et al.*, 2006). D'autre part, il a été mis en évidence que l'évolution des gènes de résistances aux maladies, principalement l'oïdium et les rouilles, ainsi que leur différenciation selon les régions étaient le fait de la sélection (Paillard, 1999; Paillard *et al.*, 2000a,b). Des génotypes multi-résistants ont aussi été créés dans ces populations. Les populations se sont donc différenciées en réponse à leur environnement climatique et pathogène. Une autre forme de sélection a été mise en évidence dans ces populations. Une augmentation de la hauteur des plantes généralisées à toutes les populations a été observée. Cette augmentation a été interprétée comme une réponse à la compétition pour la lumière intra-population. Ce phénomène de compétition a contre-sélectionné l'allèle conférant le caractère "nain" du gène *Rht1* utilisé dans les variétés modernes pour éviter la verse et pour permettre une meilleure ré-allocation dans les grains. Cet allèle a disparu des populations au bout de 10 générations (Raquin *et al.*, 2008a).

La diversité moléculaire neutre a aussi évolué dans ces populations de gestion dynamique. La diversité allélique de départ est conservée sur l'ensemble du réseau bien que certains allèles aient été perdus dans certaines populations. Nous pouvons en conclure que, pour l'instant, le système de gestion dynamique a été efficace pour conserver la diversité génétique de départ. La forte différenciation des populations est à relier à la réponse adaptative des populations à leur environnement dont nous avons parlé précédemment.

Peu de programmes de gestion dynamique de populations composites ont vu le jour. Cependant des exemples montrent que cela peut-être une méthode qui permet de :

- conserver la diversité initiale sur l'ensemble du système (Goldringer *et al.*,

2001; Porcher *et al.*, 2004)

- permettre aux populations de s'adapter à leur environnement et donc d'avoir du matériel plus facilement exploitable ensuite en sélection (Allard *et al.*, 1992).

Gestion dynamique à la ferme

La gestion dynamique à la ferme, est plus proche de la gestion *in situ* au sens strict étant donné que les ressources génétiques sont gérées directement dans l'environnement où elles seront potentiellement utilisées et où la diversité génétique a évolué (Article 2 du TIRPAA). De nombreuses formes de gestion à la ferme existent selon les pays, les besoins des agriculteurs, les espèces concernées et les systèmes socio-économiques dans lesquels les agriculteurs vivent.

La gestion à la ferme peut être vue comme une gestion "involontaire" de la diversité. En effet, dans certains pays où les conditions de cultures sont difficiles et/ou les pratiques culturelles n'ont pas été trop affectées par la modernisation de l'agriculture, les agriculteurs cultivent des variétés populations traditionnelles parce que ce sont les seules qui conviennent. Dans d'autres cas, pour des raisons culturelles principalement, la conservation de la diversité est un objectif conscient pour les agriculteurs.

Dans tous les cas, cette approche de la gestion des ressources génétiques a fait ses preuves en termes de conservation de la diversité cultivée (Jarvis *et al.*, 2008). En effet, l'importance de la sélection humaine diversifiante (souvent en raison d'utilisations différentes) en interaction avec l'adaptation des populations à des environnements contrastés permet de maintenir la variabilité génétique au sein des populations (Ex. chez le manioc (Elias *et al.*, 2001)). D'autre part les échanges de matériel entre fermiers permettent de renouveler la diversité qui peut être perdue par sélection ou dérive au sein des populations (Brush and Meng, 1998; Elias *et al.*, 2001; Pressoir and Berthaud, 2004). Ces échanges de matériels se font généralement à l'échelle d'un village, d'un groupe de villages ou d'une région précise (Louette *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 2005; Delaunay *et al.*, 2008). Les échanges à plus grande distance (centaines de km) sont plus rares mais ont été aussi décrits (Alvarez *et al.*, 2005; Empereire and Peroni, 2007).

Ces systèmes traditionnels de gestion de la diversité cultivée à la ferme sont cependant menacés par la pénétration de plus en plus importante de variétés mod-

ernes dans ces systèmes et les atouts qu'elles peuvent avoir en terme de rendement (Brush, 1991; *vin Brocke et al.*, 2003). Dans ces contextes, les agriculteurs font généralement cohabiter les deux types de variétés : d'une part, les variétés de pays sont appréciées pour leur bonne valeur gustative et leur adaptation à des milieux difficiles ; d'autre part, les variétés modernes sont utilisées pour leur rendement plus important et parce qu'elles sont plus faciles à commercialiser (Boster, 1986; Louette, 2000; *Berthaud et al.*, 2001). Ces réseaux d'échanges de semences paraissent être relativement robustes à la modernisation de l'agriculture pendant la "Révolution verte" notamment (Carpenter, 2005; *Jackson et al.*, 2007) mais si la résilience des réseaux sociaux sous-tendant les échanges de semences n'est pas assez forte, la conservation des variétés locales peut s'écrouler (McGuire, 2007, 2008).

Ces approches sont bien connues et caractérisées dans les pays du Sud. Dans les pays industrialisés du Nord, le système informel d'échanges de semences a été remplacé par un système formel hiérarchisé dans lequel les agriculteurs achètent leur semences tous les ans et ne sont plus acteurs dans la gestion de la diversité cultivée, la sélection ou la production de semences. La législation sur les semences est assez contraignante concernant le choix des variétés qui peuvent être utilisées par les agriculteurs. En effet seules les semences des variétés inscrites dans le catalogue officiel sont autorisées à la commercialisation. Pour l'instant, les critères d'inscription (Distinction, Homogénéité, Stabilité et Valeur Agricole et Technologique pour les grandes cultures) ne permettent pas l'inscription des variétés-populations anciennes. Cependant, des groupements d'agriculteurs se sont organisés afin de mettre en œuvre la gestion de variétés anciennes à la ferme partout en Europe. Le Réseau Semences Paysannes (RSP) est un bon exemple de ce genre de réseaux en France. RSP regroupe des agriculteurs cultivant différentes espèces le plus souvent en agriculture biologique. L'offre de variétés conventionnelles pour l'agriculture biologique n'étant pas assez fournie ou proposant des variétés relativement mal adaptées à cette culture, les agriculteurs de RSP ont décidé de cultiver des variétés anciennes. La première raison de l'utilisation de variétés anciennes est donc un besoin d'utiliser un matériel adapté à leur contraintes de cultures. Cependant, il existe dans ce réseau une véritable prise de conscience de ce qu'est la diversité et une réelle envie de la conserver pour elle-même.

1.1.2 Gestion dynamique des ressources génétiques et gestion de la biodiversité sauvage : des problématiques partagées

Avant de se préoccuper de la gestion de la biodiversité cultivée, la communauté scientifique a d'abord tiré la sonnette d'alarme concernant les menaces qui pesaient sur la biodiversité sauvage (UNCED, 2000). Les activités humaines sont la principale origine des menaces qui pèsent sur la biodiversité sauvage (World Conservation Monitoring Centre, 1992; Frankham, 1995). Les premiers facteurs qui causent l'extinction des populations sauvages sont les pertes des habitats naturels, l'introduction de nouvelles espèces, la surexploitation et la pollution (Sala *et al.*, 2000). Le premier facteur implique en général que les populations sauvages deviennent de plus en plus fragmentées au fil du temps. Cette fragmentation croissante est une des menaces principales à moyen et long terme pour les populations sauvages (Young and Clarke, 2000). Les 3 composantes de la fragmentation sont les suivantes (Andren, 1994; Fahrig, 2003) :

- perte d'habitat
- réduction de la taille des populations
- augmentation de l'isolement de chaque population.

Les mécanismes génétiques affectant les populations fragmentées sont les suivants (Young *et al.*, 1996), ils seront détaillés dans la partie suivante :

- plus grande sensibilité à la stochasticité de l'environnement
- diminution de l'hétérozygotie et augmentation de la dépression de consanguinité
- perte de la variabilité génétique et par conséquent perte du potentiel évolutif à long terme.

En plus de la diminution démographique, ces trois phénomènes génétiques ont pour conséquence une perte de viabilité des populations concernées ce qui augmente leur risque d'extinction. Une méta-analyse menée par Honnay and Jacquemyn (2007) met en évidence des corrélations positives entre les tailles de populations et les valeurs des mesures communes de diversité génétique H_e (Diversité de Nei), A (Nombre moyen d'allèles par locus) et P (Pourcentage de locus polymorphes), elle même reliée positivement à la viabilité des populations. L'indice de fixation (F_{IS}) ne semble pas être corrélé à la taille des populations. Une des conclusions les plus inquiétantes de cette étude est le fait que les espèces considérées comme communes soient aussi

affectées que les espèces rares. Ce résultat peut être interprété comme le fait que le niveau de fragmentation de toutes les espèces étudiées est trop élevé pour permettre un équilibre mutation-sélection-dérive.

Certaines espèces ont aussi une aire de répartition fragmentée pour des raisons indépendantes de l'activité humaine. Ces espèces peuvent avoir besoin d'un environnement particulier notamment en terme pédologique ou climatique. Les interactions biotiques peuvent aussi expliquer des aires de répartition fragmentées. Enfin des raisons historiques peuvent expliquer cette fragmentation. Les arbres adaptés au climat tempéré ont vu leur aire de répartition se fragmenter dans des zones refuges discontinues au cours du dernier épisode glaciaire (Bennett *et al.*, 1991; Cheddadi *et al.*, 2006).

La gestion de la diversité sauvage est donc une gestion de populations fragmentées, une gestion des espèces sous forme de métapopulations. C'est dans ce cadre de réflexion que les problématiques de ce domaine peuvent rejoindre celles de la gestion dynamique des ressources génétiques. En effet, qu'elle soit sous forme de réseau de populations composites ou bien de populations maintenues par un réseau d'agriculteurs, la gestion dynamique peut s'apparenter à une gestion d'espèces cultivées en métapopulations.

1.2 Mécanismes génétiques des populations fragmentées et/ou de petite taille

La migration étant le sujet principale de cette thèse, ses conséquences sur la variabilité génétique, l'adaptation locale et le fardeau génétique seront détaillées dans la partie suivante. Nous nous intéresserons dans cette partie plus particulièrement aux conséquences de la mutation, de la dérive et de la sélection.

1.2.1 Évolution du fardeau génétique et dépression de consanguinité

L'apparition récurrente de mutations délétères a été identifiée très tôt comme une source importante du fardeau génétique présent dans les populations. Le fardeau génétique se quantifie alors comme la diminution de la valeur sélective moyenne par rapport à une population qui n'aurait aucune mutation délétère (Crow and

Kimura, 1970). Le modèle le plus couramment employé pour étudier l'évolution des mutations délétères est un modèle à locus bialléliques. Chaque locus possède une forme allélique sauvage favorable (A) et une forme allélique mutée délétère (a). Les génotypes diploïdes AA , Aa et aa ont respectivement les valeurs sélectives suivantes : 1 , $1-hs$ et $1-s$ où h mesure le degré de dominance de l'allèle délétère et s l'amplitude de l'effet délétère chez les génotypes homozygotes aa .

La détermination de la valeur de ces paramètres dans la nature est l'objet de beaucoup d'efforts expérimentaux mais nos connaissances sur ce sujet restent encore limitées. La majeure partie des données expérimentales disponibles concerne la survie du stade larve au stade adulte chez *Drosophila melanogaster* (Simmons and Crow, 1977; Charlesworth and Charlesworth, 1987; Lynch *et al.*, 1999). Selon ces travaux les mutations délétères peuvent être classées en deux catégories :

- les mutations faiblement délétères ayant un coefficient de sélection faible (1 à 3 %) et étant presque codominantes ou faiblement récessives (h entre 0,2 et 0,4) avec un taux de mutation par génome diploïde U de l'ordre de 1
- les mutations létales ayant un coefficient de sélection proche de 1 mais étant presque complètement récessives (h entre 0,2 et 0,3) avec un taux de mutation par génome diploïde U de l'ordre de 0,2-0,5.

Ces valeurs représentent les moyennes des distributions réelles des paramètres pour un ensemble de mutations délétères. Les expériences sur les autres organismes montrent que la majorité des mutations sont faiblement délétères (Lynch *et al.*, 1999; Bataillon, 2000).

Dans certains cas, soit à cause du régime de reproduction soit à cause de la petite taille de la population, les fécondations se font entre individus apparentés. Ces individus consanguins portant les mêmes mutations délétères, leur descendance présente ces mutations à l'état homozygote permettant ainsi leur expression négative sur la fitness. Cette diminution de fitness due à l'état consanguin de ces individus par rapport à des individus qui ne le sont pas s'appelle dépression de consanguinité. Elle se mesure en général par la différence au sein d'une population entre les individus issus d'autofécondation et les individus issus de croisements.

Au sein d'une population, l'évolution des mutations délétères et donc du fardeau génétique et de la dépression de consanguinité est soumise aux 3 forces évolutives suivantes : mutation, dérive et sélection. L'importance de ces 3 forces et leur interaction est fonction principalement de la taille et du régime de reproduction des populations.

Bataillon and Kirkpatrick (2000) a étudié par des approches analytiques et de simulations l'influence de la taille de la population sur le fardeau génétique et la dépression de consanguinité. Dans les petites populations, la dérive est la principale force évolutive devant la sélection. Les mutations délétères s'accumulent donc au cours du temps conduisant à un fardeau génétique important. Cependant, la dépression de consanguinité est quand à elle relativement faible, tous les individus étant consanguins. La présence de dépression de consanguinité dans une population nécessite en effet la présence de polymorphisme dans cette population. Dans les grandes populations au contraire, les mutations délétères ne se fixent pas car elle sont efficacement contre-sélectionnées et donc le fardeau génétique est peu important. Cependant, les grosses tailles de populations permettent le maintien en ségrégation de mutations faiblement délétères à l'état hétérozygotes et donc de la dépression de consanguinité.

Ces résultats sont obtenus pour des populations complètement panmictiques. La présence d'autogamie dans la population peut modifier ces attendus. En effet, l'autogamie va avoir comme principale conséquence d'augmenter la fréquence des mutations délétères à l'état homozygote. L'effet de la mutation délétère s'exprime sur la fitness qui est donc plus facilement contre-sélectionnée. De plus, pour chaque individu homozygote éliminé, 2 copies de la mutation délétère sont éliminées au lieu d'une dans le cas hétérozygote. Un régime de reproduction autogamme a donc tendance à accélérer la purge des mutations délétères (Ohta and Cockerham, 1974).

La structuration en sous-populations due à la fragmentation a elle aussi un impact sur le fardeau génétique. Whitlock (2002) a montré à l'aide de développements analytiques que le fardeau génétique et la dépression de consanguinité étaient plus faibles dans une population structurée que dans une population non structurée pour des mutations récessives. Ce phénomène est principalement dû au fait que les mutations récessives se retrouvent plus fréquemment à l'état homozygote dans les populations structurées permettant ainsi leur purge. Dans ce contexte, l'autogamie a tendance à accentuer ce phénomène. Cependant, Theodorou and Couvet (2006) et Jaquiéry *et al.* (2009) ont montré que la fragmentation en sous-populations avait un effet négatif sur la viabilité des populations dans les cas où la structuration est trop forte ou pour des mutations faiblement récessives. L'effet de purge liée à la structuration est confirmé par Theodorou and Couvet (2006) mais il précise que la viabilité des populations est fortement diminuée pendant ces phases de purge.

1.2.2 Variabilité génétique et potentiel adaptatif

Du fait de la dérive et de la sélection, la variabilité génétique diminue au cours des générations. Cette variabilité est nécessaire à l'adaptation des populations à des conditions environnementales variables (Lande, 1995; Reed *et al.*, 2002). Un des paramètres cruciaux qui détermine le niveau de variabilité génétique contenu dans une population est sa taille efficace (N_e). La taille efficace d'une population est le nombre d'individus qu'il faudrait à une population idéale pour que celle-ci ait les mêmes caractéristiques de fonctionnement génétique que la population étudiée (Wright, 1931). Une population idéale est caractérisée par un système de reproduction panmictique où tous les individus ont la même probabilité de transmettre leurs gènes à la génération suivante. L'ordre de grandeur de la taille efficace minimum permettant de maintenir une variabilité génétique suffisante a été estimée entre 500 et 5000 (Lande, 1995; Franklin and Frankham, 1998; Lynch and Lande, 1998).

1.3 Le sauvetage génétique : avantages et inconvénients

Le sauvetage génétique est le fait d'introduire des allèles migrants dans une population menacée afin d'en augmenter la viabilité (Tallmon *et al.*, 2004). Au début de l'utilisation de la migration comme méthode de sauvetage, la contribution démographique directe des migrants était considérée comme la plus importante, les phénomènes génétiques étant supposés moins importants dans les populations de petites tailles. Plus récemment, les connaissances des phénomènes génétiques existants dans les petites populations (dépression de consanguinité, fardeau génétique, perte de variabilité) ont donné de l'importance à l'aspect génétique de la migration. Certains précisent donc la définition du sauvetage génétique comme l'augmentation de la viabilité d'une population suite à l'introduction de migrants *indépendamment* de l'apport démographique de ces migrants (Richards, 2000; Ingvarsson, 2001).

Cependant, l'introduction de migrants génétiquement divergent peut aussi avoir l'effet inverse c'est à dire diminuer la viabilité de la population cible. Ce phénomène s'appelle la dépression hybride.

1.3.1 Aspects positifs du sauvetage génétique

Nous aborderons ici uniquement les effets génétiques de la migration et non les effets démographiques directs.

1.3.1.1 Augmentation de la variabilité génétique

L'impact génétique le plus direct de l'introduction de nouveaux allèles dans une population est l'augmentation de la variabilité génétique. Comme nous l'avons vu précédemment, l'adaptation à des nouveaux environnements ou à des changements d'environnement par l'intermédiaire de la sélection ne peut se faire efficacement qu'avec une variabilité génétique suffisante. L'apport de nouveaux allèles ou de nouvelles combinaisons d'allèles permet donc d'augmenter le potentiel évolutif de la population.

1.3.1.2 Effets d'hétérosis

Des études expérimentales ont montré que l'hétérosis pouvait conduire à des invasions rapides dans des populations consanguines d'animaux (Saccheri and Brakefield, 2002; Ebert *et al.*, 2002) et de plantes (Richards, 2000).

L'hétérosis peut se définir à deux niveaux :

- au niveau individuel : en comparant la descendance d'un croisement à ses deux parents
- au niveau populationnel : en comparant les descendance issues d'autofécondation, d'allofécondation au sein de la population et d'allofécondation avec des migrants.

Au niveau individuel, deux mesures de d'hétérosis existent (Springer and Stupar, 2007) :

- la différence entre la moyenne des deux parents et la valeur du descendant
- la différence entre la plus haute valeur des parents et la valeur du descendant (aussi appelée "hétérosis du sélectionneur" (Gallais, 1990)).

Au niveau populationnel, l'hétérosis intra-population se mesure de la façon suivante :

$$H_{intra} = \frac{w_{alof} - w_{autof}}{w_{autof}} \quad (1.1)$$

avec w_{alof} la viabilité moyenne des descendants issus d'allofécondation intra-population et w_{autof} la viabilité moyenne des descendants issus d'autofécondation. Pour caractériser l'impact de l'hétérosis dans le cas du sauvetage génétique, on peut définir

l'hétérosis inter-populations de la façon suivante :

$$H_{inter} = \frac{w_{allop.inter} - w_{allop}}{w_{allop}} \quad (1.2)$$

avec $w_{allop.inter}$ la viabilité moyenne des descendants issus d'allopécroisements avec une population différente.

Les deux mécanismes génétiques principaux à l'origine de l'hétérosis sont la dominance et la super-dominance.

Hétérosis par dominance Dans les petites populations, les mutations délétères peuvent se retrouver à l'état homozygote du fait de croisements entre individus apparentés ou d'autofécondation. Ces mutations sont généralement récessives et l'état homozygote a pour conséquences de faire s'exprimer leur aspect délétère (dépression de consanguinité).

Le fait de croiser ces individus dépréciés par des individus venant d'une autre population et donc n'ayant pas *a priori* les mêmes mutations délétères au même locus a pour conséquence le retour à l'état hétérozygote de ces mutations. Comme elles sont généralement récessives, c'est l'allèle viable qui s'exprime et donc la valeur des descendants hétérozygotes est plus élevée que la valeur des parents homozygotes.

Le terme "dominance" désigne la dominance de l'allèle sauvage viable face à la récessivité de l'allèle muté délétère.

Cet effet d'hétérosis entre population par dominance a pu être mis en évidence expérimentalement comme par exemple dans des petites populations de *Ranunculus reptans* (Willi *et al.*, 2007). Cet effet persiste dans ce cas sur deux générations et est d'autant plus fort que les populations considérées sont de petites tailles (tailles approchées par la diversité de Nei).

Hétérosis par super-dominance L'hétérosis par super-dominance est le fait que l'état hétérozygote à un locus est supérieur à n'importe quel état homozygote. Cette supériorité est le produit des interactions alléliques aux locus hétérozygotes.

Un cas particulier de super-dominance est la super-dominance marginale (Galais, 1990). Dans ce cas, l'hétérozygotie est avantageuse dans un contexte d'environnement variable dans le temps et dans l'espace. Soit un allèle $A1$ favorable dans un milieu $E1$ et un allèle $A2$ favorable dans un milieu $E2$. Dans chaque milieu, c'est la forme homozygote qui est favorisée mais si la population est présente sur les deux milieux conjointement, c'est la forme hétérozygote qui va être favorisée.

Hétérosis par épistasie Les deux précédents mécanismes prenaient en compte uniquement les interactions alléliques au sein d'un même locus. Des interactions entre locus appelées *épistasie* existent dans le génome. L'état hétérozygote à un locus peut conférer une plus grande viabilité du fait des interactions qu'il engendre avec d'autres locus. Cette composante dans la valeur des hybrides a été mise en évidence par Lynch à l'aide d'un modèle théorique de la décomposition des effets génétiques lors d'un croisement entre deux populations (Lynch, 1991).

Le potentiel effet positif du sauvetage génétique a souvent été discuté dans la littérature (voir la revue Tallmon *et al.* (2004)) mais peu d'études l'ont réellement appliqué à des populations naturelles et en ont observé les conséquences. Madsen *et al.* (1999) l'ont appliqué à des populations consanguines de vipères et Vila (2003) à des populations scandinaves de loups. Dans les deux cas, la taille de la population cible a augmenté très rapidement, en une ou deux générations, malgré le faible nombre de migrants utilisés (respectivement 20 et 1). De même, Newman and Tallmon (2001) ont montré que la migration augmentait la viabilité de populations expérimentales de *Brassica campestris*.

Les applications réelles du sauvetage génétique restent cependant rares à cause du risque de dépression hybride qu'il peut entraîner (Tallmon *et al.*, 2004; Edmands, 2007).

1.3.2 Aspects négatifs du sauvetage génétique : la dépression hybride

La dépression hybride est le fait que les descendants issus de croisements entre des individus divergents génétiquement possèdent une viabilité plus faible que leurs parents.

1.3.2.1 Mise en évidence expérimentale de la dépression hybride

L'étude de croisements expérimentaux entre populations est la méthode la plus courante pour mettre en évidence la dépression hybride (Edmands, 2007). Plusieurs études expérimentales de croisements ont été menées sur des populations fragmentées et ont mis en évidence de la dépression hybride pour des croisements inter-

population (Fischer and Matthies, 1997; Waser *et al.*, 2000; Galloway and Etterson, 2005; Willi and Buskirk, 2005).

1.3.2.2 Mécanismes génétiques à l'origine de la dépression hybride

Dans certains cas particuliers, la dépression hybride ne s'explique pas par des mécanismes génétiques. C'est le cas par exemple de la guêpe du figuier : son interaction avec la bactérie *Wolbachia* est l'unique source de dépression hybride chez cet insecte (Greeff *et al.*, 2009). Dans d'autres cas, la dépression hybride peut être la conséquence de rupture d'interactions nucléo-cytoplasmiques positives comme l'ont montré Galloway and Etterson (2005) au sein d'une même espèce.

Cependant, dans la plupart des cas la dépression hybride trouve son origine dans deux mécanismes principaux (Schierup and Christiansen, 1996) :

- le mécanisme “écologique” qui est aussi appelé l'effet “dilution” : dans le cas où les populations sont adaptées localement, l'introduction d'allèles migrants non adaptés conduit à une diminution de la valeur sélective (?)
- le mécanisme “génétique” qui est aussi appelé “incompatibilité génétique” : des interactions épistatiques positives présentes dans la population peuvent être cassées par le croisement et que des interactions épistatiques nouvelles peuvent avoir un effet négatif (Lynch, 1991).

L'impact de ces deux mécanismes n'est pas le même au cours des générations après le croisement. L'importance de l'un ou de l'autre dépend notamment de l'architecture génétique des composantes de la valeur sélective et du régime de reproduction.

Temporalité du mécanisme “écologique” L'importance du mécanisme écologique est bien sûr lié à l'importance de l'adaptation locale des populations étudiées.

Dans le cas purement additif, c'est à dire où il n'y a pas de relations de dominances entre les allèles résidents et les allèles migrants, le mécanisme écologique apparaît dès la première génération de croisements et persiste ensuite au cours des générations.

Si des relations de dominances existent, le sens de celle-ci va déterminer la génération d'apparition de ce mécanisme. En effet si les allèles migrants sont récessifs, il faudra attendre la deuxième génération de croisement afin qu'ils puissent être à l'état homozygote et observer de la dépression hybride. A l'inverse, si les allèles migrants

sont dominants, la composante “écologique” de la dépression hybride sera la plus forte à la première génération.

Temporalité du mécanisme “génétique” L’apparition de la composante génétique de la dépression hybride est fonction du régime de reproduction de l’espèce considérée.

Dans les populations allogames où l’hétérozygotie est fréquente, des complexes de gènes impliquant des relations d’épistasie dominance par additive peuvent être sélectionnés. La composante de dominance de ces complexes peut être cassée dès la première génération de croisement ce qui conduit à de la dépression hybride du fait du mécanisme génétique (Lynch, 1991; Escobar *et al.*, 2008).

Au contraire, dans les espèces autogames, où l’homozygotie est fréquente, des complexes de gènes sélectionnés par épistasie additive par additive sont principalement mis en évidence (Goldringer *et al.*, 1997). Au cours de la première génération de croisements, ces complexes d’épistasie additive par additive ne sont pas cassés et donc la contribution de la composante épistatique dans la dépression hybride n’est pas supposée être très importante dans les espèces autogames.

Cependant, les résultats observés sur des expérimentations sur plusieurs générations ne sont pas toujours cohérents avec les attendus théoriques. Willi *et al.* (2007) a montré que pour des petites populations, les effets positifs de croisements entre populations persistaient à la deuxième génération. Edmands (1999) montre que les valeurs de chacune des trois générations de descendances de croisement qu’elle a étudiées ne sont pas forcément reliées aux valeurs des autres générations : hétérosis en première génération, dépression hybride en deuxième génération et l’un ou l’autre en troisième génération. Enfin, Fenster and Galloway (2000) mettent en évidence une variabilité de réponses au bout de 3 générations de croisements au sein de la même espèce allant de l’hétérosis entre populations éloignées à la dépression hybride en passant par un retour aux valeurs phénotypiques parentales. Enfin, sur la même espèce, Erickson and Fenster (2006) ont montré qu’une diminution de la fitness en deuxième génération pouvait être suivie d’un retour à la valeur observée en première génération à partir de la sixième génération. Ils ont aussi mis en évidence le rôle de l’épistasie dans cette réponse.

La contribution de la sous-dominance peut, quant à elle, être relativement plus importante dans les espèces autogames en première génération. En effet, l’auto-gamie conduisant principalement à des génotypes homozygotes, les croisements ont

pour conséquences de mettre à l'état hétérozygote tous les locus polymorphes ce qui peut potentiellement conduire à des mécanismes de sous-dominance. Dans les espèces allogames, les locus étant principalement hétérozygotes, on peut supposer que la sélection a éliminé les combinaisons qui présentaient de la sous-dominance. Ce phénomène reste cependant rare et seuls [Ritland and Ganders \(1987\)](#) le mettent en évidence à plusieurs loci chez *Mimulus guttatus*.

1.3.3 Notion de distance optimale de croisement

[Waser and Price \(1989\)](#) furent les premiers à proposer l'existence d'une distance optimale de croisement en fonction de la distance géographique séparant les parents. Ils ont montré que le taux de survie et la longévité de la descendance au sein de l'espèce *Ipomopsis aggregata* étaient maximales pour une distance géographique de 10 m à l'aide d'un dispositif de croisements entre populations distantes de 1 à 100 m.

Dans son modèle, [Lynch \(1991\)](#) décompose la valeur génétique de deux populations et des descendances de croisement sur deux générations en effets additifs, de dominance et d'épistasie additive par additive, dominance par additive et dominance par dominance. Dans son modèle, la différence entre la valeur sélective des parents et celle des descendants augmente avec la distance séparant les parents et diminue ensuite conduisant effectivement à un optimum. Ces deux phases ont pour principale origine les changements d'importance relative des effets de dominances (supposés positifs) par rapport aux effets d'épistasie additifs par additifs (supposés négatifs) en fonction de la distance entre les deux populations parentales.

Les expérimentations de croisements conduisent à des résultats relativement variables selon les cas. [Willi et al. \(2007\)](#) montrent que la distance de croisement n'a pas d'influence sur l'hétérosis pour des petites populations. Dans ce cas, il n'y a pas de dépression hybride. Sur la même espèce, *Ranunculus reptans*, [Willi and Buskirk \(2005\)](#) montrent de la dépression hybride pour des distances génétiques élevées. Cependant cette dépression hybride concerne des croisements inter-spécifiques, les mécanismes en jeu peuvent être différents. [Edmands \(1999\)](#) met en évidence une distance optimale de croisement mais uniquement dans les descendances de deuxième génération tandis que [Fenster and Galloway \(2000\)](#) trouve de la dépression hybride mais sans relation avec la distance de croisement.

Afin de prendre en compte tous les aspects du sauvetage génétique, deux composantes de la migration doivent être prises en compte : d’une part la “qualité” des migrants dont nous venons de discuter et d’autre part la quantité de migrants apportés dans la population cible.

1.3.4 Gérer la quantité de migrants pour le sauvetage génétique

La migration réalisée au cours du sauvetage génétique peut se séparer en deux composantes : la “qualité” des migrants et la quantité des migrants. La première composante englobe les aspects concernant la population d’origine, la distance génétique la séparant de la population cible. Cette composante peut-être abordée par des expériences de croisements entre populations, c’est le coeur de la problématique de cette thèse. Nous n’allons pas étudier spécifiquement la composante de la quantité de migrants dans cette thèse. Elle a cependant son importance et est étudiée principalement par des approches de modélisation.

La plupart des modèles utilisent un modèle prenant en compte uniquement la présence de mutations délétères contre-sélectionnées selon le modèle expliqué dans la partie 1.2.1 de l’*Introduction*. L’impact de la migration dans les métapopulations est directement mesuré par le niveau de structuration. La structuration (et donc une faible migration) peut avoir un effet positif sur la purge du fardeau génétique (Whitlock, 2002) mais uniquement pour des niveaux intermédiaires. En effet, une trop forte structuration (donc une très faible migration) peut avoir des effets négatifs sur la viabilité (Theodorou and Couvet, 2006; Jaquiéry *et al.*, 2009).

Un optimum est donc aussi nécessaire pour la quantité de migrants. Ce résultat a été traduit en génétique de la conservation en une “règle” : la règle du “un migrant par génération” (OMPG (Wang, 2004)). Cette règle est basée sur les travaux de Wright (1931) sur la structuration des populations. Il montre que le niveau de structuration idéal pour permettre la différenciation des populations (par adaptation locale par exemple) tout en évitant la fixation d’allèles dans les populations est de 20% (mesuré par le F_{ST}). Dans un modèle en îles, ce niveau de structuration correspond à une migration dite “efficace” (produit du taux de migration par la taille des populations, Nm) de 1 d’où la règle de un migrant par génération. Wang (2004) discute les différentes modifications à apporter à cette règle pour l’adapter

aux différents contextes de gestion des populations naturelles.

Peu de modèles prennent en compte l'adaptation locale dans les métapopulations pour poser la question des conséquences de la migration. Du fait du mécanisme "écologique" conduisant à de la dépression hybride, la migration est supposée avoir des conséquences négatives en présence d'adaptation locale. [Lopez *et al.* \(2009\)](#) mettent ces attendus en évidence en utilisant des simulations de métapopulations en incluant de l'adaptation locale. Dans cette étude, ils montrent que plus le nombre de locus impliqués dans l'adaptation locale augmente plus la migration a un effet négatif sur la valeur sélective des populations. Ils montrent en parallèle l'effet positif de la migration dans la purge du fardeau génétique. [Alleaume-Benharira *et al.* \(2006\)](#) simulent des populations disposées sur un gradient environnemental. Dans cette étude, la migration a des conséquences positives même en présence d'adaptation locale car elle permet de contrecarrer les effets négatifs de dérive génétique. Il faut souligner que ces effets sont particulièrement forts dans cette étude du fait d'un modèle démographique particulier et que les migrations se faisant entre demeures proches au niveau environnemental, elles apportent peu de génotypes vraiment mal-adaptés.

1.4 Présentation du projet

Bien que la sélection humaine consciente soit évitée dans les populations de blé en gestion dynamique, les populations évoluent sous l'influence de la sélection naturelle liée par exemple aux contraintes climatiques. De plus, les tailles démographiques manipulées sont supposées éviter au maximum les effets de dérive génétique mais les estimations de taille efficace à partir de marqueurs neutres montrent que les populations sont tout de même soumises à cette deuxième force évolutive. Enfin bien que l'échelle de temps soit petite, les grandes tailles démographiques permettent à des mutations d'apparaître au fil des générations. Les populations de GD sont donc soumises à ces trois forces évolutives (sélection, dérive, mutation), la migration étant quant à elle absente du système.

Le système de gestion dynamique fonctionne donc comme une métapopulation ce qui le rapproche du fonctionnement d'une espèce fragmentée ou bien d'un système d'échange de semences par exemple. Les dangers liés à la fragmentation et à la petite taille de population peuvent donc exister pour les populations de GD à plus ou moins long terme : perte de viabilité à cause d'une perte de potentiel adaptatif,

de la dépression de consanguinité et d'une augmentation du fardeau génétique.

Ces populations de GD constituent donc un dispositif de choix pour étudier l'impact du sauvetage génétique dans les populations structurées.

Nous avons, dans un premier temps, cherché à estimer l'importance de l'adaptation locale sur des caractères liés à la valeur sélective dans le dispositif de GD à l'aide d'expérimentations de transplantations entre les différentes populations. La relation entre l'adaptation locale et les contraintes climatiques a aussi été abordée. Cette étape préliminaire est importante dans le cadre du sauvetage génétique pour deux raisons : d'une part, elle peut permettre de prévoir d'éventuels effets négatifs de la migration liés au mécanisme écologique et d'autre part, elle permet d'apporter des éléments de réflexion pour trouver un optimum de migration afin de renouveler le potentiel évolutif sans remettre en cause les adaptations locales existantes. Ensuite, nous avons étudié comment la structuration et la sélection divergente liée à l'adaptation climatique pouvaient influencer la diversité d'un gène majeur *VRN-1* impliqué dans la précocité de floraison. Nous avons aussi analysé comment ce gène se comportait en croisement. Enfin, un dispositif de croisement intra et inter-populations sur deux générations dont la deuxième génération a été évaluée sur les sites d'origine des populations a été analysé. Ce dispositif de croisement nous a permis de savoir dans quelle mesure le sauvetage génétique avait des conséquences négatives ou positives dans notre dispositif.

Matériel et Méthodes

2.1 Matériel végétal

2.1.1 Conduite des populations de Gestion Dynamique

Les populations de Gestion Dynamique sont issues du croisement pyramidal de 16 lignées de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) représentant une base génétique large (Thomas *et al.*, 1991; Goldringer *et al.*, 2006). Les graines obtenues à partir de ce croisement pyramidal ont été semées et récoltées en mélange pendant 3 générations afin d'augmenter la quantité de graines disponibles. Cette population composite, appelée G0, a été utilisée comme population initiale du système de Gestion Dynamique (Figure 2.1). En 1984, des échantillons de la G0 ont été semés sur 7 sites en France : Châlons-sur-Marne, Le Moulon, Montreuil-Bellay, Nérac, Rennes, Toulouse et Vervins (Figure 2.2). Ces sites présentent des conditions environnementales contrastées notamment au niveau du climat. Depuis, chaque population a été conduite chaque année sans aucune sélection humaine consciente. Tous les ans chaque population est entièrement récoltée en mélange et un échantillon au hasard est utilisé pour produire la génération suivante. Au moins 5000 graines sont plantées dans une parcelle de 100 m² isolée d'autres cultures de blé tendre pour éviter les flux de gènes. Dans chaque site, 2 conduites culturales sont appliquées et définissent deux populations différentes au sein d'un même site : une conduite dite Intensive et une conduite dite Extensive. La conduite Intensive calque les conduites habituellement utilisées pour le blé dans la zone considérée. La conduite Exstensive diffère de la conduite Intensive sur 2 points :

- aucun traitement pesticide n'est appliqué

- le tiers de la dose habituelle d'azote est apporté uniquement.

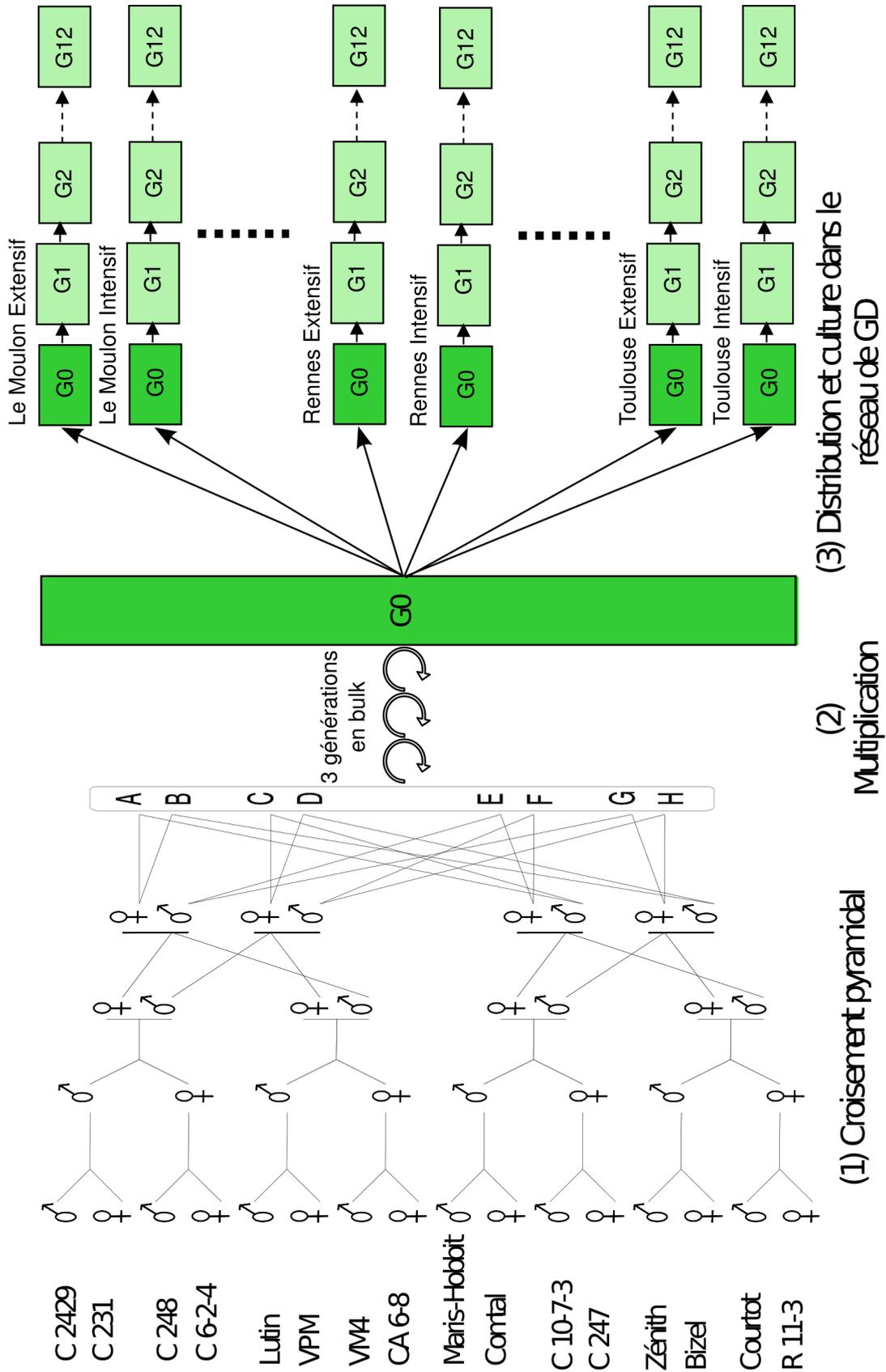


Figure 2.1: Les différentes étapes de la constitution des populations de GD : (1) 4 générations de croisement pyramidal des 16 lignées parentales; (2) 3 générations de multiplication en fécondation libre des semences; (3) distribution de la populations G0 dans les différents sites et cultures en isolement (seules les populations étudiées dans la thèse sont représentées).

Au cours des 25 ans pendant lesquels ces populations de GD ont été étudiées, certaines ont été abandonnées faute de financement par exemple et certaines ont été plus étudiées que les autres comme par exemple Le Moulon, Rennes, Vervins et Toulouse (Paillard *et al.*, 2000b; Goldringer *et al.*, 2006; Rhoné *et al.*, 2008). La population de Vervins a montré des résultats surprenants du fait potentiellement d'effets de goulots d'étranglements au cours de son histoire (Rhoné, 2008). Cette population n'a pas été utilisée dans cette thèse.

Au cours de cette thèse, nous allons donc les populations de 3 sites géographiques, Le Moulon, Rennes et Toulouse afin de disposer de populations ayant évolué dans des milieux contrastées. Les deux conduites culturelles différentes dans chaque site définissent 6 populations différentes (cf. Tableau 2.1).

	Le Moulon	Rennes	Toulouse
Conduite Extensive	ME	RE	TE
Conduite Intensive	MI	RI	TI

Table 2.1: Dénomination des 6 populations étudiées selon le site d'origine et la conduite culturelle.

2.1.2 Schéma de croisement

Afin de comprendre l'impact de potentielles migrations dans un système de populations structurées, des croisements ont été effectués à différents niveaux. Le blé étant une espèce hermaphrodite, pour effectuer des croisements, les plantes sont considérées soit comme femelles et sont castrées ou alors comme mâles et seul leur pollen est utilisé. Tous les parents des croisement étudiés au cours de cette thèse ont été échantillonnés dans les populations de GD à la 12^{ème} génération. Entre 30 et 38 plantes furent échantillonnées dans les 3 populations extensives pour servir de femelles et entre 32 et 38 plantes furent échantillonnées dans les 6 populations pour servir de mâles pour les croisements. Les plantes mâles des populations extensives n'étaient pas les mêmes que les plantes femelles.

Pour chaque femelle, 5 types de croisements différents ont été effectué (1 croisement par épi) (Figure 2.3) :

- une autofécondation (SELFing, SELF)
- un croisement avec un mâle de la même population (Within-Population Cross, WPC)

- un croisement avec un mâle de la population intensive du même site géographique (Within-Site Cross, WSC)
- un croisement avec un mâle de chaque population extensive des deux autres sites (Between-Population Cross, BPC)
- un croisement avec la variété 'Piko' (PIKO).

L'objectif du dernier croisement est de tester un croisement avec un génotype éloigné des populations de GD. 'Piko' est une variété allemande inscrite en 1994. Elle n'est pas apparentée aux 16 parents utilisés pour créer les populations de GD. Du fait de la diversité importante estimée à l'aide des microsatellites (cf. *Génotypage des parents des croisements* dans ce chapitre) au sein des populations de GD, la variété 'Piko' partage des allèles avec ces populations. Cependant, 2 locus microsatellites présentent des allèles propres à 'Piko' que nous n'avons pas échantillonner dans les populations de GD et l'AFC réalisée sur ces locus montre que 'Piko' se différencie des populations de GD (données non montrées).

Des autofécondations ont aussi été réalisées sur les plantes mâles des populations intensives afin d'avoir des graines de des individus en quantité suffisantes. Ces croisements ont été fait au printemps 2003 et les graines produites ont été récoltées au cours de l'été 2003.

Chaque épi d'une plante mère a produit ce que nous allons appeler par la suite une famille. Le nombre total de familles ainsi produites est 624 : 104 pour le type SELF, 104 pour WPC, 104 pour WSC, 208 pour BPC et 104 pour PIKO.

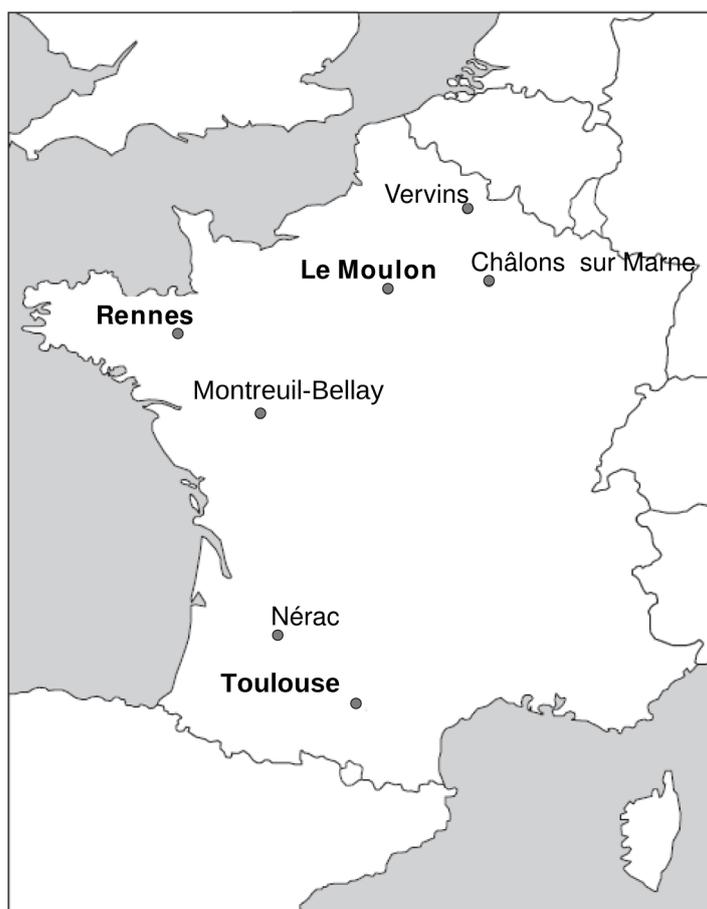


Figure 2.2: Carte de France avec les 7 sites dans lesquels ont été implantées les populations de Gestion Dynamique en 1984. Les sites écrits en gras sont ceux étudiés dans cette thèse.

