

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
AGROSUP DIJON

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences de l'Université de Bourgogne

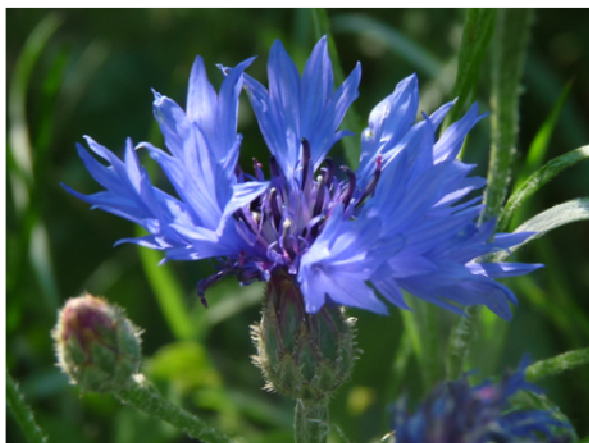
Discipline : Science de la Vie

Par

BELLANGER Solène

Le 06 décembre 2011

ETUDE DE LA BIOLOGIE D'UNE MESSICOLE EN
REGRESSION : LE BLEUET (*CENTAUREA CYANUS* L.)



Directeur de thèse

DARMENCY Henri

Co-directeur de thèse

GUILLEMIN Jean Philippe

Jury :

Dr. Nathalie MACHON,

Pr. Isabelle OLIVIERI,

Dr. Jean François ARNAUD,

Pr. Baerbel GEROWITT,

Pr. François BRETAGNOLLE,

Dr. Henri DARMENCY,

Pr. Jean Philippe GUILLEMIN,

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Président

Directeur de thèse

Co-encadrant

*Qu'est-ce donc qu'une mauvaise herbe, sinon une plante dont on n'a pas
encore découvert les vertus ?
[Ralph Waldo Emerson]*

REMERCEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidée à la réalisation de cette thèse et plus particulièrement :

Henri et Jean-Philippe, pour leur encadrement. Merci pour la confiance et l'indépendance que vous m'avez accordées pendant ces trois années. Je vous remercie aussi pour votre soutien et votre disponibilité.

Fabrice, pour ton aide et tes conseils en statistiques, merci pour ta gentillesse, ta patience et ta disponibilité.

Les membres de mon jury : Nathalie Machon et Isabelle Olivieri pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Jean-François Arnaud et François Bretagnolle d'être présent pour ma soutenance.

Les membres de mon comité de pilotage de thèse : Emmanuelle Porcher, Fabrice Roux, Josiane LeCorff, Pierre Frank, Valérie LeCorre et Xavier Reboud pour vos conseils qui m'ont permis d'avancer.

La Plateforme de Géotypage Gentyane de l'INRA de Clermont-Ferrand et plus particulièrement Charles Poncet, Lydia Jaffrelo et Nathalie Bernard.

Je tiens à remercier l'ensemble du **laboratoire Biologie et Gestion des Adventices** pour l'accueil et la disponibilité de tous.

Bruno pour m'avoir formée en botanique. Je te remercie pour tes encouragements du début à la fin de ma thèse. A quand les prochaines Achille dans les colzas ?

Louis, toujours le mot pour me faire rire. J'ai apprécié toutes les conversations, parfois étranges d'ailleurs, que l'on a pu avoir.

Merci à l'ensemble des techniciens qui ont toujours été disponible pour répondre à mes questions et m'aider si nécessaire. Je tiens plus particulièrement à remercier :

Annick, pour ces trois ans de cohabitation des plus agréables. Tu as toujours été disponible pour m'écouter me plaindre, râler et chouiner ! J'ai vraiment apprécié nos conversations et nos rigolades (« rafenelle »). Grâce à ton savoir et à ton expérience, tu as toujours été de bon conseil pour la mise en place des expérimentations. Tu m'as aussi beaucoup aidée dès que tu en avais le temps et je t'en remercie. Bref, tu as été une maman, une psy, une infirmière, une amie et bien sûr une technicienne hors paire ; un peu comme Pacha pour Kuzco, un guide qui a su me supporter et me faire rire. Promis je t'offre les dieux du stade 2012 !

Carole, pour toute l'aide que tu m'as donnée, le terrain, la mesure de capitule et bien sûr la bio mol (à la louche !). Je pense que le Lycor restera pour moi associé à un appareil qui ne veut jamais marcher, te parle parfois et qui a provoqué de façon détournée un bel hématome à ton nez. Merci aussi pour le temps que tu as passé à relire et vérifier mes références bibliographiques. Tu es un peu comme Roger rabbit, une pipelette un peu boulet toujours souriante et disponible.

Séverine, pour ton aide et ta patience en BM (tu peux me découper une plaque?). On peut dire que tu as fait parti des gens à m'avoir supportée, gentille et mignonne que je suis ! Tu as souvent pris soin de Cécile et moi, en nous

préparant des petits plats un peu comme Monica dans Friends (heureusement, en moins maniaque). D'ailleurs, j'attends le prochain porc au caramel avec impatience.

Fanny, toi aussi tu as semé, mesuré et compté des bleuets. Malgré une forte ressemblance avec le personnage de Gru dans Moi, moche et méchant, je te remercie de m'avoir écoutée me lamenter et de m'avoir nourrie avec les légumes de ton jardin pendant ma période de rédaction. Au fait, il était un petit homme pirouette cacahouète...

Emilie, pour m'avoir ramenée un pantalon lorsque le mien a craqué en plein milieu des champs ! Pour être venue à Chizé, former Virginie et pour m'avoir donnée un coup de main. J'ai apprécié tous tes passages plus ou moins éclairés dans notre bureau. Tu es un peu comme Christopher McCandless, remplie d'un besoin de liberté et de grands espaces que je respecte et apprécie.

Hugues, l'homme de la situation ! A chaque fois que j'ai eu besoin d'un homme fort tu arrivais comme par magie, un peu à la Super Dupont. Toujours souriant, tu as souvent été ma petite pause du weekend. A cette journée à Vulcania qui m'a fait découvrir l'Auvergne et ses fromages.

Merci aussi à **Florence et François** pour la couture et les cages et **Gilles** pour les conversations et toutes les belles photos.

Les secrétaires, vous avez été toutes les trois toujours accueillantes, disponibles, souriantes et en plus vous répondiez à toutes mes questions !

Merci à tous les **sernistes**, grâce à vous aucun bleuets n'est mort mais beaucoup de mouches se sont évadées !!

Merci aux doctorants, pour la solidarité et les échanges scientifiques ou non. Bon courage aux prochains qui soutiendront ! Un merci plus particulier à :

Coraline, ou plutôt Patoche la poule Playmobile, qui a été présente tout au long de ma thèse et avec qui j'ai vécu des moments particuliers ! Pendant trois années, tu as été mon chauffeur personnel, parfois à mon désavantage. Je me rappelle plus particulièrement, de la fois où la voiture s'est embourbée, qu'il a fallu la pousser et du torticolis qui a suivi. Merci pour toute l'aide que tu m'as donnée. Au-delà du chauffeur, tu as toujours été présente pour me donner des coups de mains lorsque j'en avais besoin, quitte à devoir compter des centaines de feuilles en plein cagnard ! Finalement, je n'oublierai pas nos conversations, « Les Vamps » n'ont qu'à bien se tenir ! Au fait, et ce crumble banane chocolat ?

Jeanne, petit bébé arrivé récemment (en thèse) au sein du laboratoire. J'ai commencé à t'apprécier avec les Predators, l'Agence tout risque ou the Expendables, merci Bastien pour ces grands films ! A suivi notre goût commun pour Eternal Sunshine of the Spotless Mind, et finalement Ready to Bio, chef d'œuvre bourguignon, avec Adou (tellement bien avec des cheveux), mon modèle !! Garden State est probablement un film qui te correspond mon rôti de porc (ou Babe) !

Aude, merci pour le krigeage et les sorties piscines.

A mes deux stagiaires :

Pauline, petite padawan très efficace qui a eu su rester scotcher devant des fleurs à compter des pollinisateurs toute la journée et qui a eu le courage de faire des izoenzymes. J'attends les prochains macarons avec impatience.

Homonyme, tu as réussi à sortir indemne d'une expérimentation lourde remplie de mouche, si ce n'est cette entorse sortie de je ne sais où. *Siréna* est je pense la personne qui te va le mieux quelque soit le film !!

Aux personnes qui sont passées à *BGA* et qui sont devenues des amis :

Karolle, pour ta disponibilité. Tu as encapuchonné, semé, mesuré, récolté ; tu m'as aussi écouté chouiner et râler ! Tu as souvent été la personne aux bons conseils pour moi, même si tu devrais arrêter de tout centrer sur toi. Après tout c'est moi la personne parfaite ! Les Orphelins de Baudelaire n'ont qu'à bien se tenir !

Karine, dont la joie (surtout le rire) et la bonne humeur sont communicatives, un peu comme Fran Drescher. Merci d'avoir semé, compté et mesuré des plantes.

Cécile, pour ces discussions qui ont durées des heures. Depuis que tu as Ramon et ton appareil à tout faire, c'est de la triche, je suis jalouse !

Bastien, pour les sorties et les soirées. Je pense qu'*Homère* te va bien !

Je tiens aussi à remercier ma famille et mes amis pour leurs soutiens pendant ces trois années.

Tout d'abord, **mes parents**, toujours présent et à l'écoute. Mes sœurs ensuite : *Nana*, qui fut la plus compatissante ; avoir fait une thèse hier te permet d'être de bons conseils aujourd'hui. Heureusement que tu m'as fait une phrase remonte moral qui marche trop bien. *Totoro* est le personnage qui te correspond le mieux. *Didi*, ma petite sœur ou le Vilain petit canard (je sais encore une fois je suis méchante !), est toujours présente. Tu es celle qui réussissait à me faire penser à autre chose quand ça n'allait pas. Vive Notre belle famille !

Mes amis ensuite, **mimine et bibi**, l'avocat du diable et *Stitch*, toutes deux toujours là et qui m'ont appris à oublier ses a priori. La première, de bon conseil, capable de se faire l'avocat du diable et qui a toujours réussi à me faire réfléchir et prendre du recul avant toutes choses. La deuxième, qui m'a fait relativiser ma thèse et m'a fait croire que, finalement, Dijon c'était le pays des Bisounours ! *Angel*, le Gentil Petit Diable sur mon épaule depuis la fac, nos coïncidences et nos discussions me manquent. *Bérénice*, présente depuis la maternelle, à force de s'attendre on va peut être enfin réussir à les finir ces études ! Tu es une des personnes les plus courageuses que je connaisse et tu m'as appris à ne jamais abandonner, je t'en remercie. *Yoan* (*Ratatouille*) et *Cyril* (*Gaston Lagaffe*), ces vacances en Nouvelle Calédonie ont été les meilleures et m'ont permis de complètement oublier ma thèse pendant un cours laps de temps. Vive les cagous et les tricots rayés !

*Un éléphant, convenablement beurré,
tombera, quoi qu'il arrive, côté éléphant
[Loi de Murphy]*

*Les insectes sont nos amis
Il faut les aimer aussi
Mais connaissez-vous les noms
De mes nouveaux compagnons.
Laissez-moi vous présenter
Mes bebetes préférés :*

*Moi je m'appelle Moucham
Je suis une mouche verte
Mes menus gastronomiques
Sont sur papier hygiénique
Mes menus gastronomiques
Sont sur papier hygiénique*

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP : Analyses en Composantes Principales
AD : Akènes dormants
AFD : Analyse Factorielle Discriminante
AG : Akènes Germées
AGE : Akènes germés à l'enfouissement
ANI : Akènes Non Intacts
ANV : Akènes non viables
ANVT : Akènes Non Viables Totales
AV : Akènes pleins
BH : Bordure herbacée
CapFl : Nombre de capitules en fleur
CapGr : Nombre de capitule grainés
CapTot : Nombre de capitules totaux
CbàSp : Zone de Corcelles-les-Monts
CE : Compartiment échantillonné
ChOFe : Zone de Domois
F : Fourrière (chapitre 2-B)
F : Inbreeding Coefficient (chapitre 2 C-II)
FOY : Zone de la La Foye-Moujault
FsO : Zone de Fleurey-sur-Ouche
Fst : Coefficient de différenciation entre populations
GA₃ : Acide gibbérellique
GPS : Global Positioning System
GSI : Gametophytic incompatibility system
He : Hétérozygotie attendue non biaisé
Ho : Hétérozygotie observée
Ht : Hauteur de la plante
HW : Hardy-Weinberg
I : Interface

ID : Inbreeding depression

JrFlo : Nombre de jour séparant la levée de la floraison

K : Nombre de populations testées sous structure

Lgvc : Zone de Longvic

N : Nombre total d'individus

Na : Nombre d'allèles par locus

NbCap : Number of capitula per plant

NbFl : Number total of flowers per capitulum

NbSd : Number of seeds produced

NbSdAb : Number of aborted seeds per flower

NbUnFl : Number of unfertilized flowers

NG : Nombre de plantes génotypés

NP : Nombre d'individus prélevés

PC : Plein champ

PCA : Principal component analysis

PCR : Polymerase chains reaction

PdSc : Poids sec des plantes

PlHg : Height of plants

PSC : Pseudo self-compatible

REML : Maximum de vraisemblance

SC: Self-compatibility

SdWg : Seeds weight

SI : Incompatibility system ou Système d'incompatibilité

UMR BGA : Unité Mixte de Recherche, Biologie et Gestion des Adventices

Wc : Fitness cumulative

WgD : Weight dry of plants

Wo : Fitness of outcrossed

Ws : Fitness of self-fertilized

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

- Figure 1 :** Différentes composantes de la biodiversité (standards, additionnelles ou alternatives) ainsi que les concepts utilisés pour définir la diversité biologique (Duelli & Obrist, 2003). P11
- Figure 2 :** Principales causes anthropiques (en vert) et leurs conséquences (en rouge) sur les habitats ou sur les espèces (d'après Isik, 2011). p12
- Figure 3 :** Dessin de *Centaurea cyanus* comprenant une plante, un akène et une inflorescence (The Illustrated Flora Of British Columbia). p16
- Figure 4 :** Différents états d'un akène de *Centaurea cyanus* avec en a) une fleur non fécondée, en b) un akène en cours de maturation et en c) un akène mature. p16
- Figure 5 :** Distribution du bleuet en France, en blanc les département ou aucun bleuet n'a été signalé (d'après Téla Botanica). p17

CHAPITRE I

- Figure BI-1:** Origin of the plant material used in the experiments. The mating system of plants from Poitou-Charentes and Burgundy were tested under self-fertilization or outcrossing conditions (first generation). Seeds produced under self-fertilization conditions were separated into three groups according to the number of seeds produced: those producing less than 0.02 seed per flower (G0), those producing between 0.02 and 0.05 seed per flower (G1) and those producing more than 0.06 seed per flower (G2). Clones from G0, G2 and outcrossed plants were tested in self-fertilization and in outcrossing condition (second generation). p38
- Figure BI-2:** Number of seeds produced per flower according to the mating system (outcrossed or self-fertilization with pollinators) for the first generation. The seed number was represented as the 25th and 75th quartiles (horizontal lines), the median corresponds to the bold line and the whiskers show the minimal and the maximal value, not including outliers (indicated by circles). Means compared with a Mann-Whitney test, $p < 0.001$. p41
- Figure BI-3:** Distribution of the number of plants according to the number of seeds per flower under the self-fertilization with pollinators condition. Group G0 corresponds to the plants that produced less than 0.02 seeds per flower, plants in group G1 produced between 0.02 and 0.05 seeds per flower and group G2 corresponds to the plants producing more than 0.06 seeds per flower. p43
- Figure BI-4:** Factorial discriminant analysis (FDA), on the left, according to the number of seeds per flower produced in the fly-pollinated self-

fertilization group: G0=less than 0.02 seed per flower (light grey triangles); G1=between 0.02 and 0.05 (dark grey diamonds); and G2=more than 0.06 (black squares). The groups were discriminated depending on their mean traits values (plant height, number of capitula, of flowers per capitulum and flower volume). Black circles represent the barycentres. On the right, one-dimensional test of equal average class according to the G0-G1-G2 grouping for each trait measured.

p44

Figure BI-5: Number of seeds produced per flower according to the mating system (outcrossed or self-fertilization with pollinators) for the second generation. The seed number was represented as the 25th and 75th quartiles (horizontal lines), the median corresponds to the bold line and the whiskers show the minimal and the maximal value, not including outliers (indicated with circles). Compared with a Mann-Whitney test, $p < 0.001$.

p45

Figure BII-1: Origin of the plants material used in the experiment. Six different F_0 families were produced in outcrossed condition. $F_{0.5}$ materials were obtained after self-fertilization: three unrelated families (i.e. one from Burgundy and two from Poitou-Charentes) were classified as SI because they produced less than 0.01 seed per flower; four other families (i.e. two from each region) were classified as PSC because they produced more than 0.06 seed per flower.

P58

Figure BII-2: Initial seed weight, germination ratio and juvenile survival ratio of plants according to the inbreeding coefficient ($F=0$; 0.5; 0.75). ANOVA was used for the juvenile survival and a Kruskal-Wallis test for the initial seed weight and the ratio of seed germination, significant at $\alpha < 0.05$.

p62

Figure BII-3: Plant height and dry weight according to the inbreeding coefficient ($F=0$; 0.5; 0.75). A Kruskal-Wallis test was used for plant height and ANOVA for dry weight (after a Box Cox transformation, $\lambda=0.415$), significant at $\alpha < 0.05$.

P62

Figure BII-4: Number of capitula per plant, progeny one-seed weight, flower volume, number of flowers per capitulum, ratio of seeds produced and ratio of aborted seeds per flower according to the inbreeding coefficient ($F=0$; 0.5; 0.75). ANOVA was used for a) after a Box Cox transformation ($\lambda=0.57$), and a Kruskal-Wallis test for b), c), d), e) and f), significant at $\alpha < 0.05$.

p63

Figure BII-5: Cumulative fitness according to the inbreeding coefficient ($F=0$; 0.5; 0.75). The formula used is $W_c = \text{the initial seed weight} \times \text{the germination ratio} \times \text{the juvenile survival} \times \text{the plant height} \times \text{the ratio of seed per flower}$. The test used was a Kruskal-Wallis test, significant at $\alpha < 0.05$.

p63

Figure BII-6: Factorial discriminant analysis (FDA) according to the family and the inbreeding coefficient. The families were discriminated depending on their mean traits values (initial seed weight, germination, juvenile survival, plant height and dry weight, number of capitula, number of flowers

per capitulum, number of seeds per flower, number of unfertilized flowers, number of aborted seeds and flower volume). The black circles represent the barycentres of every F group; the dark grey diamonds are the families with $F=0.5$; the grey squares represent the families with $F=0.75$ and the light grey triangles are the families with $F=0$.

p64

Figure BII-7: Level of observed heterozygosity per microarray (H_o =number of heterozygous / number total of observation) according to the coefficient of inbreeding. For each inbreeding coefficient, the heterozygosity value for the ten microarrays was showed. Pearson correlation, equation: $y = -0.24x + 0.28$; $R^2 = 0.24$, $p < 0.01$.

p68

Figure C-1 : Disposition des paniers pour l'expérimentation «akènes enfouies» avec dans chaque section, 16 paniers enfouis. Le numéro des paniers correspond à l'ordre du tirage aléatoire pour la date de prélèvement. Les cases sans numéro n'ont pas encore été déterrées.

p78

Figure C-2 : Détermination de la capacité de survie des akènes au cours du temps pour les deux populations (récoltée et multipliée). Les akènes détériorés (moins ceux germés avant enfouissement ou leur estimation AGE) ou akènes non intacts (ANI), sont séparés des akènes intacts mis en germination. Après 3 semaines, l'ensemble des akènes germés est comptabilisé (AG) et du GA3 est ajouté. Les nouvelles germinations seront appelées akènes dormants (AD). Un test de viabilité est alors fait, soit les akènes sont pleins avec un embryon viable (AV) soit, ils sont vides ou ont un embryon non viable (ANV).

p79

Figure C-3 : Evolution du nombre de morceaux d'akènes détériorés retrouvés à la sortie de terre au cours du temps (ANI + AGE) pour les deux populations : récoltée (Epagny) et multipliée. Les deux lignes représentent le nombre d'akènes germés moyen sur 100 au moment de l'enfouissement (AGEm).

p81

Figure C-4 : Evolution de la proportion d'akènes germés (AG) et dormants (AD), de la proportion d'akènes pleins (AP) et non viables (ANV) en fonction du temps d'enfouissement des semences (le temps est exprimé en mois), pour a) la population récoltée b) la population multipliée. Une courbe de la moyenne mobile est tracée pour les deux populations pour la proportion d'akènes germés (AG) et la proportion d'akènes dormants (AD+GP).

p83

Figure C-5 : Evolution de la capacité de survie $((AG+AD+AP)/(AG+AD+AP+ANV))$ en fonction du mois de déterrement des akènes pour les deux populations : récoltées et multipliées.

p84

Figure C-6 : Evolution de la capacité de survie des akènes issus de multiplication contrôlée en fonction du temps d'enfouissement (en nombre de mois). Le modèle non linéaire ($Y = A/(1+(x/B)^C)$) qui prédit le mieux l'évolution de la survie des akènes multipliés est donné ainsi que la valeur du coefficient de Pearson ajustée correspondante.

p85

Figure C-7 : Evolution de la capacité de survie des akènes issus de population récoltée en fonction du temps d'enfouissement (en nombre de mois). Le modèle non linéaire ($Y=A/(1+(x/B)^C)$) qui prédit le mieux l'évolution de la survie des akènes récoltés est donné ainsi que la valeur du coefficient de Pearson ajustée correspondante.

p85

Figure D-1 : Plan de l'expérimentation pour une culture (blé ou moutarde). Celle-ci est séparée en quatre blocs, eux-mêmes divisés en quatre sous-blocs suivant le compartiment étudié (bordure herbacée, interface, fourrière et plein champ). A l'intérieur des sous-blocs, des bleuets sont semés sur 15 points (signalés par une croix). Sur un point de semi, la présence d'un individu d'une cohorte de printemps ou d'automne est un évènement aléatoire.

p95

Figure D-2 : Nombre de feuilles des bleuets en fonction de la date de mesure (1 : 10/03, 2 : 16/04, 3 : 23/04 et 4 : 29/04), du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la cohorte (automne ou printemps) dans une culture de blé. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0.05$.

p100

Figure D-3 : Surface de la rosette des bleuets en fonction de la date de mesure (1 : 10/03, 2 : 16/04, 3 : 23/04 et 4 : 29/04), du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la cohorte (automne ou printemps) dans une culture de blé. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0.05$.

p100

Figure D-4 : Nombre de feuilles des bleuets en fonction de la date de mesure (1 : 10/03, 2 : 16/04, 3 : 23/04 et 4 : 29/04), du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la cohorte (automne ou printemps) dans une culture de moutarde. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0.05$.

p101

Figure D-5 : Surface de la rosette des bleuets en fonction de la date de mesure (1 : 10/03, 2 : 16/04, 3 : 23/04 et 4 : 29/04), du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la cohorte (automne ou printemps) dans une culture de moutarde. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0.05$.

p102

Figure D-6 : Rapport entre la biomasse et la hauteur des plantes une semaine avant la moisson de la culture, en fonction de la culture (moutarde et blé), du compartiment : interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)) et de la cohorte (automne et printemps). Le nombre de plantes mesurées est donné sous les histogrammes. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

p103

Figure D-7 : Nombre de jours séparant la levée et la floraison du bleuet en fonction de la sous-parcelle (bordure herbacée (BH), interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)), de la cohorte de levée du bleuet (automne ou printemps) et de la culture en place (blé ou moutarde). Le nombre de plantes mesurées est donné sous les histogrammes. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

p104

Figure D-9 : Nombre total de capitules par bleuet une semaine avant la moisson en fonction du compartiment (interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)), de la cohorte de levée du bleuet (automne ou printemps) et de la culture (blé et moutarde) en place dans la parcelle. Le nombre de plantes mesurées est donné sous les histogrammes. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

p105

Figure D-9 : Proportion de capitules a) en fleurs et b) grainés une semaine avant la moisson en fonction du milieu (interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)), de la cohorte de levée du bleuet (automne ou printemps) et de la culture (blé et moutarde) en place dans la parcelle. Le nombre de plantes mesurées est donné sous les histogrammes. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

p105

Figure D-10 : Nombre d'akènes produits par fleur (nombre d'akènes produits sur le nombre total de fleurs par capitule) en fonction du milieu (bordure herbacée (BH), interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)), de la cohorte de levée du bleuet (automne ou printemps) et de la culture. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

p106

Figure D-11 : Analyse en composante principale (ACP) montrant les individus issus des cohortes d'automne (sans les cohortes de printemps) en fonction du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la culture en place (blé ou moutarde) suivant une corrélation de Pearson entre les différentes valeurs de traits (le nombre total de capitules (CapTot), le nombre de jours séparant la levée de la floraison (JrFlo), le rapport entre la biomasse et le poids sec des plantes (Pd/Ht), le nombre de total de fleurs par capitule (NdFlTot) et la proportion d'akènes par fleur (PropAk) des plantes). Une ANOVA suivie d'un test de Tuckey sur l'axe F1 en fonction du type de culture et du compartiment où se situe la plante ont été fait ($F=26,9$; $p < 0,001$).

p107

Figure DII-5: Cumulative fitness according to the inbreeding coefficient (F). The formula used is $Wc = \text{seed weight} \times \text{germination rate} \times \text{juvenile survival} \times \text{the plant height} \times \text{the rate of seed per flower}$. The test used was a Kruskal-Wallis test, significant at $\alpha < 0.05$.

p142

Figure DII-6: Principal Component Analysis (PCA) using the correlation of Pearson between the characters measured (seed weight (SdWg), height of plants (PIHg), dry weight of plants (WgD), number of capitula per plant (NbCap), total number of flowers per capitulum (NbFl), rates of unfertilized flowers (NbUnFl), of seeds produced (NbSd), the flower volume (FlVl) and of aborted seeds per flower (NbSdAb)). The blue diamonds represent the plants with F=0; the green circles are the plants with F=0.5 and the red triangles represent the plants with F=0.75.

p144

Figure DII-7: Level of observed heterozygosity per microarray (H_o =Number of heterozygous / Number total of observation) according to the coefficient of inbreeding. For each inbreeding coefficient, heterozygosity value for the ten microarrays was showed. Pearson correlation, equation: $y = -0.24x + 0.28$; $R^2 = 0.24$.

p147

CHAPITRE II

Figure B-1 : Localisation des populations échantillonnées dans la zone atelier de Féney en 2008 et/ou 2009 (délimitation de la zone atelier indiquée par un trait noir) et aux alentours en 2009: ChOFe (Domois), Lgvc (Longvic), CbàSp (Corcelles-les-Monts) et FsO (Fleurey-sur-Ouche).

p124

Figure B-2 : Localisation des populations échantillonnées en 2008 sur la zone atelier de Féney. En blanc, les interfaces prélevées. La zone 1 est indiquée par un rond noir, la zone 2 par un jaune et la zone 3 par un rond rouge.

p125

Figure B-3 : Localisation des populations échantillonnées en 2009 sur la zone atelier de Féney, en blanc, les zones prélevées. La zone 1 est indiquée par un rond noir, la zone 2 par un jaune, la 3 par un rouge et la zone 4 par un rond orange.

p125

Figure B-4 : Relation entre le coefficient de Loiselle (apparemment) et a) la distance entre les individus des quatre zones de la zone atelier de Féney et les individus alentours (ChOFe et CbàSp) et b) la distance entre les individus des quatre zones de la zone atelier de Féney.

p132

Figure B-5 : Résultat de l'approche bayésienne de regroupement avec a) l'identification de la valeur de K la plus vraisemblable suivant la méthode du Delta K en fonction du nombre possible de populations et b) l'assignement des individus suivant leur localisation géographique pour un nombre de sous-population K=5. Chaque couleur représente une population génétique, les lignes verticales représentent les individus. Une plante définie par plusieurs couleurs, est considérée comme ayant des ancêtres issus de plusieurs populations génétiques. La parcelle et la zone géographique où la plante est localisée est précisée au -dessus et au bas de la figure.

p133

Figure B-6 : Résultats de l'approche par une analyse discriminante en composante principale avec a) l'inférence du nombre de clusters génétiques pour les données simulées en fonction de la valeur du critère d'information bayésien (BIC), b) le diagramme de dispersion avec les deux premiers axes

expliquant le plus la variance des données simulées (les quatre clusters génétiques identifiés sont représentés) et c) l'assignement des individus suivant leur localisation géographique pour un nombre de sous-populations $K=4$. Chaque couleur représente une population génétique, les lignes verticales représentent les individus. Une plante définie par plusieurs couleurs, est considérée comme ayant des ancêtres issus de plusieurs populations génétiques. La parcelle et la zone géographique où la plante est localisée est précisée au-dessus et au bas de la figure.

p134

CHAPITRE I

Figure A-1 : Carte de la zone d'étude du CNRS de Chizé (Poitou-Charentes) et de l'INRA de Fénay (Bourgogne). Les parcelles échantillonnées en 2008 (Chizé) et 2009 (Chizé et Fénay) sont annotées. Les zones identifiées avec des populations de bleuets sont entourées.

P146

Figure B-1 : Position des quadrats du relevé de la flore.

P152

Figure B-2 : Diversité floristique (Indice de Shannon) en fonction de la présence/absence du bleuet en 2009 dans la commune de Fénay.

p153

Figure B-3 : Diversité floristique (Indice de Shannon) en fonction de la présence/absence du bleuet pour les espèces messicoles dans la zone atelier de Fénay.

p154

Figure C-1: Map of the study site in the Poitou-Charentes region showing locations of study fields in 2008 and 2009. Symbols indicate the areas containing a population of *Centaurea cyanus* (circle) and the control fields in 2008 (point) and 2009 (triangle).

p164

Figure C-2: Map of the FOY area, including local roads (arrows), the central field (P32) and the adjacent fields. The sampling locations of field edges (generally at the opposite side with respect to the central field) are indicated as dark ellipses.

p165

Figure C-3: Spatial distribution of: a) weed species richness for La Foye-Monjault (FOY) area in 2008 and 2009; the darker the drawing, the higher the species richness; b) the corresponding error map; the darker the drawing, the higher the estimate of the error.

p169

Figure C-4: Shannon-Weaver diversity index for all species observed in inner field according to: a) the study areas compared to the control fields; b) the actual presence/absence of *Centaurea cyanus*. The box represents the 25th and 75th quartiles, the median corresponds to the bold line and the whiskers show the minimal and the maximal values except outliers figured by circles. The test used was a Mann-Whitney test for a) and a Kruskal-Wallis test for b), significant at $\alpha < 0.05$.

p171

Figure C-5: Shannon-Weaver diversity index based on the segetal species observed in inner field according to: a) the study areas compared to the control fields; b) the presence/absence of *Centaurea cyanus* compared to the control fields. The box represents the 25th and 75th quartiles, the median

corresponds to the bold line and the whiskers show the minimal and the maximal values except outliers figured by circles. The test used was a Mann-Whitney test for a) and a Kruskal-Wallis test for b), significant at $\alpha < 0.05$.

p171

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau BI-1: Number of seeds produced per flower ($\pm$ with the standard deviation of the mean) under the different pollination conditions.

p40

Tableau BI-2: Reproduction data and mean plant height according to the plant origin in outcrossed or self-fertilization with pollinator conditions (Burgundy and Poitou-Charentes). The test used was a Mann-Whitney test for the number of seeds produced in self-fertilization group and for the number of flowers per capitulum in outcrossing group. An ANOVA was made for the others traits (after a Box-Cox transformation for the number of capitula ($\Lambda = 0.01$) and the flower volume ($\Lambda = -1.46$) in outcrossing group and a $y = \ln(y+c)$ transformation for the number of seeds per flower in outcrossing group). The mean value was used, $\alpha < 0.05$.

p42

Tableau BI-3: Correlation of Pearson (R^2) between the phenotypic characters (plant height, number of capitula per plant, number of flowers per capitulum, flowers volume and number of seeds per capitulum) measured for the 58 plants under fly-pollinated self-fertilization condition (mean values of plants of the three groups of the first generation).

p44

Tableau BI-4: Comparison of plant height and reproductive data following the mating system (self-fertilization with pollinators (SFP) and outcrossed (O)) and according to the region (Burgundy and Poitou-Charentes (PC)) and the parental (descendants from G0, G2 and outcrossing (O)) origin under self-fertilization with pollinators condition. Mean values are presented and statistical comparisons were conducted using an ANOVA (with a Box-Cox transformation for the number of capitula ($\Lambda = 0.01$) and the flower volume ($\Lambda = 0.92$)) and a Kruskal-Wallis test for the number of seeds produced per flower, $\alpha < 0.05$.

P46

Tableau BI-5: Correlation of Pearson (R^2) between phenotypic characters (plant height, number of capitula per plant, number of flowers per capitulum, flower volume and number of seeds per capitulum) measured under the self-fertilization with pollinators condition for the second generation.

p47

Tableau BII-1: Mean inbreeding depression values (δ) according to the inbreeding coefficient ($F=0; 0.5; 0.75$) and the mean fitness of outcrossed (W_o) plants for each character at five different stages of the life history.

p66

Tableau BII-2: Mean heterozygosity for each of the ten loci studied by group of inbreeding coefficient ($F=0; 0.5; 0.75$); with N: the number of

observations, Na: the number of alleles observed, Ho: the observed heterozygosity and He: the unbiased expected heterozygosity. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested (df= number of genotype observed -1; Khi^2 = value of the Khi square test and the p-value) with the Bonferroni correction, significant at $\alpha < 0.05$.

P67

Tableau C-1 : Pourcentage initial (à T=0) d'akènes germés (AG), d'akènes dormants (AD), d'akènes pleins (AP) et survie initiale (AG, AD et AP) des populations récoltées (Epagny) et multipliées avant enfouissement des akènes.

P82

Tableau D-1 : Taux d'établissement (TE) et de survie juvénile (nombre de plantes ayant atteint la floraison/nombre total de levées) en fonction du type de cohortes (printemps et automne) par culture (blé et moutarde) et par milieu (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ). Les taux cumulés de plantes établies et arrivées au stade adulte sont donnés (cohortes d'automne et de printemps) en fonction de la culture et du compartiment.

p98

Tableau D-2 : Effets blocs, du compartiment, de la cohorte, de la date de mesure et des interactions sur la surface de la rosette et le nombre de feuilles en fonction de la culture de départ. Comparaisons faites suivant une ANOVA à mesures répétées. Le degré de liberté du numérateur (Num ddl), le degré de liberté du dénominateur (Den ddl), le Fischer observé (F) et la p-value ($Pr > F$) sont donnés.

P99

CHAPITRE II

Tableau B-1 : Caractéristiques des 10 microsatellites développés pour le bleuet. Pour chaque paire d'amorce, la séquence *Forward* et *Reverse* est donnée ainsi que le motif répété avec en indice le nombre de répétitions par motif, la gamme de tailles observées et la température d'hybridation (T_m).

p122

Tableau B-2 : Individus échantillonnés et génotypés en Côte d'Or, en 2008 et 2009, dans la zone atelier de Fénay (neuf parcelles) et ses alentours (quatre localités). Le Compartiment Echantillonné (CE) *i.e.*, l'Interface (I) ou le Plein Champ (PC) est précisé ainsi que le Nombre d'individus Prélevés (NP) puis le Nombre de plantes Génotypés (NG).

p126

Tableau B-3 : Matrice des distances (en km) séparant les différents lieux d'échantillonnages, soit neuf parcelles dans la zone atelier de Fénay (086, 021, 045, 099, 134, 203, 203, 206, et 207) et quatre parcelles autour de celle-ci (ChoFe, Lgvc, CbàSp et FsO).

p127

Tableau B-4 : Nombre d'allèles par locus (Na), hétérozygotie observée (Ho) et hétérozygotie attendue (He) par locus pour chaque parcelle. L'astérisque indique que la parcelle n'est pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg au locus considéré, après une correction de Bonferroni ($\alpha < 0,005$). N correspond au

nombre de plantes génotypées par parcelle ; ° lorsque, pour une parcelle, le locus est monomorphique.

p130

Tableau B-5 : Distance génétique entre les populations (Fst). La composante Fst est déterminée suivant une méthode qui calcule la distance génétique entre deux populations supposées, les différences se faisant deux à deux. Une correction de Bonferroni été faite, le niveau de significativité passant à $\alpha < 0.005$.

p131

CHAPITRE I

Tableau B-1 : Significativité des Indices de Shannon pour chaque messicole en fonction de leur présence ou non dans le champ. Les probabilités p significatives (en gras dans le tableau) montrent que lorsque l'espèce est présente dans le champ, il y a significativement plus d'espèces messicoles.

p154

Tableau C-1: Number of fields with oilseed rape (OSR) or wheat, and comparison of the mean species richness in inner fields without or including field edges in the nine study areas between 2008 and 2009 (p-value of the Kruskal-Wallis test).

p168

Tableau C-2: Mean frequency over the study areas (without the control fields) of the occurrence of *C. cyanus* in time and space according to the year of sampling, the crop, and the habitat. The mean value encompasses the two crops and the whole field (inner field and field edge together).

p170

Tableau C-3: Comparison of mean species richness over the study areas and the control fields in the edges according to their adjacent habitat (p-value of the Kruskal-Wallis test).

p171

Tableau C-4: Distribution (number of fields where a given species has been observed), frequency of occurrence, mean abundance (in the fields where the species was recorded) and mean value of Shannon-Weaver indices over the study areas calculated from the segetal species in inner field, for every segetal species as indicator, and p-value of the comparison of fields with presence versus absence of that species (comparison evaluated using a Kruskal-Wallis test).

p173

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Contexte	p3
Aperçu des connaissances sur le bleuet	p5
1- L'agroécosystème : un milieu artificialisé et fortement perturbé	p5
2- Concepts liés à la distribution des espèces dans le paysage	p6
2.1- Ecologie du paysage et des communautés : définitions	p6
2.2- Concepts liés à la distribution des espèces dans le paysage	p7
3- Mesure de la diversité biologique	p8
3.1- Comment mesurer la diversité biologique ?	p8
3.2- Les indicateurs de diversité biologique	p10
4- Facteurs environnementaux, biologiques et génétiques liés au déclin d'une espèce	p11
4.1- Les facteurs environnementaux	p11
4.2- Les facteurs biologiques	p12
4.3- Les facteurs génétiques	p13
5- Les espèces adventices	p13
6- Le bleuet (<i>Centaurea cyanus</i> L.)	p15
Organisation de la thèse	p19
Références	p20

CHAPITRE 2 : Cycle biologique du bleuet : quels sont les facteurs qui auraient un impact sur sa réussite ou sa raréfaction dans le paysage agricole ?

A- Introduction générale	p29
B- Système de reproduction des plantes issues des régions Poitou-Charentes et Bourgogne et conséquences sur la consanguinité des descendants	p31
I- Matting system evolution in <i>Centaurea cyanus</i> L., a self-incompatible segetal species, rare in the west of France	p34
1- Introduction	p35
2- Materials and methods	p37
2.1- Seed origin	p37
2.2- First generation	p37
2.3- Second generation	p39
2.4- Data analysis	p39

3- Results	p40
3.1- Housefly pollination efficiency	p40
3.2- First generation	p40
3.3- Second generation	p45
4- Discussion	p47
5- References	p51
II- Consequences of inbreeding on <i>Centaurea cyanus</i> L., a self-incompatible segetal Species, rare in the west of France	p54
1- Introduction	p55
2- Materials and methods	p57
2.1- Materials	p57
2.2- Trait estimation	p58
2.3- Calculated indexes	p59
2.4- DNA analysis (sampling, extraction and genotyping)	p60
2.5- Data analysis	p60
3- Results	p61
3.1- Trait values	p61
3.2- Calculated indexes	p63
3.3- DNA analysis	p66
4- Discussion	p68
5- References	p71
C- Persistance de akènes de bleuets enfouies dans le sol pendant 2,5ans et suivi de la germination de la dormance au court du temps pour deux populations	p75
1- Introduction	p76
2- Matériels et méthodes	p77
2.1- Origine des semences	p77
2.2- Effet de la profondeur sur la germination des akènes	p77
2.3- Mise en place de l'expérimentation et enfouissement	p77
2.4- Détermination de la capacité de survie des semences	p78
2.5- Analyse des données	p80
3- Résultats	p80
3.1- Capacité de germination et de survie initiale	p82
3.2- Evolution de la capacité de germination et de la survie au court du Temps	p82
4- Discussion	p86
5- Références	p89
D- Levée, croissance et reproduction du bleuet dans différents milieux du paysage agricole bourguignon	p91
1- Introduction	p92
2- Matériels et méthodes	p93
2.1- Origine des akènes et site d'expérimentation	p93
2.2- Plan expérimental	p94

2.3- Mesures effectuées	p95
2.4- Analyses de données	p96
3- Résultats	p97
3.1- Taux d'établissement et d'arrivée au stade adulte	p97
3.2- Croissance	p98
3.3- Succès reproducteur	p104
3.4- Analyse en composante principale	p106
4- Discussion	p108
Références	p110
E- Points marquants du chapitre	p113

CHAPITRE 2 : Y a-t-il une structuration génétique des populations de *Centaurea cyanus* L. en Bourgogne ?

A- Introduction générale	p119
B- Y a-t-il une structuration génétique des populations de <i>Centaurea cyanus</i> L. en Bourgogne ?	p120
1- Introduction	p121
2- Matériels et méthodes	p122
2.1- Identification de marqueurs spécifiques du bleuet	p122
2.2- Caractérisation génétique des populations de Côte d'Or	p123
3- Résultats	p129
3.1- Diversité génétique	p131
3.2- Structuration génétique des populations	p131
4- Discussion	p135
5- Références	p137
C- Points marquants du chapitre	p140

CHAPITRE 3 : En tant qu'espèce rare, le bleuet peut-il être utilisé comme indicateur d'une diversité floristique d'une parcelle cultivée ?

A- Introduction générale	p145
B- Relation entre la flore adventices des parcelles cultivées et <i>Centaurea cyanus</i>	p149
Résumé	p150
Introduction	p151
Matériels et méthodes	p152
Résultats	p153
Discussion	p154
Bibliographie	p156
C- <i>Centaurea cyanus</i> L. as a biological indicator of segetal species richness in	

arable fields	p159
Abstract	p161
1- Introduction	p162
2- Materials and methods	p164
2.1- The region	p164
2.2- Study areas and sampling	p165
2.3- Data analysis	p166
3- Results	p167
3.1- Occurrence of <i>C. cyanus</i>	p167
3.2- Species richness	p168
3.3- Spatial analysis	p170
3.4- Relationship between <i>Centaurea cyanus</i> and the weed species	p171
3.5- Relationship between segetal species and <i>Centaurea cyanus</i>	p172
3.6- Distribution of segetal species in the landscape	p173
4- Discussion	p174
5- Conclusion	p177
Acknowledgment	p177
References	p177
D- Discussion générale	p181
E- Points marquants du chapitre	p182

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p185
--	------

Références	p192
------------	------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p195
------------------------------------	------

ANNEXES

Annexe 1	p215
Annexe 2	p218

INTRODUCTION

CONTEXTE

Actuellement, le monde subit une érosion de sa diversité biologique à un niveau encore jamais atteint (Wilson, 2000 ; Novacek & Cleland, 2001). Les principales causes de ce déclin sont dues aux pressions anthropiques sur les écosystèmes (Vitousek et al., 1997). Avec les changements environnementaux (climats) subis par la planète, il est prédit que la décroissance de la diversité biologique va encore s'accélérer (Brook et al., 2008; Stork, 2010). Actuellement, les espèces sont identifiées comme menacées une fois qu'elles sont rares (Gaston, 1994). Il est donc indispensable d'identifier les espèces qui peuvent devenir « à risque » si l'on veut stopper cette érosion de la biodiversité (Sodhi & Ehrlich, 2010). Afin de préserver la diversité spécifique ainsi que les fonctions des écosystèmes, il est nécessaire de rassembler des informations sur la répartition des espèces et les niveaux de biodiversité dans la mosaïque paysagère que représente la planète (Pimm & Lawton, 1998). L'agroécosystème, créé il y a 10 000 ans, est un milieu artificialisé en constante évolution grâce au progrès technique. Il est caractérisé par une faune et une flore qui se sont spécialisées à cet habitat et aux pressions humaines liées à l'agriculture. Cependant, depuis les années 1950, l'agroécosystème a subi de profondes modifications sur un laps de temps très court ne laissant pas le temps aux spécialistes de s'adapter à ces changements et provoquant, ainsi, leurs déclin (Robinson & Sutherland, 2002). Les adventices des cultures représentent le groupe pour lequel la pression est la plus forte à cause des moyens mis en œuvre pour réduire l'impact qu'elles peuvent avoir sur la productivité de la culture. Parmi ces adventices se trouvent les espèces messicoles (commensales des moissons) dont certaines sont en voie de raréfaction. Le bleuet (*Centaurea cyanus* L.), une messicole considérée comme emblématique en France, est actuellement en déclin dans l'ouest de l'Europe (Sutcliffe & Kay, 2000). Cette espèce n'est présente naturellement que dans l'agroécosystème. Elle représente un intérêt esthétique pour les français, tout comme le coquelicot, avec ses fleurs bleues qui dépassent de la culture. Le bleuet symbolise la flore des champs et sa couleur bleue, celle du drapeau français (le blanc est représenté par la marguerite et la matricaire, et le rouge par le coquelicot). *C. cyanus* est aussi intéressante pour les écologistes via ses services écosystémiques potentiels. En effet ; il est une ressource importante pour les pollinisateurs (Perju & Moldovan, 1991) et les arthropodes comme les aphides Syrphidae (Weiss & Stettmer, 1991) et les Anthocoridae (Fitzgerald & Solomon, 2004), prédateurs des ravageurs des cultures. Le fait que le bleuet soit d'intérêt esthétique et culturel et qu'il contribue à la préservation des fonctions de l'écosystème (Storkey & Westbury, 2007) justifie la

conservation de cette espèce. Par ailleurs, *C. cyanus* pourrait servir d'espèce parapluie (Barua, 2011) car, en la préservant, il est probable qu'un ensemble d'autres espèces spécialistes en voie de raréfaction dans l'agroécosystème soit aussi protégé. En outre, il est déjà considéré, par un certain nombre d'associations naturalistes, comme un indicateur de diversité biologique dans les champs. Ainsi, afin de préserver ces espèces spécialistes de l'agroécosystème, il est nécessaire, dans un premier temps de mieux comprendre les facteurs environnementaux, biologiques et génétiques qui ont provoqué le déclin de ces espèces. Ensuite, il est important de faire un état des lieux de la diversité biologique dans les agroécosystèmes afin de déterminer des zones d'intérêt pour la conservation. C'est ce que nous nous proposons de présenter dans ce mémoire après un aperçu de la littérature disponible.

APPERCU DES CONNAISSANCES SUR LE SUJET

1) L'agroécosystème : un milieu artificialisé et fortement perturbé

L'agroécosystème a été créé par l'homme il y a 10 000 ans au moment de la révolution du Néolithique. Il est depuis en constante évolution grâce aux progrès techniques. Cet habitat, fortement artificialisé, est actuellement majoritairement contrôlé par l'homme. Il est composé d'une mosaïque de parcelles ayant pour particularité d'être dominée par une espèce cultivée. Sachant que la trajectoire des communautés est influencée par l'homme (Booth & Swanton, 2002), le type et la fréquence des perturbations (pratiques culturales) dans l'agroécosystème détermineront donc les communautés végétales présentes. Par exemple, la date de semis contribue fortement à fixer le type de flore présente (automne ou printanière) (Gunton et al., 2011). La culture, quant à elle, détermine la date de fermeture du couvert et donc la quantité de lumière disponible au sol (Hallgren et al., 1999). Depuis les années 1950, des changements importants dans les pratiques agricoles ont eu lieu. Les agroécosystèmes anciennement organisés en mosaïque de petites parcelles ont été remembrés et sont maintenant composés de parcelles de plus grandes tailles entraînant une diminution des espaces hors champs. Une augmentation d'apport d'intrants (fertilisants, herbicides) a aussi eu lieu (Agreste, 2001 ; Gasquez, 2005). L'intensification des pratiques agricoles a provoqué la raréfaction d'un grand nombre d'espèces spécialisées des agroécosystèmes (Robinson & Sutherland, 2002). Parmi ces espèces, on trouve des oiseaux (Donald et al., 2006), des pollinisateurs (Biesmeijer et al., 2006), des insectes (Benton et al., 2002) et des adventices (Fried et al., 2008). Ce déclin des espèces spécialistes risque d'entraîner de profondes modifications des réseaux trophiques de l'agroécosystème (Dornelas et al., 2009).

Il est possible de découper l'agroécosystème en plusieurs habitats, en fonction de son niveau de perturbation. Greaves & Marshall (1987), définissent ainsi 4 compartiments dans le paysage agricole :

- La zone centrale de la parcelle cultivée ou **plein champ** (PC) : c'est le plus perturbé des compartiments par les pratiques culturales.
- Le bord de champ ou **fourrière** (F) : elle est aussi fortement perturbée avec un tassement du sol supplémentaire, des soins irréguliers et souvent un peuplement cultivé hétérogène.

- L'**interface** (I) de la parcelle qui se situe entre la dernière rangée de la culture et la limite extérieure de la parcelle. C'est une zone de transition avec travail du sol mais non semée et pas ou peu désherbée.
- Les zones hors champs ou **bordure** des champs telles que la **bordure herbacée** (BH), les fossés,...

2) Concepts liés à la distribution des espèces dans le paysage

Traditionnellement, l'objectif de l'écologie des populations était de déterminer les mécanismes de régulation et de persistance pour une population locale sans prendre en compte les possibles interactions avec une autre population (Turchin, 2003). Depuis une vingtaine d'année, l'étude de l'écologie spatiale et de la biologie des métapopulations a pris le pas sur l'étude des interactions au sein d'une population locale (Hanski, 1999). Avec la fragmentation de nombreuses espèces animales et végétales, l'importance de la structuration spatiale des populations sur leur persistance et leur coexistence a pris de plus en plus d'importance (Koizumi, 2011).

2.1 Ecologie du paysage et des communautés : définitions

L'écologie du paysage étudie la dynamique des communautés suivant différentes échelles spatiales du paysage et considère l'écosystème comme une matrice d'éléments agencés dans l'espace de façon non aléatoire (Baudry, 1989). La structure de chaque fraction du paysage et les processus sous-jacents sont étudiés suivant leurs histoires, c'est-à-dire, la part suscitée par l'évolution naturelle et celle due à l'impact de l'homme tels que les perturbations à l'origine de l'hétérogénéité de la matrice d'éléments ou les flux d'individus et de gènes entre les différents milieux. Cette discipline permet de raisonner à plusieurs échelles paysagères, allant du compartiment de la parcelle agricole (interface, fourrière et plein champ) à l'agroécosystème, en passant par la parcelle étendue (Fried et al., 2007) ; chaque niveau hiérarchique est hétérogène et possède son propre patron d'organisation. L'écologie du paysage prend donc en compte l'évolution des communautés au niveau spatio-temporel.

L'ensemble d'espèces qui a un moment donné dans le temps et l'espace forme une association structurale et/ou fonctionnelle est aussi appelé communauté (Morin, 1999). L'écologie des communautés a pour objectif d'expliquer les règles d'assemblages des espèces ou facteurs conduisant à une structuration de la communauté (Weiher & Keddy, 1999). Dans le cas de l'étude de la lagune Ebrié, un écosystème tropical saumâtre peu profond, il a été

montré que la principale règle d'assemblage des communautés lagunaires était dépendante du degré d'instabilité physique (hydrodynamique et hydrochimique) du milieu (Guiral, 1992).

2.2 Concepts liés à la distribution des espèces dans le paysage

Plusieurs théories existent pour expliquer la répartition des espèces dans le paysage, dont :

- **La niche écologique** (Hutchinson, 1957) définie comme étant « un hypervolume où chaque dimension représente une condition environnementale favorable à une espèce ». Elle représente la place de l'individu, de la population ou de l'espèce dans un écosystème ainsi que l'ensemble des facteurs nécessaires à sa réussite. Deux types de niches peuvent ainsi être distinguées, celle dite *fondamentale* qui associe l'ensemble des conditions nécessaires à la réussite de l'espèce et la niche *réalisée*, analogue à la niche fondamentale, que l'espèce peut occuper lorsqu'aucun milieu complètement favorable n'est disponible. L'habitat ou niche représente une composante temporelle qui peut varier dans le temps et devenir défavorable, par exemple, au gré des saisons.
- **Les métapopulations** (Levins, 1969) ajoutent une notion d'extinction et de recolonisation des habitats. Une métapopulation est composée de plusieurs populations d'une même espèce qui interagissent et sont séparées spatialement par des environnements défavorables. Les milieux où se trouvent les populations sont appelés patches d'habitat et peuvent être plus ou moins favorables à l'espèce. Deux types de patches peuvent être distingués, les habitats *sources*, favorables, dont le taux de croissance sera supérieur à 1. Le deuxième type d'habitat est nommé *puits*, en partie défavorable, dont le taux de croissance est inférieur à 1. Généralement, ce type de patch est maintenu grâce aux migrants issus des habitats sources. Si aucun immigrant n'arrive dans un milieu *puits*, la population s'éteindra et pourra être recolonisée plus tard.

Les particularités biologiques des espèces, leurs évolutions et leurs capacités d'adaptation aux contraintes d'un milieu sont aussi à prendre en compte afin de mieux comprendre la répartition des niches dans le paysage. Deux types d'espèces peuvent ainsi être définis :

- **Les espèces généralistes ou ubiquistes** ont la particularité d'avoir une niche écologique large (Hutchinson, 1957). Dans une mosaïque paysagère, ces espèces seront présentes dans plusieurs habitats. Les ubiquistes ont généralement une forte

capacité d'adaptation aux contraintes de l'environnement, les espèces envahissantes en sont de bons exemples.

- **Les espèces spécialistes**, en opposition aux généralistes, ont une niche écologique étroite (Hutchinson, 1957). Une espèce devient une spécialiste lorsqu'elle n'est plus adaptée qu'à un spectre restreint d'environnements (Bolnick et al., 2003; Devictor et al., 2010). Dans une mosaïque paysagère, elles ne seront alors présentes que dans un nombre limité d'habitats. La spécialiste aura une réussite accrue dans les habitats où elle est adaptée et une performance supposée plus faible dans les autres milieux (Kassen, 2002). La spécialisation peut être définie suivant plusieurs niveaux d'organisation tels que le niveau inter-spécifique (spécialisation d'une espèce au sein d'une communauté) ou intra-spécifique (spécialisation d'individus au sein d'une population) (Poisot et al., 2011).

3) Mesure de la diversité biologique

3.1 Comment mesurer la diversité biologique

La diversité biologique correspond à la somme totale de toutes les variations biotiques de l'échelle du gène à celle de l'écosystème (Purvis & Hector, 2000). Il existe plusieurs procédés pour mesurer cette diversité :

- La **richesse spécifique**, ou nombre d'espèces, représente la notion la plus intuitive et la plus communément utilisée pour mesurer la diversité biologique. Dans une perspective évolutive ou biologique, l'espèce est le niveau le plus intéressant. En effet, une espèce possède, en générale, ses propres gènes ce qui entraînent des trajectoires évolutives uniques pour chaque espèce. La richesse spécifique, avec la présence d'espèces rares, est actuellement le critère le plus cité pour la sélection de sites à conserver (Prendergast et al., 1993). Par ailleurs, l'échelle à laquelle la mesure de la richesse spécifique est effectuée est importante. Au niveau global, le nombre total d'espèces est estimé à 14 millions. A l'échelle des régions, le nombre de populations ainsi que les espèces représentées vont différer. Au niveau de la population, le nombre de gènes est limité et va évoluer indépendamment en fonction des flux de gènes, de la dérive et des mutations. Chaque population apporte donc sa propre richesse génétique. Le nombre de populations génétiques global est estimé entre 1,1 et 6,6 milliards (Purvis & Hector, 2000), il est donc important de prendre en compte la diversité génétique pour mesurer la diversité biologique.

- Les **indices de diversité** : ces mesures représentent l'avantage de prendre en compte, en plus de la richesse spécifique, l'abondance (nombre ou densité d'individus d'une espèce). Magurran (2004) définit d'ailleurs la biodiversité comme étant l'ensemble « *des variétés et des abondances des espèces dans une unité d'étude définie* ». Il existe un grand nombre de méthodes pour calculer la diversité (indice de Margalef, moyenne arithmétique de l'indice d'abondance relatif, moyenne géométrique de l'indice d'abondance relatif,... décrites par Buckland et al. 2005). Seules les méthodes du calcul de la densité totale et des indices de Simpson et de Shannon-Weaver seront détaillées (Buckland et al. 2005). La *densité totale* est une mesure exhaustive de l'abondance qui ne prend pas en compte l'identité des espèces favorisant ainsi celles qui sont dominantes. L'équitabilité et la présence d'espèces rares ne sont pas prises en compte dans ce calcul. L'*indice de Simpson*, aussi appelé indice de dominance, considère le nombre d'espèces, leur abondance ainsi que l'équitabilité. Cet indice est peu sensible à la richesse spécifique, les espèces rares (peu abondantes) ont donc peu de poids dans le calcul ; d'où son nom d'indice de dominance. A noter que lorsque l'ensemble des espèces mesurées décline à la même vitesse, la valeur de l'indice de Simpson ne change pas. L'*indice de Shannon-Weaver* donne plus de poids à la richesse spécifique qu'à l'abondance des espèces. La présence d'espèces rares est donc favorisée avec cet indice. Le principal biais lié à l'indice de Shannon-Weaver est qu'il est peu sensible au changement de distributions liées à l'abondance des espèces (May, 1975).

Les indices de Simpson et de Shannon-Weaver ont donc pour avantage de tenir compte à la fois de la notion de richesse spécifique et d'abondance des espèces. Ces indices donnent, par ailleurs, des résultats équivalents lorsque les communautés étudiées suivent approximativement les mêmes distributions d'abondance pour les espèces (Buckland et al., 2005). Le but de l'étude sera donc le principal critère à prendre en compte pour le choix de l'indice de diversité. Dans des travaux où l'objectif sous-jacent est la conservation des espèces, la présence d'espèces rares est primordiale. Dans ce cas, l'indice de Shannon-Weaver peut s'avérer le plus approprié pour l'étude.

Le principal problème lié à cette mesure de la diversité biologique est la lourdeur liée aux expérimentations. En effet, l'abondance des espèces n'est pas toujours simple à mesurer et il est souvent nécessaire de faire un compromis. Une approche proposée par Buckland et al., (2005) afin d'éviter les inconvénients liés à la richesse spécifique et à la mesure de

l'abondance est de noter les espèces suivant leur présence/absence dans le quadrat. L'ensemble des quadrats donnera un indice d'occupation de l'espèce et pourra être pris en compte comme son abondance. Suivant ce que l'on veut mesurer, il est donc important de bien définir au préalable l'unité d'échantillonnage utilisée car la richesse spécifique et l'abondance vont dépendre de la taille de l'échantillon mesuré (Buckland et al., 2005).

Finalement, une mesure exacte de la biodiversité, même sur une petite surface, est trop complexe pour être quantifiée correctement. Une méthode plus simple doit donc être utilisée pour estimer la diversité biologique, telle que la caractérisation d'indicateur de diversité.

3.2 Les indicateurs de diversité biologique

Les indicateurs de biodiversité doivent permettre une évaluation de la diversité biologique ainsi que de ses changements (Duelli & Obrist, 2003). Trouver un indicateur de l'ensemble de la diversité biologique qui serait sensible à toutes les modifications est impossible. Plusieurs critères sont nécessaires pour le choix d'un indicateur (Pocock & Jennings, 2008) ; il doit être :

- Sensible aux changements.
- Simple à mesurer.
- Spécifique en quantifiant clairement la variable à mesurer.
- Invariant dans le temps et l'espace.

La mesure de la diversité biologique, au-delà de faire un état des lieux de la biodiversité, peut permettre l'identification de zones d'intérêt pour la conservation ou *hotspot*. Ces « points chauds » sont généralement des lieux composés par un patrimoine naturel exceptionnel avec une importante diversité biologique. Ces zones peuvent aussi être d'intérêt communautaire, *i.e.*, composées d'espèces dites d'intérêts (espèces endémiques, rares, emblématiques,...).