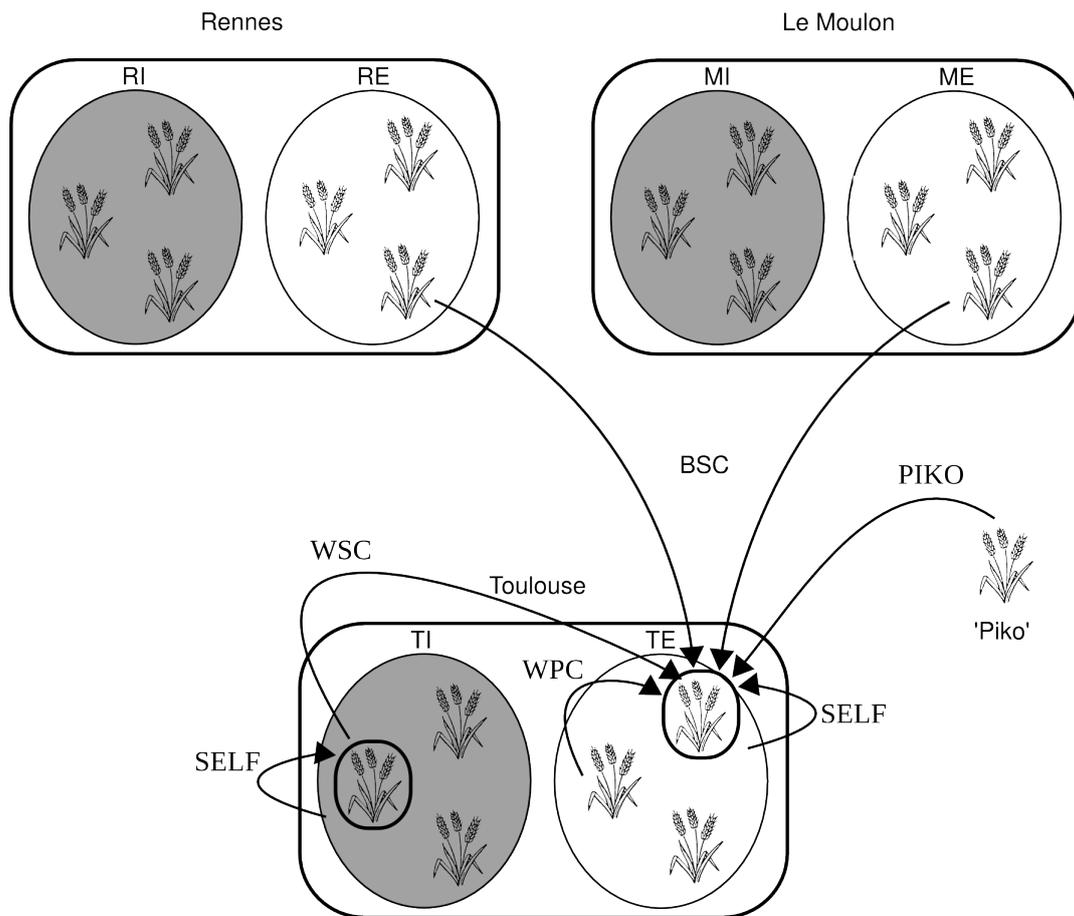


Figure 2.3: Schéma de croisements. Chaque flèche représente un croisement effectué sur la plante femelle prise comme exemple dans TE qui est encadrée. Les rectangles arrondis représentent les 3 sites géographiques et les ellipses les deux populations au sein de chaque site : l'extensive en blanc et l'intensive en grisé.

2.2 Dispositif expérimental pour la caractérisation des descendances

Le dispositif expérimental s'étalant sur 2 ans avait pour but de mesurer les caractères phénotypiques suivant : hauteur de la plante, nombre d'épis par plante, nombre de grains par plante, nombre de grains par épi, poids de grains par plante et poids de mille grains. La précocité de floraison a aussi été mesurée, les détails de cette dernière mesure sont expliqués dans la partie *Material and Methods* de l'article du chapitre 3.

2.2.1 Première génération

Les descendances issues directement des croisements réalisés en 2003 sont appelées première génération. Elles ont été semées uniquement sur le site du Moulon en octobre 2006 dans un dispositif comportant deux répétitions. Les mesures phénotypiques ont été faites soit pour chaque plante individuellement pour la répétition 1 soit en moyenne sur l'ensemble de chaque famille pour la répétition 2. Les détails du dispositif sont expliqués dans la partie *Material and Methods - Phenotypic evaluation* de l'article du chapitre 5.

Afin de produire la seconde génération, des autofécondations ont été faites sur 3 épis de 2 plantes pour chaque famille dans la répétition 1 au cours du printemps 2007.

2.2.2 Deuxième génération

Les descendances issues des autofécondations faites sur la première génération sont appelées deuxième génération. Elles ont été semées en octobre 2007 sur les trois sites géographiques d'origine des populations étudiées : Le Moulon, Rennes et Toulouse. En plus des descendances des autofécondations de la première génération, des individus de la variété 'Piko' et les parents mâles des populations intensives ont aussi été semés. Dans chaque site, 2 répétitions complètement randomisées ont été mises en place. A Rennes et à Toulouse, les notations ont été faites en moyenne pour chaque famille dans les 2 répétitions. Au Moulon, comme pour la première génération, les notations se sont faites soit individuellement pour la première répétition soit en moyenne pour chaque famille pour la répétition 2. Les détails du dispositif sont expliqués dans la partie *5.3.1. Matériels et Méthodes* du chapitre 5.

2.3 Génotypage des parents des croisements

Le tableau 2.2 donne les effectifs des échantillonnages fait dans chaque population.

Populations	Effectif
ME	67
MI	32
RE	70
RI	36
TE	76
TI	36

Table 2.2: Effectifs des échantillons pour les 6 populations étudiées

2.3.1 Marquage microsatellite

Le marquage microsatellite a été fait à l'aide de 20 marqueurs microsatellites repartis sur 20 des 21 chromosomes du blé tendre. Les positions des marqueurs sont représentés sur la figure 2.4. Le détail du marquage est dans la partie *Material and Methods - Genotyping of the parents of the crosses* de l'article du chapitre 5.

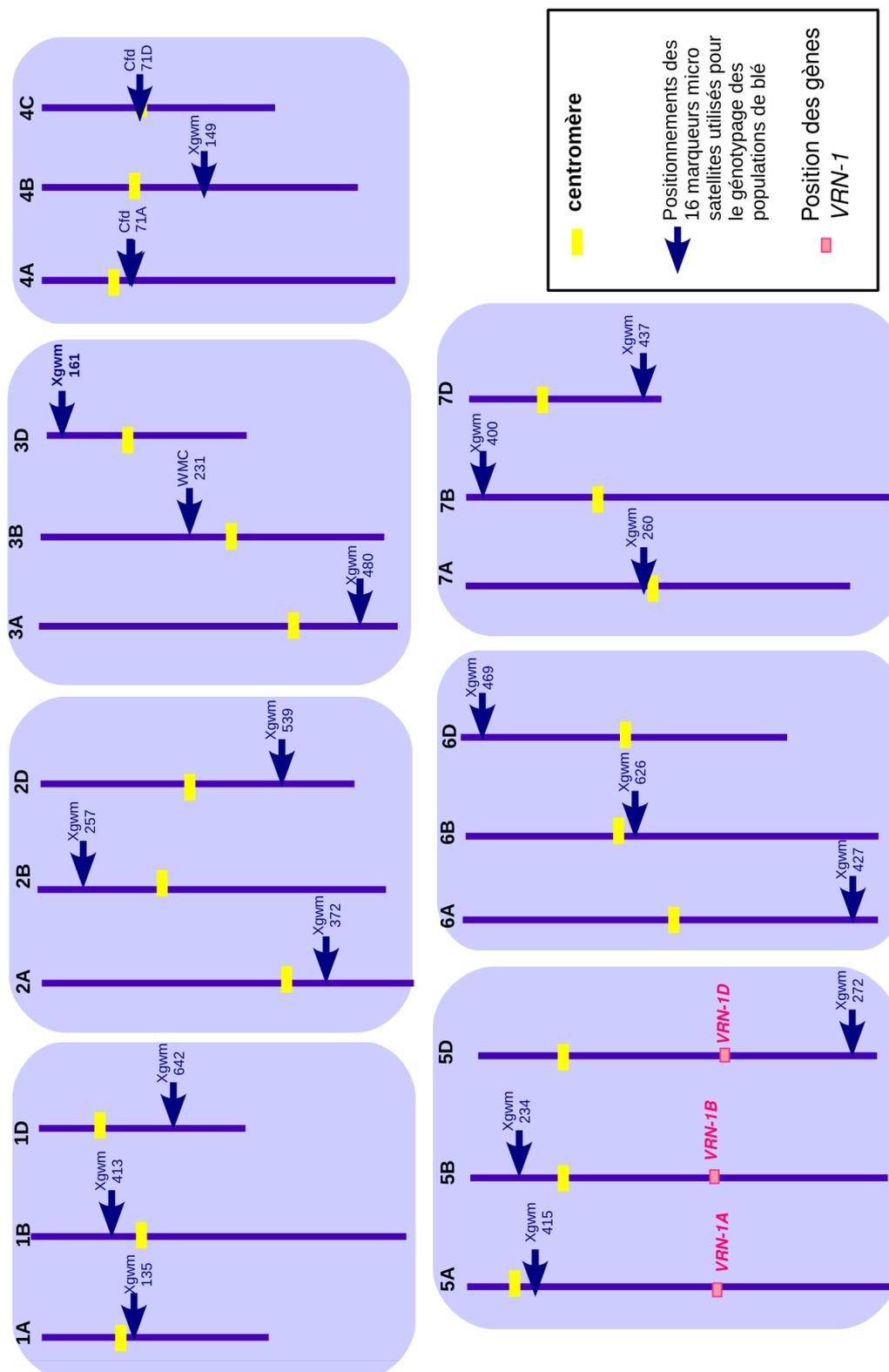


Figure 2.4: Positionnement des 20 marqueurs microsatellites et des 3 locus *VRN-1* sur les 21 chromosomes du blé tendre (d'après Somers *et al.* (2004), site internet graingenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>)).

2.3.2 Génotypage des gènes *VRN-1*

Le blé tendre est hexaploïde, *VRN-1* est présent sur les 3 génomes. Les 4 polymorphismes étudiés dans cette thèse sont les suivant :

- un polymorphisme de duplication, insertion et délétion dans le promoteur du gène *VRN-1* (note *VRN-1A_{prom}* par la suite), révélée par Yan *et al.* (2004),
- une substitution dans l'exon 7 de *VRN-1A* (*VRN-1A_{ex7}*), révélé par Yan *et al.* (2004) Sherman *et al.* (2004),
- une délétion de 4kb dans le premier intron de *VRN-1B* (*VRN-1B_{int1}*) et dans le premier intron de *VRN-1D* (*VRN-1D_{int1}*), toutes deux révélées par Fu *et al.* (2005).

Le détail du génotypage des gènes *VRN-1* est expliqué dans le Matériel et Méthodes du chapitre 4.

Adaptation locale dans les populations de GD

3.1 Introduction

Dans un ensemble de populations qui évoluent dans des milieux différents, l'adaptation locale peut se définir comme le fait que dans chaque population, les caractères évoluent ayant pour conséquences un avantage de ces populations dans leur environnement local (Kawecki and Ebert, 2004). Ce terme englobe d'une part cet état de certaines populations mais aussi le processus conduisant à cet état. L'adaptation locale est due à de la sélection divergente entre des populations n'évoluant pas sous les mêmes contraintes biotiques et abiotiques.

La présence d'adaptation locale dans une populations structurée a une forte influence sur le succès du sauvetage génétique dans cette population. En effet, si la migration peut permettre de contrer l'effet de la dépression de consanguinité, l'accumulation de fardeau génétique et d'augmenter la variabilité génétique, elle apporte aussi des gènes potentiellement maladaptés et donc peut avoir des effets négatifs sur la viabilité. De plus, l'objectif du sauvetage génétique est d'augmenter le potentiel évolutif tout en préservant les adaptations locales présentes.

L'étude de l'importance de l'adaptation locale dans les populations de GD est donc une première étape permettant de comprendre ensuite les résultats trouvés sur les croisements entre populations et de raisonner les migrations à apporter.

L'adaptation locale a principalement été étudiée pour deux caractères dans les populations de GD : la précocité de floraison et les résistances aux maladies. La

précocité de floraison se structure dans les populations selon un gradient latitudinal (Goldringer *et al.*, 2006). Les populations originaires du Nord de la France étant devenues plus tardives que les populations originaires du sud de la France. Cette structuration peut être reliée aux contraintes climatiques. En effet, les fins d’hivers/débuts de printemps plus froids dans le nord peuvent contre-sélectionner des plantes trop précoces tandis que les étés secs dans le sud peuvent contre-sélectionner des plantes trop tardives.

Dans ce chapitre, nous allons d’abord étudier l’adaptation locale dans les populations de GD par l’approche du contraste $Q_{ST}-F_{ST}$ d’une part et par un dispositif de transplantations réciproques d’autre part. Cette partie est présentée sous forme d’un article en anglais. Dans un deuxième temps, nous étudierons l’impact des croisements sur l’adaptation locale à l’aide de transplantations réciproques de descendances issues de croisements entre les populations de GD. Cette partie nous permettra de voir si les croisements entre populations modifient les adaptations locales présentes dans les populations de GD, ce qui est une question importante dans le contexte de la mise en place du sauvetage génétique. Enfin nous analyserons plus précisément l’importance de la précocité de floraison dans l’adaptation locale des populations.

3.2 Utilisation de différentes approches pour étudier l’adaptation locale dans les populations de gestion dynamique

Using different approaches to test for local adaptation in experimental wheat populations

Yves Rousselle¹, Nathalie Galic¹, and Isabelle Goldringer¹

¹UMR Génétique Végétale, Ferme du Moulon, 91190 Gif sur Yvette

April 6, 2010

Introduction

The term “local adaptation” includes both a pattern of phenotype differentiation and the process leading to this pattern. Populations are often in heterogeneous environments and therefore are submitted to variable natural selection pressures over space. Such divergent selection “should cause each local population to evolve traits that provide an advantage under its local environmental conditions” (Kawecki and Ebert, 2004). This process leads to a special pattern where resident genotypes in each habitat are expected to have on average a higher relative fitness in their local conditions than migrant genotypes. Yet divergent selection is only one of the needed prerequisites for the existence of local adaptation. Local adaptation occurs because different genotypes are favoured in each population. Gene flow prevents differentiation between populations and so prevents local adaptation (Lenormand, 2002). In addition, the realized response to divergent selection, as to any other kind of selection, is positively correlated with amount of genetic variability within each population (Falconer, 1974). The presence of adequate genetic variability, and thus generally the maintenance of an adequate population size, are therefore two important prerequisites for local adaptation to occur (Leimu and Fischer, 2008).

Finding genetic differentiation for fitness related traits in a structured population is not enough to conclude that the population is locally adapted. Indeed, genetic differentiation can arise by genetic drift alone. In order to disentangle the two mechanisms of divergent selection and drift, Spitze (1993) developed a measure, Q_{ST} , of the genetic differentiation of quantitative traits between populations. Making some assumptions, Lande (1992) showed that for neutral quantitative traits, Q_{ST} is equal to F_{ST} , the metapopulation genetic differentiation measure. Comparisons between F_{ST} measured on neutral molecular markers and Q_{ST} measured on quantitative traits have been widely used to detect local adaptation in populations

as reviewed by Leinonen *et al.* (2008). If Q_{ST} for a trait is significantly greater than neutral F_{ST} , this is interpreted as the trait being under divergent selection. Conversely, if Q_{ST} is significantly lower than F_{ST} , homogenous stabilizing selection maintains a constant value of the trait in all the considered populations even though genetic drift occurs.

Another approach to study local adaptation is to explore the phenotypic responses of different populations in their environments of origin compared to other environments. Local adaptation can be seen as a part of the interaction between the genotype and the environment. Many studies have looked for significant genotype by environment interaction ($G \times E$) as an indication of local adaptation (Fritsche and Kaltz, 2000; Campbell and Waser, 2001; Angert and Schemske, 2005; Geber and Eckhart, 2005; Latta, 2009). Yet, evidence of such an interaction is not enough to conclude that populations are locally adapted. To do so, one has to stick more closely to the definition of Kawecki and Ebert (2004) and to test the advantage of a population in its own environment compared to other populations. Two conditions have to be fulfilled in order to conclude that a population is locally adapted: (i) the mean fitness of the population in its own environment has to be greater than its mean fitness in other environments and (ii) its mean fitness in its own environment has to be greater than mean fitness of others populations in this “home” environment. Those two conditions can be tested by a transplant experiment taking into account the resident vs. migrant cases of origin \times habitat interaction in statistical models (Kawecki and Ebert, 2004). However, few studies have used this kind of model (Jakobsson and Dinnetz, 2005; Bischoff *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2007; Raabová *et al.*, 2008) because of the difficulties of transplant experiments of natural populations in natural environments.

Experimental populations evolving in contrasted environments may provide useful material to explore methods for detecting local adaptation. Because they respond to the same evolutionary forces as do natural populations, mostly natural selection and genetic drift, they can therefore be used as a model for studying the mechanisms involved in local adaptation. Here we studied such experimental populations of a self-fertilizing crop species, bread wheat (*Triticum aestivum* L.) that have been grown for 12 generations under dynamic management (DM) in France. Dynamic Management is an evolutionary approach for the conservation of the genetic resources of crop species (Henry *et al.*, 1991; Goldringer *et al.*, 2001). DM aims at maintaining genetic diversity of crop species by growing successive generations of genetically diverse populations in several contrasted environments, without intentional human selection. Previous studies on these populations have shown that populations have diverged for different traits such as disease resistance (Paillard *et al.*, 2000) and earliness (Goldringer *et al.*, 2006) in relation to local conditions.

Flowering time is one major adaptive trait in plants because it determines the environmental conditions of reproduction with respect to climate, herbivory, pathogen pressures and the presence of pollinators (Remington and Purruganan, 2003; Roux *et al.*, 2006). *VRN-1* is a major gene involved in the vernalisation response of bread wheat (Yan *et al.*, 2003, 2004; Fu *et al.*, 2005; Rhoné *et al.*, 2008) and it has been shown that it is under divergent selection in the DM populations in relation to differentiation for flowering time (Rhoné *et al.*, 2010).

In this study, we test whether we can detect local adaptation between 6 populations that have been cultivated for 12 generations under DM by using two different approaches. First, we estimated quantitative genetic differentiation (Q_{ST}) among the populations studied and made comparisons with neutral differentiation (F_{ST}). Second, we analysed a reciprocal transplant experiment done in the DM system in order to actually test whether resident genotypes perform better than migrant ones. We finally studied the relationship between flowering time and growth habit and the other traits studied in order to understand how differentiation of flowering time could be involved in local adaptation.

Materials and Methods

Plant Material

Development of the Dynamic Management populations and sampling

Sixteen nearly homozygous genotypes (referred as “initial lines” hereafter) of *Triticum aestivum* L. representing a wide genetic basis were initially crossed using a pyramidal design (Goldringer *et al.*, 2006). The hybrid seeds obtained were then sown and bulk harvested for three generations of seed multiplication. This composite cross population, G0, was used as the initial population of the DM system. In 1984, seed samples of G0 were distributed to three sites of a French experimental network: Le Moulon (48.4°N, 2.1°E), Rennes (48.1°N, 1.4°W) and Toulouse (43.4°N, 1.3°E) with contrasting environmental conditions. At each site (Le Moulon, Rennes and Toulouse), two methods of cultivation were used: an intensive farming method, where wheat was grown under the conventional management practices for the area, and an extensive farming method, with applications of only one-third of the nitrogen fertilizer used in the intensive method and no fungicide treatments. Hence, in the DM system, a local population is fully described by its site of cultivation and its farming method. Since then, each of the 6 populations has been cultivated every year without any conscious human selection. Each year, the whole plot was harvested in bulk, from which a random sample of at least 5000 seeds was sown in a 100 m² plot isolated from other wheat cultures to constitute the next generation. Migration between populations has been avoided since the begin-

ning (see Goldringer *et al.* (2006) and Rhoné *et al.* (2008) for more details on the populations). Six populations representing the 3 geographical sites and 2 farming methods were used in this study.

Multi-sites phenotypic evaluation

In each population, 20 individuals were sampled and selfed for two generations in order to have enough seed for the multi-site experiment. 120 families were thus obtained and sown in each of the 3 sites of origin (Le Moulon, Rennes and Toulouse) in October 2007 in a two-replicate randomized complete block design (RCBD). For the three sites, in each block, each family was evaluated with a single-row plot of 15 seeds. In the first replicate in Le Moulon, phenotypic measures were recorded on each plant of the row while in all the other replicates only average phenotypic values were recorded for each row.

Six phenotypic traits, related to plant fitness, were measured at maturity during the harvest in summer 2008: plant height (PH), spike number per plant (SNP), kernel number per plant (KNP), kernel number per spike (KNS), grain weight per plant (GWP) and thousand-kernel weight (TKW).

Flowering time was also measured. Because heading date (the emergence of the ear from the flag leaf) is easier to observe in wheat than flowering time (the emergence of the anthers from the spikelet), and because both traits are strongly correlated (White *et al.*, 2008), we recorded the heading date as a proxy for flowering time as it is commonly done in cereal experiments (Andersen *et al.*, 2004). Each individual plant was considered as having flowered when half of the ear had emerged from the flag-leaf. The flowering time of each family was recorded when half of its individuals in the single row plot had flowered. Finally, flowering times were transformed into cumulative degree-days (i.e. the sum of the mean temperature per day) from germination to flowering.

Genotyping and genetic analysis of the sampled individuals

Since these wheat populations are primarily self-pollinating (Enjalbert *et al.*, 1998), genotypes of the sampled individuals were considered to be the same as genotypes of the selfed progeny sown in the multi-site experiment.

Neutral markers and differentiation measures

Total DNA was extracted from each individual sampled in the 6 populations and they were genotyped for 19 microsatellite markers (including a bi-loci marker on 2 chromosomes), microsatellite genotyping is described in Rousselle *et al.*, *in prep.* Differentiation between the six populations was estimated using Weir and Cockerham F-statistics estimator θ (Weir and Cockerham, 1984) implemented in Genetix

3.2. Utilisation de différentes approches pour étudier l'adaptation locale dans les populations de gestion dynamique

(Belkhir *et al.*, 2000) with 1000 permutations used for significance tests.

Major gene of vernalization response *VRN-1*

Bread wheat is an allo-hexaploid species. There were three copies of *VRN-1* (*VRN-1A*, *VRN-1B* and *VRN-1D*), one on each diploid genome. We characterized four polymorphic sites in the gene *VRN-1*: (i) the duplication, insertion and deletion in the *VRN-1A* promoter (denoted *VRN-1A_{prom}* in the following) identified by Yan *et al.* (2004), (ii) a substitution in the 7th exon of *VRN-1A* (*VRN-1A_{ex7}*) identified by Sherman *et al.* (2004), (iii) a 4kb deletion in the first intron of *VRN-1B* (*VRN-1B_{int1}*), and (iv) a 4kb deletion in the first intron of *VRN-1D* (*VRN-1D_{int1}*) identified by Fu *et al.* (2005). Genotyping of the *VRN-1* gene across the three genomes and predictions of the growth habit (winter or spring) based on the multilocus genotypes were done according to Rhoné *et al.* (2008).

Statistical analysis of quantitative traits

In the first replicate at Le Moulon, where measures were done on each plant separately, we thought the position of the plants in the row might influence trait expression due to differences in light exposure, for instance, border effects for plants at the start and end positions. To account for such effects, we corrected phenotypic values of the first replicate in Le Moulon for the position effect (see Rousselle *et al.*, *in prep* for details).

Genetic structure at quantitative traits: Q_{ST} estimations

In order to describe the genetic structure in the 6 populations for the quantitative traits, we used the selfed progeny (20 families for each of the 6 populations) to assess the Q_{ST} statistics (Wright, 1969; Spitze, 1993) as follows:

$$Q_{ST} = \frac{(\hat{\sigma}_B^2(1 + F_{IS}))}{(2\hat{\sigma}_W^2 + \hat{\sigma}_B^2(1 + F_{IS}))} \quad (1)$$

where $\hat{\sigma}_B^2$ is the estimated between-population genetic variance, $\hat{\sigma}_W^2$ the estimated within-population genetic variance and F_{IS} the Wright fixation index. This last statistic was estimated on microsatellite markers using Genetix 4.03 (Belkhir *et al.*, 2000). The within and the between-population genetic variances were estimated separately in the three sites (Le Moulon, Rennes and Toulouse) with the following ANOVA model:

$$Y_{ijk} = \mu + Pop_i + Fam(Pop)_{ij} + rep_k + R_{ijk} \quad (2)$$

where Pop is the random population effect, Fam the random family effect, rep the fixed replicate effect and R the random residual. $\hat{\sigma}_B^2$ was estimated as the

variance associated with the *Pop* effect and $\hat{\sigma}_W^2$ the variance associated with the *Fam* within *Pop* effect.

In order to test whether quantitative genetic differentiation was significantly higher than neutral differentiation, we compared the estimated Q_{ST} to the distribution of presumably neutral F_{ST} values. Because the empirical distribution of F_{ST} values across 20 marker loci was unlikely to provide a good description of the null distribution, we used a simulation approach to predict that distribution as suggested by Whitlock (2008). To do so, we simulated the simultaneous divergence of six isolated populations. From the population-specific estimates of F_{ST} based on the 20 microsatellite markers (Weir and Hill, 2002), we computed the ratios of divergence time over effective population size for each population (Vitalis *et al.*, 2001). We used a coalescent-based algorithm (Hudson, 1991) adapted by Rhoné *et al.* (2010) to specifically simulate gene genealogies in 6 Wright-Fisher populations diverging independently for 12 generations. A total of 500,000 simulations were performed and a P_{value} was calculated as the probability for the simulated F_{ST} values to be greater than or equal to the observed Q_{ST} value. More details on this approach can be found in Rhoné *et al.* (2010).

Transplant approaches

All the families were sown in the 3 geographical sites where the DM populations had been cultivated for 12 generations. Thus our experiment can be viewed as a reciprocal transplant experiment.

$G \times E$ interaction model The first approach tested whether there was an interaction between the genetic origin of the families and the environment where they were evaluated. We tested this interaction in the following ANOVA model:

$$Y_{ijkl} = \mu + Pop_i + site_j + Fam(Pop)_{ik} + (site \times Pop)_{ij} + rep(site)_{lj} + R_{ijkl} \quad (3)$$

where *site* is the fixed geographical site effect and the other effects are the same as in model (2).

Migrants vs Residents analysis The second approach analysed further the *site* by *Pop* interaction by testing whether there was an advantage to be a local resident vs. being a migrant. This kind of analysis was drawn from the two criteria proposed by Kawecki and Ebert (2004) to detect local adaptation.

The first criterion is the “local vs. foreign” criterion, meaning that resident individuals on average should be superior to migrants in their home site. This was

3.2. Utilisation de différentes approches pour étudier l'adaptation locale dans les populations de gestion dynamique

tested with the following ANOVA model:

$$Y_{ijklmn} = \mu + site_i + Pop_j + MR_{k_{ij}} + rep(site)_{li} + Fam(Pop)_{mj} + (MR \times site)_{k_{ij}i} + R_{ijklmn} \quad (4)$$

where all the effects are the same as in the model (3) except for MR that took two possible values for each family in each of the 3 sites: R (resident) when the family is evaluated in its site of origin and M (migrant) in the other cases. This effect tested whether residents were in general superior to migrants. In addition, the interaction effect $MR \times site$ tested, for each site, the first criterion “Are local population different from foreign ones in each site?” The comparison of adjusted means of $(MR \times site)$ indicated whether resident effect was superior to migrant effect in each site.

The second criterion, “home vs. away”, meaning that individuals should better perform on average in their native habitat compared to foreign habitats, was tested by the following ANOVA model:

$$Y_{ijklmn} = \mu + site_i + Pop_j + MR_{k_{ij}} + rep(site)_{li} + Fam(Pop)_{mj} + (MR \times Pop)_{k_{ij}j} + R_{ijklmn} \quad (5)$$

where all the effects are the same as in the model (4). In this model, the interaction effect $MR \times Pop$ tested for any differences of performance for each origin of populations when grown as resident (in their site of origin) compared to when they are grown as migrant (in an other site). The comparison of adjusted means of $(MR \times Pop)$ indicated whether populations were superior as resident than as migrants.

Analysis of the relationship between flowering time and other traits

Because previous results on these populations showed that there was a significant divergence in earliness between populations that have been cultivated in the North and populations cultivated in the South of France (Goldringer *et al.*, 2006), we tried to explore if and how earliness would contribute to local adaptation of these populations. We first analysed the relation between flowering time (FT) in degree-days and the other traits in the following ANCOVA model:

$$Y_{ijk} = \mu + site_i + Pop_j + \alpha \times FT + rep(site)_{ik} + Fam(Pop)_{jl} + \alpha_i \times FT + \alpha_{ij} \times FT + R_{ijklm} \quad (6)$$

where α , α_i and α_{ij} are the FT regression coefficients respectively for the whole model, nested in the *site* effect and nested in the *Pop* by *site* interaction ; all the other effects are the same as in the preceding models.

Secondly, we analysed the effect of the growth habit (winter or spring) determined from the *VRN-1* multilocus genotypes on all the traits including flowering time in the following ANOVA model:

$$Y_{ijklm} = \mu + WStype_i + site_j + Pop_k + (WStype \times site)_{ij} + (WStype \times Pop)_{ik} + (WStype \times Pop \times site)_{ijk} + rep(site)_{mj} + R_{ijklm} \quad (7)$$

where *WStype* was the growth habit effect (Winter or Spring) and the others effects were the same as in the other models.

Results

Q_{ST} - F_{ST} contrast

Global differentiation estimated on microsatellite markers over the six populations ($\theta = 0.08$) was significantly different from zero. All the pairwise differentiation were significantly different from zero except between TE and TI populations ($\theta = 0.01$) indicating spatial differentiation in the DM system. Significant differentiation values ranged from 0.04 (between ME and TI populations) to 0.16 (between MI and RE populations).

In the model (2), the population effect was significant for FT, PH, KNS and TKW in the three sites (Le Moulon, Rennes and Toulouse) and for SNP only in Le Moulon and Rennes. FT, PH and KNS had high Q_{ST} values that ranged from 0.20 for FT in Rennes to 0.33 for PH in Le Moulon, while TKW had lower values that ranged from 0.09 in Le Moulon to 0.19 in Toulouse (Table 1). SNP had the highest Q_{ST} in Rennes (0.38) while differentiation was not significant in Toulouse. In general, except for this trait, Q_{ST} values were rather consistent from one site to the other. Differentiation for these quantitative traits was strong as illustrated by the P_{value} in table 1 showing that Q_{ST} values for these traits were significantly different from F_{ST} estimated with neutral markers. Only Q_{ST} for TKW estimated in Le Moulon was not significantly different from F_{ST} while significantly different from zero. It can be noted that KNP and GWP, which are expected to give the best indication fo fertility component of fitness, never had a significant *Pop* effect due to high level of within-population genetic variation. When the model (2) was applied only to the 3 extensive populations, only FT, PH and KNS showed significant differentiation in the three sites and TKW was only differentiated in Rennes site.

Transplantations

Interaction $G \times E$

In the model (3), the site effect was always strongly significant and the population effect was significant for all traits except for KNP and GWP (Table 2). The interaction effect between population origin and site was significant for only PH and TKW.

	Le Moulon		Rennes		Toulouse	
	Q_{ST}	F_{ST} test	Q_{ST}	F_{ST} test	Q_{ST}	F_{ST} test
FT	0.28***	0.0007	0.20***	0.0067	0.31***	0.0004
PH	0.33***	0.0002	0.31***	0.0004	0.25***	0.0017
SNP	0.13*	0.0592	0.38*	0.0001	0.09	0.21
KNP	0.00	0.9999	0.02	0.95	0.00	0.99
KNS	0.32***	0.0003	0.27**	0.0009	0.31**	0.0004
GWP	0.00	0.9999	0.04	0.75	0.04	0.75
TKW	0.09*	0.21	0.14**	0.04	0.19**	0.0089

Table 1: Quantitative differentiation among selfed progeny of 6 populations evaluated in 3 sites. Q_{ST} for all the traits and P_{value} of the comparison of Q_{ST} and simulated F_{ST} distribution. *: $P_{value} < 0.05$, **: $P_{value} < 0.01$ and ***: $P_{value} < 0.0001$.

3.2. Utilisation de différentes approches pour étudier l'adaptation locale dans les populations de gestion dynamique

Source of variation	d.f.	PH		SNP		KNP		KNS		GWP		TKW	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
Pop	5	24549	8.74***	226	3.84**	69510	0.58	5783	8.65***	225	0.96	1020	3.06*
site	2	63884	835.47***	834	63.27***	3440812	152.56***	7356	102.30***	10370	215.90***	9180	446.81***
Fam(Pop)	114	64482	14.79***	1350	1.80***	2738998	2.13***	1540	3.76***	5377	1.96***	7711	6.58***
site × Pop	10	1148	3.00**	119	1.81	139835	1.24	589	1.64	279	1.16	544	5.30***
rep(site)	3	8133	10.90***	136	6.86**	65158	1.93	897	8.32***	17	0.24	2414	78.31***
Error	548	21525		3613		6134716		19559		13089		5650	
R^2			0.88		0.43		0.52		0.61		0.56		0.79

Table 2: ANOVA table for model (3). *: $P_{value} < 0.05$, **: $P_{value} < 0.01$ and ***: $P_{value} < 0.0001$.

The strong site effect was most often due to high phenotypic values in Rennes and low values in Toulouse. Except for TKW, phenotypic evaluation at Le Moulon always yielded intermediate values. Although there was a significant interaction between population origin and site for PH and TKW, there was no clear pattern of local adaptation (Figure 1).

Migrants vs Residents

The effect of “migrant vs resident” status was significant in models (4) and (5) for PH and TKW. In each case, residents (PH=105.79 and TKW=41.99) had significantly higher values than migrants (PH=104.47 and TKW=40.80). Interaction effects between “migrant vs resident” status and population origin or site were significant only for these traits (Tables 3 and 4). Comparisons between migrant and resident status for these two traits for each population and for each site indicated that the interaction was due to the two Toulouse populations (Figure 2). The two Toulouse populations had higher relative values as residents than as migrants, and for the Toulouse site, resident populations (TE and TI) had relatively higher values than migrant ones (ME, MI, RE and RI). No other resident vs. migrant comparison was significant.

3.2. Utilisation de différentes approches pour étudier l'adaptation locale dans les populations de gestion dynamique

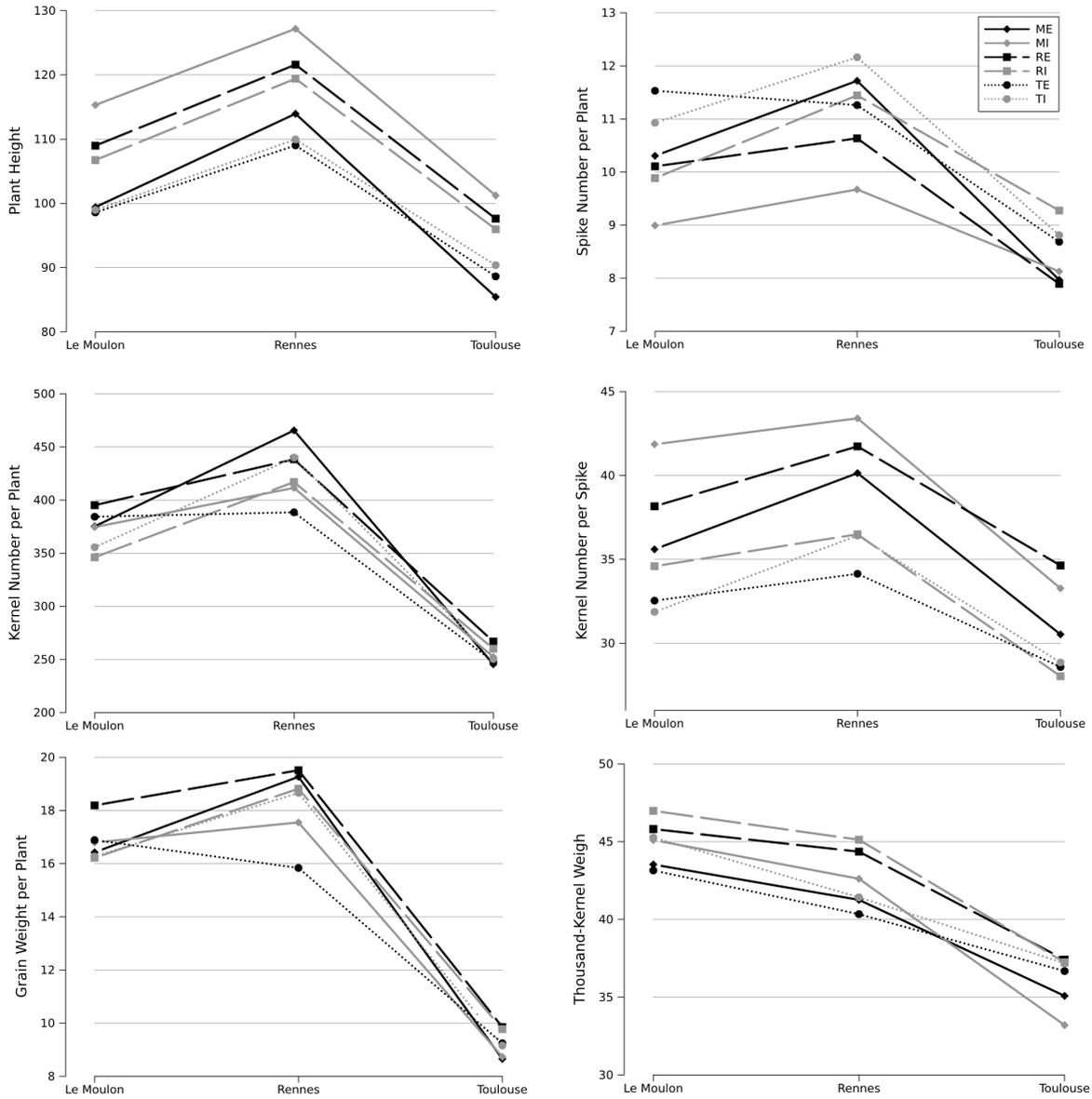


Figure 1: Reaction norms of the 6 population in the 3 sites *i.e.* adjusted means for the $Pop \times site$ effect in model (3). Dart symbols and plain lines represent Le Moulon populations, squares and dashed lines represent Rennes populations and circles and pointed lines represent Toulouse populations. Black lines represent Extensive populations and grey lines Intensive ones.

Source of variation	d.f.	PH		SNP		KNP		KNS		GWP		TKW	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
MR	1	267	6.93**	9	1.29	64	0.01	74	2.04	15	0.63	212	20.03***
site	2	47092	609.49***	733	54.75***	2666767	117.12***	4991	69.06***	7988	165.33***	6541	309.35***
Pop	5	21352	9.30***	189	3.49**	71815	0.67	4643	8.12***	171	0.81	683	2.44*
rep(site)	3	8135	70.19***	140	6.99***	69720	2.03	899	8.29***	17	0.23	2412	76.07***
Fam(Pop)	114	64634	14.68***	1361	1.78***	2737449	2.11***	15432	3.75***	5377	1.95***	7741	6.42***
MR × site	2	404	5.23**	10	0.76	1441	0.06	167	2.31	18	0.37	106	5.02**
Error	570	22020		3714		6273027		14958		13336		6908	
R^2			0.88		0.41		0.51		0.60		0.55		0.78

Table 3: ANOVA table for model (4). *: $P_{value} < 0.05$, **: $P_{value} < 0.01$ and ***: $P_{value} < 0.0001$.

Source of variation	d.f.	PH		SNP		KNP		KNS		GWP		TKW	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
MR	1	226	6.85**	9	1.27	46	0.00	75	2.07	16	0.66	213	20.23***
site	2	37252	480.59***	337	25.09***	1806549	79.03***	4890	67.78***	5561	114.81***	5801	275.54***
Pop	5	19471	8.05***	182	3.28**	50905	0.46	4792	8.03***	169	0.78	816	2.78*
rep(site)	3	8129	69.92***	140	6.96***	69079	2.01	804	8.26***	16	0.22	2410	76.32***
Fam(Pop)	114	64629	14.63***	1360	1.77***	2739993	2.10***	15429	3.75***	5390	1.95***	7739	6.45***
MR × Pop	5	449	2.32*	13	0.37	10844	0.19	310	1.72	57	0.47	163	3.09**
Error	567	21975		3711		6263624		19770		13296		5832	
R^2			0.88		0.41		0.51		0.60		0.55		0.78

Table 4: ANOVA table for model (5). *: $P_{value} < 0.05$, **: $P_{value} < 0.01$ and ***: $P_{value} < 0.0001$.

Relationship between flowering time and other traits

Here we studied the link between FT and growth habit and other traits by introducing FT as a covariate and growth habit as a factor in the ANOVA models for the other traits.

Flowering time in degree-days had a significant effect as a covariable in model (6) for PH, SNP and KNP (Table 5). For these traits, the relationship between flowering time and trait value was negative (-0.08 for PH, -0.02 for SNP and -0.74 for KNP) indicating that genotypes that flowered later were smaller and produced fewer spikes and fewer kernels per plant. The interaction between flowering time and site effects was significant for KNS and TKW. For these two traits, the relationship with flowering time was negative at the Toulouse site (respectively -0.013 and -0.026) while positive at the Le Moulon (respectively 0.028 and 0.010) and Rennes (respectively 0.004 and 0.020) sites. This meant that late genotypes performed poorly in Toulouse while they had more kernels per spike and larger kernels at the 2 northern sites. The three-way interaction between flowering time, site and population origin was significant for PH, SNP and TKW. The relationship between PH and flowering time was always negative for each site - population origin combination, which was consistent with the general negative correlation of flowering time with this trait.

Growth habit had a significant effect on FT, PH and KNS (Table 6). Winter-type progeny flowered later, were smaller and had lower KNS. No significant interaction between site and growth habit was found, probably due to the fact that vernalization occurred in all 3 sites, so growth habit was not influenced by the environment. The interaction of growth habit and population origin had a significant effect on all traits except TKW indicating the influence of the genetic background on growth habit in the different populations. The three-way interaction of growth habit by site by population origin was significant for SNP and TKW and for SNP, trends were the same as those observed for the two-way interactions.

3. Adaptation locale dans les populations de GD

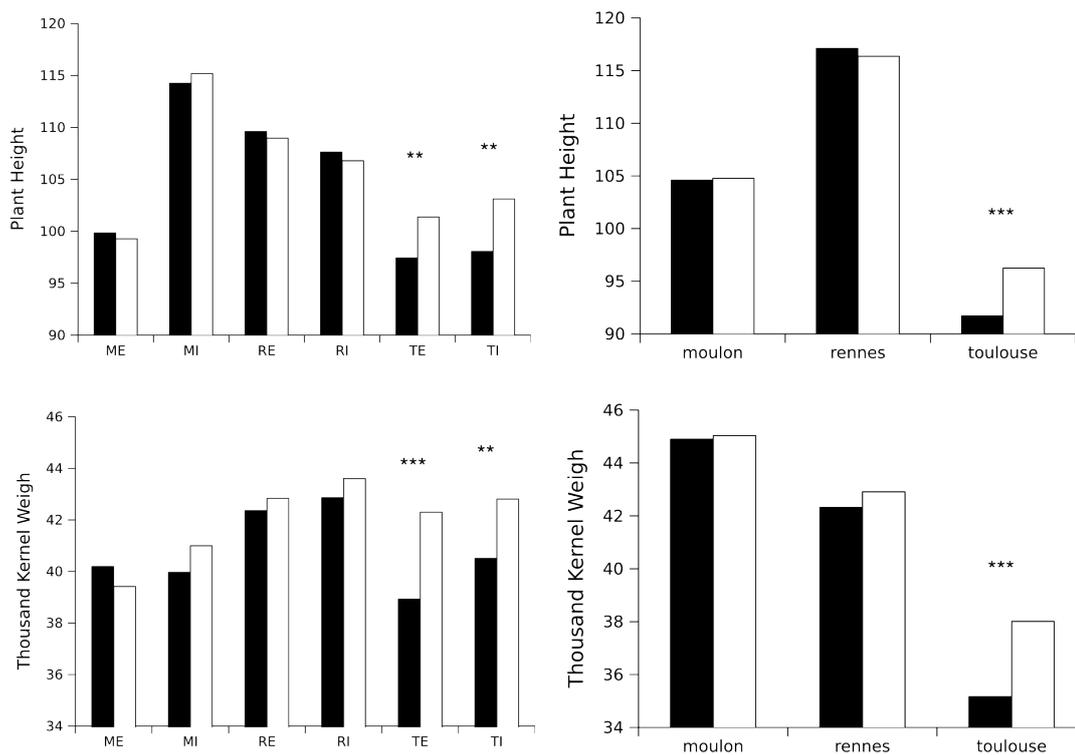


Figure 2: Least-square means for the interaction effects between “migrant vs resident” status and population origin or site for PH and TKW. Black bars are for migrants and white bars are for residents. *: $P_{value} < 0.05$, **: $P_{value} < 0.01$ and ***: $P_{value} < 0.0001$.

3.2. Utilisation de différentes approches pour étudier l'adaptation locale dans les populations de gestion dynamique

Source of variation	PH		SNP		KNP		KNS		GWP		TKW		
	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	
site	2	113	1.56	3	0.26	7720	0.34	302	4.24*	34	0.71	285	14.80***
Pop	5	395	2.18*	79	2.47*	117572	2.10	134	0.75	256	2.16*	80	1.68
$\alpha \times$ FT	1	1102	30.41***	43	6.74**	40581	3.63*	13	0.37	74	3.13	0	0
rep(site)	3	7129	65.55***	150	7.75***	93968	2.80*	605	5.66**	43	0.61	1528	52.85***
Fam(Pop)	114	64661	15.64***	1419	1.92***	2716336	2.13***	14363	3.53***	5365	1.98***	7586	6.90***
$\alpha_i \times$ FT	2	24	0.34	6	0.46	4987	0.22	334	4.69**	49	1.04	351	18.26***
$\alpha_{ij} \times$ FT	15	1210	2.23**	190	1.96*	262350	1.56	532	1.00	503	1.42	282	1.95**
Error	553	20050		6320		12679897		49513		29629		26941	
R^2		0.89		0.45		0.53		0.62		0.57		0.81	

Table 5: ANCOVA table for model (6). *: $P_{value} < 0.05$, **: $P_{value} < 0.01$ and ***: $P_{value} < 0.0001$.