Finalement, il existe une multitude de diversités biologiques liées, entre autre, à l'échelle de travail (écosystèmes, espèces, gènes), ou aux traits des espèces (fonctionnels de réponse ou de service, et structuraux), ... La figure 1 montre la complexité liée à la mesure de la diversité biologique en tentant de résumer de manière non exhaustive les différentes composantes de la diversité biologique et les concepts qui s'y attachent.

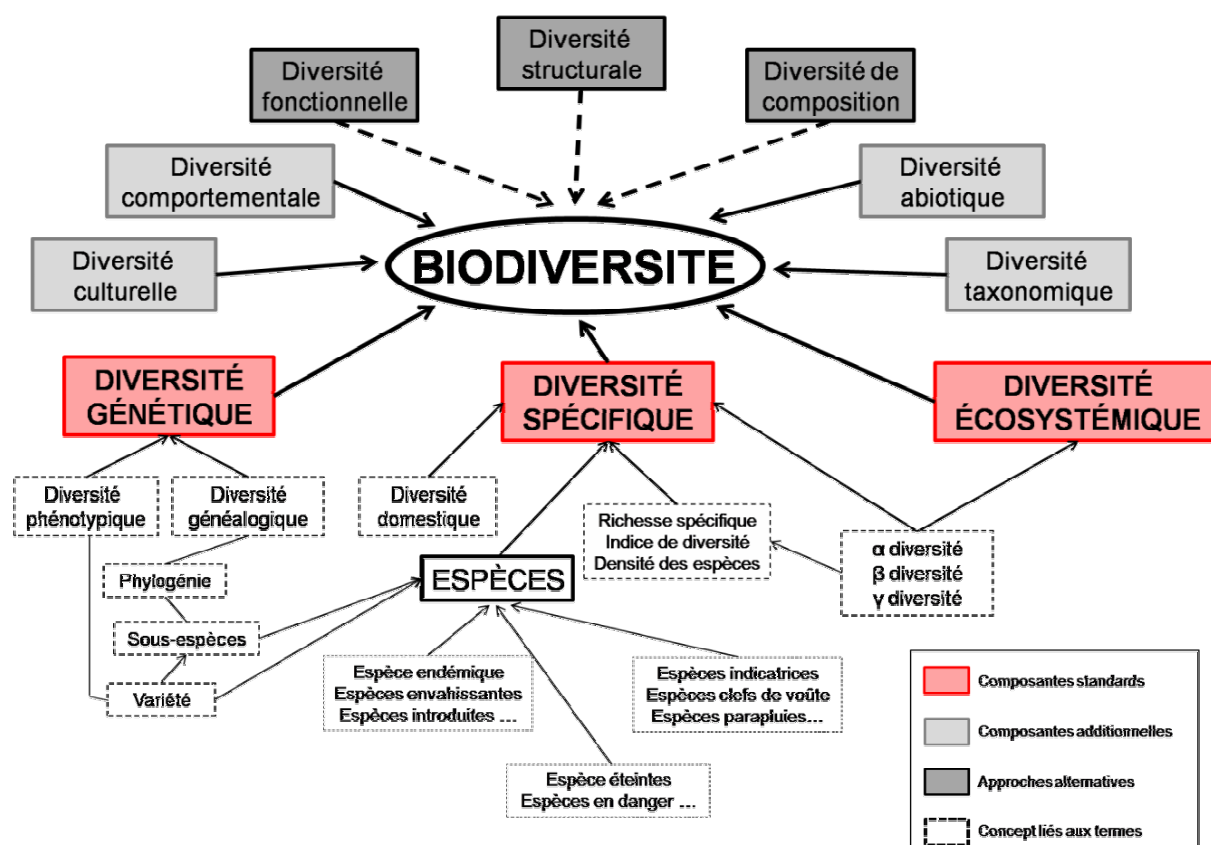


Figure 1 : Différentes composantes de la biodiversité (standards, additionnelles ou alternatives) ainsi que les concepts utilisés pour définir la diversité biologique (Duelli & Obrist, 2003).

4) Facteurs environnementaux, biologiques et génétiques liés au déclin d'une espèce

4.1 Les facteurs environnementaux

Thomas et al. (2004) estiment que plus d'un million d'espèces pourraient disparaître d'ici 2050, essentiellement à cause des changements climatiques. Les autres facteurs généralement cités pour expliquer la raréfaction ou l'extinction d'une espèce sont principalement des causes anthropiques (Vitousek et al., 1997) tels que l'urbanisation qui détruit et entraîne une fragmentation des habitats et des populations (Lindenmayer, 2009) ou encore une altération des interactions trophiques (relation proies/prédateurs, apparition d'une espèce envahissante,...) (Lindenmayer, 2011). Un grand nombre d'autres facteurs environnementaux ou anthropiques, peuvent avoir un impact sur la raréfaction d'une espèce comme l'agriculture, la déforestation ou les échanges internationaux (Figure 2, en vert). Les conséquences peuvent être, par exemple, une modification de l'habitat ou l'apparition d'espèces invasives (Figure 2, en rouge) qui provoquerait la raréfaction ou l'extinction d'une

espèce. Généralement, les facteurs environnementaux sont dépendants de l'espèce et de ses caractéristiques (distribution spatio-temporelle, variables biologiques et/ou génétique).

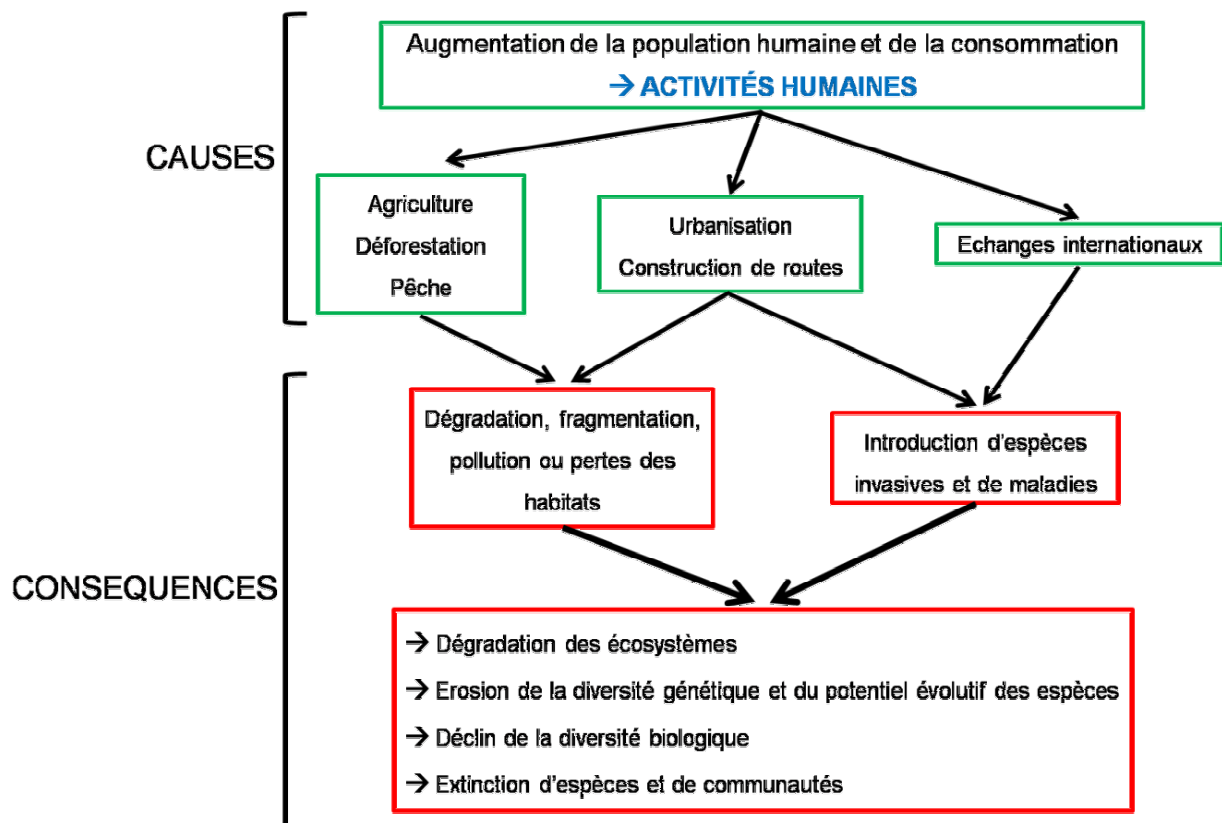


Figure 2 : Principales causes anthropiques (en vert) et leurs conséquences (en rouge) sur les habitats ou sur les espèces (d'après Isik, 2011).

4.2 Les facteurs biologiques

D'après Primack (2006), les espèces susceptibles d'être ou de devenir vulnérables à l'extinction possèdent au moins une des caractéristiques suivantes :

- L'espèce a une distribution géographique limitée ;
- L'espèce a un nombre limité de populations ;
- La taille des populations est soit petite soit en train de décliner ;
- L'espèce a une faible capacité de reproduction ou de dispersion ;
- L'espèce est une spécialiste.

D'autres facteurs peuvent s'ajouter et dépendent de l'espèce étudiée. Chez les végétaux, plusieurs étapes du cycle de vie peuvent s'avérer primordiales. La persistance des semences dans le sol, par exemple, est un facteur biologique important qui peut influencer sur le maintien ou non de l'espèce dans le temps (Kolb & Diekmann, 2005). La capacité de levée et d'installation des plantes pourra déterminer sa réussite dans un écosystème et la reproduction aidera à caractériser les facultés de dispersion de l'espèce dans l'espace.

4.3 Les facteurs génétiques

La perte de diversité semble être le critère génétique le plus souvent cité pour expliquer la raréfaction ou l'extinction d'une espèce. Le déclin de la diversité génétique augmente l'homozygotie et peut entraîner des processus délétères tels que la dépression de consanguinité (Charlesworth & Charlesworth, 1979), la chute du potentiel évolutif ou de la capacité d'adaptation aux modifications de l'environnement (Frankham, 2005). Les populations de petites tailles sont moins variables et donc plus rapidement affectées par la perte de diversité génétique (Lande, 1988 ; Groom et al., 2006).

Les analyses génétiques aident à déterminer si les populations d'une espèce sont structurées et à détecter la présence de flux de gènes. Ces éléments permettent de définir si une population est isolée et donc si les risques d'extinction sont élevés. Par contre, ces analyses ne peuvent pas donner des informations sur la dynamique des populations telles que les fluctuations annuelles d'abondance ou le taux de croissance qui sont d'intérêt pour les écologistes et les biologistes de la conservation (Koizumi, 2011).

Afin de comprendre les facteurs ayant entraîné la raréfaction d'une espèce, il est donc nécessaire d'étudier les causes environnementales, biologiques et génétiques qui pourront, par ailleurs, aider à sélectionner les zones géographiques prioritaires pour la conservation (Segarra-Moragues & Catalan, 2010).

5) Les espèces adventices

Les adventices sont définies comme l'ensemble de la flore spontanée présente dans les habitats artificialisés (Godinho, 1984). Dans le cas des agroécosystèmes, la totalité de la végétation présente, à l'exception de la culture semée, sera considérée comme adventice. Deux groupes peuvent être définis, les archéophytes et les néophytes. Les archéophytes ont été importées en France avec les semences d'espèces cultivées avant l'année 1500. Cette introduction a démarré dès le début de l'agriculture, *i.e.*, au Néolithique avec l'arrivée, *via* le Proche-Orient, des premières céréales en France. Ces espèces, maintenant naturalisées, sont considérées par les botanistes comme faisant partie de la flore française (Jauzein, 2001). Parmi les archéophytes, certaines sont des ubiquistes communes (*Galium aparine* L., *Sinapis alba* L.) alors que d'autres ne sont présentes que dans la parcelle cultivée et sont actuellement en voie de raréfaction. C'est le cas par exemple, de *Ranunculus arvensis* L., *Scandix pecten-veneris* L. et *Centaurea cyanus* L. qui ont fortement décliné dans l'ouest de l'Europe (Sutcliffe & Kay, 2000). Les néophytes, quant à elles, sont arrivées après la découverte des

Amériques, au XVI^{ème} siècle, et sont considérées par les botanistes comme des espèces introduites en France (Jauzein, 2001).

La majorité des adventices sont des espèces annuelles avec un fort taux de croissance et une stratégie écologique de type C (Critchley et al., 2006). A cause des perturbations, la persistance des semences dans la banque de semences du sol est un critère important lié à la réussite ou au déclin potentiel des adventices. Il semblerait que seulement 10% du stock semencier soit exprimé chaque année (Rahman et al., 2006) avec des semences ayant une capacité de survie et une dormance différentes en fonction de l'espèce. La répartition des semences dans le sol est aussi hétérogène. Ainsi, le stock semencier va varier temporellement et spatialement. Les adventices présentes dans une culture sont celles qui ont un cycle de vie adapté à celui de la culture. Généralement, les espèces à faible persistance sont désavantagées dans l'agroécosystème à cause des successions culturales qui peuvent être à l'origine d'environnement défavorable pendant plusieurs années pour une espèce.

La répartition des adventices dans le paysage agricole est dépendante des caractéristiques biologiques et fonctionnelles de l'espèce. Cette répartition peut également être influencée par des interventions humaines ; par exemple, le travail du sol semble être un facteur corrélé avec la distribution des espèces dans l'agroécosystème (Fried et al., 2007). Les quatre compartiments, définis par Greaves & Marshall (1987) sont aussi différenciés par la distribution de la flore. En effet, ces compartiments ont une richesse spécifique et une composition floristique différentes (Fried et al., 2007 ; Gardarin et al., 2007). Certaines adventices, très ubiquistes et peu sensibles aux perturbations, seront présentes dans tous les compartiments du paysage agricole (PC, F, I et BH : *Sonchus asper* L. et *Geranium dissectum* L.). D'autres, ayant une niche écologique plus étroite, ne seront représentées que dans certains milieux de la parcelle (I, BC, PC : *Adonis annua* L. et *Lithospermum arvense* L.). Enfin, les espèces spécialistes, souvent les plus sensibles aux perturbations, ne seront présentes que dans un seul compartiment (BH : *Dactylis glomerata* L.) (Fried et al., 2007).

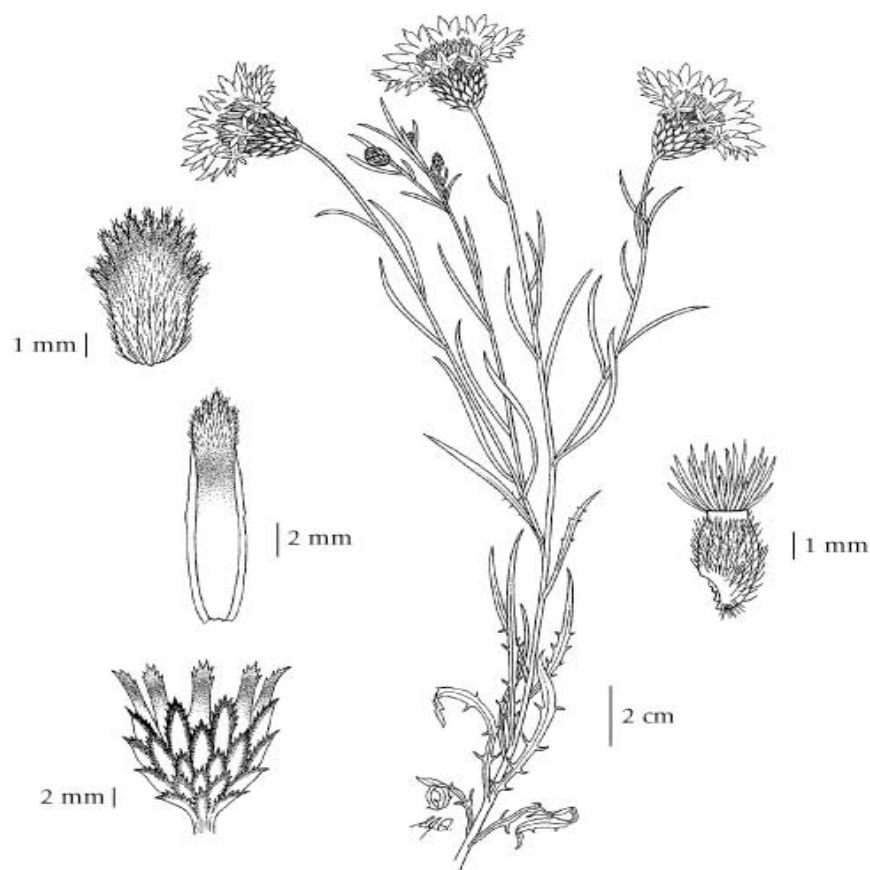
Par ailleurs, les adventices sont probablement un des groupes clefs du fonctionnement de l'écosystème (Chapin et al., 2000). La flore des champs est, en effet, en tant que producteur primaire, au centre de réseaux trophiques (Marshall et al., 2003) en servant de ressource pour les pollinisateurs, les granivores et les herbivores (Newton, 2004 ; Storkey, 2006). Parmi les adventices, se trouvent les espèces messicoles (Annexe1), souvent spécialistes de l'agroécosystème et dont certaines sont actuellement en voie de raréfaction suite à l'intensification des pratiques agricoles. Ces messicoles, spécialistes et en voie de raréfaction, sont *a priori* très sensibles aux modifications de l'environnement et pourraient

être de bonnes candidates à tester en tant qu'indicateur de biodiversité. Le bleuet est une espèce messicole spécialiste de la parcelle agricole et dont les fleurs bleues qui dépassent de la culture sont facilement reconnaissables. Actuellement en voie de raréfaction dans l'ouest de la France (Baron, 1989), il est encore fréquent dans l'est. Ces deux situations contrastées font du bleuet un candidat intéressant.

6) Le bleuet (*Centaurea cyanus* L.)

Le bleuet est une Astéracée du genre *Centaurea* qui comprend environ 250 espèces séparés en trois groupes : *Jacea*, *Cyanus* et *Acrocentron* (Garcia-Jacas et al., 2006) issus de trois centres de spéciations : Anatolien-Egée, nord Balkans-Eurasie et péninsule ibérique-Afrique du nord (Garcia-Jacas et al., 2006 ; Font et al., 2009).

En France, le bleuet est une espèce emblématique et considérée comme patrimoniale. Il est le symbole de la mémoire et de la solidarité en France et est distribué en souvenir des anciens combattants au moment des armistices du 8 mai et du 11 novembre. Cependant, sa biologie est mal connue et peu de travaux se sont attachés à son étude. *C. cyanus* est une plante annuelle, avec $2n=24$ chromosomes (Martin et al., 2009), mesurant entre 30 et 80 cm, qui germe principalement en automne et passe l'hiver sous forme de rosette. Les plantules sont facilement reconnaissables par leur couleur verte blanchâtre, légèrement cotonneuses. Le bleuet fleurit de mai à juillet. Son inflorescence est de type capitule (Figure 3) avec des fleurons externes, bleus rayonnants et stériles, et des fleurons internes féconds. La taille des grains de pollen est estimée entre 25 et 40 μm (Brun et al., 2007). Les akènes sont à ombilic barbu surmonté d'une aigrette rousse (Figure 4). Une plante produit en moyenne de 700 à 1400 akènes. Chaque akène pèse environ 4,3mg et mesure en moyenne 3mm dans la grande longueur sans l'aigrette (Kollmann & Bassin, 2001). Chadoeuf et al., (1984) estiment la persistance des akènes à 4 ans en présence de sol labouré. Au delà, seul 1% des akènes continuent de germer. La dormance des akènes de *C. cyanus* est, quant à elle, peu connue. Le bleuet est une espèce entomophile dont les principaux pollinisateurs sont des Hyménoptères (Svensson & Wigren, 1985).



Centaurea cyanus

Figure 3 : Dessin de *Centaurea cyanus* comprenant une plante, un akène et une inflorescence (The Illustrated Flora Of British Columbia).

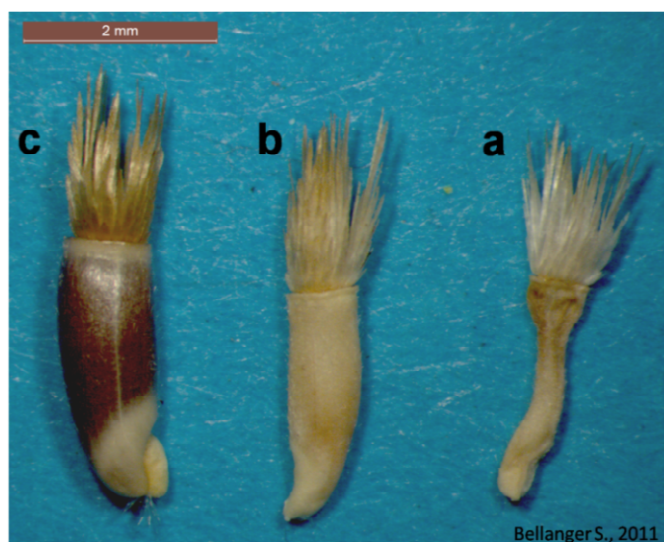


Figure 4 : Différents états d'un akène de *Centaurea cyanus* avec en a) une fleur non fécondée, en b) un akène en cours de maturation et en c) un akène mature.

C. cyanus est une espèce messicole, spécialiste du milieu de la parcelle cultivée. Cette espèce est principalement présente dans les cultures d'hiver (blé, orge, colza et moutarde) et est occasionnellement observée dans celles de printemps (tournesol) (Svensson & Wigren, 1985). Cette espèce est présente en Europe, en Afrique du nord et en Amérique du nord. *C. cyanus* a actuellement presque disparu en Grande Bretagne (Sutcliffe & Kay, 2000), il est en déclin dans l'ouest de l'Europe avec des statuts variables suivant le pays. Par exemple, les populations de bleuet sont considérées par l'IUCN (International Union for Conservation of Nature) comme vulnérable en Slovénie, en danger en Autriche et sans problème en Hongrie. Le bleuet est distribué dans presque tous les départements de France métropolitaine et semble avoir disparu du Val de Marne (Figure 5).

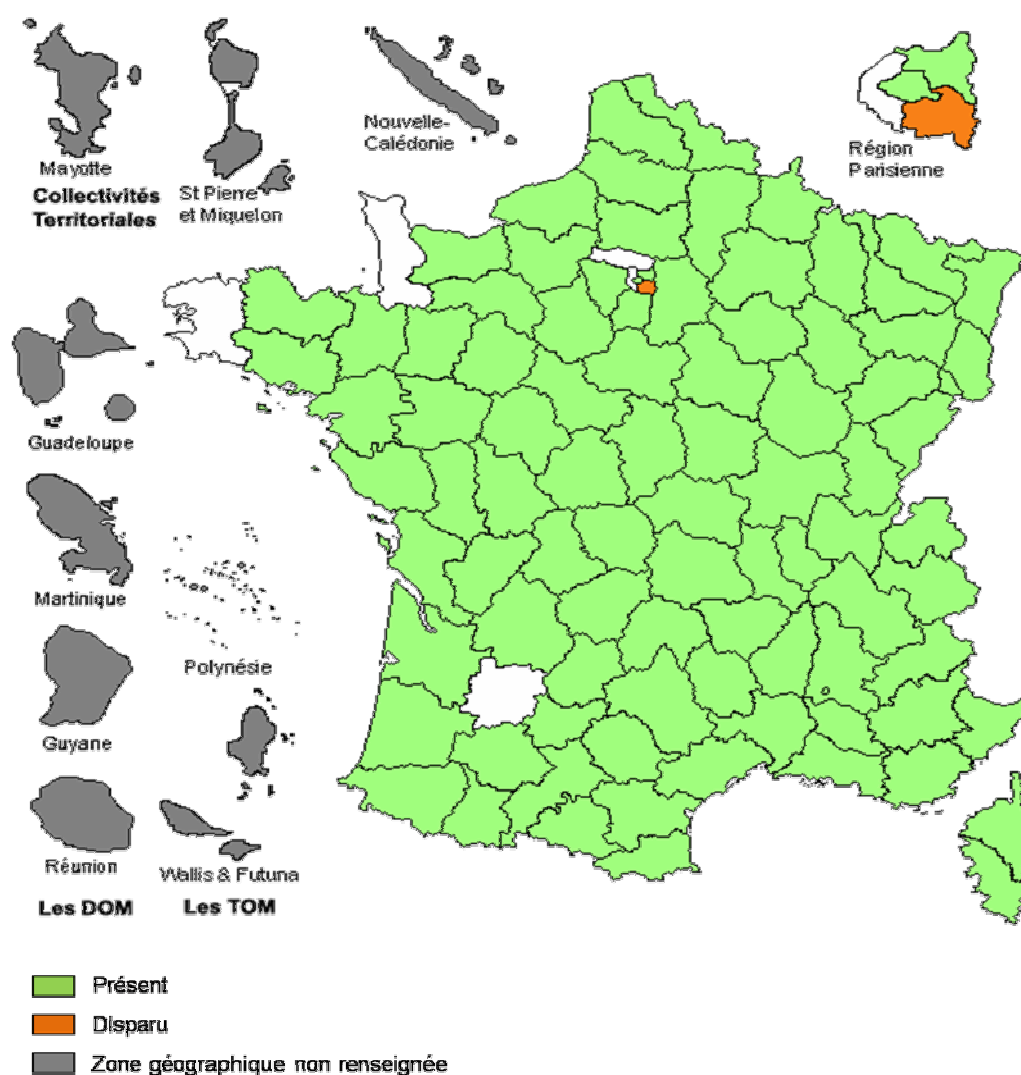


Figure 5: Distribution du bleuet en France, en blanc les département ou aucun bleuet n'a été signalé (d'après T la Botanica).

Actuellement, le bleuet est en voie de raréfaction dans l'ouest de l'Europe (Baron, 1989 ; Sutcliffe & Kay, 2000) alors qu'il est encore fréquent dans l'est. La principale cause de son déclin est l'intensification des pratiques agricoles ayant eu lieu depuis 1950. L'application d'herbicide (Håkansson, 2003 ; Ulber et al., 2010) et un tri quasi-systématique des semences (Svensson & Wigren, 1985) sont parmi les pratiques qui apparaissent comme les plus néfastes au bleuet. En effet, les semences de *C. cyanus* sont larges et lourdes et, si elles n'ont pas été dispersées au moment des récoltes, elles seront moissonnées avec la culture (Svensson & Wigren, 1985). L'impact des herbicides est variable et dépend de la famille utilisée avec une diminution significative du couvert du bleuet toujours observée (Ulber et al., 2010). Parmi les molécules les plus efficaces pour le contrôle du bleuet se trouvent : le 2.4D, le chloryralide, l'isoproturon, le chlorotoluron et le mécoprop (Marczewska & Rola, 2006 ; Ulber et al., 2010 ; Annexe 2). Des individus résistants aux inhibiteurs de l'ALS (acétolactate synthase) ont été identifiés pour la première fois en Pologne en 2001 (Marczewska & Rola, 2006). Actuellement, aucune résistance à un herbicide n'a été caractérisée en France. D'autres pratiques culturales comme l'utilisation de fertilisants peuvent avoir un impact sur *C. cyanus*. L'ajout d'azote (N) ou de phosphates (P) s'avère avoir une influence positive sur les populations de bleuet dans la parcelle cultivée. Par contre, l'impact sur les descendants est plus contrasté. En effet, le phosphate augmente le taux de germination des descendants alors que l'azote le fait chuter (Mohammaddoust et al., 2008). Des éléments liés à la biologie de l'espèce ont pu aussi accélérer sa raréfaction comme, par exemple, la longévité des semences dans le sol, la capacité de dormance et de germination des akènes, la levée, la croissance et la compétitivité des individus ou bien le système de reproduction.

ORGANISATION DE LA THESE

La première étape de ce travail de thèse a été d'essayer de déterminer les caractéristiques biologiques qui ont pu influencer la raréfaction de cette espèce dans l'agroécosystème. Plusieurs étapes du cycle de vie de l'espèce ont ainsi été étudiées. Tout d'abord, un travail sur le système de reproduction a déterminé l'importance de l'auto-incompatibilité. Des bleuets issus du Poitou-Charentes où les populations sont rares et peuvent être de petites tailles et/ou isolées, et d'autres provenant de Bourgogne où *C. cyanus* apparaît plus stable et plus fréquent ont été étudiés. Les conséquences possibles liées à ce système, dans le cas de petites populations isolées, ont ensuite été déterminées en examinant l'impact de la consanguinité sur des individus avec des coefficients de consanguinité différents. Ensuite, au stade semence, la persistance des akènes dans le sol et la capacité de dormance et de germination au cours du temps ont été testées. Enfin, la levée, la croissance, la coexistence et la reproduction du bleuet ont ensuite été analysées dans plusieurs milieux de l'agroécosystème.

La structuration et la diversité génétique des populations de Bourgogne ont ensuite été étudiées afin de mieux comprendre les relations entre les populations géographiques: déficit d'hétérozygote, flux de gènes et distance d'isolement entre populations qui peuvent influencer sur la structuration génétique.

L'objectif a, par la suite, été de déterminer comment se distribue le bleuet dans le paysage agricole et si des règles d'assemblage des communautés peuvent se dégager lorsque *C. cyanus* est présent dans une parcelle. Le bleuet a ainsi été testé comme indicateur de diversité floristique de la parcelle cultivée dans deux régions de France avec des situations contrastées quant à la présence de l'espèce (Poitou-Charentes et Bourgogne).

La thèse s'organisera ainsi suivant trois niveaux : 1) les caractéristiques biologiques ; 2) les facteurs génétiques ; et 3) l'assemblage des communautés qui ont pu influencer sur le déclin de l'espèce dans certaines région de France.

REFERENCES

- Agreste, 2001. Fertilisation azotée minérale : assagissement à la fin des années 80. Agreste Cahiers 2, 3-10.
- Baron, Y., 1989. Elément pour un bilan de la flore messicole en Poitou-Charentes. Plantes sauvages menacées. Actes. Brest. 79-86.
- Barua, M., 2011. Mobilizing metaphors: the popular use of keystone, flagship and umbrella species concepts. *Biodivers. Conserv.* 20, 1427-1440.
- Baudry, J., 1989. Interactions between agriculture and ecological systems at the landscape level. *Agric. Ecosys. Environ.* 27, 119-130.
- Benton, T.G., Bryant, D.M., Cole, L., Crick, H.Q.P., 2002. Linking agricultural practice to insect and bird populations: a historical study over three decades. *J. Appl. Ecol.* 39, 673-687.
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemueller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*. 313, 351-354.
- Bolnick, D.I., Svanbäck, R., Fordyce, J.A., Yang, L.H., Davis, J.M., Hulsey, C.D. , Forister, M.L., 2003. The ecology of individuals: incidence and implications of individual specialization. *Am. Nat.* 161, 1-28.
- Booth, B.D., Swanton, C.J., 2002. Assembly theory applied to weed communities. *Weed. Sci.* 50, 2-13.
- Brook, B.W., Sodhi, N.S., Bradshaw, C.J.A., 2008. Synergies among extinction drivers under global change. *Trends Ecol. Evol.* 23, 453-460.
- Brun, C., Dessaint, F., Richard, H., Bretagnolle, F., 2007. Arable-weed flora and its pollen representation: A case study from the eastern part of France. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 146, 29-+.
- Buckland, S.T., Magurran, A.E., Green, R.E., Fewster, R.M., 2005. Monitoring change in biodiversity through composite indices. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 243-254.
- Chadoeuf, R., Barralis, G., Lonchamp, J.P., 1984. Evolution of the seed potential of annual weeds in cultivated soil. *Comptes rendus du 7eme colloque international sur l'ecologie, la biologie et la systematique des mauvaises herbes.*, 63-70.
- Chapin, F.S., III, Zavaleta, E.S., Eviner, V.T., Naylor, R.L., Vitousek, P.M., Reynolds, H.L., et al. 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature*. 405, 234-242.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1979. Evolution and breakdown of S-allele systems. *Heredity*. 43, 41-55.
- Critchley, C.N.R., Fowbert, J.A., Sherwood, A.J., 2006. The effects of annual cultivation on plant community composition of uncropped arable field boundary strips. *Agric. Ecosys. Environ.* 113, 196-205.

- Culman, S.W., Young-Mathews, A., Hollander, A.D., Ferris, H., Sanchez-Moreno, S., O'Geen, A.T., Jackson, L.E., 2010. Biodiversity is associated with indicators of soil ecosystem functions over a landscape gradient of agricultural intensification. *Landscape Ecol.* 25, 1333-1348.
- Devictor, V., Clavel, J., Julliard, R., Lavergne, S., Mouillot, D., Thuiller, W. et al., 2010. Defining and measuring ecological specialization. *J. Appl. Ecol.* 47, 15-25.
- Donald, P.F., Sanderson, F.J., Burfield, I.J., van Bommel, F.P.J., 2006. Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990-2000. *Agric. Ecosys. Environ.* 116, 189-196.
- Dornelas, M., Moonen, A.C., Magurran, A.E., Barberi, P., 2009. Species abundance distributions reveal environmental heterogeneity in modified landscapes. *J. Appl. Ecol.* 46, 666-672.
- Duelli, P., Obrist, M.K., 2003. Biodiversity indicators: the choice of values and measures. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98, 87-98.
- Fitzgerald, J.D., Solomon, M.G., 2004. Can flowering plants enhance numbers of beneficial arthropods in UK apple and pear orchards? *Biocontrol Sci. Technol.* 14, 291-300.
- Font, M., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R., Roquet, C., Susanna, A., 2009. Evolution and biogeography of *Centaurea* section *Acrocentron* inferred from nuclear and plastid DNA sequence analyses. *Ann. Bot.* 103, 985-997.
- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* 126, 131-140.
- Fried, G., Norton, L., Reboud, X., 2008. Environmental and management factors determining weed species composition and diversity in France. *Agric. Ecosys. Environ.* 128, 68-76.
- Fried, G., Girod, C., Jacquot, M., Dessaint, F., 2007. Repartition de la flore adventice à l'échelle d'un paysage agricole : analyse de la diversité des pleins champs et des bordures. Conference du COLUMA - journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes (afpp), 245-254. afpp, Dijon.
- Garcia-Jacas, N., Uysal, T., Romashchenko, K., Suarez-Santiago, V.N., Ertugrul, K., Susanna, A., 2006. *Centaurea* revisited: A molecular survey of the *Jacea* group. *Ann. Bot-Lond.* 98, 741-753.
- Gardarin, A., Tremoy, M., Bretagnolle, F., Chauvel, B., 2007. Repartition de la flore adventice à l'échelle d'un paysage : gradient écologique des espèces observées. Conference du COLUMA – journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes. afpp, Dijon.
- Gasquez, J., 2005. Les adventices, composante inhérente des cultures. In : Livre Blanc « Gestion Responsable des Herbicides Céréales » (Ed. Bayer Crop Science), 9-15. Lyon, France.
- Gaston, K.J., 1994. *Rarity*. Chapman and Hall, London.
- Guiral, D., 1992. Physical instability : factor of organization and structuration of a shallow brackish tropical ecosystem. *Vie Milieu.* 42, 73-92.
- Godinho, I., 1984. Les définitions d' "adventice" et de "mauvaise herbe". *Weed. Res.* 24, 121-125.

- Greaves, M.P., Marshall, E.J.P., 1987. Field margins: definitions and statistics. Field margins (J.M. Way & P.W. Greig-Smith), pp. 3-10. British Crop Protection Council, London.
- Groom, M.J., Meffe, G.K., Carroll, C.R., 2006. Principle of Conservation Biology. Sinauer Inc, Sunderland MA.
- Gunton, R.M., Petit, S., Gaba, S., 2011. Functional traits relating arable weed communities to crop characteristics. *J. Veg. Sci.* 22, 541-550.
- Håkansson, S., 2003. Weeds and weed management on arable land: an ecological approach. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Hallgren, E., Palmer, M.W., Milberg, P., 1999. Data diving with cross-validation: an Investigation of broad-scale gradients in Swedish weed communities. *J. Ecol.* 87, 1037-1051.
- Hanski, I., 1999. Metapopulation ecology. Oxford: Oxford University Press.
- Hubbell, S.P., 2001. The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography, Princeton University Press.
- Hutchinson, G.E., 1957. Concluding remarks. Cold Spring Harbor Symposium. Quant. Biol. 22, 415-427.
- Isik, K., 2011. Rare and endemic species: why are they prone to extinction? *Turk. J. Bot.* 35, 411-417.
- Jauzein, P., 2001. Biodiversité des champs cultivés : l'enrichissement floristique. Dossier de l'environnement de l'INRA. 21, 43-64.
- Kassen, R., 2002. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* 15, 173-190.
- Kimura, M., Crow, J.F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49, 725-738.
- Koizumi, I., 2011. Integration of ecology, demography and genetics to reveal population structure and persistence: a mini review and case study of stream-dwelling Dolly Varden. *Ecol. Freshwat. Fish.* 20, 352-363.
- Kolb, A., Diekmann, M., 2005. Effects of life history traits on responses of plant species to forest fragmentation. *Conserv. Biol.* 19, 929-938.
- Kollmann, J., Bassin, S., 2001, Effects of management on seed predation in wildflower strips in northern Switzerland. *Agric. Ecosys. Environ.* 83, 285-296.
- Lande, R., 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science.* 241, 1455-1460.
- Levins, R., 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 15, 237-240.
- Lindenmayer, D.B., Wood, J.T., McBurney, L., MacGregor, C., Youngentob, K., Banks, S.C., 2011. How to make a common species rare: A case against conservation complacency. *Biol. Conserv.* 144, 1663-1672.
- Lindenmayer, D.B., 2009. Forest Pattern and Ecological Process: A Synthesis of 25 Years of Research. CSIRO Publishing, Melbourne.

- MacArthur, R.H., Wilson, E.O., 1967. The Theory of Island Biogeography. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Magurran, A.E., 2004. Measuring biological diversity. Oxford: Blackwell Science.
- Marczewska, K., Rola, H., 2006. Identification of chlorsulfuron-resistant *Apera spica-venti* and *Centaurea cyanus* biotypes and chemical methods of their control in winter wheat. Progress in Plant Protection 46, 215-222.
- Marshall, E.J.P., Brown, V.K., Boatman, N.D., Lutman, P.J.W., Squire, G.R., Ward, L.K., 2003. The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. Weed. Res. 43, 77-89.
- Martin, E., Dinc, M., Duran, A., 2009. Karyomorphological Study of Eight *Centaurea* L. Taxa (Asteraceae) from Turkey. Turkish Journal of Botany 33, 97-104.
- May, R.M., 1975. Patterns of species abundance and diversity. Ecology and evolution of communities (ed. Cody, M.L., Diamond, J.M.), 81-120. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Mohammaddoust, H.R., Asghari, A., Tulikov, A.M., Hasanzadeh, M., Saidi, M.R., 2008. Effect of fertilizer application on density, dry matter and seed characteristics of garden cornflower (*Centaurea cyanus* L.) and corn spurrey (*Spergula vulgaris* L.). Pakistan J. Weed Sci. Res. 14, 73-80.
- Morin, P.J., 1999. Community Ecology. Blackwell Science, Malden, USA.
- Newton, I., 2004. The recent declines of farmland bird populations in Britain: an appraisal of causal factors and conservation actions. Ibis. 146, 579-600.
- Novacek, M.J., Cleland, E.E., 2001. The current biodiversity extinction event: scenarios for mitigation and recovery. P. Natl. Acad. Sci. 98, 5466-5470.
- Perju, T., Moldovan I., 1991. Entomofauna of *Centaurea* species with a view to biological control. Buletinul Institutului Agronomic Cluj Napoca. Seria Agricultura si Horticultura. 45, 73-84.
- Pimm, S.L., Lawton, J.H., 1998. Ecology – planning for biodiversity. Science. 279, 2068-2069.
- Pocock, M.J.O., Jennings, N., 2008. Testing biotic indicator taxa: the sensitivity of insectivorous mammals and their prey to the intensification of lowland agriculture. J. Appl. Ecol. 45, 151-160.
- Poisot, T., Bever, J.D., Nemri, A., Thrall, P.H., Hochberg, M.E., 2011. A conceptual framework for the evolution of ecological specialisation. Ecol. Lett. 14, 841-851.
- Prendergast, J.R., Quinn, R., Lawton, J., Eversham, B., Gibbons, D., 1993. Rare species, the coincidence of diversity hotspots and conservation strategies. Nature. 365, 335-337.
- Primack, R.B., 2006. Essentials of Conservation Biology. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, MA.
- Purvis, A., Hector, A., 2000. Getting the measure of biodiversity. Nature. 405, 212-219.
- Rahman, A., James, T. K., Grbavac, N., 2006. Correlation between the soil seed bank and weed populations in maize fields. Weed Biol. Manag. 6, 228-234.

- Robinson, R.A., Sutherland, W.J., 2002. Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *J. Appl. Ecol.* 39, 157-176.
- Segarra-Moragues, J.G., Catalan, P., 2010. The fewer and the better: prioritization of populations for conservation under limited resources, a genetic study with *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae) in the Pyrenean National Park. *Genetica* 138, 363-376.
- Sodhi, N.S., Ehrlich, P.R., 2010. *Conservation Biology for All*. Oxford University Press, Oxford, England. (Eds.).
- Stork, N.E., 2010. Re-assessing current extinction rates. *Biodivers. Conserv.* 19, 357-371.
- Storkey, J., Westbury, D.B., 2007. Managing arable weeds for biodiversity. *Pest Manag. Sci.* 63, 517-523.
- Storkey, J., 2006. A functional group approach to the management of UK arable weeds to support biological diversity. *Weed Res.* 46, 513-522.
- Sutcliffe, O.L., Kay, Q.O.N., 2000. Changes in the arable flora of central southern England since the 1960s. *Biol. Conserv.* 93, 1-8.
- Svensson, R., Wigren, M., 1985. History and biology of *Centaurea cyanus* in Sweden. *Sven. Bot. Tidskr.* 79, 273-297.
- Thomas, J.A., Telfer, M.G., Roy, D.B., Preston, C.D., Greenwood, J.J.D., Asher, J., Fox, R., Clarke, R.T., Lawton, J.H., 2004. Comparative losses of British butterflies, birds, and plants and the global extinction crises. *Science*. 303, 1879-1881.
- Turchin, P., 2003. *Complex population dynamics: a theoretical / empirical synthesis*. Princeton: Princeton University Press.
- Ulber, L., Steinmann, H.-H., Klimek, S., 2010. Using selective herbicides to manage beneficial and rare weed species in winter wheat. *J. Plant Dis. Prot.* 117, 233-239.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M., 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science*. 277, 494-499.
- Weiher, E., Keddy, P.A., 1999. Assembly rules as general constraints on community composition. In: *Ecological assembly rules: perspectives, advances, retreats* (Eds Weiher, E., Keddy, P.A.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Weiss, E., Stettmer, C., 1991. *Unkräuter in der Agrarlandschaft locken blütenbesuchende Nutzinsekten an*. Hauptverlag, Bern, Stuttgart.
- Wilson, E.O., 2000. The future of conservation biology. *Conserv. Biol.* 14, 1.

CHAP ITRE I

*« La vraie sagesse, la vraie supériorité ne se gagne pas en luttant
mais en laissant les choses se faire d'elles-mêmes. Les plantes qui
résistent au vent se cassent, alors que les plantes souples survivent aux
ouragans. » [Épicure]*

Cycle biologique du bleuet :

Quels sont les facteurs qui auraient un impact sur sa réussite ou sa raréfaction dans le paysage agricole ?

A- INTRODUCTION GENERALE

Les caractéristiques biologiques d'une espèce ainsi que sa capacité d'adaptation aux propriétés de l'environnement font partie des facteurs déterminant de sa réussite ou non dans un paysage. Dans le cas des espèces généralistes, dont la niche écologique est large, une forte capacité d'adaptation aux différentes caractéristiques de l'environnement est attendue ce qui permet à ces espèces d'être représentées dans plusieurs habitats d'une mosaïque paysagère. A l'opposé, chez les espèces spécialistes, dont la niche écologique est étroite, une plus faible capacité d'adaptation est attendue induisant leur présence dans un type d'habitat propre à l'espèce. Les agroécosystèmes sont des milieux perturbés composés d'espèces spécialistes dont par exemple des oiseaux (outarde canepetière ou alouette des champs) et des espèces végétales de type messicole (bleuet, adonis estivale). Suite à l'intensification des pratiques agricoles, une partie de ces spécialistes est actuellement en voie de raréfaction dans le paysage agricole. Afin de les protéger, il est important de comprendre le fonctionnement de ces espèces.

Le bleuet (*Centaurea cyanus* L.) est une messicole en voie de raréfaction dans l'ouest de la France (Poitou-Charentes) alors qu'il est encore commun en Bourgogne. Cette espèce, principalement présente dans les cultures d'hiver, germe en automne, passe l'hiver sous forme de rosette et fleurit du mois de mai aux moissons. *C. cyanus* est une espèce auto-incompatible, *i.e.*, qui ne peut s'autoféconder ou se reproduire avec des individus ayant les mêmes allèles-S d'incompatibilité. Dans le cas des populations isolées et/ou de petites tailles, la limitation du nombre de reproducteurs va mener les populations vers l'extinction s'il n'y a pas évolution de ce système de reproduction.

→ Caractérisation des facteurs biologiques qui ont entraîné la raréfaction de ces espèces spécialistes.

Afin d'identifier les facteurs biologiques et évolutifs qui peuvent expliquer la raréfaction ou la réussite du bleuet au cours de son cycle de vie dans la parcelle agricole, nous avons voulu aborder trois étapes essentielles du cycle biologique des adventices annuelles : le système de reproduction, la survie des semences, leur levée et l'installation des plantules. Ce chapitre comprend donc trois parties :

B- Système de reproduction de plantes issues des régions Poitou-Charentes et Bourgogne et conséquences sur la **consanguinité** des descendants.

I - Mating system evolution in *Centaurea cyanus* L., a self-incompatible segetal species, rare in the west of France.

II - Consequences of inbreeding on *Centaurea cyanus* L., a self-incompatible segetal species, rare in the west of France

C- Persistance des akènes de bleuets enfouies dans le sol pendant 2,5 ans et suivi de la **germination** et de la **dormance** au cours du temps pour deux populations.

D- Levée, croissance et reproduction du bleuet dans différents milieux du paysage agricole bourguignon.

**B- SYSTEME DE REPRODUCTION DES PLANTES
ISSUES DES REGIONS POITOU-CHARENTES ET
BOURGOGNE ET CONSEQUENCES SUR LA
CONSANGUINITE DES DESCENDANTS.**

Le bleuet est une espèce allogame et entomophile qui possède un système d'auto-incompatibilité (SI) (Svensson & Wigren, 1985) plus ou moins partiel comme de nombreuses autres Astéracées. Ce système accepte ou rejette le pollen sur les stigmates *via* des allèles-S d'incompatibilité. Le rejet a lieu lorsque le pollen possède au moins un allèle-S en commun avec le système maternel (Takayama & Isogai, 2005). Le SI bloque l'autofécondation et empêche les croisements entre individus ayant le même système d'incompatibilité (Porcher & Lande, 2005 ; Willi, 2009). Ce système de reproduction provoque la nécessité d'une diversité des allèles-S au sein des populations. Or, dans le cas des populations isolées et/ou de petites tailles, le SI peut s'avérer désavantageux, provoquant une diminution du nombre de reproducteurs au cours du temps (Glémin et al., 2005 ; Busch & Schoen, 2008), expliquant en partie la baisse de fécondité généralement observée (Demauro, 1993 ; Byers & Meagher, 1995) et augmentant le risque d'extinction dans ces populations. Dans cette situation, une évolution du système de reproduction vers l'auto-compatibilité est attendue (Charlesworth & Charlesworth, 1979 ; Porcher & Lande, 2005) et permettrait, ainsi, à la population de se maintenir au cours de temps. Cependant, l'auto-compatibilité peut impliquer une apparition de la consanguinité. Celle-ci peut entraîner une diminution de la valeur phénotypique des individus due à l'augmentation du taux d'homozygotie qui peut permettre l'expression des allèles délétères. Ce phénomène est appelé la dépression de consanguinité (Charlesworth & Charlesworth, 1979).

Dans cette partie, nous essaierons de déterminer dans quelle mesure le bleuet est auto-incompatible, et si dans les populations issues du Poitou-Charentes une évolution vers l'auto-compatibilité a lieu. Pour ce faire, la capacité d'autofécondation de plantes issues cette région sera testée et comparée à celle d'individus issus de Bourgogne. L'impact de la consanguinité sera ensuite étudié sur les descendants afin de déterminer la tolérance du bleuet à la consanguinité. Les résultats montrent que la plupart des plantes sont strictement auto-incompatibles. Cependant, il existe des plantes pseudo auto-compatibles qui se trouvent dans des proportions équivalentes et non négligeables quel que soit la région d'origine des individus. Il ne semble donc pas y avoir d'évolution du système de reproduction vers l'auto-compatibilité dans les populations du Poitou-Charentes, supposées isolées et/ou de petites tailles. En revanche, la flexibilité observée du système d'auto-incompatibilité pourrait s'avérer un avantage lorsque le nombre de reproducteurs devient limité.

La présence des pollinisateurs pour la fécondation apparaît indispensable pour le bleuet. La densité de pollinisateurs étant fortement dépendante des conditions environnementales, cette caractéristique peut provoquer un échec de la reproduction dans les populations quel que soit la taille ou le niveau d'isolement.

Les bleuets semblent tolérer un certain niveau de consanguinité sans impact sur la valeur phénotypique des individus au sein des populations. Ainsi, lorsque le coefficient de consanguinité est inférieur à 0,5, une augmentation légère de la dépression de consanguinité est observée mais reste inférieure à $\delta < 0,5$ signifiant, *a priori*, qu'il n'y a pas de sélection allant contre l'autofécondation. Par contre, dès que le coefficient de consanguinité dépasse 0,75, la dépression de consanguinité devient importante et est principalement exprimée au moment de la germination. La valeur phénotypique cumulative est alors supérieure à $\delta > 0,5$ entraînant une forte sélection contre l'autofécondation. *C. cyanus* reste donc, pour le moment, une espèce fortement auto-incompatible.

Finalement, la flexibilité du système de reproduction et la tolérance du bleuet à la consanguinité pourrait permettre le maintien des populations en cas d'échec de la reproduction occasionné, par exemple, par une limitation du nombre de reproducteur. Par contre, dans les populations de petites tailles et/ou isolées, le coefficient de consanguinité augmentera rapidement sans épisode migratoire provoquant une hausse du risque d'extinction dans ces populations.

I) MATING SYSTEM EVOLUTION IN *CENTAUREA CYANUS* L., A SELF-INCOMPATIBLE SEGETAL SPECIES, RARE IN THE WEST OF FRANCE

Bellanger S.¹, Guillemin J.P.², Darmency H.¹

¹ INRA, UMR 1210 BGA, 17 rue Sully, BP 86510, 21065, F-Dijon, France

² AgroSup Dijon, UMR 1210 BGA, 26 rue Dr Petitjean, BP 87999, 21079, F-Dijon, France

1) INTRODUCTION

About half of all Angiosperms reproduce strictly by outcrossing, enforced by a self-incompatibility system (SI) (Igic & Kohn, 2006). SI prevents self-fertilization and inbreeding in Angiosperms (Porcher & Lande, 2005; Willi, 2009) through the ability to recognize and reject pollen that has at least one self-incompatibility allele (S-allele) in common with the maternal plant (Takayama & Isogai, 2005). The SI system has been identified in at least 68 Angiosperm families (de Nettancourt, 2001). The distribution of SI species within the Angiosperm family does not correspond to any established phylogenetic group; therefore, SI probably evolved many times independently within multiple evolutionary lineages (Steinbachs & Holsinger, 2002). Two types of SI systems exist -gametophytic and sporophytic SI- that are controlled by several incompatibility genes. They can involve dominance relationships among alleles; these relationships can differ between the pollen and stigma (Kowiyama et al., 1994). This differential expression can result in incompatibility under some circumstances and compatibility in others (DeMauro, 1993).

Individuals bearing S-alleles present at low frequency in a population possess an advantage over individuals carrying frequent S-alleles, because possessors of the rare S-allele have access to more potential mates (Llaurens et al., 2009). A disadvantage of SI is that successful reproduction requires genetic diversity of S-alleles. Small or isolated populations may have reduced S-allele diversity, which in turn would reduce the probability of finding compatible mates (Glémin et al., 2005; Busch & Schoen, 2008). The result would be an increased risk of local extinction. This phenomenon might explain the reduced fecundity observed in small and endangered populations of plants that possess an SI system (Demauro, 1993; Byers & Meagher, 1995). Pollinators also prefer larger patches; therefore, small populations are visited by proportionally fewer pollinators (Waites & Agren, 2004). Reduced pollination, combined with barriers to mating described above, could either drive SI populations to extinction or drive selection for self-compatibility (SC) (Kubota & Ohara, 2009). In species with specialist pollinators, the effects of reduced pollination are assumed to be worse again because any loss of one pollinator may drive a total reproductive failure (Bond, 1994). If a population is left with no pollinators, reproduction can only occur through autonomous self-fertilization (self-fertilization of flowers without pollinators help; Kubota et al., 2008). This phenomenon was observed in two *Mimulus* taxa (Dole & Ritland, 1993) and in populations of *Lupinus succulentus* (Harding & Barnes, 1977), in which the rate of autonomous self-fertilization was correlated with the number of pollinator visits. Theory of

plant mating system evolution predicts a spread of SC in small and isolated SI populations in which compatible mates are limited (Charlesworth & Charlesworth, 1979; Porcher & Lande, 2005). The decreased rate of reproduction should lead to an overall decline in individual seed production and subsequently in the population growth rate. Under these circumstances, natural selection should favor new mutations that break down or modify the SI system (Busch & Schoen, 2008), effectively ‘rescuing’ reproduction.

Though the regulating genes are unknown, many species of the family Asteraceae are known to have developed SI (de Nettancourt, 2001). Among 571 Asteraceae species studied, the majority is SI (63%); of the remainder, 10% are either pseudo self-incompatible (PSC: some seeds are produced by selfing but fewer than true SC) and 27% are SC (Ferrer & Good-Avila, 2006). Population disturbance in SI Asteraceae has been shown to result in varied SI evolution (Abbott & Forbes, 1993; DeMauro, 1993; Reinartz & Les, 1994). For example, *Aster furcatus* populations suffering fragmentation and decline in North America correlate with the spread of SC and low S-allele diversity (Reinartz & Les, 1994). Cornflower, *Centaurea cyanus* L., is an Asteraceae in decline in western Europe (Baron, 1989; Sutcliffe & Kay, 2000), and is now nearly extinct in the UK, although it was a common---perhaps even major---component of the arable weed flora in Europe up to the middle of the 20th century. *C. cyanus* bears societal value as a segetal species, historically associated with a successful harvest and used for folk purposes. In addition, it certainly could have high ecological value for foraging insects and it is a potential indicator of segetal richness (Bellanger et al., 2012). This species is an insect-pollinated annual that depends exclusively on arable land. It germinates primarily in autumn and is mainly present in winter crops. *C. cyanus* presence has declined with the intensification of agricultural practices in western Europe; populations are now smaller and more isolated than they have been, historically (Baron, 1989). These populations are probably subject to mate limitation. Since the type of mating system appears to be one of the main factors contributing to persistence or extinction of small or declining populations (Gargano et al, 2009) and since little is known about *C. cyanus*, we investigate here whether this species is SC, PSI, or SI and whether there is any indication of a variation in the dominant mating system. This study will lead to a better understanding of the factors responsible for the *C. cyanus* decline in western France. We compared the mating system of *C. cyanus* populations in western France (Poitou-Charentes region) where populations are small and/or isolated and where mate choice is likely limited, to those of eastern France (Burgundy region) where populations remain stable and common.

2) MATERIAL AND METHODS

2.1 Seed origin

In 2006, we collected seeds from individual plants within six *C. cyanus* populations located south of Niort in the Poitou-Charentes region, where *C. cyanus* occurs in 0.3 % of the fields (unpublished census over 19,000 fields). In 2007, we collected seeds from five populations around Dijon in Burgundy, where *C. cyanus* occurs in 9 % of the fields.

2.2 First generation

In 2009, 15 seeds from each of six randomly selected plants from every population (Poitou-Charentes and Burgundy) were set to germinate (Petri dish with germinating paper [Durieux®]) in an environmental chamber with a temperature of 15-25°C (night-day) and a photoperiod of 12h-12h. Newly germinated seedlings were transplanted into 0.3L pots of loam and put with a temperature of 15-25°C (night-day) and a photoperiod 10-14h. After one month, the plants were transplanted into 5L pots of loam and placed outside.

Once all plants were ready to bloom, four to six individuals were randomly selected from each population depending on the germination rate and the survival of seedlings (i.e. 30 individuals per region) in order to test the rate of self-fertilization in the presence of pollinators (Figure 1). For this purpose, each plant was isolated in a pollen-proof cage with houseflies as pollinators. Twenty other plants were randomly paired with twenty plants of other populations or regions in order to test outcrossing ability in the presence of pollinators (Figure 1). Both individuals were placed in the same isolated pollen-proof cage with flies as pollinators. In order to test for autonomous selfing, one capitulum of each plant was isolated in a pollen-proof bag (i.e. 100 capitula). This study design allowed us to determine which of the three mating systems were present in each population: autonomous self-fertilization without pollinators, self-fertilization with pollinators, and outcrossing in pairs.

About 0.01L of maggots was placed in each cage weekly, in order to ensure continuous presence of houseflies as pollinators. Maturing capitula were placed in a bag at an appropriate time to prevent seed shedding, and up to 30 capitula were isolated for each plant. After one month, we counted the total number of capitula per plant and measured plant height. These measures were used as surrogates of floral attractiveness. We then counted the number of unfertilized flowers, number of seeds aborted and number of seeds produced per capitulum, the sum of which represented the total number of flowers per capitulum. The width and height

of each capitulum were measured in order to obtain capitulum volume and to estimate the mean flower volume (ratio of capitulum volume by total number of flowers per capitulum).

In order to check for any bias due to the use of houseflies *versus* natural pollinators, we counted the number of seeds per capitulum collected in nature in two (presumably) isolated and five connected field populations in the Burgundy region (eastern France). Twenty capitula were collected from each population and results were compared with that of an additional cage containing 214 housefly-pollinated plants.

Self-fertilized plants were separated into three groups: those producing less than 0.02 seeds/flower (including plants with no seeds; G0), those producing between 0.02 and 0.05 seeds/flower (G1) and those producing more than 0.06 seeds/flower (G2, Figure 1).

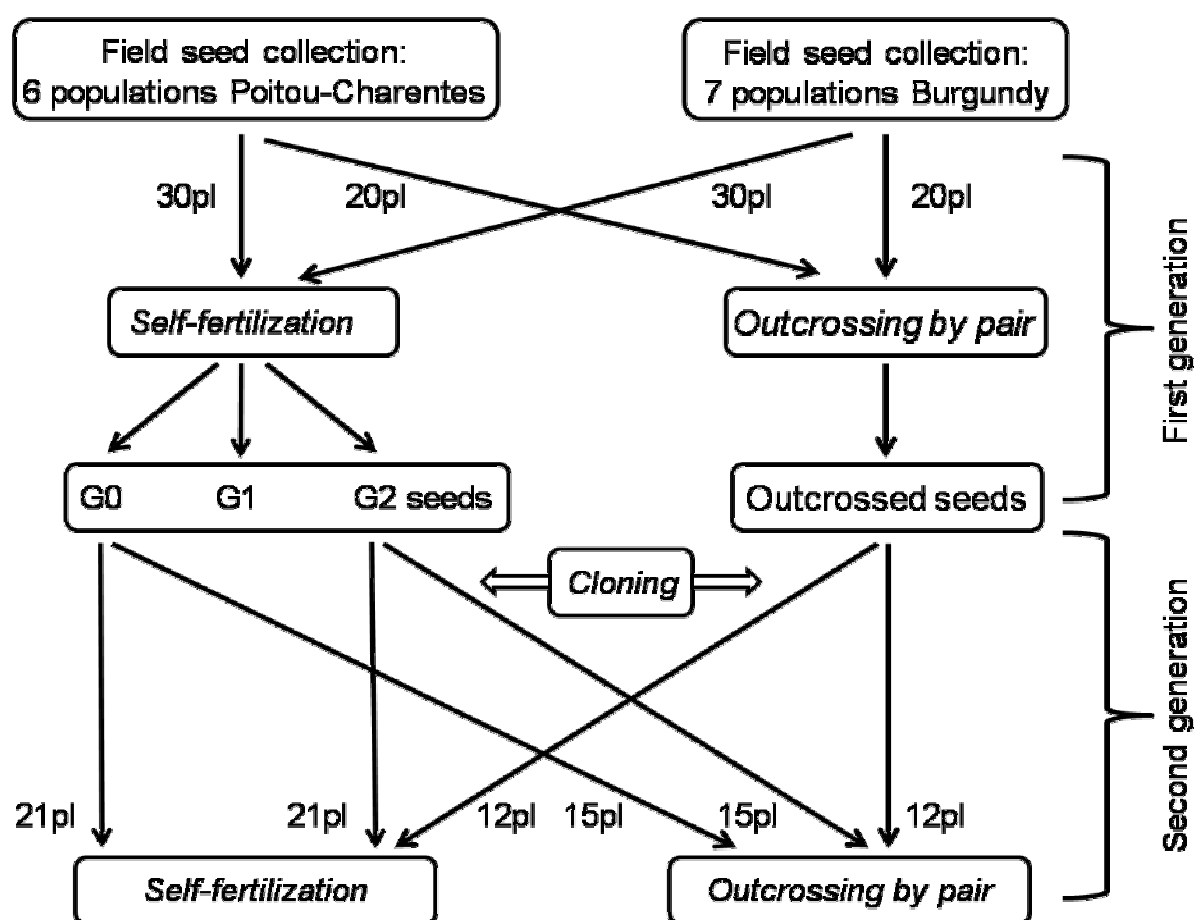


Figure 1: Origin of the plant material used in the experiments. The mating system of plants from Poitou-Charentes and Burgundy were tested under self-fertilization or outcrossing conditions (first generation). Seeds produced under self-fertilization conditions were separated into three groups according to the number of seeds produced: those producing less than 0.02 seed per flower (G0), those producing between 0.02 and 0.05 seed per flower (G1) and those producing more than 0.06 seed per flower (G2). Clones from G0, G2 and outcrossed plants were tested in self-fertilization and in outcrossing condition (second generation).

2.3 Second generation

Offspring produced by plants in the fly-pollinated self-fertilization group were compared to those in the outcrossing group to determine relative seed viability and reproductive success according to parental origin, mating system and geographical origin.

We selected seven G0 plants, seven G2 plants, and four plants from outcrosses. We then randomly selected three seeds from each plant. We cultivated and grew these seeds to maturity in the same manner described above for the parent plants. However, we also cloned each individual to allow each one to reproduce under each of the three mating conditions (autonomous fertilization, fly-pollinated self-fertilization, and outcrossing). The cut end of the pieces of stem were dipped into a 0.25% b-indolutyric acid solution and placed directly in 0.3L pots with loam, and then transferred to 5L pots. Clones generated from each of the three parental origins described above were randomly assigned to a treatment as follows: 54 (i.e. three of each of the 7+7+4 parents defined above) were placed in fly-pollinated self-fertilization conditions, and another 21 pairs (42 total) were placed in outcrossing conditions (Figure 1). One capitulum per plant was bagged to ensure autonomous pollination (i.e. 96 capitula). Measurements taken were the same as those made for parents.

2.4 Data analysis

If the data follow a Normal distribution, the mean values were compared using a mixed-nested-model ANOVA and Tuckey test. By contrast, if they didn't, the data were Box Cox transformed before analysis to normalize the residuals. However, the transformation was not always sufficient to normalize the residuals. In this case, the mean values were compared using a Kruskal-Wallis test and Dunn test. A factorial discriminant analysis (FDA) was performed to observe if in the fly-pollinated self-fertilization group, the plants were discriminated on the measured traits (plant height, number of capitula per plant, number of flower per capitulum and the flower volume) depending on the number of seeds per flower produced (G0: less than 0.02 seed per flower, G1: between 0.02 and 0.05 seed and G2: more than 0.06 seed per flower). A Box test (F of Fisher asymptotic approximation) was made to confirm that the covariance matrices were different according to the three classes of seeds product. A one-dimensional test of equal average class was made to test if the traits measured were different depending on the three classes' discriminated. All statistics were performed with XLSTAT 2010 software. Results were considered significant at $\alpha=0.05$.

3) RESULTS

3.1 Housefly pollination efficiency

There was no difference between the number of seeds produced per flower by plants reared together in a cage with housefly pollinators and plants in connected natural populations (K-W test, $p=0.1$) (Table 1). This indicates that our experimental conditions effectively mimicked the pollination efficiency of natural pollinators when the number of potential partners is not limited. The number of seeds per flower was lower in isolated populations than in the five connected populations (M-W test, $p=0.03$).

Table 1: Number of seeds produced per flower ($\pm$ with the standard deviation of the mean) under the different pollination conditions.

Location	Greenhouse	Natural populations	
Pollinators	Flies	Natural pollinators	
Conditions	Multi paternity (214 plants)	Connected populations	Isolated populations
Number of capitula observed	421	98	38
Number of seeds per flower	0.57 ± 0.03	0.58 ± 0.07	0.44 ± 0.08

3.2 First generation

Of the 60 plants reared in the fly-pollinated self-fertilization group, two died before blooming (one from Burgundy and one from Poitou-Charentes). All 20 pairs in the outcrossing group survived, but three produced no seeds, probably because they contained two incompatible plants sharing the same S-alleles and they were discarded from the results. There was no effect of the origin of population on the production of seeds per flower (ANOVA, $F=1.04$ and $p=0.43$). Plants in the outcrossing group produced more seeds than those in the fly-pollinated self-fertilization group: 0.25 ± 0.2 versus 0.02 ± 0.03 ($p<0.001$, Figure 2). No plants in the autonomous pollination group produced seeds.

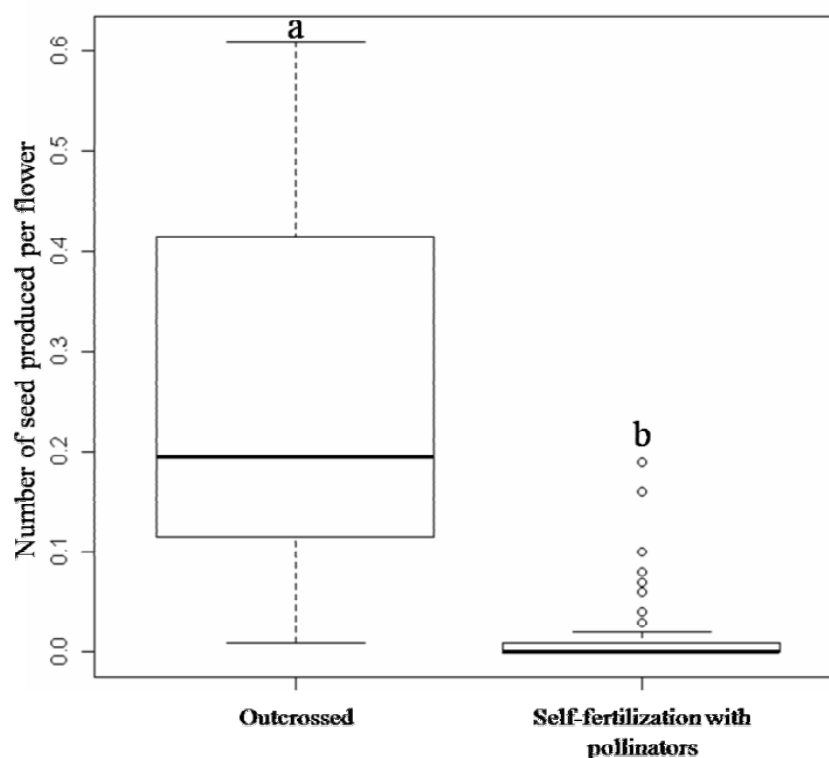


Figure 2: Number of seeds produced per flower according to the mating system (outcrossed or self-fertilization with pollinators) for the first generation. The seed number was represented as the 25th and 75th quartiles (horizontal lines), the median corresponds to the bold line and the whiskers show the minimal and the maximal value, not including outliers (indicated by circles). Means compared with a Mann-Whitney test, $p < 0.001$.

There was no difference in plant height, the number of flowers per capitulum, the flower volume or the number of seeds between plants from Poitou-Charentes and those from Burgundy (Table 2). Plants of the outcrossing group had fewer capitula per plant than plants in the fly-pollinated self-fertilization group. This difference was much more marked for plants of the Poitou-Charentes region (Table 2).

Table 2: Reproduction data and mean plant height according to the plant origin in outcrossed or self-fertilization with pollinator conditions (Burgundy and Poitou-Charentes). The test used was a Mann-Whitney test for the number of seeds produced in self-fertilization group and for the number of flowers per capitulum in outcrossing group. An ANOVA was made for the others traits (after a Box-Cox transformation for the number of capitula (Lambda=0.01) and the flower volume (Lambda=-1.46) in outcrossing group and a $y=\ln(y+c)$ tranformation for the number of seeds per flower in outcrossing group). The mean value was used, $\alpha<0.05$.

Condition	Region of origin	Number of plants	Plant height (cm)	Number of capitula per plant	Number of flowers per capitulum	Flower volume (mm ³)	Number of seeds per flower
Self-fertilization	Burgundy	29	64.1	131	15.0	10.7	0.02
	Poitou-Charentes	29	61.1	143	14.4	11.7	0.02
	p		0.6	0.6	0.4	0.2	0.4
Outcrossing	Burgundy	18	65.9	97	13.8	10.3	0.22
	Poitou-Charentes	16	61.2	59	13.5	10.3	0.25
	p		0.4	0.009**	0.4	0.3	0.8

** : significant at $p<0.01$.

The number of seeds per flower on plants in the fly-pollinated self-fertilization group varied widely among individuals: 76.8% produced less than 0.02 seed per flower (G0) (of which one third produced no seed), 10.7% produced between 0.02 and 0.05 seed (G1), and 12.5% produced more than 0.06 seed per flower (between 0.06 and 0.19) (G2) (Figure 3). Of the seven G2 individuals, four were from Poitou-Charentes and three from Burgundy. The three groups differed significantly in the number seeds per flower: $G0 < G1 < G2$ ($p<0.001$), which, retrospectively, confirms the relevance of the three groups. The average number of seed per flower produced by G2 (0.11 ± 0.05) was not significantly different from the average number of seed per flower produced through outcrossing, although the difference bordered significance ($p=0.052$).

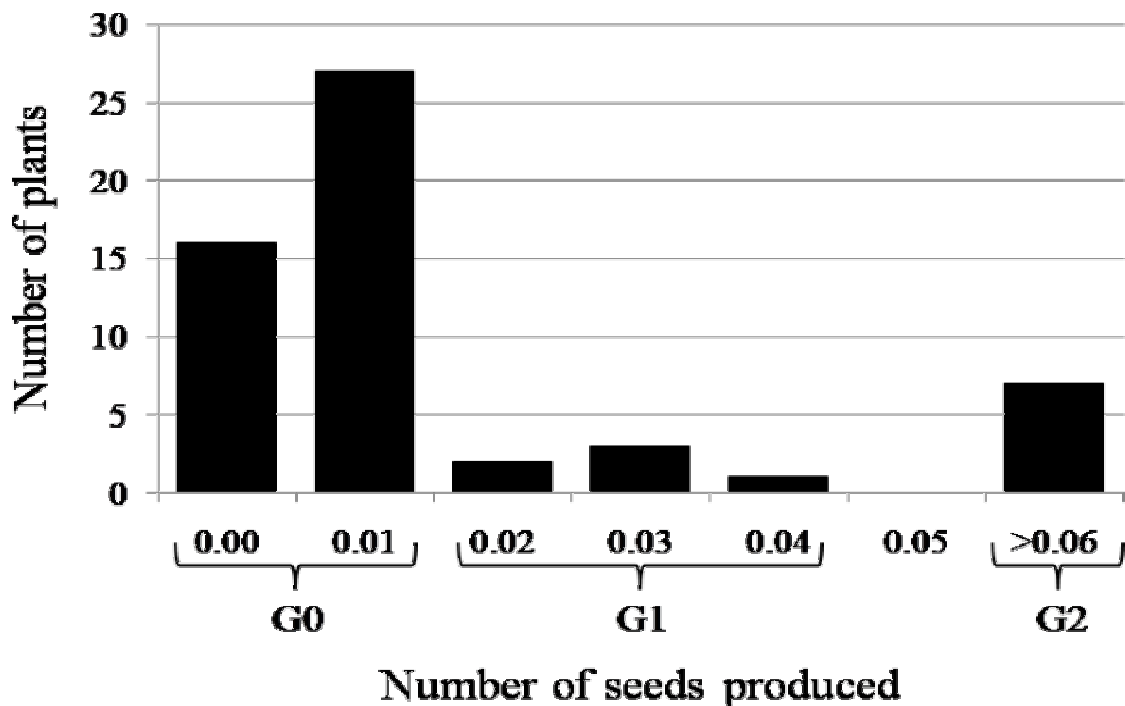


Figure 3: Distribution of the number of plants according to the number of seeds per flower under the self-fertilization with pollinators condition. Group G0 corresponds to the plants that produced less than 0.02 seeds per flower, plants in group G1 produced between 0.02 and 0.05 seeds per flower and group G2 corresponds to the plants producing more than 0.06 seeds per flower.

The first axes of the Factorial Discriminant Analysis was retained as representing 81.95% of the variability, while the next one was not significant with only 18.05% (i.e. less than one trait alone). The covariance matrices were not different for the three groups (G0, G1 and G2; Box test, $p=0.1$), meaning that the number of seeds per flower was not sufficient to discriminate the fly-pollinated self-fertilization groups through the plant height, the number of capitula, the number of flowers per capitulum and the flower volume. There was no difference in the flower volume between the G0, G1, and G2 fly-pollinated self-fertilization groups ($p=0.54$). The G1 group was different from G0 and G2 on axe 1 (ANOVA with $p<0.001$) (Figure 4). G1 plants had more flowers per capitulum than the other groups and were taller than G2 plants. G2 plants did not differ from G0, except that they had fewer capitula per plant. The number of seeds per flower was not correlated with any phenotypic characters measured in any of the three groups G0, G1 and G2. By contrast, capitula volume, the number of flowers per capitulum and flower volume were positively correlated with the total number of capitula per plant and with plant height (Table 3).

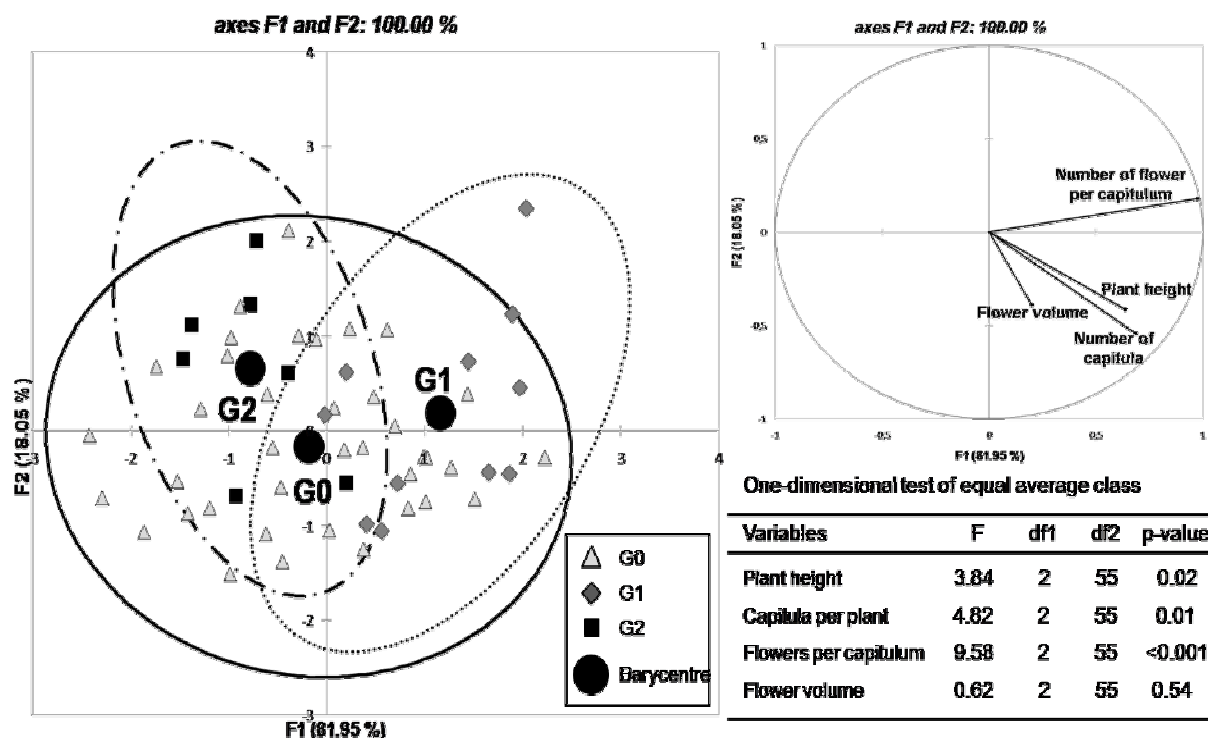


Figure 4: Factorial discriminant analysis (FDA), on the left, according to the number of seeds per flower produced in the fly-pollinated self-fertilization group: G0=less than 0.02 seed per flower (light grey triangles); G1=between 0.02 and 0.05 (dark grey diamonds); and G2=more than 0.06 (black squares). The groups were discriminated depending on their mean traits values (plant height, number of capitula, of flowers per capitulum and flower volume). Black circles represent the barycentres. On the right, one-dimensional test of equal average class according to the G0-G1-G2 grouping for each trait measured.

Table 3: Correlation of Pearson (R^2) between the phenotypic characters (plant height, number of capitula per plant, number of flowers per capitulum, flowers volume and number of seeds per capitulum) measured for the 58 plants under fly-pollinated self-fertilization condition (mean values of plants of the three groups of the first generation).

Variable	Plant height (cm)	Number of capitula per plant	Number of flowers per capitulum	Flowers volume (mm ³)	Number of seeds per flower
Plants height (cm)	1	0.12**	0.39***	0.07*	-0.05
Number of capitula per plant		1	0.26***	0.11**	-0.04
Number of flowers per capitulum			1	0.04	-0.02
Flowers volume (mm ³)				1	-0.01
Number of seeds per flower					1

, *: significant at $p < 0.01$ and < 0.001 , respectively.

3.3 Second generation

The germination rates (number of seeds germinated per family by the total number of seeds per family) were the same across all mating system groups and both parental origins. Because of environmental conditions (high temperature just after transplanting plants in 5L pots), only 13 of the 21 initial pairs in the outcrossing group survived. In the fly-pollinated self-fertilization group, 39 of the 54 initial plants survived. Of these 39 plants, 20 were descendants of the G0 (7 different parents), 11 were descendants from G2 (6 different parents) and 8 were descendants from outcrossed pairs (4 different parents). The number of plants from Burgundy and Poitou-Charentes were variable and generally too low for statistical comparison, therefore, we will not consider the effect of geographical origin in the second generation analyses.

No seed was produced in the autonomous pollination group. In the fly-pollinated self-fertilization group, one plant from an outcrossed parent seems to be a special case producing an average of 0.48 seed per flower, *i.e.* more than plants in condition of outcrossing; for the following analysis, this plant will not be taken into account. As for the previous generation, the number of seeds produced per flower was higher in the outcrossing group (0.28 ± 0.13) than in the fly-pollinated self-fertilization group (0.01 ± 7.10^{-4}) (Figure 5). No other phenotypic characters differed between these two mating system groups and all parameters were close to the values recorded for the first generation (results not shown).

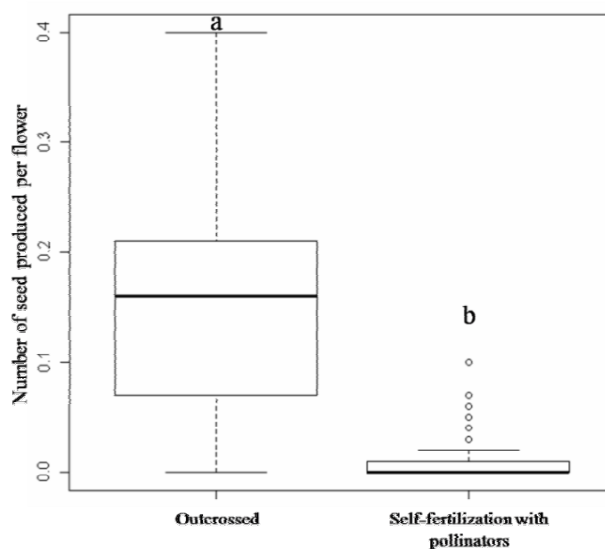


Figure 5: Number of seeds produced per flower according to the mating system (outcrossed or self-fertilization with pollinators) for the second generation. The seed number was represented as the 25th and 75th quartiles (horizontal lines), the median corresponds to the bold

line and the whiskers show the minimal and the maximal value, not including outliers (indicated with circles). Compared with a Mann-Whitney test, $p < 0.001$.

The parental origin had no effect on the number of seeds, plant height, the number of capitula per plant, or flower volume. By contrast, descendants of G0 plants had significantly fewer flowers per capitulum than descendants from G2 plants and than the outcrossing group (Table 4). The Pearson correlation showed that the number of seeds produced was not correlated with any other phenotypic characters measured. Plant height was positively correlated with each of the other traits measured, except for flower volume (Table 5).

Table 4: Comparison of plant height and reproductive data following the mating system (self-fertilization with pollinators (SFP) and outcrossed (O)) and according to the region (Burgundy and Poitou-Charentes (PC)) and the parental (descendants from G0, G2 and outcrossing (O)) origin under self-fertilization with pollinators condition. Mean values are presented and statistical comparisons were conducted using an ANOVA (with a Box-Cox transformation for the number of capitula ($\Lambda = 0.01$) and the flower volume ($\Lambda = 0.92$)) and a Kruskal-Wallis test for the number of seeds produced per flower, $\alpha < 0.05$.

	Self-fertilization with pollinators							Mating system		
	Region of origin			Parental origin						
	Burgundy	PC	p	G0	G2	O	p	SFP	O	p
Number of plants	19	19		20	11	7		38	26	
Plant height (cm)	49,5	40,4	0,07	44,9	42,1	49,6	0,63	454,0	47,2	0,56
Number of capitula per plant	117,4	124,5	0,27	131,6	72,2	167,1	0,47	120,9	55,7	0,16
Number of flower per capitulum	12,6	11,9	0,45	11,4	12,8	13,8	0,02*	12,2	13,4	0,14
Flower volume (mm ³)	9,6	10,7	0,03*	10,5	9,8	9,7	0,22	10,1	10,7	0,14
Number of seeds per flower	0,01	0,02	0,6	0,01	0,02	0,02	0,25	0,01	0,28	< 0,001***

*, ***: significant at $P < 0.05$ and < 0.001 , respectively.

Table 5: Correlation of Pearson (R^2) between phenotypic characters (plant height, number of capitula per plant, number of flowers per capitulum, flower volume and number of seeds per capitulum) measured under the self-fertilization with pollinators condition for the second generation.

Variable	Plant height (cm)	Number of capitula per plant	Number of flowers per capitulum	Flowers volume (mm ³)	Number of seeds per flower
Plant height (cm)	1	0.31***	0.09*	0.004	0.01
Number of capitula per plant		1	0.002	-0.007	-0.02
Number of flowers per capitulum			1	-0.25***	-0.04
Flowers volume (mm ³)				1	0.000
Number of seeds per flower					1

*, **, ***: significant at $P < 0.05$, < 0.01 and < 0.001 , respectively.

4) DISCUSSION

The mating system of the majority of plants tested (88%) in this study was strict self-incompatibility (SI). Though some plants self-fertilized when in the presence of pollinators, we did not observe any autonomous pollination in the absence of a pollinator. This result fits well with the structure of the flower of *C. cyanus*: first, large, blue-colored sterile florets are a signal attracting foraging insects; second, the capitulum provides a platform allowing easy insect visit; third, the style is equipped with a brush that moves within the anther-forming tube at every contact with insect and brings up pollen grains at each movement, thus making available fresh pollen to pollinators. Without insect, there is no style movement, so that little pollen is released and self-pollination is impossible even if there were no self-incompatibility.

The number of seeds produced per flower in both the paired outcrossing trials and the trials that included individual plants self-pollinated by houseflies was lower than that observed in the field and in large cage experiments (about 0.26 seed per flower against 0.57 on average under multi-pollination conditions). This result was probably caused by the limited paternal choice. Plants of the outcrossing group had fewer capitula per plant than plants in the fly-pollinated self-fertilization group, probably because of competition for resources within a pot. The frequency of plants capable of self-fertilizing and the number of self-fertilized seeds per flower did not differ between the two regions: Burgundy and Poitou-Charentes. In

contrast to the predictions generated by a previously developed theory (Charlesworth & Charlesworth, 1979; Porcher & Lande, 2005) we did not observe the spread of self-compatibility (SC) in the small and/or isolated populations of Poitou-Charentes. It is likely that the Poitou-Charentes populations are less isolated than expected, and that there is adequate pollen migration to maintain S-allele diversity. Alternatively, perhaps *C. cyanus* populations are genetically isolated, but this isolation does not necessarily causes the spread of self-compatibility, as predicted. Studies of other Asteraceae species have demonstrated that species in decline can maintain strong SI, even when this SI has caused reproductive failure (*Centaurea corymbosa*, Colas et al., 1997; *Hymenoxis acaulis*, DeMauro, 1993). Moreover, plant populations can persist for several years through germination of seeds contained in the soil seed-bank, which results in the maintenance and generation of genetic diversity for several generations after population size has become too small to be viable (Turner et al., 1996). *C. cyanus* seeds can persist for at least four years in the soil seed-bank with plowing, though only 1% of the initial stock eventually germinates (Chadoeuf et al., 1984). When buried at 30 cm under the soil surface, and without plowing, 10% of the initial stock remains viable after 2.5 years (unpublished data). An isolated SI population will ultimately become extinct without the spread of SC. Only flexibility of the mating system would allow a plant population to be maintained and to shift from outcrossing to selfing in response to population disturbance (Busch, 2005). In order to permit this flexibility, there must be low rates of selfing within a population. In natural populations, the level of incompatibility can vary from strictly SI to pseudo self-incompatible (PSC) with variation in the strength of SI between and within populations (Ferrer & Good-Avila, 2006).

Some self-fertilization has been observed in several predominantly SI plants species, demonstrating that SI is often partially effective (Ferrer et al., 2009). We found a great deal of variation in the strength of SI among individuals in the self-fertilization group in our study. Seven plants (4 from Poitou-Charentes and 3 from Burgundy) produced significantly more seeds than the others under these self-fertilization conditions. These seven plants produced almost as many seeds as those reared under outcrossing conditions and were at least probably PSC. In addition, one descendant raised under fly-pollinated self-fertilization condition produced more seeds than plants in outcrossed condition. This individual could be SC. This result is interesting because this plant originated from the most isolated population of Poitou-Charentes. It has been possible that SC is spreading in this population, but that not enough plants have been tested to support this possibility.

Generally, the PSC state is considered to be a transitional state between SI and SC (Levin, 1996), but the role of PSC in evolution has never been demonstrated. A meta-analysis revealed that 145 of 345 plant species surveyed have a mixed mating system (Goodwillie et al., 2005). Under some ecological conditions, such as pollen and seed discounting, mixed mating systems seem to be evolutionarily stable (Johnston, 1998). In insect-pollinated species, pollen discounting is strongly connected to changes in pollinator behavior and population density (England et al., 2001). In our study, autonomous pollination was not observed in *C. cyanus*; therefore, this species cannot produce seeds in the absence of pollinators to ensure reproduction. The presence of PSC within a single population would only maintain that population when S-allele diversity decreases, as in small and/or isolated populations, in the presence of pollinators. However, it is often true that pollinator visitation is also reduced in small populations because low flowering plant density is less attractive to pollinators (Waites & Agren, 2004). For instance, in *Primula merrilliana*, Shao et al (2008) observed fewer visits in small populations than in large populations. In *C. cyanus*, the number of seeds produced per flower was significantly lower in two presumably isolated populations than in connected populations in Burgundy.

As *C. cyanus* depends on pollinator presence for reproductive success, both for outcrossing or self-pollination, the attractiveness of a plant to pollinators should have important consequences for seed production. If pollinators were not required for selfing, the attractiveness of PSC individuals would be expected to decrease (Lloyd, 1987). The allocation of resources to attractiveness was measured here by capitulum number, flower density, and flower volume (Goodwillie et al., 2010). No attractiveness differences were observed between Burgundy and Poitou-Charentes populations. This suggests that small and/or isolated populations of Poitou-Charentes maintained the same attractiveness as the large populations of Burgundy. By contrast, reproductive success and character values varied according to an individual's ability to produce seeds under self-pollination. Plants from the G1 group had character values higher than plants from the other groups. These plants had significantly more flowers per capitulum, increasing the opportunities to produce seeds. This explains the intermediate G1 values relative to G0 and G2. In natural habitats, floral display has been shown to influence the rate of pollinator visitation (Kennedy & Elle, 2008). In cases of low pollinator presence, plants with a high number of flowers and capitula can reduce the possibility of a limitation in foreign pollen and thereby increases chances of reproduction (López-Villavicencio et al., 2005). The number of capitula per plant was lower for the PSC plants, demonstrating a reduced attractiveness in these plants. This result could be explained

by a decrease in fitness caused by an increase in homozygosity. For both generations in the fly-pollinated self-fertilization group, seed number was not correlated with any phenotypic characters, suggesting that attractiveness to pollinators does not affect the incidence of PSC. This result is consistent with the fact that *C. cyanus* cannot realize autonomous pollination. Indeed, theories predict a decreased investment in floral display in cases of autonomous pollination. If pollinators are not necessary for fertilization, floral displays that are attractive to pollinators are unnecessary. By contrast, if pollinators are necessary for self-fertilization, the floral display structure should be equivalent to that of outcrossers (Brunet, 1992). In the first generation, plant height, the total number of capitula per plant, flower volume and the number of flower per capitulum were positively correlated with all other phenotypic characters (except seed set). In the second generation of self-fertilization, plant height was again positively correlated with all other characters measured except flower volume, but no other correlation was found. This result for the second generation of self-fertilization and for the PSC plants within the first generation could be explained by inbreeding depression (ID) in some plants. ID is defined as the reduced opportunity for self-fertilized ovule to give rise to descendant that will survive compared to outcrossed ovules (Charlesworth & Charlesworth, 1979). This phenomenon is often assumed to predict mating system evolution. Indeed, selfing increases homozygosity, exposing deleterious alleles to selection and resulting in increases ID that in turn prevents the spread of SC. Coincidentally, plants from isolated Poitou-Charentes populations seem to be less competitive than plants from more frequent and abundant Burgundy populations when grown by pair in pots. The ID measure of selfing individuals could confirm that this consequence is critical for the mating system evolution of *C. cyanus* (Bellanger et al., in preparation).

The study of reproductive success is fundamental for developing conservation strategies. These studies can also explain why a species has become rare or endangered. Population size is one factor that limits reproductive success by changing ecological and genetic processes (Ehlers et al., 2002). For the populations of *C. cyanus* in the west of France, presence of PSC within predominantly SI populations could result in the maintenance of the smallest and most isolated populations, provided that pollinators are available to fertilize plants. Pollinators of *C. cyanus* are generalist species composed of 98% Hymenoptera (personal observations), which could be an advantage that increases the chance that a plant will be fertilized in a small and/or isolated populations, unlike in small and/or isolated populations of plants that have specialist animal pollinators.

Acknowledgements

This work has been made possible through a fellowship to SB by the Ministry of Agriculture (DGER) and the Council of the Burgundy Region. We thank all the technicians and the PhD students who helped to place the pollen-proof bags and to measure the capitula.

5) References

- Abbott, R.J., Forbes, D.G., 1993. Outcrossing rate and self-incompatibility in the colonising species *Senecio squalidus*. *Heredity* 71, 155-159.
- Bellanger, S., Guillemin, J.P., Bretagnolle, V., Darmency, H., 2011. *Centaurea cyanus* L. as a biological indicator of segetal richness in agricultural ecosystems. Submitted .
- Baron, Y., 1989. Elément pour un bilan de la flore messicole en Poitou-Charentes. *Plantes sauvages menacées. Actes. Brest.* 79-86.
- Bond, W.J., 1994. Do mutualisms matter? Assessing the impact of pollinator and disperser disruption on plant extinction. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 344, 83-90.
- Brunet, J., 1992. Sex allocation in hermaphroditic plants. *Trends Ecol. Evol.* 7, 79-84.
- Busch, J., 2005. Inbreeding depression in self-incompatible and self-compatible populations of *Leavenworthia alabamica*. *Heredity* 94, 159-165.
- Busch, J.W., Schoen, D.J., 2008. The evolution of self-incompatibility when mates are limiting. *Trends Plant Sci.* 13, 128-136.
- Byers, D.L., Meagher, T.R., 1992. Mate availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity* 68, 353-359.
- Chadoeuf, R., Barralis, G., Lonchamp, J.P., 1984. Evolution of the seed potential of annual weeds in cultivated soil. *Comptes rendus du 7eme colloque international sur l'écologie, la biologie et la systématique des mauvaises herbes.* 63-70.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1979. Evolution and breakdown of S-allele systems. *Heredity* 43, 41-55.
- Colas, B., Olivieri, I., Riba, M., 1997. *Centaurea corymbosa*, a cliff-dwelling species tottering on the brink of extinction: a demographic and genetic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3471-3476.
- DeMauro, M.M., 1993. Relationship of breeding system to rarity in the lakeside daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). *Conserv. Biol.* 7, 542-550.
- de Nettancourt, D., 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag, Berlin.
- Dole, J., Ritland, K., 1993. Inbreeding depression in two *Mimulus* taxa measured by multigenerational changes in the inbreeding coefficient. *Evolution*, 47, 361-373.
- Ehlers, B.K., Olesen, J.M., Agren, J., 2002. Floral morphology and reproductive success in the orchid *Epipactis helleborine*: regional and local across-habitat variation. *Plant Syst. Evol.* 236, 19-32.

- England, P.R., Benyon, F., Ayre D.J., Whelan, R.J., 2001. A molecular genetic assessment of mating-system variation in a naturally bird-pollinated shrub: contributions from birds and introduced honeybees. *Conserv. Biol.* 15, 1645-1655.
- Ferrer, M.M., Good-Avila, S.V., 2007. Macrophylogenetic analyses of the gain and loss of self-incompatibility in the Asteraceae. *New Phytol.* 173, 401-414.
- Ferrer, M.M., Good-Avila, S.V., Montana, C., Dominguez, C.A., Eguiarte, L.E., 2009. Effect of variation in self-incompatibility on pollen limitation and inbreeding depression in *Flourensia cernua* (Asteraceae) scrubs of contrasting density. *Ann. Bot.* 103, 1077-1089.
- Gargano, D., Gullo, T., Bernardo, L., 2009. Do inefficient selfing and inbreeding depression challenge the persistence of the rare *Dianthus guliae Janka* (Caryophyllaceae)? Influence of reproductive traits on a plant's proneness to extinction. *Plant Species Biol.* 24, 69-76.
- Glemin, S., Gaude, T., Guillemin, M., Lourmas, M., Olivieri, I., Mignot, A., 2005. Balancing selection in the wild: Testing population genetics theory of self-incompatibility in the rare species *Brassica insularis*. *Genetics* 171, 279-289.
- Goodwillie, C., Kalisz, S., Eckert, C., 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Ann. Rev. Ecol. Evol. S.* 36, 47-79.
- Goodwillie, C., Sargent, R.D., Eckert, C.G., Elle, E., Geber, M.A., Johnston, M.O., Kalisz, S., Moeller, D.A., Ree, R.H., Vallejo-Marin, M., Winn, A.A., 2010. Correlated evolution of mating system and floral display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New Phytol* 185, 311-21.
- Harding, J., Barnes, K., 1977. Genetics of *Lupinus*. 10. Genetic variability, heterozygosity and outcrossing in colonial populations of *Lupinus succulentus*. *Evolution* 31, 247-255.
- Igic, B., Bohs, L., Kohn, J., 2006. Ancient polymorphism reveals unidirectional breeding system shifts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 1359-1363.
- Johnston, M.O., 1998. Evolution of intermediate selfing rates in plants: pollination ecology versus deleterious mutations. *Genetica* 102/103, 267-278.
- Kennedy, B.F., Elle, E., 2008. The inbreeding depression cost of selfing: importance of flower size and population size in *Collinsia parviflora* (Veronicaceae). *Am. J. Bot.* 95, 1596-1605.
- Kowyama, Y., Takahasi, H., Muraoka, K., Tani, T., Hara, K., Shiotani, I., 1994. Number, frequency and dominance relationships of S-alleles in diploid *Ipomoea trifida*. *Heredity* 73, 275-283.
- Kubota, S., Kameyama, Y., Hirao, A.S., Ohara, M., 2008. Adaptive significance of self-fertilization in a hermaphroditic perennial, *Trillium camschatcense* (Melanthiaceae). *Am. J. Bot.* 95, 482-489.
- Kubota, S., Ohara, M., 2009. The evolution of self-compatible and self-incompatible populations in a hermaphroditic perennial, *Trillium camschatcense* (Melanthiaceae). *J. Plant Res.* 122, 497-507.
- Llaurens, V., Billiard, S., Castric, V., Vekemans, X., 2009. Evolution of dominance in sporophytic self-incompatibility systems: i. genetic load and coevolution of levels of dominance in pollen and pistil. *Evolution* 63, 2427-243.

- Levin, D.A., 1996. The evolutionary significance of pseudo-self-fertility. *Am. Nat.* 148, 321-332.
- Lloyd, D.G., 1987. Allocations to pollen, seeds and pollination mechanisms in self-fertilizing plants. *Funct. Ecol.* 1, 83-89.
- Lopez-Villavicencio, M., Genton, B.J., Porcher, E., Shykoff, J.A., 2005. The role of pollination level on the reproduction of females and hermaphrodites in the gynodioecious plant *Gypsophila repens* (Caryophyllaceae). *Am. J. Bot.* 92, 1995-2002.
- Porcher, E., Lande, R., 2005. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. *J. Evolutionary Biol.* 18, 497-508.
- Porcher, E., Lande, R., 2005. Loss of gametophytic self-incompatibility with evolution of inbreeding depression. *Evolution* 59, 46-60.
- Reinartz, J.A., Les, D.H., 1994. Bottleneck-induced dissolution of self-incompatibility and breeding system consequences in *Aster Furcatus* (Asteraceae). *Am. J. Bot.* 81, 446-455.
- Shao, J.W., Zhang, X.P., Zhang, Z.X., Zhu, G.P., 2008. Effects of population size on reproductive success of the endangered and endemic species *Primula merrilliana*. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1151-1160.
- Steinbachs, J. E., Holsinger, K. E., 2002. S-RNase-mediated gametophytic self-incompatibility is ancestral in Eudicots. *Mol. Biol. Evol.* 19, 825-829.
- Sutcliffe, O.L., Kay, Q.O.N., 2000. Changes in the arable flora of central southern England since the 1960s. *Biol. Conserv.* 93, 1-8.
- Takayama, S., Isogai, A., 2005. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 467-489.
- Turner, C.E., Piper, G.L., Coombs, E.M., 1996. *Chaetorellia australis* (Diptera: Tephritidae) for biological control of yellow starthistle, *Centaurea solstitialis* (Compositae), in the western USA: Establishment and seed destruction. *Bull. Entomol. Res.* 86, 177-182.
- Waites, A.R., Agren, J., 2004. Pollinator visitation, stigmatic pollen loads and among-population variation in seed set in *Lythrum salicaria*. *J. Ecol.* 92, 512-526.
- Willi, Y., 2009. Evolution towards self-compatibility when mates are limited. *J. Evolution Biol.* 22, 1967-1973.

II) CONSEQUENCES OF INBREEDING ON *CENTAUREA CYANUS* L., A SELF-INCOMPATIBLE SEGETAL SPECIES, RARE IN THE WEST OF FRANCE

Bellanger S.¹, Guillemin J.P.², Darmency H.¹

¹ INRA, UMR 1210 BGA, 17 rue Sully, BP 86510, 21065, F-Dijon, France

² AgroSup Dijon, UMR 1210 BGA, 26 rue Dr Petitjean, BP 87999, 21079, F-Dijon, France

1) INTRODUCTION

About half of all Angiosperms reproduce strictly by outcrossing enforced by a self-incompatibility system (SI) (Igic & Kohn, 2006). SI prevents self-fertilization and inbreeding in Angiosperms (Porcher & Lande, 2005; Willi, 2009) through the ability to recognize and reject pollen that has at least one self-incompatibility allele (S-allele) in common with the maternal plant (Takayama & Isogai, 2005). SI enforces outcrossing and promotes gene exchange, but small or isolated populations may have reduced S-allele diversity, which in turn would reduce the probability of finding compatible mates (Glémin et al., 2005; Busch & Schoen, 2008). The result would be an increased risk of local extinction without a change in the dominant mating system. If the mating system does not evolve, the species becomes endangered, as for *Hymenoxix acaulis* and *Centaurea corymbosa* (Demauro, 1993; Colas et al., 1997). The SI mating system can evolve toward self-compatibility (SC) as for some populations of *Linanthus bicolor* (Kennedy & Elle, 2008). In this case, the fitness of self-fertilized and outcrossed populations is the same but the selfing type is advantaged for genes transmission. Indeed, an outcrosser will transmit a quarter of the parent's genes while a selfer will transmit half of these genes to the progeny (Goodwillie, 2000). Other factors can also lead to a complete evolution toward SC as a reduction of inbreeding depression, a decrease of S-alleles diversity or a limitation in outcrossed pollen in plant populations (Porcher & Lande, 2005). The SI is often partially effective in response to population disturbance (Stephenson et al., 2000; Kalisz et al., 2004), as for the SI *Crepis sancta* (Asteraceae) (Cheptou et al., 2002). This phenomenon is called flexibility of the mating system and requires the preexisting SC mutations. Its mixed mating system may be evolutionary stable or can represent a transitory state toward complete SC. In order to maintain the mixed mating system, no pollen limitation should occur and the fitness of self-fertilized plants must be lower than that of the outcrossed ones, otherwise an evolution toward SC could occur (Porcher & Lande, 2005). In this case, plants are called pseudo self-compatible (PSC). Evolution of the mating system within SI plants seems relatively common as shown by Ferrer & Good-Avila (2007). These authors found a diversity of the mating system within the Asteraceae family. Indeed, among 571 species, the majority was SI (63%) but a significant proportion of SC (27%) and PSC (10%) were found.

Small and/or isolated populations are more vulnerable to environmental and demographic stochasticity causing an increased risk of extinction rate. The presence of SC or PSC plants is required in order to avoid the extinction in small and/or isolated populations

(Porcher & Lande, 2005). Plants of these small and/or isolated populations may self-fertilize and mate with close relatives more often than SI plants do, resulting in an increased of inbreeding (Keller & Waller, 2002) which can cause inbreeding depression (ID). ID is defined as the decrease of the mean fitness of self-fertilized *versus* outcrossed plants. It appears with the increase of homozygosity (inbreeding) and is caused by a combination of deleterious and/or lethal mutations (Charlesworth & Charlesworth, 1979). Inbreeding and genetic drift can cause a decline in individual fitness (Keller & Waller 2002; Reed, 2005). In many species, a positive correlation between fitness and genetic diversity (heterozygosity) has been observed (Pluess & Stocklin, 2004; de Vere et al., 2009). ID plays a major role for the evolution of the mating strategies. Indeed, a high ID will allow the maintenance of outcrossing. Conversely, when ID is low, self-fertilization is expected to be selected and SC alleles to spread within a population (Goodwillie et al., 2005). This phenomenon is considered as an important factor in the conservation of endangered species (Frankham et al., 2002) because of its impact on the dynamics and the extinction risk of small and/or isolated populations. ID can vary across the life cycle and it can be expressed at all stages (Fischer et al., 2003) even if deleterious and lethal mutations are generally expressed early in the life cycle. Identifying when the life stage is the most affected by ID could help to understand populations' dynamics.

Centaurea cyanus L., cornflower, is a SI, insect-pollinated annual Asteraceae species that exclusively depends on arable land (Bellanger et al., 2011). Cornflower is actually in decline western Europe (Sutcliffe & Kay, 2000), including the Poitou-Charentes region in France (Baron, 1989). In this region, populations are small and/or isolated and mate choice is likely limited compared to populations of eastern France (Burgundy region) where populations remain stable and common.

A previous study has shown that PSC individuals can coexist with SI plants in the populations whatever the population size or the isolation level (Bellanger et al., in preparation). Presence of PSC within predominantly SI populations could result in the maintenance of the smallest and most isolated populations when S-alleles diversity decreases. However, this alternative may cause an increase of inbreeding because of selfing and mating with close relatives. Consequently, the increase of inbreeding could cause ID, which has been evoked in our previous work by a lower capitula production of PSC plants in competition with a normal cornflower counterpart. In order to better understand the impact of inbreeding in *C. cyanus* populations, comparing the performance of outcrossed and self-pollinated progenies is required. The effect of different levels of inbreeding on the fitness was measured

at five life stages as proposed by Husband & Schemske (1995): seed, germination, juvenile survival, vegetative growth and fecundity. The components of the trait value and the value of the inbreeding depression were studied with SI and PSC plants representing three levels of the inbreeding coefficient: $F=0$ (i.e. seeds from outcrosses); $F=0.5$ (i.e. seeds from one self-fertilization event); $F=0.75$ (i.e. seeds from two consecutive self-fertilization events). The rate of homozygosity for each inbreeding coefficient was determined using microsatellite diversity. A comparison of the fitness according to the region of origin of the plants was made in order to determine if an adaptation process has occurred in the populations studied. These data could serve to anticipate the evolution of the mating system of cornflower toward SC or not, and the possibility of maintaining small and/or isolated populations though cornflower is a weed and, as such, controlled by weed management practices.

2) MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

The seeds used in this study were produced by individual plants (for self-fertilized seeds) or pairs of plants (for outcrossed seeds) isolated in pollen-proof cages containing houseflies for the reproduction. Three coefficients of inbreeding (F) were tested: $F=0$ (i.e. seeds from outcrosses between plants from two different regions of origin: F_0), $F=0.5$ (i.e. seeds from one self-fertilization event: $F_{0.5}$) and $F=0.75$ (i.e. seeds from two consecutive self-fertilization events: $F_{0.75}$).

F_0 was represented by six unrelated SI families with 20 seeds each. For $F_{0.5}$, seven families were tested with 20 seeds each: four belong to a plant identified as PSC (i.e. producing more than 0.06 seed per flower) and three were identified as SI (i.e. producing less than 0.01 seed per flower, see Bellanger et al., in preparation). Among these seven families, three were from the region of Poitou-Charentes and four were from the region of Burgundy. Plants $F_{0.75}$ were the progenies of the seven self-fertilized $F_{0.5}$ families; 25 seeds were used for each family (Figure 1).

The seeds were set to germinate in Caubère dishes with pleated strip paper for germination (used to identified individuals) in a growth chamber at 15-25°C (night-day) and a photoperiod of 12h/12h. Post-germination components of fitness were measured in an insect-proof greenhouse. Newly germinated seedlings were transplanted into 0.3L pots of loam soil in a frost-free greenhouse (10°C) during two months with natural photoperiod in order to mimic the overwintering period. Then, plants were transplanted in 5L pots of loam soil and

placed at 18-25°C (night-day) under a photoperiod of 8h-16h to initiate flowering. Once all plants were ready to bloom, weekly, 2L of maggots were placed in order to ensure continuous presence of houseflies for the pollination. A previous study warranted the efficiency of houseflies as pollinators of cornflower (Bellanger et al., in preparation).

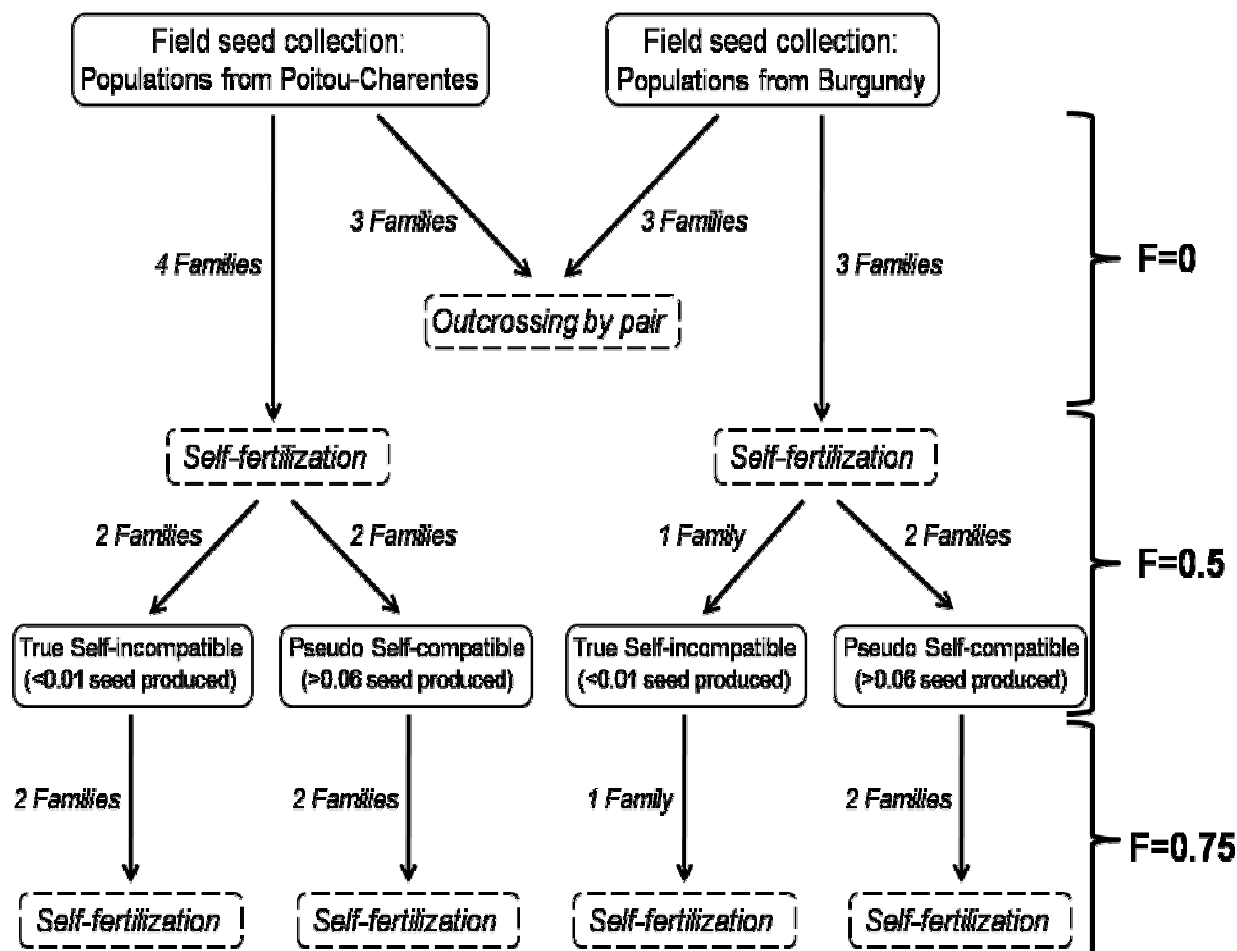


Figure 1: Origin of the plants material used in the experiment. Six different F₀ families were produced in outcrossed condition. F_{0.5} materials were obtained after self-fertilization: three unrelated families (i.e. one from Burgundy and two from Poitou-Charentes) were classified as SI because they produced less than 0.01 seed per flower; four other families (i.e. two from each region) were classified as PSC because they produced more than 0.06 seed per flower.

2.2 Trait estimation

The traits measured were selected according to the method described by Husband & Schemke (1995). The authors suggested measuring only the characters at the beginning and the end of the life cycle. The plant's fitness was measured at five stages of life history: seed, germination, juvenile survival, vegetative growth and fecundity.

- Seed: up to 20 seeds per family for F₀ and F_{0.5} and 25 seeds for F_{0.75} were individually weighed.

- Germination: the germination ratio was determined per family after three weeks in Caubère dishes with pleated strip paper in the growth chamber.
- Juvenile survival: it corresponded to the ratio of plants reaching flowering (number of plants reaching flowering by the number of seeds germinating) in a family, three months after germination.
- Vegetative growth: plant height and dry weight were determined for all plants four months after germination.
- Fecundity: the measurements were performed four months after germination. The number of capitula per plant was counted for all individuals. Twenty capitula per plant were bagged before seed shedding. The volume of each of these 20 capitula was calculated as $V = \pi \cdot R^2 \cdot H$, where R is the diameter/2 and H is the height of the capitulum. The number of unfertilized flowers, number of seeds aborted (fertilized flowers that aborted during its development) and number of seeds produced (i.e. supposed to be viable) were counted: their sum represented the total number of flowers per capitulum. The number of seeds produced per flower was calculated as the ratio of the number of seeds by the total number of flowers per capitulum. The mean flower volume was calculated as the ratio of the capitulum volume by the total number of flowers per capitulum. The progeny seed weight was estimated from 100 randomly selected seeds per plant.

Some families from $F_{0.75}$ inbreeding coefficient had a complete germination failure and were excluded from post-germination trait estimation.

2.3 Calculated indexes

The inbreeding depression was determined depending on the inbreeding coefficient at the five stages of life history: seed, germination, juvenile survival, vegetative growth and fecundity. ID was calculated with the formula $\delta = 1 - W_s/W_o$ where W_s and W_o were the mean trait values of selfed and outcrossed plants, respectively. The cumulative fitness index proposed by Goodwillie (2000) was used to take into account all the stages of the plants life history. One of the measured traits at each stage of life history has been selected. At the fecundity stage, the ratio of seeds produced per flower was selected because it seemed the most relevant trait. At the vegetative growth stage, the cumulative fitness remains unchanged whatever the trait used. Then, the formula used was: $W_c = \text{mean initial seed weight} \times \text{germination ratio} \times \text{juvenile survival} \times \text{plant height} \times \text{the ratio of seeds produced per flower}$.

2.4 DNA analysis (sampling, extraction and genotyping)

DNA was extracted from 50 mg of young leaf of every plant, using the kit Quiagen Biosprint 96. Ten microsatellite loci (i.e. cencya02, cencya03, cencya04, cencya07, cencya15, cencya16, cencya17, cencya19, cencya20 and cencya24), described elsewhere (Bellanger et al, in preparation), were screened to determine the variation of the homozygosity levels depending on the inbreeding coefficient. The products were amplified by multiplex PCR and were genotyped using 3730XL sequencer (Plateforme de Génomique Gentyane, INRA, Clermont-Ferrand, France). The allele sizes were analyzed with Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems). The parameters of genetic diversity including the Hardy-Weinberg equilibrium (HW), the unbiased expected heterozygosity (i.e. $H_e = (2N / (2N-1)) * H_o$), the observed heterozygosity (i.e. $H_o = \text{number of heterozygous} / N$, with $N = \text{number total of observations}$), and the number of alleles (N_a) per level of inbreeding depression were obtained using GenAlex 6.4 (Peakall & Smouse, 2006).

2.5 Data analysis

For the ratios of germination and juvenile survival, the comparisons among the three F groups and the regions of origin were made using the family trait values. For the others traits, the comparisons were made using the individual trait values. The type of analysis was depending on the sample normality (test of Shapiro-Wilk and Anderson-Darling). If the data follow a Normal distribution, the mean values were compared using a mixed-nested-model ANOVA and Tuckey test. By contrast, if they didn't, the data were Box Cox transformed before analysis to normalize the residuals. However, the transformation was not always sufficient to normalize the residuals. In this case, the mean values were compared using a Kruskal-Wallis test and Dunn test. The nested ANOVA model included the inbreeding coefficient (F) and the family within inbreeding coefficient was made with REML (Restricted Maximum Likelihood) method; inbreeding coefficient was considered as a fixed factor and the family as a random factor. For the regional effect, the nested ANOVA model was made included the region of origin, the inbreeding coefficient (F) and the region of origin within the inbreeding coefficient with Tuckey test. In this model, group F_0 was not analyzed because plants had mixed regional origin.

A factorial discriminant analysis (FDA) was performed to observe if the families were discriminated according to the inbreeding coefficient. The mean family values were used in order to take into account all the stages measured of the life cycle (i.e. seed, germination,

juvenile survival, vegetative traits and fecundity). A Box test (F of Fisher asymptotic approximation) was made to confirm that the covariance matrices were different for the three inbreeding coefficient groups. All statistics were performed with XLSTAT 2010 software. Results were considered significant at $\alpha=0.05$.

3) RESULTS

Initially, of the 405 seeds weighted and set to germinate (i.e. 130 seeds from F_0 ; 132 from $F_{0.5}$ and 143 from $F_{0.75}$), 231 germinated (i.e. 107 seeds from F_0 ; 95 from $F_{0.5}$ and 29 from $F_{0.75}$) and 214 plants reached flowering (i.e. 103 plants from F_0 ; 86 from $F_{0.5}$ and 25 from $F_{0.75}$). Of the plants which reached flowering, one produced no seed (from $F_{0.5}$). The mean number of seeds produced per flower was 0.57 ± 0.18 .

3.1 Trait values

A family effect for each trait measured was observed at all the stages of life history whatever the inbreeding coefficient (with a value of the test of Z between 1.5 and 2.7 and a *p*-value between 0.01 and 0.03). The region of origin of plants had no impact on the measured traits when the inbreeding coefficient was $F_{0.5}$. For $F_{0.75}$, the region of origin had an impact on the initial seed weight which was heavier for seeds from Poitou-Charentes than those from Burgundy ($p=0.004$). The juvenile survival and the ratio of seeds produced per flower were lower for plants from Poitou-Charentes comparing to those from Burgundy ($p=0.033$ and $p=0.007$ respectively). The others measured traits were not impacted by the region of origin of plants for $F_{0.75}$. Inbreeding effects were detected as follow:

Seed: the initial seed weight was significantly different according to the inbreeding coefficient, with $F_{0.5} > F_0 > F_{0.75}$ (Figure 2.a).

Germination: among the seven $F_{0.75}$ families, two failed to germinate so the ratio of germination ranged from 0 to 0.77. The ratio of germination ranged from 0.27 to 1 for $F_{0.5}$ families, and from 0.65 to 0.90 for F_0 families. The $F_{0.75}$ families had a ratio of germination significantly lower than those of F_0 and $F_{0.5}$ families (Figure 2.b). For the following analysis, seeds which had not germinated will not be considered.

Juvenile survival: no difference of juvenile survival has been observed according to the inbreeding coefficient (Figure 2.c). For the following analysis, plants that have not reached flowering will not be considered.

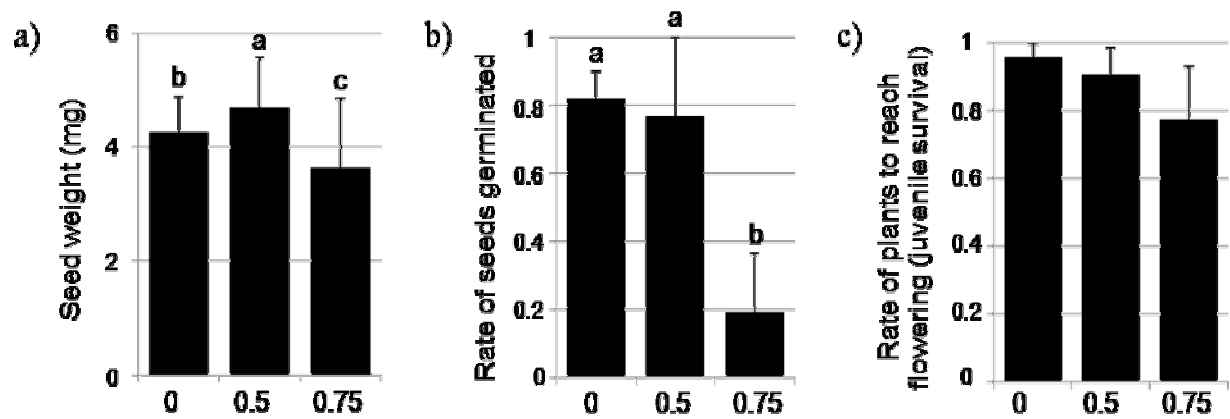


Figure 2: Initial seed weight, germination ratio and juvenile survival ratio of plants according to the inbreeding coefficient (F=0; 0.5; 0.75). ANOVA was used for the juvenile survival and a Kruskal-Wallis test for the initial seed weight and the ratio of seed germination, significant at $\alpha < 0.05$.

Vegetative traits: the F_0 plants were taller and had higher dry weight than $F_{0.5}$ and $F_{0.75}$ individuals (Figures 3.a & b).