Source of variation	FT		PH		SNP		KNP		KNS		GWP		TKW		
	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	
Wstype	1	44417	18.20***	533	4.41*	1	0.13	24545	1.87	338	6.63**	48	1.82	14	0.72
site	2	1791763	2211.16***	40491	167.48***	544	37.94***	1919462	73.18***	3381	33.17***	5739	107.05***	5129	132.92***
Pop	5	297549	24.39***	23225	38.43***	188	5.24***	71516	1.09	5891	32.12***	369	2.75**	1057	10.96***
Wstype \times site	2	1746	0.36	200	0.83	34	2.41	5567	0.21	142	1.40	9	0.18	83	2.16
Wstype \times Pop	5	64980	5.33***	5240	8.67***	77	2.15*	201184	3.07**	844	3.31**	477	3.56**	188	1.95
Wstype \times site \times Pop	20	42750	0.88	1343	0.56	289	2.02**	347090	1.32	1075	1.06	748	1.40	701	1.82**
rep(site)	3	372212	50.84***	7726	21.31***	112	5.21**	80195	2.04	788	5.16**	21	0.27	2571	44.43***
Error	620	1512986		74585		4320		7855651		30533		16082		11654	
R^2		0.92		0.57		0.26		0.33		0.33		0.41		0.54	

Table 6: ANOVA table for model (7). *: $P_{value} < 0.05$, **: $P_{value} < 0.01$ and ***: $P_{value} < 0.0001$.

3. Adaptation locale dans les populations de GD

	Sites	Populations					
		ME	MI	RE	RI	TE	TI
FT	Tous	W	W	W			
PH			S	W		S	
SNP						W	S
KNP							S
KNS				S			S
GWP						W	S
		Le Moulon	W				S
TKW	Rennes						
	Toulouse	S					

Table 7: Effect of growth habit on traits in interactions with site and population origin effects. Letters (S or W) indicates which growth habit (Spring or Winter) had the highest value.

Winter-type progeny flowered later than spring-type progeny only for some populations in some sites. For instance, we found no differences between spring and winter types in either Toulouse population, while differences were significant in the Le Moulon populations (Table 7). Spring progeny in MI and TE were taller than winter ones in every sites while winter types tend to be taller in RE. Spring-type progeny from TI population had higher values than winter-type ones for all traits, except FT and PH, at at least one of the northern sites (Le Moulon or Rennes).

While early flowering plants of Toulouse populations set larger seeds, there was only a limited advantage of spring types (significant only in the TI population evaluated in Le Moulon) with regard to TKW.

Discussion

Methods for detecting local adaptation

To our knowledge, it is one of the first times that the two different approaches, Q_{ST} - F_{ST} contrasts and transplant experiment were combined, on real data to detect local adaptation. As the transplant experiment approach directly test for the occurrence of local adaptation, we were able to draw conclusions about the efficiency of the Q_{ST} - F_{ST} contrast approach as an exploratory method to detect traits under divergent selection and hence local adaptation as proposed by Whitlock (2008).

Q_{ST} - F_{ST} contrast

Estimations of Q_{ST} are most generally carried on in common-garden experiments where individuals from studied populations are brought back in the lab (Leinonen *et al.*, 2008). However, 9 studies over the 62 reviewed by Leinonen *et al.* (2008)

estimated “ Q_{ST} ” with phenotypic measures done directly on the wild populations in their natural habitat. Pujol *et al.* (2008) and Whitlock (2008) criticized the use of such so called P_{ST} approaches because genetic and non-genetic effects (such as plasticity for example) are confounded in these studies and they both proposed the “lab common-garden” method as the most appropriate solution. However Whitlock (2008) raised two limits concerning common-garden experiments: (i) plasticity could be part of the mechanism of local adaptation and thus assessing Q_{ST} in the lab would not take this mechanism into account and (ii) lab conditions might increase genetic variance and so bias estimations of Q_{ST} . Note that these are two aspects of $G \times E$ interactions. In fact, two levels of approximation make the “ P_{ST} in the wild” approaches deviate from the underlying hypothesis of Q_{ST} - F_{ST} contrast. First, each population is evaluated separately in one environment (its own habitat) and so it is not possible to separate genetic and non-genetic components of the phenotypic variance. Secondly, genetically structured families (selfed, full-sib or half-sib) with replicates are necessary to estimate the additive component of the genetic variance. Some authors who estimate P_{ST} in the wild take into account the first level of approximation by correcting the phenotypic variance by an estimated value of narrow-sense (Sæther *et al.*, 2007) or broad-sense heritability (Wójcik *et al.*, 2006) but it is inaccurate. Thus, we think that these “ P_{ST} in the wild” approaches are not reliable rather due to the experimental design than to the fact that the evaluation sites are the natural habitat of the populations. In this study, all the populations were evaluated in each site of origin in a replicated pure-line family design. In fact, this experimental design can be seen as a replicated “common-garden” experiment: it provided three separate estimations of real Q_{ST} for the same set of populations.

Estimations of Q_{ST} were consistent among the three sites except for SNP which Q_{ST} was higher in Rennes than in the other sites, and for TKW which Q_{ST} was significantly different from F_{ST} distribution only in Rennes and Toulouse sites. Consistency of the three sites estimations of Q_{ST} was not related to a significant site by population interaction. Indeed, PH showed a significant site by population interaction but consistent estimations of Q_{ST} , and SNP showed relative discrepancies in Q_{ST} estimations but no significant site by population interactions. In this experiment, Q_{ST} estimation was quite repeatable for a given set of populations despite the large variance of estimations found for a similar number of populations by Goudet and Büchi (2006). Over the 6 traits tested for local adaptation with the transplant experiment, only PH and TKW showed clear pattern of local adaptation while 4 traits (including PH and TKW) showed significant Q_{ST} . Q_{ST} - F_{ST} contrast can therefore be seen as a good exploratory approach but transplant experiments are necessary to confirm that observed divergent selection has actually led to local adaptation.

Transplant approach

There are many slightly different methods to detect local adaptation in a transplant experiment but the vast majority of these studies test for interactions between genotypes from different populations and the environments where these populations have evolved (Fritsche and Kaltz, 2000; Campbell and Waser, 2001; Angert and Schamske, 2005; Geber and Eckhart, 2005; Latta, 2009). Kawecki and Ebert (2004) proposed a more precise method to test for local adaptation by taking into account the “sympatric” and “allopatric” cases of this $G \times E$ interaction. Very few transplant experiment studies have actually used this approach. A more frequent approach is to directly compare the phenotypic values, even if the authors have tested for environment, population or environment by population interaction effects before performing these comparisons (Jakobsson and Dinnetz, 2005; Ellis *et al.*, 2007). As Kawecki and Ebert (2004) emphasized, if a rich environment has a large effect on the measured trait, this could hide local adaptation. This is also true for a large effect of the population of origin on a trait. Jakobsson and Dinnetz (2005) tried to take these effects into account, but a more integrated approach is to directly account for the “sympatric” and “allopatric” cases of $G \times E$ interactions simultaneously with environment and population simple effects in an ANOVA model (Bischoff *et al.*, 2006; Raabová *et al.*, 2008).

In this study, we found significant $G \times E$ interactions for two traits: PH and TKW. However, because Toulouse was a poorer environment than the two others and because Rennes populations showed higher intrinsic values for these two traits, direct comparisons of populations means in the three environments would not allow to detect for local adaptation. Taking into account a migrant vs resident effect in our models allowed us to detect local adaptation for these two traits in the Toulouse populations, these populations performed relatively better in Toulouse than at the other sites and they perform better in Toulouse relative to migrant populations. The $G \times E$ approach identified traits potentially showing locally adaptation, but did not give us direct tests of local adaptation while the resident vs migrant model allowed to identify the part of interaction corresponding to local adaptation. In conclusion, we suggest to use this kind of model in transplant experiments in order to directly test for local adaptation.

Local adaptation in a DM system

We identified two traits (PH and TKW) for which local adaptation was detected among the experimental wheat populations. While previous studies have shown that populations have diverged for different traits such as disease resistance (Pailard *et al.*, 2000) and earliness (Goldringer *et al.*, 2006), this is the first time that we were able to directly test for local adaptation by a transplant experiment. Lo-

cal adaptation arose in particular for the Toulouse populations compared to the northern populations. Thus since a parallel genetic differentiation was observed between population evolved in the South compared to populations evolved in the North, we thought this might be an expression of climatic adaptation. Divergent selection for flowering time in these populations has been interpreted as a response to climatic constraints (Goldringer *et al.*, 2006) such as dry summers selecting for early genotypes in southern populations and cold springs selecting for late genotypes in northern populations. Studying the relationship between fitness components and flowering time gave us more understanding on how climatic constraints play a role in the local adaptation pattern. In this study, the relationship between flowering time and KNS and TKW was negative in the southern site (Toulouse) and positive in the northern sites (Le Moulon and Rennes). Thus, late plants set more and larger seeds in the North (FT regression coefficient ranged from 0.004 to 0.028) while the earliest plants set more and larger seeds in Toulouse (FT regression coefficient from -0.013 to -0.026). Because seed filling is the last step in wheat development, it is known to be much influenced by heat and the lack of water in early summer (Gooding *et al.*, 2003; Shah and Paulsen, 2003) which correspond to the Toulouse conditions. From that, we inferred that climatic constraint was a selective force favoring increases in the frequency of early genotypes at Toulouse and late genotypes at Le Moulon and Rennes.

The growth habit determined by *VRN-1* genotypes had a significant effect on flowering time only in the two Le Moulon populations and in the Rennes Extensive population. It did not have any effects on flowering time in the Toulouse populations. In northern populations, winter-type genotypes flowered later. As winter-type genotypes still represent a third of the genotypes in the two Toulouse populations (data not shown), we can surmise that selection for earlier genotypes in Toulouse did not tend to eliminate winter-types but rather selected for earlier winter-type by acting on earliness per se instead of on the vernalisation response.

The interaction between population origin and *VRN-1*-based growth habit for flowering time showed that *VRN-1* is interacting with the different genetic background existing in the different populations. Hanocq *et al.* (2007) and Rhoné *et al.* (2010) showed that many regions over the wheat genome are involved in flowering time including *VRN-1*. We can therefore hypothesize that epistatic interactions between *VRN-1* and other genes are involved in flowering time. Interactions between population origin and *VRN-1* showed interesting patterns for PH. Indeed, in two populations (Le Moulon Intensive and Toulouse Extensive) that have evolved in contrasting environments, spring-type genotypes were significantly taller than winter-type genotypes while it was the opposite in the RE population. Genetic linkage between *VRN-1* and plant height QTL seems to be more probable and is confirmed by Kato *et al.* (1999). They particularly showed that *VRN-1A* has a

pleiotropic action on flowering time and plant height.

Finally, it should be acknowledged that we detected more limited indications of local adaptation than what we expected. This was due to a large population effect that hid local adaptation patterns in the $G \times E$ model. The two Rennes populations and the Intensive population of Le Moulon had high TKW values in all sites. This pattern might be explained by the fact that families from those populations were on average taller than the other populations at all sites. In our experimental design, all the families were randomized regardless to their population of origin. This might could have led to competition between families from different populations which hid local adaptation pattern. Randomizing families only within population origins in the experimental design might be a better solution in order to evaluate plants in a more similar competition context as where they had been evolving. On the other hand, if we would like to use these results to draw conclusions about the potential advantage of genetic rescue in our system, this experimental design with between-populations competition allowed us to evaluate potential migrants in a competition context closer to what they would face in a foreign population.

References

- Andersen, C. H., Jensen, C. S. and Petersen, K. (2004) Similar genetic switch systems might integrate the floral inductive pathways in dicots and monocots. *Trends in Plant Science*, 9:105–107.
- Angert, A. L. and Schemske, D. W. (2005) The evolution of species' distributions: reciprocal transplants across the elevation ranges of *Mimulus cardinalis* and *M. lewisii*. *Evolution*, 59(8):1671–1684.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. and Bonhomme, F. (2000) Genetix 4.02, logiciel sous windows tm pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR, 5000*.
- Bischoff, A., Crémieux, L., Smilauerova, M., Lawson, C. S., Mortimer, S. R., Dolezal, J., Lanta, V., Edwards, A. R., Brook, A. J., Macel, M., Leps, J., Steinger, T. and Müller-Schärer, H. (2006) Detecting local adaptation in widespread grassland species - the importance of scale and local plant community. *Journal of Ecology*, 94:1130–1142.
- Campbell, D. R. and Waser, N. M. (2001) Genotype- by-environment interaction and the fitness of plant hybrids in the wild. *Evolution*, 55(4):669–676.
- Ellis, A. G., Weis, A. E. and Gaut, B. S. (2007) Spatial scale of local adptation and population genetic structure in a miniature succulent, *Argyroderma pearsonii*. *New Phytologist*, 174:904–914.

3.2. Utilisation de différentes approches pour étudier l'adaptation locale dans les populations de gestion dynamique

- Enjalbert, J., Goldringer, I., David, J. and Brabant, P. (1998) The relevance of outcrossing for the dynamic management of genetic resources in predominantly selfing *Triticum aestivum* L. (bread wheat). *Genetics selection Evolution*, 30:197–211.
- Falconer, D. S. (1974) *Introduction à la génétique quantitative*. Masson et Cie.
- Fritsche, F. and Kaltz, O. (2000) Is the *Prunella* (lamiaceae) hybrid zone structured by an environmental gradient? evidence from a reciprocal transplant experiment. *American Journal of Botany*, 87(7):995–1003.
- Fu, D., Szücs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J. S., von Zitzewitz, J., Hayes, P. M. and Dubcovsky, J. (2005) Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 273(1):54–65.
- Geber, M. A. and Eckhart, V. M. (2005) Experimental studies of adaptation in *Clarkia xantiana*. ii. fitness variation across a subspecies border. *Evolution*, 59(3):521–531.
- Goldringer, I., Enjalbert, J., David, J., Paillard, S., Pham, J. L. and Brabant, P. (2001) Dynamic management of genetic resources: a 13-year experiment on wheat. *Broadening the Genetic Base of Crop Production*, pages 245–260.
- Goldringer, I., Prouin, C., Rousset, M., Galic, N. and Bonnin, I. (2006) Rapid differentiation of experimental populations of wheat for heading time in response to local climatic conditions. *Annals of Botany*, 98(4):805.
- Gooding, M., Ellis, R., Shewry, P. and Schofield, J. (2003) Effects of restricted water availability and increased temperature on the grain filling, drying and quality of winter wheat. *Journal of Cereal Science*, 37(3):295–309.
- Goudet, J. and Büchi, L. (2006) The effects of dominance, regular inbreeding and sampling design on q_{ST} , an estimator of population differentiation for quantitative traits. *Genetics*, 172(2):1337–1347.
- Hanocq, E., Laperche, A., Jaminon, O., Lainé, A. and Le Gouis, J. (2007) Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL meta-analysis. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 114(3):569–584.
- Henry, J. P., Pontis, C., David, J., Gouyon, P. H., Seitz, A. and Loeschke, V. (1991) An experiment on dynamic conservation of genetic resources with metapopulations.

3. Adaptation locale dans les populations de GD

- Hudson, R. R. (1991) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Survey in Evolutionary Biology*, 7:1–44.
- Jakobsson, A. and Dinnetz, P. (2005) Local adaptation and the effects of isolation and population size—the semelparous perennial *Carlina vulgaris* as a study case. *Evolutionary Ecology*, 19(5):449–466.
- Kato, K., Miura, H. and Sawada, S. (1999) Qtl mapping of genes controlling ear emergence time and plant height on chromosome 5a of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 98:472–477.
- Kawecki, T. J. and Ebert, D. (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7(12):1225–1241.
- Lande, R. (1992) Neutral theory of quantitative genetic variance in an island model with local extinction and colonization. *Evolution*, 46:381–389.
- Latta, R. G. (2009) Testing for local adaptation in *Avena barbata*: a classic example of ecotypic divergence. *Molecular Ecology*, 18:3781–3791.
- Leimu, R. and Fischer, M. (2008) A meta-analysis of local adaptation in plants. *PLoS One*, 3(12):e4010.
- Leinonen, T., O’Hara, R., Cano, J. M. and Merilä, J. (2008) Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, 21:1–17.
- Lenormand, T. (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4):183–189.
- Paillard, S., Goldringer, I., Enjalbert, J., Trottet, M., David, J., de Vallavieille-Pope, C. and Brabant, P. (2000) Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. ii- adult plant resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 101:457–462.
- Pujol, B., Wilson, A. J., Ross, R. I. C. and Pannell, J. R. (2008) Are q_{ST} - f_{ST} comparisons for natural populations meaningful? *Molecular ecology*, 17:4782–4785.
- Raabová, J., Fischer, M. and Münzbergová, Z. (2008) Niche differentiation between diploid and hexaploid *Aster amellus*. *Oecologia*, 158(3):463–472.
- Remington, D. L. and Puruganan, M. D. (2003) Candidate genes, quantitative trait loci, and functional trait evolution in plants. *International Journal of Plant Science*, 164:S7–S20.

3.2. Utilisation de différentes approches pour étudier l'adaptation locale dans les populations de gestion dynamique

- Rhoné, B., Remoué, C., Galic, N., Goldringer, I. and Bonnin, I. (2008) Insight into the genetic bases of climatic adaptation in experimentally evolving wheat populations. *Molecular Ecology*, 17(3):930–943.
- Rhoné, B., Vitalis, R., Goldringer, I. and Bonnin, I. (2010) Evolution of flowering time in experimental wheat populations: a comprehensive approach to detect genetic signatures of natural selection. *Evolution*, Advanced Online.
- Roux, F., Touzet, P., Cuguen, J. and Le Corre, V. (2006) How to be early flowering: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 11:375–381.
- Shah, N. and Paulsen, G. (2003) Interaction of drought and high temperature on photosynthesis and grain-filling of wheat. *Plant and Soil*, 257(1):219–226.
- Sherman, J. D., Yan, L., Talbert, L. and Dubcovsky, J. (2004) A PCR marker for growth habit in common wheat based on allelic variation at the *VRN-A1* gene. *Crop Science*, 44:1832–1838.
- Spitze, K. (1993) Population structure in daphnia obtusa: Quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, 135(2):367–374.
- Sæther, S. A., Fiske, P., Kålås, J. A., Kuresoo, A., Luigujõe, L., Piirtney, S. B., Sahlman, T. and Höglund, J. (2007) Inferring local adaptation from $q_{ST} - f_{ST}$ comparisons: neutral genetic and quantitative trait variation in european populations of great snipe. *Journal of Evolutionary Biology*, 20:1563–1576.
- Vitalis, R., Dawson, K. and Boursot, P. (2001) Interpretation of variation across marker loci as evidence of selection. *Genetics*, 158:1811–1823.
- Weir, B. and Cockerham, C. (1984) Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6):1358–1370.
- Weir, B. S. and Hill, W. G. (2002) Estimating F -statistics. *Annuals Review of Genetics*, 36:721–750.
- White, J. W., Hendler, M., Hunt, L. A., Payne, T. S. and Hoogenboom, G. (2008) Simulation-based analysis of effects of *VRN* and *Ppd* loci on flowering in wheat. *Crop Science*, 48:678–687.
- Whitlock, M. C. (2008) Evolutionary inference from Q_{ST} . *Molecular Ecology*, 17:1885–1896.
- Wright, S. (1969) Evolution and the genetics of populations. vol. 2. the theory of gene frequencies.

Wójcik, A. M., Polly, P. D., Sikorski, M. D. and Wójcik, J. J. (2006) Selection in a cycling population: differential response among skeletal traits. *Evolution*, 60(9):1925–1935.

Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J. and Dubcovsky, J. (2004) Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1677–1686.

Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T. and Dubcovsky, J. (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN-1*. *Proc Natl Acad Sci US A*, 100:6263–6268.

3.3 Comportement des croisements dans la réponse à l'adaptation locale

3.3.1 Matériels et Méthodes

3.3.1.1 Matériel végétal

Afin d'étudier l'impact des croisements sur l'adaptation locale dans les populations de GD, deux types de croisements ont été utilisés dans cette partie :

- les croisements intra-population, WPC (Within-Population Cross)
- les croisements inter-sites, BSC (Between-Site Cross).

La réalisation des croisements est détaillée dans la partie *Schéma de croisement* du chapitre *Matériels et Méthodes*. Nous avons uniquement utilisé la deuxième génération étant donné qu'elle était la seule à avoir été évaluée sur les trois sites (Le Moulon, Rennes et Toulouse).

3.3.1.2 Analyses statistique des caractères quantitatifs

Afin de voir si les croisements ont un effet sur l'adaptation locale, nous avons appliqué un modèle de type "Migrants vs Résidents" (cf. partie précédente de ce chapitre pour plus de détails) sur les descendances de croisements WPC et BSC. Les descendances des croisements BSC ne sont pas toujours entièrement migrant ou entièrement résidents. En effet si l'un des deux parents est originaire du site dans lequel la descendance est évaluée, la moitié du génome de cette descendance doit être considérée comme résidente et l'autre moitié comme migrante. Afin de le prendre en compte, nous avons utilisé une variable dose qui quantifie la proportion de gènes "résidents" qui permet de distinguer trois cas : 0 quand aucun des deux parents n'est originaire du site d'évaluation, 1 quand l'un des deux parents est originaire du site d'évaluation et 2 quand les deux parents sont originaires du site d'évaluation. Cette dose de gènes résidents a été testé comme covariable dans une ANCOVA mais les résultats sont plus précis quand elle est testée comme facteur dans une ANOVA. Les deux modèles d'ANOVA sont comparables aux modèles utilisés dans la partie précédente :

$$Y_{ijklmn} = doseR_i + site_j + Pop_k + rep(site)_{lj} + Fam(Pop)_{mk} + (doseR \times site)_{ij} + R_{ijklmn} \quad (3.1)$$

et :

$$Y_{ijklmn} = doseR_i + site_j + Pop_k + rep(site)_{lj} + Fam(Pop)_{mk} + (doseR \times Pop)_{ik} + R_{ijklmn} \quad (3.2)$$

3.3.2 Résultats

L'effet de la dose de résident sur les descendances des croisements WPC et BSC est significatif dans les modèles (3.1) et (3.2) seulement pour PMG/TKW (Tables 3.1 et 3.2). Les individus dont la dose est 0 (PMG/TKW = 42,08) ont des valeurs significativement inférieures aux individus dont la dose est 1 (PMG/TKW = 42,85) ou 2 (PMG/TKW=43,16). L'interaction entre la dose de gènes résidents et le site est significative pour NGPE/KNS et l'interaction entre la dose et la populations d'origine de la plante mère est significative pour PMG/TKW. Les descendances qui sont 100% résidentes à Toulouse ont des valeurs de PMG/TKW significativement plus grandes que les hybrides et les migrantes (Figure 3.1 B). Pour le même caractère, les descendances issues de la population de Toulouse ont des valeurs plus grandes quand elles sont considérées comme 100% résidentes (dose=2) quu quand elles sont considérées comme migrantes (dose=0) ou comme hybrides (dose=1) (Figure 3.1 A). La population de Rennes ne montre pas de différences significative entre les résidents et les migrants pour PMG/TKW mais il y a un léger effet d'hétérosis : les hybrides (dose=1) ont un PMG/TKW plus élevé que les autres types de descendances (Figure 3.1 A et B). Alors que pour NGPE/KNS, les descendances issues de Toulouse ont des valeurs plus faibles en tant que résidentes à Toulouse, les descendances issues de la population de Rennes ont des plus fortes valeurs en tant que résidentes à Rennes (Figure 3.1 D). Ces résultats sont cohérents avec ceux trouvés en appliquant les modèles (4) et (5) de la partie précédente aux descendances des croisements WPC (données non montrées). Ces modèles ont montré que les descendances issues de la population de Rennes avaient des valeurs plus hautes pour NGPE/KNS quand elles étaient considérées comme résidentes et plus hautes que les descendances d'autres populations Rennes.

3.3. Comportement des croisements dans la réponse à l'adaptation locale

Source of variation	d.f.	HP/PH		NEP/SNP		NGP/KNP		NGPE/KNS		PGP/GWP		PMG/TKW	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
doseR	2	60	0,57	34	2,51	18775	0,79	40	0,49	35	0,10	175	8,64**
site	2	58397	556,45***	1387	101,06***	5332418	233,78***	9817	121,43***	14081	282,31***	6418	317,16***
Pop	2	1258	2,97	2	0,10	4920	0,14	118	0,86	23	0,31	101	1,56
rep(site)	3	13936	88,53***	100	4,84**	262160	7,33***	1060	8,74***	71	0,95	3244	106,88***
Fam(Pop)	177	51151	5,51***	1871	1,54***	3660854	1,74***	14700	2,05***	7655	1,73***	7715	4,31***
doseR × site	4	226	1,08	9	0,34	27744	0,58	548	3,39**	30	0,30	87	2,15
Erreur	860	45127		5770		9877043		33510		20749		8580	

Table 3.1: Table d'ANOVA pour le modèle (3.1). * : $P_{value} < 0.05$, ** : $P_{value} < 0.01$ and *** : $P_{value} < 0.0001$.

Source of variation	d.f.	HP/PH		NEP/SNP		NGP/KNP		NGPE/KNS		PGP/GWP		PMG/TKW	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
doseR	2	62	0,59	35	2,56	20588	0,87	38	0,46	37	0,75	175	8,66**
site	2	74955	713,80***	1878	136,78***	6533482	275,00***	10250	125,97***	19182	385,61***	10119	501,50***
Pop	2	906	2,50	1	0,05	57023	1,71	757	5,88**	64	0,92	138	2,42
rep(site)	3	13934	88,46***	100	4,86**	260932	7,32***	1072	8,78***	71	0,95	3244	107,17***
Fam(Pop)	177	51512	5,54***	1896	1,56***	3690260	1,76***	15053	2,09***	7729	1,76***	7823	4,38***
doseR × Pop	4	200	0,95	6	0,21	57093	1,20	331	2,03	85	0,86	112	2,78*
Erreur	860	45154		5774		9847694		33727		20693		8555	

Table 3.2: Table d'ANOVA pour le modèle (3.2). * : $P_{value} < 0.05$, ** : $P_{value} < 0.01$ and *** : $P_{value} < 0.0001$.

3.3.3 Discussion

Le fait d'étudier l'adaptation locale sur des descendance issues de croisements au lieu de l'étudier sur des descendance issues d'autofécondations a des conséquences sur les résultats obtenus. Si la population de Toulouse montre des signes d'adaptation locale pour PMG dans les deux cas, les indices d'adaptation de cette population pour le caractère HP sont par contre absents de l'étude en croisements. Nous pouvons supposer que les croisements cassent les complexes d'adaptation locale sélectionnés dans la population de Toulouse pour ce caractère.

Pour NGPE au contraire, des indices d'adaptation locale dans la population de Rennes apparaissent dans l'étude sur les croisements tandis que la population de Toulouse montre plutôt une maladaptation pour ce caractère. Dans les deux cas, les hybrides ont une valeur intermédiaire et ne sont donc pas spécialement influencé par l'adaptation locale.

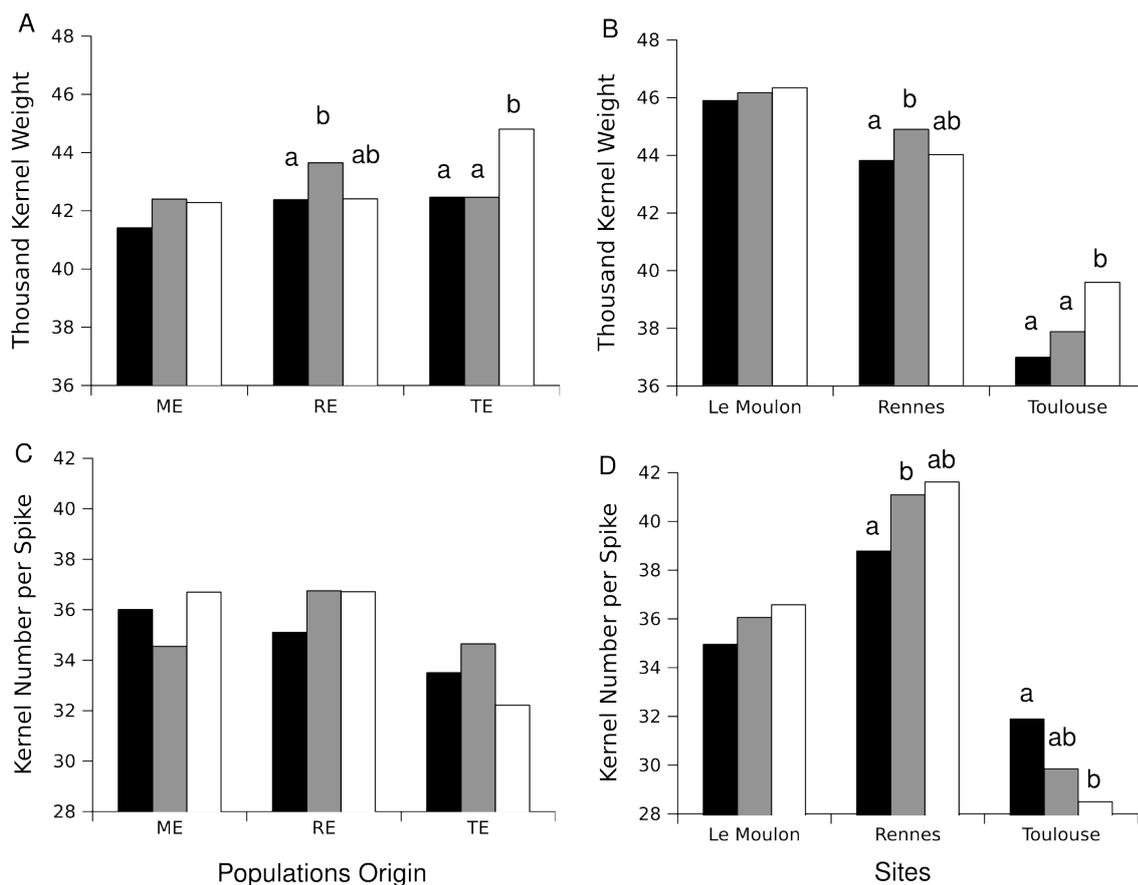


Figure 3.1: Moyennes ajustées pour le Poids de 1000 Grains (PMG/TKW) et le Nombre de Grains Par Epis (NGPE/KNS) pour l'effet d'interaction entre la dose de gènes résidents et le site (A et B) ou l'origine de la plante mère (C et D) des modèles (3.1) et (3.2). Les barres blanches représentent les cas où la dose égale 2, les grises pour ceux où la dose égale 1 et les noirs pour ceux où la dose égale 0. Les lettres au dessus des barres correspondent aux groupes statistiques pour les comparaisons entre les différentes valeurs de doses au sein de chaque population d'origine ou de chaque site (seuil utilisé : $P_{value} = 0,01667$).

Rôle dans l'adaptation locale de l'adaptation climatique et d'un gène impliqué dans la précocité de floraison, *VRN-1*

4.1 Introduction

4.1.1 Importance de la précocité de floraison dans l'adaptation locale

La précocité de floraison est un caractère souvent impliqué dans l'adaptation locale chez les plantes car ce caractère détermine l'adéquation entre le cycle de reproduction de la plante et les contraintes climatiques, les pressions pathogènes ou la présence de pollinisateurs (Remington and Purruganan, 2003; Roux *et al.*, 2006).

Chez le blé, les 3 composantes de la précocité de floraison sont :

- les *besoins en vernalisation* : besoin en températures froides pendant l'hiver pour initier la floraison
- la *sensibilité à la photopériode* : nécessité d'un changement de longueur du jour à la sortie de l'hiver pour initier la floraison
- la *précocité intrinsèque* : une fois les besoins en vernalisation et en photopériode remplis, c'est la composante quantitative liée au génotype propre de la plante et à son état intrinsèque.

Au cours de cette thèse, la précocité de floraison a été mesurée uniquement au cours d'expérimentations au champ. Il n'est donc pas possible de séparer les différentes composantes de ce caractère. Cependant, dans une étude sur un panel de lignées de blé tendre, la précocité mesurée au champ a été trouvée très corrélée à la précocité intrinsèque (Rousset et al, in prep.). Nous avons donc considéré que la variation observée pour la précocité au champ était en grande partie due à la variation de la composante intrinsèque de la précocité.

4.1.2 *VRN-1* et la réponse à la vernalisation chez le blé

Le passage du méristème de l'état végétatif à l'état reproducteur est appelé initiation florale. Il est régulé par des facteurs environnementaux abiotiques, principalement la lumière et la température et dépend aussi de l'état intrinsèque de la plante. La cascade d'induction conduisant à la floraison comporte comme étape l'induction du gène *VRN-1*. Son expression est induite par le gène *VRN3* (analogue de *FT* chez *Arabidopsis thaliana*) lui-même indirectement induit par la photopériode. Dans un blé de type Hiver, l'expression de *VRN-1* est de plus régulée négativement par le gène *VRN2*. La vernalisation a pour conséquence de lever cette régulation négative, *VRN-1* s'exprime ce qui conduit à la floraison. *VRN-1* est un analogue de *APETALA1* (*Arabidopsis thaliana*) qui est un facteur de transcription de type MADS box. La régulation de *VRN-1* par *VRN2* se ferait par l'intermédiaire de 2 sites de *VRN-1* : le promoteur (Yan *et al.*, 2003, 2004) et le premier intron (Fu *et al.*, 2005). Une seule mutation sur une de ces deux zones entraîne la perte de la reconnaissance entre les deux gènes. *VRN-1* est alors exprimé de façon constitutive, la vernalisation n'est plus nécessaire pour lever la régulation de *VRN2* sur *VRN-1*, le blé est de type Printemps. Le plus souvent, la mutation d'une seule des trois copies de *VRN-1* suffit à initier la floraison sans vernalisation : la forme allélique de type Printemps est dominante sur la forme allélique de type Hiver.

4.1.3 *VRN-1* et son impact sur la précocité au champ

Une étude menée sur un panel de lignées de blé tendre, il a été montré que *VRN-1* était impliqué de façon significative dans le déterminisme de la précocité au champ (Rousset et al, in prep.). L'implication de *VRN-1* a aussi été mise en évidence directement dans les populations de GD (Rhoné *et al.*, 2010). Des méta-analyses récentes de QTLs de la précocité et de ses composantes ont montré que son

contrôle génétique n'impliquait pas uniquement les gènes majeurs comme *VRN-1* mais aussi d'autres régions sur les chromosomes 2 et 5 (pour les 3 génomes A, B et D) principalement et 4 et 7 de façon moins importante (Hanocq *et al.*, 2007). Ces régions ont des effets moindres sur la précocité.

L'objectif de ce chapitre est de caractériser une partie des bases génétiques de l'adaptation climatique dans les populations de GD afin de mieux comprendre et prédire l'impact de migrations entre populations issues d'environnements aux climats proches ou différents. Nous allons notamment étudier *VRN-1*, gène impliqué dans la réponse à la vernalisation et la précocité de floraison chez le blé (Fu *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2003, 2004; Rhoné *et al.*, 2008). Tout d'abord, je vais analyser la structuration de la variabilité génétique présente pour la précocité dans les populations de GD. Je vais ensuite décrire la diversité génétique de *VRN-1* et sa structuration spatiale et temporelle dans les 6 populations étudiées afin de comprendre quelles sont les forces évolutives (sélection vs. dérive et migration vs. mutation) qui agissent sur ce gène. Ensuite, j'étudierai l'implication de ce gène dans la précocité de floraison à partir de familles d'individus dont la précocité de floraison et le génotype à *VRN-1* sont conjointement connus. Enfin, j'étudierai l'impact de ce gène dans des descendance issues des croisements afin de déterminer l'importance de la dominance ou de l'épistasie en regard de l'additivité.

4.2 Matériels et Méthodes

4.2.1 Matériel végétal

Deux type de matériel végétal sont à distinguer : le matériel végétal utilisé pour les mesures de précocité et le matériel utilisé pour le génotypage de *VRN-1*. Les mesures de précocité ont été réalisées au cours de l'expérimentation multilocale sur la deuxième génération de descendance issus des croisements décrits dans le chapitre *Matériel et Méthodes*. Selon les questions posées, les analyses porteront soit uniquement sur les descendance d'autofécondations soit sur les descendance issues de croisements. Le génotypage de *VRN-1* a été réalisé sur les parents de ces croisements (taille d'échantillons dans le tableau 4.5), individus issus de la deuxième génération des populations de GD ainsi que sur les 16 parents utilisés au départ de la création de ces populations. Cet échantillonnage permet d'une part d'observer

l'évolution de ce gène entre les parents initiaux et la deuxième génération de la GD et d'autre part de faire le lien entre la précocité mesurée sur différents types de descendance et le génotype de *VRN-1*.

4.2.2 Génotypage et analyse de la diversité du gène

VRN-1

4.2.2.1 Génotypage des 3 copies du gènes *VRN-1*

Quatre sites polymorphes répartis sur les 3 copies du gène ont été génotypés pour cette analyse :

- un polymorphisme de duplication, insertion et délétion dans le promoteur du gène *VRN-1* (note *VRN-1A_{prom}* par la suite), révélée par Yan *et al.* (2004),
- une substitution dans l'exon 7 de *VRN-1A* (*VRN-1A_{ex7}*), révélé par Yan *et al.* (2004) Sherman *et al.* (2004),
- une délétion de 4kb dans le premier intron de *VRN-1B* (*VRN-1B_{int1}*) et dans le premier intron de *VRN-1D* (*VRN-1D_{int1}*), toutes deux révélées par Fu *et al.* (2005)

Pour tous les sites polymorphes de *VRN-1*, des marqueurs co-dominants ont été développés (Yan *et al.*, 2004; Sherman *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005). Les conditions PCR ont été adaptées à partir des protocoles proposés par les auteurs et sont données en annexe. Pour détecter les allèles au locus *VRN-1A_{prom}*, le génotypage a été effectué par migration sur gel d'acrylamide. L'amorce *forward* a été rallongée avec une queue M13 et les amplifications PCR ont été effectuées en présence de l'amorce M13 complémentaire marquée par fluorescence suivant le protocole proposé par Boutin-Ganache *et al.* (2001). Les produits d'amplification ont été séparés sur gel dénaturé de polyacrylamide 5% dans un séquenceur à plaques LI-COR (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA). Les variations au locus *VRN-1A_{ex7}* après digestion du produit de PCR (marqueur de type CAPS, *Cleavage Amplification Polymorphic Sequence*) et aux locus *VRN-1B_{int1}* et *VRN-1D_{int1}* (présence ou absence de délétions) ont été révélées par migration sur gel d'agarose à 2% et 0.8% respectivement et visualisées sous éclairage UV.

Le nombre de données manquantes se répartit de la façon suivante entre les 4 locus : 2,4 % pour *VRN-1A_{prom}*, 2,1 % pour *VRN-1A_{ex7}*, 0 % pour *VRN-1B_{int1}* et 2,4 % pour *VRN-1D_{int1}*.

4.2.2.2 Analyse de la diversité des 3 copies du gène *VRN-1*

Fréquences et diversité Les fréquences des allèles aux 4 sites polymorphes, le nombre d'allèles, la diversité de Nei (H_e) (Nei, 1987) et les indices de fixation, F_{IS} , ont été estimés avec le logiciel Genetix (Belkhir *et al.*, 2000). Ces statistiques ont été estimées de façon globale sur l'ensemble des échantillons et séparément pour chaque échantillon.

Déséquilibre de liaison Le déséquilibre de liaison (DL) entre chaque paire des 4 sites polymorphes a été estimé à l'aide du programme LINKDIS implémenté dans Genetix. La mesure utilisée est le r^2 . Le déséquilibre a été estimé sur l'ensemble des individus génotypés et séparément au sein de chaque population. Le DL peut être accentué si des locus ont des allèles à des fréquences faibles ou du fait d'une forte structuration (allèle présent dans une seule population par exemple). Pour évaluer l'impact de ces phénomènes, l'estimation globale de DL a été effectuée en supprimant de l'analyse le locus *VRN-1D_{int1}* (1 % des individus dans PTE) et les individus portant l'allèle 04 de *VRN-1A_{prom}* (présent uniquement dans PMI).

Données haplotypiques et structuration Du fait du fort déséquilibre de liaison observé entre les 4 sites polymorphes de *VRN-1*, les génotypes multilocus en phase ou haplotypes ont été reconstitués. On appellera haplotypes la combinaison des allèles des différents locus à l'état haploïde. Afin de procéder à cette reconstruction, tous les individus ayant au moins une donnée manquante sur un des 4 locus ont été supprimés du jeu de données. La reconstruction des haplotypes a été réalisée grâce au logiciel Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Nous avons utilisé l'algorithme ELB (Excoffier-Laval-Balding (Excoffier *et al.*, 2003)) pour estimer les phases gamétiques et donc inférer les haplotypes présents dans nos populations.

Afin de tester la structuration de *VRN-1* (au niveau haplotypique, ou pour chaque polymorphisme) au sein des 6 populations, nous avons fait des AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) permettant de tester les groupes de populations suivants :

- regroupement des populations par site géographique (Le Moulon, Rennes et Toulouse)
- regroupement des populations selon l'itinéraire technique (Populations Extensives et Populations Intensives)

4. Rôle dans l'adaptation locale de l'adaptation climatique et d'un gène impliqué dans la précocité de floraison, *VRN-1*

- regroupement selon la latitude du site d'origine (Populations du Moulon et de Rennes et Populations de Toulouse).

Variance allélique temporelle et tailles efficaces Les tailles efficaces des 6 populations ont été estimées en utilisant la variation temporelle des fréquences alléliques moyenne \hat{F}_c de *VRN-1* selon [Waples \(1989\)](#). Afin de séparer les effets propres à chaque locus, les tailles efficaces ont aussi été calculées pour chaque locus. Les intervalles de confiance 95 % ont été estimés en utilisant le fait que la statistique $\frac{n\hat{F}_c}{E(\hat{F}_c)}$ suit un χ^2 à $n - 1$ degrés de libertés, n étant le nombre d'allèles indépendants ([Waples, 1989](#)). Dans certains cas, lorsque la variance due à la dérive est faible et s'approche de la variance d'échantillonnage, la taille efficace estimée peut tendre vers l'infini, et elle peut être négative si la variance due à la dérive devient plus faible que la variance d'échantillonnage. Dans ces deux cas, la taille efficace estimée a été remplacée par l'effectif démographique (5000 graine semées à chaque génération) corrigé par le coefficient de consanguinité moyen F_{IS} ($N_e = \frac{N}{1+F_{IS}} \approx 2650$). Pour les locus et les populations présentant des tailles efficaces faibles, inférieures à 50, un test de sélection positive a été réalisé selon [Goldringer and Bataillon \(2004\)](#). A partir de la taille efficace neutre mesurée sur les microsatellites et des fréquences des allèles du locus testé dans les 16 parents initiaux, une distribution des F_c attendus sous dérive seule est obtenue par simulation. Le F_c mesuré sur le locus testé est alors comparé à cette distribution : s'il est dans les 5 % supérieur de la distribution, on en conclura que le site polymorphe est soumis à la sélection positive.

Différentiation spatiale et tests de sélection divergente La différenciation sur l'ensemble des 6 populations de GD et entre populations 2 à 2 a été mesurée en utilisant l'estimateur θ de [Weir and Cockerham \(1984\)](#) à l'aide du logiciel Genetix. 500 permutations globales sur les individus sont effectuées pour tester la significativité de la différenciation estimée.

Des tests sur le degré de différenciation de *VRN-1* ont été réalisés afin de savoir si la différenciation observée pouvait s'expliquer par la simple dérive ou si elle était plus importante qu'attendue et donc potentiellement due à de la sélection divergente. Pour cela, l'évolution des fréquences alléliques ou haplotypiques est simulée dans un schéma mimant la création de 2 ou 3 populations : 7 générations à partir des 16 parents initiaux jusqu'à la population initiale G0 et 12 générations entre G0 et G12 avec 2 ou 3 populations différentes. Les fréquences de départ correspondent aux

fréquences estimées chez les 16 parents initiaux, soit pour chaque locus, soit pour les haplotypes. Les tailles efficaces des différentes populations pour les 2 phases sont celles estimées à partir des locus microsatellites. À la fin des 19 générations de simulations, le F_{ST} global est estimé entre les populations finales. Cette procédure est répétée 3000 fois, une distribution des F_{ST} sous l'effet de la simple dérive pour chaque locus et pour les haplotypes est ainsi obtenue. La valeur observée pour le locus correspondant ou pour les haplotypes est alors comparée à cette distribution. Si 95 % des valeurs simulées sous simple dérive sont inférieures à la valeur observée, la conclusion est que le locus ou les haplotypes sont soumis à de la sélection divergente dans ce sous ensemble de populations. Cette procédure est adaptée de [Goldringer and Bataillon \(2004\)](#) par [Rhoné et al. \(2010\)](#). Les populations testées sont les 3 couples formés par les 2 populations de chacun des 3 sites géographiques (Le Moulon, Rennes et Toulouse) et les 2 triplets formés par l'itinéraire technique (Extensif et Intensif).

4.2.3 Analyse de la variabilité de la précocité dans les populations de GD

Dans le chapitre *Adaptation locale dans les populations de GD*, le modèle (2) dans l'article permet de mesurer la différenciation du caractère précocité entre les 6 populations grâce au Q_{ST} . Les trois valeurs de Q_{ST} estimées dans chacun des 3 sites expérimentaux (entre 0,20 et 0,31) sont significativement différentes de 0. Le test comparant ces valeurs à la distribution des F_{ST} dans le cas neutre montre que la différenciation pour ce caractère est significativement plus importante que celle attendue sous simple dérive (cf Tableau 1 dans l'article du chapitre 3).

Afin de préciser ces résultats et de tester l'interaction entre l'effet de la population d'origine et l'effet site d'expérimentation, nous avons analysé la précocité de floraison sur les descendances de deuxième génération d'autofécondation par le même modèle que le modèle (3) de l'article du chapitre 3 :

$$Y_{ijklm} = Pop_i + site_j + Fam(Pop)_k + (Pop \times site)_{ij} + rep(site)_l + R_{ijklm} \quad (4.1)$$

avec Pop l'effet aléatoire de la population d'origine (ME, MI, RE, RI, TE et TI), $site$ l'effet fixe du site d'expérimentation, Fam l'effet aléatoire de la famille et rep l'effet fixe des répétitions dans chaque site.

4.2.4 Association entre *VRN-1* et la précocité

4.2.4.1 Analyses des descendance d'autofécondations

L'intérêt des descendants d'autofécondation est que le génotype de l'ensemble des individus de la descendance est attendu proche de celui des plantes mères (à l'hétérozygotie résiduelle près) qui sont génotypés pour les gènes *VRN-1*. Il est donc possible de rechercher une association entre génotype et phénotype de précocité. Le locus *VRN-1D_{int1}* étant presque fixé dans la population TE et complètement fixé dans les autres populations, n'est pas pris en compte dans les analyses suivante.