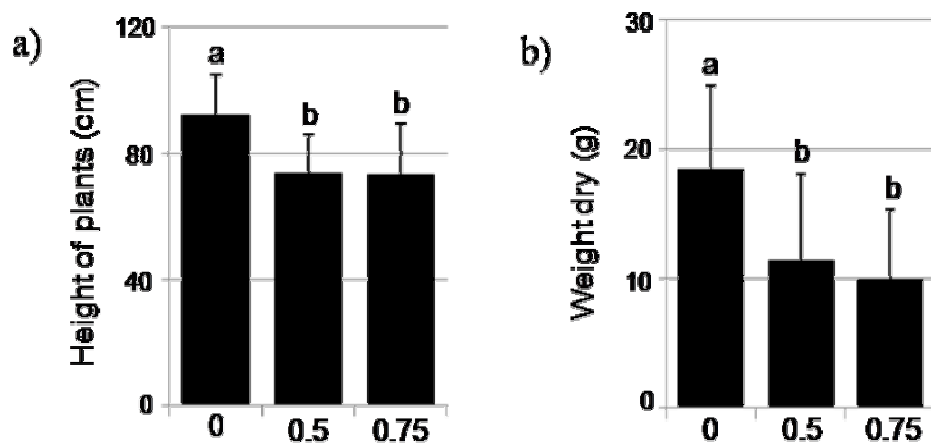


Figure 3: Plant height and dry weight according to the inbreeding coefficient (F=0; 0.5; 0.75). A Kruskal-Wallis test was used for plant height and ANOVA for dry weight (after a Box Cox transformation, $\lambda=0.415$), significant at $\alpha < 0.05$.

Fecondity: the number of capitula per F_0 plant was higher than that of $F_{0.5}$ plants (Figure 4.a). The progeny one-seed weight of $F_{0.75}$ plants was higher than those of the two other F groups (Figure 4.b). The flower volume increased with the inbreeding coefficient while the number of flowers per capitulum decreased (Figure 4.c & d). The ratio of seeds produced and the ratio of aborted seeds per flower were higher for F_0 than for $F_{0.5}$ and $F_{0.75}$ (Figures 4.e & f).

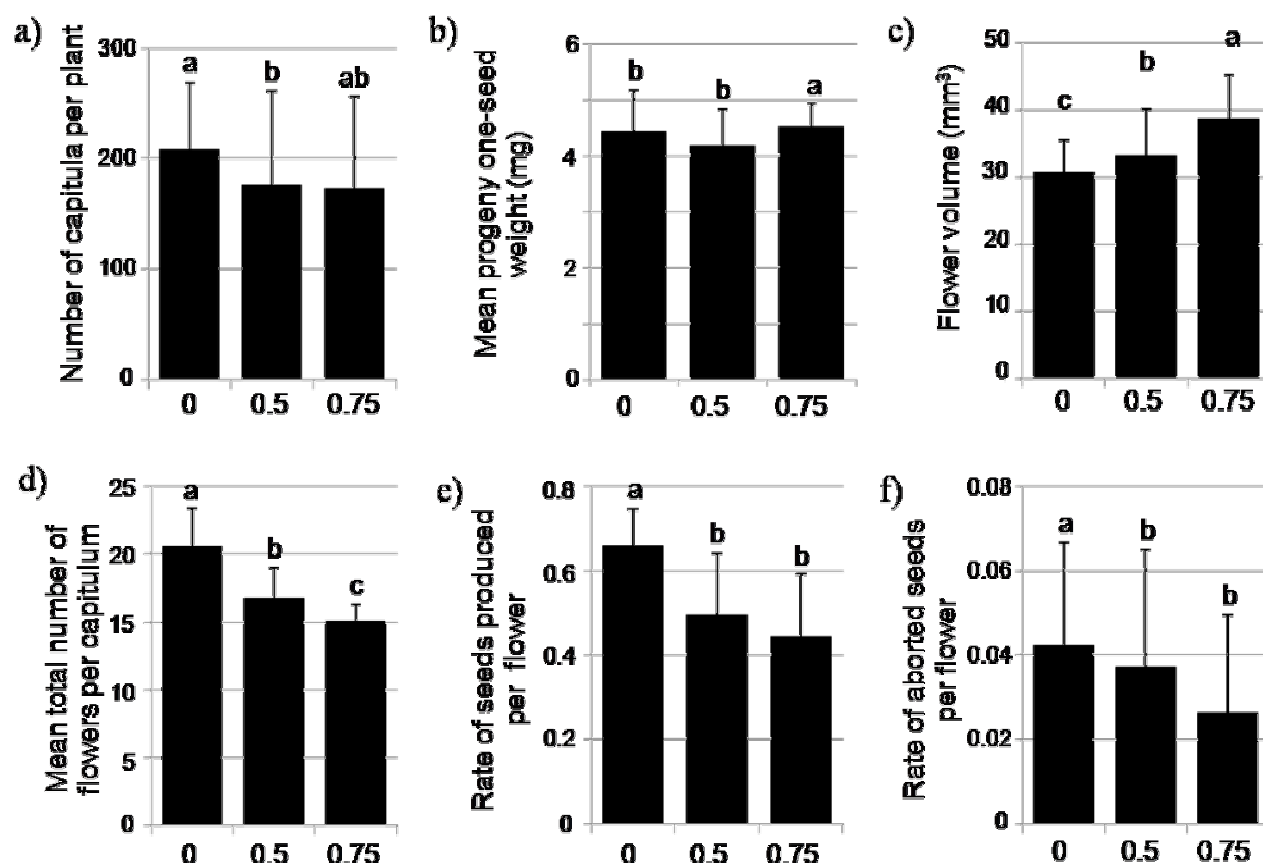


Figure 4: Number of capitula per plant, progeny one-seed weight, flower volume, number of flowers per capitulum, ratio of seeds produced and ratio of aborted seeds per flower according to the inbreeding coefficient (F=0; 0.5; 0.75). ANOVA was used for a) after a Box Cox transformation ($\lambda=0.57$), and a Kruskal-Wallis test for b), c), d), e) and f), significant at $\alpha < 0.05$.

3.2 Calculated indexes

Plants with an inbreeding coefficient of 0.75 had a cumulative fitness significantly lower than plants with F=0 (Figure 5).

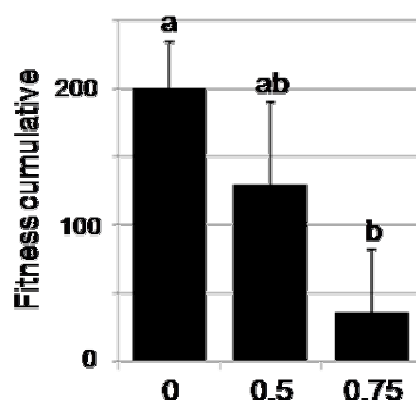


Figure 5: Cumulative fitness according to the inbreeding coefficient (F=0; 0.5; 0.75). The formula used is $W_c = \text{the initial seed weight} \times \text{the germination ratio} \times \text{the juvenile survival} \times \text{the plant height} \times \text{the ratio of seed per flower}$. The test used was a Kruskal-Wallis test, significant at $\alpha < 0.05$.

Two axes of the Factorial discriminant analysis were retained as representing 90.18% and 9.82 % of the variability, i.e. all the variability. The covariance matrices were different for the three inbreeding coefficients (Box test, $p < 0.001$). Germination, juvenile survival, plant height and dry weight, number of capitula, number of flowers per capitulum, number of seeds per flower, number of unfertilized flowers and the flower volume contributed to axe 1. The progeny one-seed weight and the number of aborted seeds per flower contribute to axe 2. Families with $F_{0.75}$ had lower trait values except for the flower volume and the number of unfertilized flowers. By contrast, F_0 families had higher trait values except for the flower volume and the number of unfertilized flowers. $F_{0.5}$ families had intermediate trait values between F_0 and $F_{0.75}$ families (Figure 6).

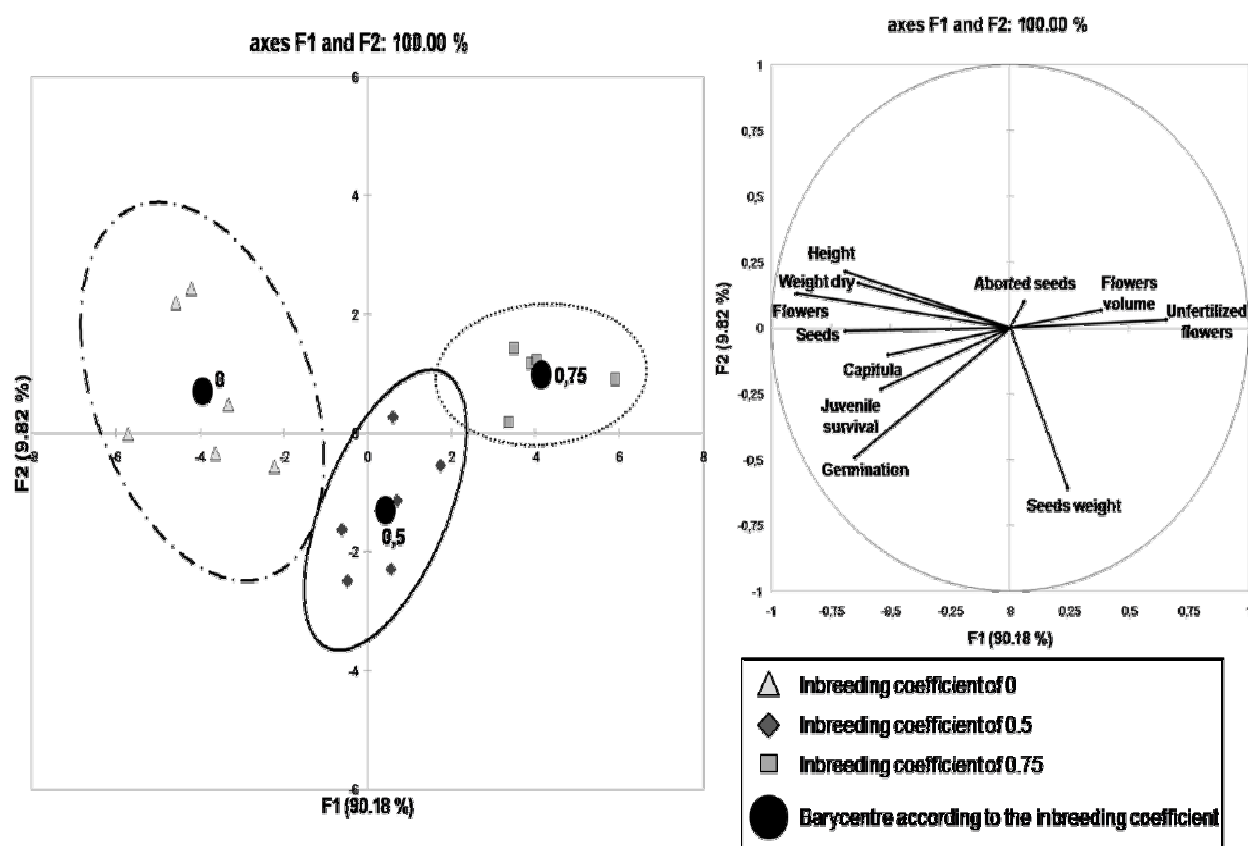


Figure 6: Factorial discriminant analysis (FDA) according to the family and the inbreeding coefficient. The families were discriminated depending on their mean traits values (initial seed weight, germination, juvenile survival, plant height and dry weight, number of capitula, number of flowers per capitulum, number of seeds per flower, number of unfertilized flowers, number of aborted seeds and flower volume). The black circles represent the barycentres of every F group; the dark grey diamonds are the families with $F=0.5$; the grey squares represent the families with $F=0.75$ and the light grey triangles are the families with $F=0$.

Traits were ranged in three groups depending on their values of ID:

$-0.1 < \delta < 0.1$: the characters were not impacted by inbreeding. For $F_{0.5}$ plants, the three first stages of the life cycle, the progeny one-seed weight and the flower volume were not affected by inbreeding. Only the progeny one-seed weight was not affected by inbreeding in $F_{0.75}$ plants (Table 1).

$-0.5 < \delta < -0.1$ or $0.1 < \delta < 0.5$: the characters were moderately impacted by inbreeding. For $F_{0.5}$ plants, all the traits at vegetative stage and the numbers of capitula, total flowers, seeds produced and seeds aborted had a moderate ID value. Concerning $F_{0.75}$ plants, all the characters at the stages of seed, juvenile survival and vegetative growth were moderately impacted by inbreeding: number of capitula, total flowers, seeds produced and seeds aborted (Table 1). The calculation of the cumulative fitness showed a moderate ID for $F_{0.5}$ plants (Table 1).

$-0.5 < \delta$ or $\delta > 0.5$: the characters were strongly impacted by inbreeding. The number of unfertilized flowers of $F_{0.5}$ and $F_{0.75}$ plants was greatly affected by inbreeding as well as the germination ratio for $F_{0.75}$ plants (Table 1). The calculation of the cumulative fitness showed a strong impact of inbreeding on $F_{0.5}$ plants (Table 1).

Only the progeny seed weight was not affected by inbreeding whatever the inbreeding coefficient (Table 1). Otherwise, the impact of inbreeding increased with F. When F value was low, the three first stages of life cycle were not affected by inbreeding, and only the vegetative and fecundity stages were moderately impacted except for the character number of unfertilized flowers which was strongly affected. The cumulative fitness also showed a moderate ID. When F value was high, all the stages were at least moderately impacted by inbreeding, while the germination stage, the number of unfertilized flowers and the cumulative fitness were strongly affected (Table 1).

Table 1: Mean inbreeding depression values (δ) according to the inbreeding coefficient ($F=0$; 0.5; 0.75) and the mean fitness of outcrossed (W_o) plants for each character at five different stages of the life history.

STAGES	VARIABLES	W_o	$\delta F_{0.5}$	$\delta F_{0.75}$	$W_o \neq W_s F(0.5)$	$W_o \neq W_s F(0.75)$	$W_{0.5} \neq W_{0.75}$
Seeds	Initial seed weight (mg)	4.25	-0.10	0.15	0.09	0.04*	<0.001***
Germination	Germination ratio	0.82	0.06	0.77	0.70	0.002**	0.006**
Juvenile survival	Juvenile survival	0.96	0.05	0.19	0.70	0.002**	0.005**
Vegetative biomass	Plant height (cm)	92	0.20	0.20	<0.001***	<0.001***	0.83
	Dry weight (g)	18.4	0.39	0.47	<0.001***	<0.001***	0.65
Fecondity	Number of capitula	207	0.15	0.17	<0.001***	0.09	0.81
	Number of flowers	20.5	0.18	0.27	<0.001***	<0.001***	<0.001***
	One-seed weight (mg)	4.43	0.06	-0.02	0.06	0.33	0.005**
	Flower volume (mm ³)	30.6	-0.09	-0.26	0.11	0.001**	0.005**
	Number of seeds	0.66	0.25	0.32	<0.001***	<0.001***	0.19
	Number of aborted seeds	0.04	0.12	0.37	0.07	0.02*	0.14
Fitness cumulative		199.7	0.35	0.82	0.20	0.002**	0.015*

*, **, ***: significant at $p < 0.05$, < 0.01 and < 0.001 , respectively.

3.3 DNA analysis

The number of alleles observed ranged from 6 to 14 alleles with a mean value of 8.5 alleles per locus for F_0 , from 5 to 14 alleles with a mean value of 7 alleles per locus for $F_{0.5}$, and from 3 to 9 alleles with a mean value of 5.3 alleles for $F_{0.75}$ (Table 2). Concerning the heterozygosity observed (H_o), it ranged from 0.02 to 0.57 with a mean value of 0.3 for F_0 plants. H_o ranged from 0.03 to 0.37 with a mean value of 0.15 for $F_{0.5}$ plants, and from 0.03 to 0.27 with a mean value of 0.11 for $F_{0.75}$ plants (Table 2). All the loci departed from Hardy-Weinberg (HW) equilibrium whatever the inbreeding coefficient (with the Bonferroni correction). Only the locus cencya07 for $F_{0.75}$ was at HW equilibrium (Table 2).

Table 2: Mean heterozygosity for each of the ten loci studied by group of inbreeding coefficient (F=0; 0.5; 0.75); with N: the number of observations, Na: the number of alleles observed, Ho: the observed heterozygosity and He: the unbiased expected heterozygosity. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested (df= number of genotype observed -1; Khi²= value of the Khi square test and the p-value) with the Bonferroni correction, significant at $\alpha < 0.05$.

Inbreeding coefficient (F)	Locus	N	Na	Ho	He	Hardy-Weinberg equilibrium		
						df	Khi ²	p-value
0	cencya07	97	6	0.31	0.46	15	57.7	<0.001***
	cencya03	97	8	0.02	0.50	28	574.6	<0.001***
	cencya15	96	12	0.42	0.75	66	264.6	<0.001***
	cencya19	79	7	0.25	0.69	21	247.6	<0.001***
	cencya04	101	8	0.13	0.76	28	492.6	<0.001***
	cencya17	105	8	0.57	0.66	28	87	<0.001***
	cencya20	105	14	0.39	0.89	91	518.1	<0.001***
	cencya02	101	8	0.21	0.69	28	271.4	<0.001***
	cencya16	104	8	0.56	0.62	28	171.9	<0.001***
	cencya24	101	6	0.10	0.72	15	403.6	<0.001***
	Mean	98.6	8.5	0.3	0.68			
0,5	cencya07	66	5	0.20	0.51	10	71.8	<0.001***
	cencya03	64	6	0.03	0.68	15	310	<0.001***
	cencya15	54	7	0.06	0.84	21	290.8	<0.001***
	cencya19	58	7	0.05	0.73	21	265	<0.001***
	cencya04	64	10	0.23	0.76	45	250.5	<0.001***
	cencya17	69	3	0.32	0.61	3	35.8	<0.001***
	cencya20	69	14	0.12	0.80	91	491.4	<0.001***
	cencya02	57	6	0.07	0.41	15	186.6	<0.001***
	cencya16	70	7	0.37	0.71	21	96.6	<0.001***
	cencya24	66	5	0.03	0.62	10	253.5	<0.001***
	Mean	63.7	7	0.15	0.67			
0,75	cencya07	36	3	0.06	0.06	3	0.03	0.9
	cencya03	35	6	0.06	0.65	15	128.7	<0.001***
	cencya15	31	6	0.10	0.75	15	114.8	<0.001***
	cencya19	29	4	0.03	0.67	6	79.7	<0.001***
	cencya04	38	6	0.26	0.64	15	108.3	<0.001***
	cencya17	41	3	0.10	0.51	3	30.9	<0.001***
	cencya20	37	9	0.08	0.78	36	225.4	<0.001***
	cencya02	30	5	0.13	0.53	10	89.5	<0.001***
	cencya16	37	5	0.27	0.54	10	70.2	<0.001***
	cencya24	35	6	0.03	0.62	15	140	<0.001***

Mean	34.9	5.3	0.11	0.57
------	------	-----	------	------

***: significant at $\alpha < 0.001$

The HW disequilibrium was also observed on average over all the loci for each family (Khi-square test= 0.96; df=17 and $p < 0.001$) and for the F groups (Khi-square test= 0.78; df=2 and $p < 0.001$). Moreover, as expected, the increase of the rate of homozygosity was observed with the increase of the inbreeding coefficient ($H_o = -0.24F + 0.28$; $R^2 = 0.24$; $p < 0.01$) (Figure 7). Rough estimate of the fixation index is given by $F = 1 - H_o/H_e$; using the mean data in Table 2, it comes $F = 0.56$, 0.78 and 0.81 for F_0 , $F_{0.5}$ and $F_{0.75}$, respectively. These values effectively increased from F_0 to $F_{0.5}$ and $F_{0.75}$, as expected, but they are much higher than the expected ones calculated according to their paternity scheme, which is due to the pairing of plants for reproduction rather than random mating.

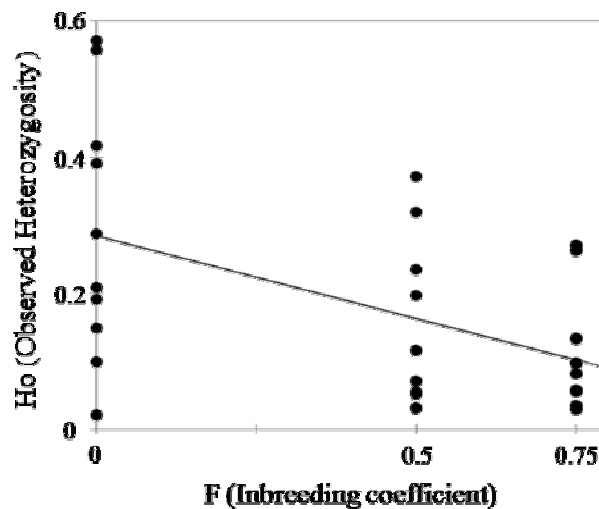


Figure 7: Level of observed heterozygosity per microarray (H_o =number of heterozygous / number total of observation) according to the coefficient of inbreeding. For each inbreeding coefficient, the heterozygosity value for the ten microarrays was showed. Pearson correlation, equation: $y = -0.24x + 0.28$; $R^2 = 0.24$, $p < 0.01$.

4) DISCUSSION

The fitness of *C. cyanus* was affected by inbreeding. The more the inbreeding coefficient (F) of plants increased, the more the fitness decreased and the inbreeding depression (ID) increased. For an intermediate consanguinity value ($F_{0.5}$), ID values ranged from -0.10 to 0.39 and for $F_{0.75}$, ID values ranged from -0.26 to 0.77. The only character unaffected by ID was the seed weight of progenies. As expected, the rate of homozygosity was increased with inbreeding.

At the three first stages of development (i.e. seeds, germination and juvenile survival), plants with $F_{0.5}$ were unaffected by ID unlike plants with $F_{0.75}$ which were moderately impacted. In addition, $F_{0.75}$ were strongly affected at the stage germination ($\delta=0.77$). The seeds with high F were lighter resulting in fewer reserves causing a decreasing of the seed quality and the seed viability. This could explain why the germination ratio and the juvenile survival were affected by ID. These results are consistent with the theoretical expectations that suggest that ID will be mainly expressed in the early stages of life history (Husband & Schemske, 1995) as observed for *Dianthus guliae* in the stage of seeds (i.e. quality/viability) (Gargano et al., 2009). At the vegetative stage, ID was expressed moderately and in the same way whatever the F value. At the fecundity stage, the impact of ID was variable depending on the characters measured. The progeny seed weight was never affected by ID (random mating) whereas the others traits were impacted moderately. The number of flowers and seeds per flower decreased with inbreeding whereas the flower volume increased. Floral display has been shown to influence the rate of pollinators visitation and thereby affect the outcrossing rate (Kennedy & Elle, 2008). The rate of pollinators visitation can change the possibility of a limitation in outcrossed pollen and thereby the outcrossing rate in self-compatible plants (Brunet & Sweet, 2006). A decreasing in flower volume is generally interpreted as an adaptation of resource allocation after a change toward self-fertilization (Goodwillie et al., 2010). This reduction is often observed with inbreeding in populations (Ellmer & Andersson, 2004; Ivey & Carr, 2005; Glaettli & Goudet, 2006) as in *Lupinus bicolor* (Karoly, 1994) and may be an advantage if it facilitates autonomous pollination (i.e. reproductive success) in absence of pollinators. However, in our previous study, autonomous pollination was not observed in *C. cyanus*, i.e. this species cannot produce seeds in absence of pollinators to ensure reproduction (Bellanger et al., in preparation). Natural context and environment are important for the mating strategies and when pollinators are required for selfing, the allocation of resources to attractiveness is important for the seeds production (Goodwillie et al., 2010). The results observed in this study were caused by ID which led a decreasing of attractiveness and of efficiency of fecundation. Moreover, for the same inbreeding coefficient, the mean value of the characters measured was variable between families. In natural populations, a variation of the response to inbreeding among families is often observed. A number of factors can explain those variations as the mutation rate, the inbreeding history, the amount of loci homozygote and heterozygote or the evolution of the population size (Hedrick et al., 1999). A variation of one of these factors within a family can change the ID.

In taking into account all the stages of life history (i.e. cumulative fitness), plants with one self-fertilization ($F_{0.5}$) were moderately affected by ID ($\delta=0.35$) whereas plants with $F_{0.75}$ were strongly impacted by ID ($\delta=0.82$). $F_{0.75}$ Plants were strongly disadvantaged mainly because of the stage germination. This demonstrates that early stages of life history are critical for successful establishment in the natural populations of *C. cyanus* with have a high inbreeding coefficient. The ID level is commonly mentioned to predict the evolution of the mating system (Lande & Schemske, 1985). The models predict that the fixation of the selfing or the outcrossing mating system will depend on the level of ID, respectively <0.5 or >0.5 (Willi, 2009). Thus, in our study, the selection against selfing was small ($\delta<0.5$) after one self-fertilization but when a second self-fertilization occurred the selection against selfing became strong ($\delta>0.5$). This important reduction of the fitness was probably caused by the selection against the lethal and deleterious loci (Castric & Vekemans, 2004; Stone, 2004; Glemin et al., 2005). The self-incompatibility system of *C. cyanus* seems, for the moment, stable. Similarly, in the small population of the rare *Brassica insularis* from Punta Calcina (Corsica), the mating system remained strongly incompatible showing that even in small and/or isolated populations, ID can prevent the spread of self-compatible alleles (Glémin et al., 2005). However, repeated self-fertilization could decrease the level of ID (Husband & Schemske, 1995; Pico et al., 2007) via a purge of the deleterious and the recessive mutations. The purge will increase the average of the population's fitness compared with the populations without an episode of purge (Pujol et al., 2009). After the purge, the mean fitness of population will be close to those without inbreeding. In this case, an evolution of the mating system toward complete self-compatibility could occur. A review on 150 plant species has shown that an evolution toward selfing has occurred in many species under high ID (Goodwillie et al., 2005). This has been observed for *Linanthus bicolor*, a self-compatible species derived from self-incompatibility system. Weak or no significant ID was measured showing a shift toward selfing almost complete (Goodwillie, 2000). It is important to determine the extent of ID and the capacity of populations to purge the deleterious alleles in order to understand in which direction the mating system will evolve (i.e. the maintenance or the breakdown of self-incompatibility system) (Brennan et al., 2005).

In our study, an increasing of the rate of homozygosity was observed with inbreeding, exposing the deleterious alleles to the selection. The mean rate of homozygosity observed for $F_{0.75}$ plants was probably underestimated as no further increasing of the calculated F was observed after $F_{0.5}$. Indeed, on the 143 initial seeds, only 25 had reached flowering. Our results have shown that ID was mainly expressed early in the plant development (i.e.

germination), meaning that the DNA analysis was made only on one plant out of five and probably not with the plants displaying the most lethal and deleterious alleles. The reduction of the fitness, resulting in observed heterozygosity (i.e. the genetic diversity), was showed for several species with different mating systems as *Ipomopsis aggregata* (Heschel & Paige, 1995) *Gentianella germanica* (Fischer & Matthies, 1998), *Silene regia* (Menges, 1991), *Gentiana pneumonanthe* (Oostermeijer et al., 1995), *Gentiana lutea*, *Primula veris* (Kéry et al., 2000), *Ranunculus reptans* (Fischer et al. 2000) and *Cirsium dissectum* (de Vere et al., 2009). The selection against the deleterious alleles should reduce progressively ID by purge (Lande & Schemske, 1985). A deficit of heterozygous was observed for the plants assumed without inbreeding. The presence of null alleles could explain this result. A degree of selfing in natural population is also possible as for *Ziera* species (Armstrong, 2002). The level of inbreeding in the natural populations of those species was depending on the number of flowers visited per plant. In the case of *C. cyanus*, the limitation of outcrossed pollen or the loss of allele-S diversity, in presence of pollinators, could lead a degree of selfing in natural populations. The values of ID observed in our study were probably underestimated compared to natural environment which is more stressful (Armbruster & Reed, 2005; Willi et al., 2007). Indeed, in natural condition the differences in the development and the mortality rate between inbred and outcrossed progenies can be over expressed because of the competition (Mustajärvi et al., 2005). *C. cyanus* is a species with a degree of pseudo self-compatible individuals assumed in natural populations. This pseudo compatibility leads inbreeding in natural populations causing a decreasing of the fitness. Our results have shown that a low inbreeding ($F_{0.5}$) is not impacted by ID whereas, high inbreeding ($F_{0.75}$) is strongly affected by ID. Then, in natural population of *C. cyanus*, it seems that a degree of self-fertilization whatever the size of the population is present and might explain the deficit of heterozygous observed without assumed inbreeding. This inbreeding, if it remains low in natural populations, should not influence the maintenance of populations. By contrast, in small and/or isolated populations the inbreeding coefficient will increase causing an augmentation of the extinction risk. The seeds bank could buffer the effect of the inbreeding in the populations bringing some genetic diversity as in small and/or isolated populations and then, slow down the ID.

5) REFERENCES

Armbruster, P., Reed, D.H., 2005. Inbreeding depression in benign and stressful environments. *Heredity*. 95, 235-242.

- Armstrong, J. A., 2002. *Zieria* (Rutaceae) a systematic and evolutionary study. *Aust. Syst. Bot.* 15, 277-463
- Baron, Y., 1989. Elément pour un bilan de la flore messicole en Poitou-Charentes. *Plantes sauvages menacées. Actes. Brest.* 79-86.
- Bellanger, S., Guillemin, J.P., Bretagnolle, V., Darmency, H., 2011. *Centaurea cyanus* L. as a biological indicator of segetal richness in agricultural ecosystems. Submitted.
- Brennan, A.C., Harris, S.A., Hiscock, S.J., 2005. Modes and rates of selfing and associated inbreeding depression in the self-incompatible plant *Senecio squalidus* (Asteraceae): a successful colonizing species in the British Isles. *New. Phytol.* 168, 475-486.
- Brunet, J., Sweet, H.R., 2006. Impact of insect pollinator group and floral display size on outcrossing rate. *Evolution* 60, 234-246.
- Castric, V., Vekemans, X., 2004. Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Mol. Ecol.* 13, 2873-2889.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1979. Evolution and breakdown of S-allele systems. *Heredity* 43, 41-55.
- Cheptou, P.O., Lepart, J., Escarre, J., 2002. Mating system variation along a successional gradient in the allogamous and colonizing plant *Crepis sancta* (Asteraceae). *J. Evolution. Biol.* 15, 753-762.
- Colas, B., Olivieri, I., Riba, M., 1997. *Centaurea corymbosa*, a cliff-dwelling species tottering on the brink of extinction: a demographic and genetic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3471-3476.
- de Vere, N., Jongejans, E., Plowman, A., Williams, E., 2009. Population size and habitat quality affect genetic diversity and fitness in the clonal herb *Cirsium dissectum*. *Oecologia* 159, 59-68.
- Demauro, M.M., 1993. Relationship of breeding system to rarity in the lakeside daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). *Conserv. Biol.* 7, 542-550.
- Ellmer, M., Andersson S., 2004. Inbreeding depression in *Nigella degenii* (Ranunculaceae): Fitness components compared with morphological and phenological characters. *Int. J. Pl. Sci.* 165, 1055-1061.
- Ferrer, M.M., Good-Avila, S.V., 2007. Macrophylogenetic analyses of the gain and loss of self-incompatibility in the Asteraceae. *New Phytol.* 173, 401-414.
- Fischer, M., Hock, M., Paschke, M., 2003. Low genetic variation reduces cross-compatibility and offspring fitness in populations of a narrow endemic plant with a self-incompatibility system. *Conserv. Genet.* 4, 325-336.
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., van Kleunen, M., Schmid, B., 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *Am. J. Bot.* 87, 1128-1137.
- Fischer, M., Matthies, D. 1998. Effects of population size on performance in the rare plant *Gentianella germanica*. *J. Ecol.* 86, 195-204.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.

- Gargano, D., Gullo, T., Bernardo, L., 2009. Do inefficient selfing and inbreeding depression challenge the persistence of the rare *Dianthus guliae* Janka (Caryophyllaceae)? Influence of reproductive traits on a plant's proneness to extinction. *Plant Species Biol.* 24, 69-76.
- Glaettli, M., Goudet, J., 2006. Variation in the intensity of inbreeding depression among successive life-cycle stages and generations in gynodioecious *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). *J. Evol. Biol.* 19, 1995-2005.
- Glemin, S., Gaude, T., Guillemin, M., Lourmas, M., Olivieri, I., Mignot, A., 2005. Balancing selection in the wild: Testing population genetics theory of self-incompatibility in the rare species *Brassica insularis*. *Genetics*. 171, 279-289.
- Goodwillie, C., 2000. Inbreeding depression and mating systems in two species of *Linanthus* (Polemoniaceae). *Heredity*. 84, 283-293.
- Goodwillie, C., Kalisz, S., Eckert, C., 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Ann. Rev. Ecol. Evol. S.* 36, 47-79.
- Goodwillie, C., Sargent, R.D., Eckert, C.G., Elle, E., Geber, M.A., Johnston, M.O., Kalisz, S., Moeller, D.A., Ree, R.H., Vallejo-Marin, M., Winn, A.A., 2010. Correlated evolution of mating system and floral display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New. Phytol.* 185, 311-21.
- Hedrick, P.W., Savolainen, O., Karkkainen, K., 1999. Factors influencing the extent of inbreeding depression: an example from Scots pine. *Heredity* 82, 441-450.
- Heschel, M.S., Paige, K.N., 1995. Inbreeding depression, environmental stress, and population size variation in scarlet gilia (*Ipomopsis aggregata*). *Conserv. Biol.* 9,126-133.
- Husband, B., Schemske, D., 1995. Magnitude and timing of inbreeding depression in a diploid population of *Epilobium-angustifolium* (Onagraceae). *Heredity* 75, 206-215.
- Igic, B., Bohs, L., Kohn, J., 2006. Ancient polymorphism reveals unidirectional breeding system shifts. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 1359-1363.
- Ivey, C.T., Carr, D.E., 2005. Effects of herbivory and inbreeding on the pollinators and mating system of *Mimulus guttatus* (Phrymaceae). *Am. J. Bot.* 92, 1641-1649.
- Kalisz, S., Vogler, D.W., Hanley, K.M., 2004. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* 430, 884-887.
- Karoly, K., 1994. Inbreeding effects on mating system traits for two species of *Lupinus* (Leguminosae). *Am. J. Bot.* 81, 1538-1544.
- Keller, L.F., Waller, D.M., 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends. Ecol. Evol.* 17, 230-241.
- Kennedy, B.F., Elle, E., 2008. The inbreeding depression cost of selfing: importance of flower size and population size in *Collinsia parviflora* (Veronicaceae). *Am. J. Bot.* 95, 1596-1605.
- Kéry, M., Matthies, D., Spillman, H.H., 2000. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *J. Ecol.* 88, 17-30.
- Lande, R., Schemske, D.W., 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39, 24-40.

- Menges, E.S., 1991. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. *Conserv. Biol.* 5, 158-164.
- Mustajärvi, K., Siikamäki, P., Åkerberg, A., 2005. Inbreeding depression in perennial *Lychnis viscaria* (Caryophyllaceae): effects of population mating history and nutrient availability. *Am. J. Bot.* 92, 1853-1861.
- Oostermeijer, J.G.B., van Eijck, M.W., van Leeuwen, N.C., den Nijs, J.C.M., 1995. Analysis of the relationship between allozyme heterozygosity and fitness in the rare *Gentiana pneumonanthe*. *J. Evol. Biol.* 8, 739-759.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molec. Ecol. Notes.* 6, 288-295.
- Pico, F.X., Mix, C., Ouborg, N.J., Van Groenendael, J.M., 2007. Multigenerational inbreeding in *Succisa pratensis*: effects on fitness components. *Biol. Plant.* 51, 185-188.
- Pluess, A.R., Stöcklin, J., 2004. Genetic diversity and fitness in *Scabiosa columbaria* in the Swiss Jura in relation to population size. *Conserv. Genet.* 5, 145-156.
- Porcher, E., Lande, R., 2005. Loss of gametophytic self-incompatibility with evolution of inbreeding depression. *Evolution* 59, 46-60.
- Porcher, E., Lande, R., 2005. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. *J. Evolutionary Biol.* 18, 497-508.
- Pujol, B., Zhou, S.R., Vilas, J.S., Pannell, J.R., 2009. Reduced inbreeding depression after species range expansion. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 15379-15383.
- Reed, D.H., 2005. Relationship between population size and fitness. *Conserv. Biol.* 19, 563-568.
- Stephenson, A.G., Good, S.V., Vogler, D.W., 2000. Interrelationships among inbreeding depression, plasticity in the self-incompatibility system, and the breeding system of *Campanula rapunculoides* L. (Campanulaceae). *An. Bot. London* 85, 211-220.
- Stone, J.L., 2004. Sheltered load associated with S-alleles in *Solanum carolinense*. *Heredity* 92, 335-342.
- Sutcliffe, O.L., Kay, Q.O.N., 2000. Changes in the arable flora of central southern England since the 1960s. *Biol. Conserv.* 93, 1-8.
- Takayama, S., Isogai, A., 2005. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 467-489.
- Willi, Y., 2009. Evolution towards self-compatibility when mates are limited. *J. Evolution Biol.* 22, 1967-1973.
- Willi, Y., Dietrich, S., van Kleunen, M., Fischer, M., 2007. Interspecific competitive stress does not affect the magnitude of inbreeding depression. *Evol. Ecol. Res.* 9, 959- 974.
- XLSTAT, 2011. Version 2011.2.04. Paris, France: Addinsoft SARL 1995-2011.

**C- PERSISTANCE DES AKENES DE BLEUETS
ENFOUIES DANS LE SOL PENDANT 2,5 ANS ET
SUIVI DE LA GERMINATION ET DE LA
DORMANCE AU COURS DU TEMPS POUR DEUX
POPULATIONS**

1) INTRODUCTION

La banque de semences du sol est un des facteurs clef de la compréhension de la dynamique des populations végétales (Cabin et al., 1998). Elle représente une part considérable de la diversité *via* la coexistence des semences dans le sol (Silvertown et al., 2006). Par ailleurs, la persistance des semences est un des facteurs particulièrement important pour le maintien des populations au cours du temps (Rees et al., 2002). Les agroécosystèmes sont des milieux fortement perturbés où la pression sur la flore adventice des parcelles cultivées est importante. Les perturbations fréquentes (apport régulier d'intrants (engrais, herbicides)) font de cet écosystème un milieu où la survie des semences s'avère nécessaire pour le maintien des espèces. Des taxa avec une capacité de survie courte sont susceptibles de régresser rapidement dans ce type d'habitat où l'utilisation du milieu change régulièrement (rotation des cultures) (Stöcklin & Fischer, 1999). Dans le cas des plantes annuelles, qui représentent l'essentiel de la flore des agroécosystèmes, la capacité de survie des semences est importante à l'échelle locale car elle permet le maintien des populations en cas d'échec de la reproduction ou d'extinction locale (Saatkamp et al., 2011). Les messicoles, espèces commensales des moissons, sont actuellement touchées par le déclin de la diversité observée à l'échelle planétaire (Gregory et al., 2005). Parmi les taxa en voie de raréfaction, on trouve *Ranunculus arvensis* L., *Scandix pecten-veneris* L., et *Centaurea cyanus* L. (Sutcliffe & Kay, 2000).

Le bleuet (*Centaurea cyanus* L.) est annuel et entomophile. Il germe principalement en automne et fleurit de mai à juillet. Cette espèce, encore commune dans les parcelles cultivées au début du XX^{ème} siècle, est actuellement en voie de raréfaction dans l'ouest de l'Europe (Sutcliffe & Kay, 2000). *C. cyanus* possède un système d'auto-incompatibilité empêchant l'autofécondation et les croisements entre individus génétiquement proches *via* la reconnaissance d'allèles-S d'incompatibilité. Dans le cas des populations isolées, une limitation du nombre de reproducteurs est susceptible de se produire au cours du temps ce qui peut entraîner un échec de la reproduction pouvant mener à son extinction. Dans cette situation, la banque de semences du sol pourrait faire perdurer des allèles-S limitant ainsi l'échec de la reproduction et permettant le maintien de la population au moins à court terme. L'étude de la persistance des akènes dans le temps est donc cruciale pour une meilleure compréhension de la dynamique des populations de bleuets. Plusieurs méthodes existent pour mesurer la capacité de survie des semences dans le sol dont la datation au C₁₄ (Moriuchi et al., 2000) ou l'enfouissement de semences (Telewski & Zeevat, 2002) qui permet de mesurer, en

plus de la capacité de survie, le taux de germination au cours des saisons. Afin d'estimer la persistance des akènes de bleuet dans la banque du sol, des akènes issus de deux populations, la première récoltée en Bourgogne et la deuxième issue de multiplication en parcelle jardinée, ont été enfouis pendant 2,5 ans. Le taux de germination et la survie des akènes ont été mesurés une fois par mois afin de déterminer si *C. cyanus* est une espèce à persistance courte ou longue dans le sol et la saisonnalité de sa germination.

2) MATERIELS ET METHODES

2.1 Origine des semences

La capacité de survie dans le sol d'akènes issus de deux origines a été testée. La première population a été récoltée, en juillet 2008, dans une parcelle de colza se situant à Epagny en Bourgogne. Les akènes de la deuxième population, fournis par la société Herbiseeds en 2007, ont été multipliés et récoltés en parcelle jardinée entre juillet et août 2008. Ceux-ci pourraient être utilisés comme référence internationale bien que leur origine, pouvant diverger d'une année à l'autre, ne soit pas connue. Après avoir été récoltés, les akènes ont été stockés quatre mois à environ 20°C sous humidité ambiante avant d'être enfouis en décembre 2008. Aucune semence issue du Poitou-Charentes, où le bleuet est actuellement en voie de raréfaction, n'a été utilisée dans cette expérimentation ; la quantité d'akènes nécessaire à cette expérimentation étant trop importante.

2.2 Effet de la profondeur sur la germination des akènes

Une expérimentation effectuée au préalable sur des akènes issus du premier lot (Epagny en Bourgogne) et sur des semences provenant directement de la société Herbiseeds a permis de déterminer la profondeur d'enfouissement à partir de laquelle les akènes ne germent plus. Les résultats ont ainsi montré que ceux-ci germent et lèvent jusqu'à 8cm de profondeur quel que soit la population étudiée. Au-delà, aucune germination n'a été observée. Le maximum de germination est obtenu pour les semences placées en surface et à une profondeur de 0,5cm (Guillemin, données non publiées). Afin d'éviter toute germination une fois enfoui, il a été décidé d'enterrer les akènes à 30cm de profondeur.

2.3 Mise en place de l'expérimentation et enfouissement

246 sacs en Tergal contenant 100g de terre tamisée, 100 akènes et des étiquettes de couleur pour différencier les deux populations ont été préparés. Trois répétitions de chaque

population sont mises au fond de 40 paniers afin d'être enterrés. Trois répétitions par population ont été utilisées pour tester la capacité de germination et la survie avant enfouissement (T0). En décembre 2008, une tranchée de 30cm de profondeur a été creusée à la mini-pelleteuse dans les parcelles jardinées de l'INRA de Dijon. Les paniers sont placés au fond des tranchées, séparés d'environ 10cm les uns des autres, les tranchées sont ensuite comblées avec la terre extraite. Les paniers contenant les deux populations sont placés par paire et repérés par un piquet.

2.4 Détermination de la capacité de survie des semences

Une fois par mois, une paire de paniers choisie aléatoirement est déterrée (Figure 1). Les sacs de Tergal sont ouverts et vidés sur un plateau. La terre est transférée sur un tamis de 800µm pour un lavage sous l'eau. L'ensemble des akènes est ainsi récupéré. L'ensemble est compté en séparant les akènes détériorés non intacts (ANI) des akènes intacts. Ces derniers sont mis en germination (Figure 2) dans des boîtes de Petri (Ø 14cm) contenant des tubes en verre servant de réserve d'eau, une mèche en contact avec le fond de la boîte, du papier de germination (Durieux®) et 45ml d'eau osmosée. Les boîtes sont placées dans un module climatisé (25°C Jour, 15°C Nuit, photopériode: 12h Jour, 12h Nuit). Les conditions de germination utilisées sont celles qui se sont avérées optimales pour le bleuet lors de pré-tests (données non publiées).

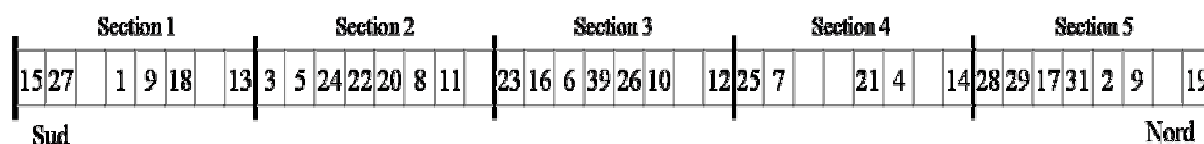


Figure 1 : Disposition des paniers pour l'expérimentation «akènes enfouies» avec dans chaque section, 16 paniers enfouis. Le numéro des paniers correspond à l'ordre du tirage aléatoire pour la date de prélèvement. Les cases sans numéro n'ont pas encore été déterrées.

Le nombre d'akènes germés (AG) pour chaque répétition est compté une fois par semaine. Après trois semaines, de l'acide gibbéréllique (GA3) à 0,3g/l est ajouté dans les boîtes de Petri. Après une semaine, un dernier comptage des akènes germés est fait (akènes dormants, AD) puis on effectue un test de viabilité (Figure 2). Le test de viabilité, aussi appelé *crush test* (Sawma & Mohler, 2002) consiste à couper en deux les akènes restants à l'aide d'un scalpel. Si un embryon de couleur blanche est présent, les akènes sont alors considérés comme viables (akènes pleins, AP). Si l'embryon est de couleur marron à noir ou si l'akène est vide, ceux-ci sont alors considérés comme non viables (akènes vides, ANV) (Figure 2). La capacité initiale

(avant enfouissement) de germination avec et sans GA3, la proportion d'akènes viables non germés et d'akènes non viables ont été déterminées pour chaque population.

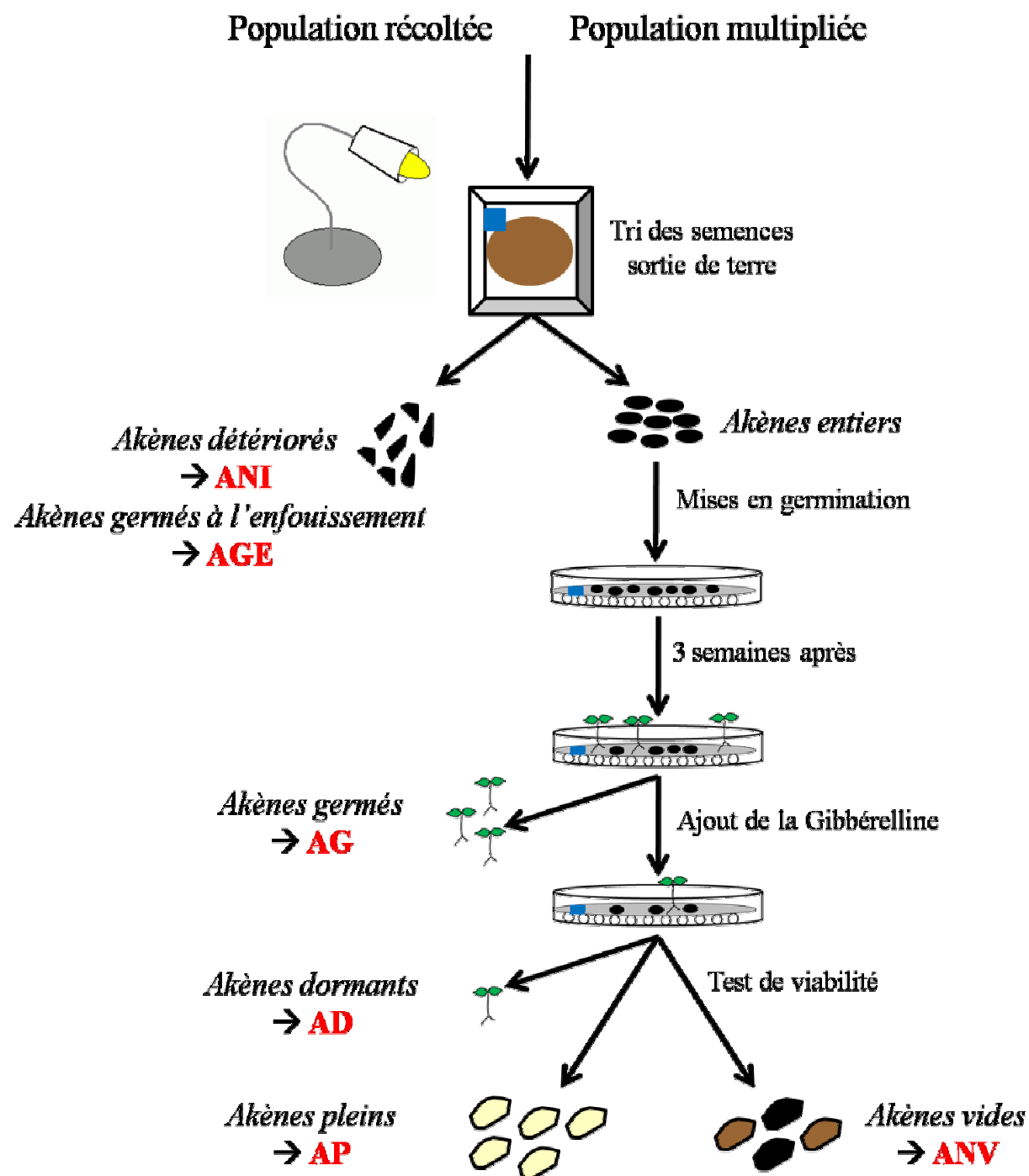


Figure 2 : Détermination de la capacité de survie des akènes au cours du temps pour les deux populations (récoltée et multipliée). Les akènes détériorés (moins ceux germés avant enfouissement ou leur estimation AGE) ou akènes non intacts (ANI), sont séparés des akènes intacts mis en germination. Après 3 semaines, l'ensemble des akènes germés est comptabilisé (AG) et du GA3 est ajouté. Les nouvelles germinations seront appelées akènes dormants (AD). Un test de viabilité est alors fait, soit les akènes sont pleins avec un embryon viable (AV) soit, ils sont vides ou ont un embryon non viable (ANV).

2.5 Analyse des données

Des courbes de tendance de moyennes ont été tracées afin de mettre en évidence la capacité de germination et de dormance des akènes dans le temps. La moyenne des deux premiers points de données correspond à la valeur du premier point de la courbe de tendance, la moyenne des deuxièmes et troisièmes points correspond au deuxième point de la courbe de tendance et ainsi de suite.

L'ensemble des régressions linéaires et des modèles non linéaires ont été effectué avec le logiciel XLSTAT 2011. Plusieurs modèles non linéaires ont été testés, celui ayant le meilleur coefficient de corrélation de Pearson ajusté (R^2) et la meilleure valeur du AIC (Akaike's Information Criterion) sera défini comme étant le modèle qui prédit le mieux nos données de survie des akènes au cours du temps.

3) RESULTATS

Au moment de l'enfouissement des semences, les conditions climatiques ont induit la germination d'un certain nombre d'akènes qui ont été retrouvés avec le radicule et l'épicotyle dès le premier prélèvement, c'est-à-dire, un mois après l'enfouissement. De tels akènes germés précocement *in situ* ont été observés pendant plusieurs mois et retirés de l'analyse. Toutefois, après plusieurs mois, une détérioration de l'état des akènes a été observée, entraînant une impossibilité de faire la différence entre les akènes ayant initiés leur germination au moment de l'enfouissement (AGE) et ceux non viables ou morts qui se sont détériorés au cours du temps (ANI) (Figure 3). Afin de ne pas surestimer la survie des akènes au cours du temps, un nombre d'akènes germés moyen (AGEm) par lot (pour 100 akènes) a été estimé sur les quatre premiers mois d'enfouissement, soit $22,8 \pm 4,7$ akènes germés pour la population récoltée et $18,2 \pm 4,8$ akènes germés pour la population multipliée. La valeur estimée du nombre d'akènes germés précocement a été soustraite aux 100 akènes initialement enfouis pour chaque répétition au-delà du quatrième mois.

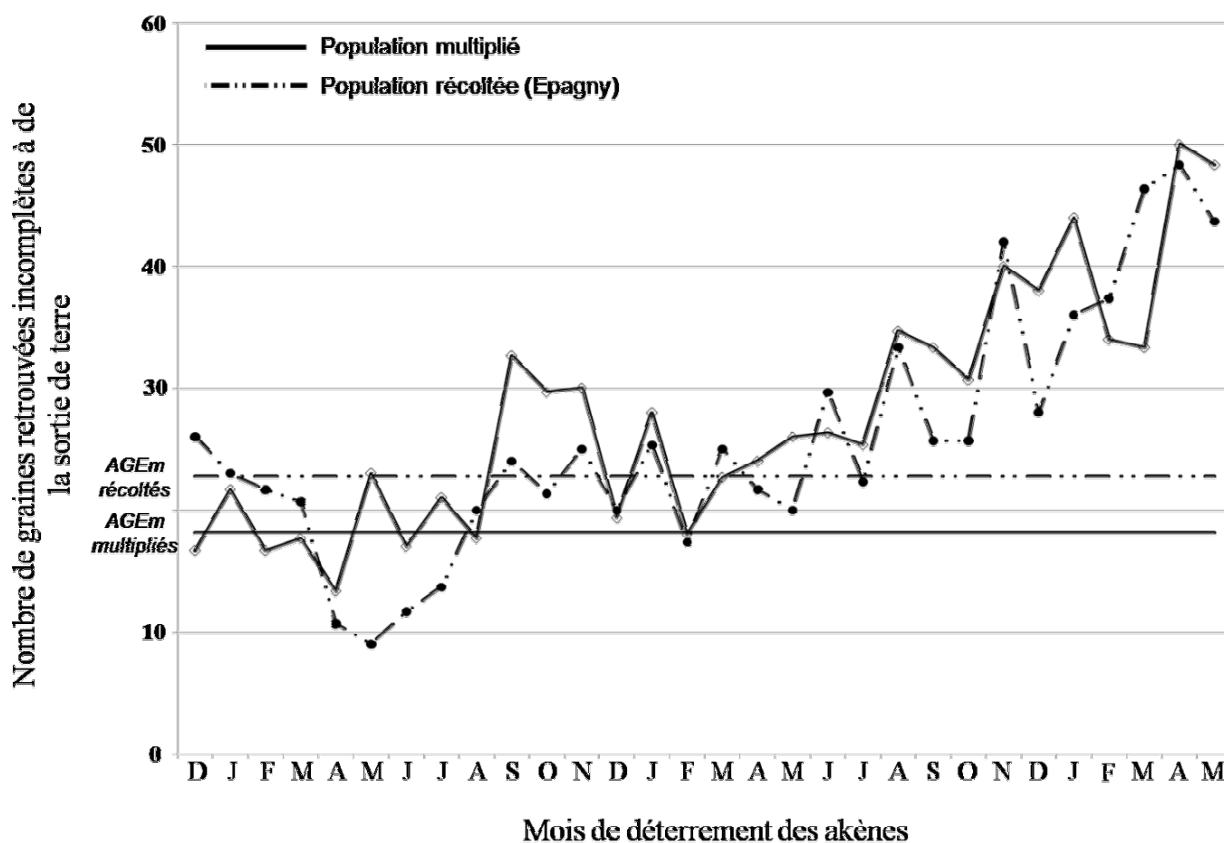


Figure 3 : Evolution du nombre de morceaux d'akènes détériorés retrouvés à la sortie de terre au cours du temps (ANI + AGE) pour les deux populations : récoltée (Epagny) et multipliée. Les deux lignes représentent le nombre d'akènes germés moyen sur 100 au moment de l'enfouissement (AGEm).

Le nombre total d'akènes non viables (ANVT) correspond aux akènes détériorés (ANI) et aux akènes vides (ANV) (Figure 2). Pour la suite, la survie des akènes correspond au nombre total d'akènes viables ($AV = \text{akènes germés (AG)} + \text{akènes dormants (AD)} + \text{akènes pleins (GP)}$) / nombre total d'akènes - nombre de germinations à l'enfouissement AGE) (Figure 2).

3.1 Capacité de germination et de survie initiale

La moyenne du nombre d'akènes germés avant et après ajout du GA3 est plus élevée dans la population multipliée, avec pratiquement trois fois plus d'akènes germés après ajout du GA3 (Tableau 1). Par contre, la viabilité initiale des akènes récoltés est plus élevée de 13% par rapport à celle des akènes multipliés (Tableau 1).

Tableau 1 : Pourcentage initial (à T=0) d'akènes germés (AG), d'akènes dormants (AD), d'akènes pleins (AP) et survie initiale (AG, AD et AP) des populations récoltées (Epagny) et multipliées avant enfouissement des akènes.

Populations	Pourcentage d'akènes germés sans Ga3	Pourcentage d'akènes germés avec Ga3	Pourcentage d'akènes viables non germés	Survie initiale
récoltée	12%	4%	59%	75%
multipliée	15,3%	11,3%	35%	62%

3.2 Evolution de la capacité de germination et de survie au cours du temps

Le nombre moyen d'akènes germés au cours du temps varie en fonction du mois où ils ont été déterrés, avec une augmentation des germinations entre juillet et novembre. Une variation saisonnière marquée de la germination est donc observée (Figure 4). Par ailleurs, l'ajout de GA3 permet d'augmenter le taux de germination de 0 à 0,13 pour la population multipliée et de 0 à 0,22 pour la population récoltée (Figure 4).

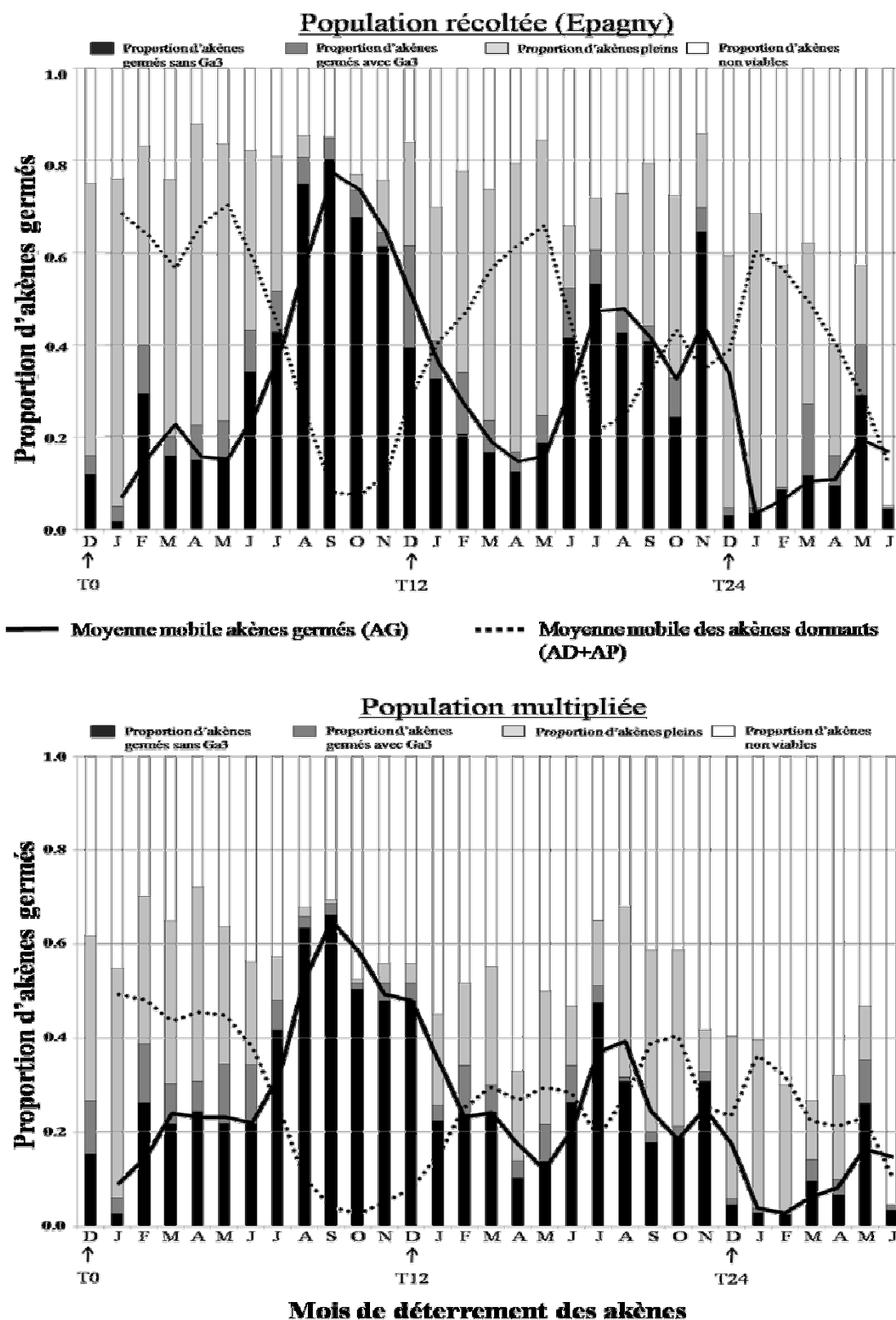


Figure 4 : Evolution de la proportion d'akènes germés (AG) et dormants (AD), de la proportion d'akènes pleins (AP) et non viables (ANV) en fonction du temps d'enfouissement des semences (le temps est exprimé en mois), pour a) la population récoltée b) la population multipliée. Une courbe de la moyenne mobile est tracée pour les deux populations pour la proportion d'akènes germés (AG) et la proportion d'akènes dormants (AD+GP).