Le premier modèle (4.2) vise à analyser les effets additifs de chaque locus sur la précocité :

$$Y_{ijklmno} = site_i + Pop_j + VRN-1A_{promk} + VRN-1A_{ex7l} + VRN-1B_{int1m} + rep(site)_{in} + \varepsilon_{ijklmno} \quad (4.2)$$

L'effet de la population d'origine est considéré comme aléatoire, les autres effets étant considérés comme fixes. L'effet de chaque site polymorphe (*VRN-1A_{prom}*, *VRN-1A_{ex7}* et *VRN-1B_{int1}*) a, de plus, été testé dans des modèles séparés en interaction avec le site d'expérimentation et la populations d'origine. L'allèle 04 de *VRN-1A_{prom}* n'est présent que dans la population Intensive du Moulon. Pour éviter des confusions d'effets, les individus portant cet allèle ont été supprimés de l'analyse.

L'effet de la combinaison des 3 sites polymorphes est testé dans un modèle où l'effet Haplo est la concaténation des génotypes aux 3 sites polymorphes.

$$Y_{ijklm} = Pop_i + site_j + Haplo_k + (Pop \times Haplo)_{ik} + (site \times Haplo)_{jk} + (Pop \times site \times Haplo)_{ijk} + rep(site)_l + \varepsilon_{ijklm} \quad (4.3)$$

Les effets de la population d'origine et de l'haplotype sont considérés comme aléatoires alors que l'effet de la répétition et l'effet du site sont considérés comme fixes. Pour cette analyse, seules les familles portant les haplotypes H3 (regroupés avec H4), H5 et H8 ont été prises en compte pour éviter les modalités de l'effet Haplo avec de trop faibles d'effectifs.

4.2.4.2 Analyses de l'ensemble des croisements

Seuls les génotypes des deux parents de chaque famille sont connus, les fréquences des différents génotypes au sein de chaque famille ne sont pas connues directement. Afin d'analyser les effets des gènes *VRN-1* sur la précocité dans les descendance

des croisements, la dose des allèles de chaque locus présente dans chaque famille sera calculée comme la somme du nombre d'allèles apporté par la plante mère et par la plante père. C'est l'effet de cette dose d'allèle sur la précocité moyenne de la famille qui va être testé dans le modèle (4.4) regroupant les 3 sites polymorphes $VRN-1A_{prom}$, $VRN-1A_{ex7}$ et $VRN-1B_{int1}$.

$$Y_{ijkl} = \mu + site_i + rep(site)_j + SiteOrigine_k + \alpha_1 \cdot VRN-1A_{prom}(02) + \alpha_2 \cdot VRN-1A_{prom}(05) + \beta \cdot VRN-1A_{ex7} + \gamma \cdot VRN-1B_{int1} + \varepsilon_{ijkl} \quad (4.4)$$

Un deuxième modèle a pour but de tester l'effet des haplotypes des 2 parents de chaque famille sur la précocité :

$$Y_{ijklmn} = \mu + LieuOrigine_i + HaploMere_j + HaploPere_k + HaploMere \times HaploPere_{jk} + site_m + rep(site)_{ml} + \varepsilon_{ijklmn} \quad (4.5)$$

Pour cette analyse, seuls les haplotypes ayant été observés dans suffisamment de familles (au moins 5) ont été conservés : H1, H2, H3, H5, H8 et H9 (regroupés avec H16) pour les mères et H1, H2, H3, H5, H8 et H14 pour les pères.

4.3 Résultats

4.3.1 Diversité et structuration des gènes $VRN-1$

4.3.1.1 Diversité des gènes $VRN-1$

Les locus $VRN-1A_{ex7}$, $VRN-1B_{int1}$ et $VRN-1D_{int1}$ présentent 2 allèles dans les populations étudiées. $VRN-1A_{prom}$ présente 4 allèles. Pour chaque locus, un allèle est beaucoup plus fréquent que les autres (Tableau 4.1). L'allèle 02 de $VRN-1D_{int1}$ est en très faible fréquence (2%).

Il existe un fort déséquilibre de liaison (DL) entre $VRN-1A_{prom}$ et $VRN-1A_{ex7}$ (0,75) (Tableau 4.2). Le DL est aussi relativement important entre $VRN-1A_{prom}$ et $VRN-1B_{int1}$ (0,12). Les autres couples de locus montrent des DL inférieurs à 0,10 bien que significatifs sauf pour le couple $VRN-1A_{prom}$ et $VRN-1D_{int1}$.

Ces valeurs de DL sont du même ordre de grandeur si on ne prend pas en compte les deux allèles rares dans l'estimation (Tableau 4.3).

Douze haplotypes sont présents dans nos échantillons (Tableau 4.4). Quatre haplotypes sont plus fréquents que les autres : H3 (57 %), H8 (17 %), H5 (15 %) et H2 (13%). Un nouvel haplotype qui n'avait pas été trouvé auparavant dans les populations de GD (Rhoné *et al.*, 2008) est détecté dans nos échantillons : H16.

Les indices de fixation, F_{IS} , sont compris entre 0,66 et 1 avec une majorité d'entre eux proches de 1 (Tableau 4.1) ce qui est attendu avec le régime de reproduction principalement autogame du blé tendre.

4.3.1.2 Structuration de la diversité de *VRN-1*

Évolution temporelle de *VRN-1* La diversité de *VRN-1A_{ex7}* présente chez les 16 parents initiaux due aux fréquences relativement équilibrées des 2 allèles, est conservée dans les populations Intensives et dans la population Toulouse Extensive (Table 4.5). Dans les 2 autres populations Extensives (Le Moulon et Rennes), la fréquence de l'allèle 02 a diminué entraînant une diminution de la diversité de Nei de 0,44 à 0,25 et 0,22 respectivement.

Pour *VRN-1A_{prom}* également, la diversité génétique initiale (0,48) est maintenue dans toutes les populations sauf PME et PRE ($H_e=0,25$ et 0,24 respectivement) (Table 4.5). L'allèle 01 de *VRN-1A_{prom}* présent en faible fréquence chez les 16 parents disparaît dans les populations Extensives ME et RE et dans MI. Comme pour *VRN-1A_{ex7}*, la diversité de TI augmente sensiblement (0,57) du fait du ré-équilibrage des fréquences alléliques. Un nouvel allèle (04) apparaît dans la population MI ce qui a pour effet de maintenir la diversité dans cette population malgré la perte de l'allèle 01 et la diminution forte de la fréquence de l'allèle 05.

La diversité initiale de *VRN-1B_{int1}* est faible (0,12) car les fréquences alléliques initiales sont très déséquilibrées en faveur de l'allèle 01. Ce déséquilibre est conservé dans la population RE et accentué dans la population ME avec une diversité de Nei de 0,04 et dans la population RI où l'allèle 02 n'a pas été échantillonné. Dans la population MI et dans une plus grande mesure dans les populations de Toulouse, la fréquence de l'allèle 02 augmente en fréquence. La diversité de Nei dans ces 3 populations est donc plus grande : 0,38 pour MI, 0,48 pour TE et 0,50 pour TI.

La diversité initiale de *VRN-1D_{int1}* est nulle car seul l'allèle 01 est présent dans les 16 parents. Il est fixé dans toutes les populations sauf dans TE où l'allèle 02 apparaît.

Le θ estimé en moyenne sur les 4 locus ne montre aucune différenciation significative entre les 16 parents et chacune des 6 populations de GD (Tableau 4.8).

Table 4.1: Allèles et fréquences des allèles de 4 locus de *VRN-1* étudiés.

Allèles	<i>VRN-1A_{prom}</i>	<i>VRN-1A_{ex7}</i>	<i>VRN-1B_{int1}</i>	<i>VRN-1D_{int1}</i>
01	0,04	0,74	0,82	0,98
02	0,74	0,26	0,18	0,02
04	0,03			
05	0,19			

Table 4.2: Déséquilibre de liaison entre les 4 locus de *VRN-1*. (***) : $P_{value} < 0,0001$, ** : $P_{value} < 0,01$ et * : $P_{value} < 0,05$)

<i>VRN-1A_{ex7}</i>	<i>VRN-1B_{int1}</i>	<i>VRN-1D_{int1}</i>	
0,75***	0,12***	0,02	<i>VRN-1A_{prom}</i>
	0,06*	0,08**	<i>VRN-1A_{ex7}</i>
		0,07*	<i>VRN-1B_{int1}</i>

Table 4.3: Déséquilibre de liaison entre les 3 locus *VRN-1A_{ex7}*, *VRN-1B_{int1}* et *VRN-1A_{prom}* sans les individus portant l'allèle 04 de ce dernier site polymorphe. (***) : $P_{value} < 0,0001$, ** : $P_{value} < 0,01$ et * : $P_{value} < 0,05$)

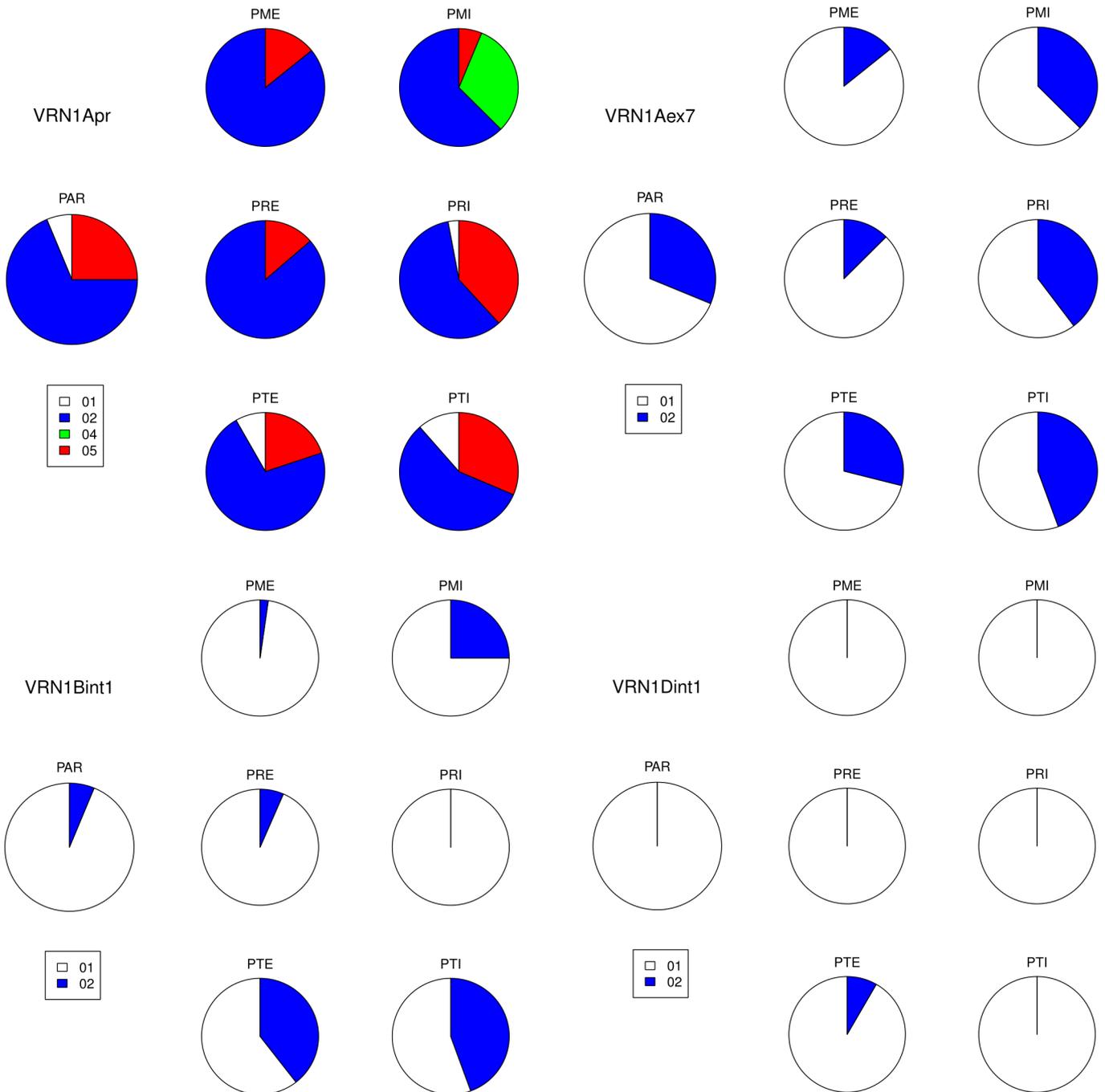
<i>VRN-1A_{ex7}</i>	<i>VRN-1B_{int1}</i>	
0,85***	0,16***	<i>VRN-1A_{prom}</i>
	0,07*	<i>VRN-1A_{ex7}</i>

Table 4.4: Haplotypes présents dans nos échantillons et leur fréquence dans chaque population.

Haplotype	<i>VRN-1A_{prom}</i>	<i>VRN-1A_{ex7}</i>	<i>VRN-1B_{int1}</i>	<i>VRN-1D_{int1}</i>	PAR	PME	PMI	PRE	PRI	PTE	PTI	Type
H1	01	02	02	01	0,06					0,06	0,06	P
H2	01	02	01	01					0,03	0,01	0,06	P
H3	02	01	01	01	0,69	0,84	0,44	0,80	0,59	0,30	0,22	H
H4	02	01	01	02						0,07		P
H5	02	01	02	01		0,02	0,19	0,07		0,33	0,34	P
H6	02	02	01	01						0,01		P
H8	05	02	01	01	0,25	0,14	0,06	0,13	0,37	0,16	0,28	P
H9	05	01	01	01					0,01	0,02		P
H10	05	02	02	01						0,01	0,04	P
H14	04	02	01	01			0,25					H
H15	04	02	02	01			0,06					P
H16	05	01	01	02						0,01		?

4. Rôle dans l'adaptation locale de l'adaptation climatique et d'un gène impliqué dans la précocité de floraison, *VRN-1*

Figure 4.1: Évolution des fréquences alléliques pour les 4 locus polymorphes des 3 copies de *VRN-1* : *VRN-1A_{ex7}*, *VRN-1A_{prom}*, *VRN-1B_{int1}* et *VRN-1D_{int1}*. Chaque camembert représente les fréquences alléliques dans une population.



Par contre, le θ estimé sur les fréquences des haplotypes dans les populations montrent des différenciations significatives bien qu'inférieures à 10% entre les 16 parents initiaux et ME (0,06), RE (0,07) et les deux populations de Toulouse (TE et TI respectivement 0,07 et 0,09) (Tableau 4.9).

Tailles efficaces et tests de sélection Les tailles efficaces estimées pour chaque site polymorphes entre les 16 parents initiaux et chaque population de la 12^{ème} génération montrent certaines valeurs très faibles notamment pour le locus *VRN-1B_{int1}* dans les 2 populations de Toulouse ($N_e = 18$ et 15). Les effectifs efficace estimés sont par contre égaux ou supérieurs à la taille démographique de la population pour *VRN-1A_{prom}* dans PTE, pour *VRN-1A_{ex7}* dans PMI et PTE et pour *VRN-1B_{int1}* dans PRE ce qui indique très peu de variation temporelle des fréquences alléliques. Les valeurs moyennes par population sur les 3 locus de *VRN1* sont comprises entre 46 (Toulouse Intensif) et 187 (Rennes Intensif).

Le test de sélection positive a été réalisé sur *VRN-1B_{int1}* dans les deux populations toulousaines et Moulon Intensif et sur *VRN-1A_{prom}* dans Moulon Intensif. La variance temporelle des fréquences alléliques de *VRN-1B_{int1}* a été trouvée significativement plus importante que celle attendue sous dérive seule dans les 3 populations testées (Tableau 4.3.1.2). Ce site polymorphe est probablement soumis à de la sélection positive. Le test n'est pas significatif pour *VRN-1A_{prom}* malgré une différence importante entre la taille efficace estimée (40) et la taille efficace attendue sous dérive seule (99). Les fréquences initiales de ce locus sont relativement déséquilibrées (Table 4.1). Pendant la simulation permettant d'obtenir la distribution neutre des F_c , la perte des deux allèles en faibles fréquences initiales est assez probable ce qui a pour conséquence d'augmenter la variance de la distribution est donc de rendre le test très conservatif.

Déséquilibre de liaison et haplotypes Initialement, il existe un fort DL (0,99) au sein du gène *VRN-1A* entre le locus *VRN-1A_{ex7}* et *VRN-1A_{prom}* (4.2). De façon plus surprenante, il existe aussi un fort DL entre les gènes *VRN-1A* et *VRN-1B* : *VRN-1A_{prom}* et *VRN-1B_{int1}* sont en fort DL (0,98) tandis le DL est plus faible (0,41) mais significatif entre *VRN-1A_{ex7}* et *VRN-1B_{int1}*. Dans les populations du Moulon et de Rennes, le DL entre les gènes *VRN-1A* et *VRN-1B* disparaît à la génération 12 tandis que celui existant au sein du gène *VRN-1A* reste constant. Dans les populations de Toulouse, l'ensemble des DL initiaux est maintenu bien

4. Rôle dans l'adaptation locale de l'adaptation climatique et d'un gène impliqué dans la précocité de floraison, *VRN-1*

Table 4.5: Mesures de diversité des 4 polymorphismes du gène *VRN-1* pour les 16 parents initiaux et les 6 populations de la 12^{ème} génération de GD. N : taille des échantillons, A : nombre d'allèles par locus, H_e : diversité de Nei et F_{IS} : indice de fixation.

Populations	N	<i>VRN1A_{prom}</i>			<i>VRN1A_{ex7}</i>			<i>VRN1B_{int1}</i>			<i>VRN1D_{int1}</i>		
		A	H_e	F_{IS}	A	H_e	F_{IS}	A	H_e	F_{IS}	A	H_e	F_{IS}
16 parents	16	3	0,48	1	2	0,44	1	2	0,12	1	1	0,00	-
PME	67	2	0,25	0,94	2	0,25	0,94	2	0,04	0,66	1	0,00	-
PMI	32	3	0,52	1	2	0,48	1	2	0,38	1	1	0,00	-
PRE	69	2	0,24	0,75	2	0,22	0,72	2	0,12	0,88	1	0,00	-
PRI	35	3	0,51	1	2	0,49	0,94	1	0,00	-	1	0,00	-
PTE	76	3	0,44	0,97	2	0,41	1	2	0,48	1	1	0,15	1
PTI	36	3	0,57	0,90	2	0,50	0,89	2	0,50	1	1	0,00	-

Table 4.6: Effectifs efficaces estimés entre les 16 parents et la 12^{ème} génération pour chacune des 6 populations.

Populations	<i>VRN-1A_{prom}</i>	<i>VRN-1A_{ex7}</i>	<i>VRN-1B_{int1}</i>	En moyenne pour <i>VRN-1</i>	N_e mesuré sur les marqueurs microsatellites
PME	85	63	300	95 (18-255)	134 (97-179)
PMI	40	2650	41	53 (12-137)	58 (41-79)
PRE	81	51	2650	93 (18-250)	52 (36-70)
PRI	278	582	86	187 (31-760)	57 (39-78)
PTE	2650	2650	18	62 (12-160)	79 (58-103)
PTI	415	162	15	46 (9-123)	101 (71-138)

Table 4.7: Test de sélection positive sur *VRN-1A_{prom}* dans Moulon Intensif et sur *VRN-1B_{int1}* dans les 2 populations toulousaines et dans Moulon Intensif

Site polymorphe	Population	N_e estimé sur le site testé	F_c mesuré sur le site testé	N_e simulé sous dérive seule	$Pvalue$
<i>VRN-1A_{prom}</i>	PMI	40	0,25	99	0,092
<i>VRN-1B_{int1}</i>	PMI	41	0,25	109	0,010
	PTE	18	0,54	115	0,005
	PTI	15	0,65	149	0,002

qu'étant plus faible. Enfin $VRN-1D_{int1}$ présente un DL significatif avec $VRN-1A_{ex7}$ et $VRN-1B_{int1}$ dans PTE.

Structuration spatiale de la diversité de $VRN-1$ Les 6 populations sont significativement différenciées et la valeur du θ estimée en moyenne sur les 4 polymorphismes est 0,12. Les 6 populations sont différenciées entre elle sauf les paires Rennes Extensive et Le Moulon Extensive, Le Moulon Intensive et Toulouse Intensive et Toulouse Extensive et Toulouse Intensive (Tableau 4.8). Il est à noter que, contrairement aux populations de Toulouse, les deux populations cultivées au Moulon (ME et MI) sont significativement différenciées ($\theta = 0,17$), de même que les deux populations de Rennes (RE et RI : $\theta = 0,13$). C'est la population TI qui présente les plus forts indices de différenciation ($\theta = 0,26$ et $0,24$) avec ME et RE respectivement. Une part importante de la différenciation provient du locus $VRN-1B_{int1}$ qui présente des niveaux de différenciation assez élevés notamment entre les populations de Toulouse et les autres (θ jusqu'à 0,46) (Tableau 4.3.1.2). La forte différenciation à ce locus provient d'une forte augmentation de la fréquence de l'allèle 02 spécifiquement dans les populations de Toulouse.

Les 2 autres locus (sans $VRN-1D_{int1}$ fixé dans la plupart des population) présentent des niveaux de différenciation du même ordre que la moyenne sur les 4 locus.

La différenciation spatiale estimée sur les fréquences haplotypiques est toujours légèrement plus forte que celle sur les données multilocus (Tableau 4.9). La population Toulouse Intensif devient significativement différenciée des populations Moulon Intensif et Toulouse Extensif mais les valeurs de θ restent très proches et inférieures à 10%.

Des trois haplotypes présents chez les 16 parents initiaux (H1, H3 et H8), seuls H3 et H8 sont encore présents dans toutes les populations (Figure 4.3).

Les 2 populations ME et RE possèdent uniquement 3 haplotypes H3, H5 et H8. En plus des ces 3 haplotypes, le nouvel allèle au promoteur (04) apporte 2 nouveaux haplotypes (H14 et H15) dans la population MI. La population RI a en plus des deux haplotypes H3 et H8 les haplotypes H2 et H9 mais en très faibles fréquences. Dans ces 4 populations, l'haplotype H3 (associé au type Hiver) est majoritaire bien que dans Moulon Intensif, H5 et le nouvel haplotype H14 (associé au type Hiver) soient presque à la même fréquence.

Les populations de Toulouse présentent une grande diversité d'haplotypes, notamment associés au type Printemps, seuls H14 et H15 ne sont pas détectés dans

4. Rôle dans l'adaptation locale de l'adaptation climatique et d'un gène impliqué dans la précocité de floraison, *VRN-1*

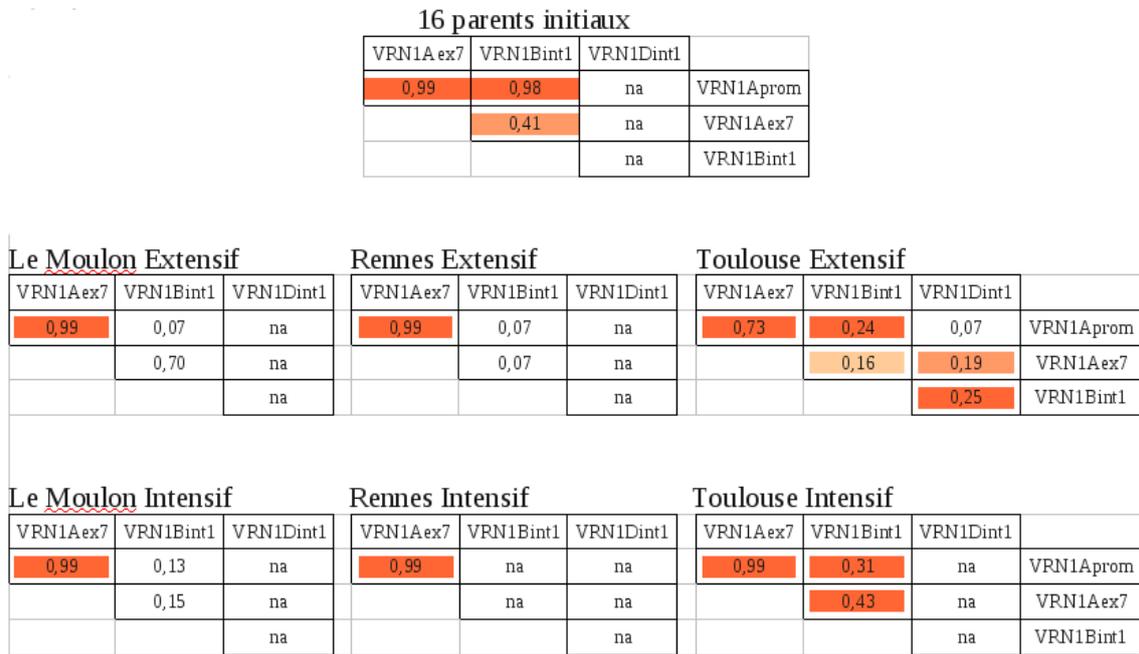


Figure 4.2: Déséquilibre de liaison entre les 4 locus dans chaque population et chez les 16 parents de la GD. Pvalue<0,0001, Pvalue<0,01 et Pvalue<0,05.

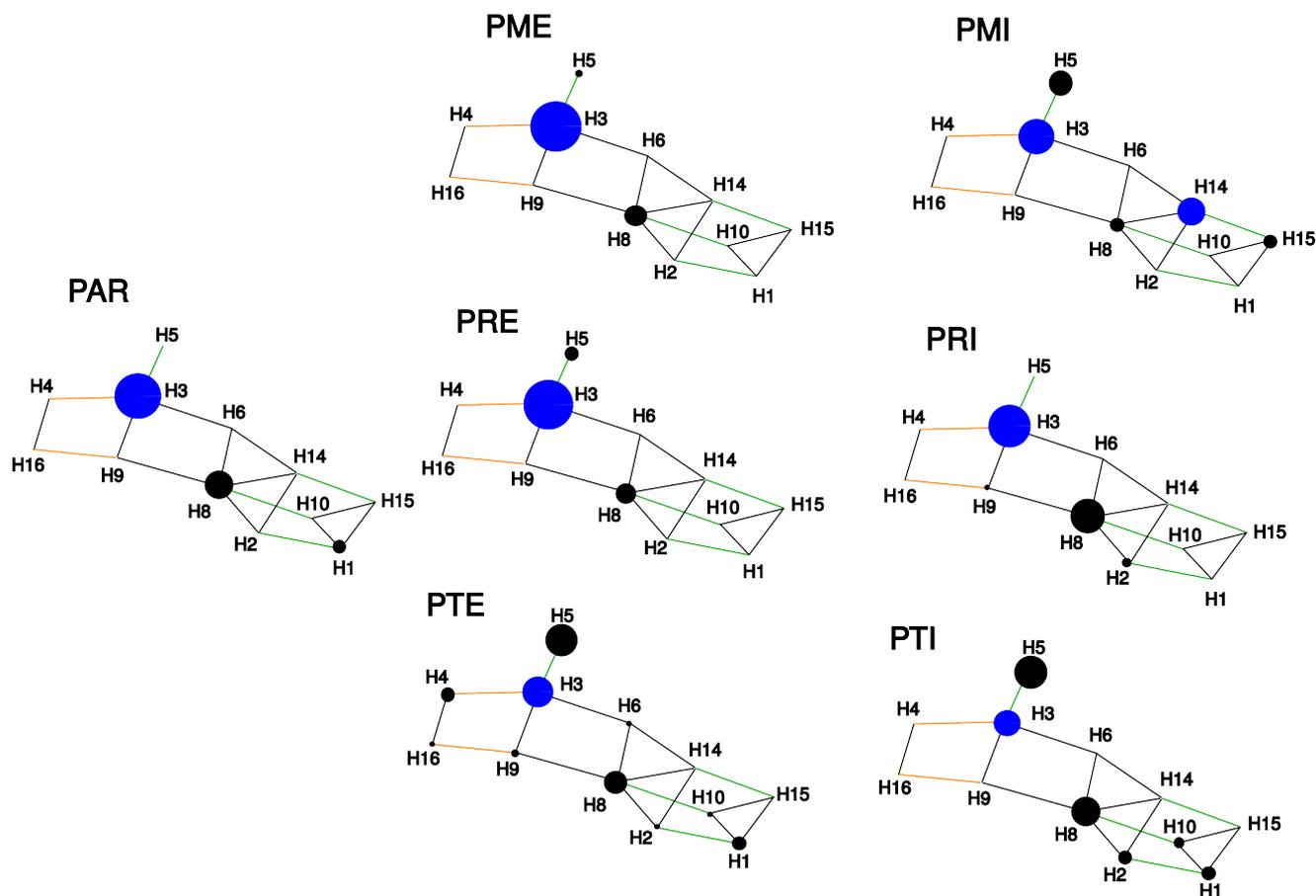
Table 4.8: Différenciation entre chaque paire de populations. Valeurs de θ en moyenne sur les 4 locus. Les valeurs significatives sont en gras.

	PME	PMI	PRE	PRI	PTE	PTI
PAR	0,04	0,04	0,05	0,00	0,04	0,07
PME		0,17	0,00	0,14	0,14	0,26
PMI			0,16	0,10	0,04	0,06
PRE				0,15	0,12	0,24
PRI					0,11	0,11
PTE						0,01

Table 4.9: Différenciation estimées sur les fréquences des haplotypes entre chaque paire de populations. Les valeurs significatives sont en gras.

	PME	PMI	PRE	PRI	PTE	PTI
PAR	0,06	0,06	0,07	0,00	0,07	0,09
PME		0,18	0,00	0,15	0,15	0,27
PMI			0,17	0,11	0,06	0,07
PRE				0,17	0,13	0,25
PRI					0,14	0,12
PTE						0,03

Figure 4.3: Réseaux des haplotypes dans les 6 populations de GD et dans les 16 parents initiaux. La taille des cercles est proportionnelle à la fréquence des haplotypes dans chaque population (pas de cercle si l'haplotype est absent de la population). Chaque lien représente le changement d'un des 4 sites polymorphes, les liens verts indiquent un changement de $VRN-1B_{int1}$ et les liens oranges un changement de $VRN-1D_{int1}$. Les cercles bleus représentent les haplotypes associés au type Hiver et les cercles noirs les haplotypes associés au type Printemps sur la base de [Rhoné et al. \(2008\)](#).



TE et TI présente H1, H2, H3, H5, H8 et H10. Les 3 haplotypes H3, H5 et H8 sont les plus fréquents. Finalement, ces trois haplotypes sont retrouvés dans toutes les populations sauf RI.

Les haplotypes associés au type Hiver sont plus fréquents dans les populations du Nord (entre 0,59 et 0,84) alors que ce sont les haplotypes associés au type Printemps qui sont les plus fréquents dans le Sud (entre 0,70 et 0,78)

Les 2 modèles d'AMOVA testant le regroupement de populations par site géographique ou par itinéraire technique ne montrent pas d'effet groupe significatif sur les données haplotypiques. Dans les deux cas, la plus grosse part de la variabilité est dans la composante intra-population (entre 81 et 82 %). La structuration en populations au sein de chaque groupe est par contre significative dans les deux modèles. Pour ces deux modèles, l'AMOVA faite en moyenne sur les locus donne des résultats très comparables.

Le modèle d'AMOVA testant une structuration entre les populations du Nord de la France (Le Moulon et Rennes) et du Sud de la France (Toulouse) ne montre pas d'effet groupe significatif pour les données haplotypiques. Par contre, l'AMOVA faite en moyenne sur les 3 sites polymorphes montre une structuration Nord/Sud significative ($P_{value} < 0,05$). L'AMOVA faite sur chacun des locus montre que cette structuration est en très grande partie due à la structuration Nord/Sud de *VRN-1B_{int1}*.

Aucun test de sélection divergente n'apparaît significatif entre deux populations cultivées sur le même site excepté entre PMI et PME pour lesquelles *VRN-1B_{int1}* est détecté significatif ($P_{value} = 0,03$) et l'haplotype marginalement ($P_{value} = 0,09$) (Table 4.11). Au niveau des trois populations extensives ou des trois populations intensives, *VRN-1B_{int1}* apparaît de nouveau soumis à sélection divergente ($P_{value} = 0,01$ et $0,06$ respectivement).

4.3.2 Variabilité de la précocité de floraison dans les populations de GD

Tous les effet du modèle (4.1) sont significatifs (Table 4.12). Les individus provenant de la population TE sont significativement plus précoces que ceux provenant des autres populations (Figure 4.4-A). Les deux populations du Moulon (ME et MI) et la population RI font partie du groupe le plus tardif. Les moyennes ajustées pour l'effet *site* sont significativement différentes les unes des autres : le site d'expérimen-

tation du Moulon présente les dates de floraison les plus précoces (1393 °J), celui de Toulouse les plus tardives (1770 °J) et celui de Rennes des valeurs intermédiaires (1532 °J). L'interaction entre ces deux effets est significative mais TE est dans les 3 sites la population la plus précoce et ME, MI et RI les populations les plus tardives (Figure 4.4-B).

Dans les 3 sites, les besoins en vernalisation sont satisfaits : les 6 ou 8 semaines de froid (température moyenne journalière en dessous de 10 °C) sont passées à la sortie de l'hiver, autour du 100^{ème} jour après la levée (JAL) (Figure 4.5). La vernalisation se termine légèrement plus tôt au Moulon (60 JAL) qu'à Rennes ou à Toulouse (respectivement 68 et 72 JAL) ce qui conduit à une plus grande somme des températures pour ces deux derniers sites (respectivement 361 °J et 428 °J) par rapport au Moulon (303 °J). Les plantes de l'expérimentation à Toulouse fleurissent le plus tôt après les 8 semaines de vernalisation (107 jours après les 8 semaines (JA8) soit 1770 °J) suivies des plantes de l'expérimentation du Moulon (110 JA8 et 1393 °J) et enfin les plantes de l'expérimentation de Rennes (122 JA8 et 1532 °J).

Le changement de photopériode en fonction du nombre de jours après la levée est variable selon les sites. Le passage à 14 H de jour se fait dans les 3 sites avant le début des floraisons. Par contre, Le Moulon est le seul site dans lequel la floraison commence après le passage à 14 H de jour. A Rennes, le passage à 15 H de jour se situe entre le début et la moyenne des floraisons observées tandis qu'à Toulouse, il se situe entre la moyenne et la fin des floraisons (Figure 4.5).

4. Rôle dans l'adaptation locale de l'adaptation climatique et d'un gène impliqué dans la précocité de floraison, *VRN-1*

Table 4.10: Différenciation entre chaque paire de populations pour chacun des 4 sites polymorphes de *VRN-1*. Les valeurs en gras sont significativement non nulles.

<i>VRN-1A_{prom}</i>							<i>VRN-1A_{ex7}</i>						
	PME	PMI	PRE	PRI	PTE	PTI		PME	PMI	PRE	PRI	PTE	PTI
PAR	0,04	0,08	0,05	0,00	0,00	0,00	PAR	0,06	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00
PME		0,18	0,00	0,15	0,03	0,13	PME		0,13	0,00	0,15	0,05	0,20
PMI			0,18	0,14	0,11	0,12	PMI			0,15	0,00	0,00	0,00
PRE				0,16	0,03	0,14	PRE				0,18	0,06	0,23
PRI					0,03	0,00	PRI					0,01	0,00
PTE						0,02	PTE						0,03

<i>VRN-1B_{int1}</i>							<i>VRN-1D_{int1}</i>						
	PME	PMI	PRE	PRI	PTE	PTI		PME	PMI	PRE	PRI	PTE	PTI
PAR	0,00	0,07	0,00	0,05	0,18	0,25	PAR	-	-	-	-	0,02	-
PME		0,24	0,01	0,00	0,33	0,46	PME		-	-	-	0,07	-
PMI			0,13	0,24	0,02	0,05	PMI			-	-	0,04	-
PRE				0,03	0,25	0,35	PRE				-	0,07	-
PRI					0,31	0,42	PRI					0,04	-
PTE						0,00	PTE					0,04	-

Table 4.11: Tests de sélection divergente par simulation sur le gène *VRN1*.

Groupes de populations	Locus	F_{ST} mesuré sur <i>VRN-1</i>	F_{ST} mesuré sur les microsatel- lites	F_{ST} simulé sous dérive pour <i>VRN-1</i>	P_{value}
PME-PMI	<i>VRN-1A_{prom}</i>	0,18		0,06	0,13
	<i>VRN-1A_{ex7}</i>	0,13	0,10	0,05	0,21
	<i>VRN-1B_{int1}</i>	0,24		0,03	0,03
	haplotype	0,18		0,06	0,09
PRE-PRI	<i>VRN-1A_{prom}</i>	0,16		0,10	0,29
	<i>VRN-1A_{ex7}</i>	0,18	0,10	0,10	0,27
	<i>VRN-1B_{int1}</i>	0,03		0,05	0,49
	haplotype	0,17		0,11	0,26
PTE-PTI	<i>VRN-1A_{prom}</i>	0,02		0,05	0,76
	<i>VRN-1A_{ex7}</i>	0,03	0,01	0,05	0,58
	<i>VRN-1B_{int1}</i>	0,00		0,04	-
	haplotype	0,03		0,06	0,86
PME-PRE-PTE	<i>VRN-1A_{prom}</i>	0,02		0,07	0,95
	<i>VRN-1A_{ex7}</i>	0,04	0,08	0,07	0,73
	<i>VRN-1B_{int1}</i>	0,27		0,04	0,01
	haplotype	0,11		0,07	0,31
PMI-PRI-PTI	<i>VRN-1A_{prom}</i>	0,08		0,08	0,55
	<i>VRN-1A_{ex7}</i>	0,00	0,09	0,08	-
	<i>VRN-1B_{int1}</i>	0,24		0,05	0,06
	haplotype	0,10		0,08	0,49

Source	ddl	SC	F
Pop	5	395096	8,68***
site	2	16470748	7009,38***
Fam(Pop)	114	1044506	7,80***
Pop \times site	10	25766	2,19*
rep(site)	3	381890	108,36***
R	566	664998	

Table 4.12: Table d'ANOVA pour le modèle (4.1). $P_{value} < 0,0001$: ***, $P_{value} < 0,01$: ** et $P_{value} < 0,05$: *.

4. Rôle dans l'adaptation locale de l'adaptation climatique et d'un gène impliqué dans la précocité de floraison, *VRN-1*

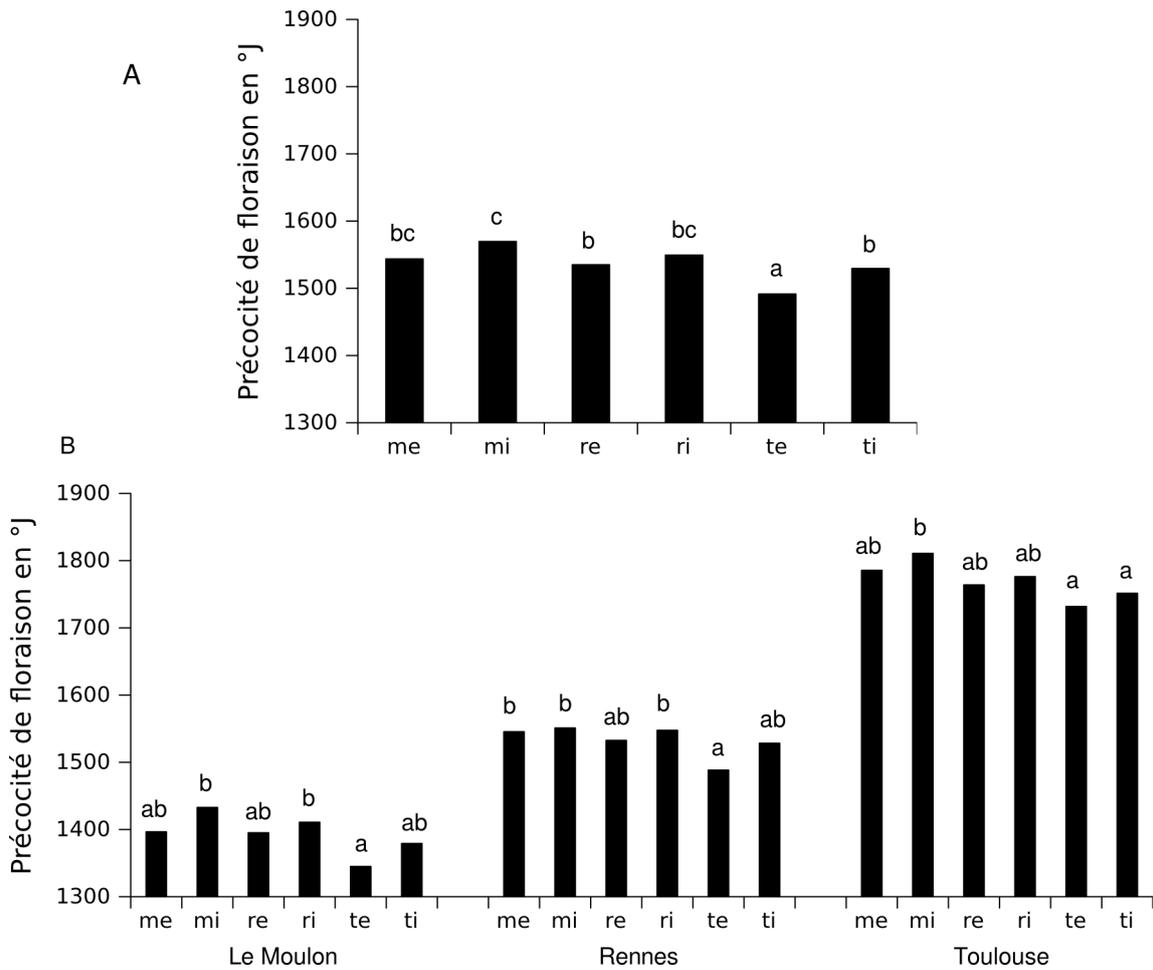


Figure 4.4: Moyennes ajustées de la précocité de floraison en °CJ pour l'effet *Pop* (A) et l'interaction *Pop* × *site* (B) du modèle (4.1). Les lettres représentent les groupes statistiques des comparaisons de moyennes.

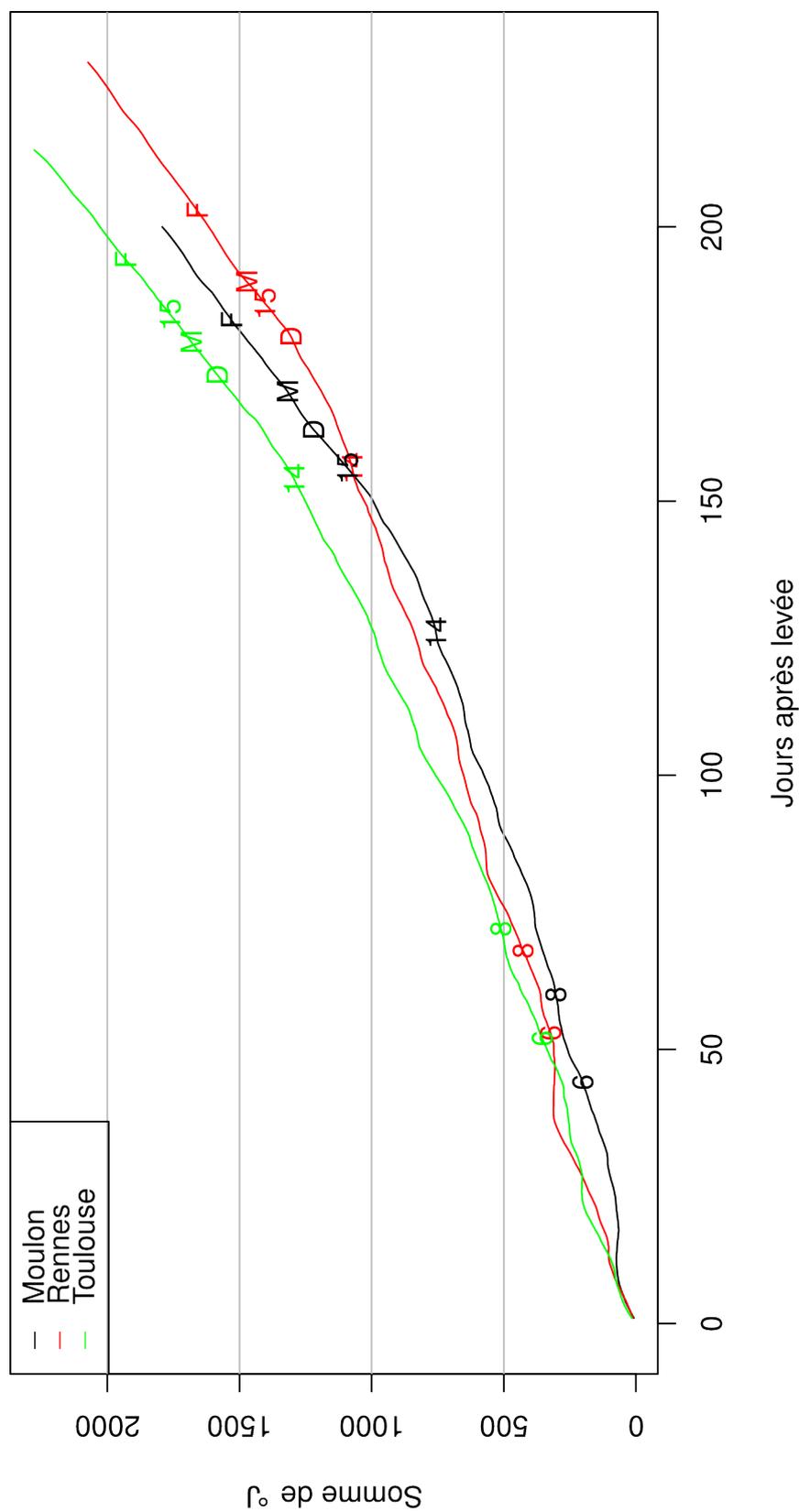


Figure 4.5: Sommes des °J au cours de l'expérimentation de 2008 en fonction du nombre de jours après la levée dans les 3 sites (Le Moulon en noir, Rennes en rouge et Toulouse en vert). Sept dates pour chaque site sont reportées sur les courbes : 6 semaines de vernalisation (6), 8 semaines de vernalisation (8), passage à 14 H de jour (14), passage à 15 H de jour (15), début de la floraison (D), moyenne des dates de floraison (M), fin des floraisons (F).

4.3.3 Association entre VRN1 et la précocité

4.3.3.1 Analyses des autofécondations

Effets simples des sites polymorphes Le pourcentage d'explication totale du modèle (4.2) est de 91 %. L'effet de la population d'origine est significatif (Table 4.13). Les descendances issues d'autofécondation de plantes provenant de la population TE sont significativement plus précoces que les autres tandis que les descendances issues des populations MI et RI sont significativement plus tardives comme nous l'avons montré avec le modèle (4.1). Seul *VRN-1B_{int1}* a un effet significatif sur la précocité : les descendances portant l'allèle 02 sont significativement plus précoces (1546 °J) que les descendances portant l'allèle 01 (1566 °J).

Bien que *VRN-1B_{int1}* soit le seul à avoir un effet sur la précocité de floraison dans ce modèle complet, chaque locus a un effet sur ce caractère quand il est testé seul avec un effet population d'origine et un effet site. Cependant l'effet de *VRN-1A_{ex7}* est faible et celui de *VRN-1A_{prom}* est marginalement significatif. Pour les 3 sites polymorphes, l'interaction entre le site polymorphe et la population d'origine est très significative, celle entre le site d'expérimentation et le site polymorphe ne l'est jamais.

Effet de la combinaison des 3 sites polymorphes Les 3 haplotypes pris en compte dans cette analyse sont H3, H5 et H8. Le modèle (4.3) montre que la population d'origine et l'haplotype composé des 3 sites polymorphes ainsi que l'interaction entre ces deux effets ont un effet significatif sur la précocité (Table 4.14). Dans ce modèle, 4,4% de la variabilité totale est expliqué par la combinaison des trois sites polymorphes de *VRN-1* et 8,6 % par la population d'origine. Le site d'expérimentation a aussi un effet significatif. Les descendances portant l'haplotype H3, associé au type Hiver, sont significativement plus tardifs (1571 °J) que les descendances portant l'haplotype H5 ou H8, tous deux associés au type Printemps (respectivement 1551 et 1556 °J).

L'interaction entre l'haplotype et la population d'origine se traduit par le fait que les différences entre haplotypes ne sont significatives que dans les deux populations du Moulon et dans la population RE (Figure 4.6). Dans ces 3 populations, l'haplotype H3 est le plus tardif mais il n'est pas significativement différent de H8 dans MI et de H5 dans RE. Dans RI et dans les deux populations de Toulouse, les différences ne sont pas significatives.

4.3.3.2 Analyse des effets de *VRN-1* en croisement

Effet des doses des allèles de chaque site polymorphe Les résultats du modèle (4.4) montrent que le site d'origine de la plante mère a un effet significatif sur la précocité des descendances ainsi que le site d'expérimentation (Tableau 4.15). Seul l'effet dose de *VRN-1B_{int1}* a un effet significatif sur la précocité. L'allèle 01 de ce site polymorphe a un effet significativement tardifiant (coefficient de regression associé : 3,47). Aucune interaction entre les effets doses et l'origine de la plante mère ou le site expérimental n'a été trouvée par ailleurs (données non montrées).

Effet des haplotypes parentaux Tous les effets du modèle (4.5) sont significatifs (Table 4.16). Comme dans les autres modèles, le site d'expérimentation et le site d'origine de la plante mère sont significatifs. De plus, les deux haplotypes parentaux ainsi que leur interaction ont un effet significatif sur la précocité. L'interaction entre l'effet des haplotypes parentaux avec le site d'origine de la plante mère ou le site d'expérimentation a montré uniquement un effet faible d'interaction entre l'haplotype maternel et le site d'origine de la plante mère (données non montrées).

Dans ce modèle 0,6% de la variabilité est expliquée par *VRN-1* alors que dans le modèle (4.4) prenant en compte les doses de chaque site polymorphes séparément, *VRN-1* expliquait uniquement 0,06% soit dix fois moins de variabilité qu'expliquée par l'haplotype. Cette différence de variance expliquée par *VRN-1* dans les 2 modèles indique l'importance des interactions entre les sites polymorphes de *VRN-1*. Les faibles parts de variance expliquée par *VRN-1* dans ces deux modèles s'expliquent par l'importance de variance environnementale présente entre sites expérimentaux. Un modèle prenant en compte uniquement un effet famille et un effet population d'origine sur ces mêmes données montre que la part de variance génétique (effets famille et population) est de 10%. Les modèles prenant en compte un effet population, nous devons comparer l'effet de *VRN-1* avec l'effet famille seul. Cet effet explique 7% de la variance totale soit 10 fois plus que la variabilité expliquée par l'haplotype.

4. Rôle dans l'adaptation locale de l'adaptation climatique et d'un gène impliqué dans la précocité de floraison, *VRN-1*

Table 4.13: Table d'ANOVA pour le modèle (4.2).

Source	ddl	SC	<i>F</i>
site	2	15006040	2942,25***
Pop	5	240238	18,84***
<i>VRN-1A_{prom}</i>	2	7888	1,55
<i>VRN-1A_{ex7}</i>	1	603	0,24
<i>VRN-1B_{int1}</i>	2	29817	11,69**
rep(site)	3	366443	47,90***
Erreur	649	1624118	

Table 4.14: Table d'Analyse de Variance pour le modèle 4.3.

Source	ddl	SC	<i>F</i>
rep(site)	3	350679	46,84***
Pop	5	212958	17,07***
Haplo	2	33238	6,66**
Pop × Haplo	8	73846	3,70**
site	2	9574639	1918,17***
Haplo × site	4	7737	0,78
Pop × site × Haplo	26	43016	0,66
Erreur	534	1332741	

Table 4.15: Table d'ANCOVA du modèle (4.4).

Source	ddl	SC	<i>F</i>
site	2	47033249	7213,50***
rep(site)	3	771812	78,92***
OrigineMère	2	219397	33,65***
α_1 (<i>VRN-1A_{prom}</i> (02))	1	1476	0,45
α_2 (<i>VRN-1A_{prom}</i> (05))	1	544	0,17
β (<i>VRN-1A_{ex7}</i> (01))	1	1348	0,41
γ (<i>VRN-1B_{int1}</i> (01))	1	29368	9,01**
Erreur	1908	6220239	

Table 4.16: Table d'ANOVA pour le modèle 4.5

Source	ddl	SC	<i>F</i>
rep(site)	3	755942	80,57***
site	2	43393951	6937,17***
SiteOriMère	2	213999	34,21***
HaploMère	4	114165	9,13***
HaploPère	5	75234	4,81**
HaploMère × HaploPère	9	130973	4,65***
Erreur	1745	5457732	

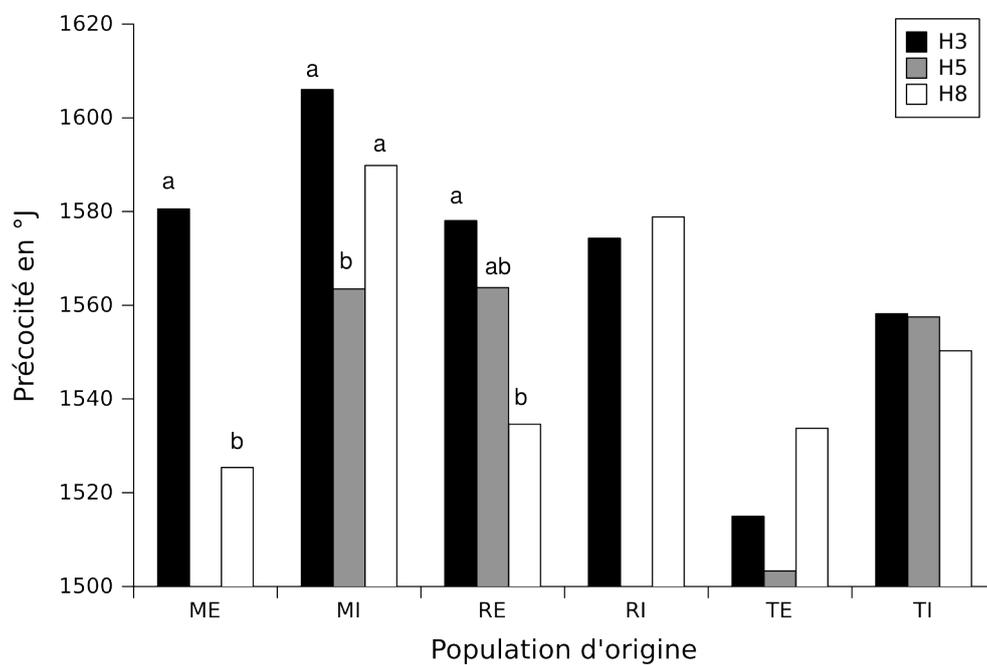


Figure 4.6: Moyennes ajustées de la précocité de floraison pour l'interaction $Pop \times Haplotype$ du modèle (4.3). Les lettres au dessus des barres représentent les groupes statistiques, les comparaisons de moyennes étant réalisées pour chaque population séparément. L'haplotype H5 n'est pas présent dans les populations ME et RI.

4.4 Discussion

4.4.1 Apparition de nouveaux allèles

Deux allèles qui ne sont pas présents dans les 16 parents initiaux apparaissent dans les populations :

- l'allèle 04 au locus *VRN-1A_{prom}* qui apparaît dans la population Intensive du Moulon, il a déjà été décrit dans les populations de GD ou dans des variétés européennes des années 1930 (Rhoné *et al.*, 2008).
- l'allèle 02 au locus *VRN-1D_{int1}* qui apparaît dans la population Extensive de Toulouse comme décrit précédemment par Rhoné (2008). Il a déjà été décrit dans des lignées californiennes ou argentines (Fu *et al.*, 2005). On le trouve aussi dans des lignes asiatiques.

La question que nous pouvons nous poser est la suivante : ces allèles sont-ils apparus par mutation ou par migration. Étant donnée la faible probabilité que le matériel connu portant ces 2 allèles ait été cultivé à proximité des populations de GD, l'hypothèse la plus probable est que ces nouveaux allèles soient apparus par mutation. Les croisements successifs des premières générations de la mise en place de la GD ont pu provoquer des *crossing-over* inégaux et accroître le taux de mutation (Raquin, 2005; Raquin *et al.*, 2008b).

4.4.2 Sélection de *VRN-1B_{int1}* en relation avec l'adaptation climatique

L'allèle 02 du site polymorphe *VRN-1B_{int1}* augmente en fréquence dans les deux populations de Toulouse. Nous avons montré que ce site était soumis de façon significative à une sélection positive dans ces populations et à une sélection divergente sur l'ensemble des populations étudiées. De plus, c'est le seul des 3 sites polymorphes étudiés qui a un effet significatif sur la précocité de floraison. Que ce soit en croisement ou dans les descendance d'autofécondation, l'allèle 02 a un effet précocifiant significatif. Goldringer *et al.* (2006) ont montré que les populations du nord de la France avaient tendance à être plus tardives que les populations du sud. Les fins d'hivers froids contre-sélectionnent des plantes trop précoces dans le Nord tandis que la sécheresse estivale contre-sélectionne des plantes trop tardives dans le sud. Ces résultats sont confirmés par l'effet significatif de la Population d'origine dans tous les modèles présentés ici.

Grâce à l'étude conjointe de l'évolution et de la structuration de la diversité de *VRN-1B_{int1}* et de son implication dans la précocité de floraison, nous avons montré que l'allèle 02 de *VRN-1B_{int1}* avait été sélectionné positivement et spécifiquement dans les populations toulousaines en réponse aux contraintes climatiques.

4.4.3 Importance des interactions épistatiques intra et inter génomes

La structuration observée sur les fréquences haplotypiques est plus élevée que celle observée sur les 4 sites polymorphes en moyenne. Ce résultat ainsi que la présence d'un fort déséquilibre de liaison entre *VRN-1A* et *VRN-1B_{int1}* pourrait nous amener à penser que la diversité de *VRN-1* se structure au niveau de l'haplotype au delà d'une structuration au niveau des sites polymorphes uniquement. Le fait que *VRN-1* explique entre 5 et 10 fois plus de variance dans les modèles où l'haplotype est pris en compte au lieu des 3 sites polymorphes séparément va dans le sens de l'existence d'interaction épistatiques intra et inter génomes.

Les réseaux d'haplotypes montrent une assez forte structuration Nord-Sud. En effet dans les populations du Nord, l'haplotype associé au type Hiver (H3) est majoritaire. Dans MI, un nouvel haplotype associé au type Hiver apparaît (H14). La présence de ce nouvel haplotype est à relier à la diminution de l'haplotype H3 dans cette population. Dans les 2 populations de Toulouse, au contraire, ce sont les haplotypes associés au type Printemps qui sont majoritaires. L'observation du réseau dans ces populations peut nous permettre d'émettre une hypothèse quand au maintien de l'haplotype H3 : il peut être recréé par recombinaison à chaque génération à partir des autres haplotypes présents.

Cependant, la structuration en groupes est en général significative uniquement en moyenne sur les sites polymorphes et non pour les haplotypes. De plus, les tests de sélection divergente ne sont jamais significatifs pour les haplotypes alors qu'ils le sont pour *VRN-1B_{int1}*. De même, la différenciation estimée sur ce site polymorphe est plus importante que celle estimée sur les haplotypes. Cependant, la méthode utilisée pour détecter de la sélection n'est peut-être pas la meilleure pour les données sous formes d'haplotypes. En effet, les haplotypes n'étant pas présents initialement sont modélisés par des fréquences très faibles et donc ont de fortes chances d'être perdus par simple dérive. Ce phénomène conduit à des niveaux de différenciation important même sous la seule dérive, les niveaux de différenciation estimées doivent donc être

forts pour être significatifs : le test est donc conservatif pour les haplotypes (Rhoné *et al.*, 2010).

Les relations épistatiques semblent avoir un impact non négligeable sur le rôle de *VRN-1* dans la précocité de floraison même si *VRN-1B_{int1}* semble avoir un effet important sur ce caractère. L'importance relative des deux n'est pas évidente.

4.4.4 Cohérence des résultats entre les descendance d'autofécondation et de croisement

Les résultats obtenus sur les descendance issues d'autofécondation et celles issues des croisements sont très cohérents : l'allèle 02 de *VRN-1B_{int1}* a un effet précocifiant significatif et l'haplotype formé par *VRN-1A_{prom}*, *VRN-1A_{ex7}* et *VRN-1B_{int1}* a un effet significatif sur la précocité de floraison. Le modèle prenant en compte les doses pour les 3 sites polymorphes ne présente pas de résultats très différents si les doses sont prises en compte comme des facteurs et non comme des covariables (données non montrées). L'effet de *VRN-1* et plus particulièrement de *VRN-1B_{int1}* semble donc être principalement additif. Cependant, le fait que l'interaction entre les haplotypes parentaux ait un effet significatif sur la précocité nous laisse supposer que des effets de dominance sont impliqués dans le rôle de *VRN-1* dans la précocité. Rhoné *et al.* (2008) a montré qu'il existait de la dominance entre les 3 sites polymorphes étudiés ici dans la réponse à la vernalisation : le type "printemps" est dominant sur le type "hiver".

4.4.5 Interaction entre la précocité de floraison et le développement de l'appareil végétatif

Les populations de Toulouse sont plus précoces que les populations du Moulon et de Rennes. Par contre, l'ensemble des plantes évaluées dans l'expérimentation à Toulouse sont significativement plus tardives que dans les 2 autres sites (Le Moulon et Rennes). Les besoins en vernalisation sont satisfaits dans les 3 sites donc ce phénomène ne semble pas être en cause. De plus les besoins en température pour le développement sont atteints plus tôt à Toulouse que dans les 2 autres sites : les plantes cumulent plus de degré-jour pour fleurir à Toulouse que dans les 2 autres sites. Deux explications sont envisageables.

Premièrement, la vernalisation et la température ne sont pas les seules com-

posantes de la précocité de floraison, la photopériode joue aussi un rôle. Le passage à 14 H de jour se fait à Toulouse plus tardivement que dans les sites du Nord. La somme de degré-jour correspondant à ce passage à Toulouse est approximativement celle à laquelle les floraisons commencent dans les 2 autres sites d'expérimentation. Les floraisons commençant après ce passage à Toulouse, il est possible qu'elles soient retardées à cause d'une photopériode limitante. Le passage à 15 H de jour est encore plus tardif à Toulouse et survient alors qu'une grande partie des plantes a déjà fleuri. Rhoné (2008) a montré que la sensibilité à la photopériode avait tendance à disparaître dans les populations de Toulouse. Ce résultat est cohérent avec ce que nous observons : les plantes sensibles à la photopériode fleurissent plus tard et sont potentiellement contre-sélectionnées par la sécheresse estivale.

Deuxièmement, ce retard de floraisons peut être dû au développement de l'appareil végétatif. Brooking and Jamieson (2002) a montré que des températures relativement élevées pendant la vernalisation peuvent conduire à une augmentation du nombre de feuilles mises en place pendant le développement du blé. Entre des sites où la vernalisation se fait à des températures moyennes de 5 °C comme au Moulon ou à Rennes et des sites où la température moyenne pendant la vernalisation est autour de 7 °C comme à Toulouse, il pourrait y avoir la mise en place d'une feuille supplémentaire. Le développement de cette feuille supplémentaire pourrait expliquer le retard de floraison observé à Toulouse. Cette explication n'est qu'une hypothèse, l'écart de température est en effet assez faible. Il faudrait faire des comptages de feuilles pour la confirmer.

Chapitre 5

Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

5.1 Introduction

Dans les cas où le sauvetage génétique est envisagé comme solution pour augmenter la viabilité d'une population qui montre de la dépression de consanguinité, la présence de fardeau génétique ou encore une perte du potentiel évolutif, des croisements entre populations sont souvent utilisés de façon préliminaire afin de tester si des migrations conduiraient plutôt à impact positif sur la viabilité (hétérosis) ou à un impact négatif (dépression hybride). Les deux possibilités étant à prendre en compte comme nous l'avons expliqué dans l'*Introduction*.

Deux mécanismes peuvent conduire à de la dépression hybride :

- le mécanisme “écologique” dans lequel l'apport d'allèles maladaptés localement diminue la valeur sélective des descendances
- le mécanisme “génétique” par lequel des interactions positives entre gènes sont cassées par recombinaisons et des interactions négatives peuvent apparaître.

L'apparition des différents phénomènes au cours des générations après les croisements entre populations a été présentée en *Introduction*. Le mécanisme écologique, lorsqu'il existe, a un impact constant au cours des générations sous l'hypothèse que les gènes déterminant l'adaptation locale ont des effets principalement additifs ou que la dominance est équitablement répartie entre allèles adaptés localement et al-

lèles maladaptés. La temporalité du mécanisme génétique est quant à elle fonction du régime de reproduction. En effet, en fonction des types d'épistasie à effet positifs présentes dans les populations parentales (additive par additive ou dominance par dominance), les complexes de gènes impliqués peuvent être cassés soit dès la première génération soit uniquement à partir de la deuxième génération.

Le degré de divergence entre populations soit par adaptation locale ou alors suite à des fixations de complexes de gènes différents ou de mutations délétères différentes semble avoir un impact important sur les aspects positifs ou négatifs de croisements entre deux populations. C'est pourquoi la notion de distance optimale de croisement a été introduite. Elle peut se définir comme la divergence entre deux populations conduisant à la descendance ayant la plus grande valeur sélective par effet positifs d'hétérosis sans les effets négatifs de dépression hybride.

Nous avons mis en évidence dans les chapitres précédents la présence d'adaptation locale dans les populations de Gestion Dynamique principalement pour la hauteur de plante (HP), le nombre de grains par épis (NGPE) et le poids de mille grains (PMG). Nous avons aussi montré que ce dernier caractère était lié à la précocité de floraison. Enfin, nous avons montré que des interactions de dominance et d'épistasie étaient impliquées dans le déterminisme génétique de la précocité de floraison.

Les descendances des croisements entre populations et intra populations sont étudiées dans ce chapitre. Certains mécanismes n'apparaissant qu'en deuxième génération, nous avons étudiés les deux premières générations de descendances. Nous avons montré que l'adaptation locale avait un impact sur la structuration des caractères quantitatifs. Pour cette raison, nous avons conduit les expérimentations d'évaluation de la deuxième génération sur les 3 sites d'origines des populations étudiées (Le Moulon, Rennes et Toulouse).

Les questions posées par ce chapitre sont les suivantes : (i) Existe-t-il de l'hétérosis intra ou inter populations ? (ii) Existe-t-il de la dépression hybride dans les croisements et si oui quelle est le type optimal de croisement ? (iii) L'adaptation locale joue-t-elle un rôle dans la réponse des populations en croisements ?

La première partie de ce chapitre concerne l'étude de la première génération de descendances évaluées au Moulon. Elle est constituée principalement d'un article soumis à *Heredity*. La deuxième partie concerne l'étude multilocale de la deuxième génération de descendances.

5.2 Première génération de descendances

5.2.1 Dépression de consanguinité et faible hétérosis inter-populations

ORIGINAL ARTICLE

Inbreeding depression and low between-population heterosis in recently diverged experimental populations of a selfing species

Y Rousselle, M Thomas, N Galic, I Bonnin¹ and I Goldringer

UMR Génétique Végétale, INRA–CNRS–Univ Paris–Sud–AgroParisTech, Ferme du Moulon, Gif sur Yvette, France

In fragmented populations, genetic drift and selection reduce genetic diversity, which in turn results in a loss of fitness or in a loss of evolvability. Genetic rescue, that is, controlled input of diversity from distant populations, may restore evolutionary potential, whereas outbreeding depression might counteract the positive effect of this strategy. We carried out self-pollination and crosses within and between populations in an experimental subdivided population of a selfing species, *Triticum aestivum* L., to estimate the magnitude of these two phenomena. Surprisingly, for a self-fertilizing species, we found significant inbreeding depression within each population for four of the six traits studied, indicating that mildly deleterious mutations were still segregating in these populations. The progeny of within- and between-population crosses was very similar, indicating low between-

population heterosis and little outbreeding depression. We conclude that relatively large population effective sizes prevented fixation of a high genetic load and that local adaptation was limited in these recently diverged populations. The kinship coefficient estimated between the parents using 20 neutral markers was a poor predictor of the progeny phenotypic values, indicating that there was a weak link between neutral diversity and genes controlling fitness-related traits. These results show that when assessing the viability of natural populations and the need for genetic rescue, the use of neutral markers should be complemented with information about the presence of local adaptation in the subdivided population.

Heredity advance online publication, 9 June 2010; doi:10.1038/hdy.2010.72

Keywords: inbreeding depression; outbreeding depression; local adaptation; genetic rescue; genetic load; heterosis

Introduction

Dynamic management (DM) is an evolutionary approach for the conservation of the genetic resources of crop species (Henry *et al.*, 1991; Goldringer *et al.*, 2001). DM aims at maintaining the genetic diversity of crop species by growing successive generations of genetically diverse populations in several contrasted environments, without intentional human selection. Similar to wild fragmented populations, the mid-term maintenance of the evolutionary potential of the DM populations is a major issue for the sustainable conservation of biodiversity. In isolated populations, drift and selection lead to the reduction of genetic diversity. Reduced genetic diversity might then result in a loss of fitness because of inbreeding depression caused by the accumulation of deleterious mutations (Lynch *et al.*, 1995; Keller and Waller, 2002) and a loss of evolvability, that is, the ability of a population to respond to natural or artificial selection (Houle, 1992). Isolation is not the only threat

for natural populations. In the case of connected populations, genetic load seems to be more important in very small populations, as shown theoretically by Theodorou and Couvet (2006) and by crossing experiments by Willi and Fischer (2005).

Introduction of migrants in the threatened populations may allow the restoration of evolutionary potential by introducing new alleles into the population and hence (1) increasing the within-population genetic variability and (2) producing heterosis by masking deleterious recessive mutations or increasing the level of heterozygosity. The potential positive effect of migration to manage natural fragmented populations has often been discussed in the literature (reviewed in Tallmon *et al.*, 2004), but few studies have really applied the so-called ‘genetic rescue’ to real populations and surveyed its consequences. Madsen *et al.* (1999) applied it to inbred populations of adder species and Vila (2003) applied genetic rescue to Scandinavian wolf populations. In both cases, the target population size increased very quickly, in one or two generations, despite the very few number of migrants used (20 and 1, respectively). Similarly, in plants, Newman and Tallmon (2001) showed that migration increased the fitness of experimental populations of *Brassica campestris*.

Real application of genetic rescue in conservation strategies is infrequent, probably because of the risk of outbreeding depression. Outbreeding depression is the

Correspondence: Dr Y Rousselle, UMR Génétique Végétale, INRA–CNRS–Univ Paris–Sud–AgroParisTech, Ferme du Moulon, Gif sur Yvette 91190, France.

E-mail: yves.rousselle@moulon.inra.fr

¹Current address: Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB), 57 rue Cuvier, CP 41, 75231 Paris Cedex 05, France.

Received 23 November 2009; revised 23 April 2010; accepted 5 May 2010

reduction in fitness of offspring from matings between genetically divergent individuals. Experimental crosses between populations are the most frequent way of measuring the amount of outbreeding depression in a structured population (Edmands, 2007). Several experimental crossing studies have been carried out on fragmented populations and have revealed either outbreeding depression (Fischer and Matthies, 1997; Waser et al., 2000; Willi et al., 2005; Galloway and Etterson, 2005), heterosis between populations (Fenster and Galloway, 2000; Bossuyt, 2007) or both within one species (*Physa acuta*; Escobar et al., 2008).

In general, two non-exclusive mechanisms may explain outbreeding depression (Schierup and Christianesen, 1996): (1) the 'ecological mechanism', which is also called the 'dilution effect', in which, due to local adaptation of the populations, individuals carrying migrant genes have a lower fitness because these genes are maladapted to the new environment (Waser, 1993) and (2) the 'genetic mechanism' in which positive epistatic interactions within gene complexes might be broken (Lynch, 1991), whereas deleterious epistatic interactions appear. The two mechanisms may have different influences on the different generations of the progeny after the crossing event, depending on the genetic architecture of fitness traits (for example, dominance) and on the mating system. In outcrossing species in which heterozygosity is high, complexes of genes could be selected by dominance-by-additive epistasis. The dominance component of these complexes might be broken during the first generation, leading to outbreeding depression because of the genetic mechanism (Escobar et al., 2008). On the contrary, in selfing species, in which homozygosity is high, mainly additive-by-additive epistasis is expected to be found (Goldringer et al., 1997). In the first generation after a cross, additive-by-additive epistasis complexes are not broken and hence epistasis is not expected to contribute much to outbreeding depression in selfing species. However, in selfing species underdominance might also contribute to outbreeding depression of the first generation. Under both mating systems, the first generation is expected to be further depressed by the ecological mechanism, that is, the additive effects of the migrant maladapted alleles, except in the rare case in which the migrant alleles are fully recessive. Although the ecological mechanism persists after the second generation, genetic incompatibility is expected to be fully expressed as recombination breaks *cis* parental genes complexes (Lynch, 1991). Other mechanisms could also be involved in outbreeding depression, such as interactions between *Wolbachia* and a fig wasp (Greeff et al., 2009).

When applying genetic rescue approaches, two components of migration should be studied: the 'quality' of the migrants and the quantity of the migrants. Managing the quantity of migrants is well described by Wang (2004), who applied the One-Migrant-per-Generation rule to conservation biology. We will not discuss this component of the genetic rescue but will focus on the 'quality' component. Migrant origin should be carefully chosen to benefit from the renewal of genetic variability while limiting outbreeding depression effects. A major issue is to identify the appropriate distance (geographical or genetic) of the migrant individuals. This distance can be described as the optimal crossing

distance, and it depends mainly on the genetic structure of the populations, on the importance of local adaptation and on the mating system (Waser, 1993). Most of the studies described above estimate divergence between populations by geographical distances. A few estimate differentiation at the genetic level by kinship coefficient (Willi et al., 2005) or by F_{ST} (Escobar et al., 2008) or at the phenotypic level by Q_{ST} (Escobar et al., 2008).

In this study, we investigated the conditions to set up a genetic rescue approach in an experimental DM system of a self-fertilizing crop species, bread wheat (*Triticum aestivum* L.). To this aim, genetic diversity and phenotypic variability were analyzed in three DM populations after 12 generations of evolution without conscious human selection. Previous studies on these populations have shown that populations have diverged for different traits, such as disease resistance (Paillard et al., 2000) and earliness (Goldringer et al., 2006), in relation to local conditions. Three levels of crosses (selfing and within-population and between-population crosses) were carried out and phenotypic values of the progeny were analyzed to assess individual inbreeding depression and between-population heterosis or outbreeding depression. Kinship coefficients between the parents of the crosses were estimated using molecular markers, and the relation between the kinship coefficient between parents and the progeny values was analyzed to test for the existence of an optimal genetic distance. These results, together with analyses of the genetic structure of the populations, allowed to improve our understanding of the DM system and to make decisions regarding migration strategies.

As the DM system corresponds to recently diverged populations, the findings of our study can be useful not only for designing optimized dynamic management of genetic resources for crops, but also for improving conservation strategies for wild species experiencing recent habitat fragmentation.

Materials and methods

Plant material

Development of the dynamic management populations: A total of 16 nearly homozygous genotypes (referred to as 'initial lines' hereafter) of *Triticum aestivum* L. representing a wide genetic basis were initially crossed using a pyramidal design (Goldringer et al., 2006). The hybrid seeds obtained were then sown and bulk harvested for three generations of seed multiplication. This composite cross population, G0, was used as the initial population of the DM system. In 1984, seed samples of G0 were distributed to three sites of a French experimental network, Le Moulon (48.4°N, 2.1°E), Rennes (48.1°N, 1.4°W) and Toulouse (43.4°N, 1.3°E), with contrasted environmental conditions. Since then, each population has been cultivated every year without any conscious human selection. Each year, the whole population was harvested in bulk, from which a random sample of at least 5000 seeds was sown in a 100 m² plot isolated from other wheat cultures to constitute the next generation. Migration between populations has been avoided since the beginning (see Goldringer et al., 2006; Rhoné et al., 2008 for more details on the populations).

Crossing scheme: Because wheat plants are hermaphrodites, plants were considered either as females and the spikes for crosses were emasculated or as males and only their pollen were used. In each of the three populations of the twelfth generation (Le Moulon, Rennes and Toulouse), 30–39 female plants and 35–38 male plants were randomly chosen for the crossing scheme. For each female plant, three types of crosses were made (Figure 1): self-pollination (SELF), within-population crosses (WPC, two distinct samples were used for female plants and male plants in each population) and between-population crosses (BPC, cross between a female from one population and a male from each of the two other populations). The male sample in each population was the same for the two last types of crossing (WPC and BPC). For each cross, different spikes of the female plant were either selfed or pollinated during spring 2003 and harvested during summer 2003. The progeny from the resulting seeds of each spike was called a family. The total number of families was 416: 104 for the SELF type, 104 for the WPC type and 208 for the BPC type.

Phenotypic evaluation

The first-generation progeny of all the crosses were sown in a common-garden experiment at Le Moulon in October 2006 in a two-replicate randomized complete block design. In each block, each family was evaluated with a 1.20 m single row of 15 seeds. The first replicate was cultivated without fungicide and phenotypic measures were recorded on each plant of each row. The second replicate was cultivated with fungicide to ensure seed quality at harvest and only average phenotypic values were recorded for each row.

Six phenotypic traits, related to plant fitness, were measured at maturity during the harvest in summer 2007: plant height (PH), spike number per plant (SNP), kernel number per plant (KNP), kernel number per spike

(KNS), grain weight per plant (GWP) and thousand-kernel weight (TKW).

Genotyping of the parents of the crosses

In spring 2003, a leaf sample was taken on each parent used in the crossing scheme for genotyping. The 16 initial lines of the DM populations were sown in 2007 and they were also sampled for genotyping. For each plant, total DNA was extracted from 100 mg of fresh material following a protocol derived from the Dneasy 96 Plant Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

In all, 17 microsatellite markers developed by Röder *et al.* (1998), 1 (*wmc231*) by Somers and Edwards (2004) and a bi-loci marker (the pair of primers amplifies two individual loci on 2 chromosomes) (*cfid71*) developed by Guyomarc'h *et al.* (2002) were used for genotyping the 217 individuals studied. This set of 20 markers covers the 21 chromosomes of bread wheat except the chromosome 1A. PCR protocols were adapted from Röder *et al.* (1998) and Guyomarc'h *et al.* (2002). Amplified fragments were separated on an ABI 3130xl semi-automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyzed using GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems).

Analyses

Genetic diversity among parents: We analyzed the genetic diversity of the individuals involved in the crossing scheme and of the 16 parents of the DM populations. Sample sizes for each population (Le Moulon, Rennes and Toulouse) were 67, 70 and 76, respectively. For each population, gene diversity was estimated from the allelic frequencies using the unbiased estimator H_e (Nei, 1987). Mean average over loci of allele number per locus (A) and within-population fixation index F_{IS} were computed using Genetix 4.03 (Belkhir *et al.*, 2000, Montpellier, France). The 95% confidence interval of F_{IS} was computed using 1000 bootstraps per locus. Differentiation between the three populations was estimated using Weir and Cockerham F -statistics estimator θ (Weir and Cockerham, 1984) with 1000 permutations used for significance tests. We also estimated differentiation between the three populations by the D_{EST} measure (Jost, 2008). In contrast to F_{ST} estimator θ , D_{EST} partitions total genetic variance into statistically independent within- and between-population components and therefore avoids underestimation of differentiation by F_{ST} -like measures because of high within-population diversity (Jost, 2008). We estimated population genetic effective sizes (\hat{N}_e) between the 16 initial lines and the populations at the twelfth generation using temporal variation in allele frequencies estimated by the mean allelic frequency standardized variance (F_c , Nei and Tajima, 1981). We used the second sampling scheme from Waples (1989). We estimated 95% confidence intervals assuming that $(n\hat{F}_c)/E(\hat{F}_c)$ follows a χ^2 with n degree of freedom (total number of alleles). We compared the genetic effective sizes obtained with the demographic sizes corrected for selfing following: $N_{selfing} = (N_{demographic}) / (1 + F_{IS})$ (Pollak, 1987).

To investigate the possibility for an optimal genetic distance for crossing, we computed kinship coefficient for each pair used in the crossing scheme using SPAGeDi (Hardy and Vekemans, 2002, Bruxelles, Belgique), a software program that implements the computation of the kinship coefficient proposed by Loiselle *et al.* (1995).

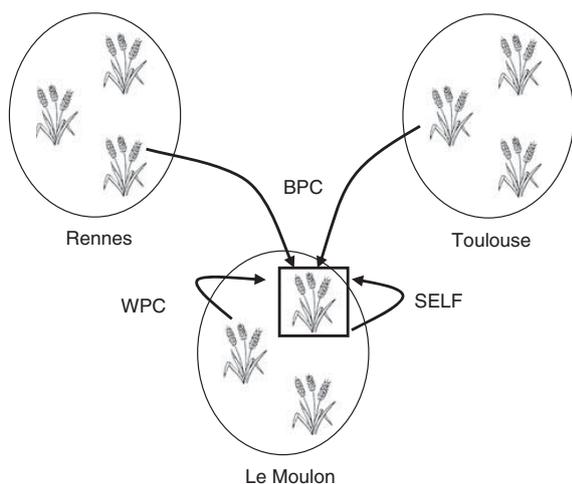


Figure 1 Crossing scheme. Each ellipse represents a population (Le Moulon, Rennes and Toulouse). Cross type codes are SELF for selfing, WPC for within-population cross and BPC for between-population cross. The framed plant is the target female plant for the four crosses symbolized by the arrows.

Statistical analysis of quantitative traits

Preliminary analysis and correction for spatial effects: In the first replicate, we thought that the position of the plants in the row might influence trait expressions because of differences in light exposure such as, for instance, border effects for plants at the start and end position. To account for such effects, we tested a 'position' effect using the following analysis of variance (ANOVA) model that explained phenotypic traits measured on the first replicate: $Y_{ij} = \mu + \text{pos}_i + \text{Fam}_j + R_{ij}$ where pos_i is the fixed position effect, Fam_j is the random family effect and R is the random residual. Family and position effects were significant for all the traits, and hence we corrected each individual trait value in the first replicate for the position effect. In the following analyses of quantitative traits, means of corrected individual values were used for each family in the first replicate. Thus, for each trait, each family was described by two values, one for each replicate. The estimated broad-sense heritability at the design level ranged from 0.25 to 0.86, indicating the high level of genetic variation and the high correlation between the two replicates, although the experimental conditions of the two replicates differed.

Genetic structure at quantitative traits: To describe the genetic structure in parental populations for the quantitative traits, we used the selfed progeny (32 families for Le Moulon, 34 for Rennes and 38 for Toulouse) to assess the Q_{ST} statistics (Wright, 1969; Spitze, 1993) as follows:

$$Q_{ST} = \frac{(\hat{\sigma}_B^2(1 + F_{IS}))}{(2\hat{\sigma}_W^2 + \hat{\sigma}_B^2(1 + F_{IS}))}$$

where $\hat{\sigma}_B^2$ is the estimated between-population genetic variance, $\hat{\sigma}_W^2$ is the estimated within-population genetic variance and F_{IS} is the Wright fixation index. The within- and the between-population genetic variances in the experiment were estimated with the following ANOVA model:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Pop}_i + \text{Fam}(\text{Pop})_{ij} + \text{rep}_k + R_{ijk} \quad (1)$$

where Pop is the random population effect, Fam is the random family effect, rep is the fixed replicate effect and R is the random residual. $\hat{\sigma}_B^2$ was estimated as the variance associated with the Pop effect and $\hat{\sigma}_W^2$ as the variance associated with Fam . Q_{ST} was computed when the Pop effect was significant.

Sources of variation for the progeny phenotypic values: Using all progeny (104 SELF, 104 WPC and 208 BPC), we tested the effect of cross type and the effect of the population of origin of the female plant with the following ANOVA model:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{ctype}_i + \text{OriginFpl}_j + (\text{ctype} \times \text{OriginFpl})_{ij} + \text{Fam}(\text{ctype} \times \text{OriginFpl})_{ijk} + \text{rep}_l + R_{ijkl} \quad (2)$$

where ctype is the fixed effect of cross type as defined in the crossing scheme (SELF, WPC and BPC), OriginFpl is the random effect of the population of origin of the female plant (Le Moulon, Rennes and Toulouse) and the other effects are the same as described in model (1).

To analyze how the relatedness between the parents of a cross affected the phenotypic value of the progeny, the

last model included the kinship coefficient K as covariates as follows:

$$Y_{ij} = \mu + \text{OriginFpl}_i + \alpha K + \beta K^2 + \alpha_i K + \beta_i K^2 + \text{rep}_j + R_{ij} \quad (3)$$

We included the square of the kinship coefficient (K^2) to define the phenotypic value of the progeny as a parabolic function of the kinship coefficient. A significant K^2 effect would indicate that there is an optimal kinship coefficient maximizing the progeny value.

To test for local adaptation, we have compared least-square means of WPC progeny from the Le Moulon population (considered as residents as experimentation took place in Le Moulon), with Rennes or Toulouse WPC progeny (considered as migrants) and corresponding BPC (Le Moulon by Rennes and Le Moulon by Toulouse in both direction). Least-square means were estimated using the following model:

$$Y_{ijkl} = \text{cross}_i + \text{Fam}(\text{cross})_{ij} + \text{rep}_k + R_{ijkl} \quad (4)$$

where cross is the fixed effect of the cross type taking into account the origin of the two parents and the other effects are the same as described in model (1).

All ANOVA analyses were run using PROC generalized linear model (GLM) in SAS (SAS Institute, 2000, Carry, NC, USA).

Hierarchical heterosis estimation: Finally, applying model (4) to the progeny of all crosses, we estimated heterosis at two levels: (1) within population and (2) between populations. For (1), we estimated *within-heterosis* for each population (Le Moulon, Rennes and Toulouse) as $(Y_{WPC,i} - Y_{SELF,i}) / (Y_{WPC,i})$ where $Y_{WPC,i}$ and $Y_{SELF,i}$ are, respectively, the mean trait value for the progeny from within-population crosses and from selfing in population i . For (2), we estimated *between-heterosis* for each pair of populations (Le Moulon-Rennes, Le Moulon-Toulouse and Rennes-Toulouse) as

$$\frac{(Y_{BPC,ij} - ((Y_{WPC,i} + Y_{WPC,j})/2))}{Y_{BPC,ij}}$$

where $Y_{BPC,ij}$ is the mean trait value for progeny from crosses between population i and population j for both directions. To test whether heterosis values are significantly different from 0, we applied a t -test on heterosis numerator with the ESTIMATE statement of generalized linear model (GLM) procedure in SAS.

Results**Population structure**

Table 1 shows diversity statistics for the 16 initial lines of the DM system and for the three parental populations. Although the Rennes population had a slightly lower H_e , the values for the Nei diversity were quite close in the populations of the twelfth generation and in the 16 initial lines. This result indicated that there was no marked loss of within-population diversity during the 12 generations of DM. This was confirmed by the allele number. A factorial component analysis showed that the initial diversity of the 16 lines was included in the total diversity of the three populations (data not shown). For all populations, the fixation index was rather close to 1, from 0.84 (Rennes population) to 0.98 (16 initial lines),

5. Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

Table 1 Diversity statistics for the three parental populations and for the 16 initial lines of the DM system

	n	A	H_e (s.e.)	F_{IS}	N_e (95% CI)
16 initial lines	16	4.0	0.61 (0.16)	0.98	—
Le Moulon population	67	5.0	0.61 (0.18)	0.93	173 (120–244)
Rennes population	70	3.9	0.51 (0.18)	0.84	67 (46–93)
Toulouse population	76	5.0	0.59 (0.15)	0.97	95 (68–128)

Abbreviations: A, mean allele number; DM, dynamic management; F_{IS} , fixation index; H_e , Nei diversity; n, sample size; N_e , effective size.

and significantly different from zero, as expected for a highly selfing species such as bread wheat. Genetic effective sizes ranged from 67 (95% confidence interval 46–93) for Rennes population to 173 (95% confidence interval 120–244) for Le Moulon population. They were consistent with the within-population diversity H_e : Rennes population had the smallest value ($H_e = 0.51$) and Le Moulon population the highest ($H_e = 0.61$). N_e values were 15–39 times smaller than demographic sizes corrected for selfing, that is, 2650.

Global differentiation over the three populations ($\theta = 0.07$ and $D_{EST} = 0.11$) was significantly different from zero (tests performed on θ only). Differentiation (θ) for each pair of populations ranged from 0.05 (0.09 for D_{EST}) between populations from Toulouse and Le Moulon to 0.10 (0.14 for D_{EST}) between populations from Toulouse and Rennes, with an intermediate value of 0.07 (0.10 for D_{EST}) between populations from Le Moulon and Rennes. The three values of θ were significantly different from zero, indicating spatial differentiation in the DM system. D_{EST} values were of the same order than θ while slightly higher. In addition, D_{EST} ranked pairs of populations as θ .

In model (1), the population effect was significant for PH, KNS and GWP. Q_{ST} values for these traits were 0.29, 0.19 and 0.19, respectively, whereas F_{ST} was 0.07 (Table 2). Therefore, differentiation for these quantitative traits was strong, as illustrated by the ratio Q_{ST}/F_{ST} equal to 4.14, 2.71 and 2.71, respectively. Although D_{EST} (0.11) was higher than θ , quantitative differentiation was still higher than neutral differentiation. Plant height differentiation was mainly because of the higher mean value for Rennes progeny (Table 2), whereas Toulouse progeny had significantly lower mean GWP and KNS, leading to significant Q_{ST} for these two traits.

Sources of variation for progeny phenotypic values

Model (2) showed significant cross type and family effects for all traits (Table 3). Progeny derived from selfing had significantly lower values than the progeny issued from the two other cross types for KNP, GWP, KNS and TKW, indicating marked individual inbreeding depression (Table 4). For PH and SNP, progeny from selfing had significantly lower mean values than between-population cross progeny and lower but not significantly different mean values than within-population cross progeny. Mean values for traits for progeny from between-population crosses were never significantly different than those of progeny from within-population crosses. The effect of the population of origin of the female plant was significant for all traits except for SNP and KNP. These results were consistent with the high Q_{ST} values estimated for PH, KNS and GWP on selfed progeny, whereas Q_{ST} was not significant for TKW. Progeny issued from female plants of the Rennes

Table 2 Quantitative differentiation among selfed progeny

Traits	Least-square means for the Pop effect			Q_{ST}
	Le Moulon	Rennes	Toulouse	
PH	106.27 (A)	117.89 (B)	103.89 (A)	0.29***
SNP	11.03	10.72	10.95	0 (NS)
KNP	472.10	481.75	443.52	0.1 (NS)
GWP	20.98 (A)	22.24 (A)	19.77 (B)	0.19*
KNP	42.44 (A)	44.43 (A)	40.24 (B)	0.19*
TKW	44.16	45.55	44.26	0.05 (NS)

Abbreviations: GWP, grain weight per plant; KNP, kernel number per plant; KNS, kernel number per spike; NS, non significant; PH, plant height; SNP, spike number per plant; TKW, thousand-kernel weight.

Capital letters near the least-square means correspond to groupings from pairwise multiple comparison between the populations of origin. Q_{ST} for all the traits.

* P -value < 0.05, *** P -value < 0.0001.

population were significantly taller and had higher TKW and GWP (Table 5). Progeny derived from female plants of the Toulouse population had a significantly lower KNS. The interaction between cross type and population of origin of the female plant was not significant for any trait except PH.

The kinship coefficient K had a significant effect on PH and GWP and a significant interaction effect with the female plant origin for TKW. K^2 also had a significant effect on TKW in interaction with the female plant origin. Despite these significant effects of K , model (3) explained only 4–23% of the phenotypic variation compared with 59–88% explained by model (2). The discrete cotype effect explained much more phenotypic variation than the continuous K covariate.

The cross effect of model (4) was significant only for PH, SNP and TKW. For these three traits, phenotypic values of Le Moulon WPC progeny were significantly lower than PH of Rennes WPC progeny but not different than PH of Toulouse WPC progeny (see Figure 2). Reciprocal between-population crosses did not show any asymmetry except for PH between the Toulouse population and the Le Moulon population. In this case, BPC progeny from a female plant from the Le Moulon population had a significantly lower PH than BPC progeny from male plants from the Le Moulon population. We found no indication of a specific maternal effect.

Within-population heterosis was much greater than between-population heterosis for all the quantitative traits (Figure 3). KNP and GWP showed large and significant heterosis in the Toulouse population (0.17 and 0.21, respectively) and in the Rennes population (0.12 and 0.17, respectively), whereas heterosis was not significant in the Le Moulon population (0.06 and 0.10,

Table 3 ANOVA table with model (2)

Source of variation	d.f.	PH		SNP		KNP		GWP		KNS		TKW	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
<i>ctype</i>	2	2112	4.93**	67	4.57*	662066	16.14***	2921	30.57***	1547	9.57***	1260	23.00***
<i>OriginFpl</i>	2	12392	28.93***	30	2.08	60167	1.47	435	4.55*	1136	7.02*	443	8.08**
<i>ctype</i> × <i>OriginFpl</i>	4	6772	7.90***	43	1.47	96513	1.18	289	1.51	161	0.50	102	0.93
<i>Fam</i> (<i>ctype</i> × <i>OriginFpl</i>)	400	88231	5.68***	2958	1.56***	8269727	1.26*	19270	1.28**	32750	1.97***	11085	2.02***
<i>Rep</i>	1	4202	108.71***	32	6.79**	11459	0.70	781	20.80***	2520	60.80***	3203	234.11*
Error	383	14879		1843		6394752		14681		16288		5390	
R ²			0.88		0.63		0.59		0.62		0.70		0.75

Abbreviations: GWP, grain weight per plant; KNP, kernel number per plant; KNS, kernel number per spike; PH, plant height; SNP, spike number per plant; TKW, thousand-kernel weight.

*P-value <0.05, **P-value <0.01 and ***P-value <0.0001.