L'évolution du taux de survie au cours du temps ($(AG+AD+AP)/\text{nombre total d'akènes} - AGEm$) montre une différence entre les deux populations. Les akènes issus de la population multipliée ont une capacité de survie initiale (à T0) plus faible que ceux issus de la population récoltée (Figure 5 et Tableau 1). Pour la population multipliée, pendant 13 mois, la survie des akènes ne varie pas avec un taux de survie moyen de $0,58 \pm 0,07$. Au-delà (à partir du 14^{ème} mois), il est possible de calculer une régression linéaire significative ($\text{Survie} = 0,88 - 1,90 \cdot 10^{-2} \cdot \text{mois}$; $R^2 \text{ ajusté} = 0,32$ et $p = 0,01$). Le modèle non linéaire qui prédit le mieux l'évolution de la survie des akènes enfouis au cours du temps montre une dynamique similaire avec une chute de la capacité de survie d'abord très faible mais qui s'accélère après 12-15 mois (Figure 6). Pour la population récoltée, pendant 24 mois, la capacité de survie des akènes est de $0,78 \pm 0,05$. Après (à partir du 25^{ème} mois), elle diminue significativement ($\text{Survie} = 0,83 - 3,884 \cdot 10^{-3} \cdot \text{mois}$; $R^2 \text{ ajusté} = 0,14$ et $p = 0,04$). Au delà du 29^{ème} mois, la capacité de survie des akènes récoltés passe sous le seuil des 10%. Le modèle non linéaire qui prédit le mieux l'évolution de la survie des akènes enfouis au cours du temps marque clairement la rupture vers le 22-23^{ème} mois (Figure 7). Au 31^{ème} mois, environ 18% des akènes issus des deux populations sont encore viables (Figures 6 & 7).

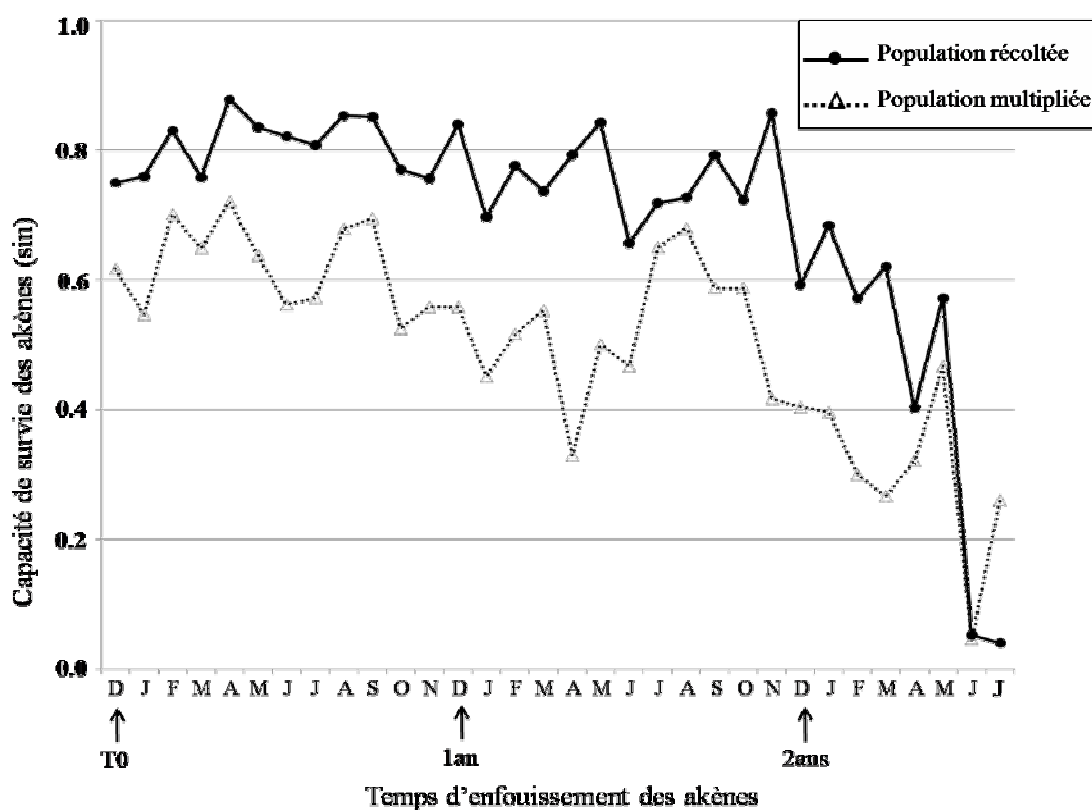


Figure 5 : Evolution de la capacité de survie ($(AG+AD+AP)/(AG+AD+AP+ANV)$) en fonction du mois de déterrement des akènes pour les deux populations : récoltées et multipliées.

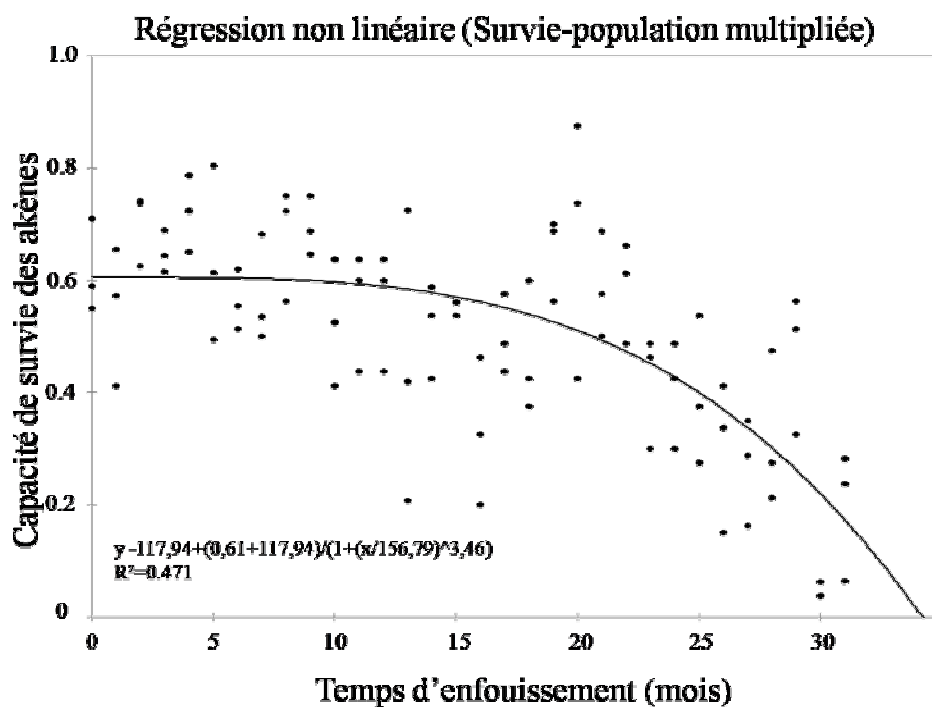


Figure 6 : Evolution de la capacité de survie des akènes issus de multiplication contrôlée en fonction du temps d'enfouissement (en nombre de mois). Le modèle non linéaire ($Y=A/(1+(x/B)^C)$) qui prédit le mieux l'évolution de la survie des akènes multipliés est donné ainsi que la valeur du coefficient de Pearson ajustée correspondante.

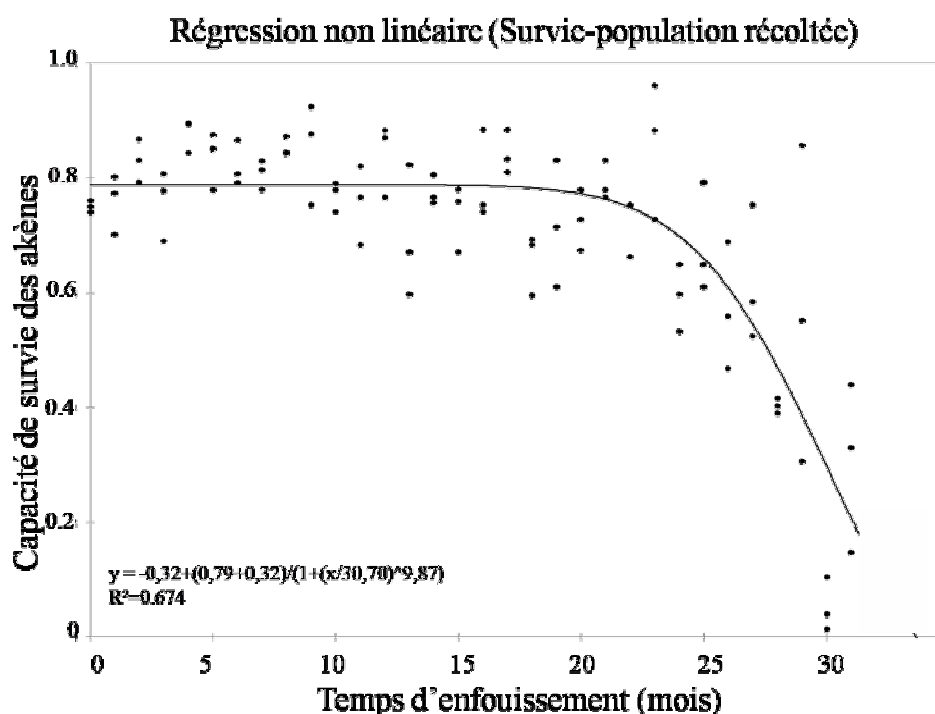


Figure 7 : Evolution de la capacité de survie des akènes issus de population récoltée en fonction du temps d'enfouissement (en nombre de mois). Le modèle non linéaire ($Y=A/(1+(x/B)^C)$) qui prédit le mieux l'évolution de la survie des akènes récoltés est donné ainsi que la valeur du coefficient de Pearson ajustée correspondante.

La capacité de survie des akènes issus des populations récoltées et multipliées suit le même type de modèle de décroissance avec une meilleure corrélation des données au modèle pour la population récoltée. La survie initiale de cette population est plus élevée de 20% et reste stable 10 mois de plus par rapport à la population multipliée. Par contre, la décroissance de la survie est plus rapide pour la population récoltée (Figures 6 & 7).

4) DISCUSSION

Une variation saisonnière de la germination est observée au cours du temps avec un pic entre le mois de juillet et le mois de novembre. Les germinations ne sont pas nulles les autres mois avec, par exemple, des valeurs élevées en février 2009. Par ailleurs, l'intensité et la durée du pic de germination entre août et novembre sont plus importantes que celles du mois de février. Ces résultats correspondent à ceux observés en milieu naturel, à savoir une cohorte majoritaire qui germe en automne et une autre réduite au printemps. Ces résultats ont été confirmés par l'étude sur la phénologie du bleuet en fonction de la culture et du compartiment de l'agroécosystème où deux cohortes de germination ont été observées, une d'automne (levée en novembre) et une au printemps (levée en avril) (Chapitre 2.D).

La survie des akènes de *C. cyanus* commence à chuter environ deux ans après l'enfouissement pour la population récoltée (Epagny), soit après deux saisons de germination. Dans le cas de la population multipliée, la survie commence à baisser après une année d'enfouissement. Dans une expérience comparable, la survie des akènes de plusieurs adventices a été mesurée pendant 2,5ans d'enfouissement dans le sud-est de la France (Lubéron). Après ce laps de temps, entre 0 et 20% des akènes de bleuet mesurés restaient viables (Saatkamp et al., 2009) ce qui concorde avec nos résultats. *C. cyanus* fait donc partie des espèces messicoles avec une persistance faible dans le sol au même titre que *Caucalis platycarpos*, *Nigella dasmascena* et *Vaccaria hispanica* trois autres messicoles rares. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la chute de la survie des semences au cours du temps tels que l'augmentation du taux d'humidité qui amplifie les risques d'attaques par des agents pathogènes (Schafer & Kotanen, 2003), le vieillissement des semences (Priestley, 1986) ou des germinations trop profondes sans émergence appelées aussi germinations suicides (Benvenuti et al., 2001; Traba et al., 2004). Des caractéristiques phénotypiques des semences peuvent aussi influencer la capacité de survie des akènes telles que l'épaisseur du tégument (Gardarin et al., 2010) ou bien la taille de l'akène qui serait positivement (Bekker et al., 1998) ou négativement (Moles & Westoby, 2006) corrélée à la persistance dans le sol. A l'opposé,

des messicoles comme *Adonis annua*, *Carthamus lanatus* ou *Bupleurum rotundifolium* ont un niveau de survie supérieur à 90% après 2,5ans (Saatkamp et al., 2009). L'identification des espèces avec une persistance à court et à long terme est importante pour la compréhension de la dynamique des populations et du maintien des espèces rares dans le milieu. Dans les agroécosystèmes, les habitats peuvent rester défavorables plusieurs années pour une espèce à cause des rotations de cultures. Dans ce type de milieu, une espèce ayant une persistance faible des akènes sera donc désavantagée et, sans renouvellement régulier du stock semencier, le risque d'extinction locale augmente.

Une différence de capacité de survie entre les deux populations testées a été observée. Les akènes issus de la population multipliée ont un taux de survie initial plus faible et qui commence à chuter plus rapidement (au cours de la 2^{ème} année), et le taux de germination est plus faible que pour les akènes issus de la population récoltée. Ces différences inter-populations pourraient être dues aux conditions d'obtention et de maturation des akènes puisqu'ils sont issus directement du champ sans multiplication d'homogénéisation. Il est possible qu'un certain niveau de consanguinité soit, par ailleurs, présent dans la population multipliée issue de conditions contrôlées. La performance plus faible de cette population pourrait donc provenir de la dépression de consanguinité (voir Chapitre 2.D.II). Celle-ci est définie comme une diminution de la fitness des individus issus d'autofécondation par rapport à ceux issus de croisements. Elle apparaît avec l'augmentation du taux d'homozygotie (consanguinité) et est due à la combinaison des allèles délétères et/ou létaux (Charlesworth & Charlesworth, 1979).

Une graine dormante est définie comme n'ayant pas la capacité de germer sans une combinaison de facteurs physiques et environnementaux qui sont favorables à sa germination. Une fois l'ensemble des conditions nécessaires présentes, la dormance est levée (Baskin & Baskin, 2004). Une dormance secondaire peut s'exprimer chez les espèces ayant une dormance peu profonde. Elle est souvent associée avec le cycle annuel de dormance dans la banque de semences du sol (Fenner & Thompson, 2005). La dormance secondaire apparaît lorsque les conditions nécessaires à la germination ne sont plus favorables. Elle peut être induite et perdue plusieurs fois en fonction des changements de saisons (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Dans le cas de *Mesembryanthemum nodiflorum*, une espèce présente dans les déserts, la dormance secondaire a été maintenue pendant plus de trente ans (Guterman & Gendler, 2005). Dans notre étude, le GA3 semble avoir peu d'impact sur la germination de *C. cyanus* au cours des saisons. Par ailleurs, les variations saisonnières du taux de germination observées tendent à montrer que le bleuet est une espèce avec une dormance

principalement de type physiologique et peu profonde liée aux changements de saisons. Cette périodicité lui évite de germer en abondance au printemps dans les cultures d'hiver bien installées et étouffantes, comme on le verra dans la partie C. Par ailleurs, dans les cultures de printemps, la floraison des bleuets sera rapidement initiée par la longueur du jour (donnée non publiées de H. Darmency), ce qui donne lieu à des plantes chétives et peu productives.

Le bleuet est une espèce avec une persistance à court terme des akènes dans le sol. Ce résultat est observé pour des individus issus de multiplication en parcelle jardinée et pour des akènes résultant de récoltes *in situ* (Bourgogne ou Lubéron). Des akènes issus de l'ouest de la France devraient donc, *a priori*, suivre la même dynamique de germination et de survie même si une vérification de cette hypothèse semble nécessaire. Or, dans un contexte de maintien de cette espèce dans l'ouest de la France, la faible capacité de survie des akènes dans le temps pourrait être problématique. En effet, le bleuet est inféodé à l'agroécosystème, habitat en perpétuel changement dû à l'alternance des pratiques qui y sont réalisées (apport d'intrants, succession longue et diversifiée des cultures, travail du sol). Avant la mécanisation, le tri des semences et l'usage d'herbicides, les parcelles étaient régulièrement favorables au bleuet ; les akènes n'avaient donc pas la nécessité d'avoir une forte persistance dans le sol pour que l'espèce puisse se maintenir dans l'agroécosystème. Actuellement, les parcelles sont, en plus, exposées à des changements de pratiques culturales plus fréquents, les rendant défavorables à la germination et à l'établissement de *C. cyanus*. Néanmoins, malgré un déclin rapide de la capacité de survie, la quantité d'akènes viables dans le sol reste non négligeable après 2,5ans. Afin de déterminer si la survie continue de chuter ou si le taux de mortalité fini par atteindre un plateau, laissant ainsi une quantité non négligeable d'akènes viables dans le stock semencier au cours du temps, il est nécessaire de caractériser la dynamique de survie des akènes au-delà des 2,5ans. Ainsi, si une proportion non négligeable d'akènes persistent dans le sol plusieurs années, cela pourrait être suffisant pour permettre le maintien des populations de bleuets au cours du temps dans l'ouest de la France.

Remarquons enfin que Saatkamp et al. (2011) observe une persistance plus élevée des espèces à germination lente alors que celles à germination rapide comme *Agrostemma githago* et *Vaccaria hispanica* ont un taux de survie qui chute rapidement. Lorsque les conditions sont favorables à une espèce, si les semences n'initient pas la germination suffisamment rapidement, elles devront rester viables jusqu'à la prochaine opportunité. Le bleuet, espèce à persistance faible du stock semencier, est probablement une espèce à germination rapide (Saatkamp et al. (2011)). Cette caractéristique lui permettrait dès qu'elle est en capacité de

germer d'accomplir systématiquement son cycle avant la récolte de la culture, ce qui peut aussi aider à le maintenir.

5) REFERENCES

- Baskin, J.M., Baskin, C.C., 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14, 1-16.
- Bekker, R.M., Bakker, J.P., Grandin, U., et al. 1998. Seed size, shape and vertical distribution in the soil: indicators of seed longevity. *Funct. Ecol.* 12, 834-842.
- Benvenuti, S., Macchia, M., Miele, S., 2001. Quantitative analysis of emergence of seedlings from buried weed seeds with increasing soil depth. *Weed Sci.* 49, 528-535.
- Cabin, R.J., Mitchell, R.J., Marshall, D.L., 1998. Do surface plant and soil seed bank populations differ genetically? A multipopulation study of the desert mustard *Lesquerella fendleri* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 85, 1098-1109.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1979. Evolution and breakdown of S-allele systems. *Heredity.* 43, 41-55.
- Fenner, M., Thompson, K., 2005. *The ecology of seeds*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171, 501-523.
- Gardarin, A., Durr, C., Mannino, M.R., Busset, H., Colbach, N., 2010. Seed mortality in the soil is related to seed coat thickness. *Seed Sci. Res.* 20, 243-256.
- Gregory, R.D., van Strien, A., Vorisek, P., Meyling, A.W.G., Noble, D.G., Foppen, R.P.B., Gibbons, D.W., 2005. Developing indicators for European birds. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 269-288.
- Guterman, Y., Gendler, T., 2005. Annual rhythm of germination of seeds of *Mesembryanthemum nodiflorum* 32 years after collection. *Seed Sci. Res.* 15, 249-253.
- Moles, A.T., Westoby, M., 2006. Seed size and plant strategy across the whole life cycle. *Oikos.* 113, 91-105.
- Moriuchi, K.S., Venable, D.L., Pake, C.E., Lange, T., 2000. Direct measurement of the seed bank age structure of a Sonoran desert annual plant. *Ecology.* 81, 1133-1138.
- Priestley, D.A., 1986. *Seed aging – implications for seed storage and persistence in the soil.* New York: Comstock Publishing.
- Rees, J.M., Mills, L.S., Dunning, J.B., et al., 2002. Emerging issues in population viability analysis. *Conserv. Biol.* 16, 7-19.
- Saatkamp, A., Affre, L., Dutoit, T., Poschlod, P., 2011. Germination traits explain soil seed persistence across species: the case of Mediterranean annual plants in cereal fields. *Ann. Bot.* 107, 415-426.

- Saatkamp, A., Affre, L., Dutoit, T., Poschlod, P., 2009. The seed bank longevity index revisited: limited reliability evident from a burial experiment and database analyses. *Ann. Bot.* 104, 715-724.
- Sawma, J.T., Mohler, C.L., 2002. Evaluating seed viability by an unimbibed seed crush test in comparison with the tetrazolium test. *Weed Technol.* 16, 781-786.
- Schafer, M., Kotanen, P.M., 2003. The influence of soil moisture on losses of buried seeds to fungi. *Acta. Oecol.* 24, 255-263.
- Silvertown, J., McConway, K., Gowing, D., et al., 2006. Absence of phylogenetic signal in the niche structure of meadow plant communities. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* 273, 39-44.
- Stöcklin, J., Fischer, M., 1999. Plants with longer-lived seeds have lower local extinction rates in grassland remnants 1950–1985. *Oecologia.* 120, 539-543.
- Sutcliffe, O.L., Kay, Q.O.N., 2000. Changes in the arable flora of central southern England since the 1960s. *Biol. Conserv.* 93, 1-8.
- Telewski, F.W., Zeevart, J.A.D., 2002. The 120-yr period for Dr Beal's seed viability experiment. *Am. J. Bot.* 89, 1285-1288.
- Traba, J., Azcarate, F.M., Peco, B., 2004. From what depth do seeds emerge? A soil seed bank experiment with Mediterranean grassland species. *Seed Sci. Res.* 14, 297-303.

**D- LEVEE, CROISSANCE ET REPRODUCTION
DU BLEUET DANS DIFFERENTS MILIEUX DU
PAYSAGE AGRICOLE BOURGUIGNON.**

1) INTRODUCTION

Un déclin de la diversité biologique est actuellement observé à l'échelle de la planète (Gregory et al, 2005). Les agroécosystèmes font partie des milieux les plus touchés par cette raréfaction (Robinson & Sutherland, 2002) alors qu'ils représentent entre 24 et 38% des écosystèmes actuels terrestres (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). L'intensification des pratiques agricoles depuis les années 50 est une des principales causes de ce déclin via une simplification des rotations, une diminution de la diversité des cultures et un apport quasi-systématique d'engrais et de pesticides dans les parcelles. De plus, ces changements ont morcelé les populations, entraînant une perte des connectivités entre les populations, un isolement spatial (Lienert & Fisher, 2003; Trakhtenbrot et al, 2005), et de ce fait, une diminution de la diversité génétique (Young et al, 1999) pouvant mener jusqu'à l'extinction de la population. Dans les agroécosystèmes, le déclin est plus important chez les espèces animales ou végétales inféodées au milieu. En effet, des espèces encore communes dans les agroécosystèmes il y a 50 ans, sont maintenant en voie de raréfaction. C'est le cas, par exemple, de certaines espèces d'oiseaux spécialistes du milieu agricole dont les effectifs ont fortement diminué en Grande Bretagne (Donald et al., 2006). Certaines espèces végétales messicoles (commensales des moissons) telles que *Ranunculus arvensis* L., *Scandix pecten-veneris* L. ou *Centaurea cyanus* L. sont aussi actuellement en régression dans l'ouest de l'Europe (Sutcliffe & Kay, 2000).

L'étude de la flore adventice des champs montre que la parcelle et son environnement direct hébergent des flores plus ou moins typiques et riches, avec des espèces spécialistes qui ne se trouvent que dans un habitat, et d'autres, ubiquistes, observées dans tous les milieux. Quatre principaux compartiments peuvent ainsi être définis (Greaves & Marshall, 1987 ; Fried et al., 2008 ; Cordeau, 2010) :

- La zone centrale du champ, ou plein champ, fortement perturbée par les pratiques agricoles ;
- Les premiers mètres de la parcelle, ou fourrière, aussi perturbés par les pratiques agricoles avec, en plus, un tassement du sol, des soins moins réguliers et souvent un peuplement cultivé hétérogène ;
- L'interface, entre la dernière rangée de la culture et la limite extérieure de la parcelle, est une zone de transition avec un travail du sol mais pas semée et pas ou peu désherbée ;

- Les bordures de champs sont en dehors des limites de la parcelle, telles que les haies ou les bordures herbacées.

Les bordures herbacées et les interfaces des champs, en offrant un habitat moins perturbé, sont souvent considérées comme des zones refuges pour certaines espèces initialement inféodées à la parcelle cultivée (Fried et al., 2008). La répartition des espèces dans le paysage agricole et leurs réponses aux stress anthropiques permettent de mieux comprendre quelles sont les caractéristiques biologiques responsables du déclin ou de la réussite d'une espèce dans un des compartiments de l'agroécosystème (Smart et al., 2002).

Le bleuet, *Centaurea cyanus* L., est une espèce annuelle et entomophile qui germe principalement en automne et fleuri de mai à juin. On le retrouve, ainsi, essentiellement dans les cultures d'hiver telles que le blé, l'orge, le colza ou la moutarde. C'est une messicole inféodée au milieu de la parcelle cultivée, commune au début du XX^{ème} siècle et actuellement en voie de raréfaction dans l'ouest de l'Europe (Sutcliffe & Kay, 2000). Principalement présent dans l'interface et la fourrière, il est observé en densité plus faible et moins fréquemment dans le plein champ, rarement dans les bordures des champs (haies, bordures herbacées) (observations personnelles). Afin de mieux comprendre les causes de ses limites et de sa raréfaction dans les paysages agricoles, nous avons cherché à déterminer les facteurs qui influencent son succès dans un compartiment par rapport à un autre. Ainsi, des akènes de bleuet ont été semés dans les quatre compartiments (bordure herbacée, interface de la parcelle, fourrière et plein champ) de deux cultures d'hiver (blé et moutarde). Des mesures de traits ont été effectuées au cours du temps, entre la période du semis de la culture et sa moisson. Les traits correspondent ici à des mesures morphologiques (nombre de feuilles, de capitules,...) et phénologiques (date de la levée, date de la floraison) (Violle et al., 2007) qui peuvent varier en fonction des conditions liées aux différents milieux et pourront ainsi expliquer, en partie, les raisons de la réussite ou non du bleuet dans les différents compartiments du milieu agricole.

2) MATERIELS ET METHODES

2.1 Origine des akènes et site d'expérimentation

Les akènes utilisées ont été récoltés en 2008 dans une parcelle de colza à Epagny en Côte d'Or, puis conservés à 20°C au sec. Les bleuets ont été semés en 2009 sur le Domaine expérimental de l'INRA d'Epoisses (Côte d'Or) qui se situe à 15km au sud de Dijon et

représente une surface de 125ha, soit environ 70 parcelles en 2009-2010. *C. cyanus* n'est pas présent sur le Domaine expérimental.

2.2 Plan expérimental

- Éléments du paysage :

Le bleuet a été semé dans deux parcelles, une de blé et une de moutarde, choisies sur le domaine. Quatre éléments de l'agroécosystème ont été étudiés pour chaque culture, dont trois sont des compartiments de la parcelle agricole (interface, fourrière et plein champ) et un est attenant à celui-ci (bordure herbacée).

La **bordure herbacée (BH)** est un habitat large de 50cm à 1m, entre la route et la parcelle (Figure 1). Les BH des deux cultures ne sont pas similaires. Celle du blé, avec une forte densité de couvert et sans zone de sol nu, était principalement composée de Monocotylédones. La BH de la moutarde, avec une densité de couvert plus faible, des zones de sol nu et un tassement régulier du sol, était principalement composée de Dicotylédones. L'**interface (I)** se situe entre la limite de la parcelle et la première rangée de semis. Généralement, ce milieu est celui avec la richesse spécifique la plus élevée dans la parcelle cultivée. La **fourrière (F)** se situe dans les 6 premiers mètres du champ et a généralement une richesse spécifique plus forte que le plein champ. Le **plein champ (PC)** représente la zone centrale de la parcelle et est la zone avec la richesse spécifique la plus faible (Fried et al., 2007).

- Mise en place :

Chaque culture a été découpée en 4 blocs, eux-mêmes divisés en 4 sous-blocs en fonction du compartiment étudié. Dans chacun de ces sous-blocs, du bleuet a été semé sur 15 points, séparés les uns des autres de 70cm. La présence d'une germination de printemps ou d'automne sur un point donné, et donc, le nombre de plante par cohorte dans un sous-bloc, est un évènement aléatoire. Les akènes ont été semés à 5m et 12m de l'entrée du champ pour la fourrière et le plein champ respectivement (Figure 1). La profondeur de semis a été déterminée suivant les résultats d'une expérimentation qui a testé le taux de germination en fonction de la profondeur sur les mêmes lots d'akènes. Les résultats ont montré que le maximum de germination est observé avec les akènes placés en surface ou à 0,5cm de profondeur (Guillemin, non publié). Les bleuets ont donc été semés entre 0,5-1cm de profondeur, une semaine après la culture, soit le 16 octobre pour la moutarde et le 28 octobre 2009 pour le blé. Un groupe de 25 akènes par point a été semé. L'itinéraire technique est resté celui habituellement utilisé pour ces cultures, excepté l'absence de traitements herbicides dans les champs et l'absence de fauche dans la BH afin de limiter la mortalité. Dans cette partie,

nous nous sommes intéressées aux différences phénotypiques des individus en fonction du compartiment et de la culture.

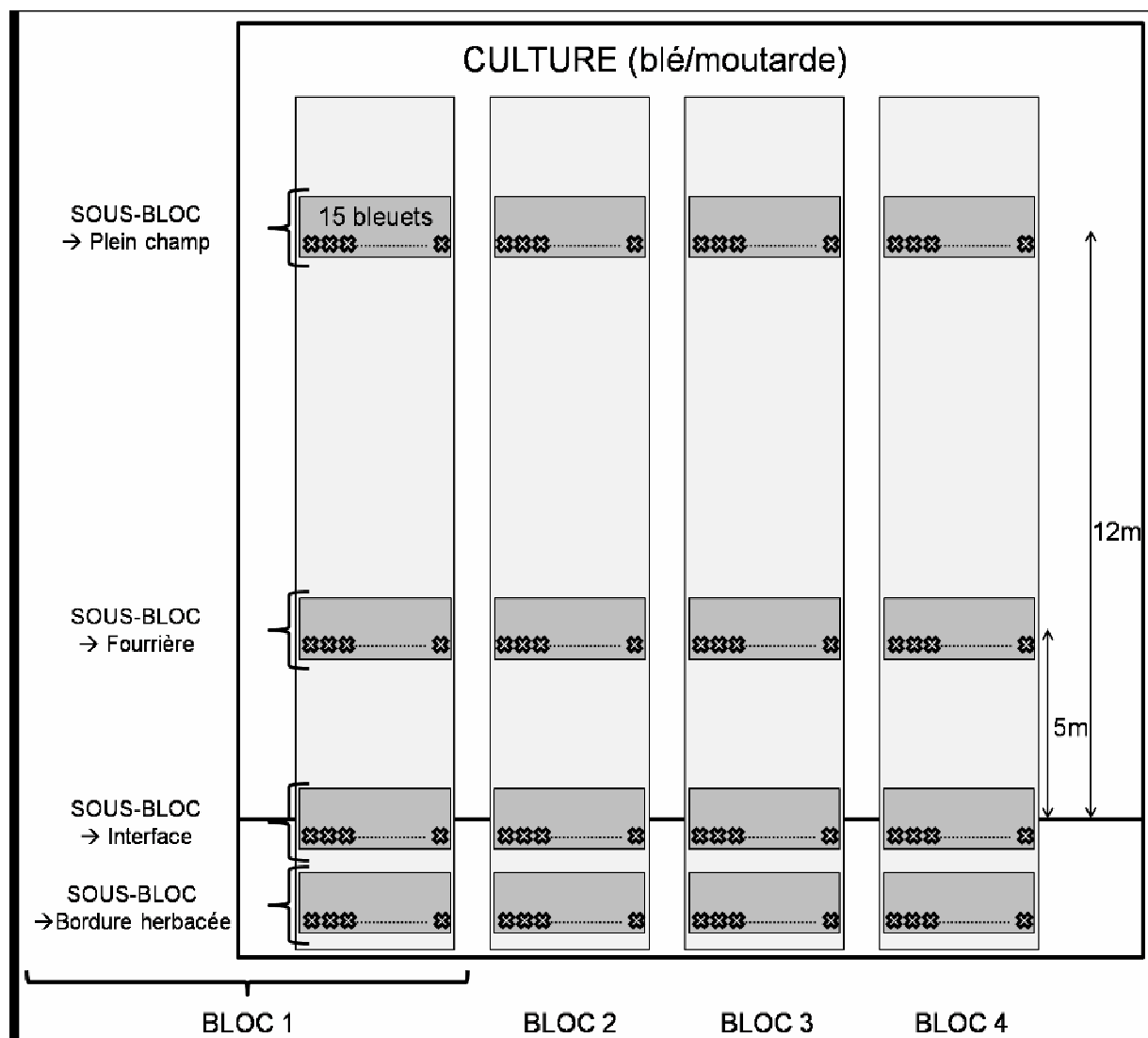


Figure 1 : Plan de l'expérimentation pour une culture (blé ou moutarde). Celle-ci est séparée en quatre blocs, eux-mêmes divisés en quatre sous-blocs suivant le compartiment étudié (bordure herbacée, interface, fourrière et plein champ). A l'intérieur des sous-blocs, des bleuets sont semés sur 15 points (signalés par une croix). Sur un point de semi, la présence d'un individu d'une cohorte de printemps ou d'automne est un évènement aléatoire.

2.3 Mesures effectuées

- Taux d'établissement et d'arrivée au stade adulte :

Les dates de levée ont été suivies et comptabilisées du mois d'octobre 2009 au mois d'avril 2010 (observation de possibles cohortes de levée). La date de levée correspond à l'apparition de la première plantule. Les levées qui ont émergées par la suite ont été systématiquement retirées. En ce qui concerne la cohorte de printemps, l'objectif était

d'obtenir, pour un compartiment, un effectif équivalent à celui de la cohorte d'automne. Ainsi, si une plantule lève au printemps à côté d'une automnale, l'automnale est retirée. Cette opération est réalisée jusqu'à obtention d'un nombre équivalent de plantules pour les deux cohortes dans un même compartiment. Le taux d'établissement estimé pour un milieu correspond au nombre de levées observées (présence/absence d'au moins une levée sur un point de semis) dans les quatre blocs de chaque culture par le nombre total de points de semis, soit 60. Le taux d'arrivée au stade adulte a aussi été estimé et correspond au nombre de plantes qui atteignent la floraison avant la moisson sur le nombre total de points où il y avait une levée de la cohorte correspondante.

- Croissance :

A partir de la sortie de l'hiver (mars), la surface de la rosette (rayon le plus grand $\times$ rayon le plus petit $\times \pi$) et le nombre de feuilles par plante ont été estimés. Quatre mesures de croissance ont été réalisées : le 10/03, le 16/04, le 23/04 et le 29/04/2010. Lors de la première mesure, les cohortes de printemps n'étaient pas encore présentes. Quatre mesures ont donc été effectuées sur les cohortes d'automne et seulement trois ont été faites sur celles de printemps. Une semaine avant la moisson de la culture, les plantes sont prélevées pour mesurer la hauteur et le poids sec de chaque plante.

- Succès reproducteur :

La date de floraison a été notée et correspond à l'apparition du premier bourgeon floral. Une semaine avant la moisson, 10 capitules par plante ont été récoltés et ensachés afin de compter le nombre total de fleurs (non compris les fleurons stériles) par capitule, le nombre de fleurs non fécondées, le nombre d'akènes produits et le nombre d'akènes avortés.. Le nombre moyen d'akènes par fleur correspond au nombre d'akènes produits par capitule divisé par le nombre total de fleurs par capitule. Les nombres de capitules grainés ou en fleurs, et leur total, ont été déterminés pour chaque plante.

2.4 Analyses de données

Le dispositif expérimental a été fait suivant un « split-split plot », soit un montage où l'expérience est subdivisée en deux niveaux. Ainsi, les différentes modalités d'un premier facteur sont réparties en deux champs et correspondent au type de culture (blé ou moutarde). A l'intérieur de ces champs quatre répétitions, ou blocs, ont été définies. Les différentes modalités du deuxième facteur sont attribuées aux sous-blocs et correspondent aux différents compartiments du champ (bordure herbacée, interface, fourrière et plein champ). Enfin, au sein de ces sous-blocs, le troisième facteur est réparti aléatoirement selon le type de cohorte

levée (printemps ou automne). L'effet des différentes modalités (cultures, compartiments et cohortes) sur les traits mesurés a été testé avec une ANOVA et une comparaison par paire de Tuckey sur la base des valeurs par bloc. La valeur du F de Fischer pour l'effet culture est déterminée par rapport à l'erreur sur les grands blocs (1*3 ddl), et pour l'effet compartiment par rapport à l'erreur sur les sous-blocs (2*3*3 ddl). Les différences de surface de la rosette et de nombre de feuilles par plante ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à mesures répétées où la date de mesure correspond au facteur répété ; le bloc, le sous-bloc, la date et la cohorte représentent les effets fixes. L'analyse en composantes principales (ACP) a été faite en fonction de la culture et du compartiment sur les valeurs individuelles, pour chaque cohorte séparément. Les individus sont placés sur les axes en fonction de la corrélation (Pearson) entre les traits (nombre total de capitules, le rapport de la biomasse par la hauteur des plantes, le nombre de jours séparant la levée de la floraison, le nombre total de fleurs par capitule et la proportion moyenne d'akènes par fleur). Une ANOVA suivie d'une comparaison par paire de Tuckey a ensuite été faite sur l'axe 1 et 2 de l'ACP.

3) RESULTATS

3.1 Taux d'établissement et d'arrivée au stade adulte

Que ce soit dans le blé ou la moutarde, deux cohortes de bleuets ont été observées : une s'établissant à l'automne et une, moins importante, au printemps. Un mois après avoir été semées, les semences de la cohorte d'automne ont levé soit pendant la semaine 47 pour la moutarde soit la semaine 48 pour le blé (année 2009). Celles de printemps, quant à elles, ont toutes levées pendant la semaine 13 (année 2010) dans le blé. Dans la moutarde, des levées ont été notées entre les semaines 13 et 15. Le taux d'établissement varie en fonction de la culture, du milieu mais aussi de la cohorte. Globalement, pour le blé, le taux d'établissement du bleuet en BH est presque nul puis augmente entre l'interface et le plein champ (BH<I<F<PC). Le taux d'établissement suit la même répartition pour les cohortes de printemps, avec une absence complète dans la BH (I<F<PC). En automne, le taux d'établissement dans la fourrière est légèrement plus élevé que celui du plein champ (BH<I<PC<F) (Tableau 1). Pour la moutarde, le taux d'établissement des automnales reste supérieur à 0,45 avec I<BH<PC<F alors que pour les printanières, il ne dépasse pas 0,27 avec F<BH<I<PC. Ainsi, le taux d'établissement total (automne + printemps) est toujours supérieur à 0,5 avec I<BH<PC<F. (Tableau 1).

Le taux d'arrivée au stade adulte est plus élevé chez les cohortes d'automne quel que soit la culture et le milieu. Les cohortes de printemps dans la moutarde ont une survie juvénile supérieure à celle dans le blé (Tableau 1).

Tableau 1 : Taux d'établissement (TE) et de survie juvénile (nombre de plantes ayant atteint la floraison/nombre total de levées) en fonction du type de cohortes (printemps et automne) par culture (blé et moutarde) et par milieu (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ). Les taux cumulés de plantes établies et arrivées au stade adulte sont donnés (cohortes d'automne et de printemps) en fonction de la culture et du compartiment.

	Milieux	Automne		Printemps		Cumul	
		TE	Arrivée au stade adulte	TE	Arrivée au stade adulte	TE	Arrivée au stade adulte
Blé	BH	0,03	1	-	-	0,03	1
	I	0,15	0,56	0,05	0	0,2	0,42
	F	0,5	1	0,27	0,56	0,77	0,85
	PC	0,45	1	0,45	0,3	0,9	0,65
Moutarde	BH	0,55	1	0,12	0,57	0,67	0,93
	I	0,45	1	0,13	1	0,58	1
	F	0,83	0,94	0,1	0,83	0,93	0,93
	PC	0,55	0,94	0,27	0,56	0,82	0,82

3.2 Croissance

- Suivi du nombre de feuille et de la surface de la rosette :

D'une manière générale, il n'y a pas d'effets du compartiment, de la cohorte et de la date de mesure sur le nombre de feuilles dans le blé et la moutarde, sauf pour l'interaction cohorte*compartiment. Au contraire, seule l'interaction cohorte*date n'a pas d'impact sur la surface de la rosette dans le blé et la moutarde (Tableau 2).

Dans le blé, la surface de la rosette et le nombre de feuilles restent faibles, que ce soit pour les cohortes d'automne ou celles de printemps, sans évolution marquée au cours du temps. Seuls les individus issus des cohortes d'automne de la F et du PC sont plus développés et ne semblent pas avoir terminé leur croissance lors de la dernière mesure (Figures 2 & 3).

Tableau 2 : Effets blocs, du compartiment, de la cohorte, de la date de mesure et des interactions sur la surface de la rosette et le nombre de feuilles en fonction de la culture de départ. Comparaisons faites suivant une ANOVA à mesures répétées. Le degré de liberté du numérateur (Num ddl), le degré de liberté du dénominateur (Den ddl), le Fischer observé (F) et la p-value (Pr > F) sont donnés.

Variables	Effets	MOUTARDE				BLE			
		Num DDL	Den DDL	F	Pr > F	Num DDL	Den DDL	F	Pr > F
Surface de la rosette	Compartiments	3	82	8,28	<0,001***	4	56	111,72	<0,001***
	Cohorte	1	82	130,20	<0,001***	1	56	962,24	<0,001***
	Date	3	82	143,22	<0,001***	3	56	149,72	<0,001***
	Compartiments*cohorte	3	82	6,05	0,001**	2	56	90,27	<0,001***
	Compartiments*date	9	82	9,11	<0,001***	5	56	32,24	<0,001***
	Cohorte*date	2	82	0,09	0,91	2	56	2,02	0,14
Nombre de feuilles	Compartiments	3	82	1,94	0,13	4	56	1,40	0,25
	Cohorte	1	82	1,36	0,25	1	56	0,54	0,47
	Date	3	82	0,87	0,46	3	56	1,35	0,27
	Compartiments*cohorte	3	82	3,05	0,03*	2	56	5,54	0,01*
	Compartiments*date	9	82	0,73	0,68	5	56	1,23	0,31
	Cohorte*date	2	82	0,26	0,77	2	56	0,17	0,84

*, **, *** : significatif à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et < 0.001 , respectivement

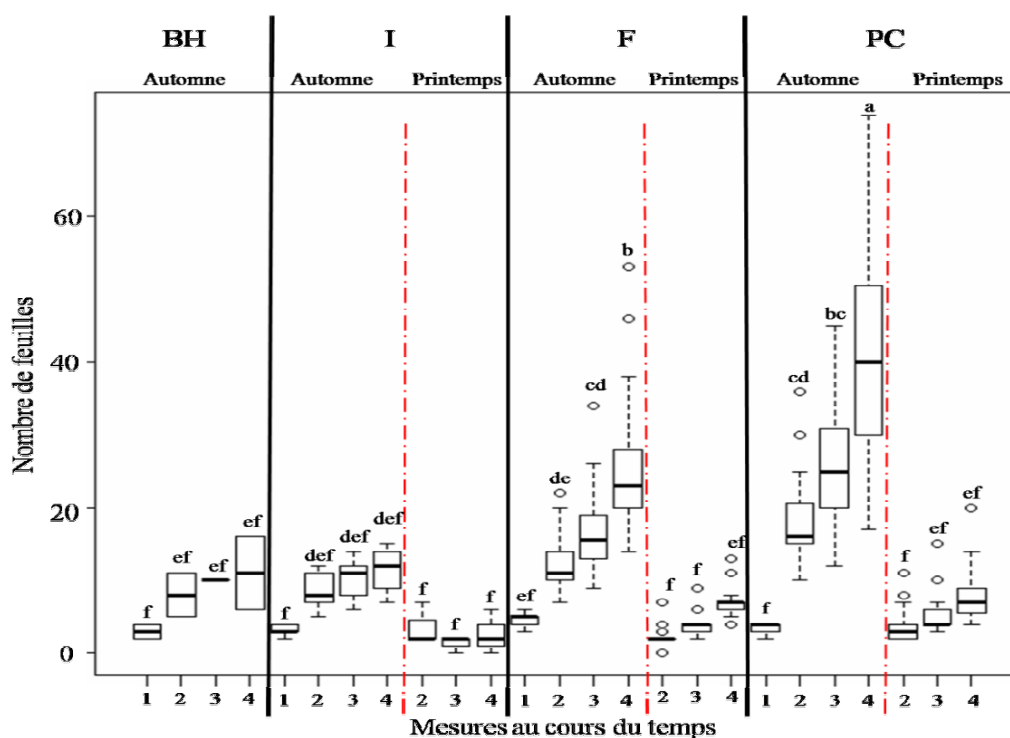


Figure 2 : Nombre de feuilles des bleuets en fonction de la date de mesure (1 : 10/03, 2 : 16/04, 3 : 23/04 et 4 : 29/04), du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la cohorte (automne ou printemps) dans une culture de blé. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0.05$.

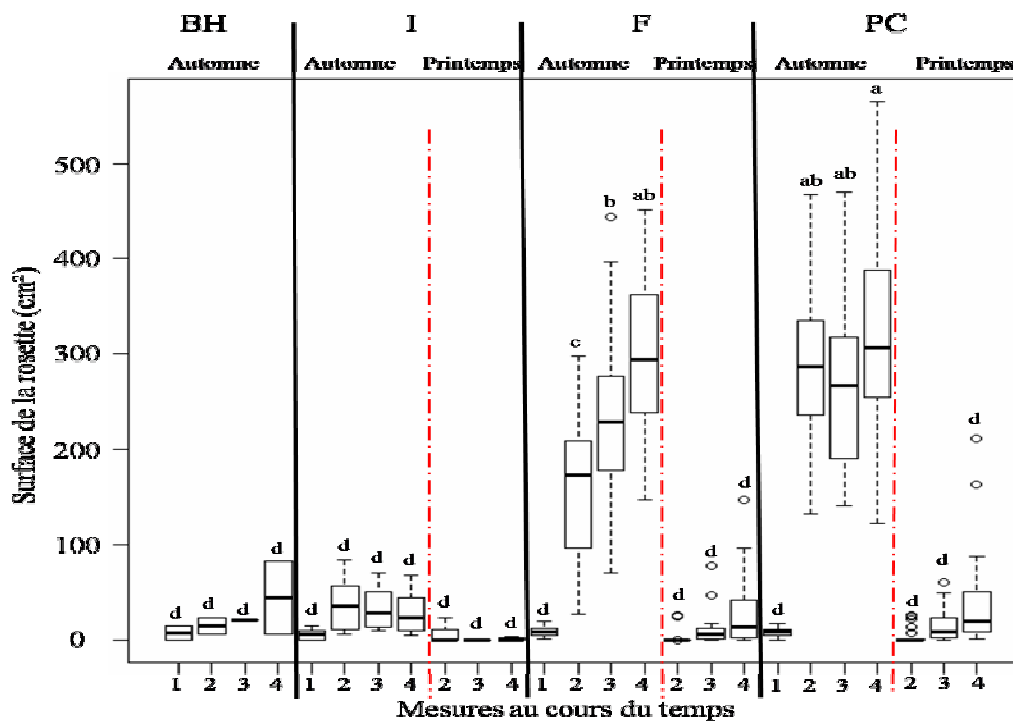


Figure 3 : Surface de la rosette des bleuets en fonction de la date de mesure (1 : 10/03, 2 : 16/04, 3 : 23/04 et 4 : 29/04), du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la cohorte (automne ou printemps) dans une culture de blé. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0.05$.

Dans la parcelle de moutarde, les cohortes de printemps ont moins de feuilles et de plus petites rosettes que celles d'automne, sans évolution marquée au cours du temps. La croissance est la plus importante en I de la moutarde (Figures 4 & 5). Par ailleurs, le stade atteint fin avril par les plantes levées au printemps est équivalent au stade observé au 10 mars pour les plantes issues des levées d'automne (Figures 4 & 5).

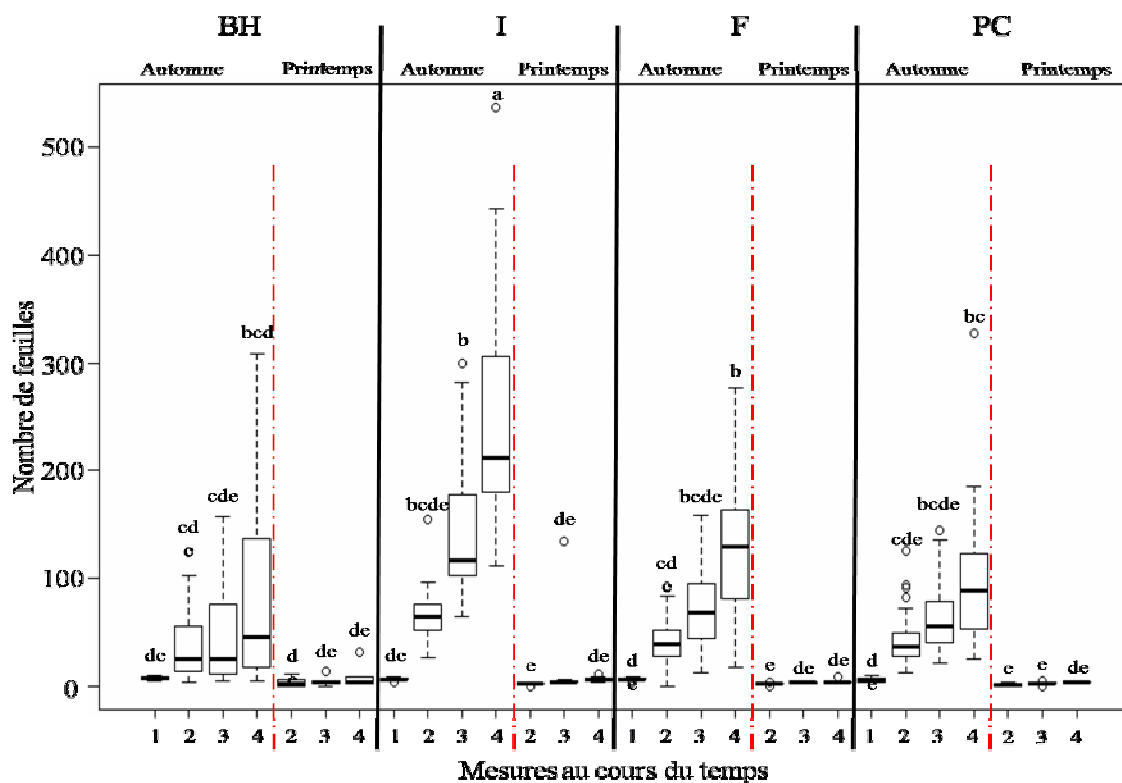


Figure 4 : Nombre de feuilles des bleuets en fonction de la date de mesure (1 : 10/03, 2 : 16/04, 3 : 23/04 et 4 : 29/04), du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la cohorte (automne ou printemps) dans une culture de moutarde. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0.05$.

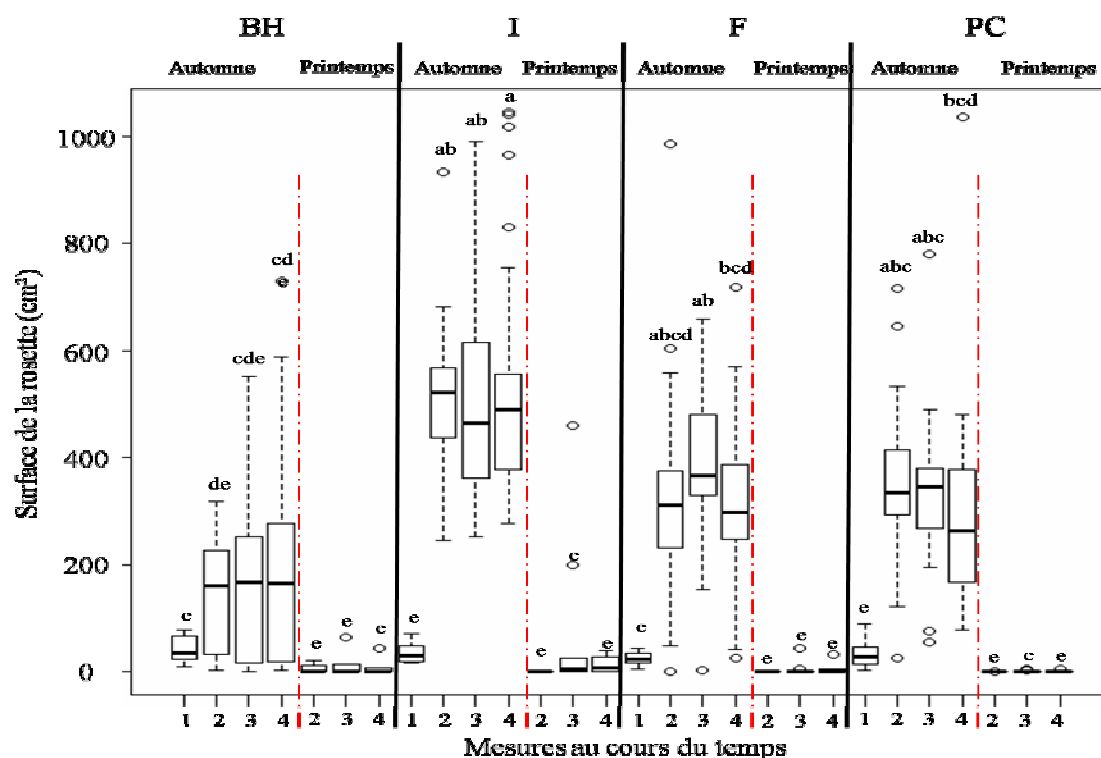


Figure 5 : Surface de la rosette des bleuets en fonction de la date de mesure (1 : 10/03, 2 : 16/04, 3 : 23/04 et 4 : 29/04), du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la cohorte (automne ou printemps) dans une culture de moutarde. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0.05$.

Pour la dernière date de mesure (date 4) en BH, le nombre de feuilles (entre 5 et 309 feuilles) et la surface de la rosette (entre 2,4 et 730,4 cm²) varient fortement pour les individus de la moutarde (Figure 5). Quant à la BH du blé, seulement deux individus se sont installés. Il n'est donc pas possible de conclure pour ce compartiment.

La surface de la rosette des cohortes d'automne n'est pas différente entre le blé et la moutarde pour un même milieu, à l'exception de l'I. En effet, dans ce compartiment, les bleuets de la moutarde ont une plus grande rosette (547,6 cm² pour la moutarde contre 29,6 cm² pour le blé, ANOVA, $p < 0.001$). Les plantes de la F (313,3 cm² dans la moutarde et 296,5 cm² dans le blé) et du PC (295,6 cm² dans la moutarde et 312,7 cm² dans le blé) ont la même taille de rosette. Celle-ci est toujours plus petite et différente des automnales chez les cohortes de printemps quel que soit la culture et le milieu de croissance des plantes. Le nombre de feuilles des cohortes d'automne, au moment de la dernière date de mesure, est différent entre le blé et la moutarde quel que soit le milieu. Celui-ci est systématiquement plus élevé dans la moutarde (252,1 en I, 129,2 en F et 97,3 feuilles en PC contre 11,2 en I, 26,2 en F et 41,4 feuilles en PC, ANOVA, $p < 0.0075$). Chez les cohortes de printemps, le nombre de feuilles ne

varie pas quel que soit la culture ou le milieu d'installation et il n'apparaît pas différent des cohortes d'automne dans le blé.

- Rapport entre la biomasse et la hauteur de la plante au moment des moissons :

Une forte hétérogénéité des valeurs moyenne du rapport entre la biomasse et la hauteur des plantes dans la BH de la moutarde (rapport moyen par bloc allant de 0,01 à 0,81 pour les cohortes d'automne) est observée tandis que, pour le blé, seules deux plantes ont réussi à s'installer. Il n'est donc pas possible de conclure pour ce compartiment. Concernant les autres sous-blocs, l'ensemble des plantes issues de la cohorte de printemps ainsi que celles issues de la cohorte d'automne dans le blé ont le même rapport entre la biomasse et la hauteur. Les plantes levées en automne dans l'I de la moutarde sont les plus grosses et les plus hautes. (Figure 6).

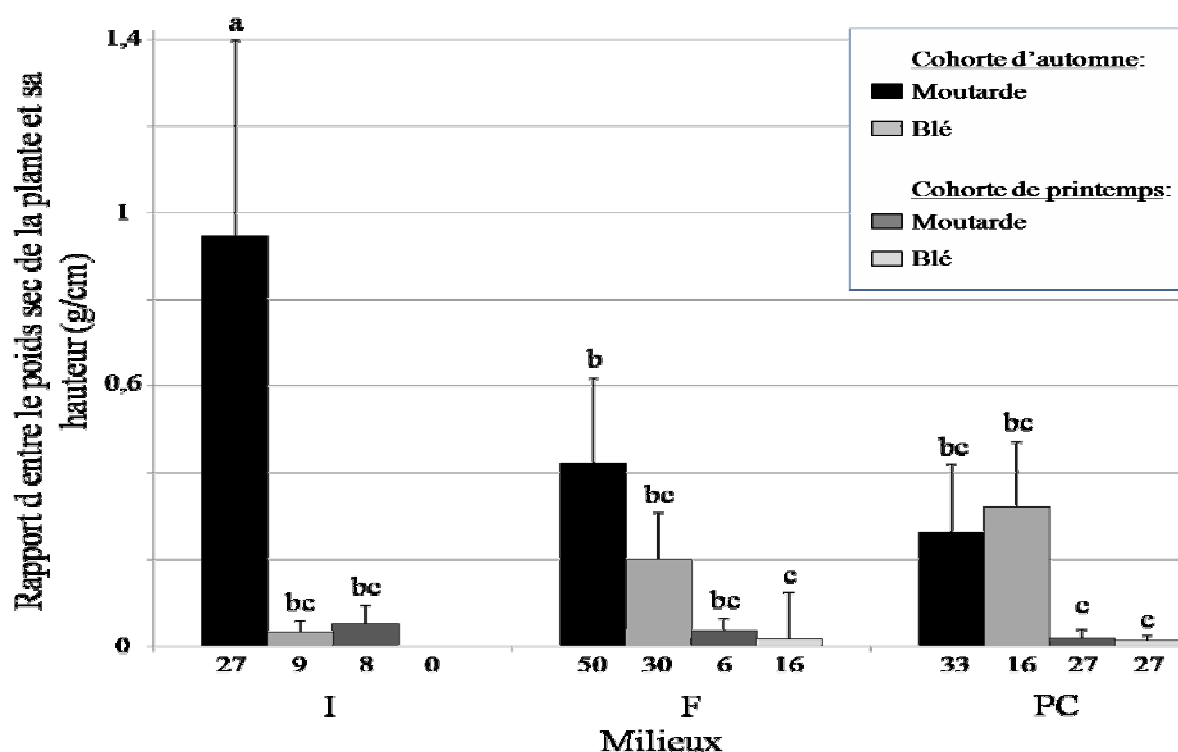


Figure 6 : Rapport entre la biomasse et la hauteur des plantes une semaine avant la moisson de la culture, en fonction de la culture (moutarde et blé), du compartiment : interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)) et de la cohorte (automne et printemps). Le nombre de plantes mesurées est donné sous les histogrammes. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

3.3 Succès reproducteur

- Floraison :

La durée séparant la levée de la floraison du bleuet, quel que soit la culture ou le milieu, est plus courte pour les cohortes de printemps avec un temps de développement plus court (de 22 à 75 jours). Concernant les cohortes d'automne, le temps entre la levée et la floraison est le même quel que soit l'origine des plantes et varie de 151 à 204 jours (Figure 7).

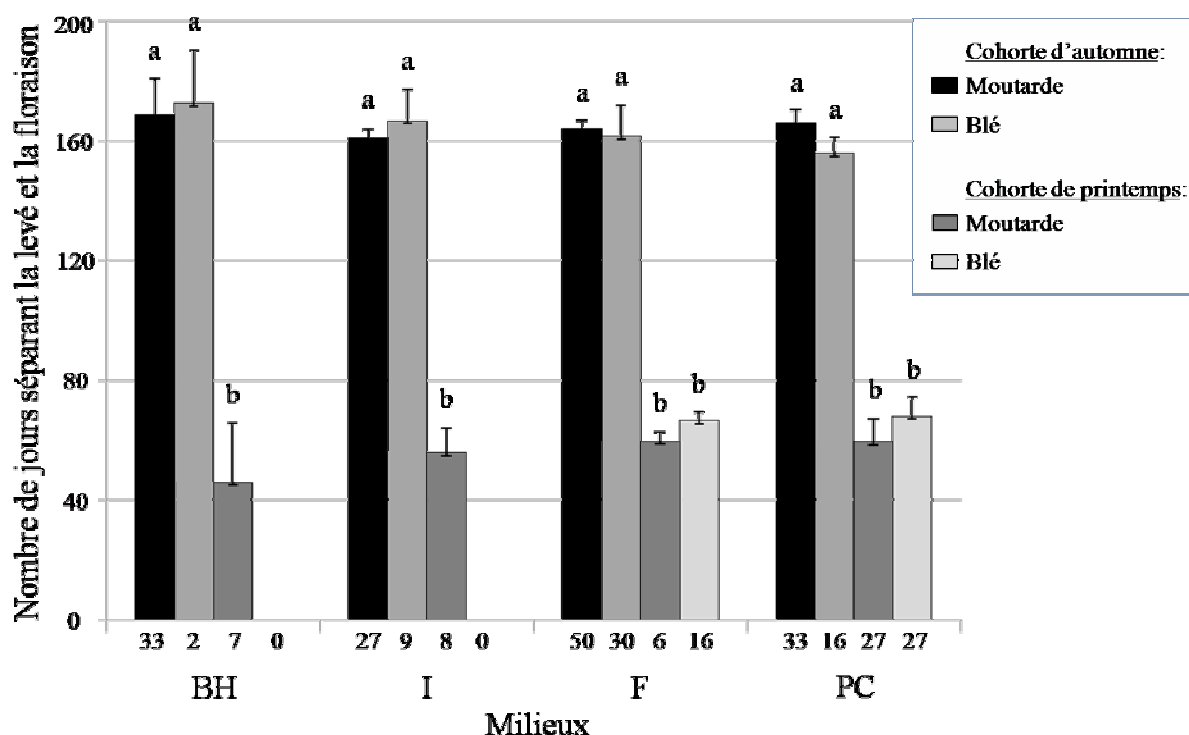


Figure 7 : Nombre de jours séparant la levée et la floraison du bleuet en fonction de la sous-parcelle (bordure herbacée (BH), interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)), de la cohorte de levée du bleuet (automne ou printemps) et de la culture en place (blé ou moutarde). Le nombre de plantes mesurées est donné sous les histogrammes. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

- Capitules :

Une forte hétérogénéité du nombre total de capitules, grainés et en fleurs par plante est présente dans la BH de la moutarde (en moyenne par bloc : de 5,7 à 573,9 capitules totaux, de 5,7 à 412,8 capitules grainés et de 0 à 161,1 capitules en fleurs pour les cohortes d'automne) tandis que pour le blé, seules deux plantes ont réussi à s'installer. Il n'est donc pas possible de conclure pour ce compartiment.

Le nombre total de capitules par plante pour les cohortes d'automne et de printemps n'est pas différent quel que soit le compartiment. Seules les plantes issues de la cohorte d'automne de l'I de la moutarde produisent plus de capitules (Figure 8).

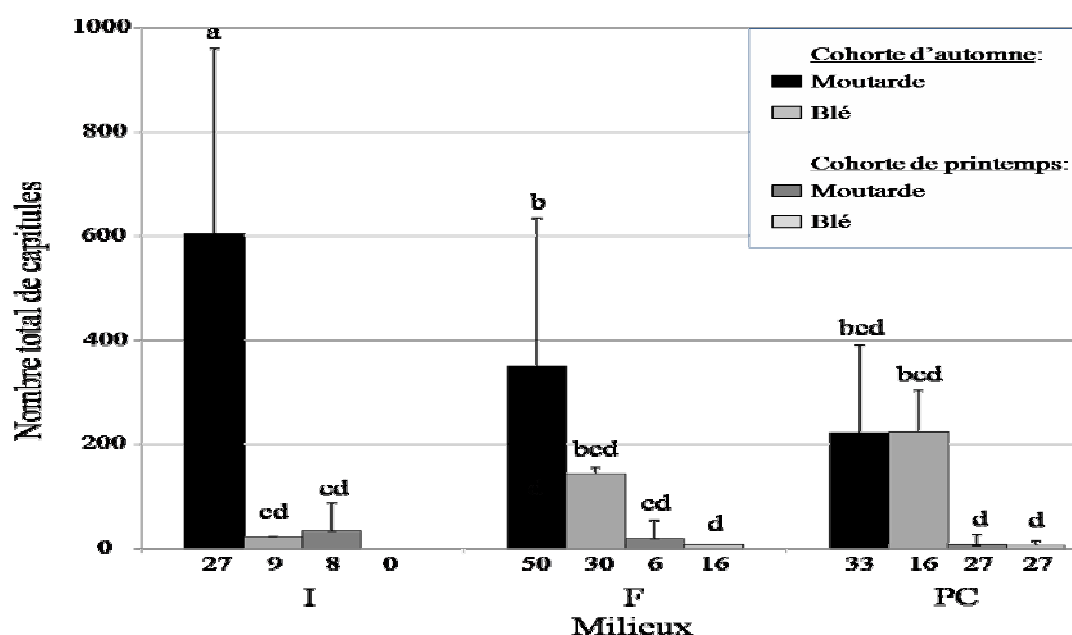


Figure 8 : Nombre total de capitules par bleuet une semaine avant la moisson en fonction du compartiment (interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)), de la cohorte de levée du bleuet (automne ou printemps) et de la culture (blé et moutarde) en place dans la parcelle. Le nombre de plantes mesurées est donné sous les histogrammes. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

Les capitules grainés représentent plus de 50% des capitules totaux (Figure 9.b). La floraison est plus avancée (peu de capitules en fleurs vs beaucoup en graines) pour les cohortes d'automne en I de la moutarde (Figure 9.a & b).

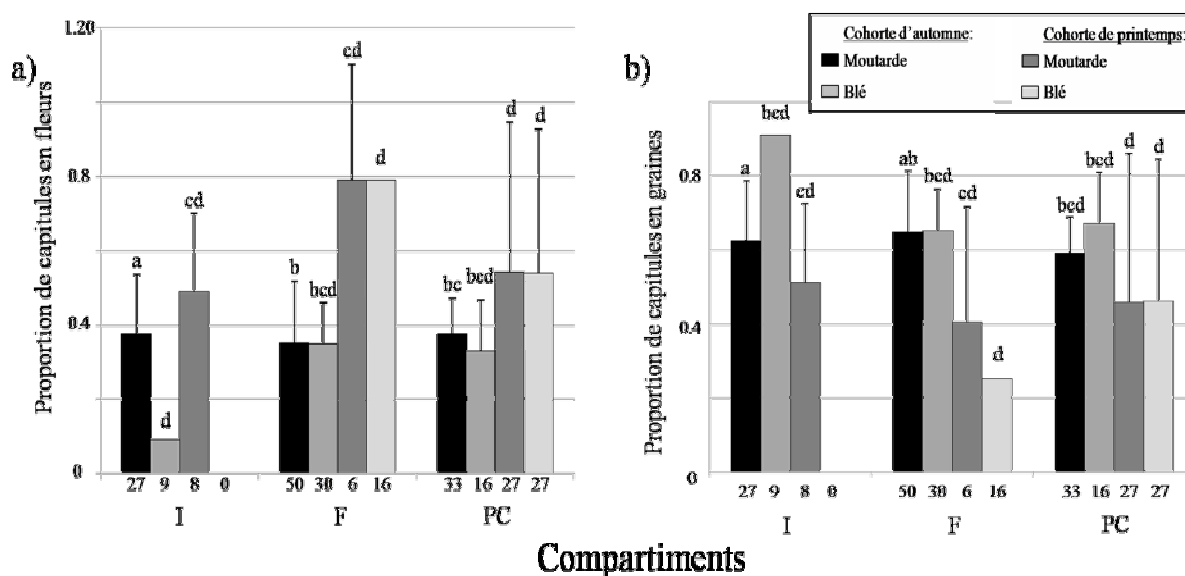


Figure 9 : Proportion de capitules a) en fleurs et b) grainés une semaine avant la moisson en fonction du milieu (interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)), de la cohorte de levée du bleuet (automne ou printemps) et de la culture (blé et moutarde) en place dans la parcelle. Le nombre de plantes mesurées est donné sous les histogrammes. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

Le nombre d'akène produits par fleur ne change pas quel que soit le type de culture, le compartiment ou la cohorte (Figure 10).

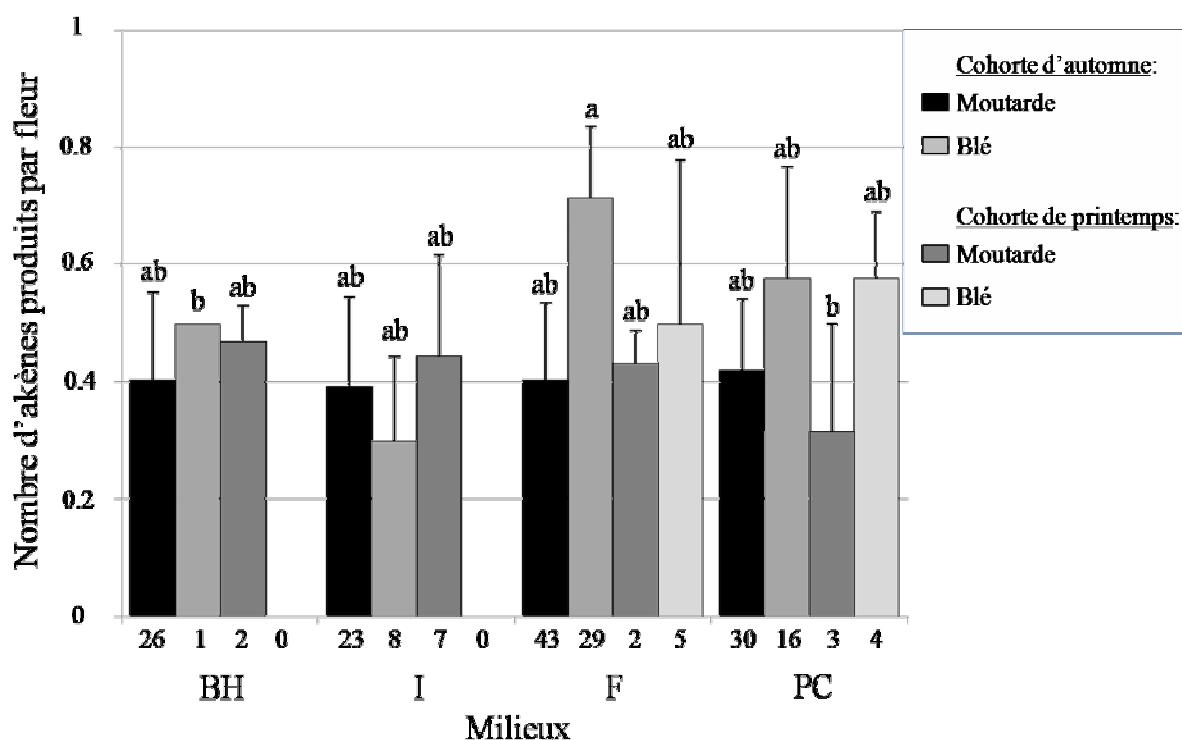


Figure 10 : Nombre d'akènes produits par fleur (nombre d'akènes produits sur le nombre total de fleurs par capitule) en fonction du milieu (bordure herbacée (BH), interface (I), fourrière (F) et plein champ (PC)), de la cohorte de levée du bleuet (automne ou printemps) et de la culture. Le test de comparaison est une ANOVA suivie d'une comparaison multiple par paire de Tuckey, significativité à $\alpha < 0,05$.

3.4 Analyse en composantes principales

Une analyse en composante principale (ACP) a permis de placer les individus des cohortes d'automne suivant leurs similarités. Les plantes peuvent ainsi être différenciées par rapport aux traits mesurés et en fonction du compartiment où elles se situaient. La figure 11 place les individus suivant la valeur de corrélation entre les différents traits mesurés et en fonction du compartiment (BH, I, F, PC) et de la culture. L'axe 1 explique 40,6% de la variation et est positivement corrélé avec le nombre total de capitules par plante et avec le rapport de la biomasse par la hauteur de la plante. Il est négativement corrélé avec le nombre de jours séparant la levée de la floraison, la proportion moyenne d'akènes par fleur et le

nombre total de fleurs par capitule. L'axe 2 explique 35,6% de la variation et est positivement corrélé avec le nombre total de capitules, le rapport de la biomasse par la hauteur des plantes, la proportion moyenne d'akènes par fleur et le nombre total de fleurs par capitule. Il est négativement corrélé avec le nombre de jours séparant la levée de la floraison.

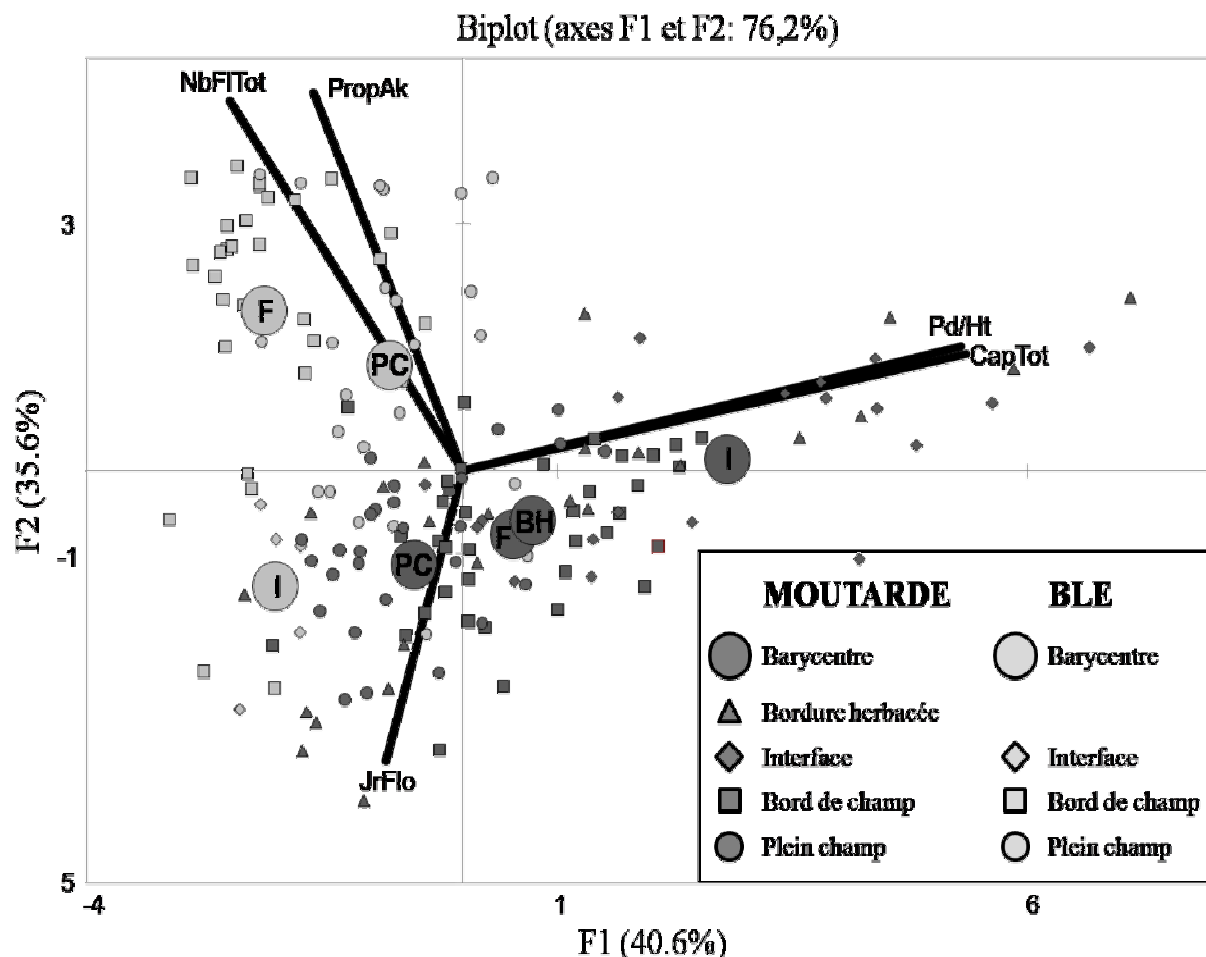


Figure 11 : Analyse en composante principale (ACP) montrant les individus issus des cohortes d'automne (sans les cohortes de printemps) en fonction du compartiment (BH : bordure herbacée, I : interface, F : fourrière et PC : plein champ) et de la culture en place (blé ou moutarde) suivant une corrélation de Pearson entre les différentes valeurs de traits (le nombre total de capitules (CapTot), le nombre de jours séparant la levée de la floraison (JrFlo), le rapport entre la biomasse et le poids sec des plantes (Pd/Ht), le nombre de total de fleurs par capitule (NdFITot) et la proportion d'akènes par fleur (PropAk) des plantes). Une ANOVA suivie d'un test de Tuckey sur l'axe F1 en fonction du type de culture et du compartiment où se situe la plante ont été fait ($F=26,9$; $p<0,001$).

Dans le blé, les plantes ont un nombre total de capitules et un rapport de la biomasse sur la hauteur équivalent. Par contre, en I, elles produisent moins de fleurs par capitule, moins d'akènes par fleur et ont une floraison plus tardive que celles en F et PC. Dans la moutarde, les plantes issues de l'I sont plus développées (plus de capitules et rapport de la biomasse par

la hauteur plus élevé), ont une date de floraison équivalente et produisent autant de fleurs par capitule et d'akènes par fleur que celles en BH et F. Par contre, celles en PC sont moins développées, ont une floraison plus tardive, produisent moins de fleurs par capitule et moins d'akènes par fleurs que celles en I. La comparaison des deux cultures montre que les bleuets sont plus développés dans la moutarde (plus de capitules et rapport de la biomasse par la hauteur plus élevé), produisent moins de fleurs par capitules, moins d'akènes par fleur et ont une floraison plus tardive que ceux dans le blé (Figure 11).

L'ACP sur la cohorte de printemps a donné un nuage de points indifférenciés sans structuration.

4) DISCUSSION

Deux cohortes de levées des bleuets ont été observées au cours de l'expérimentation, une, levant à l'automne et une, au printemps. Les bleuets levés en automne ont un cycle de vie qui correspond à celui des cultures d'hiver. Par contre, les plantes germant et s'établissant au printemps doivent accomplir leur cycle beaucoup plus vite. Ce raccourcissement du cycle peut expliquer le taux de survie juvénile plus faible (toutes les plantes n'ont pu atteindre la floraison au moment des moissons) ainsi qu'une production de capitules et une biomasse moins élevées. Toutefois, même si le bleuet est majoritairement présent dans les cultures d'hiver, il est parfois observé dans des cultures de printemps comme le tournesol, semé généralement courant avril dans les régions au nord de la Loire (CETIOM, 2002), ce qui correspond à la période de levée observée pour les cohortes de printemps. D'autres espèces, comme *Raphanus raphanistrum*, *Spergula arvensis*, *Sonchus asper* ou *Anagallis arvensis* ont le même comportement que le bleuet avec deux types cohortes dans l'année (Cordeau, 2010).

Des différences morphologiques apparaissent en fonction du type de culture et du compartiment dans lequel le bleuet est présent. En interface de la moutarde, *C. cyanus* a un rapport de la biomasse par la hauteur et un nombre de capitules par plante plus élevés. Cette tendance, moins marquée, est observée pour les plantes qui se situent dans la fourrière de moutarde. Cependant, quelle que soit la culture, les bleuets issus du plein champ produisent autant de capitules et ont un rapport de la biomasse par la hauteur équivalent. Ces différences peuvent en partie s'expliquer par la culture en place. En effet, la fermeture du couvert ou la quantité de lumière arrivant au sol (Hallgren et al., 1999) et l'apport de fertilisants (Andersson & Milberg, 1998) varient en fonction de la culture et peuvent ainsi modifier la morphologie des plantes. Dans la moutarde, la zone d'inter-rang est plus large que dans le blé, diminuant la

compétition pour la lumière. Ce type d'implantation réduit la concurrence sur le développement de la partie végétative et n'affecte pas la mise en place des capitules. Par contre, dans le blé, la compétition pour la lumière étant plus forte, les plantes vont s'étioler sans développer de vraies rosettes afin d'accéder à la lumière. Le succès reproducteur des bleuets semble donc équivalent dans les deux cultures à l'exception de l'I de la moutarde où la réussite est plus importante (plus de capitule par plante). Un des facteurs qui pourrait expliquer cette différence morphologique dans l'I est la compétition interspécifique avec les autres adventices et non celle avec la culture qui est plus faible en I (Fried et al., 2007). En effet, l'I du blé était principalement composée de Poacées, réputées plus compétitives, alors que dans la moutarde, les espèces majoritaires étaient des dicotylédones.

En ce qui concerne les plantes de la BH des deux cultures, il est difficile de conclure. Dans le blé, les bleuets ont un taux de levée très faible alors que dans la moutarde, une forte hétérogénéité morphologique des individus est observée. En BH, les perturbations (absence de travail du sol, pas d'intrants, fauchées et avec des espèces à stratégies de type C (Critchley et al., 2006)) sont différentes de celles de la parcelle cultivée entraînant une forte différenciation entre ces deux habitats. Dans la BH, le couvert végétal est principalement dominé par des Poacées et quelques dicotylédones ubiquistes et adaptées à la fauche (*Geranium dissectum* et *Sonchus asper*) alors que les trois compartiments de la parcelle cultivée sont essentiellement composées d'espèces annuelles et de quelques vivaces (Fried et al., 2007). Par ailleurs, des migrations sont plutôt observées de la parcelle vers la BH et non dans l'autre sens (Dutoit et al., 2007) ce qui signifie que la culture peut avoir une influence sur la BH. Cependant, les adventices les moins ubiquistes et les moins compétitives ne sont pas présentes en BH à cause de la forte compétition liée aux Poacées. Une expérimentation a testé le taux de levée des akènes et la croissance des plantules de bleuets enfouies ou en surface en fonction de la présence ou non d'un couvert végétal en milieu contrôlé. Le taux de levée ne varie pas quel que soit la densité de couvert ou le niveau d'enfouissement. Par contre, la croissance des plantules est fortement ralentie en présence de couvert montrant que le bleuet est une espèce sensible à la compétition (Reibel et al., 2010). Par ailleurs, *C. cyanus* n'est pas une ubiquiste signifiant ainsi que l'hétérogénéité morphologique observée entre les deux BH est probablement due à la composition végétale et à la densité de couvert. Pour la moutarde, la densité de couvert végétal était faible avec des zones de sols nus et majoritairement composées de Dicotylédones. Dans la BH longeant le blé, la densité de couvert était plus dense, sans sol nu et majoritairement composée de Monocotylédones. Des bleuets ont donc pu s'installer dans la BH de la moutarde grâce aux espaces vides limitant la compétition.

L'absence de fauche a permis aux bleuets d'aller au bout de leur cycle ce qui explique leur réussite dans la BH de la moutarde. D'autres facteurs seraient également à prendre en compte tels que le tassement du sol (la BH de la moutarde avait été sous-solée), le niveau de perturbation de la surface du sol qui favoriserait les espèces annuelles (Critchley et al., 2006) ou la structure du compartiment qui peut influencer la composition des communautés (Le Cœur et al., 1997).

Une diversité de facteurs peut intervenir sur la réussite d'une espèce dans un milieu comme son contexte historique, le climat, le type de sol, les interactions inter- et intra-spécifiques, les perturbations anthropiques, etc... (Sosnoskie et al., 2007). La réussite des bleuets entre les différents compartiments semble être dépendante, au moins en partie, de la culture en place ainsi que des espèces composant les compartiments périphériques de la parcelle. La bordure herbacée apparaît comme la plus différente avec le taux de réussite le plus bas pour *C. cyanus*. D'une manière générale, la réussite du bleuet dans les autres compartiments est dépendante de la culture. Dans la moutarde, les plantes ont un succès plus élevé en interface et celui-ci diminue en allant vers le plein champ ($PC < F < I$). Une augmentation du niveau de perturbation est généralement observée de l'interface vers le plein champ (travail du sol, fertilisation, compétition avec la culture) permettant aux espèces annuelles adventices des cultures de se maintenir en interface malgré les perturbations (Fried et al., 2007) et expliquant la réussite du bleuet dans ce compartiment. Dans le blé, le succès du bleuet est plus élevé dans la F puis diminue en PC et I ($I < PC < F$). Le nombre de capitules produit par plante est supérieur dans la moutarde alors que, dans le blé, le nombre d'akènes produits est plus grand. Il semble que les bleuets dans le blé arrivent à compenser le nombre de capitules plus faible en produisant plus d'akènes, augmentant ainsi leur succès reproducteur. Dans cette expérimentation, l'absence d'herbicides a probablement eu un impact sur la réussite de l'espèce. Généralement, leur application réduit fortement la densité d'adventices dans les parcelles cultivées (F et PC). Ainsi, lorsque que des herbicides sont appliqués dans une parcelle et que la BH est entretenue (fauchage, broyage, ...), l'interface pourrait être alors considérée comme une zone refuge pour le bleuet. En effet, dans ce milieu la compétition avec la culture est plus faible et les applications d'herbicides moins efficaces, ce qui permettrait à l'espèce de se maintenir. D'autres espèces caractéristiques du plein champ se retrouvent actuellement aussi cantonnées dans l'interface de la culture comme *Gallium aparine* et *Viola arvensis* (Gardarin et al., 2007).

5) REFERENCES

- Andersson, T.N., Milberg, P., 1998. Weed flora and the relative importance of site, crop, crop rotation, and nitrogen. *Weed Sci.* 46, 30-38.
- CETIOM 2002. Tournesol : les techniques culturales, le contexte économique. Grignon, CETIOM.
- Cordeau, S., 2010. Conséquences de la mise en place des bandes enherbées sur l'évolution de la flore adventice. Thèse de l'Université de Bourgogne.
- Critchley, C.N.R., Fowbert, J.A., Sherwood, A.J., 2006. The effects of annual cultivation on plant community composition of uncropped arable field boundary strips. *Agric. Ecosys. Environ.* 113, 196-205.
- Donald, P.F., Sanderson, F.J., Burfield, I.J., van Bommel, F.P.J., 2006. Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990-2000. *Agric. Ecosys. Environ.* 116, 189-196.
- Dutoit, T., Buisson, E., Gerbaud, E., Roche, P., Tatoni, T., 2007. The status of transitions between cultivated fields and their boundaries: écotones, écoclines or edge effects? *Acta. Oecol.* 31, 127-136.
- Fried, G., Norton, L., Reboud, X., 2008. Environmental and management factors determining weed species composition and diversity in France. *Agric. Ecosys. Environ.* 128, 68-76.
- Fried, G., Girod, C., Jacquot, M., Dessaint, F., 2007. Répartition de la flore adventice à l'échelle d'un paysage agricole : analyse de la diversité des pleins champs et des bordures. Conférence du COLUMA - journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes (AFPP), Dijon 245-254.
- Gardarin, A., Tremoy, M., Bretagnolle, F., Chauvel, B., 2007. Repartition de la flore adventice à l'échelle d'un paysage : gradient écologique des espèces observées. Conférence du COLUMA – journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes (afpp). Dijon 305-314.
- Greaves, M.P., Marshall, E.J.P., 1987. Field margins: definitions and statistics. *Field margins*, British Crop Protection Council, London (Way, J.M., Greig-Smith, P.W.), 3-10.
- Gregory, R.D., van Strien, A., Vorisek, P., Meyling, A.W.G., Noble, D.G., Foppen, R.P.B., Gibbons, D.W., 2005. Developing indicators for European birds. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 269-288.
- Hallgren, E., Palmer, M.W., Milberg, P., 1999. Data diving with cross-validation: an investigation of broad-scale gradients in Swedish weed communities. *J. Ecol.* 87, 1037-1051.
- Le Coeur, D., Baudry, J., Burel, F., 1997. Field margins plant assemblages: variation partitioning between local and landscape factors. *Landsc. Urban Plan.* 37, 57-71.
- Lienert, J., Fischer, M., 2003. Habitat fragmentation affects the common wetland specialist *Primula farinosa* in north-east Switzerland. *J. Ecol.* 91, 587-599.
- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, DC.

- Reibel, C., Guillemin, J.P., Cordeau, S., Chauvel, B., 2010. Ability of seedling emergence and plant establishment of weeds in sown grass strips. Conférence du COLUMA - journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes (AFPP), Dijon 177-184.
- Robinson, R.A., Sutherland, W.J., 2002. Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *J. Appl. Ecol.* 39, 157-176.
- Smart, S.M., Bunce, R.G.H., Firbank, L.G., Coward, P., 2002. Do field boundaries act as refugia for grassland plant species diversity in intensively managed agricultural landscapes in Britain? *Agric. Ecosyst. Environ.* 91, 73-87.
- Sosnoskie, L.M., Luschei, E.C., Fanning, M.A., 2007. Field margin weed-species diversity in relation to landscape attributes and adjacent land use. *Weed Sci.* 55, 129-136.
- Sutcliffe, O.L., Kay, Q.O.N., 2000. Changes in the arable flora of central southern England since the 1960s. *Biol. Conserv.* 93, 1-8.
- Trakhtenbrot, A., Nathan, R., Perry, G., Richardson, D.M., 2005. The importance of long-distance characterization of nine new microsatellite markers in *Taraxacum* (Asteraceae). *Mol. Ecol. Notes.* 4, 645-648.
- Violle, C., Navas, M.L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos.* 116, 882-892.
- Young, A.G., Brown, A.H.D., Zich, F.A., 1999. Genetic Structure of fragmented Populations of the endangered Daisy *Rutidosis leptorhynchoides*. *Conser. Biol.* 13, 256-265.

E- POINTS MARQUANTS DU CHAPITRE

Les trois parties de ce chapitre ont permis de dégager des éléments de biologie majeurs pour comprendre aussi bien la régression que le maintien du bleuet. Ainsi, *C. cyanus* n'est pas strictement auto-incompatible. Il existe une proportion non négligeable d'individus **pseudo auto-compatibles** au sein des populations quel que soit leur taille et leur niveau supposé d'isolement. La présence de **pollinisateurs est indispensable** pour la fécondation. Il ne semble **pas y avoir d'évolution vers un système d'auto-compatibilité** dans la région où le bleuet est en voie de raréfaction. Cette flexibilité du système de reproduction peut s'avérer être un avantage lorsque la diversité des allèles-S est faible dans une population isolée et/ou de petite taille.

Dès que le coefficient de consanguinité dépasse 0,5, les allèles délétères sont fortement exprimés provoquant une très faible germination chez ces akènes et les plantes qui arrivent à germer sont fortement désavantagées tout au long de leur cycle de vie. Par contre, les plantes avec un coefficient de consanguinité plus faible ($<0,5$) ont une valeur phénotypique équivalente aux individus sans consanguinité. Le bleuet **tolère ainsi un faible niveau de consanguinité** qui pourrait permettre le maintien des populations isolées et/ou de petites tailles qui se sont reproduits avec des individus génétiquement proches, *via* la pseudo auto-compatibilité.

Le bleuet est une espèce avec une **faible persistance des akènes** dans le sol. La capacité de survie des akènes reste stable environ 2 ans (avec une variation inter-population), au-delà, elle décline rapidement. Cette faible persistance est un désavantage pour l'espèce dans les parcelles présentant des rotations sans cultures d'hiver durant plus de deux années ou lorsque les techniques de lutte contre les adventices sont très efficaces et détruisent tous les bleuets levés.

Les akènes de *Centaurea cyanus* ne présentent qu'une **dormance secondaire de type saisonnière** (2 pics de germination, un à l'automne et un au printemps). Dès que les conditions de température et de lumière sont idéales, le bleuet est capable de germer rapidement. Ces caractéristiques biologiques sont un avantage dans un milieu perturbé où le temps entre la germination et la reproduction est limité (moissons). Le bleuet est, ainsi, une espèce **opportuniste typique de la stratégie C**.

Le bleuet est une espèce ayant **deux cohortes de germination**, une majoritaire en **automne** et une minoritaire au **printemps**. Dans une culture d'hiver, les cohortes de

printemps sont désavantagées et doivent accomplir l'ensemble de leur cycle de vie sur un laps de temps court (moins de 3 mois). Le succès reproducteur de ces cohortes est donc plus faible. Les printanières seront, par contre, avantagées sur les automnales (qui seront totalement absentes) dans une culture d'été comme le tournesol. Il est probable que la présence de deux cohortes de germination soit due au comportement opportuniste de l'espèce qui induit la germination dès que les conditions environnementales sont favorables. La présence d'une composante génétique serait à vérifier mais cela semble peu probable étant donné que le bleuet n'est pas une espèce dormante.

C. cyanus est **favorisé dans les cultures de dicotylédones** (moutarde et colza) avec une meilleure levée et croissance, par rapport aux monocotylédones (blé, orge) qui sont plus compétitives entraînant une levée et une croissance réduites. C'est peut-être la raison de sa présence dans les colzas d'hiver bien que ce soit une messicole, *a priori* typique des moissons de céréales. L'insensibilité aux herbicides du colza y a sûrement contribué aussi. Le colza pourrait donc être une opportunité pour son retour dans les champs.

La réussite du bleuet dans un compartiment apparaît être dépendante de la culture ainsi que des espèces adventices présentes. La présence de Poacées, espèces très compétitives, en forte densité semblent être parmi les variables qui ont le plus d'impacts sur la distribution du bleuet dans les compartiments du paysage agricole en absence de traitement herbicide dans la parcelle cultivée et de fauche dans sa bordure herbacée (Svensson & Wigren, 1985 ; Fried et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats permettent d'avoir une vision relativement globale des caractéristiques biologiques qui peuvent avoir un impact sur la réussite ou la raréfaction du bleuet dans certaines régions d'Europe. La faible persistance des akènes, le faible niveau de compétitivité face aux autres adventices (Svensson & Wigren, 1985), le système d'auto-incompatibilité et la nécessité de pollinisateurs pour la fécondation sont probablement les facteurs les plus défavorables au maintien de cette espèce aujourd'hui.

Dans les populations de petites tailles et/ou isolées la diversité génétique des allèles-S d'auto-incompatibilité ne peut pas être maintenue simplement à l'aide de la banque de semence du sol. En cas d'apparition d'une mutation dans une population, les akènes dans le sol n'opposeraient pas d'effet tampon important, permettant ainsi à celle-ci d'envahir rapidement la population. Il apparaît donc important de mieux comprendre le fonctionnement génétique des populations de bleuet dans le paysage agricole.

Caractéristiques biologiques qui peuvent expliquer sa raréfaction :

- Faible persistance des akènes dans le temps
- Peu compétitive
- Le système d'auto-incompatibilité
- Les pollinisateurs sont nécessaires pour sa reproduction
- Légère tolérance pour la consanguinité

Caractéristiques biologiques qui pourraient rassurer sur son avenir :

- Présence de deux cohortes, une automnale et une printanière
- Espèce opportuniste (non dormante et qui germe très rapidement)
- Flexibilité du système de reproduction (individus pseudo auto-compatibles)
- Légère tolérance pour la consanguinité

CHA PITR E II

*« Ce qui donne à un individu sa valeur génétique, ce n'est pas la
qualité propre de ses gènes. C'est qu'il n'a pas la même collection de
gènes que les autres. » François Jacob*

Y a-t-il une structuration génétique des populations de *Centaurea cyanus* L. en Bourgogne ?

A- INTRODUCTION GENERALE

L'intensification des pratiques agricoles depuis les années 1950 a profondément changé l'agroécosystème. Le paysage, autrefois, composé d'une mosaïque de petites parcelles a été remanié et est maintenant formé de grandes parcelles. Ce changement a provoqué une potentielle perte des connections entre les populations pouvant entraîner l'expression de la consanguinité ou de la dérive génétique qui, à terme, peut mener à l'extinction d'une population. Actuellement, un déclin de certaines espèces spécialistes des agroécosystèmes telles que des oiseaux ou des espèces végétales de type messicoles a lieu. Ce déclin, s'il est dû à un isolement, peut entraîner une perte de la diversité génétique des populations. Cependant, si cette diversité diminue, cela peut altérer la capacité d'adaptation des populations aux changements environnementaux ce qui peut être problématique dans l'agroécosystème qui est un milieu particulièrement perturbé.

→ *Estimer la diversité et la structuration génétique des populations d'espèces en voie de raréfaction dans le paysage agricole est important afin de comprendre les causes de leurs raréfactions.*

Le bleuet est une messicole spécialiste des parcelles cultivées dont les populations sont stables et fréquentes dans l'est de la France (Bourgogne) et en voie de raréfaction dans l'ouest (Poitou-Charentes). Cette espèce possède un système d'auto-incompatibilité qui induit la nécessité d'une diversité génétique importante dans les populations mais aussi un élément de son maintien.

**B- Y A-T-IL UNE STRUCTURATION
GENETIQUE DES POPULATIONS DE
CENTAUREA CYANUS EN BOURGOGNE ?**

1) INTRODUCTION

Certaines activités humaines seraient à l'origine d'une partie de l'érosion de la diversité biologique, actuellement observée dans le monde (Pimm & Raven, 2000). La fragmentation du paysage est une des conséquences de l'activité humaine et représenterait une menace majeure au maintien des espèces (Brooks et al., 2002; Reed, 2004). Elle provoque une diminution des connections entre les populations (Trakhtenbrot et al., 2005) et les rend plus vulnérables à la stochasticité démographique et environnementale. L'isolement géographique d'une population entraîne une limitation des flux de gènes et peut induire une diminution de la variabilité génétique pour les espèces allogames (Young et al., 1999) causée par la consanguinité et la dérive génétique (Hensen & Oberprieler, 2005). Ce phénomène peut provoquer une diminution de la valeur phénotypique et adaptative des individus, et ainsi, mener à une extinction des populations (Höglund, 2009).

Les agroécosystèmes sont des milieux créés par l'homme, fortement et régulièrement perturbés. Ils représentent actuellement entre 24 et 34% des écosystèmes terrestres de la planète (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Suite à un changement des pratiques culturelles au cours des années 1950, on assiste à une réduction de la faune et de la flore spécialistes des milieux agricoles (Peeters & Janssens, 1995). Ce déclin est dû, entre autres, à une fragmentation des populations entraînant une perte des connections et à un apport quasi-systématique d'intrants modifiant les propriétés du milieu (engrais et pesticides). Chez les plantes, la distribution spatiale de la variabilité génétique est principalement déterminée par la capacité de dispersion des semences et du pollen, dans le cas des espèces allogames, et la répartition de l'espèce dans le paysage (Epperson, 1993 ; Muraya et al., 2011). Une population isolée à faible capacité de dispersion des semences et du pollen sera plus rapidement touchée par la consanguinité et la dérive génétique (Epperson, 2004). La limitation des flux de gènes est, ainsi, fortement liée au mode de reproduction de l'espèce (Lowe et al., 2004) et à la configuration du paysage. En effet, lorsqu'une espèce occupe un large territoire, des différenciations locales dues à des barrières de dispersion peuvent altérer les processus liés aux flux de gènes (Gerlach & Musolf, 2000) et donc favoriser l'émergence d'une structuration génétique. Parmi les espèces les plus touchées par la fragmentation des populations dans les agro-écosystèmes se trouvent les adventices des cultures et en particulier les espèces dites messicoles (espèces commensales des moissons) dont fait partie le bleuet (*Centaurea cyanus* L.).

Le bleuet est une Astéracée annuelle, diploïde et strictement entomophile. Encore commun dans les parcelles agricoles au milieu du XX^{ème} siècle, il est actuellement en voie de raréfaction dans l'ouest de l'Europe (Baron, 1989; Sutcliffe & Kay, 2000). *C. cyanus* est une espèce emblématique à valeur patrimoniale en France qui représente une ressource de pollen et de nectar pour les pollinisateurs comme d'autres espèces du genre *Centaurea* (Harrod & Taylor, 1995). Le bleuet germe essentiellement en automne. On le retrouve généralement dans les céréales d'hiver et les colzas, principalement en interface (limite entre la parcelle et la première rangée de semis) et dans les six premiers mètres de la parcelle. Le bleuet étant entomophile, les flux de pollen dans le paysage sont donc dépendants de la distance parcourue par les pollinisateurs. La dispersion des akènes se fait généralement sur de courtes distances et peut être de type barochore (gravité), myrmécochore (fourmis) ou hydrochore (eau). La distance géographique entre deux populations représente un des facteurs déterminant de la différenciation génétique (Slatkin, 1993). *C. cyanus* possède, par ailleurs, un système d'auto-incompatibilité qui empêche l'autofécondation et la reproduction entre individus génétiquement proches. Une expérimentation en serre a cependant montré que des individus, quelle que soit la taille de leur population d'origine, pouvaient être pseudo auto-compatibles (chapitre 2.D.II).

Afin de mieux comprendre la structuration génétique des populations dans un paysage agricole de Bourgogne, des populations supposées de bleuets ont été échantillonnées dans la zone atelier de l'UMR Biologie et Gestion des Adventices (UMR BGA) de Fénay ainsi que dans ses alentours afin : i) de mieux comprendre les liens de parenté entre individus, mais aussi ii) dans le but de cerner les limites géographiques des populations et leur degré d'isolement.

2) MATERIELS ET METHODES

2.1 Identification de marqueurs spécifiques du bleuet

L'identification des marqueurs microsatellites a été effectuée par la société Ecogenics (Wagistrasse 23 – 8952 Zurich-Schlieren, Switzerland). Onze marqueurs spécifiques à *Centaurea cyanus* L. et polymorphes pour un échantillon de bleuets d'origines Européennes variées ont ainsi été développés et dix ont été retenus pour le génotypage des plantes (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des 10 microsatellites développés pour le bleuet. Pour chaque paire d'amorce, la séquence *Forward* et *Reverse* est donnée ainsi que le motif répété avec en indice le nombre de répétitions par motif, la gamme de tailles observées et la température d'hybridation (Tm).

Locus	Séquences des amorces (5' - 3')	Motif répété	Intervalle de taille (pb)	Tm (°C)
Cencya02	F: CTCACCTACTGATTAACCTCCGTCT R: TGCGGACAACTATTGTAAAACG	(GT) ₃ (AT) (GT) ₁₂ (GC) (GT) ₃	127-253	50
Cencya03	F: GCTTGAGGCATGGGTCTTAG R: CGTTGGATGAGAAATGAACG	(TG) ₁₄	201-271	56
Cencya04	F: ACAAGATGGGGACTTTATATGTG R: GAGAGGGCATGGGATTAATAAG	(TG) ₂₃	116-220	56
Cencya07	F: CTTCTCCAACCTTTGAGCTG R: CACCGCAATCTAGTTCCAATC	(AG) ₂₀	64-168	56
Cencya15	F: GCTCGCAAGTTGTCTCGTATC R: CCATTGCTTTTAGGTTTCTGC	(CT) ₁₆ (TT) (CT) ₉	70-234	50
Cencya16	F: CAGTCACCCAGGAGGTCAAG R: CACCTTTCAGACGTTACGG	(GT) ₁₅	138-170	56
Cencya17	F: TGCTTCTGTTTCCAACATTATCAG R: CCAGTGGTCGTTTCTTCTTG	(GT) ₁₇	120-164	56
Cencya19	F: TTCTGTCTGCGACAATGGAC R: TGAAAATTTGGTGAGAATGGAG	(TC) ₃ (CA) (TC) ₁₆ (AC) ₁₂	69-219	56
Cencya20	F: CAACCGGATATGGATTTTGG R: AGTCGTAAAGGCGGTAGACG	(TG) ₉ (AG) ₂₀	137-282	50
Cencya24	F: GTTCCCCTCATTAACCGATG R: CCCGACTTGTTTGAATAGTGC	(GT) ₁₅	109-181	56

2.2 Caractérisation génétique des populations de Côte d'Or

Echantillonnage de la diversité à l'échelle d'une zone atelier

La zone atelier de l'UMR BGA se situe sur la commune de Fénay, au sud-est de Dijon, en Côte d'or. Elle est composée de 130 parcelles agricoles et représente une surface de 8 km². Un repérage des bleuets a été fait au préalable entre 2006 et 2007. Quatre zones avec des bleuets ont ainsi été identifiées (Tableau 2). Elles sont localisées à l'est de la zone atelier et s'étalent sur une surface de 4 km² (Figure 1). Chaque individu a été attribué à une population putative suivant sa localisation géographique. Les individus sont par ailleurs identifiés en fonction de la parcelle et du compartiment (interface ou plein champ) auxquels ils appartiennent. Neuf parcelles ont ainsi été repérées avec des populations de bleuet en interface et/ou en plein champ (Figure 1). En 2008 et 2009, pour chaque population supposée,

un morceau de feuille a été prélevé aléatoirement sur 30 plantes géoréférencées à l'aide d'un GPS (Magellan, SportTrak Color). Quatre zones ont été définies suivant la proximité entre les parcelles : la zone 1 avec les plantes des champs 021 et 086, la zone 2 avec les individus issus des parcelles 134, 045 et 099, la zone 3 contenant les champs 203 et 204 et enfin la zone 4 avec les plantes des parcelles 206 et 207 (Figure 2 et 3). En 2008, seules les interfaces des zones 1 (37 plantes), 2 (21 plantes) et 3 (22 plantes) ont été échantillonnées (Figure 2 & Tableau 2), soit 67 plantes. En 2009, les interfaces des neuf parcelles (40 plantes dans la zone 1, 77 dans la zone 2, 18 dans la zone 3 et 36 dans la zone 4) ainsi que deux pleins champs (39 plantes dans la zone 2 et 30 dans la zone 4) ont été échantillonnées dans la zone atelier de Féney. Quatre parcelles supplémentaires (56 plantes au total) se trouvant hors de la zone atelier et à des distances variables ont aussi été échantillonnées en 2009 (Figure 3, Tableaux 2 & 3). Dans le cas où l'effectif de la population putative est inférieur à 30 plantes, l'échantillonnage est exhaustif.

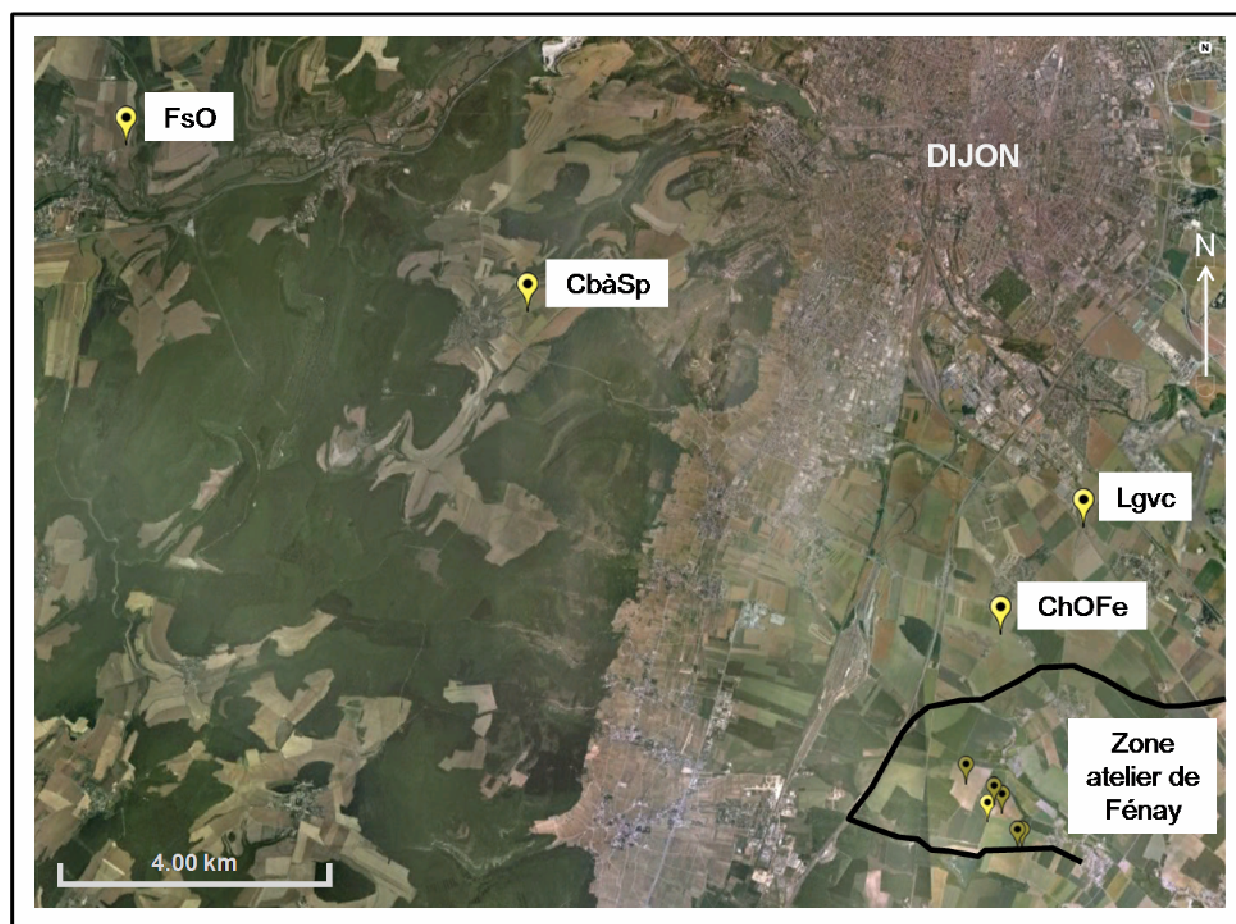


Figure 1 : Localisation des populations échantillonnées dans la zone atelier de Féney en 2008 et/ou 2009 (délimitation de la zone atelier indiquée par un trait noir) et aux alentours en 2009: ChOFe (Domois), Lgvc (Longvic), CbàSp (Corcelles-les-Monts) et FsO (Fleurey-sur-Ouche).

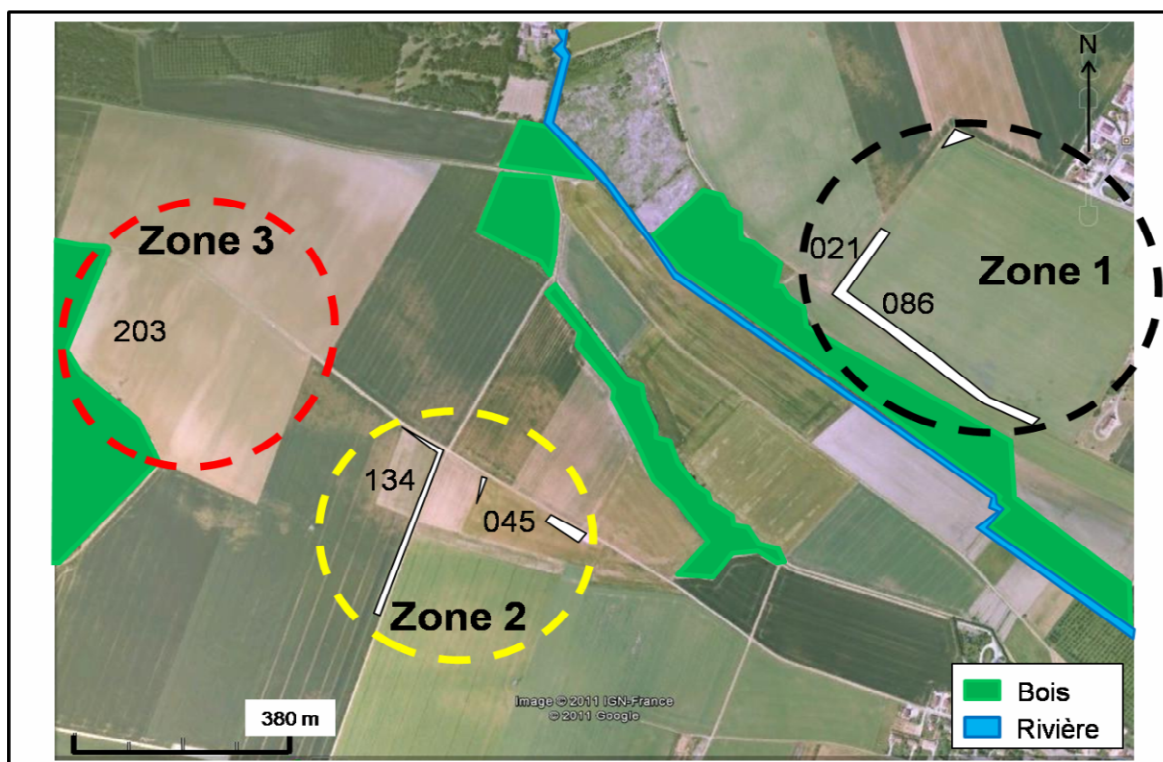


Figure 2 : Localisation des populations échantillonnées en 2008 sur la zone atelier de Fénay. En blanc, les interfaces prélevées. La zone 1 est indiquée par un rond noir, la zone 2 par un jaune et la zone 3 par un rond rouge.

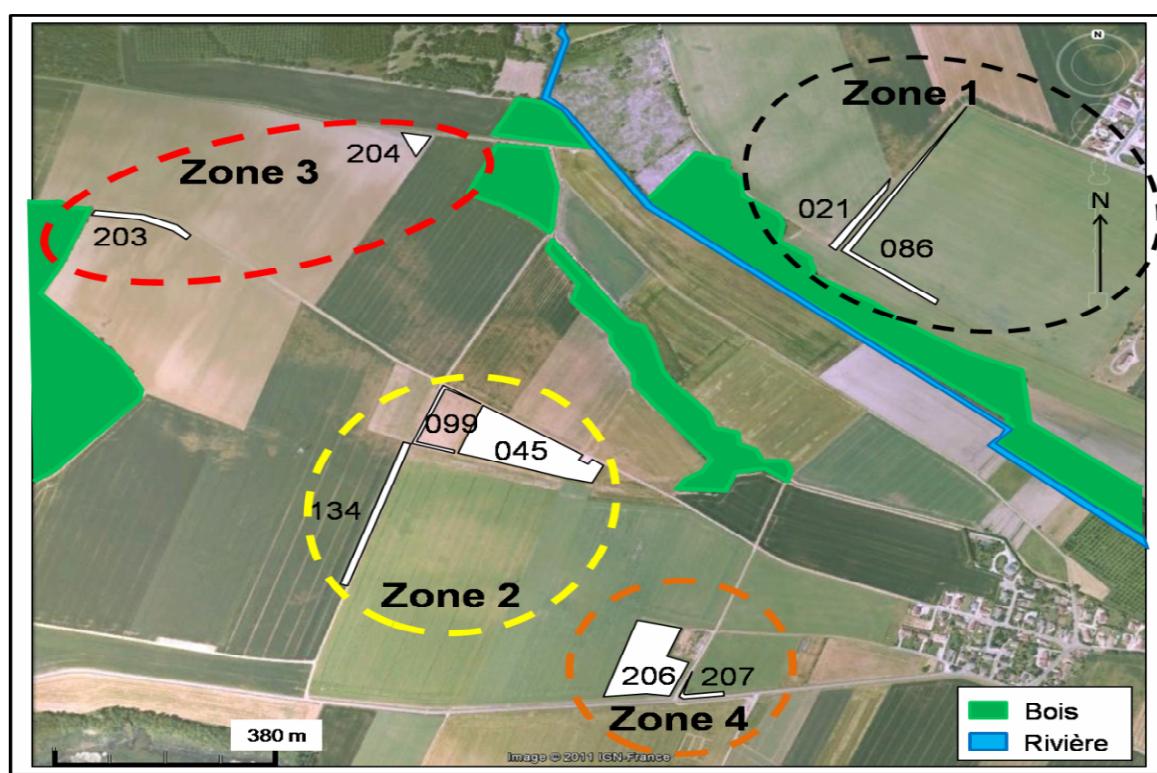


Figure 3 : Localisation des populations échantillonnées en 2009 sur la zone atelier de Fénay, en blanc, les zones prélevées. La zone 1 est indiquée par un rond noir, la zone 2 par un jaune, la 3 par un rouge et la zone 4 par un rond orange.

Tableau 2 : Individus échantillonnés et géotypés en Côte d’Or, en 2008 et 2009, dans la zone atelier de Féney (neuf parcelles) et ses alentours (quatre localités). Le Compartiment Echantillonné (CE) *i.e.*, l’Interface (I) ou le Plein Champ (PC) est précisé ainsi que le Nombre d’individus Prélevés (NP) puis le Nombre de plantes Géotypés (NG).

Parcelles		2008			2009		
		CE	NP	NG	CE	NP	NG
Zone atelier de Féney Zone 1	086	I	11	1	I	30	28
	021	I	26	1	I	10	8
	Total		37	2		40	36
Zone atelier de Féney Zone 2	045	I	13	2	I + PC	39I + 30PC	21I + 23PC
	099	-	-		I	30	28
	134	I	8	1	I	16	10
	Total		21	3		85I + 30PC	59I + 23PC
Zone atelier de Féney Zone 3	203	I	22	1	I	12	12
	204	-	-		I	7	7
	Total		22	1		19	19
Zone atelier de Féney Zone 4	206	-	-		I + PC	16I + 30PC	16I + 20PC
	207	-	-		I	20	18
	Total		-			36I + 30PC	34I + 20PC
Alentours	ChOFe	-	-		I	17	12
	Lgvc	-	-		I	8	1
	Cbà Sp	-	-		I	21	16
	FsO	-	-		I	10	3
	Total		-			56	32
TOTAL			70	6		296	223

Tableau 3 : Matrice des distances (en km) séparant les différents lieux d'échantillonnages, soit neuf parcelles dans la zone atelier de Féney (086, 021, 045, 099, 134, 203, 203, 206, et 207) et quatre parcelles autour de celle-ci (ChoFe, Lgvc, CbàSp et FsO).

		Zone atelier de Féney									Alentours			
	Parcelles	086	021	045	099	134	203	204	206	207	ChOFe	Lgvc	CbàSp	Fso
Zone atelier de Féney Zone 1	086	0												
	021	0,1	0											
Zone atelier de Féney Zone 2	045	0,8	0,9	0										
	099	0,8	0,9	0,1	0									
	134	0,9	1	0,1	0,1	0								
Zone atelier de Féney Zone 3	203	1,2	1,3	0,8	0,7	0,7	0							
	204	0,8	0,8	0,6	0,6	0,7	0,5	0						
Zone atelier de Féney Zone 4	206	1,1	1,2	0,6	0,6	0,7	1,3	1,2	0					
	207	1,1	1,2	0,7	0,7	0,8	1,4	1,3	0,1	0				
Alentours	ChOFe	2,5	2,3	2,7	2,7	2,8	2,4	2,1	3,4	3,4	0			
	Lgvc	4,1	4	4,7	4,7	4,8	4,4	4	5,2	5,2	2	0		
	CbàSp	10,8	10,6	10,5	10,4	10,4	9,7	9,9	11,5	11,1	8,6	8,9	0	
	FsO	17,1	16,9	16,9	16,8	16,8	16	16,2	17,2	17,3	15,3	15,7	6,7	0

Extraction et analyses des microsatellites

50 mg de matériel végétal ont été prélevés et placés dans des plaques de 96 puits de type deepwell 1,2 ml. Les plaques ont ensuite été envoyées pour l'extraction d'ADN et le génotypage à une plateforme de génotypage (Plateforme de Génotypage Gentyane, INRA, Clermont-Ferrand, France). L'ADN a été extrait selon le protocole Qiagen Biosprint 96 et amplifié à l'aide des dix marqueurs microsatellites (Tableau 1) dans les conditions suivantes : 95°C pendant 5min suivi de 7 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 62°C et 30 sec à 72°C puis, 30 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C et 30 sec à 72°C, suivit de 8 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 56°C et 30 sec à 72°C et une étape finale de 5 min à 72°C. Les produits PCR obtenus sont marqués (FAM, NED, VIC, PET) et lus sur séquenceur ABI 3730XL (Applied

Biosystems, Foster City, California, USA) avec une échelle standard de 500bp. La taille des allèles est ensuite déterminée à l'aide du logiciel Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems).