Table 4 Phenotypic least-square means values for the cross type effect (SELF, WPC and BPC) in model (2)

Cross types	PH	SNP	KNP	GWP	KNS	TKW
SELF	109.30 (a)	10.91 (a)	465.87 (a)	20.99 (a)	42.36 (a)	44.74 (a)
WPC	112.76 (ab)	11.47 (ab)	528.95 (b)	25.12 (b)	45.58 (b)	47.28 (b)
BPC	113.27 (b)	11.60 (b)	533.93 (b)	25.54 (b)	45.56 (b)	47.76 (b)

Abbreviations: BPC, between-population cross; GWP, grain weight per plant; KNP, kernel number per plant; KNS, kernel number per spike; PH, plant height; SELF, SELFing; SNP, spike number per plant; TKW, thousand-kernel weight; WPC, within-population cross.

Letters beside values correspond to multiple comparisons between the cross types.

Table 5 Phenotypic least-square mean values for the origin of the female plant (Le Moulon, Rennes and Toulouse) in model (2)

Female plant origin	PH	SNP	KNP	GWP	KNS	TKW
Le Moulon	109.34 (a)	11.11 (a)	505.67 (a)	23.44 (a)	45.12 (a)	45.83 (a)
Rennes	117.69 (b)	11.26 (a)	522.18 (a)	24.98 (b)	45.60 (a)	47.69 (b)
Toulouse	108.30 (a)	11.61 (a)	500.91 (a)	23.31 (a)	42.78 (b)	46.27 (a)

Abbreviations: GWP, grain weight per plant; KNP, kernel number per plant; KNS, kernel number per spike; PH, plant height; SNP, spike number per plant; TKW, thousand-kernel weight.

Letters beside values correspond to multiple comparisons between the origins of the female plants.

respectively). Within-population heterosis was always low but significant for PH (0.03 for the three populations), KNS (0.04–0.08, not significant for the Rennes population) and TKW (0.04–0.06). In general, within-population heterosis for the different traits varied in the same proportions when changing from one population to another, except for heterosis for SNP that was marginally negative in the Le Moulon population and between 0.08 and 0.10 in the two other populations. Between-population heterosis was always low or negative whatever the populations and traits and never significant. There was slight outbreeding depression for SNP, KNS, KNP and GWP for the progeny of the cross between the Le Moulon and Rennes populations. Progeny from the Le Moulon and Toulouse crosses also showed weak outbreeding depression for KNS.

Discussion

Finding rules to apply when designing genetic rescue for threatened fragmented populations is a major issue in conservation biology (Tallmon et al., 2004; Edmands, 2007). In this study we used recently diverged experimental populations to which we applied self-pollination, within- and between-population crosses to investigate the link between the genetic structure of the subdivided

population, and fitness-related traits values in the first-generation offspring, by assessing within-population heterosis or inbreeding depression, between-population heterosis or genetic load and outbreeding depression. This approach is complementary and intermediate to analytical and simulation studies (Theodorou and Couvet, 2002; Glemin et al., 2003; Jaquière et al., 2009) and experimental crosses in natural populations (Fenster and Galloway, 2000; Newman and Tallmon, 2001; Willi et al., 2005) because much information on the history of the populations (time since divergence, population census sizes, initial diversity and so on) is available.

We found high and significant inbreeding depression within populations for four of six traits with systematic superiority of within-population cross progeny compared with selfed progeny. Moreover, little between-population heterosis was found, with similar values for offspring from between-population and within-population crosses.

Within-population heterosis

Wheat is a mainly selfing species with an outcrossing rate between 2 and 10% (Martin, 1990; Enjalbert et al., 1998; Enjalbert and David, 2000). In a selfing species, a high level of homozygosity is expected at all loci.

5. Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

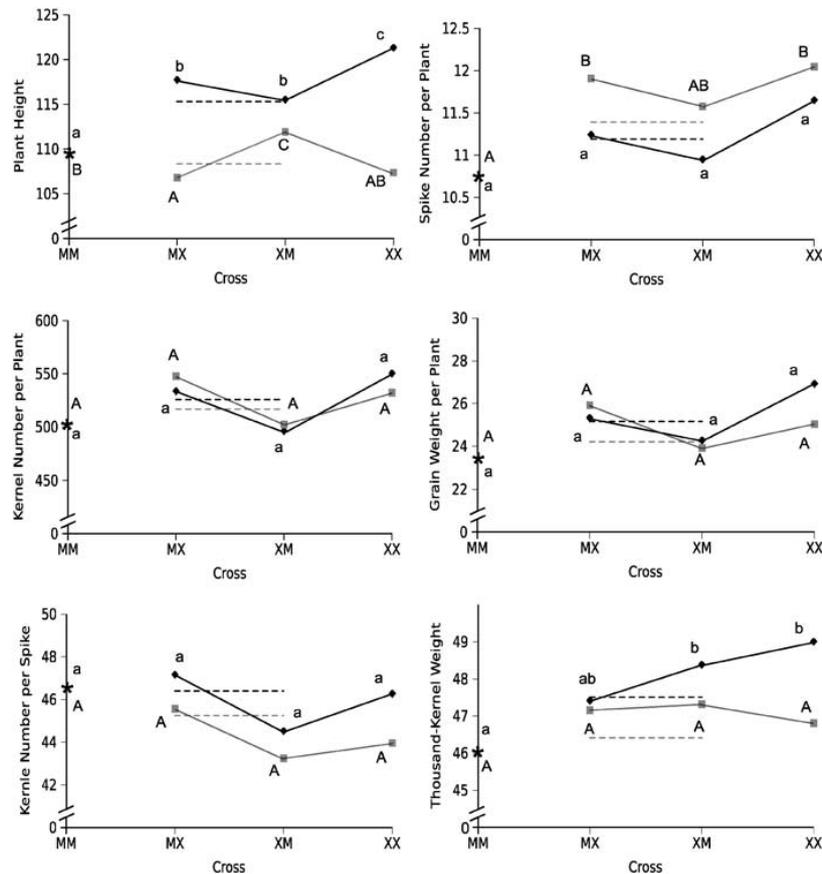


Figure 2 Least-square means values for the *cross* effect in model (4) for resident within-population crosses (Le Moulon \times Le Moulon (MM)), migrant within-population crosses (XX, X is Rennes or Toulouse) and between-population crosses (MX for crosses with the female plant from the Le Moulon population and XM for the reciprocal crosses). Black lines represent X parent from the Rennes population, and grey lines represent X parent from the Toulouse population. Horizontal dotted lines represent the mid-parent values between each couple MM and XX. Letters correspond to multiple comparisons between migrant, resident and BPC, lowercase for X=Rennes and uppercase for X=Toulouse.

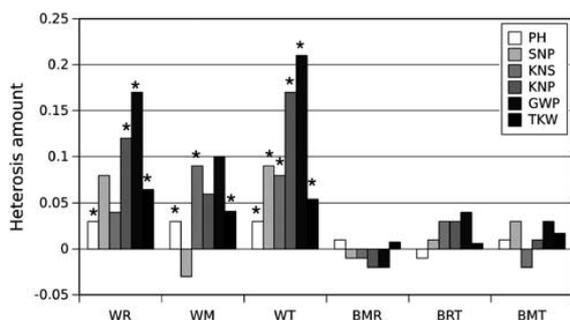


Figure 3 Bar chart of levels of within- and between-population heterosis for quantitative traits. GWP, grain weight per plant; KNP, kernel number per plant; KNS, kernel number per spike; PH, plant height; SNP, spike number per plant; TKW, thousand kernel weight. Heterosis level estimates are as follows: BMR, between Le Moulon and Rennes; BMT, between Le Moulon and Toulouse; BRT, between Rennes and Toulouse; WM, within Le Moulon; WR, within Rennes; WT, within Toulouse.

Recessive deleterious mutations are thus expressed, and selection is expected to purge them efficiently, leading to low inbreeding depression in a selfing population.

Unexpectedly, significant inbreeding depression was revealed in each DM population for four of the six studied traits in selfing and within-population cross progeny. Corresponding within-population cross progeny heterosis values ranged between 4 and 21%. These values are surprisingly higher than the reported values for wheat species: Dreisigacker *et al.* (2005) found heterosis values for grain yield ranging from -15.33 to 14.13% with a mean of 0.5% for crosses between specific inbred lines from a breeding program, whereas Husband and Schemske (1996) estimated that the mean within-population heterosis for 11 selfing species is 5% for seed production. In fact, inbreeding depression can be divided into two parts: one contributed by lethal or sub-lethal mutations that will be purged by inbreeding, independent of population size, unless the mutation is totally recessive (Nei, 1968; Bataillon and Kirkpatrick, 2000), and the second because of mildly deleterious mutations that are only partially recessive. This second type will be greatly sensitive to population size and it will decrease as population size becomes smaller and genetic drift increases (Bataillon and Kirkpatrick, 2000).

The evidence of inbreeding depression that we found within each population, associated with a supposedly

low genetic load, was consistent with the theoretical results of Bataillon and Kirkpatrick (2000) for effective sizes of approximately 100 and deleterious effects of mutations >0.05 . The researchers showed that small populations ($N \ll 100$) do not efficiently purge their genetic load, and have an overall reduction in fitness because of the accumulation of deleterious mutations. However, inbreeding depression is not visible when comparing crosses between individuals within these populations to self-fertilized individuals because of the fixation of many loci within the population as a whole. On the contrary, larger populations ($N \gg 100$) more efficiently purge their genetic load, and allelic diversity within the population is high enough to allow the detection of inbreeding depression when comparing selfed individuals to crosses between individuals within the population.

However, in our case, the two smallest populations, Rennes and Toulouse, showed stronger inbreeding depression than the largest population (Le Moulon). This discrepancy between theoretical expectations from Bataillon and Kirkpatrick (2000) and our experimental results could be explained by the difference of time scale taken into account in the two approaches. Their model assumes that the studied population is at mutation-selection-drift equilibrium. After 12 generations, we can hardly assume that DM populations reached such equilibrium. Simple simulations allowed us to assess the probability that a mildly deleterious mutation (mutation effect between 0.01 and 0.10) initially existing in the ancestral population would be eliminated after 12 generations and its frequency if instead of being eliminated it remained in the segregating population (see details in the Supplementary Information). For the three populations, the probability of fixation of the deleterious mutation is null (Supplementary Figure S1). The more probable case is that the deleterious mutation could still be segregating in the populations. The expected frequency of the deleterious mutation is lower in the Le Moulon population than in the two others (Supplementary Figure S2), which could explain the lower values of within-population heterosis in this population.

Between-population heterosis or outbreeding depression
Studying the first-generation progeny of crosses between individuals from two populations can reveal two mechanisms linked to the subdivided population structure. First, hybridization between divergent populations may result in loss of fitness, known as outbreeding depression. This decline in fitness can be attributed to the effect of locally maladapted genes, which have been selected in another environment (the ecological mechanism) (Waser, 1993) or to genetic mechanisms such as the break-up of positive epistatic interactions or underdominance effects (Lynch, 1991). Second, masking mildly deleterious mutations differentially fixed in the different populations (genetic load at the within-population level) may lead to between-population heterosis (Fenster and Galloway, 2000).

In our study, between-population progeny were never significantly different from within-population progeny, and heterosis at the between-population level was low ($<4\%$). This may indicate either both low between-

population heterosis and little outbreeding depression or compensation between the two phenomena.

Effective population size is expected to strongly influence the accumulation of a genetic load in a population, as small population sizes will increase genetic drift thus increasing fixation of deleterious alleles (Kimura *et al.* 1963). Simultaneously small population sizes will cause allele frequency variations among populations, leading to strong genetic differentiation. Hence, crosses between smaller populations are expected to show more heterosis than crosses between larger populations (Whitlock, 2000). On the other hand, larger divergence between populations might lead to outbreeding depression because of genetic incompatibilities (Escobar *et al.*, 2008). Finally, selection is expected to be more efficient in larger populations, when genetic drift is limited, allowing for local adaptation to develop in the population. Hence, crosses between large but locally adapted populations might also yield outbreeding depression. In this study, genetic effective sizes of the populations were relatively large (Table 1) compared with those of wild populations (Frankham, 1995, 1999; Siol *et al.*, 2007) and the F_{ST} estimated on 20 neutral markers between the three experimental wheat populations were quite low ($F_{ST} \approx 7\%$), which was consistent with reduced between-population heterosis. The slightly higher heterosis between the Rennes and Toulouse populations might be because of their larger differentiation ($F_{ST} = 0.10$) and lower N_e (Table 1).

We found high and significant Q_{ST} values, associated with Q_{ST}/F_{ST} ratios >1 for PH, KNS and GWP (Table 2). This can be interpreted as the consequence of divergent selection acting on these traits (Whitlock, 1999) as was shown by previous studies on these populations (Rhoné, 2008) and for other traits such as disease resistance (Paillard *et al.*, 2000) or heading date (Goldringer *et al.*, 2006). Non-additive effects such as dominance or epistasis are expected to lower the estimation of Q_{ST} (Whitlock, 1999; Goudet and Buchi, 2006). Hence, Q_{ST}/F_{ST} ratio of >1 is a conservative indication that, in addition to drift, the main force acting on the DM populations is divergent selection, potentially leading to local adaptation of populations in each contrasted site. Comparison of least-square means of the population origins estimated on selfed progeny gave indications of the differentiation at quantitative traits under divergent selection. For GWP and KNS, which are expected to be tightly correlated with fitness, there were no significant differences between Le Moulon and Rennes progeny. However, Toulouse progeny showed significantly lower values for these fitness-related traits, possibly indicating maladaptation of this population to Le Moulon environment. One possible explanation is that the environments of Le Moulon and Rennes are more similar and hence genes selected for local adaptation in Rennes are also adapted to Le Moulon, whereas locally adapted genes selected in Toulouse are maladapted in Le Moulon. Such a pattern is consistent with adaptation to climatic conditions, as climatic conditions of the two northern sites (Le Moulon and Rennes) are quite similar to each other, whereas very different from conditions in the southern site (Toulouse). We studied an aspect of local adaptation by considering that WPC progeny from the Le Moulon population were residents and WPC progeny from the Rennes and Toulouse populations were

migrants (see Figure 2). Results were not the same as for the analysis of selfed progeny except for PH and KNP. Indeed, there were no differences between populations for GWP and KNS (traits with a significant Q_{ST}), whereas there were significant differences for SNP and TKW (traits without significant Q_{ST}). This discrepancy could be explained by the fact that phenotypic values are expressions of genetic interactions between male and female alleles in progeny of crosses in addition to simple effect of homozygous female effects as in selfed progeny. This draws attention to the fact that estimation of Q_{ST} is dependent on the type of family used. Goudet and Buchi (2006) showed that progeny from self-pollination is the most efficient design to estimate Q_{ST} in the case of self-fertilizing species. Progeny from the Rennes populations showed significantly higher phenotypic values than progeny from the Le Moulon and Toulouse populations for SNP and TKW. This might indicate that the progeny from the Rennes population were more adapted than those from the Le Moulon population. However, differentiated traits for progeny of crosses (SNP and TKW) are less correlated with fitness than GWP because only part of the fitness components are taken into account, whereas GWP integrates both the number of offspring and survival potential of the offspring (heavier seeds are expected to be more viable). SNP and TKW could be therefore taken to represent life history traits and differences rather than different life history strategies.

In addition, the greater plant height of the Rennes progeny in both cases, selfed or progeny of crosses, might give them a competitive advantage when grown side by side with shorter families, even in the case of the 'local' families from Le Moulon.

Overall, knowing that the experimental design was not optimal to precisely assess local adaptation, we found only slight indications of local adaptation for the three populations, which was consistent with limited outbreeding depression. Finally, the most likely explanation is that both between-population heterosis and outbreeding depression were low in the DM system after 12 generations of divergent evolution.

Optimal crossing distance

A balance of the effects of heterosis and outbreeding depression as a function of relatedness between crossed individuals is expected to lead to the existence of an optimal genetic distance for genetic rescue strategies (for example, in Willi *et al.*, 2005 and reviewed in Tallmon *et al.*, 2004). In this study, we found no clear relationship (neither linear nor quadratic) between the kinship coefficient for pairs of crossed individuals and progeny phenotypic values. In fact, kinship coefficients averaged for each type of cross were very similar, although high values of kinship were slightly more frequent for within-population pairs of individuals (see Supplementary Figure S3). This result shows that neutral diversity is not as informative as desired for assessing potentially adaptive diversity in the DM system, although linkage disequilibrium is expected to be high in a selfing species (Golding and Strobeck, 1979). However, low linkage disequilibrium in DM has been shown around genes submitted to high selective pressure (Raquin *et al.*, 2008).

Conclusion

On the basis of our results from between-population cross progeny, we think that planned migrations between populations would not bring high heterosis in the DM system, thus reducing its possible positive effect. According to Jaquière *et al.* (2009), information from neutral markers indicating that within-population diversity is still at a sufficient level is a clue that there are no important viability problems within the populations. Neutral marker information did not provide relevant predictive information on phenotypic traits and thus on the evolutionary potential of the populations. This might be a general feature to many experimental crossing experiments. Indeed, complementary information about the subdivided population (for example, presence of local adaptation) is necessary to have a more precise picture of the mechanisms involved in the population under consideration.

Lynch (1991) raised the fact that although heterosis may occur in the first generation after crosses, recombination between parental chromosomes and the break-up of coadapted gene complexes could lead to increased outbreeding depression in the following generations. Genetic rescue effects should then be studied beyond the first generation and these studies are currently in progress with the DM wheat populations. In addition, to further study local adaptation in the DM system, cross progeny have to be studied in each site of parental origin to assess the effects of adaptive genes in the environment in which they have been selected.

Local adaptation could be an important mechanism and is found to be quite frequent in natural populations (Merila and Crnokrak, 2001; McKay and Latta, 2002; Hufford and Mazer, 2003). Only very few theoretical studies take into account local adaptation through an environmental gradient along a species range (Garcia-Ramos and Kirkpatrick, 1997; Alleaume-Benharira *et al.*, 2006). Integrating this kind of selection in theoretical or simulation approaches could be very useful to help conservation biologists to make management decisions.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to the anonymous reviewers for their constructive and detailed comments. We thank J Enjalbert for insightful discussions, providing the simulation program and careful reading of the paper, J Dawson for relevant comments and English correction of the paper and O Ronce and S Glémin for relevant suggestions during this work. YR was funded by a grant from the MENRT. This work has been completed despite the obstacles created due to the French research and University organizational reforms and despite the time and effort devoted to resisting them. This resistance is crucial for keeping the public service of research and university teaching alive in France.

References

- Alleaume-Benharira M, Pen IR, Ronce O (2006). Geographical patterns of adaptation within a species' range: interactions between drift and gene flow. *J Evol Biol* **19**: 203–215.
- Bataillon T, Kirkpatrick M (2000). Inbreeding depression due to mildly deleterious mutations in finite populations: size does matter. *Genet Res* **75**: 75–81.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2000). GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000*.
- Bossuyt B (2007). Genetic rescue in an isolated metapopulation of a naturally fragmented plant species, *Parnassia palustris*. *Conserv Biol* **21**: 832–841.
- Dreisigacker S, Melchinger AE, Zhang P, Ammar K, Flache-necker C, Hoisington D et al. (2005). Hybrid performance and heterosis in spring bread wheat, and their relations to SSR-based genetic distances and coefficients of parentage. *Euphytica* **144**: 51–59.
- Edmunds S (2007). Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol Ecol* **16**: 463–475.
- Enjalbert J, David JL (2000). Inferring recent outcrossing rates using multilocus individual heterozygosity application to evolving wheat populations. *Genetics* **156**: 1973–1982.
- Enjalbert J, Goldringer I, David J, Brabant P (1998). The relevance of outcrossing for the dynamic management of genetic resources in predominantly selfing *Triticum aestivum* L. (bread wheat). *Genet Sel Evol* **30**: 197–211.
- Escobar JS, Nicot A, David P (2008). The different sources of variation in inbreeding depression, heterosis and outbreeding depression in a metapopulation of *Physa acuta*. *Genetics* **180**: 1593–1608.
- Fenster C B, Galloway L F (2000). Inbreeding and outbreeding depression in natural populations of *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Conserv Biol* **14**: 1406–1412.
- Fischer M, Matthies D (1997). Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *Am J Bot* **84**: 1685.
- Frankham R (1999). Quantitative genetics in conservation biology. *Genet Res* **74**: 237–244.
- Frankham R (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genet Res* **66**: 95–107.
- Galloway LF, Etterson JR (2005). Population differentiation and hybrid success in *Campanula americana*: geography and genome size. *J Evol Biol* **18**: 81–89.
- García-Ramos G, Kirkpatrick M (1997). Genetic models of adaptation and gene flow in peripheral populations. *Evolution* **51**: 21–28.
- Glemin S, Ronfort J, Bataillon T (2003). Patterns of inbreeding depression and architecture of the load in subdivided populations. *Genetics* **165**: 2193–2212.
- Golding GB, Strobeck C (1979). Linkage disequilibrium in a finite population that is partially selfing. *Genetics* **94**: 777–789.
- Goldringer I, Brabant P, Gallais A (1997). Estimation of additive and epistatic genetic variances for agronomic traits in a population of doubled-haploid lines of wheat. *Heredity* **79**: 60–71.
- Goldringer I, Enjalbert J, David J, Paillard S, Pham JL, Brabant P (2001). Dynamic management of genetic resources: a 13-year experiment on wheat. In: Cooper H, Spillane C, Hodgkin T (eds). *Broadening the Genetic Base of Crop Production*. CABI Publishing: Wallingford, UK, pp 245–269.
- Goldringer I, Prouin C, Rousset M, Galic N, Bonnin I (2006). Rapid differentiation of experimental populations of wheat for heading time in response to local climatic conditions. *Ann Bot* **98**: 805–817.
- Goudet J, Buchi L (2006). The effects of dominance, regular inbreeding and sampling design on Q_{ST} , an estimator of population differentiation for quantitative traits. *Genetics* **172**: 1337–1347.
- Greiff JM, Van Vuuren GJJ, Kryger P, Moore JC (2009). Outbreeding and possibly inbreeding depression in a pollinating fig wasp with a mixed mating system. *Heredity* **102**: 349–356.
- Guyomarc'h H, Sourdille P, Charmet G, Edwards K, Bernard M (2002). Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theor Appl Genet* **104**: 1164–1172.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* **2**: 618–620.
- Henry JP, Pontis C, David J, Gouyon PH (1991). An experiment on dynamic conservation of genetic resources with metapopulations. In: Seitz A, Loeschke V (eds). *Species Conservation: A Population Approach*. Birkhäuser Verlag: Basel, pp 185–198.
- Houle D (1992). Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics* **130**: 195–204.
- Hufford KM, Mazer SJ (2003). Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends Ecol Evol* **18**: 147–155.
- Husband BC, Schemske DW (1996). Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* **50**: 54–70.
- Jaquière J, Guillaume F, Perrin N (2009). Predicting the deleterious effects of mutation load in fragmented populations. *Conserv Biol* **23**: 207–218.
- Jost L (2008). GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol* **17**: 4015–4026.
- Keller LF, Waller DM (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol Evol* **17**: 230–241.
- Kimura M, Maruyama T, Crow JF (1963). The mutation load in small populations. *Genetics* **48**: 1303–1312.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am J Bot* **82**: 1420.
- Lynch M (1991). The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution* **45**: 622–629.
- Lynch M, Conery J, Burger R (1995). Mutation accumulation and the extinction of small populations. *Am Nat* **146**: 489–518.
- Madsen T, Shine R, Olsson M, Wittzell H (1999). Conservation biology: restoration of an inbred adder population. *Nature* **402**: 34–35.
- Martin TJ (1990). Outcrossing in twelve hard red winter wheat cultivars. *Crop Sci* **30**: 59–62.
- McKay JK, Latta RG (2002). Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends Ecol Evol* **17**: 285–291.
- Merila J, Crnokrak P (2001). Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *J Evol Biol* **14**: 892–903.
- Nei M (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press: New York, NY, USA.
- Nei M (1968). The frequency distribution of lethal chromosomes in finite populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **60**: 517–524.
- Nei M, Tajima F (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**: 145–163.
- Newman D, Tallmon DA (2001). Experimental evidence for beneficial fitness effects of gene flow in recently isolated populations. *Conserv Biol* **15**: 1054–1063.
- Paillard S, Goldringer I, Enjalbert J, Doussinault G, Vallavieille-Pope C, Brabant P (2000). Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. I—Is specific seedling resistance selected? *Theor Appl Genet* **101**: 449–456.
- Pollak E (1987). On the theory of partially inbreeding finite populations. I. Partial selfing. *Genetics* **117**: 353–360.
- Raquin A, Brabant P, Rhoné B, Balfourier F, Leroy P, Goldringer I (2008). Soft selective sweep near a gene that increases plant height in wheat. *Mol Ecol* **17**: 741–756.

5. Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

- Rhoné B (2008). Genetic mechanisms involved in climatic adaptation of experimentally evolving populations of bread wheat. Msc Thesis, AgroParisTech, Paris, France.
- Rhoné B, Remoué C, Galic N, Goldringer I, Bonnin I (2008). Insight into the genetic bases of climatic adaptation in experimentally evolving wheat populations. *Mol Ecol* **17**: 930–943.
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MT, Leroy P *et al.* (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics* **149**: 2007–2023.
- SAS Institute (2000). *SAS/STAT user guide*, Version 8. SAS Publishing: Cary, NC, USA.
- Schierup MH, Christiansen FB (1996). Inbreeding depression and outbreeding depression in plants. *Heredity* **77**: 461–468.
- Siol M, Bonnin I, Olivieri I, Properi JM, Ronfort J (2007). Effective population size associated with self-fertilization: lessons from temporal changes in allele frequencies in the selfing annual *Medicago truncatula*. *J Evol Biol* **20**: 2349–2360.
- Somers DJ, Isaac P, Edwards K (2004). A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* **109**: 1105–1114.
- Spitze K (1993). Population Structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* **135**: 367–374.
- Tallmon DA, Luikart G, Waples RS (2004). The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends Ecol Evol* **19**: 489–496.
- Theodorou K, Couvet D (2002). Inbreeding depression and heterosis in a subdivided population: influence of the mating system. *Genet Res* **80**: 107–116.
- Theodorou K, Couvet D (2006). Genetic load in subdivided populations: interactions between the migration rate, the size and the number of subpopulations. *Heredity* **96**: 69–78.
- Vila C (2003). Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proc R Soc B Biol Sci* **270**: 91–97.
- Wang J (2004). Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conserv Biol* **18**: 332–343.
- Waples RS (1989). A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* **121**: 379–391.
- Waser NM (1993). Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. In: Thornhill NW (ed). *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives*. University of Chicago Press: Chicago, pp 173–199.
- Waser NM, Price MV, Shaw RG (2000). Outbreeding depression varies among cohorts of *Ipomopsis aggregata* planted in nature. *Evolution* **54**: 485–491.
- Weir B, Cockerham C (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358–1370.
- Whitlock MC (1999). Neutral additive genetic variance in a metapopulation. *Genet Res* **74**: 215–221.
- Whitlock MC (2000). Local drift load and the heterosis of interconnected populations. *Heredity* **84**: 452–457.
- Willi Y, Fischer M (2005). Genetic rescue in interconnected populations of small and large size of the self-incompatible *Ranunculus reptans*. *Heredity* **95**: 437–443.
- Willi Y, Van Buskirk J, Fischer M (2005). A threefold genetic allee effect population size affects cross-compatibility, inbreeding depression and drift load in the self-incompatible *ranunculus reptans*. *Genetics* **169**: 2255–2265.
- Wright S (1969). *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol. 2. *The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press: Chicago.

Supplementary Information accompanies the paper on Heredity website (<http://www.nature.com/hdy>)

Supplementary material

Simulation study of the maintenance of the initial mutation load

In order to take into account the fact that our populations have probably not reached the mutation-selection-drift equilibrium as assumed by the theoretical models, we have computed the probability of fixation/elimination of a mildly deleterious mutation and its frequency in the segregating case after 12 generations. Simulations were performed using a locally developed program. As wheat is a mainly selfing species, only homozygous genotypes were simulated. Three mutation effect values were used: 0.01, 0.05 and 0.10. The three effective sizes estimated using microsatellites data were used. Ancestral genotypes of the DM populations were 16 nearly homozygous genotypes, so the two initial values of the deleterious mutation frequency were 1/16 and 2/16. One thousand replicates were done for each combination of parameters. Probability of fixation/segregation was computed as the percentages of fixation/segregation of the deleterious/wild mutation over the 1000 replicates. Expected frequency of the deleterious mutation was computed as the mean frequency of the deleterious mutation over the segregating cases.

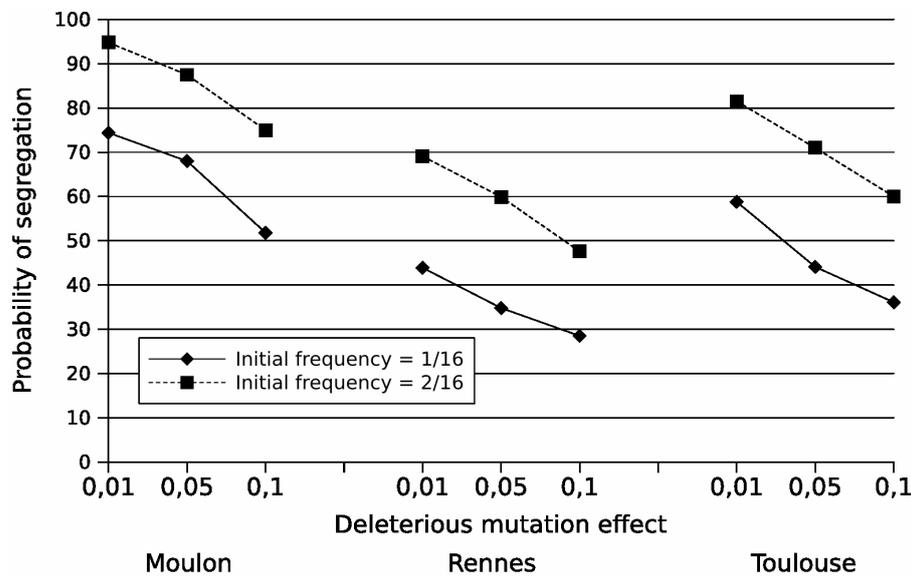


Figure S1: Probability of segregation of the two alleles in the population for the three populations corresponding to three different values of effective sizes (Le Moulon: 173, Rennes: 67 and Toulouse: 95) and for three values of deleterious mutation effect.

5. Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

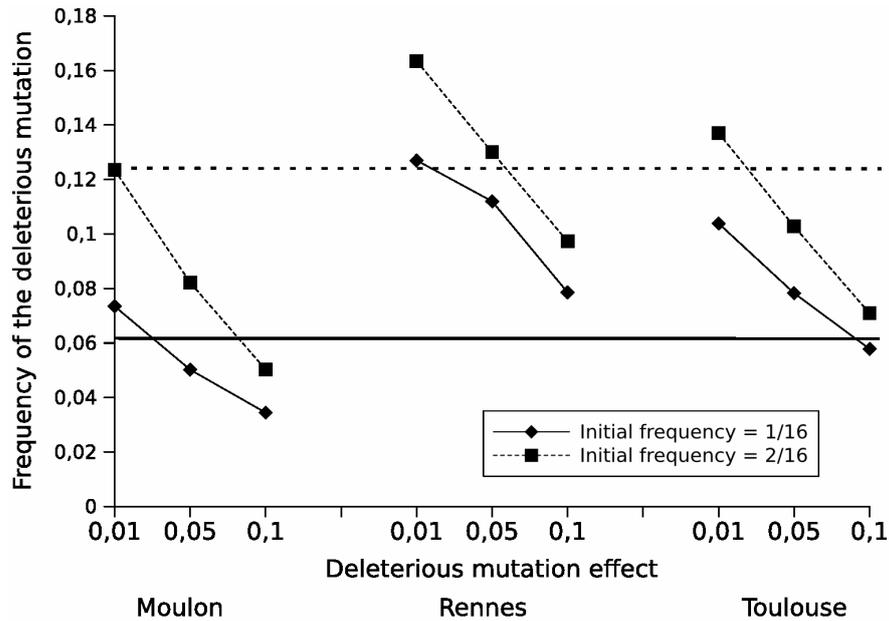


Figure S2: Expected frequency of the deleterious mutation in the segregating cases for the three populations corresponding to three different values of effective sizes (Le Moulon: 173, Rennes: 67 and Toulouse: 95) and for three values of deleterious mutation effect. Horizontal lines correspond to the initial value of the deleterious mutation frequency (solid line: 1/16 and ticks: 2/16).

5.2.2 Résultats complémentaires sur la première génération

Les résultats présentés dans l'article ne concernent que les populations extensives (ME, RE et TE) des trois sites. Cependant, les descendance de première génération des croisements inter-populations intra-site (WSC entre la population intensive et extensive du même site) et les descendance des croisements avec 'Piko' (PIKO) ont aussi été évaluées au Moulon avec les autres descendance de premières génération. Les valeurs de ces descendance sont à prendre avec précaution étant donné que ni les parents issus des populations intensives ni 'Piko' n'ont été évalués conjointement avec les descendance de premières générations.

Modèle d'analyse des caractères quantitatifs Les caractères quantitatifs ont été analysés avec le même modèle que le modèle (2) de l'article :

$$Y_{ijkl} = \mu + type_i + OrigineMère_j + (type \times OrigineMère)_{ij} + Fam(type \times OrigineMère)_{ijk} + rep_l + \varepsilon_{ijkl} \quad (5.1)$$

avec *type* l'effet fixe du type de croisement (SELF, WPC, WSC, BPC et PIKO), *OrigineMère* l'effet aléatoire de la population d'origine de la plante mère (ME, RE et TE), *Fam* l'effet aléatoire de la famille et *rep* l'effet fixe de la répétition.

Résultats Tous les effets du modèle (5.1) sont significatifs pour tous les caractères sauf l'interaction entre *OrigineMère* et *type* pour NGP, NGPE, PGP et PMG et l'effet *rep* et *OrigineMère* pour NGP (Table 5.1). Comme dans les résultats présentés dans l'article, l'effet *type* est significatif pour tous les caractères.

Les valeurs des descendance d'autofécondations sont significativement plus faibles que les valeurs des descendance des autres types de croisements (sauf PIKO) pour tous les caractères sauf NGPE (Figure 5.1). Ce résultat est cohérent avec la mise en évidence de dépression de consanguinité dans l'article sur la première génération. La valeur des descendance de croisement inter-populations intra-site (WSC, pas analysées dans l'article) n'est pas significativement différente des descendance des croisements intra-population (WPC) ou inter-populations inter-sites (BPC) pour NGP, NGPE et PMG. Elle est significativement plus faible que la valeur des descendance de BPC pour NEP et PGP. Elle est par contre significativement supérieure à tous les types de descendance pour HP.

5. Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

Les croisements avec 'Piko' sont dans le groupe de plus faibles valeurs pour HP, NEP et PMG. Pour NGP et PGP, les descendance des croisements avec 'Piko' sont dans le groupe de valeurs intermédiaires. Enfin les descendance des croisements avec 'Piko' présentent la plus haute valeur pour NGPE de façon significative.

Encore une fois ces résultats sont à prendre avec précaution du fait que les parents issus des populations intensives et la variété 'Piko' ne sont pas semés avec le reste de la première génération au Moulon.

Source of variation	d.f.	HP		NEP		NGP		NGPE		PGP		PMG	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
rep	1	6039	169,32***	68	15,67***	1620	0,10	3492	79,34***	1652	44,45***	5352	365,61***
Fam(OrigineMère \times type)	600	116217	5,43***	4229	1,61***	12498760	1,27**	49678	1,88***	28379	1,28**	17033	1,94***
OrigineMère	2	14561	39,06***	60	4,32*	13848	0,33	2255	13,83***	291	3,08*	671	12,00***
type	4	8887	11,89***	272	9,80***	800368	9,62***	6539	20,03***	2960	15,64***	2752	24,59***
OrigineMère \times type	8	9158	6,13***	142	2,56**	207825	1,25	896	1,37	420	1,11	204	0,91
Erreur	560	170817		2493		9415658		25311		21267		8432	

Table 5.1: Table d'ANOVA pour le modèle (5.1)

5. Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

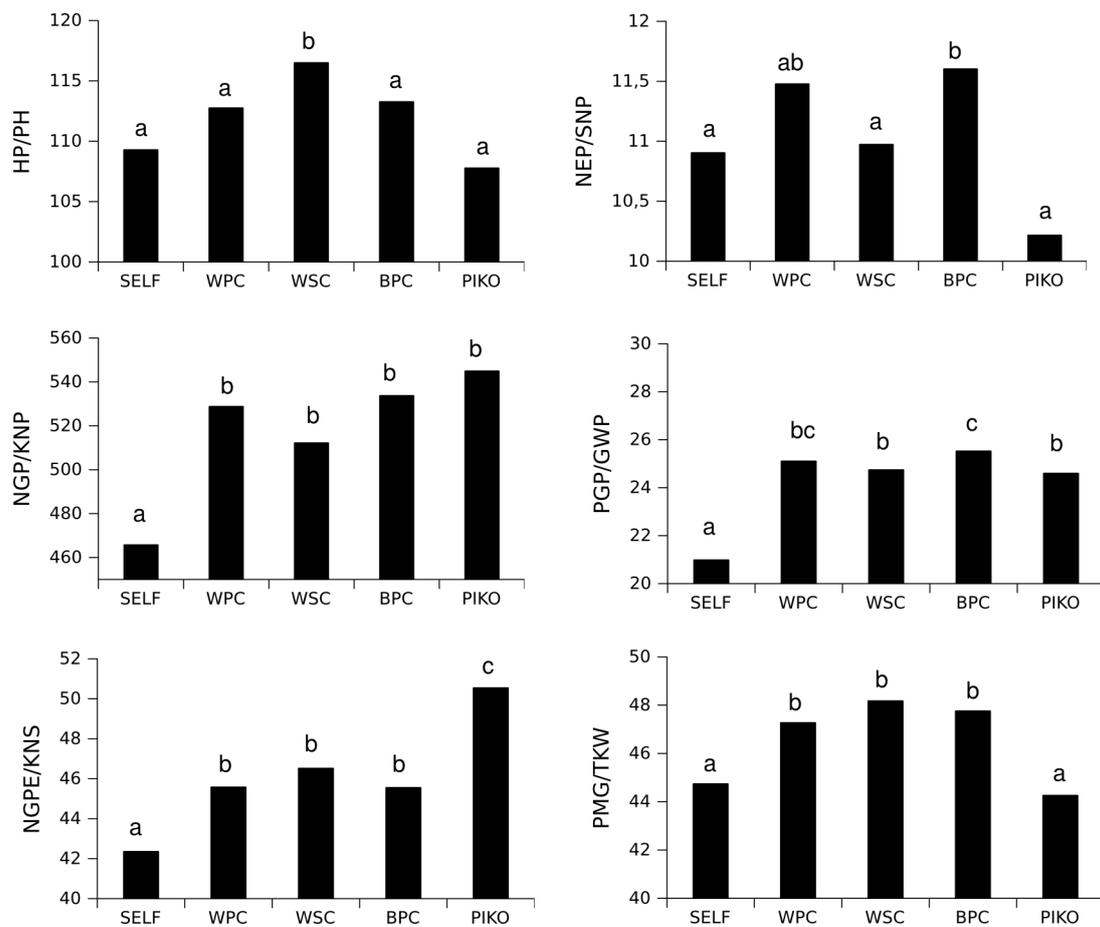


Figure 5.1: Moyennes ajustées pour l'effet *type* du modèle (5.1). Les lettres représentent les groupes statistiques.

5.3 Deuxième génération de descendances dans un dispositif multilocal

5.3.1 Matériels et méthodes

5.3.1.1 Matériel végétal

Comme expliqué dans la partie *Schéma de croisements* du chapitre *Matériels et Méthodes*, 5 types de croisements ont été réalisés sur chacune des plantes femelles échantillonnées dans les 3 populations extensives étudiées :

- une autofécondation (SELFing, SELF)
- un croisement avec un mâle de la même population (Within-Population Cross, WPC)
- un croisement avec un mâle de la population intensive du même site géographique (Within-Site Cross, WSC)
- un croisement avec un mâle de chaque population extensive des deux autres sites (Between-Sites Cross, BSC)
- un croisement avec la variété 'Piko' (PIKO).

Des autofécondations ont été réalisées sur 3 épis de 2 plantes par famille de première génération afin de produire la deuxième génération.

En plus des familles de deuxième génération, des autofécondations de la variété 'Piko' (notées PI) et de parents mâles des populations intensives (notées SELI) font partie du matériel végétal étudié.

5.3.1.2 Dispositif expérimental

Les familles de seconde génération ont été semées à l'automne 2007 dans les 3 sites d'origine des populations étudiées : Le Moulon, Rennes et Toulouse. Dans chaque site expérimental, 2 répétitions complètement randomisées ont été mises en place. Chaque famille est représentée dans chaque répétition par un semis en ligne de 15 graines. Pour chaque origine de population (Le Moulon, Rennes et Toulouse), 20 familles ont été prises pour représenter les croisements SELF, WPC, WSC et BSC avec chacune des deux autres populations extensives et les descendances autofécondées des parents mâles intensifs, et 15 familles ont été prises pour les croisements PIKO. La variété 'Piko' est représentée par 20 lignes dans chaque répétition.

A Rennes, à Toulouse et dans la première répétition au Moulon, les notations

phénotypiques ont été faites globalement sur l'ensemble de chaque ligne. Dans la deuxième répétition au Moulon, les notations ont été faites individuellement pour chaque plante.

5.3.1.3 Analyses des caractères quantitatifs

Dans la répétition pour laquelle les notations ont été faites individuellement, nous pensions que la position de la plante dans la ligne pouvait influencer la valeur des caractères mesurés du fait de différences d'exposition à la lumière et d'effets de bord pour les deux extrémités de la ligne. Nous avons donc corrigé la valeur phénotypique de chaque plante pour l'effet position dans la ligne et utiliser la moyenne ajustée de la ligne par la suite.

Dans les modèles d'analyses suivant, chaque famille est représentée par une valeur pour chaque répétition dans chaque site.

Analyse des croisements entre populations L'effet du type de croisement sur la valeur phénotypique des descendance a été testé sur les descendance issues des types de croisement suivant : SELF, WPC, WSC et BSC, dans le modèle d'ANOVA suivant :

$$Y_{ijklmn} = \mu + type_i + OrigineMère_j + site_k + (type \times OrigineMère \times site)_{ijk} + Fam(type \times OrigineMère)_l + rep(site)_{mk} + R_{ijklmn} \quad (5.2)$$

dans lequel *type* est l'effet fixe type de croisements dans lequel les autofécondations provenant des populations extensives ont été différenciées de celles provenant des populations intensives (respectivement notée SELF et SELI), *OrigineMère* est l'effet aléatoire de la population d'origine de la plante mère, *site* est l'effet fixe du site d'expérimentation, *Fam* est l'effet aléatoire de la famille et *rep* l'effet fixe de la répétition dans chaque site.

Nous avons estimé l'hétérosis au niveau populationnel à 3 niveaux différents : (i) intra-population extensive (H_{WP}), (ii) intra-site inter-populations du même site (H_{WS}) et (iii) inter-sites par paire de sites (H_{BS}). Les trois hétérosis sont calculés de la façon suivante :

$$H_{WP,i} = \frac{(Y_{WPC,i} - Y_{SELF,i})}{Y_{WPC,i}} \quad (5.3)$$

$$H_{WS,i} = \frac{(Y_{WSC,i} - \frac{(Y_{SELI,i} + Y_{SELF,i})}{2})}{Y_{WSC,i}} \quad (5.4)$$

$$H_{BS,ij} = \frac{(Y_{BSC,ij} - \frac{(Y_{SELF,i} + Y_{SELF,j})}{2})}{Y_{BSC,ij}} \quad (5.5)$$

avec :

- $Y_{SELF,i}$ la valeur moyenne des descendance issues d'autofécondation de la population extensive du site i
- $Y_{SELI,i}$ la valeur moyenne des descendance issues d'autofécondation de la population intensive du site i
- $Y_{WPC,i}$ la valeur moyenne des descendance issues des croisements intra-population extensive du site i
- $Y_{WSC,i}$ la valeur moyenne des descendance issues des croisements intra-site pour l'origine i
- $Y_{BSC,ij}$ la valeur moyenne des descendance issues des croisements entre les populations extensives des sites i et j dans les deux sens de croisement.

Les valeurs moyennes utilisées pour estimer les différents hétérosis ont été estimées à l'aide du modèle suivant :

$$Y_{ijklm} = crois_i + site_j + (crois \times site)_{ij} + Fam(crois)_k + rep(site)_l + R_{ijklm} \quad (5.6)$$

avec *crois* l'effet fixe du type de croisement prenant en compte l'origine des deux parents, les autres effets étant les mêmes que dans le modèle (5.2). Ces mesures d'hétérosis ont été estimés d'une part en moyenne pour les 3 sites expérimentaux et séparément pour chaque site. Il faut noter que, dans cette partie, les hétérosis sont estimées relativement aux valeurs des descendance d'autofécondations de chaque population, contrairement aux hétérosis estimées dans l'analyse de la première génération qui sont relatives aux valeurs des descendance en croisement pour les populations considérées (cf. partie 5.2.1, page 117).

Analyse des croisements avec 'Piko' L'effet du croisement avec un génotype non apparenté aux populations de Gestion Dynamique, 'Piko', a été testé sur les descendance issues des types SELF et PIKO ainsi que sur les individus de la variété 'Piko' avec le modèle d'ANOVA suivant :

$$Y_{ijklm} = \mu + crois_i + site_j + (crois \times site)_{ij} + Fam(crois)_{ki} + rep(site)_{lj} + R_{ijklm} \quad (5.7)$$

dans lequel *crois* est l'effet du croisement et prend comme niveaux de facteurs :

- MA, RA et TA pour les descendances issues d'autofécondations des 3 populations extensives (respectivement Le Moulon, Rennes et Toulouse)
- MP, RP et TP pour les descendances issues des croisements avec 'Piko' pour les plantes mères ayant pour origine respectivement Le Moulon, Rennes et Toulouse
- PI pour les individus de la variété 'Piko'.

Les croisements avec la variété 'Piko' ont été analysés séparément afin de pouvoir prendre en compte un effet origine de la plante mère dans les modèles d'analyse pour les croisements entre populations, 'Piko' n'appartenant à aucune population.

De la même manière que pour les croisements entre populations, l'hétérosis pour les croisements avec 'Piko' a été calculé séparément pour chaque origine de la plante mère :

$$H_{PIKO,i} = \frac{(Y_{XP,i} - \frac{(Y_{XA,i} + Y_{PI})}{2})}{Y_{XP,i}} \quad (5.8)$$

avec $Y_{XP,i}$ la valeur moyenne des descendants des croisements avec 'Piko' pour chaque origine i (MP, RP ou TP), $Y_{XA,i}$ la valeur moyenne des autofécondations pour chaque origine i (MA, RA ou TA) et Y_{PI} la valeur moyenne des individus de 'Piko'. Ces hétérosis ont été calculés en moyenne sur les trois sites et séparément pour chaque site.