Analyses génétiques

- Diversité génétique

Les paramètres liés à la diversité génétique tels que l'équilibre d'Hardy-Weinberg (HW), le nombre d'allèles par locus (N_a), l'hétérozygotie observée (H_o = nombre d'hétérozygote / N) et l'hétérozygotie attendue non biaisée (H_e = $(2N / (2N-1)) * H_o$ (hétérozygotie observée)), N correspondant au nombre total d'individus, ont été obtenus avec le logiciel GenAlex 6.4 (Peakall & Smouse, 2006). Les différenciations entre populations ou F_{st} ont été calculées par le logiciel ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier et al., 2006), avec 100000 itérations pour la Chaîne de Markov et 10000 périodes de pré-calcul. Le déséquilibre de liaison a été testé à l'aide du logiciel FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995). Le niveau de significativité utilisé est de $\alpha < 0,05$. La correction séquentielle de Bonferroni (α est divisé par le nombre de loci, soit 10, $\alpha < 0,005$) a été utilisée pour les comparaisons multiples (Rice, 1989).

- Structuration génétique dans le paysage

Le coefficient de parenté par paire de Loiselle (Loiselle et al., 1995) entre individus et suivant des classes de distance a été déterminé avec le logiciel SpaGeDi (Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity, Hardy & Vekemans, 2002). Des tests de permutation (1000 permutations) ont été effectués pour vérifier la significativité de la parenté au sein des classes de distances. L'erreur standard a été estimée par une procédure de Jackknife.

Afin de caractériser la structure de la diversité génétique, deux différentes approches ont été utilisées. Dans un premier temps, une approche bayésienne de regroupement a été effectuée. Cette méthode, développée dans STRUCTURE (Pritchard et al., 2000, <http://pritch.bsd.uchicago.edu>), permet d'affecter les individus dans des sous-populations liées à l'information multilocus. La première étape de ce modèle est d'estimer le nombre de populations K . Pour se faire, 30 itérations indépendantes allant de $K=1$ à 12 populations ont été effectuées. Les paramètres utilisés pour le modèle sont 5000 MCMC répétitions et 50000 pré-calculs en utilisant le modèle avec accréation des populations et en supposant que les fréquences alléliques soient corrélées. L'estimation du nombre de populations (ΔK) est calculée suivant la méthode donnée par Evanno et al., (2005). Le modèle détecte le nombre de populations en estimant, pour chaque simulation, la probabilité ou vraisemblance de K . Cette valeur est appelée $\text{LnP}(D)$ ou LnK . Pour chaque K , la valeur moyenne de LnK des 30

simulations est calculée avec l'écart type correspondant. La différence moyenne des vraisemblances entre les valeurs successives de K ($\Delta K = \ln K - \ln (K-1)$) puis la valeur absolue de la différence entre les valeurs successives de ΔK ($|\Delta K| = |\Delta K - \Delta K|$) est déterminée. Le ΔK correspond à la valeur moyenne absolue de $|\Delta K|$ pour les 30 simulations divisée par l'écart type de $\ln K$. Le nombre de populations correspond à la valeur de ΔK la plus élevée. Le logiciel CLUMPP v1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007) a ensuite été utilisé pour fusionner les résultats des 30 simulations pour chaque K lorsqu'un nombre de population a été déterminé. Les résultats sont représentés à l'aide du logiciel DISTRUCT v1.1 (Rosenberg 2004).

La deuxième approche utilisée est une analyse discriminante en composante principale (DAPC) (Jombart et al., 2010) qui permet l'identification du nombre de clusters génétiques via l'étude de la variation génétique des individus échantillonnés. Cette méthode multivariée définit un modèle qui sépare la variation entre groupes (variabilité génétique structurée) de celle à l'intérieur du groupe (variabilité génétique aléatoire), estimant ainsi une variable maximisant la première et minimisant la deuxième. Le principal avantage de cette approche multivariée est l'absence d'hypothèse au préalable sur la génétique des populations (équilibre HW, déséquilibre de liaison). Le nombre de clusters génétique est identifié à l'aide d'un modèle statistique et de sa vraisemblance associée (fonction *find.cluster*) qui correspond à la plus faible valeur du critère bayésien d'information (BIC). Le nombre de clusters génétique permet ensuite d'effectuer la DAPC. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R à l'aide du package Adegenet.

3) RESULTATS

En 2008, seul six individus ont pu être génotypés sur les 70 initialement échantillonnés, le matériel végétal n'étant probablement pas de suffisamment bonne qualité. Les analyses sur la diversité génétique et la structuration des populations dans le paysage n'ont donc pu être faites pour 2008. En 2009, sur les 296 individus issus des 13 parcelles échantillonnées, 223 ont été génotypés (Tableau 2). Sur les quatre populations échantillonnées autour de la zone atelier, un seul individu sur les huit issus de la parcelle Lgvc et trois sur les dix issus de la parcelle FsO ont pu être génotypés (Tableau 2). Les individus de ces deux localités ont donc été retirés des analyses sur la diversité génétique et la structuration du paysage.

Tableau 4 : Nombre d'allèles par locus (Na), hétérozygotie observée (Ho) et hétérozygotie attendue (He) par locus pour chaque parcelle. L'astérisque indique que la parcelle n'est pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg au locus considéré, après une correction de Bonferonni ($\alpha < 0,005$). N correspond au nombre de plantes génotypées par parcelle ; ° lorsque, pour une parcelle, le locus est monomorphique.

Parcelles	021 (N=8)			086 (N=28)			099 (N=28)			134 (N=10)		
LOCUS	Na	Ho	He	Na	Ho	He	Na	Ho	He	Na	Ho	He
cencya03	3	0,00	0,62*	4	0,08	0,68*	6	0,08	0,69*	4	0,00	0,77*
cencya07	3	0,00	0,55	7	0,15	0,51*	4	0,15	0,44*	2	0,00	0,19*
cencya15	6	0,25	0,83	13	0,42	0,88*	13	0,48	0,84	7	0,33	0,86
cencya19	3	0,00	0,62	7	0,13	0,70*	8	0,28	0,73*	3	0,33	0,67
cencya04	4	0,25	0,75	11	0,28	0,89*	9	0,17	0,85*	1	0,00	0,00°
cencya17	4	0,63	0,64	7	0,81	0,75	5	0,67	0,68	3	0,50	0,59
cencya20	4	0,00	0,75*	14	0,50	0,89*	10	0,22	0,78*	5	0,00	0,81*
cencya02	4	0,00	0,73	6	0,10	0,80*	9	0,32	0,83*	4	0,00	0,80
cencya16	7	0,38	0,83	7	0,48	0,71*	7	0,30	0,72*	6	0,40	0,81
cencya24	2	0,00	0,50	6	0,19	0,71*	4	0,08	0,62*	4	0,00	0,51*
Parcelles	203 (N=12)			204 (N=7)			206 (N=36)			207 (N=18)		
LOCUS	Na	Ho	He	Na	Ho	He	Na	Ho	He	Na	Ho	He
cencya03	4	0,11	0,76*	2	0,00	0,30	4	0,03	0,41*	4	0,00	0,61*
cencya07	4	0,18	0,46	2	0,00	0,26	6	0,18	0,52*	4	0,19	0,38
cencya15	8	0,45	0,87	6	0,14	0,87	14	0,33	0,71*	14	0,20	0,94*
cencya19	3	0,00	0,39*	3	0,17	0,62	9	0,21	0,80*	7	0,17	0,79*
cencya04	2	0,00	0,26	4	0,25	0,75	9	0,06	0,88*	6	0,10	0,64*
cencya17	4	0,73	0,64	5	0,86	0,77	9	0,63	0,72*	5	0,61	0,62
cencya20	5	0,29	0,59	3	0,17	0,62	15	0,34	0,88*	7	0,14	0,73*
cencya02	4	0,17	0,65	3	0,00	0,48*	9	0,33	0,81*	5	0,22	0,73
cencya16	5	0,45	0,63	4	0,57	0,69	8	0,56	0,77	6	0,50	0,76
cencya24	3	0,00	0,45*	2	0,17	0,17	4	0,10	0,43*	3	0,06	0,41*
Parcelles	045 (N=44)			CbàSp (N=16)			ChOFe (N=12)					
LOCUS	Na	Ho	He	Na	Ho	He	Na	Ho	He			
cencya03	7	0,05	0,69*	6	0,13	0,73*	3	0	0,42*			
cencya07	5	0,14	0,42*	5	0,40	0,45	6	0,33	0,59*			
cencya15	16	0,32	0,85*	12	0,53	0,87	10	0,50	0,86			
cencya19	9	0,31	0,79*	6	0,31	0,74*	5	0,30	0,75			
cencya04	13	0,32	0,88*	9	0,08	0,90*	7	0,40	0,88*			
cencya17	4	0,36	0,52*	6	0,69	0,69	6	0,75	0,77			
cencya20	10	0,33	0,80*	7	0,07	0,84*	5	0,20	0,83			
cencya02	8	0,27	0,76*	4	0,00	0,70*	5	0,22	0,77*			
cencya16	7	0,50	0,76*	7	0,60	0,75	5	0,27	0,65*			
cencya24	5	0,07	0,58*	5	0,06	0,80*	4	0,10	0,49*			

3.1 Diversité génétique

Le nombre d'allèles observés par locus et par population varie de 2 à 16 allèles pour un locus dans une population, l'hétérozygotie observée varie entre 0 et 0,86 et celle attendue varie de 0 à 0,89. Aucun déséquilibre de liaison n'a été observé entre loci et aucune des parcelles échantillonnées n'est complètement à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HW) (Tableau 4). Le nombre de locus qui dévie de HW varie entre les parcelles, allant d'un locus sur les dix pour la parcelle 204 à la totalité des loci pour la parcelle 045 (Tableau 4). A chaque fois qu'il y a un déséquilibre HW, les loci sont en déficit d'hétérozygotes.

Le calcul des distances génétiques (Fst), après la correction de Bonferroni, montre que les populations ne sont pas différentes quelle que soit leur origine géographique avec des valeurs de Fst qui varient entre 0,001 et 0,091 (Tableau 5).

Tableau 5 : Distance génétique entre les populations (Fst). La composante Fst est déterminée suivant une méthode qui calcule la distance génétique entre deux populations supposées, les différences se faisant deux à deux. Une correction de Bonferroni été faite, le niveau de significativité passant à $\alpha < 0.005$.

		Zone atelier de Féney				Alentours	
		Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	ChOFe	CbàSp
Zone atelier de Féney	Zone 1	0					
	Zone 2	0,012	0				
	Zone 3	0,091	0,064	0			
	Zone 4	0,026	0,019	0,073	0		
Alentours	ChOFe	0,02	0,007	0,069	0,063	0	
	CbàSp	-0,004	0,001	0,007	0,007	0,029	0

3.2 Structuration génétique des populations

Les coefficients de Loiselle en fonction de la distance entre les individus de la zone atelier de Féney (zones 1, 2, 3 et 4) et ceux des alentours (ChOFe et CbàSp) montrent une séparation génétique des individus à partir d'une distance d'environ 550 mètres (Figure 4a). Le même niveau de résultat est observé en ne prenant en compte que les individus issus de la zone atelier de Féney (Figure 4b).

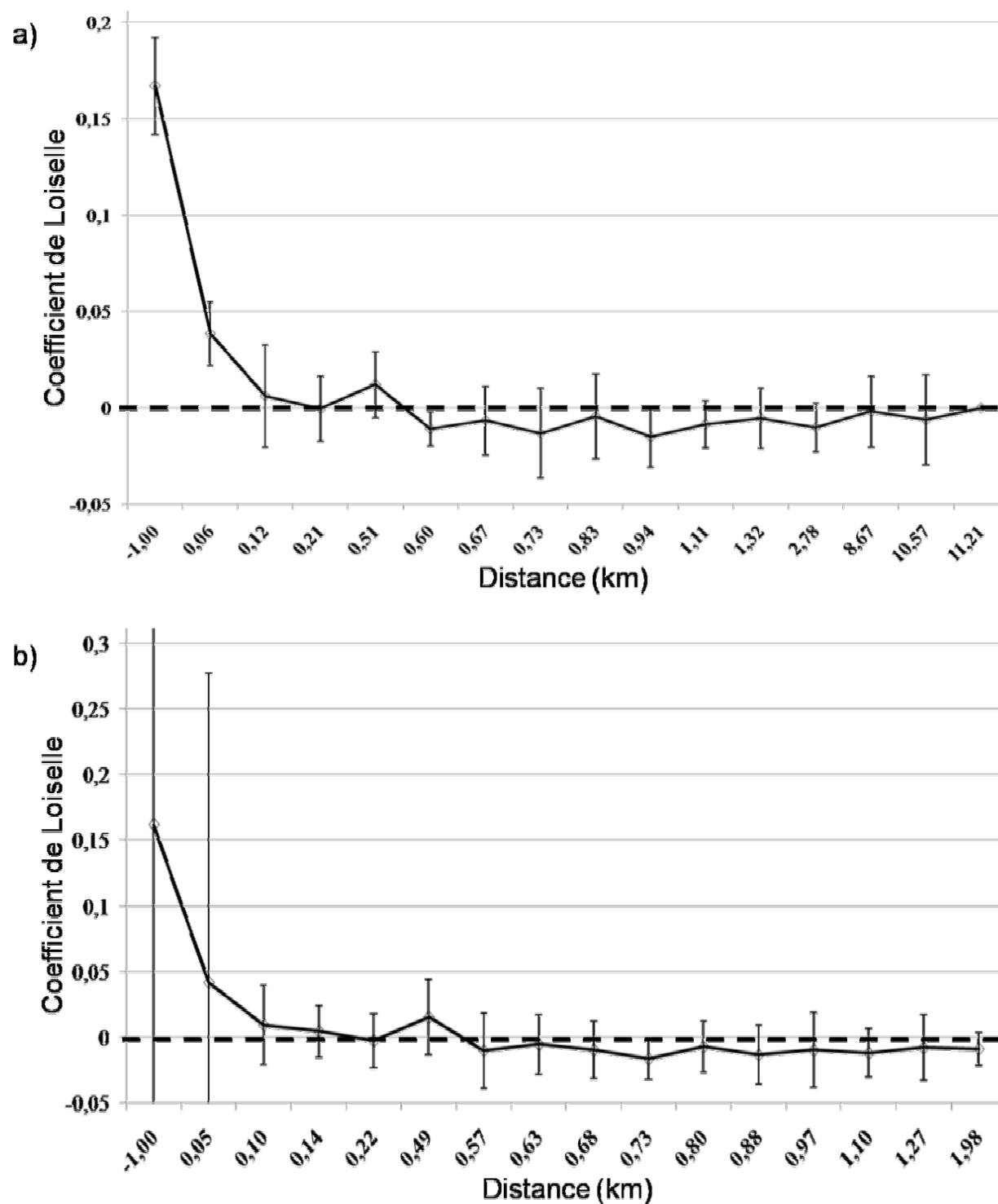


Figure 4: Relation entre le coefficient de Loiseleur (apparemment) et a) la distance entre les individus des quatre zones de la zone atelier de Fénay et les individus alentours (ChOFe et CbàSp) et b) la distance entre les individus des quatre zones de la zone atelier de Fénay.

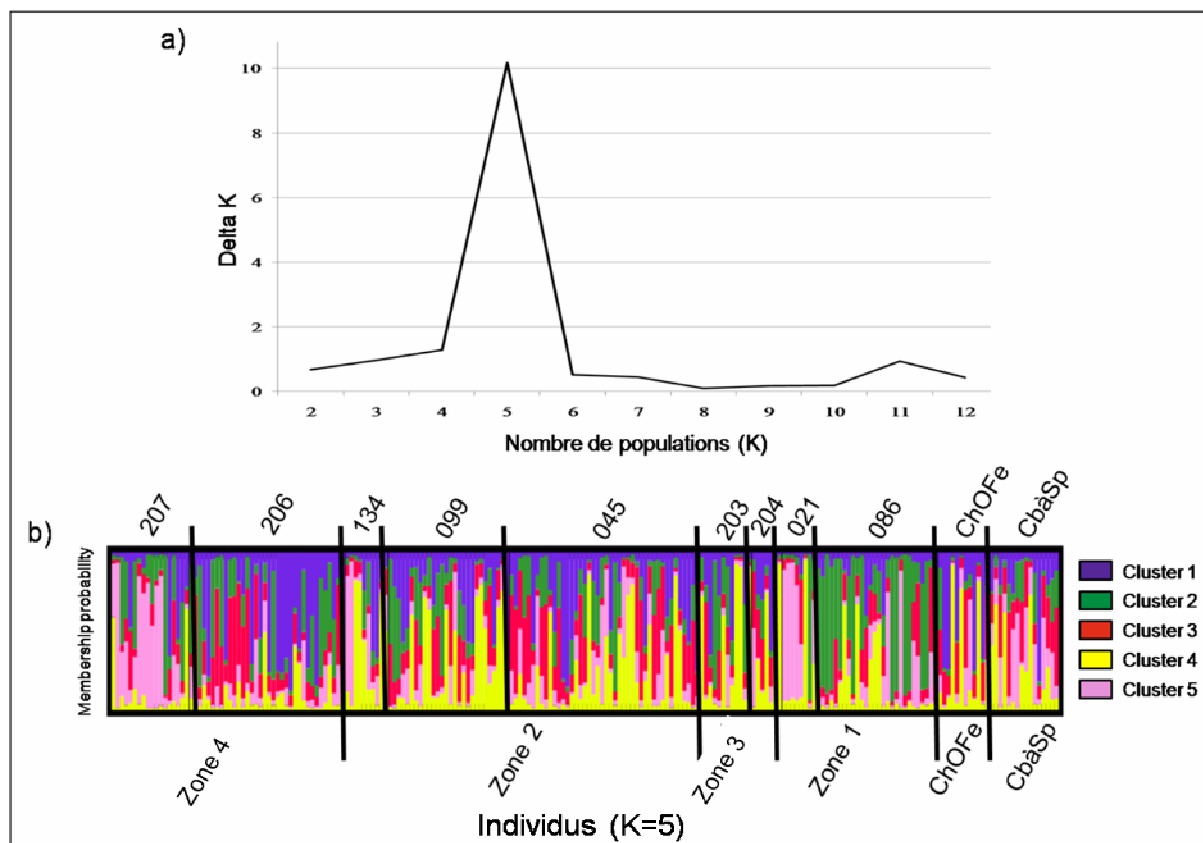


Figure 5 : Résultat de l'approche bayésienne de regroupement avec a) l'identification de la valeur de K la plus vraisemblable suivant la méthode du Delta K en fonction du nombre possible de populations et b) l'assignement des individus suivant leur localisation géographique pour un nombre de sous-population K=5. Chaque couleur représente une population génétique, les lignes verticales représentent les individus. Une plante définie par plusieurs couleurs, est considérée comme ayant des ancêtres issus de plusieurs populations génétiques. La parcelle et la zone géographique où la plante est localisée est précisée au -dessus et au bas de la figure.

L'analyse effectuée par l'approche bayésienne de regroupement pour K entre une et douze populations (30 itérations) en prenant les dix loci, montre, d'après le calcul du ΔK (Evanno et al., 2005), qu'il existerait vraisemblablement 5 populations génétiquement différentes (Figure 5a). Entre K=3 et 7, aucune structuration géographique claire de la diversité génétique n'est visible que ce soit à l'échelle des quatre zones définies à Fénay avec les deux localisations aux alentours ou au niveau de la parcelle où les plantes ont été échantillonnées (Figures 5b). Cependant, à K=5, il semble y avoir une sous-structuration géographique au niveau de la parcelle, avec les plantes de la parcelle 207 qui sont dominées par le génotype rose, tout comme celles de la parcelle 021 (Figure 5b). Les plantes de la parcelle 086 sont dominées par le génotype vert. Les bleuets des zones 2 et 4 semblent avoir le génotype jaune qui domine (Figure 5b). Quant aux individus des parcelles alentours à la zone atelier, aucun génotype ne se distingue (Figure 5b).

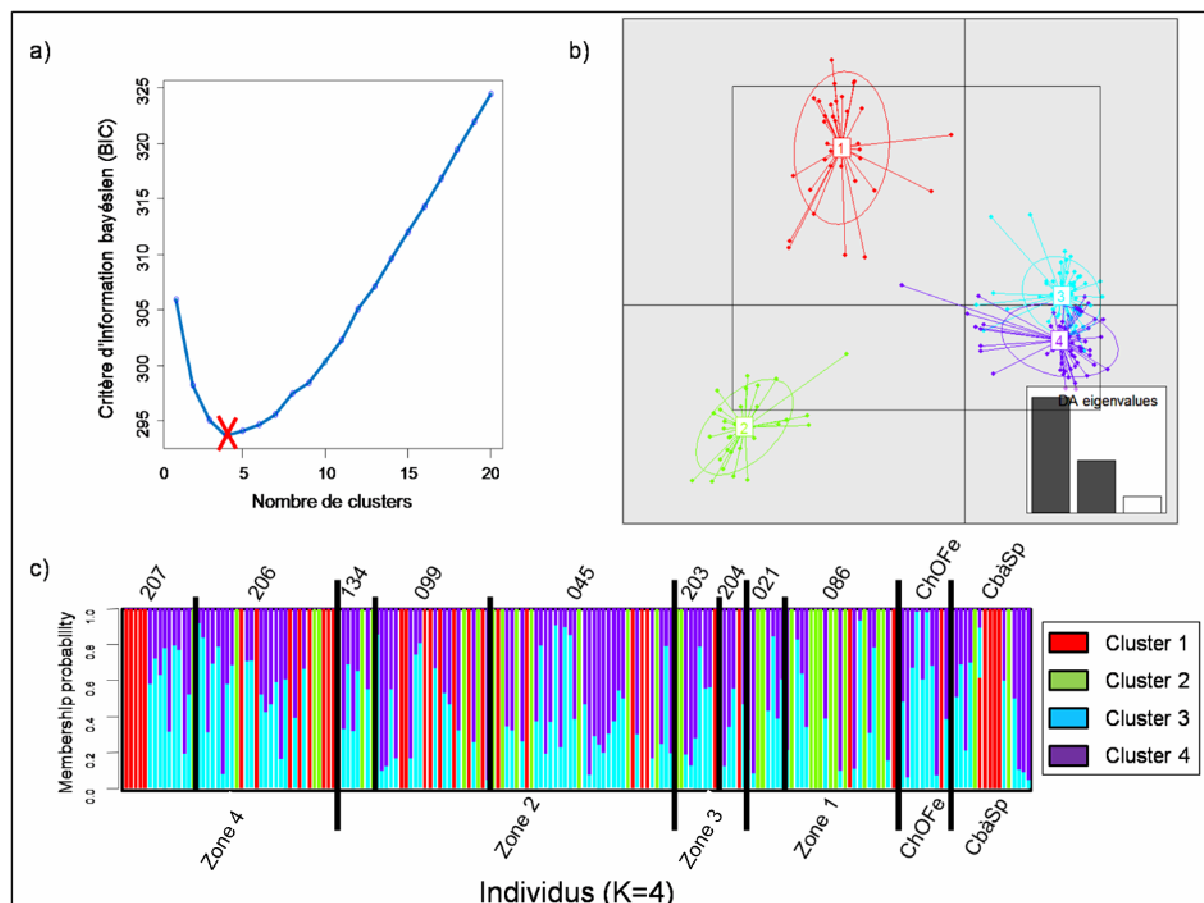


Figure 6 : Résultats de l'approche par une analyse discriminante en composante principale avec a) l'inférence du nombre de clusters génétiques pour les données simulées en fonction de la valeur du critère d'information bayésien (BIC), b) le diagramme de dispersion avec les deux premiers axes expliquant le plus la variance des données simulées (les quatre clusters génétiques identifiés sont représentés) et c) l'assignement des individus suivant leur localisation géographique pour un nombre de sous-populations $K=4$. Chaque couleur représente une population génétique, les lignes verticales représentent les individus. Une plante définie par plusieurs couleurs, est considérée comme ayant des ancêtres issus de plusieurs populations génétiques. La parcelle et la zone géographique où la plante est localisée est précisée au-dessus et au bas de la figure.

La DAPC pour K entre une et douze populations avec les dix loci, montre, d'après le calcul du BIC, qu'il existerait vraisemblablement 4 populations génétiquement différentes (Figure 6a). Sur les quatre clusters génétiques identifiés, les clusters 3 et 4 apparaissent génétiquement plus proches (Figure 6b). Par contre, aucune structuration géographique claire de la diversité génétique n'est visible que ce soit à l'échelle des quatre zones définies à Fénay avec les deux localisations aux alentours ou au niveau de la parcelle où les plantes ont été échantillonnées (Figures 6c). Cependant, les clusters 3 et 4 apparaissent plus communs que les types 1 et 2. Le cluster 2, plus particulièrement, semble plus spécifique et est majoritaire dans la zone 1 (Figure 6c).

4) DISCUSSION

L'approche bayésienne de regroupement détecte cinq génotypes au sein de notre échantillon qui ne sont pas représentés clairement au niveau géographique. L'analyse discriminante en composante principale, quant à elle, identifie quatre clusters génétiques qui ne se différencient pas, eux aussi, géographiquement. Les deux différentes approches permettent donc de mettre en évidence la présence de différents génotypes qui ne sont pas géographiquement différenciés dans la zone atelier de l'UMR Biologie et Gestion des Adventices de Fénay et aux alentours de celle-ci. Seuls les individus de la zone 1, pour les deux approches, semblent avoir une sous-structuration génétique différente des autres localisations avec un cluster génétique prépondérant. Le flux de gènes entre les populations échantillonnées est certainement important et entraîne l'absence de structuration géographique claire malgré la présence de barrières écologiques telles qu'une rivière ou des îlots boisés, dans cette zone atelier. Pourtant, il est considéré que ces barrières peuvent être un facteur limitant des flux de gènes entre les populations (Dupanloup et al., 2002). La distance géographique séparant les différentes populations supposées ne semble pas freiner les flux de gènes. Toutefois, celle-ci est souvent considérée comme un des facteurs déterminant de la structuration ou non des populations dans un paysage comme cela a été montré pour la diversité génétique humaine (Cavalli-Sforza et al., 1994 ; Poloni et al., 1997). Par ailleurs, la différence génétique est inversement corrélée à la quantité de flux de gènes entre populations, elle-même, fortement dépendante de la distance géographique entre population (Malécot, 1973).

Ainsi, aucun des microsatellites n'était totalement à l'équilibre de HW. Ceci est probablement dû à un effet Wahlund causé par un déficit d'hétérozygotes. Ce résultat a déjà été détecté auparavant, *via* une méthode utilisant des isoenzymes, dans des populations issues de Bourgogne et du Poitou-Charentes (Petit, 2006). Ce phénomène est communément observé chez d'autres êtres vivants comme, par exemple, chez les mammifères (Wang et al., 2011), les éponges (Duran et al., 2004), les coraux (Polato et al., 2010), les ascidies (Pérez-Portela & Turon, 2008 ; Dupont et al., 2009) les gorgones (Gutiérrez-Rodríguez & Lasker, 2004 ; Ledoux et al., 2010) ou certains ascaris parasites (Belanger et al., 2011). Plusieurs facteurs peuvent expliquer un déficit d'hétérozygotes comme la présence d'allèles nuls ou une sous-structuration des populations non détectée entraînant un effet Wahlund spatial et temporel (Addison & Hart, 2005). Des facteurs démographiques peuvent aussi induire ce déficit d'hétérozygotes comme la présence de consanguinité dans les populations. *C. cyanus* possède

un système d'auto-incompatibilité qui empêche l'autofécondation et la reproduction entre individus ayant les mêmes allèles-S d'auto-incompatibilité. Le fait qu'une proportion non négligeable d'individus pseudo auto-compatibles ait été identifiée dans les populations quel que soit la taille et/ou le niveau d'isolement supposé (chapitre 2.D.1) pourrait expliquer le déficit d'hétérozygotes qui serait donc induit ici par la consanguinité.

Il existe vraisemblablement une reproduction de proche en proche provoquant un gradient génétique entre les populations que les deux approches ne peuvent pas détecter et qui expliquerait pourquoi la population CbàSp qui se situe à environ 10 km de la zone de Fénay n'est pas différente des autres populations. Ce type de reproduction de proche en proche peut s'expliquer par le comportement des pollinisateurs qui, une fois les visites des fleurs d'un patch terminées, se dirigeront vers la population géographique la plus proche. Schwartz & McKelvey (2009) observent que les résultats donnés par l'approche bayésienne de regroupement peuvent être faussés lorsque la reproduction entre populations voisines provoque un gradient génétique. Plusieurs autres facteurs peuvent induire un échec de cette méthode tels que, des flux de gènes importants entre populations, la méthode d'échantillonnage utilisée (Latch et al., 2006 ; Waples & Gaggiotti, 2006) ou un des loci qui n'est pas à l'équilibre de HW. En effet, cette première approche suppose que les populations sont à l'équilibre de HW. Lorsque ce n'est pas le cas, le déséquilibre est minimisé par le logiciel et les résultats peuvent être biaisés. Une étude sur la structuration génétique en Amérique du nord de l'espèce *Dirofilaria immitis*, un parasite du cœur chez les espèces canines, a ainsi montré qu'aucune valeur fixe de K ne pouvait pas être déterminée si les loci en déséquilibre de HW étaient pris en compte dans les calculs. Par contre, lorsque l'analyse est effectuée en ne considérant que les loci à l'équilibre de HW, trois populations sont alors identifiées (Belanger et al., 2011). Concernant notre étude, si les loci en déséquilibre de HW ne sont pas pris en compte dans les calculs, aucune structuration génétique nette n'apparaît (les valeurs du delta K varient énormément). Hors, les résultats qui sont obtenus montrent que nos populations sont en déséquilibre de HW, qu'il y a un important flux de gènes entre populations et qu'il semble y avoir un gradient génétique induit par une reproduction entre individus de populations voisines. Aucune hypothèse au préalable n'était nécessaire avec la deuxième approche (DAPC) et le même type de résultat est pourtant observé. Ainsi, au sein des individus échantillonnés, une structuration génétique est bien présente sans pour autant qu'il y ait de structuration géographique.

Finalement, de cette étude il ressort que les flux de gènes seraient trop importants pour déterminer avec certitude une distance à partir de laquelle une population pourrait devenir

isolée. Ces résultats montrent que les populations de bleuet en Bourgogne sont organisées en patchs avec des flux importants entre patchs et entre populations voisines géographiquement distinctes. Cette répartition en métapopulation est un avantage et permet de maintenir une diversité génétique importante dans les populations. Dans les cas des populations isolées, la diversité génétique devrait rapidement baisser, pouvant entraîner un échec de la reproduction et une augmentation du risque d'extinction.

1) REFERENCES

- Addison, J., Hart, M., 2005. Spawning, copulation and inbreeding coefficients in marine invertebrates. *Biol. Lett.* 1, 450-453.
- Baron, Y., 1989. Elément pour un bilan de la flore messicole en Poitou-Charentes. Plantes sauvages menacées. Actes. Brest. 79-86.
- Belanger, D.H., Perkins, S.L., Rockwell, R.F., 2011. Inference of population structure and patterns of gene flow in canine heartworm (*Dirofilaria immitis*). *J. Parasitol.* 97, 602-609.
- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., DaFonseca, G.A.B., Rylands, A.B., Konstant, W.R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G., Hilton-Taylor, C., 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conserv. Biol.* 16, 909-923.
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P., Piazza, A., 1994. The History and Geography of Human Genes. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L., 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11, 2571-2581.
- Dupont, L., Viard, F., Dowell, M.J., Wood, C., Bishop, J.D.D., 2009. Fine- and regional-scale genetic structure of the exotic ascidian *Styela clava* (Tunicata) in southwest England, 50 years after its introduction. *Mol. Ecol.* 18, 442-453.
- Duran, S., Pascual, M., Estoup, A., Turon, X., 2004. Strong population structure in the marine sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) as revealed by microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 13, 511-522.
- Epperson, B.K., 2004. Multilocus estimation of genetic structure within populations. *Theor. Popul. Biol.* 65, 227-237.
- Epperson, B.K., 1993. Recent advances in correlation analysis of spatial patterns of genetic variation. *Evol. Biol.* 27, 95-155.
- Evanno, G., Regnaut, R., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2006. An integrated software package for population genetics data analysis. Arlequin v3.1. <http://cmpg.unibe.ch/software>
- Gerlach, G., Musolf, K., 2000. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conserv. Biol.* 14, 1066-1074.

- Goudet, J., 1995. Fstat (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86, 485-486.
- Gutiérrez-Rodríguez, C., Lasker, H.R., 2004. Microsatellite variation reveals high levels of genetic variability and population structure in the gorgonian coral *Pseudopterogorgia elisabethae* across the Bahamas. *Mol. Ecol.* 13, 2211-2221.
- Hardy, O.J., 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.
- Harrod, R.J., Taylor, R.J., 1995. Reproduction and pollination biology of centaurea and acroptilon species, with emphasis on *Centaurea diffusa*. *Northwest Sci.* 69, 97-105.
- Hensen, I., Oberprieler, C., 2005. Effects of population size on genetic diversity and seed production in the rare *Dictamnus albus* (Rutaceae) in central Germany. *Conserv. Genet.* 6, 63-73.
- Höglund, J., 2009. Evolutionary conservation genetics. Oxford: Oxford University Press.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., 2007. CLUMPP, a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics.* 23, 1801-1806.
- Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genet.* 11, 94.
- Latch, E.K., Dharmarajan, G., Glaubitz, J.C., Rhodes, O.E., 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conserv. Genet.* 7, 295-302.
- Ledoux, J., Garrabou, J., Bianchimani, O., Drap, P., Féral, J.P., Aurelle, D., 2010. Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*. *Mol. Ecol.* 19, 4204-4216.
- Loiselle, B.A., Sork, V.L., Nason, J., Graham, C., 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 82, 1420-1425.
- Lowe, A., Harris, S., Ashton, P., 2004. Ecological genetics: design analysis and application. Blackwell Publishing, USA, 70-72.
- Malécot, G., 1973. Isolation by distance. In: Genetic Structure of Populations (ed. Morton NE), 72-75. University of Hawaii Press, Honolulu.
- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Island Press, Washington, DC.
- Muraya, M.M., Mutegi, E., Geiger, H.H., de Villiers, S.M., Sagnard, F., Kanyenji, B.M., Kiambi, D., Parzies, H.K., 2011. Wild sorghum from different eco-geographic regions of Kenya display a mixed mating system. *Theor. Appl. Genet.* 122, 1631-1639.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6, 288-295.
- Peeters, A., Janssens, F., 1995. Agriculture et nature. Concilier la biodiversité et une production agricole performante en prairie : est-ce possible ? *Annales de Gembloux.* 101, 127-147.

- Pérez-Portela, R., Turon, X., 2008. Cryptic divergence and strong population structure in the colonial invertebrate *Pycnoclavella communis* (Asciadiacea) inferred from molecular data. *Zoology* 111, 163-178.
- Petit, C., 2006. Approche de la génétique des populations de *Centaurea cyanus*. Rapport de M2, Univ. Bourgogne.
- Pimm, S.L., Raven, P., 2000. Extinction by numbers. *Nature*. 403, 843-845.
- Polato, N.R., Concepcion, G.T., Toonen, R.J., Baums, I.B., 2010. Isolation by distance across the Hawaiian Archipelago in the reefbuilding coral *Porites lobata*. *Mol. Ecol.* 19, 4661-4677.
- Poloni, E.S., Semino, O., Passarino, G., Santachiara-Benerecetti, A.S., Dupanloup, I., Langaney, A., Excoffier, L., 1997. Human genetic affinities for Y-chromosome P49a,f/TaqI haplotypes show strong correspondence with linguistics. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 1015-1035.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155, 945-959.
- R Development Core Team, 2011. R/ a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org>.
- Reed, D.A., 2004. Extinction risk in fragmented habitats. *Anim. Conserv.* 7, 181-191.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.
- Rosenberg, N.A., 2004. DISTRUCT, a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes*. 4, 137-138.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non equilibrium populations. *Evolution* 47, 264-279.
- Sutcliffe, O.L., Kay, Q.O.N., 2000. Changes in the arable flora of central southern England since the 1960s. *Biol. Conserv.* 93, 1-8.
- Trakhtenbrot, A., Nathan, R., Perry, G., Richardson, D.M., 2005. The importance of long-distance characterization of nine new microsatellite markers in *Taraxacum* (Asteraceae). *Mol. Ecol. Notes*. 4, 645-648.
- Wang, Y., Liu, W., Wang, G.M., Zhong, W., Wan, X., 2011. Genetic consequences of group living in Mongolian Gerbils. *J. Hered.* 102, 554-561.
- Waples, R.S., Gaggiotti, O., 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol. Ecol.* 15, 1419-1439.
- Young, A.G., Brown, A.H.D., Zich, F.A., 1999. Genetic structure of fragmented populations of the endangered daisy *Rutidosia leptorhynchoidea*. *Conserv. Biol.* 13, 256-265.

C- POINTS MARQUANTS DU CHAPITRE

En Bourgogne on observe :

- Une **structuration génétique** des populations.
- Une probable sous-**structuration** géographique des populations.
- Des **flux de gènes important** entre les populations.
- Un **gradient génétique** probable entre les populations dû à une reproduction entre individus de populations géographiques voisines.
- Un réseau de populations géographiques connectées entre elles → **pas d'isolement détecté** des populations.

CHAPI TRE III

*« Tout ce qui est simple est faux et tout ce qui est compliqué
est inutilisable » Paul Valéry*

En tant qu'espèce rare, le bleuet peut-il être utilisé comme indicateur d'une diversité floristique d'une parcelle cultivée ?

A- INTRODUCTION GENERALE

Suite à l'érosion généralisée de la diversité biologique dont les causes sont principalement anthropiques (Gregory et al., 2005), un état des lieux s'est avéré nécessaire. Dans les agroécosystèmes, la flore des parcelles cultivées figure parmi les groupes clefs du fonctionnement de l'écosystème. Les adventices représentent, en effet, une ressource importante pour un grand nombre d'espèces des réseaux trophiques supérieurs telles que les oiseaux, les insectes ou les pollinisateurs (Newton, 2004 ; Storkey, 2006). Cependant, un déclin de certaines espèces messicoles spécialistes de l'agroécosystème (espèces végétales commensales des moissons) est actuellement observé. Dans un contexte de conservation et de protection des espèces rares, il est essentiel de distinguer facilement les communautés avec une diversité biologique élevée.

Ce qu'il faut pour être un bon indicateur (Pocock & Jennings, 2008) :

- *Sensible* aux changements,
- *Simple* à mesurer,
- *Spécifique* en quantifiant clairement la variable à mesurer,
- *Invariant* dans le temps et l'espace.

Le bleuet (*Centaurea cyanus* L.) est une messicole spécialiste de la parcelle cultivée, facilement identifiable avec ses fleurs bleues qui dépassent de la culture. Suite à l'intensification des pratiques agricoles, il est actuellement en voie de raréfaction dans l'ouest de la France (Poitou-Charentes) et est encore relativement commun dans l'est (Bourgogne). *C. cyanus* réunirait les critères recommandés pour un indicateur de la diversité biologique au sein de la parcelle cultivée : il est spécifique du milieu, semble être sensible aux modifications de l'environnement et est facile à détecter donc simple à mesurer.

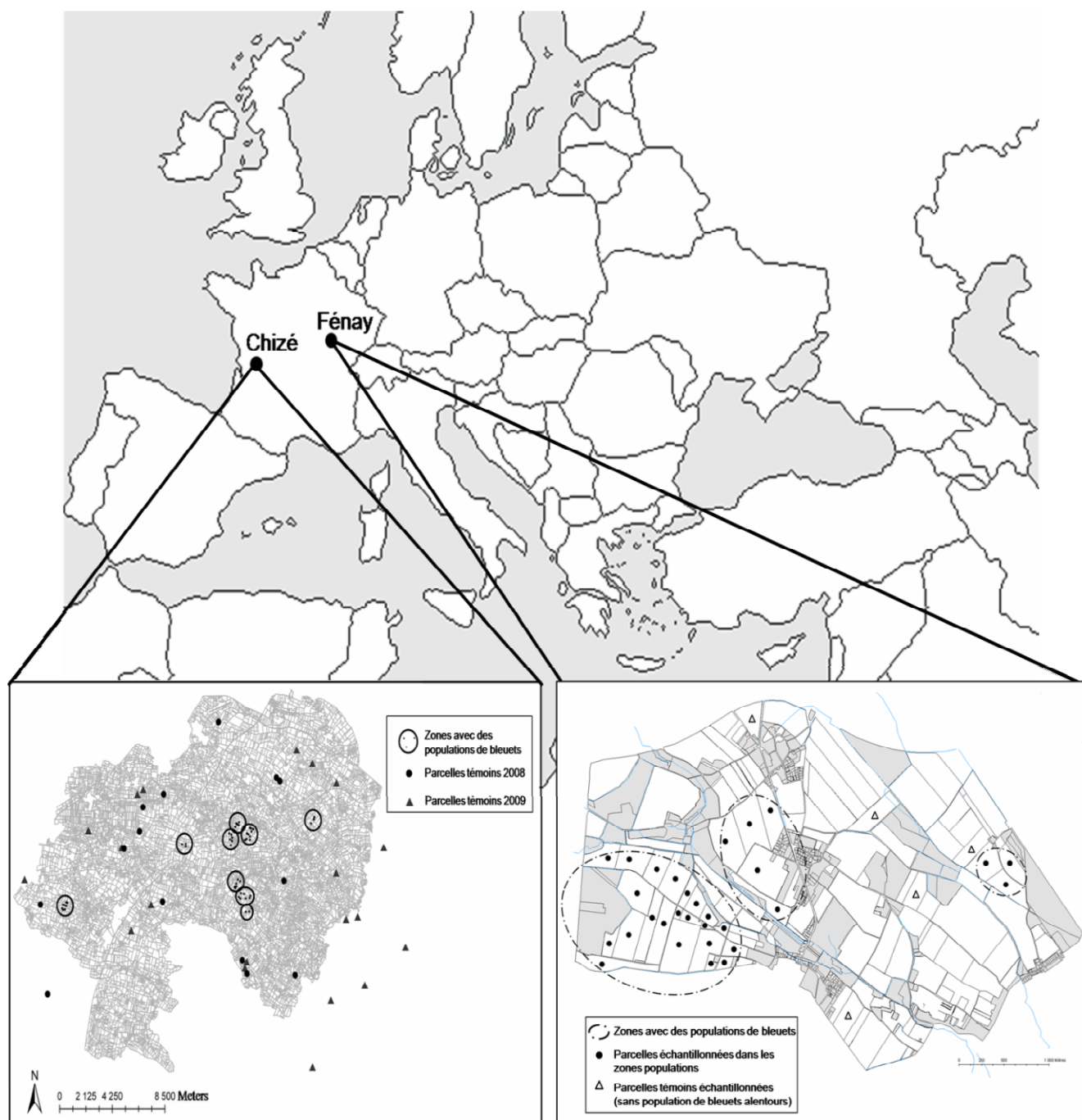


Figure 1 : Carte de la zone d'étude du CNRS de Chizé (Poitou-Charentes) et de l'INRA de Fénay (Bourgogne). Les parcelles échantillonnées en 2008 (Chizé) et 2009 (Chizé et Fénay) sont annotées. Les zones identifiées avec des populations de bleuets sont entourées.

→ *L'objectif est donc de déterminer si le bleuet peut être utilisé comme indicateur d'une diversité floristique dans la parcelle cultivée via l'étude de deux sites représentant des situations contrastées : le Poitou-Charentes où le bleuet est rare et la Bourgogne où il est encore fréquent.*

Ce chapitre est composé de deux articles :

Le premier travail a été effectué sur une année de relevé, en Bourgogne, région où les populations de bleuets sont encore stables et fréquentes alors que la deuxième expérimentation a été faite sur deux années de relevé, en Poitou-Charentes, région où les populations de bleuets sont rares.

A- Bellanger, S., Darmency, H., Guillemain, J.P., 2009. Relationships between weed diversity and *Centaurea cyanus*. XIII^{ème} Colloque International sur la Biologie des Mauvaises Herbes, Dijon, France, 8-10 Septembre 2009, 8–15. Communication orale

B- Bellanger, S., Guillemain, J.P., Bretagnolle, V., Darmency, H., 2011. *Centaurea cyanus* L. as a biological indicator of segetal species richness in arable fields. Soumis

C-

**B- RELATION ENTRE LA FLORE ADVENTICE
DES PARCELLES CULTIVEES ET
*CENTAUREA CYANUS***

BELLANGER, S., DARMENCY, H., GUILLEMIN, J.P.

XIII^{ème} Colloque International Sur La Biologie Des Mauvaises Herbes

Dijon – 8 - 10 Septembre 2009

**XIII^{ème} COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LA BIOLOGIE DES MAUVAISES HERBES
DIJON – 8 - 10 SEPTEMBRE 2009**

**RELATION ENTRE LA FLORE ADVENTICE DES PARCELLES CULTIVEES ET
*CENTAUREA CYANUS***

S. BELLANGER⁽¹⁾, H. DARMENCY⁽¹⁾, J.P. GUILLEMIN⁽²⁾

(1) UMR 1210 Biologie et Gestion des Adventices, INRA, BP 86510, 21065 Dijon, France.

solene.bellanger@dijon.inra.fr, Henri.Darmency@dijon.inra.fr

(2) ENESAD, UMR 1210 Biologie et Gestion des Adventices, INRA/ENESAD/UB, 26 bd. du Dr. Petitjean, BP 87999

F-21079 Dijon Cedex, France. jp.guillemain@enesad.fr

RESUME

Préserver ou accroître la biodiversité est un enjeu qui nécessite la mise au point d'indicateurs. Le milieu agricole est aussi concerné car il doit répondre à un consensus entre la productivité agricole et le maintien de services écologiques. Nous avons choisi de tester si le bleuet, une espèce messicole, peut être utilisé comme indicatrice. Notre étude a donc cherché à mettre en évidence si sa présence était synonyme d'une richesse floristique importante. Pour cela, des relevés floristiques ont été effectués dans 3 zones de la commune de Fenay (Côte d'Or), contenant une population supposée stable de bleuet. Des parcelles témoins hors de ces zones ont aussi été échantillonnées. La présence du bleuet dans une parcelle n'indique pas une meilleure diversité floristique. En revanche, les zones avec des populations de bleuet sont plus riches que le reste de la commune de Fenay.

Mots-clés : biodiversité, adventices, champs, messicoles, bleuet

ABSTRACT

RELATIONSHIPS BETWEEN WEED DIVERSITY AND *CENTAUREA CYANUS*

Protecting or increasing biodiversity is a challenge that requires the setup of biodiversity indicators. The agri-environment is also concerned because it is necessary to compromise between agri-productivity and the preservation of ecological services. We chose to test if the cornflower could fit to that purpose. Our study tried to estimate if its presence indicates higher biodiversity. For that purpose, 3 zones in Fenay (Côte d'Or), containing each a stable population of cornflower, were sampled. Control fields outside these zones were also sampled. The presence of cornflower in a field is not associated with higher plant diversity. However, the biodiversity in the zones containing a stable population of cornflower increased compared to the rest of the fields in Fenay.

Keywords: biodiversity, weeds, arable fields, segetal, cornflower

INTRODUCTION

Actuellement, le monde subit une érosion de la biodiversité à une échelle encore jamais atteinte (Gregory *et al*, 2005). Il est maintenant reconnu que les principaux facteurs responsables de cette chute sont anthropiques. Par ailleurs, c'est dans les agro-écosystèmes que le nombre d'espèces en déclin est le plus important (Robinson & Sutherland, 2002). La cause principale de cette raréfaction est le changement dans les pratiques culturales à partir des années 50. En effet, avant, l'agriculture était de type extensive, et le paysage était composé d'une mosaïque de cultures et donc potentiellement de différents habitats pour la faune et la flore. Avec la révolution verte, les pratiques agricoles se sont intensifiées. Les rotations se sont simplifiées avec une réduction de la diversité des cultures pouvant aller pour certaines jusqu'à la monoculture. Les itinéraires techniques appliqués ont évolué vers une intensification avec des apports quasi-systématiques d'engrais et de pesticides. Il y a eu aussi mise en œuvre de remembrements qui ont modifié le paysage agricole le faisant passer d'une mosaïque composée de nombreuses petites parcelles à un assemblage de grandes parcelles. Cette pratique a entraîné une fragmentation de l'habitat qui a diminué les connectivités entre les parcelles (Trakhtenbrot *et al*, 2005) et représente actuellement une menace sérieuse pour le maintien de certaines populations (Young *et al*, 1996). En effet, elle provoque la réduction de la taille et l'isolement spatial de celles-ci (Lienert et Fisher, 2003). Ce phénomène induit une diminution de la variabilité génétique (Young *et al*, 1999) due à la dérive génétique ou la consanguinité (Hensen *et al*, 2005) et peut ainsi mener à l'extinction de la population.

Ainsi, certaines pratiques se sont avérées néfastes pour un grand nombre de communautés animales et végétales associées aux milieux agricoles (Peeters et Janssens, 1995). Parmi ces espèces, on trouve les adventices des cultures, et plus particulièrement les messicoles (espèces commensales des moissons), qui ont un rôle important de support de la diversité pour les réseaux trophiques supérieurs (Marshall *et al*, 2003). Il est donc nécessaire de trouver des indicateurs de diversité parmi les adventices des cultures. Les taxons choisis comme indicateurs doivent être sensibles aux différentes contraintes qui peuvent affecter la diversité et ainsi, permettre, par leur intermédiaire, une mesure de la qualité de l'habitat (Landres *et al*, 1988).

Le bleuet (*Centaurea cyanus* L.) est une espèce messicole emblématique reconnaissable à ses fleurs bleues, et souvent considérée comme patrimoniale. C'est une Astéracée annuelle diploïde. Elle germe principalement en automne, passe l'hiver en rosette et fleurit d'avril à juin (Dutoit *et al*, 2001). *C. cyanus* a été importé en France avec les moissons pendant l'Antiquité mais faisait déjà partie du cortège floristique au Néolithique (Jauzein, 2001). On le retrouve principalement dans les cultures de céréales d'hiver et de colza. *C. cyanus*, très répandu en Europe jusqu'à la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, est actuellement en déclin dans certaines régions de France (Baron, 1989) et d'Europe (Wilson, 1990). Les principales causes de sa raréfaction résulteraient de changements dans les pratiques agricoles telles que le tri des semences, l'utilisation d'herbicides (antidicotylédones) et d'engrais, la destruction des bords de champs (zone refuge pour les messicoles) ainsi que la conversion des terrains arables marginaux en pâturage (Olivereau, 1996). Ces différentes pressions l'ont réduit à des populations de petites tailles et la fragmentation de son habitat a conduit à des extinctions locales. Cependant, cette espèce peut représenter une ressource importante de pollen et de nectar pour les insectes pollinisateurs et ses semences peuvent aussi servir de ressource à l'avifaune.

L'ensemble des caractéristiques citées précédemment fait du bleuet un bon candidat à tester comme indicateur de diversité. Il est d'ailleurs déjà considéré comme tel par des associations naturalistes mais cela n'a encore jamais été démontré scientifiquement. Cette étude testera les relations du bleuet avec la flore dans les agro-écosystèmes. Des relevés floristiques ont été effectués dans des parcelles cultivées de la commune de Fenay

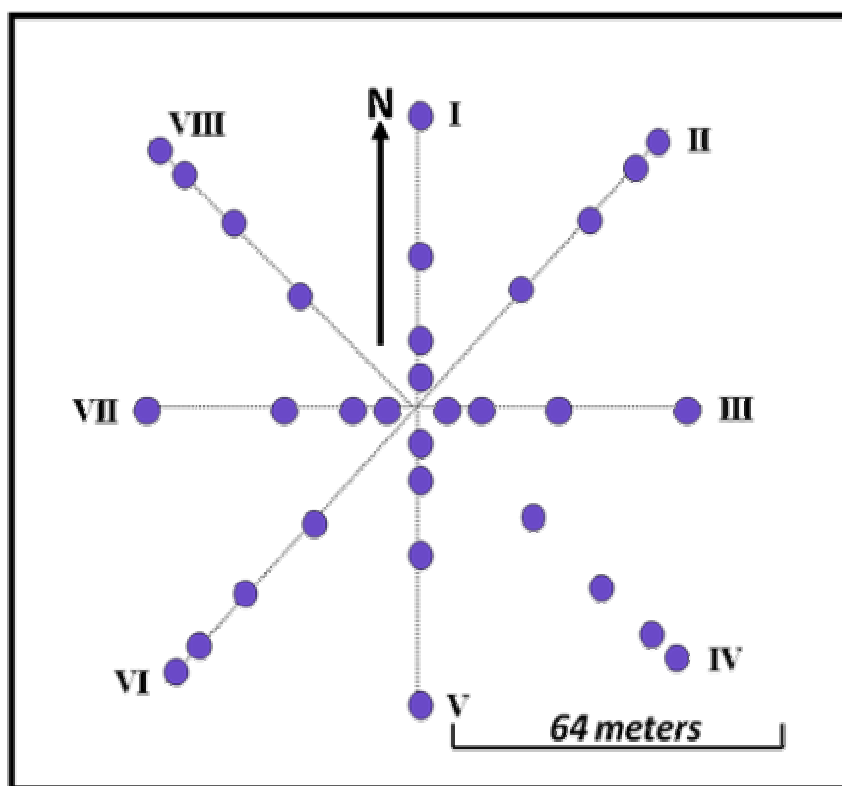
(Côte d'Or). Pour tester la pertinence du bleuet en tant qu'indicateur de diversité floristique, nous calculerons les indices de diversité de Shannon en fonction de la présence ou non du bleuet dans la parcelle avec l'ensemble de la flore puis seulement avec les espèces messicoles. Par ailleurs, nous testerons la capacité des autres messicoles trouvées dans les échantillonnages à être le marqueur de la présence de ce groupe.

MATERIEL ET METHODES

ZONE D'ETUDE ET PROTOCOLE D'ECHANTILLONNAGE

La zone d'étude se situe dans la commune de Fenay en Côte d'Or. Elle est composée de 80 parcelles appartenant à 20 agriculteurs différents et représente une surface de 8km². Des populations stables de *C. cyanus* y ont été repérées en 2006 et 2007. Les bleuets sont ainsi, distribués dans trois zones non adjacentes. En 2009, une campagne de relevés floristiques a été mise en place afin d'échantillonner les parcelles où se trouvaient des populations stables de bleuet ainsi que les parcelles avoisinantes dans les trois zones repérées. L'échantillonnage a été fait suivant un protocole de relevés en étoile hiérarchisé. Celui-ci est composé de 32 quadrats de 2x2m. Le centre de l'étoile est placé approximativement au milieu de la parcelle. Puis, 8 transects de 4 quadrats sont disposés autour de ce point. Chaque transect mesure 64 mètres et est séparé du suivant par un angle de 45° par rapport au centre de l'étoile (Figure 1). Pour chaque quadra, les espèces sont notées 1 quand elles sont vues une fois et 2 quand elles ont été observées plus d'une fois dans le quadra. Trois ensembles de parcelles ont ainsi été échantillonnés dans la commune de Fenay.

Figure 1 : Position des quadrats du relevé de la flore.
Location of quadrats of relevé.



Des parcelles supplémentaires, choisies aléatoirement dans la commune de Fenay et ne se situant pas dans les zones à population de bleuet, ont été échantillonnées. Par la suite, ces parcelles seront nommées témoins.

ANALYSE DE DONNEES

Les données ont été traitées via une comparaison des indices de diversité de Shannon en fonction de la présence/absence du bleuet dans les parcelles échantillonnées et des témoins. Afin de ne pas biaiser les résultats observés, nous avons retiré le bleuet de l'analyse. L'indice de diversité de chaque espèce messicole rencontrée lors des relevés a été calculé suivant le même principe.

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel de statistique Past1.77 avec un seuil de décision pour l'ensemble des tests fixé à 10%. Etant donné le nombre peu élevé de parcelles avec des messicoles, la comparaison des indices de diversité été faite avec des tests de Kruskal Wallis.

RESULTATS

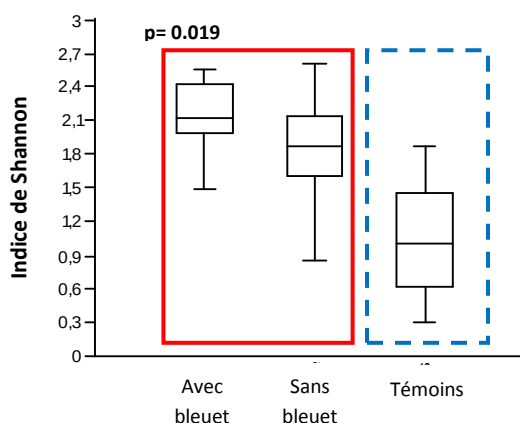
Dans la commune de Fenay, 33 parcelles ont été échantillonnées. Les relevés ont été faits dans des parcelles de blé, de colza, d'orge, de moutarde et de tournesol. Une parcelle témoin pour chaque culture a été échantillonnée. Du bleuet a été vu dans 5 parcelles.

RELATION ENTRE LA FLORE OBSERVEE ET LE BLEUET

Les indices de diversité de Shannon ont été calculés en fonction de la présence/absence du bleuet en plein champ dans les trois zones géographiques étudiées, pour l'ensemble de la flore. Dans les zones à bleuet, il n'y a pas de différence significative de diversité entre les parcelles avec ou sans *C. cyanus* (Figure 2). Par contre, les témoins sont significativement plus pauvres que les parcelles se trouvant hors des trois zones ($p=0.019$).

Figure 2: Diversité floristique (Indice de Shannon, toutes espèces incluses) en fonction de la présence/absence du bleuet dans les champs en 2009 dans la commune de Fenay.

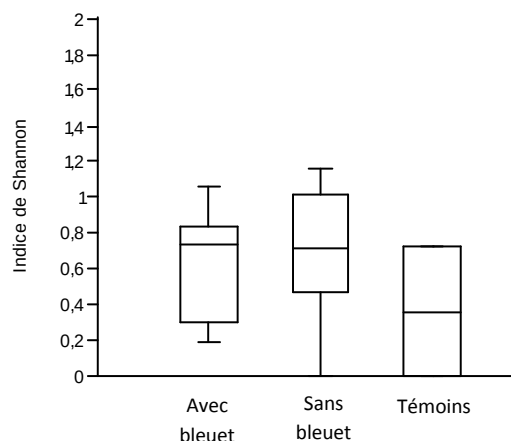
Weed diversity (Shannon index, includes all the species) in the field according to the presence / absence of *C. cyanus* in 2009 in the Fenay district.



Centaurea cyanus étant une espèce messicole, la même analyse a été faite en ne prenant en compte que ce groupe d'espèces. Nous avons pris comme liste de référence pour les espèces messicoles celle indiquée par le site internet de Telabotanica (Aboucaya, 2011). Pour l'ensemble des relevés, huit messicoles ont été trouvées en plein champ : *Alopecurus myosuroides* (ALOMY), *Scandix pecten-veneris* (SCAPV), *Papaver rhoeas* (PAPSPP), *Viola spp* (VIOspp), *Centaurea cyanus* (CENCY), *Aphanes arvensis* (APHAR),

Legousia speculum-veneris (LEGSV) et *Galium aparine* (GALAP). Lorsque du bleuet est présent dans la parcelle, il n'y a pas plus d'espèces messicoles dans le champ (Figure 3).
Figure 3 : Diversité floristique (Indice de Shannon) en fonction de la présence/absence du bleuet pour les espèces messicoles dans la commune de Fenay.