5.3.2 Résultats

5.3.2.1 Effets des croisements entre populations

Dans le modèle (5.2), le type de croisement a un effet significatif sur tous les caractères sauf NGPE (Table 5.2). L'origine de la plante mère a un effet significatif sur tous les caractères sauf NGP, et le site d'expérimentation a un effet très hautement significatif sur tous les caractères (cf. chapitre 3, page 49). L'effet famille est également toujours très significatif. Lorsque l'on compare les valeurs moyennes ajustées des cinq types de croisements et des autofécondations, on voit que aucun des caractère ne montre de dépression de consanguinité intra-population significative. En effet, les descendances issues d'autofécondations (SELF), bien que présentant des valeurs phénotypiques inférieures aux descendances issues des croisements intra-population (WPC), ne sont jamais significativement différentes de ces dernières (Figure 5.2). Par contre, les descendances des croisements entre populations du même site d'origine (WSC) montrent des valeurs phénotypiques significativement supérieures à celles

des descendances issues d'autofécondations des populations extensives (SELF) pour HP et à celles des autofécondations des deux types de populations (SELF et SELI) pour NGP, PMG et PGP (Figure 5.2). Enfin, les descendances des croisements intersites (BSC) ont des valeurs significativement supérieures aux valeurs phénotypiques des descendances d'autofécondation (SELF) pour HP, PMG et PGP.

La triple interaction entre *site*, *OrigineMère* et *type* indique si l'expression de l'effet *type* de croisement diffère selon l'origine de la plante mère et selon le site d'expérimentation. Elle est significative pour HP, PMG et PGP (Table 5.2). L'effet de cette interaction sur ces 3 caractères est modéré : les classements des différents types de croisements pour chaque combinaison "origine de la plante mère par un site" sont assez proches de ceux observés pour l'effet *type* global (Figure 5.3). Globalement, c'est dans l'expérimentation réalisée à Rennes que des différences entre descendances s'expriment le plus. Cependant, dans un cas seulement (le caractère PGP), les descendances issues des plantes mères de la population de Rennes sont significativement différentes. De la même manière, les descendances des plantes mère de la population du Moulon ne montrent pas plus de différences au Moulon, et celles issues des plantes mères de la population de Toulouse ne montrent pas plus de différences qu'évaluées à Rennes.

5. Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

Source of variation	d.f.	HP		NEP		NGPE		NGP		PMG		PGP	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
type	4	9027	6,23***	135	3,09*	273	0,67	458246	5,08**	1210	6,19***	1608	8,82***
lieumr	2	17221	23,76***	130	5,96**	5655	27,84***	89251	1,98	1300	13,30***	414	4,54*
site	2	188269	1947,30***	3443	258,69***	24555	319,03***	13528256	551,98***	26668	1329,28***	40016	788,27***
site × type × lieumr	28	2348	1,73**	267	1,43	1435	1,33	497896	1,45	1237	4,41***	1257	1,77**
Fam(type × lieumr)	345	125826	7,54***	3796	1,65***	35571	2,68***	7866382	1,86***	17204	4,97***	15894	1,82***
rep	3	27597	190,30***	271	13,59***	2302	19,95***	361690	9,84***	6519	216,64***	66	0,87
R	1709	82614		11121		63690		20305340		16882		42160	

Table 5.2: Table d'ANOVA pour le modèle (5.2)

Source of variation	d.f.	HP		NEP		NGPE		NGP		PMG		PGP	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
crois	6	19824	11,52***	439	8,40***	3851	5,92***	852604	6,58***	2756	10,54***	2646	10,32***
site	2	65903	903,08***	906	75,37***	10161	120,39***	4107920	191,39***	12096	643,05***	13147	309,33***
crois × site	12	1797	4,11***	182	2,53**	2875	5,68***	265323	2,06*	960	8,51***	616	2,41**
Fam(crois)	118	34209	7,95***	1033	1,46**	12927	2,60***	2567260	2,03***	5193	4,68***	5081	2,03***
rep(site)	3	5158	47,13***	89	4,92**	1319	10,42***	91105	2,83*	2266	80,33***	36	0,57
R	583	21272		3420		23760		6020619		5379		11965	

Table 5.3: Table d'ANOVA pour le modèle (5.7)

5.3. Deuxième génération de descendance dans un dispositif multilocal

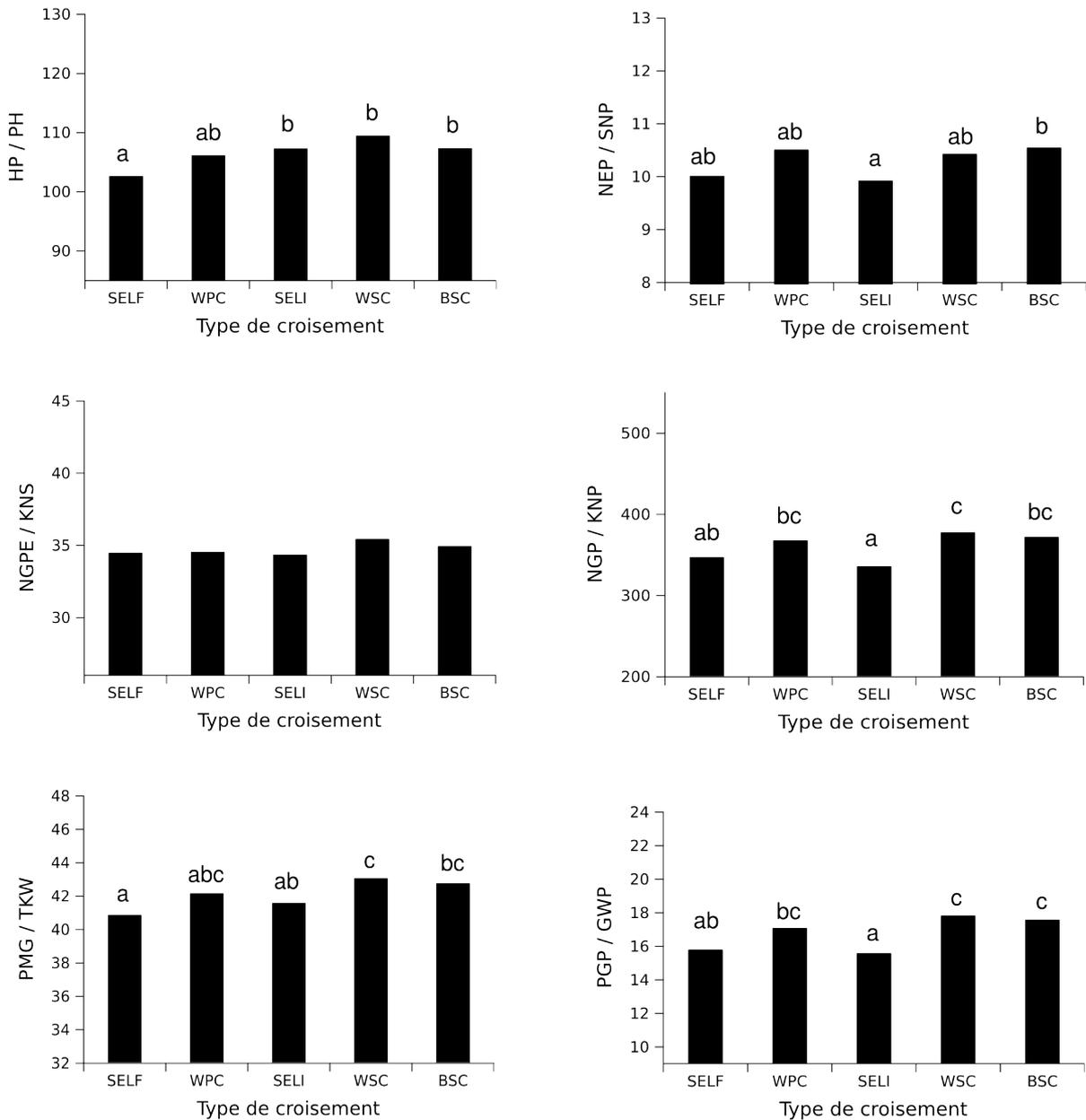


Figure 5.2: Moyennes ajustées pour l'effet *type* du modèle (5.2). Les lettres représentent les groupes statistiques.

5. Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

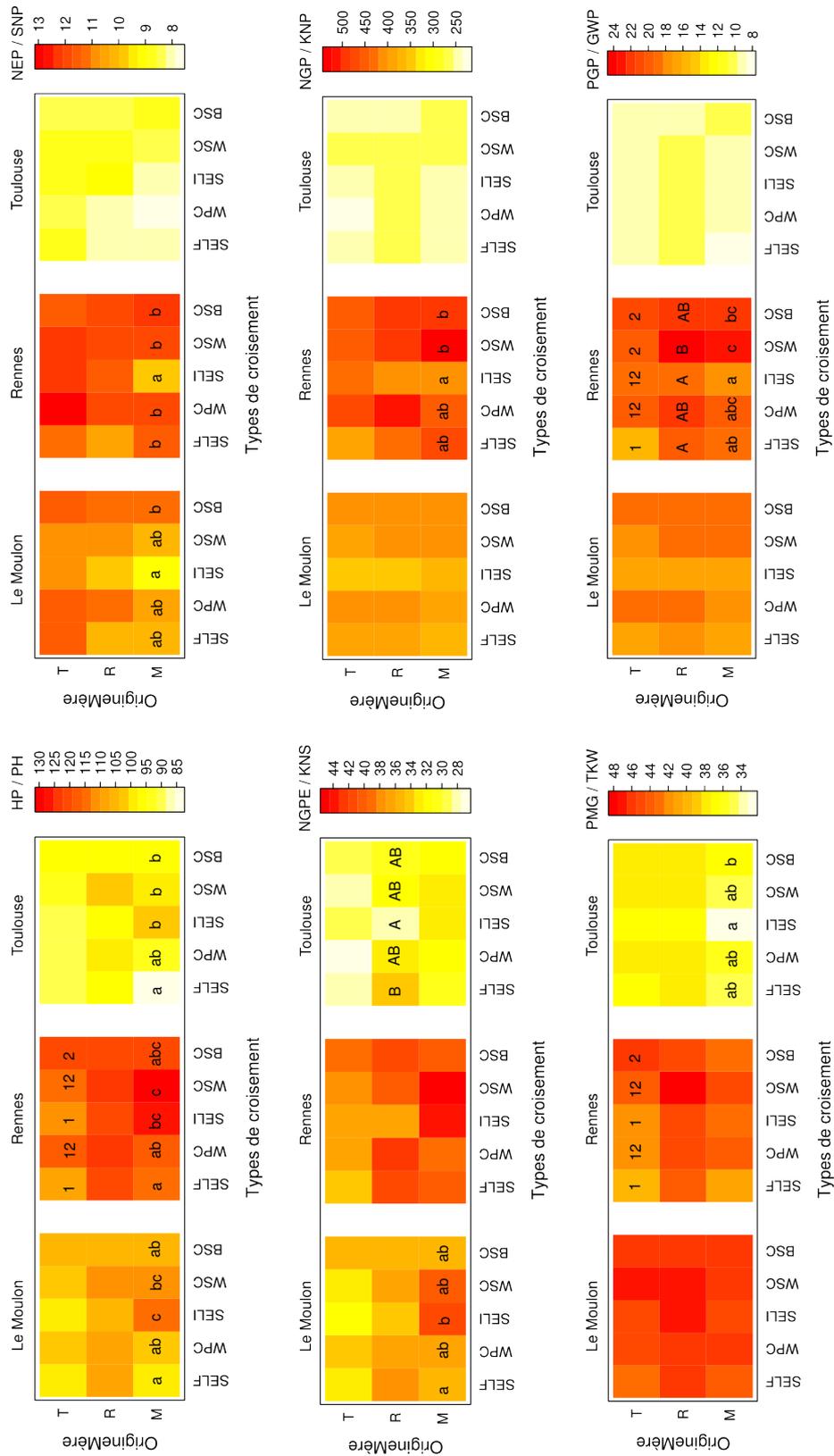


Figure 5.3: Moyennes ajustées pour la triple interaction *type* × *OrigineMère* × *site* du modèle (5.2). Les lettres représentent les groupes statistiques pour chaque série de croisements d'une combinaison entre le site et l'origine de la plante mère.

Les valeurs d'hétérosis obtenues diffèrent grandement selon les caractères (Figure 5.4). En général, ce sont les caractères HP, NGP, PMG et PGP qui présentent les valeurs d'hétérosis significatives et les plus fortes. NEP et NGPE ne présentent jamais d'hétérosis significatif. En ce qui concerne les valeurs moyennes sur les 3 sites (Figure 5.4-A), l'hétérosis entre populations du même site (H_{WS}) semble sensiblement plus important alors que l'hétérosis intra-population (H_{WP}) semble le plus faible, ce qui correspond aux comparaisons des différents types de croisement (Figure 5.2). Il est par contre notable que les trois types d'hétérosis s'expriment très différemment selon le site d'évaluation (Figure 5.4-B, C et D). Les valeurs d'hétérosis mesurées au Moulon sont très proches des valeurs moyennes pour les trois types d'hétérosis bien que moins significative tandis que les valeurs d'hétérosis mesurées à Rennes sont plus importantes (jusqu'à 0,21) (Figure 5.4). Les valeurs d'hétérosis mesurées à Toulouse sont pas contre très faibles voire négatives et moins souvent significatives (entre -0,07 et 0,07) ce qui diminue les différences observées en moyenne entre les trois niveaux d'hétérosis (Figure 5.4-D).

Hétérosis intra-population (H_{WP}) et intra-site (H_{WS}). Les valeurs d'hétérosis intra-population (H_{WP}) et entre populations du même site d'origine (H_{WS}) diffèrent beaucoup selon l'origine de la plante mère et le site d'expérimentation. Par exemple, pour les populations originaires du Moulon, H_{WS} est très nettement supérieur à H_{WP} dans l'évaluation à Rennes (jusqu'à 4 fois plus fort pour PGP, Figure 5.4), alors que H_{WS} n'est que légèrement supérieur à H_{WP} dans les évaluations à Toulouse et au Moulon (Figure 5.4). Pour les populations originaires de Rennes, H_{WS} est à peine supérieur à H_{WP} dans l'évaluation à Rennes (sauf pour les caractères PMG et PGP qui deviennent significatifs, Figure 5.4-C), les deux sont très faibles dans l'évaluation à Toulouse. Les populations originaires de Toulouse présentent un hétérosis intra-population (H_{WP}) supérieur mais moins significatif à l'hétérosis entre populations (H_{WS}) dans l'évaluation à Rennes et dans une moindre mesure au Moulon. Lorsque l'évaluation est réalisée à Toulouse, H_{WS} et H_{WP} sont tous les deux très faibles voire négatifs et non significatifs (sauf pour H_{WS} pour PH).

Hétérosis entre populations de sites d'origine différentes (H_{BS}). Dans l'évaluation au Moulon, les valeurs de H_{BS} sont similaires quelque soient les populations croisées (RM, MT et TR). A Rennes, ce sont les descendance issues de croisements avec la population de Toulouse (MT et TR) qui montrent le plus d'hétérosis,

dans l'évaluation à Toulouse, c'est l'inverse. En général, les valeurs de H_{BS} sont intermédiaires entre H_{WP} et H_{WS} .

D'une manière générale, si ces résultats indiquent l'existence d'interactions génotype/environnement qui s'expriment différemment selon le type de descendance, ils semblent difficilement explicables par des phénomènes d'adaptation locale puisque, par exemple, les croisements entre sites d'origine avec la population de Toulouse présentent le plus d'hétérosis à Rennes et plus que les croisements Rennes par Le Moulon.

5.3.2.2 Effets des croisements avec une variété non apparentée : 'Piko'

Le modèle (5.7) montre un effet significatif de tous les effets du modèle pour tous les caractères (sauf pour l'effet *rep* pour PGP) (Table 5.3). L'effet croisement est notamment très significatif. La variété 'Piko' a des valeurs moyennes significativement plus faibles que les descendance des croisements avec les 3 populations pour tous les caractères et quelque soit l'origine des plantes mères utilisées dans les croisements sauf avec les populations du Moulon et de Toulouse pour NGPE (Figure 5.5). Pour NEP, NGP, PMG et PGP, les descendance issues d'autofécondations des populations extensives (MA, RA et TA) ont des valeurs proches des croisements avec 'Piko' et ces valeurs sont significativement supérieures à celles de la variété 'Piko'. C'est également le cas pour PH et NGPE pour les croisements avec la population de Rennes. D'une manière générale, il y a donc soit hétérosis, soit dominance des populations de GD sur cette variété.

L'interaction entre l'effet *crois* et l'effet *site* est significative pour tous les caractères (Table 5.3). Les valeurs observées à Toulouse sont plus faibles pour tous les traits, ce qui conduit dans deux cas (NEP et NGP) à ne plus détecter de différences significatives entre les descendance. Les comportements des descendance au Moulon et à Rennes semblent plus proches (Figure 5.6). La variété 'Piko' présente toujours les valeurs les plus faibles pour tous les caractères quelque soit les sites expérimentaux sauf pour NGPE mesuré au Moulon. Pour ce caractère, au Moulon, la variété 'Piko' a une valeur significativement plus élevée que les descendance d'autofécondation (MA, RA et TA), les descendance issues de croisement ayant des valeurs phénotypiques comparables à celle de la variété 'Piko'. A Rennes et à Toulouse, c'est 'Piko' qui présente les plus faibles NGPE, et les descendance sont soit supérieures aux 2 parents soit proches des populations d'origine de la plante mère.

Les caractères qui présentent les plus fortes valeurs d'hétérosis H_{PIKO} moyens

5.3. Deuxième génération de descendance dans un dispositif multilocal

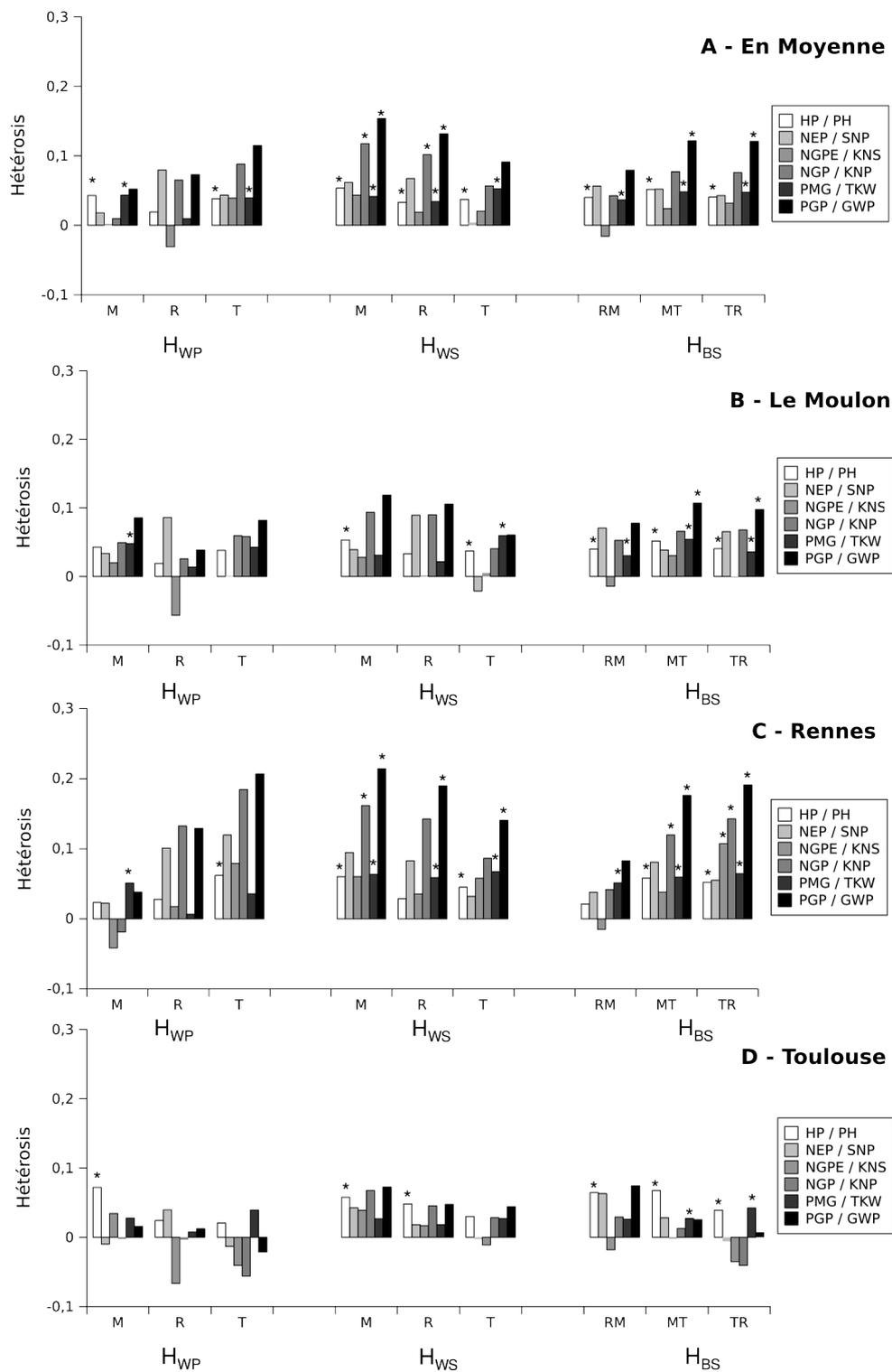


Figure 5.4: Valeurs d'hétérosis mesurées à partir des croisements entre populations pour 3 niveaux : intra-population H_{WP} , intra-site H_{WS} et inter-site H_{BS} . Le premier graphique représente les valeurs moyennes sur l'ensemble des 3 sites et les suivants les valeurs mesurées séparément dans chaque site. Les étoiles représentent une valeur d'hétérosis significativement non nulle.

sur les 3 sites sont PGP puis NGP (entre 0,14 et 0,24) quelque soit l'origine de la plante mère (Figure 5.7-A) comme c'était déjà le cas pour les autres types de croisement (cf. Figure 5.4). Le niveau d'hétérosis des descendances issues des croisements MP est relativement élevé aussi pour NEP (0,15). Toutes les autres valeurs d'hétérosis sont inférieures à 0,11 mais il n'y a aucun cas de dépression hybride et presque toutes les valeurs sont significatives contrairement aux croisements intra et inter-populations (Figure 5.4). Les hétérosis mesurés au Moulon (entre 0,04 et 0,25) sont très comparable à ceux mesurés à Rennes (entre 0,02 et 0,28) et légèrement supérieurs à ceux mesurés à Toulouse (entre -0,01 et 0,21) (Figure 5.7-B). L'hétérosis observé au niveau des croisements avec la population de Rennes est plus sensible à l'environnement, notamment les valeurs observées à Toulouse sont beaucoup plus faibles et moins significatives que celles des croisements avec les populations du Moulon et de Toulouse.

5.3. Deuxième génération de descendances dans un dispositif multilocal

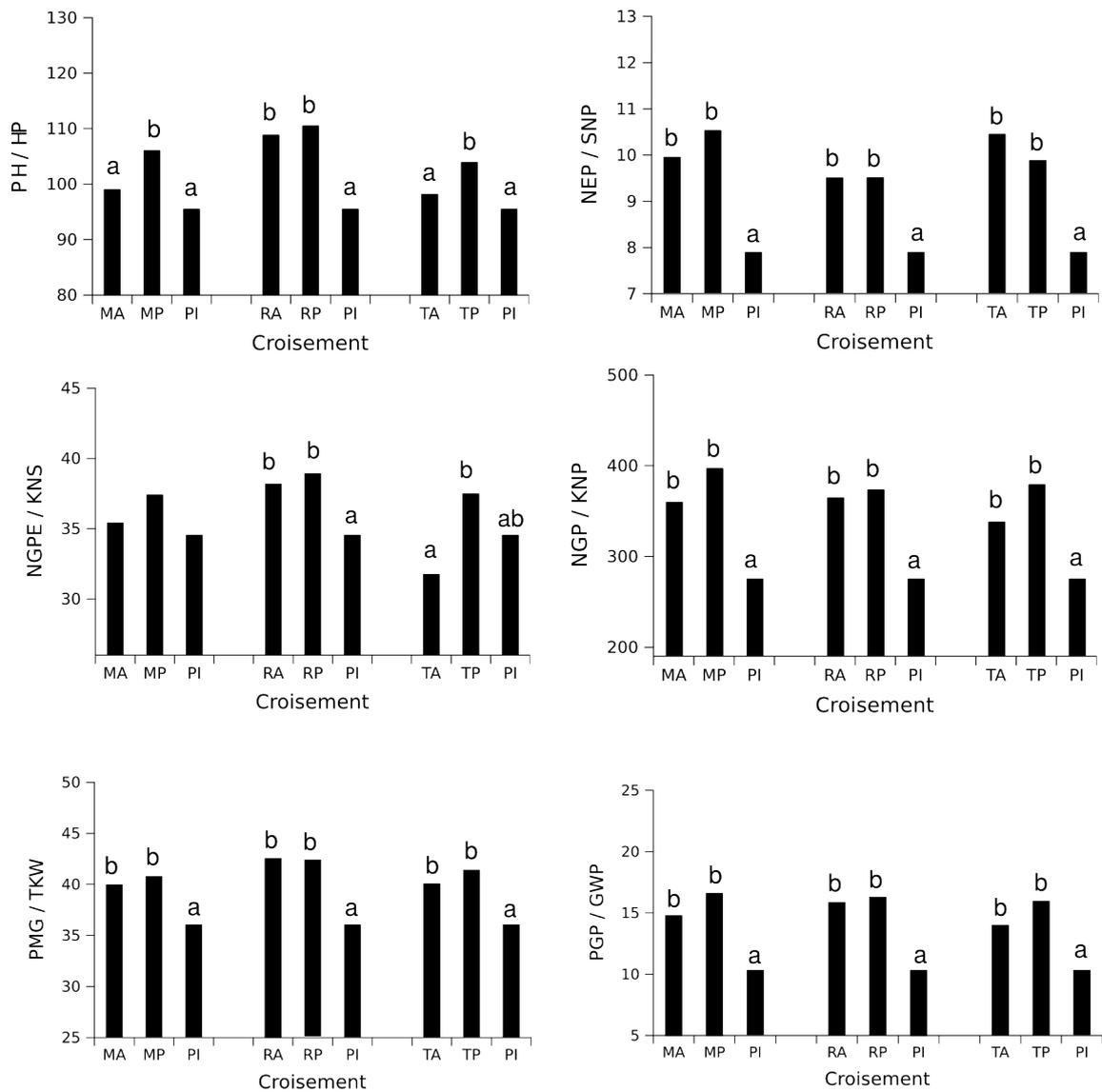


Figure 5.5: Valeurs phénotypiques ajustées pour l'effet *crois* du modèle (5.7). Les lettres représentent les groupes statistiques.

5. Impacts de croisements intra et inter-populations sur la valeur sélective et ses composantes

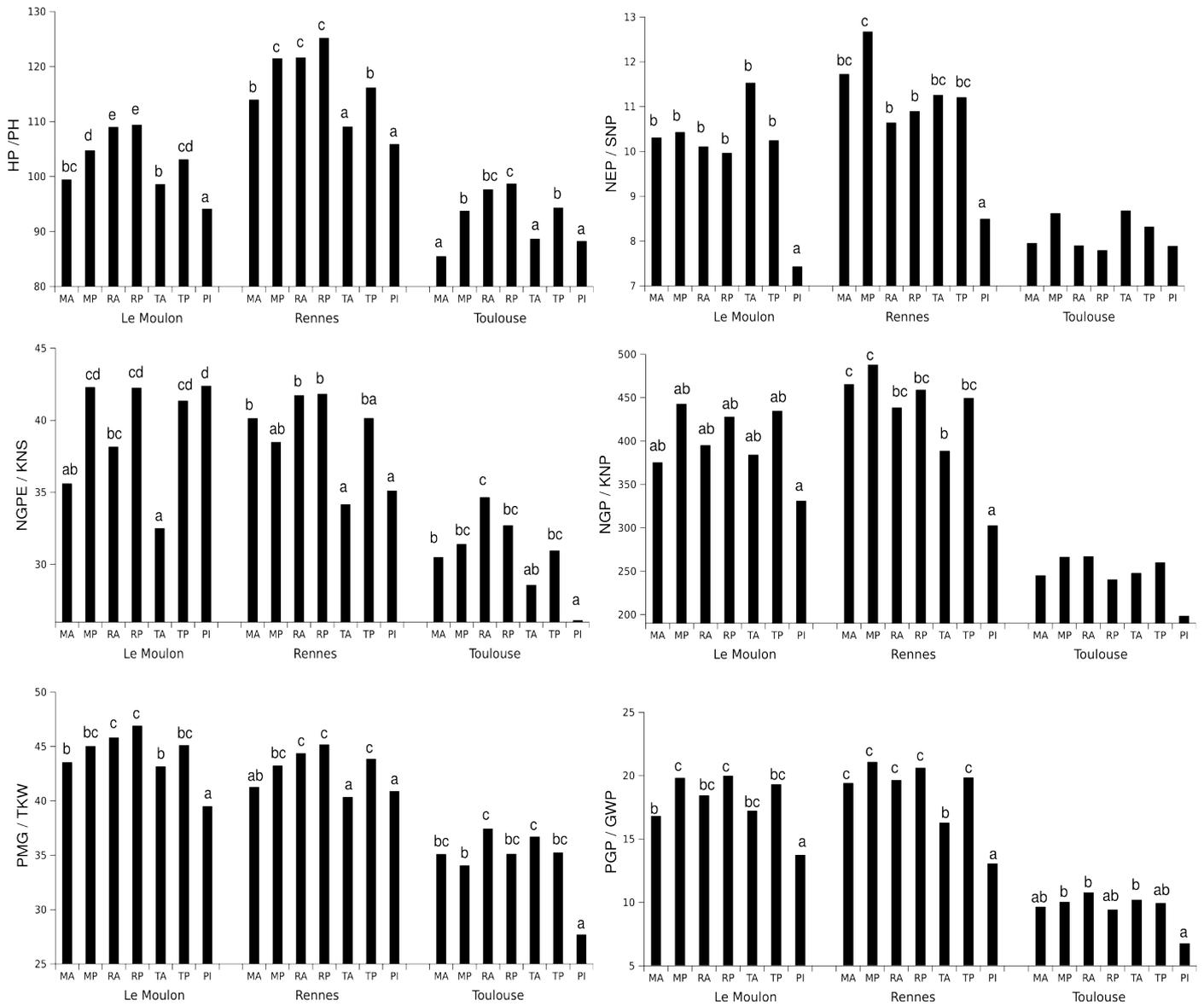


Figure 5.6: Valeurs phénotypiques ajustées pour l'interaction entre l'effet *crois* et l'effet *site* du modèle (5.7). Les lettres représentent les groupes statistiques correspondant aux comparaisons de moyennes pour chaque trait dans chaque site.

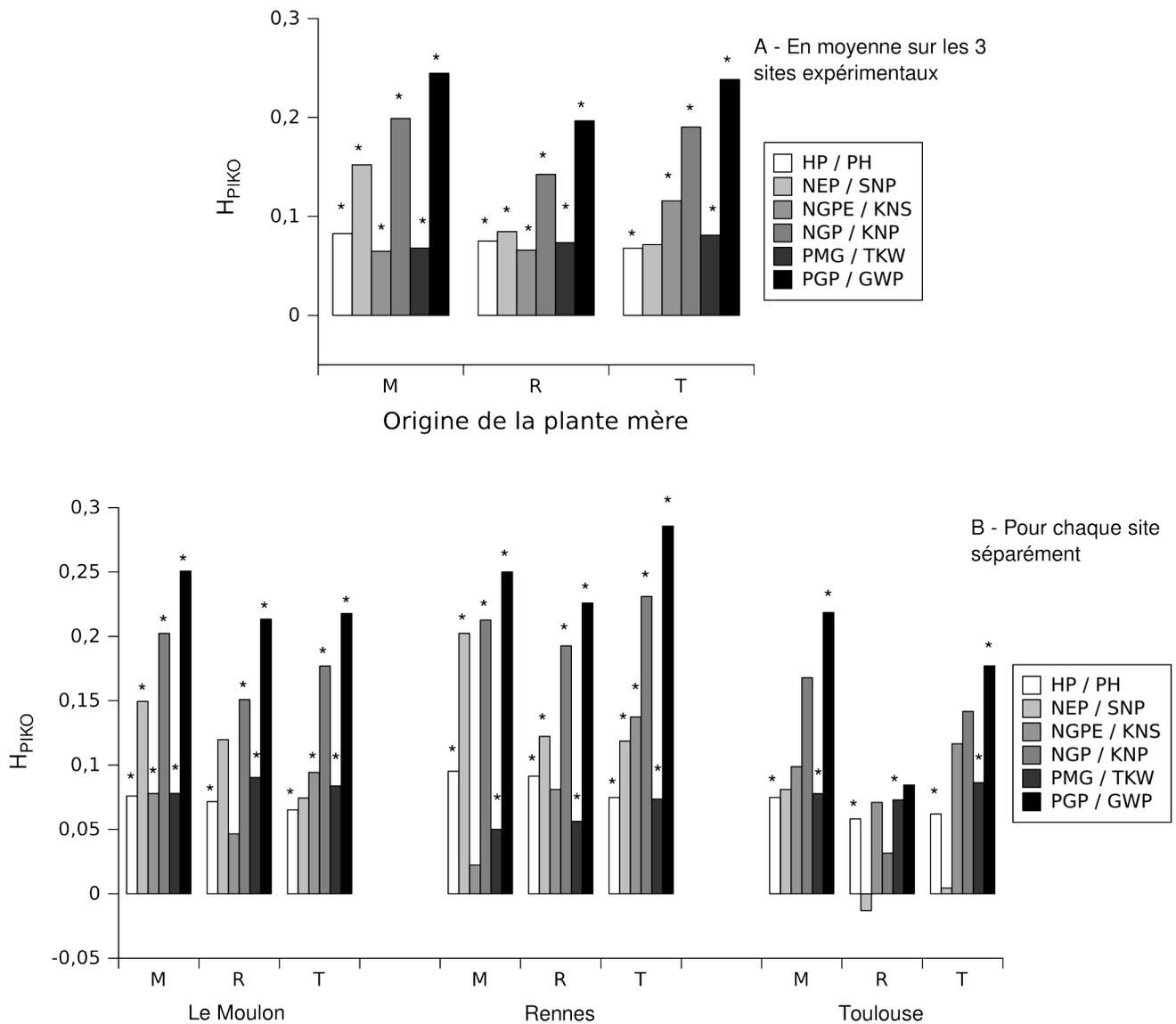


Figure 5.7: Hétérosité pour les croisements avec 'Piko'. Le graphique A représente les valeurs en moyennes pour les 3 sites d'expérimentation tandis que le graphique B représente les valeurs pour chaque site séparément. Les étoiles indiquent un hétérosité significatif.

5.4 Discussion

Dans cette analyse sur les descendance de croisements de deuxième génération nous avons mis en évidence une faible mais non significative dépression de consanguinité au sein des populations alors qu'un hétérosis significatif entre populations d'un même site d'origine et entre populations de sites d'origine différents a été détecté. Nous avons aussi mis en évidence un hétérosis élevé et significatif entre les populations de Gestion Dynamique et une variété non apparentée 'Piko'. Nous n'avons pas mis en évidence de dépression hybride dans nos descendance.

Etant donné que la première génération a été évaluée uniquement au Moulon, nous allons uniquement discuter les résultats obtenus pour l'expérimentation au Moulon pour la deuxième génération. D'autre part, étant donné que la deuxième génération est produite par autofécondation à partir de la première, le nombre de locus hétérozygotes dans les descendance de deuxième génération est attendu 2 fois plus faible et donc l'hétérosis estimé aussi.

5.4.1 Hétérosis intra-population

Très peu de dépression de consanguinité a été observée en moyenne au sein des populations extensives : les descendance issues d'autofécondations ne sont pas significativement différentes des descendance issues des croisements intra-population (WPC). Cependant 2 caractères (HP et PMG) montrent un hétérosis intra-population significatif mais faible (autour de 5%) dans 2 populations : Le Moulon et Toulouse. Les valeurs d'hétérosis estimées en première génération pour les croisements intra-population sont plus souvent significatives que les valeurs estimées en deuxième génération au Moulon (respectivement 72% et 6%). Elles sont aussi plus importantes notamment pour les caractères NGPE et PGP. Les comparaisons des valeurs d'hétérosis entre les deux générations étant proches des attendus théoriques (diminution de l'hétérosis suite à la diminution du nombre de locus hétérozygotes), nous pouvons en déduire que les mécanismes impliqués dans l'hétérosis sont principalement la dominance et de la super-dominance.

La présence de dépression de consanguinité dans les populations de GD peut nous laisser supposer que la plus grande partie des mutations délétères est en ségrégation dans ces populations. La présence de dépression de consanguinité nécessite en effet le maintien du polymorphisme dans les populations (Bataillon and Kirkpatrick, 2000). Les populations de GD semble avoir des tailles suffisamment importante pour

maintenir ce polymorphisme.

5.4.2 Hétérosis intra-site d'origine

Nous avons mis en évidence un fort hétérosis entre populations du même site d'origine, notamment pour les caractères HP, NGP, PMG et PGP et principalement pour les populations du Moulon et de Rennes. Ces résultats nous indiquent la présence de fardeau génétique dans les populations en question. En effet, l'hypothèse la plus probable pour expliquer cet hétérosis est le phénomène de dominance : les mutations délétères récessives fixées dans les populations parentales ne sont pas les mêmes, le croisement les met à l'état hétérozygote, elle sont donc masquées dans les descendances issues de croisement.

5.4.3 Absence de dépression hybride

Après une génération de recombinaison des haplotypes parentaux, la théorie prédit un accroissement de la dépression hybride du fait de la rupture de complexes de gènes co-adaptés (mécanisme génétique de la dépression hybride ou incompatibilité génétique). Pas plus qu'en première génération, nous n'avons pas détecté de dépression hybride quelque soit le type de croisement étudié. Ce résultat pourrait être interprété par l'absence de complexes de gènes co-adaptés dans nos populations de GD. Cependant, le blé étant une espèce autogame, la présence de complexes de gènes sélectionnés est attendue. De plus, nous avons mis en évidence des interactions épistatiques entre génomes pour le gène *VRN-1* impliqué dans la précocité de floraison (chapitre 4). Une première explication est le fait que l'hétérosis dû au fardeau génétique est suffisamment important pour cacher les éventuels effets négatifs de la rupture des complexes co-adaptés. Une deuxième explication pourrait être la présence de fardeau génétique sous forme de complexes épistatiques. De la même manière que des mutations délétères peuvent s'accumuler par dérive, des complexes épistatiques faiblement délétères peuvent aussi s'accumuler du fait de la dérive. Le fait de croiser casse ces complexes et permet un gain de valeur sélective. Enfin, un autre mécanisme peut exister dans les espèces autogames du fait du faible taux de recombinaisons : la présence de complexes de gènes liés en répulsion. Ces complexes sont composées de gènes qui se transmettent intégralement de générations en générations du fait de l'absence de recombinaisons. Ils comportent des gènes ayant un impact positif sur la valeur sélective mais aussi des gènes ayant un impact négatif

sur celle-ci (d'où le terme "répulsion"). Du fait de l'impact positif d'une partie des gènes, les gènes délétères ne sont pas contre-sélectionnés efficacement et persistent dans la population. Dans ce cas aussi, le fait de croiser des individus entre différentes populations et de recombinaison les haplotypes parentaux entre la première et la deuxième génération permet de casser ces complexes de gènes en répulsion et donc de gagner en valeur sélective.

5.4.4 Hétérosis entre sites d'origine et adaptation locale

L'hétérosis entre populations de sites d'origine différents est comparable à l'hétérosis entre populations du même site bien que légèrement plus faible et significatif pour moins de caractères (HP, PMG et PGP). Ces résultats confirment ceux obtenus en première génération. Deux mécanismes peuvent expliquer les valeurs des descendance issues des croisements entre populations de sites d'origine différents. D'une part, la présence de fardeau génétique dans les populations peut conduire à de l'hétérosis et d'autre part, la présence d'adaptation locale peut conduire à de la dépression hybride du fait de la présence d'allèles maladaptés localement (mécanisme écologique). Les croisements entre populations d'origines différentes présentant de l'hétérosis, nous pouvons en déduire que les phénomènes de dépression hybride par le mécanisme écologique sont faible voire absents. Cependant, nous avons mis en évidence dans le chapitre 3 la signature de l'adaptation locale pour 2 caractères principalement, HP et PMG, et ce dans les populations originaires de Toulouse. Selon la théorie du mécanisme écologique de dépression hybride, les croisements impliquant des individus issus des populations de Toulouse devraient montrer un plus faible hétérosis voire de la dépression hybride pour les deux caractères HP et PMG que pour les autres caractères et ceci principalement à Toulouse. L'hétérosis estimé pour ces deux caractères est significatif pour les croisements impliquant des individus des populations de Toulouse quand il est estimé au Moulon et à Rennes. Il est cependant parmi les plus faibles et il est 2 à 3 fois plus faible que celui observé pour PGP par exemple, caractère pour lequel aucune trace d'adaptation locale n'a été détectée. Dans l'expérimentation menée à Toulouse par contre, PH et PMG sont les deux seuls à montrer des valeurs significatives d'hétérosis pour les croisements impliquant des individus issus des populations de Toulouse. Les phénomènes d'adaptation locale ne semblent donc pas vraiment influencer les valeurs des descendance des croisements entre sites d'origine ou alors ses effets négatifs sont probablement

diminués par les effets positifs d'hétérosis dû au fardeau.

5.4.5 Impact du site d'expérimentation sur les estimations d'hétérosis

Les mesures d'hétérosis sont assez différentes selon les sites d'expérimentation : les hétérosis mesurés à Rennes vont jusqu'à des valeurs de 21% et sont significatifs dans 39% des cas tandis que la valeur maximum estimée à Toulouse est 7% et seulement 15% des hétérosis y sont significatifs. L'estimation réalisée au Moulon est intermédiaire avec des valeurs proches des valeurs moyennes sur les 3 sites et 22% des hétérosis significatifs. Nous avons vu précédemment que Rennes pouvait être considéré comme un milieu riche tandis que Toulouse devait être considéré comme plutôt plus pauvre. Nous pouvons associer les variations d'estimations des hétérosis au niveau de stress rencontrées par les descendances dans les 2 sites expérimentaux : les milieux stressant (généralement le laboratoire pour des individus issus de populations naturelles) ont en effet tendance à diminuer l'expression des différences génétiques entre individus. Ces résultats soulignent l'importance d'une expérimentation multilocale dans une démarche préliminaire à des éventuelles migrations entre populations. En effet, nous pouvons déduire de ces résultats que l'intérêt de l'état hétérozygote et donc de migration par le pollen est plus important à Rennes qu'à Toulouse.

5.4.6 Croisements avec une variété non apparentée

Les valeurs d'hétérosis estimées pour les croisements avec la variété 'Piko' sont très souvent significatifs et entre 10 et 25% pour NGPE, NGP et PGP. Dans la plupart des cas, 'Piko' présente une valeur significativement plus faible que les descendances issues d'autofécondations des populations de la GD, la bonne valeur des descendances en croisements sont principalement dues à un effet de dominance des individus issus des populations de GD. Cependant, les croisements avec les individus issus de la population de Toulouse présentent de la super-dominance pour HP et NGPE ainsi que les croisements avec la population du Moulon pour HP. Ici aussi, aucun cas de dépression hybride n'est détectée malgré une claire maladaptation de 'Piko' aux sites d'expérimentations. Nous pouvons en conclure que le mécanisme écologique, supposé conduire à de la dépression hybride, est soit très faible soit contre-carré par l'hétérosis dans les croisements.

Les résultats obtenus sur les croisements avec 'Piko' permettent un début de réponse sur la question du médium utilisé pour les migration : graines ou pollen (croisements). En effet, dans ce cas, 'Piko' montrant des valeurs très faibles dans les milieux d'évolution des populations, nous pouvons supposer que ces génotypes seraient relativement rapidement éliminés par la sélection, éliminant ainsi l'intérêt de la migration. Au contraire, l'apport de pollen provenant de 'Piko' (par croisement) présente l'avantage de produire des individus ayant une bonne valeur sélective. Nous pouvons donc supposer que ces individus et les combinaisons génétique comportant des allèles de 'Piko' persisteraient dans les populations et augmenteraient la variabilité génétique des populations à long terme, ce qui est un des buts du sauvetage génétique.

Discussion générale

6.1 L'adaptation locale dans les populations de Gestion Dynamique

L'adaptation des populations à leur environnement et les mécanismes génétiques impliqués dans cette adaptation sont des préoccupations centrales en génétique évolutive. L'adaptation locale des populations dans des environnements hétérogènes est un cas particulier d'adaptation et est souvent utilisée comme objet d'étude. L'adaptation locale est elle-même au centre de différentes problématiques en génétique évolutive comme dans la compréhension des mécanismes de spéciation ou dans la compréhension des forces agissant sur le maintien de la diversité génétique en biologie de la conservation par exemple.

Deux grands types d'approches peuvent être identifiées dans l'étude de l'adaptation locale. D'une part l'étude de populations naturelles par différentes méthodes comme la comparaison entre la différenciation au niveau de caractères phénotypiques et la différenciation neutre (comparaison Q_{ST}/F_{ST}) ou les expériences de transplantation. Dans ces approches, ce sont les potentielles conséquences de l'adaptation locale dans les milieux naturels qui sont recherchées *a posteriori*. D'autre part, les approches d'évolution expérimentale peuvent permettre de comprendre les mécanismes impliqués dans l'adaptation et plus particulièrement dans l'adaptation locale. En effet, ces approches permettent de suivre au cours des générations la réponse de populations expérimentales à des contraintes imposées, plus ou moins artificielles. Les limites que nous voyons à ces deux approches sont les suivantes : une approche *a posteriori* est moins informative qu'une approche qui suit l'adaptation au cours du

temps mais les conditions lors des évolutions expérimentales peuvent être éloignées des conditions réelles d'évolution des espèces dans leurs milieux.

Le dispositif de Gestion Dynamique de blé permet d'associer les deux approches : d'une part, les populations expérimentales de blé évoluent dans les environnements "habituels" pour l'espèce (agrosystèmes) et sont donc soumises aux pressions de sélection rencontrées généralement dans ces environnements et d'autre part, la GD est une expérimentation d'évolution expérimentale, les populations sont suivies au fil des générations et l'état ancestral/initial est connu. Ce dispositif constitue donc un matériel de choix pour étudier l'adaptation locale.

Les études menées jusqu'à maintenant sur la différenciation et l'adaptation locale dans les populations de GD ont montré que les résistances aux maladies (Paillard *et al.*, 2000b) et la précocité de floraison (Goldringer *et al.*, 2006) avaient été soumises à des pressions de sélection divergente. L'implication dans le déterminisme de la précocité de floraison d'un gène majeur de la vernalisation, *VRN-1*, a été mise en évidence dans les populations de GD (Rhoné *et al.*, 2008). Les expérimentations réalisées dans ces études ont été menées principalement sur un unique site, Le Moulon, ou bien sur plusieurs sites mais sans réelle réciprocité entre les populations évaluées et les sites d'évaluation (Paillard *et al.* 2000a). Ces expérimentations peuvent donc être assimilées à des expérimentations de types "common-garden" qui sont fréquemment utilisées chez de nombreuses espèces végétales pour tester l'adaptation locale. Une discussion critique concernant ce type d'étude est faite dans le chapitre 3 *Adaptation Locale* : un unique environnement ne permet pas en général de tester efficacement la présence d'adaptation locale.

Dans cette étude, nous avons réalisé pour la première fois sur les populations de GD de blé une expérimentation de transplantation entre populations issues de 3 sites : Le Moulon, Rennes et Toulouse. Cette approche nous a permis d'obtenir trois résultats principaux. Premièrement, nous avons pu confirmer l'importance de la sélection divergente sur certains caractères liés à la valeur sélective (précocité de floraison, hauteur de plante, nombre de grains par épis et poids de 1000 grains) par la méthode des contrastes $Q_{ST}-F_{ST}$. Nous avons montré dans le même temps que l'évaluation de la différenciation au niveau des caractères quantitatifs était très cohérente entre les 3 sites expérimentaux. Deuxièmement, nous avons montré, par les transplantations réciproques, que deux caractères (hauteur de plante et poids de 1000 grains) étaient effectivement adaptés localement. Enfin, en étudiant conjointement la précocité de floraison et les caractères liés à la valeur sélective, nous avons

pu mettre en évidence le fait que la précocité de floraison était sélectionnée entre autres par l'intermédiaire du poids de 1000 grains, caractère mis en place à la fin du cycle de développement.

6.2 Adaptation locale et modélisation

L'importance de l'adaptation locale et la nature de ses bases génétiques vont déterminer les conséquences négatives à réaliser des migrations entre populations et les risques à générer de la dépression hybride. Un des mécanismes de la dépression hybride est l'apport de gènes maladaptés dans la population cible, c'est le mécanisme "écologique". La prise en compte de l'adaptation locale est donc très importante dès que la question du sauvetage génétique se pose.

La modélisation de populations est une approche couramment utilisée pour comprendre l'impact de la migration sur la viabilité des populations. Cependant, très peu de modèles prennent en compte l'adaptation locale soit par l'intermédiaire d'un gradient environnemental (Garcia-Ramos and Kirkpatrick, 1997; Alleaume-Benharira *et al.*, 2006) soit à l'aide d'environnements contrastés (Lopez *et al.*, 2009). Les résultats trouvés par Alleaume-Benharira *et al.* (2006) sont contradictoires avec les attendus (présence de dépression hybride en cas d'adaptation locale) puisqu'ils trouvent que la migration est efficace même en présences d'adaptation locale car elle permet de contre-carrer les effets négatifs de la dérive. Ces résultats sont cependant à prendre avec précautions du fait d'un modèle démographique utilisé très particulier avec des tailles démographiques très petites. Lopez *et al.* (2009) mettent en évidence un impact de l'adaptation locale sur ce qu'ils appellent le "fardeau de migration" c'est à dire la diminution de viabilité des populations liée à la migration. Dans leur étude, plus la proportion du génome qui est impliqué dans l'adaptation locale est grande, plus les conséquences négatives de la migration sont importantes.

Le très petit nombre d'étude d'une part et les résultats contradictoires qu'elles apportent d'autre part soulignent la grande nécessité de prendre en compte l'adaptation locale dans les modèles utilisés pour étudier les impacts de la migration sur la viabilité des populations.

6.3 Présence de dépression de consanguinité mais pas de fardeau génétique dans la GD

L'hétérosis observé sur les descendances de croisements intra-population ainsi que celui observé sur les descendances des croisements inter-populations sont assez élevés (pouvant atteindre 20 %). Cependant la plus grosse composante de cet hétérosis est l'hétérosis intra-population, la composante inter-population étant faible voire nulle. Ces résultats montrent la présence de dépression de consanguinité dans nos populations (hétérosis intra-population) mais un faible fardeau génétique (peu ou pas de composante inter-populations de l'hétérosis). En deuxième génération cependant, les croisements inter-populations (notamment intra-site) présentent des valeurs légèrement plus élevées que les croisements intra-population.

La taille efficace des populations est sans doute le principal paramètre ayant un rôle dans la présence de dépression et l'absence de fardeau génétique. En effet, les populations ont une taille efficace suffisamment importante pour empêcher la fixation de mutation délétères dans les populations tout en permettant la ségrégation de celles-ci. Le régime autogame du blé n'est pas en contradiction avec la présence de dépression de consanguinité. En effet, si l'autogamie permet en théorie une purge plus efficace, elle divise aussi la taille efficace des populations par deux, diminuant ainsi l'efficacité de la sélection. La théorie n'a pas encore apporté de réponse sur l'importance relative des deux phénomènes. De plus, le régime autogame diminue la recombinaison et ainsi permet la création de blocs de gènes en répulsion (gènes favorables liés à des gènes défavorables) qui diminuent encore l'efficacité de la sélection contre les mutations délétères.

Enfin, nos résultats montrent que les populations de GD ne souffrent pas de gros problèmes de viabilité au bout de 12 générations.

6.4 Absence de dépression hybride dans une espèce autogame adaptée localement ?

Le résultat le plus surprenant est l'absence de dépression hybride pour les 2 générations et pour tous les caractères, alors que des traces d'adaptation locale ont été identifiées pour certains traits (hauteur de plante et poids de 1000 grains).

Les deux mécanismes pouvant conduire à de la dépression hybride sont le mé-

canisme «génétique», rupture de complexes de gènes co-adaptés et le mécanisme «écologique», apport de gènes maladaptés localement. Nous avons montrés que 2 caractères (hauteur de plante et poids de 1000 grains) étaient localement adaptés dans les populations de GD. De plus, nous nous attendons dans une espèce autogame à la sélection de complexes de gènes coadaptés du fait du faible taux de recombinaison apparent et la bonne transmission de blocs de gènes voire de génomes entiers d'une génération à l'autre. Nous avons d'ailleurs montré pour les trois copies du gène *VRN1* que des relations épistatiques intra mais aussi inter génomes avaient un rôle dans la détermination de la précocité de floraison. Ainsi, deux facteurs de risques pour le sauvetage génétique ont été détectés dans les populations de GD : de l'adaptation locale et des relations épistatiques (au moins pour *VRN-1*). Cependant, ces deux facteurs ne semblent pas avoir pour conséquence la présence de dépression hybride dans les descendance de croisements.

Une explications possible serait que de la dépression hybride existe mais que nous ne la mettons pas évidence . L'effet positif de l'hétérosis sur les descendance de croisements pourrait en effet masquer les effets négatifs de la dépression hybride. Si les deux mécanismes se compensent, la composante inter populations de l'hétérosis sera estimée faible voire nulle, ce qui est cohérent avec nos résultats.

Une autre explication serait la présence de fardeau génétique dans nos populations sous forme de complexes de gènes en répulsion. Dans ce cas là, le mécanisme «génétique» ne conduit pas à de la dépression hybride mais bel et bien à de l'hétérosis. La présence de ce genre de complexes dans des populations autogames est tout à fait possible.

6.5 Conséquences pour la migration dans les systèmes de gestion *in situ* des ressources génétiques

Le système de GD de blé est un système expérimental d'étude de la gestion dynamique *in situ*. Si les systèmes de gestion de la diversité génétique en populations composites ne sont pas nombreux, les réseaux d'échange de semences entre agriculteurs sont considérés comme jouant un rôle de plus en plus important dans la gestion des ressources génétiques, même dans les pays occidentaux. Des rapprochements peuvent être fait entre ces réseaux d'échanges et l'expérimentation de GD de

blé. Des populations hétérogènes évoluent dans des milieux contrastés en terme de climat ou de conditions pédologiques par exemple. Les tailles démographiques sont aussi relativement comparables. Il existe tout de même une différence : les agriculteurs pratiquent de la sélection sur les populations qu'ils maintiennent. Cependant, en terme de conséquences évolutives, nous pouvons tout de même tirer des informations de notre étude pour les «appliquer» aux réseaux d'échanges de semences.

En effet, la question de la gestion de la diversité, du potentiel évolutif et de l'adaptation locale des populations qu'ils maintiennent intéresse beaucoup les acteurs de ces réseaux. Ils pratiquent de nombreux échanges de semences et donc la question de la migration dans de tels réseaux est aussi importante.

Au vu de nos résultats et surtout du fait de l'absence de dépression hybride, nous pouvons émettre l'hypothèse que les échanges de semences ne présentent pas un risque important pour ces populations en réseaux sans pour autant apporter une augmentation de la valeur sélective des populations (pas de fort hétérosis inter populations).

Cependant quelques points restent à discuter afin de prendre cette transposition avec précaution. Premièrement, l'adaptation locale peut être plus importante dans ces réseaux du fait d'une plus grande variété de pratiques culturales et de sélection humaine pour divers critères augmentant encore la différenciation entre populations. Le risque des échanges est alors de perdre ces adaptations «locales» au sens large du terme (climat, sol mais aussi pratiques culturales, utilisations post-récolte...). Deuxièmement, au cours des échanges, des stockages de semences, les lots manipulés peuvent être de faible taille et ainsi produire un effet de goulot d'étranglement sur les populations. De plus, quand les populations sont issues de lots sortis de banques de graines, elles peuvent aussi souffrir d'un fort effet fondateur (goulot d'étranglement à la création d'une population) du fait de l'homogénéité de ces lots conservés *ex situ*. Ces deux phénomènes peuvent conduire à des populations de faible taille efficace avec un fardeau génétique conséquent. Dans ce cas, la migration peut-être un bon moyen de conserver la viabilité de ces populations. Troisièmement, les résultats obtenus dans cette étude concernent des populations qui ont divergé récemment (12 générations). Nous pouvons supposé que l'accumulation de fardeau ou sa purge ainsi que les processus d'adaptation locale sont en cours dans les populations étudiées. Les degrés de divergence des populations maintenues par les réseaux d'agriculteurs sont peu connus mais ce paramètre peut jouer un très grand rôle dans l'importance relative entre effets positifs et négatifs de la migration dans de tels systèmes. L'étude

et la compréhension des mécanismes génétiques dans les populations conservées dans les réseaux d'échanges est donc une étape importante pour réfléchir sur la migration dans ces systèmes.

Enfin, deux objectifs principaux se dégagent pour les acteurs de ces réseaux : conserver les variétés anciennes d'une part et faire évoluer la diversité présente pour répondre à leur besoins d'autre part. La migration est un bon moyen pour augmenter la diversité d'une population et ainsi répondre au deuxième objectif. Par contre il est relativement difficile de maintenir des variétés anciennes de façon stable dans un système où des fortes migrations sont réalisées. Il pourrait donc être judicieux de dissocier les deux objectifs quand on se pose des questions sur la gestion de la migration même si la conservation du potentiel évolutif des variétés anciennes est aussi un objectif important.

Bibliographie

- Allard, R. W. (1996) Genetic basis of the evolution of adaptedness in plants. *Euphytica*, 92 :1–11.
- Allard, R. W., Zhang, Q., Saghai Marroof, M. A. and Muona, O. M. (1992) Evolution of multilocus genetic structure in an experimental barley population. *Genetics*, 131 :957–969.
- Alleaume-Benharira, M., Pen, I. R. and Ronce, O. (2006) Geographical patterns of adaptation within a species' range : interactions between drift and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(1) :203–215.
- Alvarez, N., Garine, E., Khasah, C., Dounias, E., Hossaert-McKey, M. and McKey, D. (2005) Farmers' practices, metapopulation dynamics, and conservation of agricultural biodiversity on-farm : a case study of sorghum among the duupa in sub-sahelian cameroon. *Biological Conservation*, 121(4) :533–543.
- Andren, H. (1994) Effects of habitat fragmentatiion on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat : a review. *Oikos*, 71 :355–366.
- Autrique, E., Nachit, M. M., Monneveux, P., Tanksley, S. D. and Sorrels, M. E. (1996) Genetic diversity in durum wheat based on rflps, morphophysiological traits, and coefficient of parentage. *Crop Science*, 36 :735–742.
- Bataillon, T. (2000) Estimation of spontaneous genome-wide mutation rate parameters : wither beneficial mutations? *Heredity*, 84 :497–501.

- Bataillon, T. and Kirkpatrick, M. (2000) Inbreeding depression due to mildly deleterious mutations in finite populations : size does matter. *Genetics Research*, 75(01) :75–81.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. and Bonhomme, F. (2000) Genetix 4.02, logiciel sous windows tm pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR, 5000*.
- Bennett, K. D., Tzedakis, P. C. and Willis, K. J. (1991) Quaternary refugia of north european trees. *Journal of Biogeography*, 18 :103–115.
- Berthaud, J., Clément, J. C., Emperaire, L., Louette, D., Pinton, F., Sanou, J. and Second, S. (2001) The role of local-level geneflow in enhancing and maintaining genetic diversity. In *Broadening the genetic base of crop production*, pages 81–104. Cooper, H. D. and Spillane, C. and Hodgkin, T.
- Boster, J. S. (1986) Exchange of varieties and information between aguaruna manioc cultivators. *American Anthropologist*, 88 :428–436.
- Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M. and Deschepper, C. F. (2001) M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*, pages 24–28.
- Brooking, I. R. and Jamieson, P. D. (2002) Temperature and photoperiod response of vernalization in near-isogenic lines of wheat. *Field Crops Research*, 79 :21–38.
- Brush, S. B. (1991) Farmer-based approach to conserving crop germplasm. *Economic Botany*, 45 :153–165.
- Brush, S. B. and Meng, E. (1998) Farmers' valuation and conservation of crop genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45 :139–150.
- Carpenter, D. (2005) The *in situ* conservation of rice plant genetic diversity : a case study from a philippine barangay. *Agriculture and Human Values*, 22 :421–434.
- Charlesworth, D. and Charlesworth, B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30 :479–513.

- Chebotar, S., Röder, M. S., Korzun, V., Saal, B., Weber, W. E. and Börner, A. (2003) Molecular studies on genetic integrity of open-pollinating species rye (*Secale cereale* L.) after long-term genebank maintenance. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 :1469–1476.
- Cheddadi, R., Vendramin, G. G., Litt, T., François, L., Kageyama, L.-S., M., Laurent, J.-M., de Beaulieu, J.-L., Sadori, L., Jost, A. and Lunt, D. (2006) Imprints of glacial refugia in the modern genetic diversity of *Pinus silvestris*. *Global Ecology and Biogeography*, 15 :271–282.
- Crow, J. F. and Kimura, M. (1970) *An introduction to population genetics theory*. Harper and Crow.
- Delaunay, S., Tesar, R. P., Oualbégo, A., Vom Brocke, K. and Lançon, J. (2008) Growing cotton does not disrupt traditional sorghum seed exchange. *Cahiers de l'Agriculture*, 17 :189–194.
- Ebert, D., Haag, C., Kirkpatrick, M., Riek, M., Hottinger, J. and Pajunen, V. (2002) A selective advantage to immigrant genes in a *Daphnia* metapopulation. *Science*, 295(5554) :485.
- Edmands, S. (1999) Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution*, 53(6) :1757–1768.
- Edmands, S. (2007) Between a rock and a hard place : evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology*, 16(3) :463–475.
- Elias, M., McKey, D., Panaud, O., Anstett, M. C. and Robert, T. (2001) Traditional management of cassava morphological and genetic diversity by the makushi amerindians (guyana, south america) : Perspectives for on-farm conservation of crop genetic resources. *Euphytica*, 120 :143–157.
- Emperaire, L. and Peroni, N. (2007) Traditional management of agrobiodiversity in brazil : a case study of manioc. *Human Ecology*, 35 :761–768.
- Erickson, D. and Fenster, C. (2006) Intraspecific hybridization and the recovery of fitness in the native legume *Chamaecrista fasciculata*. *Evolution*, 60(2) :225–233.

- Escobar, J. S., Nicot, A. and David, P. (2008) The different sources of variation in inbreeding depression, heterosis and outbreeding depression in a metapopulation of *Physa acuta*. *Genetics*, 180(3) :1593–1608.
- Esquinas-Alcázar, J. (2005) Science and society : protecting crop genetic diversity for food security : political, ethical and technical challenges. *Nat Rev Genet*, 6(12) :946–953.
- Excoffier, L., Laval, G. and Balding, D. (2003) Genetic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Human Genomics*, 1 :7–19.
- Excoffier, L., Laval, G. and Scheinder, S. (2005) Arlequin ver. 3.1 : An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1 :47–50.
- Eyre-Walker, A., Gaut, R. L., Hilton, H., Feldman, D. L. and S., G. B. (1998) Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 :4441–4446.
- Fahrig, L. (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics*, 34 :487–515.
- Fenster, C. B. and Galloway, L. F. (2000) Inbreeding and outbreeding depression in natural populations of *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Conservation Biology*, 14 :1406–1412.
- Fischer, M. and Matthies, D. (1997) Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentiana germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, 84(12) :1685–1685.
- Frankham, R. (1995) Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 29 :305–327.
- Franklin, I. R. and Frankham, R. (1998) How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation*, 1 :69–73.
- Fu, D., Szücs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J. S., von Zitzewitz, J., Hayes, P. M. and Dubcovsky, J. (2005) Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 273(1) :54–65.

- Gallais, A. (1990) *Théorie de la sélection en amélioration des plantes*. Masson.
- Galloway, L. F. and Etterson, J. R. (2005) Population differentiation and hybrid success in *Campanula americana* : geography and genome size. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(1) :81–89.
- Garcia-Ramos, G. and Kirkpatrick, M. (1997) Genetic models of adaptation and gene flow in peripheral populations. *Evolution*, 51 :21–28.
- Goldringer, I. and Bataillon, T. (2004) On the distribution of temporal variations in allele frequency : consequences for the estimation of effective population size and the detection of loci undergoing selection. *Genetics*, 168 :563–568.
- Goldringer, I., Brabant, P. and Gallais, A. (1997) Estimation of additive and epistatic genetic variances for agronomic traits in a population of doubled-haploid lines of wheat. *Heredity*, 79 :60–71.
- Goldringer, I., Enjalbert, J., David, J., Paillard, S., Pham, J. L. and Brabant, P. (2001) Dynamic management of genetic resources : a 13-year experiment in wheat. In H. Cooper, C. Spillane and T. Hodgkin, editors, *Broadening genetic base of crop production*, pages 245–260. CABI Publishing.
- Goldringer, I., Prouin, C., Rousset, M., Galic, N. and Bonnin, I. (2006) Rapid differentiation of experimental populations of wheat for heading time in response to local climatic conditions. *Annals of Botany*, 98(4) :805–817.
- Greeff, J. M., van Vuuren, G. J. J., Kryger, P. and Moore, J. C. (2009) Outbreeding and possibly inbreeding depression in a pollinating fig wasp with a mixed mating system. *Heredity*, 102(4) :349–356.
- Hammer, K., Arrowsmith, N. and Gladis, T. (2003) Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources. *Naturwissenschaften*, 90(6) :241–250.
- Hanocq, E., Laperche, A., Jaminon, O., Lainé, A. and Le Gouis, J. (2007) Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL meta-analysis. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 114(3) :569–584.
- Henry, J. P., Pontis, C., David, J. and Gouyon, P. H. (1991) An experiment on dynamic conservation of genetic resources with metapopulations. In A. Seitz

- and V. Loeschcke, editors, *Species conservation : a population biological approach*, pages 185–198. Birkhäuser verlag, Basel.
- Honnay, O. and Jacquemyn, H. (2007) Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conserv Biol*, 21(3) :823–831.
- Horsfall, T. G. (1972) Genetic vulnerability of major crops. In *National Academy of Science*.
- Ingvarsson, P. K. (2001) Restoration of genetic variation lost - the genetic rescue hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 16 :62–63.
- Jackson, L., Pascual, U. and Hodgkin, T. (2007) Utilizing and conserving agrobiodiversity in agricultural landscapes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 121 :196–210.
- Jaquiéry, J., Guillaume, F. and Perrin, N. (2009) Predicting the deleterious effects of mutation load in fragmented populations. *Conservation Biology*, 23(1) :207–218.
- Jarvis, D. I., Brown, A. H. D., Cuong, P. H., Collad-Panduro, L., Latrounerie-Moreno, L., Gyawali, S., Tanto, T., Sawadogo, M., Mar, I., Sadiki, M., Hue, N. T.-N., Arias-Reyes, L., Balma, D., Bajracharya, J., Castillo, F., Rijal, D., Belqadi, L., Rana, R., Saidi, S., Ouedraogo, J., Zanger, R., Rhrib, K., Chavez, J. L., and Bhuwon Sthapit, D. S., Santis, P. D., Fadda, C. and Hodgkin, T. (2008) A global perspective of the richness and evenness of traditional crop-variety diversity maintained by farming communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 :5326–5331.
- Kawecki, T. J. and Ebert, D. (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7(12) :1225–1241.
- Lande, R. (1995) Mutation and conservation. *Conservation Biology*, 9 :782–791.
- Lefort, M., Chauvet, M., Mitteau, M. and Sontot, A. (1998) La gestion des ressources génétiques en France. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2 :19–26.
- Lopez, S., Rousset, F., H., S. F., Shaw, R. G. and Ronce, O. (2009) Joint effects of inbreeding and local adaptation on the evolution of genetic load after fragmentation. *Conservation Biology*, 9999(9999).

- Louette, D. (2000) Traditional management of seed and genetic diversity : what is a landrace? In *Genes in the field : On-farm conservation of crop diversity*, pages 109–142.
- Louette, D., Charrier, A. and Berthaud, J. (1997) *In situ* conservation of maize in mexico : genetic diversity and maize seed management in a traditional community. *Economic Botany*, 51 :20–38.
- Lynch, M. (1991) The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*, 45 :622–629.
- Lynch, M., Blanchard, J., Houle, D., Kibota, T., Schultz, S., Vassilieva, L. and Willis, J. (1999) Perspective : spontaneous deleterious mutation. *Evolution*, 53 :645–663.
- Lynch, M. and Lande, R. (1998) The critical effective size for genetically secure population. *Animal Conservation*, 1 :70–72.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Donini, P. and Tuberosa, R. (2003) Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 :783–797.
- Madsen, T., Shine, R., Olsson, M. and Wittzell, H. (1999) Conservation biologyRestoration of an inbred adder population. *Nature*, 402(6757) :34–35.
- McGuire, S. J. (2007) Vulnerability on farmer seed systems : farmer practices for coping with seed insecurity for sorghum in eastern ethiopia. *Economic Botany*, 61 :211–222.
- McGuire, S. J. (2008) Securing access to seed : social relations and sorghum seed exchange in eastern ethiopia. *Human Ecology*, 36 :217–229.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Newman, D. and Tallmon, D. A. (2001) Experimental evidence for beneficial fitness effects of gene flow in recently isolated populations. *Conservation Biology*, 15 :1054–1063.
- Ohta, T. and Cockerham, C. C. (1974) Detrimental genes with partial selfing and effects on a neutral locus. *Genetical Research*, 23 :191–200.

- Paillard, S. (1999) *Evolution des résistances à différentes maladies dans des populations de blé tendre (Triticum aestivum L.) menées en gestion dynamique*. Ph.D. thesis, Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Paillard, S., Goldringer, I., Enjalbert, J., Doussinault, G., de Vallavieille-Pope, C. and Brabant, P. (2000a) Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. i - is specific seedling resistance selected? *Theoretical and Applied Genetics*, 101 :449–456.
- Paillard, S., Goldringer, I., Enjalbert, J., Trottet, M., David, J., de Vallavieille-Pope, C. and Brabant, P. (2000b) Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. ii- adult plant resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 101 :457–462.
- Parzies, H. K., Spoor, W. and Ennos, R. A. (2000) Genetic diversity of barley landrace accessions (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) conserved for different lengths of time in *ex situ* gene banks. *Heredity*, 84 :476–486.
- Porcher, E., Gouyon, P.-H. and Lavigne, C. (2004) Dynamic management of genetic resources : maintenance of outcrossing in experimental metapopulations of a predominantly inbreeding species. *Conservation Genetics*, 5 :259–269.
- Prescott-Allen, R. and Prescott-Allen, C. (1982) The case for *in situ* conservation of crop genetic resources. *Nature and Resources*, 28 :15–20.
- Pressoir, G. and Berthaud, J. (2004) Population structure and strong divergent selection shape phenotypic diversification on maize landraces. *Heredity*, 92 :95–101.
- Raquin, A., Brabant, P., Rhone, B., Balfourier, F., Leroy, P. and Goldringer, I. (2008a) Soft selective sweep near a gene that increases plant height in wheat. *Molecular Ecology*, 17(3) :741–756.
- Raquin, A.-L. (2005) *Evolution de la diversité microsatellite dans une population de blé tendre conduite en gestion dynamique : effets de la mutation, de la dérive et de la sélection*. Ph.D. thesis, Université Paris XI.
- Raquin, A.-L., Depaulis, F., Lambert, A., Galic, N., Brabant, P. and Goldringer, I. (2008b) Experimental estimation of mutation rates in a wheat population with a gene genealogy approach. *Genetics*, 179 :2195–2211.

- Reed, J. M., Mills, L. S., Dunning, J. B., Menges, E. S., McKelvey, K. S., Frye, R., Beissinger, S. R., Anstett, M. C. and Miller, P. (2002) Emerging issues in population viability analysis. *Conservation Biology*, 16 :7–19.
- Remington, D. L. and Purugganan, M. D. (2003) Candidate genes, quantitative trait loci, and functional trait evolution in plants. *International Journal of Plant Science*, 164 :S7–S20.
- Rhoné, B. (2008) *Genetic mechanisms involved in climatic adaptation of experimentally evolving populations of bread wheat*. Ph.D. thesis, AgroParisTech, Paris, France.
- Rhoné, B., Remoué, C., Galic, N., Goldringer, I. and Bonnin, I. (2008) Insight into the genetic bases of climatic adaptation in experimentally evolving wheat populations. *Molecular Ecology*, 17(3) :930–943.
- Rhoné, B., Vitalis, R., Goldringer, I. and Bonnin, I. (2010) Evolution of flowering time in experimental wheat populations : a comprehensive approach to detect genetic signatures of natural selection. *Evolution*, Advanced Online.
- Richards, C. M. (2000) Inbreeding depression and genetic rescue in a plant metapopulation. *The American Naturalist*, 155(3) :383–394.
- Ritland, K. and Ganders, F. R. (1987) Crossability of *Mimulus guttatus* in relation to components of gene fixation. *Evolution*, 41 :772–786.
- Roussel, V., Koenig, J., Beckert, M. and Balfourier, F. (2004) Molecular diversity in french bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes. *Theoretical and Applied Genetics*, 108 :920–930.
- Roux, F., Touzet, P., Cuguen, J. and Le Corre, V. (2006) How to be early flowering : an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 11 :375–381.
- Russell, J. R., Ellis, R. P., Thomas, W. T. B. and ETAL ???? (2000) A retrospective analysis of spring barley germplasm development from "foundation genotypes" to currently successful cultivars. *Molecular Breeding*, 6 :553–568.
- Saccheri, I. and Brakefield, P. (2002) Rapid spread of immigrant genomes into inbred populations. *Proceedings of the Royal Society of London-B-Biological Sciences*, 269(1495) :1073–1078.

- Sala, O., Chapin III, F., Armesto, J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L., Jackson, R., Kinzig, A. *et al.* (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287(5459) :1770.
- Schierup, M. H. and Christiansen, F. B. (1996) Inbreeding depression and outbreeding depression in plants. *Heredity*, 77(5) :461–468.
- Sherman, J. D., Yan, L., Talbert, L. and Dubcovsky, J. (2004) A PCR marker for growth habit in common wheat based on allelic variation at the *VRN-A1* gene. *Crop Science*, 44 :1832–1838.
- Simmons, M. J. and Crow, J. F. (1977) Mutation affecting fitness in *Drosophila* populations. *Annual Review of Genetics*, 11 :49–78.
- Soengas, P., Cartea, E., Lema, M. and Velasco, P. (2009) Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. *Molecular Breeding*, 23 :389–395.
- Somers, Isaac and Edwards (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 109(6) :1105–1114.
- Springer, N. M. and Stupar, R. M. (2007) Allelic variation and heterosis in maize : How do two halves make more than a whole? *Genome Research*, 17 :264–275.
- Tallmon, D. A., Luikart, G. and Waples, R. S. (2004) The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(9) :489–496.
- Theodorou, K. and Couvet, D. (2006) Genetic load in subdivided populations : interactions between the migration rate, the size and the number of subpopulations. *Heredity*, 96(1) :69–78.
- Thomas, G., Rousset, M., Pichon, M., Trottet, M., Doussinault, G. and Picard, E. (1991) Méthodologie de l'amélioration de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). i, création par croisements et analyse d'une population artificielle à 16 parents, base de cette étude méthodologique. *Agronomie*, 11(5) :359–368.
- Thuillet, A. C., Bataillon, T., Poirier, S., Santoni, S. and David, J. L. (2005) Estimation of long-term effective populations sizes through the history of durum wheat using microsatellite data. *Genetics*, 169 :1589–1599.

- UNCED (2000) Convention on biological diversity. In *Proceedings of the United Nation conference on environment and development, Rio de Janeiro, Brazil*.
- Vila, C. (2003) Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 270(1510) :91–97.
- vin Brocke, K., Weltzien, E., Christinck, A., Presterl, T. and Geiger, H. (2003) Effects of farmers' seed management on performance and adaptation of pearl millet in rajasthan, india. *Euphytica*, 130 :267–280.
- Wang, J. (2004) Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conservation Biology*, 18 :332–343.
- Waples, R. S. (1989) A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, 121(2) :379–391.
- Waser, N. and Price, M. (1989) Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata* : seed set and offspring fitness. *Evolution*, pages 1097–1109.
- Waser, N. M., Price, M. V. and Shaw, R. G. (2000) Outbreeding depression varies among cohorts of *Ipomopsis aggregata* planted in nature. *Evolution*, 54 :485–491.
- Weir, B. and Cockerham, C. (1984) Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6) :1358–1370.
- Whitlock, M. C. (2002) Selection, load and inbreeding depression in a large metapopulation. *Genetics*, 160 :1191–1202.
- Willi, Y. and Buskirk, J. V. (2005) Genomic compatibility occurs over a wide range of parental genetic similarity in an outcrossing plant. *Proceedings of the Royal Society B*, 272 :1333–1338.
- Willi, Y., Kleunen, M., Dietrich, S. and Fischer, M. (2007) Genetic rescue persists beyond first-generation outbreeding in small populations of a rare plant. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 274(1623) :2357.
- World Conservation Monitoring Centre (1992) *Global biodiversity : Status of the Earth's living resources*. Chapman & Hall, London.
- Wright, S. (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16 :97–159.

- Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J. and Dubcovsky, J. (2004) Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 :1677–1686.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T. and Dubcovsky, J. (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN-1*. *Proc Natl Acad Sci US A*, 100 :6263–6268.
- Young, A. G., Boyle, T. and Brown, T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10) :413–418.
- Young, A. G. and Clarke, G. M., editors (2000) *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Annexes

Annexe A

Protocoles de biologie moléculaire

A.1 Protocole d'extraction d'ADN

Protocole d'extraction d'ADN en plaque Whatman

Objectifs :

Extraire de l'ADN de haute qualité pour la PCR, à partir de poudre de feuilles lyophilisée (ou fraîche). Avec une plaque Whatman, on obtient de quoi faire une cinquantaine de réactions PCR.

Principe Général de la manipulation.

- Extraction des composés hydrosolubles en présence de métabisulfite, puis précipitation d'une partie des protéines par l'acétate de potassium et centrifugation pour éliminer les débris insolubles.
- Fixation des acides nucléiques sur une membrane de silice en présence d'ions chaotropes (chlorure de guanidium), lavage de la membrane, puis élution de l'ADN.

Domaine d'application :

- Toutes applications reposant sur la PCR, pour lesquelles la qualité de l'ADN est importante, mais il n'est pas nécessaire d'obtenir de grosses quantités (à exclure pour des blots).
- En particulier : amplification PCR de gènes pour séquençage ou génotypage SNP.

Matériel :

- 20mg de feuilles broyées à froid puis lyophilisées aliquotées dans une plaque DeepWell 2mL.
- Pipette multicanaux P300 avec cônes adaptés. (**Ne pas utiliser les cônes habituels de P200**)
- Centrifugeuse Héraus à 4°C
- Bain marie à 65°C
- 2 plaques deep well 2mL
- 2 plaques PCR 96
- 2 plaques de filtration (membrane laine de verre) Whatman unifilter 800 GF/B (Whatman Ref 7700-2803)

Réactifs :

1) Tampon d'extraction :

Volume final	100 ml	200 ml	300 ml	400ml
Tris 1M pH = 8	10ml	20	30	40
EDTA 0,5M	10ml	20	30	40
NaCl 2.5M	20ml	40	60	80
SDS 20%	6,25ml	12,5	19	25
PVP 40000	1 g	2 g	3 g	4 g
Na Bisulfite	1 g	2 g	3 g	4 g
ddH ₂ O	53.5ml	107ml	161ml	215

Ajouter le NaBisulfite et la RNase A (Amersham Ref XXXX) au moment de l'utilisation.

2) Acétate de potassium: (3M K et 5M Ac)

Pour 100 ml : mélanger 60 ml de KAc 5M, 11.5 ml d'acide acétique glacial et 28.5 ml d'H₂O.

3) Tampon CGE (Chlorure de Guanidium 7.8M / Ethanol)

- Solution de Chlorure de guanidium 7.8 M. (Sigma Ref G-3272)

Dissoudre 37.25 gr de chlorure de guanidium dans l'eau jusqu'à un volume final de 50 ml de solution (faire le mélange dans un tube Sarstedt de 50 ml).

- Le tampon CGE est obtenu en mélangeant 1/3 de solution de chlorure de guanidium 7.8 M et 2/3 d'éthanol à 96%.

4) Tampon de lavage (éthanol et sels d'acétate de potassium)

- Faire une solution aqueuse (Acétate de potassium 160 mM, Tris HCl pH 8 22,5 mM, EDTA 0,1 mM)

Volume final	100 ml	200 ml	300 ml	400ml
Tris 1M pH = 8	2,25 ml	4,5 ml	6,75 ml	9 ml
EDTA 0,5M	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl
Acétate de potassium 5 m	3,2 ml	6,4 ml	9,6 ml	12,8 ml
ddH ₂ O	94,50 ml	189 ml	283,50 ml	378 ml

- Le tampon de lavage est obtenu en mélangeant 100 ml de cette solution et 170 ml d'éthanol à 96%.

Hygiène et sécurité.

- Le tampon CGE contient du chlorure de guanidium qui est irritant. Porter des gants et éviter tout contact avec la peau.

Déroulement de la manipulation

DUREE : 3 Heures sans compter l'aliquotage des poudres (environ 1 heure 1/2 par plaque) et la préparation des solutions.

Personne de référence pour ce protocole :Xavier RAFFOUX.

1) Phase d'extraction :

Préchauffer le tampon d'extraction à 65°C.

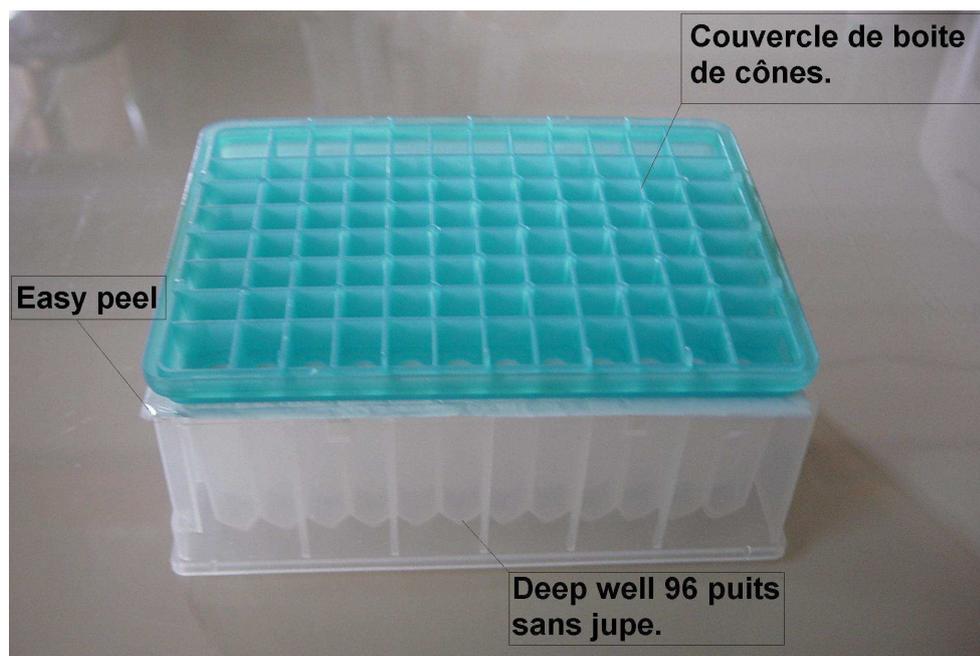
Ajouter le Na Bisulfite : 1g pour 100mL

Repartir 1000µL de tampon d'extraction dans chaque puit.

Fermer la plaque Deep Well avec un film EasyPeel (appuyer sur le film en frottant avec un kleenex).

Agiter doucement par inversion en maintenant le film EasyPeel avec un kleenex et un couvercle de boîte de cône.Le tout maintenu avec des élastiques.

Incuber à 65°C pendant 30 min au bain marie en plaçant un couvercle de boîte de cône maintenu par des élastiques sur la plaque. Agiter par inversion toutes les 10 minutes.



2) Déprotéinisation et filtration

Ajouter 300 μl (avec multidispenseur eppendorf seringue 5mL) d'acétate de K (5M/3M) froid (dans la glace). Sceller la plaque avec un film EasyPeel. Agiter doucement par inversion en utilisant un support de boîte de cône pour maintenir le film easy peel. Incuber 5 min dans la glace.

Centrifuger 10 min à 5600 rpm à 4°C, rotor 6444.

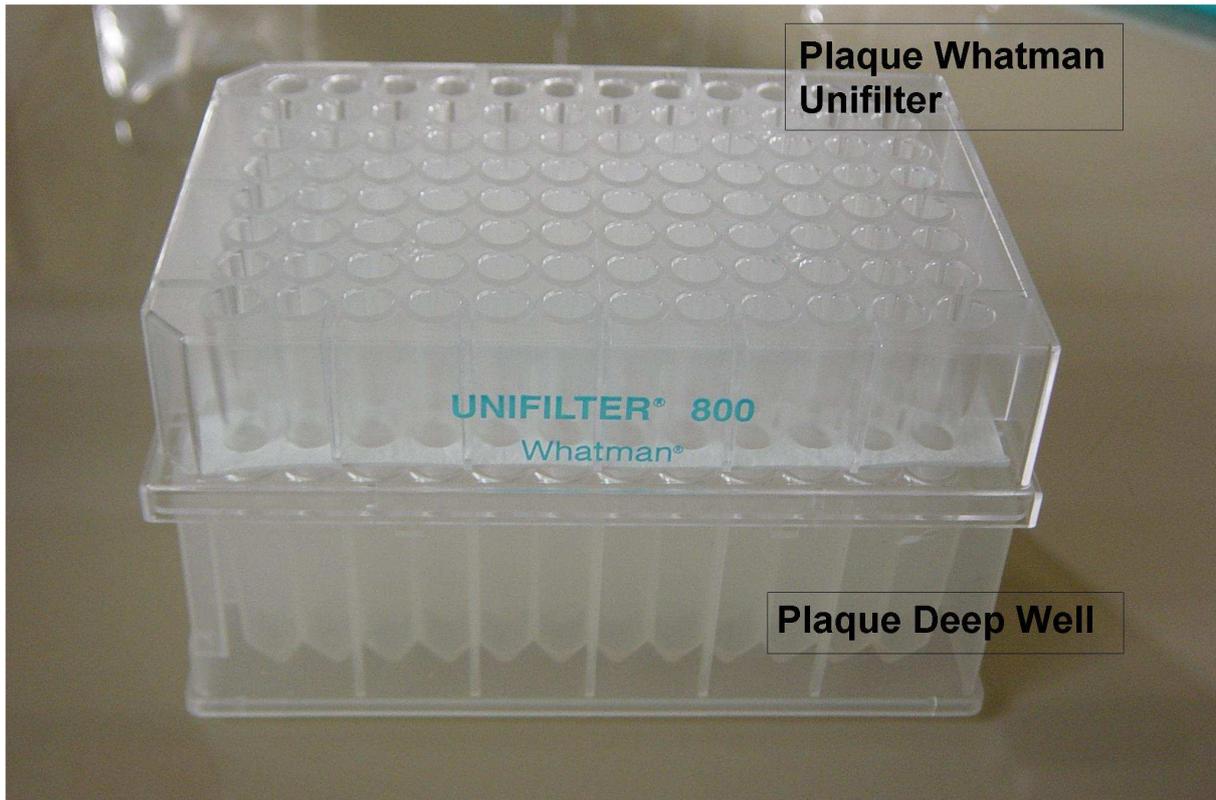
Transférer 800 μl (4X200 μL avec multi eppendorf) de surnageant dans une plaque DeepWell 96 propre.

3) Fixation de l'ADN

Ajouter 1000 μl de tampon CGE (avec multidispenseur et seringue 10mL).

Mélanger soigneusement par pipetage.

Appliquer 800 μl du mélange sur chaque plaque Whatman unifilter (avec multi eppendorf). Centrifuger les plaques 2 min à 5600 rpm à T° ambiante. Eliminer le liquide qui passe dans une vieille plaque 96 Deepwell.



4) Lavage

1° lavage: déposer 500 μ l de tampon de lavage (Ethanol et sel d'acétate de potassium) sur chaque colonne. Centrifuger les plaques 2 min à 5600 rpm à T° ambiante. **Eliminer le liquide qui passe.**

2° lavage: déposer 500 μ l de tampon de lavage (Ethanol et sels d'acétate de potassium) sur la colonne. Centrifuger les plaques 15 min à 5600 rpm à T° ambiante (pour bien essorer la colonne). **Eliminer le liquide qui passe.**

ELUTION DE L'ADN



Positionner les plaques PCR 96 sur un support de boîte de cône bleue. Poser les colonnes sur cet assemblage.

Déposer sur chaque colonne 50 μ l d'eau UP préchauffée à 65 °C. Attendre 5 min à T° ambiante.

Centrifuger 2 min à **1000** rpm à T° ambiante. Récupérer le liquide qui passe sur les plaques PCR 96 en polypropylène

Déposer de nouveau sur la colonne 50 μ l d'eau UP préchauffée à 65 °C. Attendre 5 min à T° ambiante.

Centrifuger 2 min à **1000** rpm à T° ambiante. Récupérer le liquide qui passe sur les plaques PCR 96 en polypropylène.

Congeler les ADN natifs.

Faire un gel de contrôle agarose standard 0.8%

A.2 Protocoles de révélation du polymorphisme de *VRN-1*

Protocole d'analyse du polymorphisme de *VRN1*

VRN1A Exon 7

1) Mélange réactionnel PCR

Produits	Concentration/ Quantité finale
Tampon	1 X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,1 mM
Amorce F	0,5 µM
Amorce R	0,5 µM
Taq	1 U
ADN	25 ng
Volume total	22 µl

2) Programme d'amplification

Etapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation	94 °C	4 min	1
Dénaturation	94 °C	1 min	10
Hybridation	Décrément de 1°C à chaque cycle de 65°C à 55°C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min 30	
Dénaturation	94 °C	1 min	21
Hybridation	55 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min 30	
Elongation finale	72 °C	5 min	1
Conservation	4 °C 10°C	5 min infini	

Nom	Séquence 5'-3'	Taille attendue	T°
VRN_1_A_int4_F	TCAGATTCTAGACTGAGATGTTCAA	807	55°C
VRN_1_A_3'UTR_R	GATGTGGCTCACCATCCACG		

Ensuite digestion du produit PCR par l'enzyme Aci I

VRN1A Promoteur

1) Mélange réactionnel PCR

Produits	Concentration/ Quantité finale
Tampon	1 X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 mM
Amorce F-M13	0,1 µM
Amorce R	0,1 µM
Queue M13	0,025 µM
Taq	1 U
ADN	25 ng
Volume total	22 µl

2) Programme d'amplification

Etapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation	94 °C	5 min	1
Dénaturation	94 °C	20 sec	30
Hybridation	55 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Elongation finale	72 °C	3 min	1
Conservation	4 °C	10 min	

Nom	Séquence 5'-3'
VRN_1_A_pr_F-M13	CACGACGTTGTAACGAC GAAAGGAAAAATTCTGCTCG
VRN_1_ex1_R	TGCACCTTCCCSCGCCCAT

Allèles	Taille
02	483 pb
01	705 et 614 pb
05	463 pb
03	483 pb
04	> 463 pb

A.2. Protocoles de révélation du polymorphisme de *VRN-1*

VRN1B Intron 1

1) Mélange réactionnel PCR

Produits	Concentration/ Quantité finale
Tampon	1 X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,1 mM
Amorce F	0,5 µM
Amorce R	0,5 µM
Amorce R Del	0,5 µM
Taq	1 U
ADN	25 ng
Volume total	22 µl

2) Programme d'amplification

Etapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation	94 °C	4 min	1
Dénaturation	94 °C	30 sec	10
Hybridation	Décrément de 1°C à chaque cycle de 70°C à 60°C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min 30	
Dénaturation	94 °C	30 sec	28
Hybridation	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min 30	
Elongation finale	72 °C	10 min	1
Conservation	4 °C	10 min	

Nom	Séquence 5'-3'	Allèle	Taille attendue	T°
VRN1B_int1_NoDel_F = VRN1B_int1_del_F	CAAGTGGAAACGGTTAGGACA	01	1149	60°C
VRN1B_int1_NoDel_R	CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA			
VRN1B_int1_del_R	CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	02	709	60 °C

VRN1D Intron 1

1) Mélange réactionnel PCR

Produits	Concentration/ Quantité finale
Tampon	1 X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,1 mM
Amorce F	0,5 µM
Amorce R	0,5 µM
Amorce R Del	0,5 µM
Taq	1 U
ADN	25 ng
Volume total	22 µl

2) Programme d'amplification

Etapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation	94 °C	4 min	1
Dénaturation	94 °C	30 sec	10
Hybridation	Décrément de 1°C à chaque cycle de 68°C à 58°C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min 30	
Dénaturation	94 °C	30 sec	28
Hybridation	58 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min 30	
Elongation finale	72 °C	10 min	1
Conservation	4 °C	10 min	

Nom	Séquence 5'-3'	Taille attendue	T°	Allèle
VRN1D_int1_NoDel_F = VRN1D_int1_del_F	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC	997	58°C	01
VRN1D_int1_NoDel_R	AAATGAAAAGGAACGAGAGCG			
VRN1D_int1_del_R	GGTCACTGGTGGTCTGTGC	1671		02