Weed diversity (Shannon index) of the segetal species associated with cereal cultures according to the presence/absence of *C. cyanus* in Fenay district.



La comparaison des indices de diversité pour chaque espèce de messicole en fonction de leur présence ou non dans la parcelle a été faite. Sur les 8 espèces de messicoles observées dans les relevés, seule VIOSPP semble être une espèce « signal » de la présence d'autres messicoles dans la parcelle (Tableau 1).

Tableau 1 : Significativité des Indices de Shannon pour chaque messicole en fonction de leur présence ou non dans le champ. Les probabilités p significatives (en gras dans le tableau) montrent que lorsque l'espèce est présente dans le champ, il y a significativement plus d'espèces messicoles.

Significance of Shannon indices for each segetal species associated with cereal cultures according to their presence or not in the field. The probabilities p significant (in bold) show that when the species is present in the field, there are significantly more endangered species.

Espèces	ALOMY	APHAR	CENCY	GALAP	LEGSV	PAPSPP	SCAPV	VIOSPP
p	0,2774	0,9001	0,401	0,2589	1	0,465	0,4359	0,01053

DISCUSSION

Dans la zone atelier de la commune de Fenay, le bleuet n'est pas le marqueur d'une plus grande diversité floristique. Par contre, les zones à population de bleuet échantillonnées (parcelles avec du bleuet et celles l'entourant) sont significativement plus riches en espèces adventices que les témoins. A l'échelle de la commune de Fenay, la répartition des bleuets n'est donc pas complètement aléatoire. En revanche, elle semble l'être à une échelle plus fine comme celle de la parcelle. Des pratiques agricoles et/ou un type de sol différent pourraient être des causes explicatives. En effet, le type de pratique conduite dans les agro-écosystèmes a un impact direct sur la diversité et la structuration des communautés d'adventices (Kleijn & Sutherland, 2003). Le paysage peut aussi avoir une influence sur la diversité des mauvaises herbes (Boutin *et al*, 2008). Étant donné que la majorité des populations de bleuet se situent dans la partie sud-ouest de la zone atelier, il est possible que le reste de la zone soit différent sur au moins un des éléments précédemment cités. Par

ailleurs, l'effort d'échantillonnage est peut-être insuffisant et nécessiterait une deuxième campagne de relevé floristique. Le nombre de témoins est aussi probablement trop faible (seulement un par culture) et ne représenterait pas correctement la réelle diversité floristique hors des zones à population de bleuet. Afin de confirmer ces résultats, réitérer une campagne d'échantillonnage l'année prochaine pourrait être nécessaire.

Comme nous l'avons vu précédemment, le bleuet fait partie des espèces messicoles, un groupe actuellement en voie de raréfaction dans les parcelles cultivées. Or, ce sont des espèces commensales des moissons, donc normalement adaptées aux pratiques culturales. Pourtant, l'intensification de l'agriculture a provoqué leur déclin (Robinson et Sutherland, 2002). La diversité ainsi que la présence d'espèces rares ou en danger sont des critères souvent cités pour la sélection de site à conserver (Prendergast *et al.*, 1993). Les comparaisons des indices de diversité de Shannon en fonction de la présence/absence du bleuet montrent que cette espèce ne peut pas servir de marqueur de la présence de messicoles dans les parcelles de la commune de Fenay. De la même façon, les autres messicoles peuvent être testées comme indicatrice de diversité floristique de leur groupe. Sur les 8 rencontrées dans la zone atelier, seule *Viola spp* semble être une espèce « signal » de leur présence dans le champ. Ces résultats pourraient provenir d'une différence de réponse de cette espèce à un aspect de l'intensification (Pocock et Jennings, 2008). Par ailleurs, VIOSPP est encore relativement abondante et fréquente à Fenay. En effet, elle a été observée dans 29 des 33 parcelles échantillonnées, dont les parcelles témoins. La probabilité de rencontrer des espèces messicoles en sa présence augmente donc. Ces arguments font de *Viola spp*, *a priori*, un choix inapproprié pour indiquer la présence des espèces messicoles. En effet, si on recherche une espèce indicatrice de changements floristiques, le plus efficace est plutôt de déterminer les caractéristiques des espèces rares ou en voie de raréfaction dans un paysage pour mieux comprendre les facteurs influençant leurs statuts et ainsi choisir l'espèce la plus sensible (Dierssen, 2006). Or, ces indicateurs sont difficiles à identifier (Nordén *et al.*, 2007). Il faut donc faire attention au choix de l'espèce indicatrice, car une mauvaise décision pourrait déformer notre compréhension de la biodiversité en exagérant ou réduisant les impacts d'une gestion. Ainsi, des espèces indicatrices choisies et bien adaptées au milieu peuvent ne pas montrer les changements pour des espèces plus sensibles et ainsi retarder la gestion nécessaire de ce milieu (Dudley *et al.* 2005). Par exemple, dans les forêts du nord de la Scandinavie, les rennes et les élans ont été choisis comme indicateurs de l'état de la forêt, mais il s'est avéré qu'ils ne prenaient pas en compte le bois mort, ce qui a entraîné une menace importante sur un grand nombre de saproxyliques qui sont sur la Liste Rouge de Suède (Fridman & Walheim 2000).

En conclusion, Le bleuet n'est pas un indicateur de diversité floristique, ni banale ni rare (messicoles) dans la parcelle où il se trouve. Par contre, les zones avec des populations de bleuet semblent être plus riches que le reste de la commune de Fenay. Le bleuet pourrait donc marquer par sa présence une plus grande diversité non pas à l'échelle de la parcelle, mais du paysage. L'analyse des pratiques culturales dans les différentes parcelles échantillonnées est en cours afin de déterminer d'éventuelles différences explicatives. Reste à savoir, à l'échelle des zones à bleuet, si la présence du bleuet est réellement aléatoire ou si elle répond à des critères pas encore renseignés, en particulier des pratiques agricoles ou des facteurs paysagers (connectivités des parcelles, propriété foncière, etc.).

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à une bourse cofinancée par la DGER et le Conseil Régional de Bourgogne pour S. B.

BIBLIOGRAPHIE

Aboucaya, A., 2011. Plan d'action national Messicoles, Conservatoire Botanique National de Porquerolles, Available from: http://www.tela-botanica.org/page:plantes_messicoles_liste (accessed Febuary 2011).

Baron, Y., 1989. *Elément pour un bilan de la flore messicole en Poitou-Charentes*. Plantes sauvages menacées. Actes. Brest. BRG.

Boutin, C., Baril, A. & Martin, P.A., 2008- Plant diversity in crop fields and woody hedgerows of organic and conventional farms in contrasting landscapes. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 123, 185-193.

Dierssen, K., 2006- *Indicating botanical diversity* – Structural and functional aspects based on case studies from Northern Germany. *Ecological Indicators*, 6, 94-103.

Dudley N., Baldock D., Nasi R. and Stolton S., 2005 *Measuring biodiversity and sustainable management in forests and agricultural landscapes*. The Royal Society 360, 457–470.

Dutoit, T., Gerbaud, E., Ourcival, J.M., Roux, M., Alard, D., 2001- Recherche prospective sur la dualité entre caractéristiques morphologiques et capacités de compétition des végétaux : le cas des espèces adventices et du blé. *Life Sciences*, 324, 261-272.

Fridman J. & Walheim M., 2000 *Amount, structure and dynamics of dead wood on managed forest land in Sweden*. For. Ecol. Mngmt. 131, 23–36.

Gregory, R.D., A. van Strien, P. Vorisek, A. W. Gmelig Meling, D. G. Noble, R. P. B. Foppen, and D.W. Gibbons,, 2005- Developing indicators for European birds. *The Royal Society*, 360, 269–288.

Hensen, I., Oberprieler, C. & Wesche, K. 2005- Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill (Ranunculaceae) in Central Germany. *Flora*, 200, 3-14.

Jauzein, P., 2001- Biodiversité des champs cultivés : l'enrichissement floristique. *Dossier de l'environnement de l'INRA*, 21, 43-64.

Kleijn, D. & Sutherland, W.J., 2003- How effective are European agri-environment schemes in conserving and promoting biodiversity? *Journal Applied Ecology*, 40, 947-969.

Landres, P.B., Verner, J. & Thomas, J.W., 1988- Ecological uses of vertebrate indicator species : a critique. *Conservation Biology*, 2, 316-328.

Lienert, J. & Fischer, M. 2003- Habitat fragmentation affects the common wetland specialist *Primula farinose* in north-east Switzerland. *Journal of Ecology*, 91, 587-599.

Marshall, E.J.P., Brown, V.K., Boatman, N.D., Lutman, P.J.W., Squire, G.R. & Ward, L.K, 2003- The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. *Weed Research*, 43, 77-89.

Nordén, B., Paltto, H., Götmark, F. & Wallin, K., 2007- Indicators of biodiversity, what do they indicate ? – Lessons for conservation of cryptogams in Oak-rich forest. *Biological Conservation*, 35, 369-379.

Olivereau, F., 1996- Les plantes messicoles des plaines françaises. *Courrier de l'Environnement*, 28, 5-18.

Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2008- PAST - PAlaeontological STatistics, ver. 1.77.

Peeters, A., Janssens, F., 1995- Agriculture et nature Concilier la biodiversité et une production agricole performante en prairie : est-ce possible ? *Annales de Gembloux*, 101, 127-147.

Pocock, M.J.O., Jennings, N., 2008- Testing biotic indicator taxa: the sensitivity of insectivorous mammals and their prey to the intensification of lowland agriculture. *Journal Applied Ecology*, 45, 151-160.

Prendergast, J.R., Quinn, R., Lawton, J., Evesham, B., Gibbons, D., 1993- Rare species, the coincidence of biodiversity hotspots and conservation strategies. *Nature*, 365, 335-337.

Robinson, R.A. et Sutherland, W.J., 2002- Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *Journal Applied Ecology*, 39, 157–176.

Trakhtenbrot, A., Nathan, R., Perry, G. & Richardson, D.M. 2005- The importance of long-distance characterization of nine new microsatellite markers in *Taraxacum* (Asteraceae). *Molecular Ecology Notes*, 4, 645-648.

Young, A.G., Boyle, T. & Brown, T. 1996- The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *TREE*, 11, 413-418.

Young, A.G, Brown, A.H.D. & Zich, F.A. 1999- Genetic Structure of fragmented Populations of the endangered Daisy *Rutidosis leptorhynchoides*. *Conservation Biology*, 13, 256-265.

**C- *CENTAUREA CYANUS* L. AS A BIOLOGICAL
INDICATOR OF SEGETAL SPECIES RICHNESS
IN ARABLE FIELDS**

BELLANGER, S., GUILLEMIN, J.P., BRETAGNOLLE, V., DARMENCY H.,

Soumis

***Centaurea cyanus* L. as a biological indicator of segetal species richness in arable fields**

Solène Bellanger ^{ab}, Jean-Philippe Guillemin ^b, Vincent Bretagnolle ^c, Henri Darmency ^{a*}

^a INRA, UMR 1210 BGA, 17 rue Sully, BP86510, 21065, F-Dijon, France

^b AgroSup Dijon, UMR 1210 BGA, 26 Dr Petitjean, BP87999, 21079, F-Dijon, France

^c CNRS, UPR 1934, Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, Villiers en Bois, 79360 Beauvoir sur Niort, France

* Corresponding author. Tel.: 33 380 693186 ; Fax: 33 380 693262.

E-mail addresses: solene.bellanger@diyon.inra.fr (S. Bellanger),

jp.guillemin@agrosupdiyon.fr (JP. Guillemin), breta@cebc.cnrs.fr (V. Bretagnolle),

darmency@diyon.inra.fr (H. Darmency).

ABSTRACT

Agricultural intensification has resulted in a loss of biological diversity within the agroecosystem. Biological indicator species are important tools for monitoring species diversity. The aim of this study was to determine whether cornflower, *Centaurea cyanus* L., a segetal species that is easily identified in the countryside, is an appropriate indicator of weed species diversity in the Poitou-Charentes region in western France. The study areas selected were those in which *C. cyanus* was present in agricultural fields in a previous monitoring in both 2006 and 2007. All plant species in sample fields within the study areas were inventoried in two consecutive years in 2008 and 2009. The presence of *C. cyanus* was not a good indicator of overall species richness within the fields. However, *C. cyanus* presence did correlate with the presence of other segetal species. Reciprocally, most other segetal species, which were also found at low frequencies in the study areas, also correlated with higher segetal richness. We therefore conclude that *C. cyanus* is a good candidate for use as an indicator of segetal diversity.

Keywords: Arable field, Species diversity, Biological indicators, Weeds, Agroecosystem, Cornflower

1. Introduction

Loss of biological diversity is a major concern globally, in particular because the main causes of this loss are known to be anthropomorphic (Gregory et al., 2005). Agroecosystems are currently experiencing a strong rate of biodiversity loss (Robinson and Sutherland, 2002). This is critical because agroecosystems account for 24 to 38% of terrestrial ecosystems on the planet, and are the most dominant terrestrial ecosystem in the world (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Though the agroecosystem mainly depends on human management, it nevertheless harbors many wild animals and plants. In particular, many plant species have adapted specifically to this ecosystem since the origin of agriculture, and many weeds now depend strictly on cropping systems. However, cropping systems have been intensified in Western Europe since the 1950s (Wilson et al., 1999). This intensification is characterized by an increased use of nitrogen fertilization (Minoshima et al., 2007), and by landscape homogenization (Kleijn et al., 2009). As a result, there has been a widespread decline of biological diversity that encompasses farmland birds (Donald et al., 2006), pollinators (Biesmeijer et al., 2006), insects (Benton et al., 2002), and arable weed communities (Fried et al., 2009). This reduction in diversity has, in turn, had a strong impact on trophic networks within agroecosystems (Dornelas et al., 2009).

Arable weeds are one of the plant groups predicted to be most affected by agricultural intensification, and particularly by herbicide use (Culman et al., 2010). Weeds are a component of biological diversity (Marshall et al., 2003) and a key trophic resource for pollinators, phytophagous insects, granivorous farmland birds, and other herbivores (Newton, 2004; Storkey, 2006). Decline of species diversity could lead to the loss of ecosystem services and then affect ecosystem functioning (Chapin et al., 2000; Balvanera et al., 2006).

However, monitoring the entire weed community (e.g. about 360 species in France) is challenging, and simple indicators may offer an efficient means of monitoring ecosystem health. The selection of an appropriate indicator species will depend on costs and benefits—a trade-off between the intended goal of the indicator and the feasibility of the indicator—and on management objectives (Dale and Beyeler, 2001). Single species and species assemblages, or both, have been used as biological indicators (Hyvönen and Huusela-Veistola, 2008). Species richness is the simplest measure of diversity, but other indices that measure the frequency distribution of a species are commonly used: the Shannon-Weaver index is one of these (Magurran, 1988). Identifying appropriate diversity indicators has proven to be a

difficult task in many cases (Nordén et al., 2007). Indicators must characterize environmental changes (Dierssen, 2006) and they must be sensitive to processes that affect biological diversity (Landres et al., 1988; Grundy et al., 2011).

Alternatively, many conservationists have used the presence and richness of rare or endangered species as biological indicators (Prendergast et al., 1993). These already threatened species are generally the first to be affected by ecosystem changes. The weed species *Ranunculus arvensis* L., *Scandix pecten-veneris* L., and *Centaurea cyanus* L. have declined markedly this century in Western Europe (Sutcliffe and Kay, 2000). These weeds are probably good candidate as biodiversity indicators because they are strictly dependent on arable ecosystems (Wilson, 1993) and are sensitive to agricultural intensification (Pocock and Jennings, 2008).

Arable land-dependent weed species are called “segetal species”. This term describes annual species with a life cycle that corresponds to that of winter cereals and that mature at the time of harvest. Their co-existence with winter cereals was reported as far as it can be recorded from the origin of agriculture. They comprise abundant (*Papaver rhoeas* L., *Galium aparine* L.), under surveillance (*Bromus arvensis* L., *Consolida regalis* L.) or threatened (*Adonis annua* L., *Nigella arvensis* L.) species. The segetal reference list we used in this study is the one adopted by a panel of agronomy and botany experts in France under the label “messicoles” (Aboucaya et al., 2011). Several species from this list are very widespread while others are on the red list of many countries and regions. *C. cyanus* (Asteraceae) appears on this list as a species that may be at risk and should be monitored. Although it is a noxious weed, it is considered as emblem of the flora associated with traditional, “low input”, cereal cultures. At the society level, it symbolizes hope and represents a flag species that deserves to be protected (WWF, 1989). It is an insect-pollinated, annual species that was imported to western Europe along with cereals about 2000 years ago (Jauzein, 2001). This species germinates in autumn and is mainly present in winter crops (wheat and oilseed rape). It is a rare and endangered segetal species in western France, including in the Poitou-Charentes region (Baron, 1989). Populations of *C. cyanus* in the Poitou-Charentes region are generally small and restricted to just a few areas. This species may be a good candidate as indicator of arable land biodiversity because it occurs only in arable land and is an easily recognizable species, with blue flowers that emerge above the crop canopy. Identifying *C. cyanus* presence could help to detect associated species that are not easily visible and to identify areas that are significant for conservation. In reality, some associations in France already view this species as a biodiversity indicator. The aim of this study, therefore, is to evaluate whether *C. cyanus*

can be considered a reliable weed diversity indicator. The study was carried out in the Poitou-Charentes region in 2008 and 2009, using floristic samples collected in fields in which *C. cyanus* was either present or absent.

2. Materials and methods

2.1. The region

The study site is located in the Central Western France (Poitou-Charentes Region, 46°11'N, 0°28'W; Fig. 1), south of the city of Niort within a landscape that is primarily farmland. The study site encompasses approximately 500 km², and includes mostly winter crop (winter wheat and oilseed rape) and, to a lesser extent, grasslands. Average field size is about 4 ha in this region. Accurate visual monitoring of the region conducted in late spring during *C. cyanus* flowering in 2006 and 2007 detected *C. cyanus* within fields or field edges (i.e. still cropped land but not sowed) of 0.38% of the 18 000 fields (Fig. 1), which allowed to determine the study areas for further years.

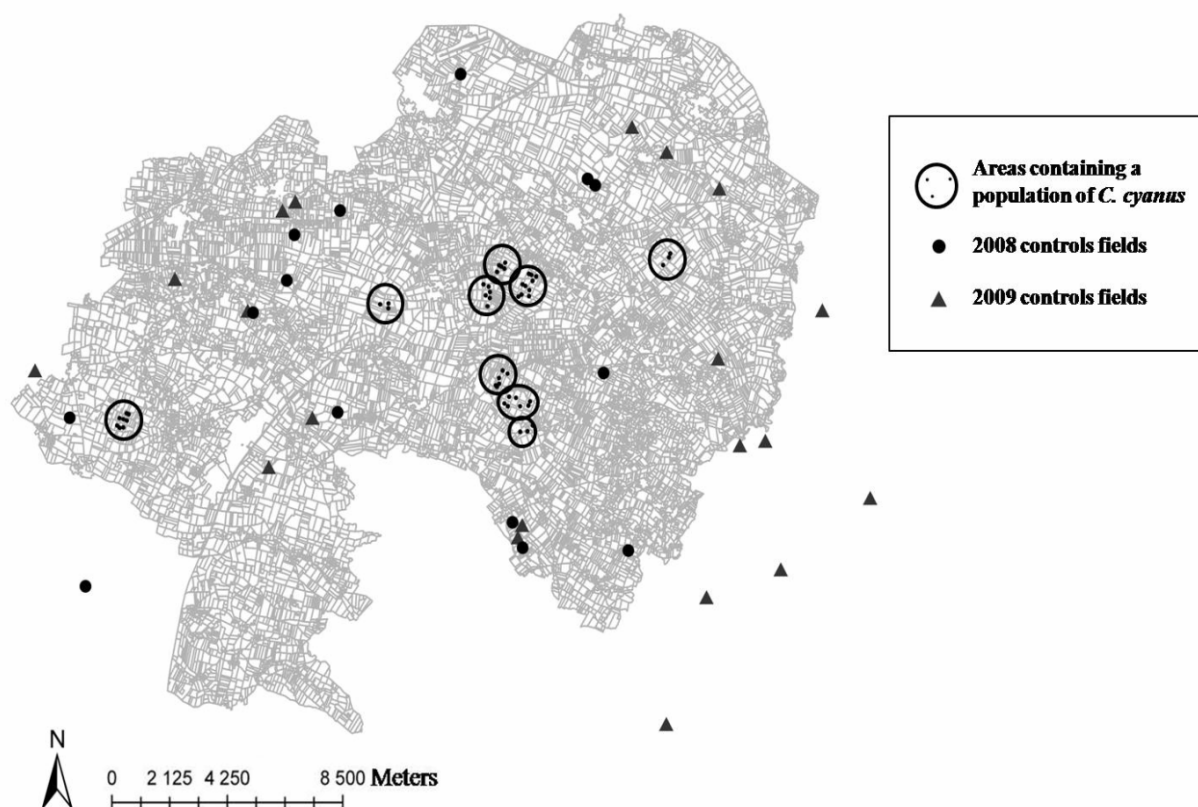


Fig. 1. Map of the study site in the Poitou-Charentes region showing locations of study fields in 2008 and 2009. Symbols indicate the areas containing a population of *Centaurea cyanus* (circle) and the control fields in 2008 (point) and 2009 (triangle).

2.2. Study areas and sampling

Nine areas were selected (Fig. 1). Each consisted of a central field where a population of *C. cyanus* was observed both in 2006 and 2007, and all adjacent fields (Fig. 2). Our survey included seven of these areas in March 2008, and all nine areas in February–March 2009. The fields were only surveyed if winter wheat or winter oilseed rape was actively sown at the time of the study. Therefore, only 27 were sampled both years while 37 fields were sampled only once in either 2008 or in 2009. In each area, weed species were surveyed within central and adjacent fields and on one randomly taken field edge of every field. By early spring, fall-germinating species were already identifiable as small plants and spring-germinating species as just-emerged seedlings, so that we consider that we were able to sample the whole sample richness. Several control fields, 14 in 2008 and 20 in 2009, sown either with winter wheat or oilseed rape, were randomly sampled outside the selected areas, i.e. in locations where *C. cyanus* had not been observed in the 2006–2007 monitoring (Fig. 1).

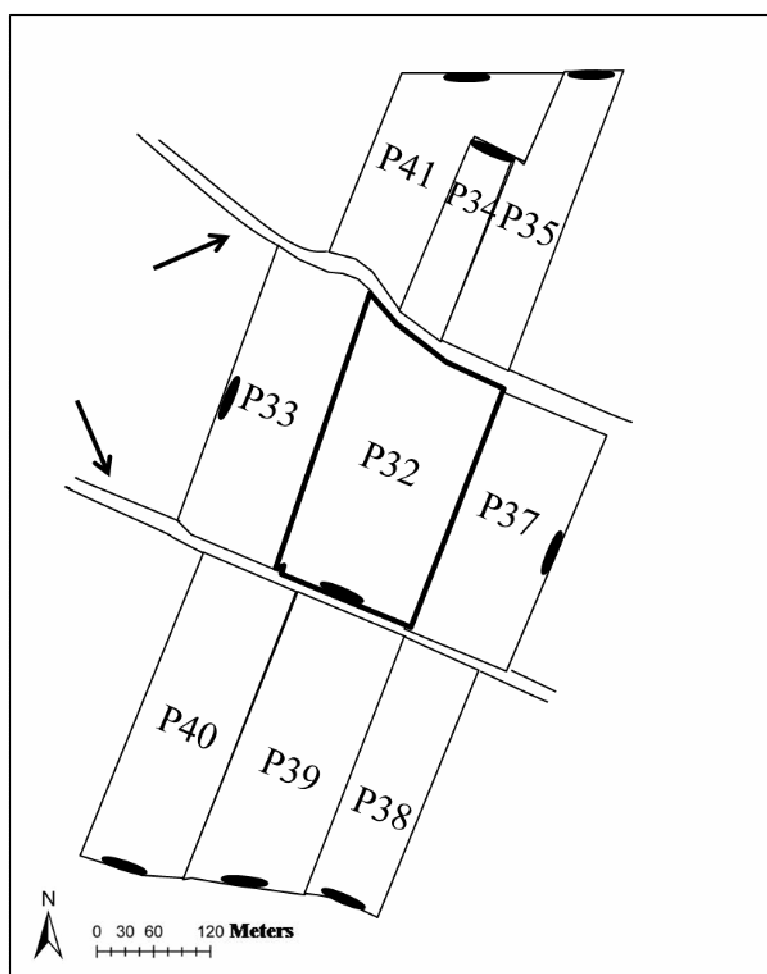


Fig. 2. Map of the FOY area, including local roads (arrows), the central field (P32) and the adjacent fields. The sampling locations of field edges (generally at the opposite side with respect to the central field) are indicated as dark ellipses.

To account for heterogeneity of weed distribution throughout the inner field, the sample protocol was based on a star pattern composed of eight, 60m-long arms. The star was sometimes slightly distorted to account for field configuration, especially narrow fields for which the most outer quadrat was located at least 5m from the field border. Each arm contained four 2×2m² quadrats. The distance between quadrats varied along each arm (Gaba et al., 2010). We used GPS to record the location of the 32 quadrats. We pooled data from the 32 quadrats in order to estimate the Shannon-Weaver diversity indices at the field level. Here we simply defined the species abundance in a field as the sum of the quadrats that contained a given species (therefore, this value ranged from 0 to 32). This approach avoids the drawbacks of estimating species richness and species density. In addition, we recorded the incidence of weed species throughout a continuous 0.5m-wide, 50m-long lane in the field edge.

2.3. Data analysis

The species richness was calculated as the accumulated number of species in a field according to the compartment (field edge or inner field) or in the whole field (field edge and inner field). Species richness of the whole field allowed accounting for potentially present species even if not detected inside the corresponding field. An interpolation map was generated from quadrats and edge data to determine the species richness throughout each study area. We used the ordinary kriging method for geostatistical analysis. Area mapping was done using ArcView GIS® 9.3. The analysis was done separately for each area and for each year. The kriging method creates a modeling data distribution map and models the species richness spatial distribution using the geospatial position data that we collected at each site. We used the Gaussian model, which gives us the variogram with the lowest nugget value. A corresponding error map was used to estimate the reliability of the model predictions.

The comparison of the mean species richness between areas and years of sampling was made, firstly, based on the whole field data and, secondly, based on inner field data only (i.e. without field edge). The field edge was not included in the calculation of the Shannon-Weaver index because species abundance was not recorded in that compartment which has not been structured into quadrats. An unbalanced, nested ANOVA model included Year, Area, and Crop within Area, all random factors, in GLM procedure using XLSTAT (2011). The frequency of occurrence is the proportion of the numbers of fields in which the species was

observed to the total number of fields over the study areas (without the control fields). When the field edge was included in the calculation, it is specified.

The Shannon-Weaver index was calculated from all species recorded in the quadrats (without the edge) as:

$$H' = - \sum [(N_i / N) * \ln (N_i / N)]$$

with:

- N_i =the abundance value for one species
- N =the sum of the abundances for all species observed in the field.

In a second step, we only used the segetal species. The segetal reference list used here is the one adopted by Tela Botanica (http://www.tela-botanica.org/page:plantes_messicoles_liste). The Kruskal-Wallis test was used to compare the diversity indices, using R software (R development Core Team, 2011). The regression model of the diversity index in terms of the frequency of occurrence of every segetal species was done using XLSTAT (2011) software.

3. Results

3.1. Occurrence of *C. cyanus*

In 2008, *C. cyanus* was found in five of the seven areas surveyed. It was present in eight fields of the 40 grown with wheat or oilseed rape contained within these seven areas. In three of these areas *C. cyanus* was present in just one field (both on the edge and the inner field). In one area, *C. cyanus* was present in two fields and in the final area *C. cyanus* was present in three fields (of these five fields, *C. cyanus* was present on the edge and the inner field in two cases, and on the edge only in the remaining three cases). Three of the fields in which *C. cyanus* was found in 2008 were the same central fields in which it was found in the 2006/2007 monitoring.

In 2009, *C. cyanus* was found in six of the nine areas surveyed. It was present in ten fields of the 51 grown with wheat or oilseed rape contained within these nine areas. In three of these areas *C. cyanus* was present in just one field. In two of these areas *C. cyanus* was present in two fields (in the inner field only). In one area *C. cyanus* was present in three fields (twice in the inner field and once on the edge). Among these fields, only two of the fields in which *C. cyanus* was found in 2009 were the same, central field in which it was detected in the 2006/2007 monitoring and only two of the fields contained *C. cyanus* in both 2008 and 2009. Over both years, its frequency of occurrence was 0.20 in the study areas (inner field and field edge). The abundance of *C. cyanus* inside the fields in which it was detected (i.e. 14

fields) ranged from 1 to 32 with a mean of 10.6 ± 2.6 (maximum abundance is 32 quadrats). *C. cyanus* was never observed in control fields.

3.2. Species richness

A total of 107 species were observed in the inner fields (including the control fields) over 2008 and 2009, and 133 when field edges were included. In the study areas an average of 23.5 species was observed per whole field, with a mean of 14.7 species in the field edge and 15.8 species in the inner field. In the control fields, an average of 28 species was observed per whole field, with 19.4 species in the field edge and 15.5 species in the inner field.

Table 1: Number of fields with oilseed rape (OSR) or wheat, and comparison of the mean species richness in inner fields without or including field edges in the nine study areas between 2008 and 2009 (p-value of the Kruskal-Wallis test).

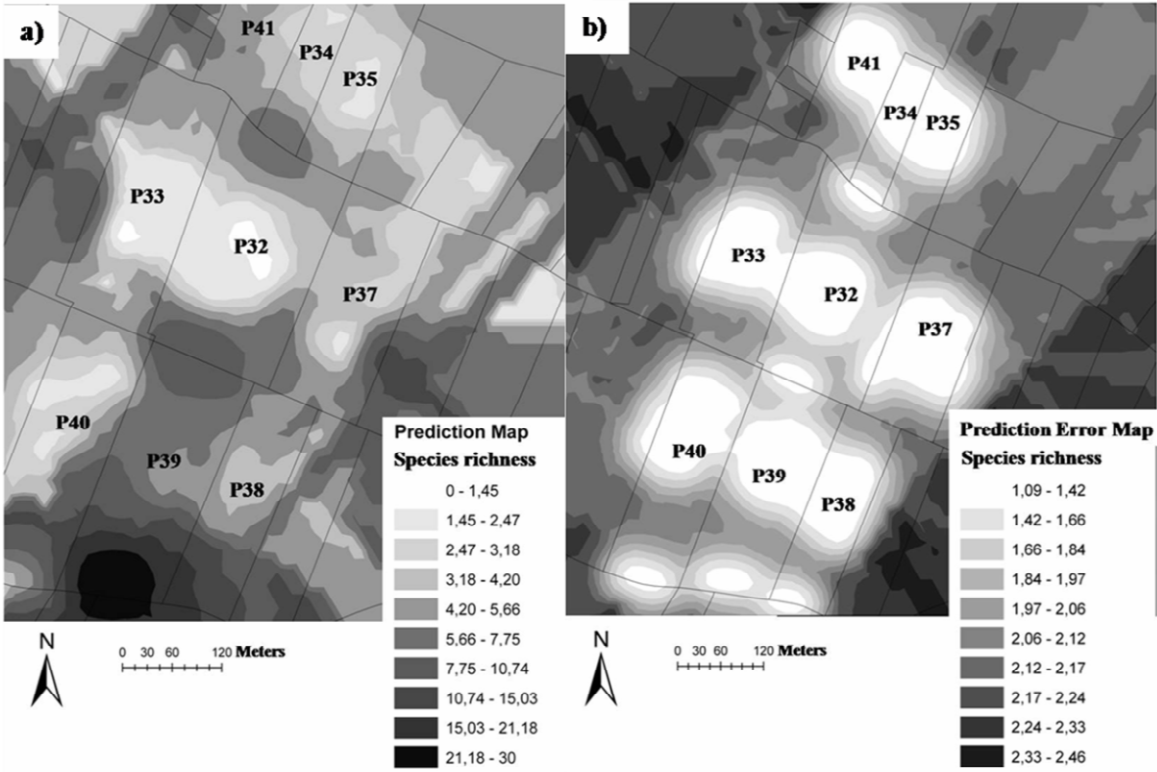
Areas	Field number		Species richness			
	2008	2009	Without edge		Including edge	
	OSR / Wheat	OSR / Wheat	2008 / 2009	p-value	2008 / 2009	p-value
F2	6 / 3	3 / 6	18.6 = 12.9	0.05	29.3 > 19.4	0.02*
F30	2 / 5	2 / 4	16.7 = 16.5	0.55	25.8 = 24.8	0.94
F43	1 / 2	1 / 2	12.7 = 18	0.47	17.7 = 24.3	0.51
FOY	1 / 8	5 / 3	12.1 < 19.6	0.005**	19.9 < 31.0	0.01*
STB	0 / 3	0 / 3	12.3 = 8.3	0.69	20.3 = 11.0	0.19
V5	2 / 5	0 / 6	17.4 = 14.8	0.99	19.7 = 20.0	0.35
V6	1 / 1	0 / 4	27 = 12.2	0.17	36.1 = 19.5	0.24
V1	/	5 / 2	15.6		/ 26.7	/
F1	/	2 / 3	19.4		/ 26.4	/

*, **: significant at $\alpha < 0.05$ and 0.01, respectively

The mean species richness per whole field (inner field and field edge) differed between 2008 and 2009 in only two of the seven areas that were surveyed in both years: F2, where species richness was higher in 2008, and FOY, where species richness was lower in

2008 (Table 1). When considering the mean species richness in the inner field only, there was no difference for F2, and only FOY appeared different between years.

Spatial distribution of species richness in 2008



Spatial distribution of species richness in 2009

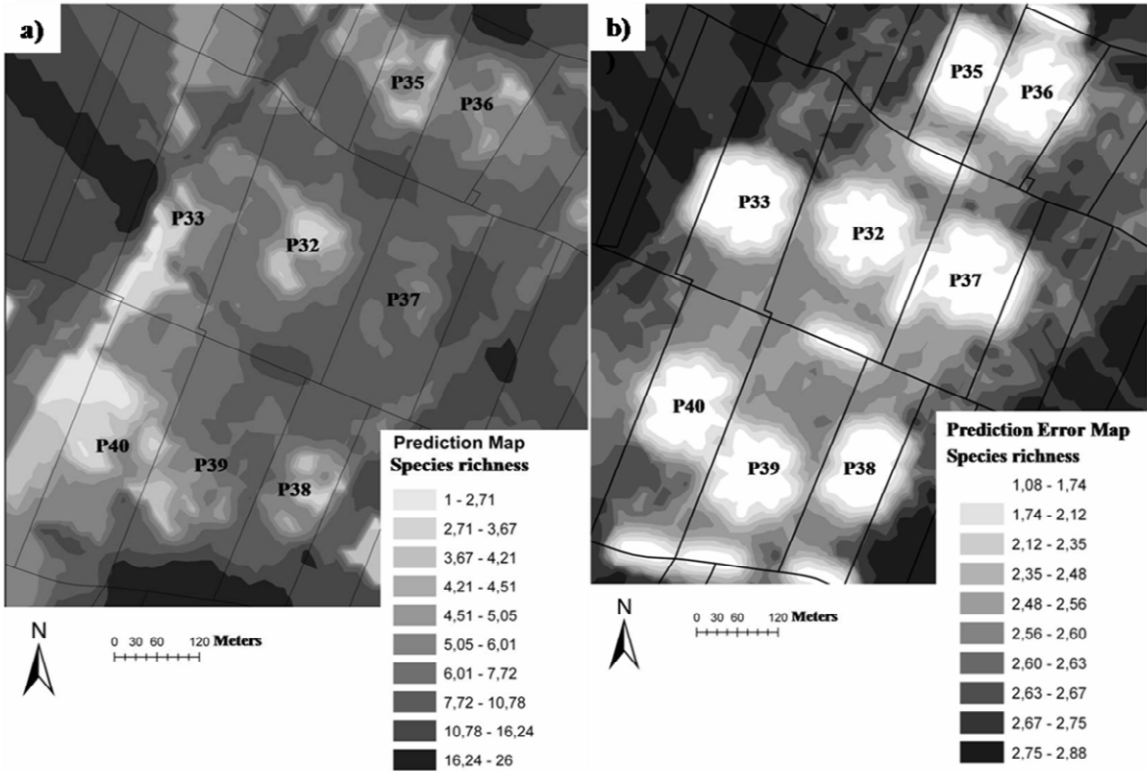


Fig. 3. Spatial distribution of: a) weed species richness for La Foye-Monjault (FOY) area in 2008 and 2009; the darker the drawing, the higher the species richness; b) the corresponding error map; the darker the drawing, the higher the estimate of the error.

Six of the nine fields in F2 were sown with oilseed rape in 2008 but only three fields were sown with oilseed rape in 2009. Conversely, only one of the nine FOY fields was sown with oilseed rape in 2008, but five of eight fields surveyed in FOY in 2009 were sown with oilseed rape (Table 1). The nested model ($df=14$, $F=3.24$, $p=0.0004$) indicates that the species richness distribution can be explained by the crop planted in a given field. The mean species richness in wheat fields over the study areas was 19.3 (11.9 in the field edge and 13 in the inner field) and the mean species richness in oilseed rape fields was 31.7 (20.2 in the field edge and 21.2 in the inner field). This result could explain differences between 2008 and 2009 in F2 and FOY. There was no significant effect of sampling year or area on species richness.

3.3. Spatial analysis

The spatial distribution of weeds was similar for all nine areas. Prediction and error maps from the kriging method are presented here for FOY only, one of the two areas that showed a species richness difference between years (Fig. 3). We did not observe *C. cyanus* in FOY in 2008 but we observed *C. cyanus* in one FOY wheat field in 2009 (P37). The frequency of *C. cyanus* occurrence changed in time and space, but *C. cyanus* frequency was always below 0.3 (Table 2).

Table 2: Mean frequency over the study areas (without the control fields) of the occurrence of *C. cyanus* in time and space according to the year of sampling, the crop, and the habitat. The mean value encompasses the two crops and the whole field (inner field and field edge together).

	Mean value	Wheat / Oilseed rape	Edge / Inner field
2008	0.20	0.18 / 0.23	0.20 / 0.12
2009	0.20	0.21 / 0.17	0.02 / 0.18

We observed a difference between the field interior and the edge, but the nature of this difference depended on the type of edge. If the edge was located between two fields, species richness was lower at the field edge than the interior. If the edge was alongside a hedgerow, species richness was the same in the interior and at the edge. If the edge was by a grass strip, species richness was higher at the edge than in the interior (Table 3). The error map shows that the best prediction of species richness in both years (in white in Fig. 3.b) matched with the location of the sampled quadrat on the star design and with the field edges.

Table 3: Comparison of mean species richness over the study areas and the control fields in the edges according to their adjacent habitat (p-value of the Kruskal-Wallis test).

Edge type	Number of edges	Mean species richness	p-value
Field edge / Inner field			
Field/Field	40	12.2 / 17.5	0.002**
Field/Hedge	12	13.9 / 15.2	0.88
Field/grass strip	73	18.4 / 14.9	0.002**

** : significant at $\alpha < 0.01$.

3.4. Relationship between *Centaurea cyanus* and the weed species

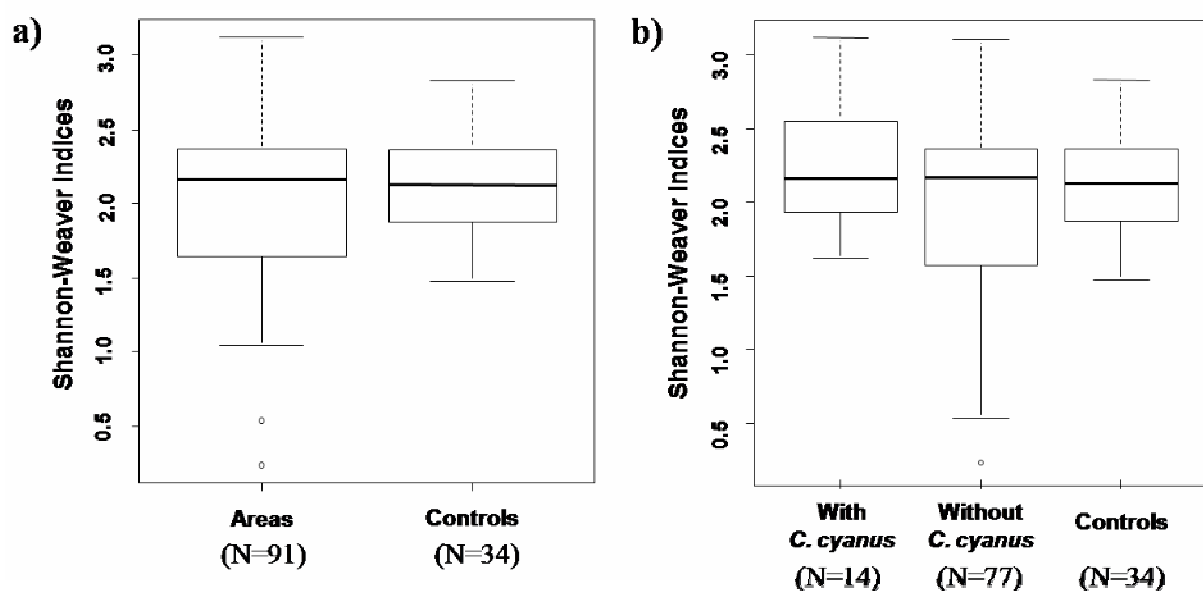


Fig. 4. Shannon-Weaver diversity index for all species observed in inner field according to: a) the study areas compared to the control fields; b) the actual presence/absence of *Centaurea cyanus*. The box represents the 25th and 75th quartiles, the median corresponds to the bold line and the whiskers show the minimal and the maximal values except outliers figured by circles. The test used was a Mann-Whitney test for a) and a Kruskal-Wallis test for b), significant at $\alpha < 0.05$.

The Shannon-Weaver diversity indices were calculated per field without including the edges. There was no significant difference in species diversity between 2008 and 2009. The two years were therefore considered together for subsequent analyses. Species diversity did not differ between the study areas and the control fields (Fig. 4a). Species diversity also did not differ between the central field and adjacent fields within any single area. We compared

the Shannon-Weaver diversity indices of the fields in which *C. cyanus* was actually present in the 2008 and 2009 sampling seasons with those in which *C. cyanus* was absent, in order to assess whether *C. cyanus* is an appropriate indicator of weed diversity. *C. cyanus* was not included in the calculation of the Shannon-Weaver diversity indices used in this comparison. The species diversity of fields containing *C. cyanus* in 2008 or 2009 did not differ from the species diversity in those fields without *C. cyanus* or from the control fields (Fig. 4b).

3.5. Relationship between segetal species and *Centaurea cyanus*

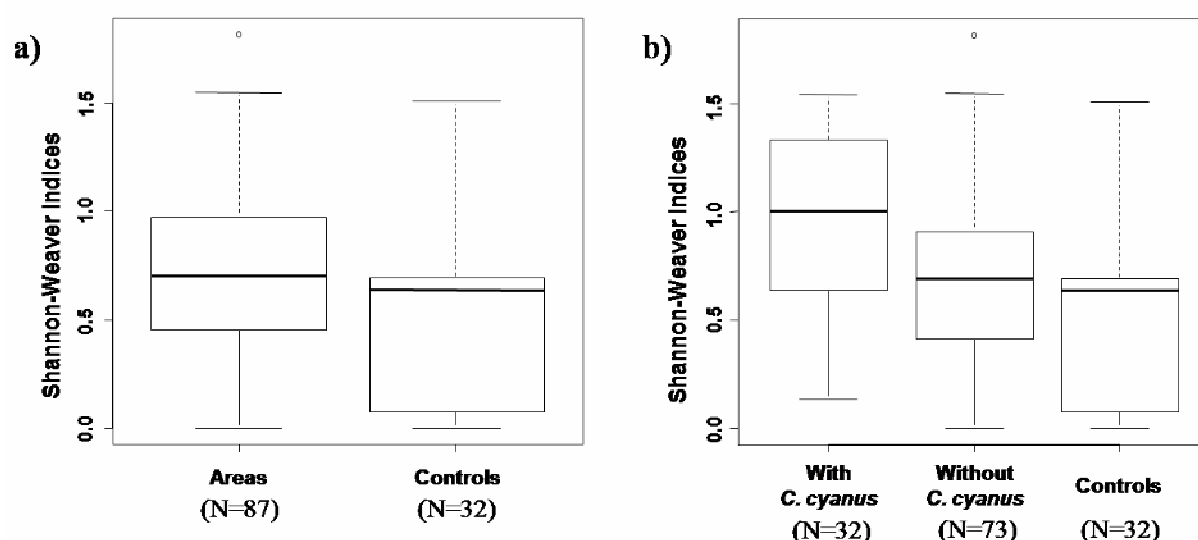


Fig. 5. Shannon-Weaver diversity index based on the segetal species observed in inner field according to: a) the study areas compared to the control fields; b) the presence/absence of *Centaurea cyanus* compared to the control fields. The box represents the 25th and 75th quartiles, the median corresponds to the bold line and the whiskers show the minimal and the maximal values except outliers figured by circles. The test used was a Mann-Whitney test for a) and a Kruskal-Wallis test for b), significant at $\alpha < 0.05$.

We observed 14 segetal species in the quadrats: *Adonis annua* L., *Alopecurus myosuroides* Hds., *Aphanes arvensis* L., *Arrhenatherum elatius* L., *Calepina irregularis* L., *C. cyanus*, *Galium aparine* L., *Legousia speculum-veneris* L., *Lithospermum arvense* L., *Papaver rhoeas* L., *Ranunculus arvensis* L., *Scandix pecten-veneris* L., *Thlaspi arvense* L., and *Viola* sp. (*tricolor* and/or *arvensis*). Of these species, *A. elatius* and *T. arvense* were observed only in 2008 while *R. arvensis* and *L. speculum-veneris* were observed only in 2009. Where they were present, their average abundance ranged from 1 to 20 quadrats over a total of 32 (Table 4). Diversity was significantly higher in the study fields than in the control fields ($p=0.026$, Fig. 5a). Fields that contained *C. cyanus* in 2008 or 2009 contained significantly more segetal diversity than fields without *C. cyanus* ($p=0.047$) and than the control fields

($p=0.006$, Fig. 5b). The difference in segetal diversity between fields within the study areas that did not contain *C. cyanus* and the control fields bordered significance ($p=0.076$).

Table 4: Distribution (number of fields where a given species has been observed), frequency of occurrence, mean abundance (in the fields where the species was recorded) and mean value of Shannon-Weaver indices over the study areas calculated from the segetal species in inner field, for every segetal species as indicator, and p-value of the comparison of fields with presence versus absence of that species (comparison evaluated using a Kruskal-Wallis test).

	Number of fields	Occurrence	Abundance	Shannon-Weaver indices	p-value
<i>Lithospermum arvense</i>	5	0.05	1.2 ± 0.2	1.06	0.27
<i>Adonis annua</i>	5	0.05	1.9 ± 0.2	1.04	0.07
<i>Legousia speculum veneris</i>	7	0.08	13.8 ± 3.8	1.20	<0.001***
<i>Alopecurus myosorides</i>	9	0.10	8.3 ± 2.6	1.08	0.01*
<i>Centaurea cyanus</i>	14	0.16	10.6 ± 2.6	0.94	0.04*
<i>Scandix pecten veneris</i>	13	0.15	2.6 ± 0.2	1.06	0.006**
<i>Calepine irregularis</i>	21	0.24	6.4 ± 1.6	0.93	0.005**
<i>Papaver rhoeas</i>	30	0.34	6.1 ± 1.6	0.82	0.04*
<i>Aphanes arvensis</i>	30	0.34	7.4 ± 2.2	0.80	0.03*
<i>Galium aparine</i>	61	0.70	9.6 ± 2.6	0.53	0.69
<i>Viola sp.</i>	75	0.86	19.8 ± 2.9	0.53	0.59

*, **, ***: significant at $\alpha < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

3.6. Distribution of segetal species in the landscape

In order to check whether the relationship observed above between *C. cyanus* and the segetal species group holds true for every segetal species, we repeated the calculation as above for every species separately (and removed that species from the data used to estimate the Shannon-Weaver diversity index). The ten segetal species that were observed in both years were used for the analysis. We also used *L. speculum-veneris*, which was observed in enough fields in 2009 (eight fields) to allow us to search for a correlation with the other segetal species in 2009 only.

Presence of seven of the eleven segetal species was correlated with richer segetal diversity (Table 4). Segetal diversity was significantly higher in fields where *A. annua*, *L. speculum-veneris*, *A. myosuroides*, *C. cyanus*, *S. pecten-veneris*, *C. irregularis*, *P. rhoeas* or *A. arvensis* were present than in fields in which these species were absent. The frequency of all of these species was below 0.4. Presence of *L. arvense*, which had the lowest frequency of occurrence, was not associated with higher segetal species diversity. Presence of *G. aparine*, and *Viola* sp. were not correlated with higher segetal species diversity. The frequency of occurrence of each of these species was above 0.4. Moreover, we observed a significant negative correlation between segetal species diversity and the frequency of occurrence of segetal species; the Shannon-Weaver indices (y) decreased linearly when the frequency of occurrence (x) increased ($y = 1.057 - 0.80x$; $R^2 = 0.906$; $F = 86.47$ and $p < 0.001$).

4. Discussion

The frequency of occurrence of *C. cyanus* in the study areas was 0.20, including both locations in the inner field and at the edge. Provided that we chose the study areas according to previous scouting of the blue flowers in the countryside, it is not surprising that its frequency of occurrence was much higher than the 0.0038 observed in the monitoring. Though *C. cyanus* had been recorded in a central field in both 2006 and 2007, it did not appear among the surface annual flora in two and three areas in 2008 and 2009, respectively. It was found in only three and two of the seven and nine central fields in 2008 and 2009, respectively. It was predominantly observed in the adjacent fields and/or edges (13 times over 18), but it was observed only once in two consecutive years in the same field. This confirms seldom and sporadic presence, even within the selected study areas. Probably, it is so rare and sensitive to weed management that it could escape the sampling procedure or be really absent of the surface flora although it is present in the soil seed bank and can re-appear under favorable conditions. Highly selective herbicides and variation of the date of spray are important factors involved in the regression of *C. cyanus* (Guillemin et al, in preparation).

Although it is not the purpose of that study to compare the flora diversity among crops or field location, we need to describe it in order to check if there is any relationship with the presence of *C. cyanus*. The mean species richness corresponds to the species richness commonly found within agricultural landscapes and eutrophicated fallow that often contains less than 20 species (Dierssen, 2006). Species richness within wheat fields in the study areas was close to that found in randomly sampled wheat fields in 2006 and 2007 in the same

region (Gaba *et al.*, 2010) and in other regions (Fried *et al.*, 2008). In contrast to studies in more eastern regions (Fried *et al.*, 2008), species richness was higher in fields sown with oilseed rape, probably because of reduced tillage, earlier sowing date and mild winter. The kriging representation clearly showed higher species richness in field edges alongside a road and in the first meters from the edge than in the central part of the field. This was confirmed by comparisons of species richness in the field and along the edge (Table 3) and corresponds to general findings (Wilson and Aebischer, 1995; Romero *et al.*, 2008, Fried *et al.*, 2009). Higher species richness within 4m of the field edge and rapid decline at greater distances is a widespread pattern of weed distribution that is mainly due to decades of intensive weed control and depletion of soil seed banks within fields. Competition with crops is less intense at the field edge alongside a grass strip (Albrecht, 2003), herbicide application is less effective, and both traffic on the road alongside the grass strip and presence of a road margin are potential seed entries, so the edge could serve as a refuge (Marshall *et al.*, 2003; Fried *et al.*, 2009). However, when the edges are situated between two fields, a location that was seldom surveyed in previous works, weed managements from both parts probably display higher selection pressure, including spray of more herbicides corresponding to two different crops, so that the species richness could be lower than in both crop inner fields. Finally, it is noteworthy that although control fields displayed similar diversity in their inner part, the additional species found in the field edge represented one third of the total diversity of whole fields in the study areas while they were nearly half the species in the control fields, which, perhaps, denotes a peculiar agricultural management in the *C. cyanus*-containing study areas.

We also observed a difference in the distribution of species richness within an area depending on the year and the proportion of each crop type. This is probably because of crop rotation, which some suggest may influence species richness (Ulber *et al.*, 2009). A high percentage of oilseed rape in the study areas should be correlated with an increase in species richness of weeds. This result could explain differences between 2008 and 2009 for F2 and FOY. However, no difference was observed between fields containing or expected to contain (i.e. the central field in each area) *C. cyanus* and the fields without *C. cyanus*.

The Shannon-Weaver indices for weed species, when all the weed species were considered, did not differ according to the presence/absence of *C. cyanus* in the inner field. In fact, we found greater segetal species diversity when *C. cyanus* was inside the field than when it was absent. This same relationship was observed with the other less common segetal species in our sample, with the exception of *L. arvensis*, which was probably too rare. Some other segetal species, like *A. myosuroides* and *A. arvensis*, could be otherwise very abundant.

Some segetal species are in decline because of the practice of crop intensification (Krebs et al., 1999). Our study revealed that rare segetal species appear to be found together in the same fields. They probably have similar biological characteristics and responded in the same way to the local environmental factors. These fields could be considered as refuge areas for these rare species, especially if the seed banks in these areas still contain seeds of rare segetal species. Indeed, one of the main barriers to maintaining or increasing plant diversity in agroecosystems could be the loss of many species from the seed bank (Zobel et al., 2000). Fields identified as refuges for rare segetal species are valuable sites for conserving plant diversity (Leng et al., 2009).

There are many possible factors that could influence the presence and distribution of rare segetal species in particular fields: the type of agricultural practices (Pocock and Jennings, 2008), the landscape context (Marshall, 2009), the proportion of conventional or organic systems within in an agroecosystem and the proportion of arable land surrounding wheat fields (Roschewitz et al., 2005). There are probably spatio-temporal dynamic factors (Waldhardt and Otte, 2003) linked with biological characteristics (Fagan et al., 1999) or neighborhood effects (Tilman, 1994) that influence the distribution of species richness in agroecosystems. For instance, preliminary results of a similar survey carried out in the east of France, in Burgundy, showed that diversity in fields with *C. cyanus* was not higher than in fields without *C. cyanus* (Bellanger et al., 2009). However, total weed diversity in areas always containing a few fields with *C. cyanus* was higher than that in the control fields located in areas where never *C. cyanus* was observed, and no clear-cut effect emerged for other segetal species. Therefore, the value of *C. cyanus* as an indicator of weed diversity could differ between the two regions and according to the target usual or segetal diversity. *C. cyanus* is still relatively common in Burgundy compared to Poitou-Charentes, which could impact its value as a biological indicator.

Indeed, a biological indicator will be a better predictor of change if it is a rare or endangered taxon at the scale involved in the study (Duelli and Obrist, 2003). Perhaps, the similarity in total weed diversity between control and *C. cyanus* areas in Poitou-Charentes was due to the overall agricultural intensity that led to a greater homogenization of field conditions in the region; this could reflect a situation in which only the segetal species respond to certain agricultural practices or structural heterogeneity (Dierssen, 2006). Landscape composition (Wagner et al., 2000) and climate conditions could also be important factors that could explain these different results.

5. Conclusion

C. cyanus and several other rare segetal species all seem to be good indicators of segetal species presence and diversity on a regional scale. *C. cyanus* is a particularly good candidate indicator species because it is one of the most easily recognizable at the rosette stage and the only one that emerges above the crop canopy at flowering time and up to harvest time. However, a more refined description of biological diversity in an agroecosystem, including the agroecosystem's ecosystemic services, should probably consider several indicator weed species (Hyvönen and Huusela-Veistola, 2008). Good candidate indicators are species that are neither too rare nor too abundant. Like *C. cyanus*, *Scandix pecten-veneris* and *Calepina irregularis* had a frequency of occurrence above 0.1. These segetal species could be used as biological indicators alongside *C. cyanus*. In the context of biodiversity conservation, studies are needed to determine whether these species could serve as useful indicators of biological diversity of organisms other than non-segetal weeds: arthropods (Duelli and Obrist, 1998) and birds (Storkey, 2006). At the very least, rare segetal species could be good indicators to use for selecting study areas that might be appropriate for addressing more broad biodiversity conservation questions in agroecosystems.

Acknowledgements

This work has been made possible through an ECOGER grant from INRA and a fellowship to SB by the Ministry of Agriculture (DGER) and the Council of the Burgundy Region. We thank Bruno Chauvel, Emilie Cadet, Damien Charbonnier and Virginie Moirez for their assistance in the field, Aude Trichard for the kriging method and Fabrice Dessaint for statistical advice.

References

- Aboucaya, A., 2011. Plan d'action national Messicoles, Conservatoire Botanique National de Porquerolles, Available from: http://www.tela-botanica.org/page:plantes_messicoles_liste (accessed February 2011).
- Albrecht, H., 2003. Suitability of arable weeds as indicator organisms to evaluate species conservation effects of management in agricultural ecosystems. *Agric. Ecosys. Environ.* 98, 201-211.

- ArcView GIS, 1999. Geographic Information Software v 9.3. Environmental Systems Research Institute (ESRI), Redlands, California.
- Balvanera, P., Pfisterer, A.B., Buchmann, N., He, J.S., Nakashizuka, T., Raffaelli, D., et al. 2006. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecol. Lett.* 9, 1146-1156.
- Baron, Y., 1989. Elément pour un bilan de la flore messicole en Poitou-Charentes. Plantes sauvages menacées. Actes. Brest. BRG.
- Bellanger, S., Darmency, H., Guillemin, J.P., 2009. Relationships between weed diversity and *Centaurea cyanus*. XIII^{ème} Colloque International sur la Biologie des Mauvaises Herbes, Dijon, France, 8-10 Septembre 2009, 8-15, 2009.
- Benton, T.G., Bryant, D.M., Cole, L., Crick, H.Q.P., 2002. Linking agricultural practice to insect and bird populations: a historical study over three decades. *J. Appl. Ecol.* 39, 673-687.
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemueller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*. 313, 351-354.
- Chapin, F.S., III, Zavaleta, E.S., Eviner, V.T., Naylor, R.L., Vitousek, P.M., Reynolds, H.L., et al. 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature*. 405, 234-242.
- Culman, S.W., Young-Mathews, A., Hollander, A.D., Ferris, H., Sanchez-Moreno, S., O'Geen, A.T., Jackson, L.E., 2010. Biodiversity is associated with indicators of soil ecosystem functions over a landscape gradient of agricultural intensification. *Landscape Ecol.* 25, 1333-1348.
- Dale, V.H., Beyeler, S.C., 2001. Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecol. Indicators*. 1, 3-10.
- Dierssen, K., 2006. Indicating botanical diversity - Structural and functional aspects based on case studies from Northern Germany. *Ecol. Indicators*. 6, 94-103.
- Donald, P.F., Sanderson, F.J., Burfield, I.J., van Bommel, F.P.J., 2006. Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990-2000. *Agric. Ecosys. Environ.* 116, 189-196.
- Dornelas, M., Moonen, A.C., Magurran, A.E., Barberi, P., 2009. Species abundance distributions reveal environmental heterogeneity in modified landscapes. *J. Appl. Ecol.* 46, 666-672.
- Duelli, P., Obrist, M.K., 2003. Biodiversity indicators: the choice of values and measures. *Agric. Ecosys. Environ.* 98, 87-98.
- Duelli, P., Obrist, M.K., 1998. In search of the best correlates for local organismal biodiversity in cultivated areas. *Biodivers. Conserv.* 7, 297-309.
- Fagan, W.E., Cantrell, R.S., Cosner, C., 1999. How habitat edges change species interactions. *Am. Nat.* 153, 165-182.
- Fried, G., Petit, S., Dessaint, F., Reboud, X., 2009. Arable weed decline in Northern France : Crop edges as refugia for weed conservation ? *Biol. Conserv.* 142, 238-243.

- Fried, G., Norton, L., Reboud, X., 2008. Environmental and management factors determining weed species composition and diversity in France. *Agric. Ecosys. Environ.* 128, 68-76.
- Gaba, S., Chauvel, B., Dessaint, F., Bretagnolle, V., Petit, S., 2010. Weed species richness in winter wheat increases with landscape heterogeneity. *Agric. Ecosys. Environ.* 138, 318-323.
- Gregory, R.D., van Strien, A., Vorisek, P., Meyling, A.W.G., Noble, D.G., Foppen, R.P.B., Gibbons, D.W., 2005. Developing indicators for European birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences.* 360, 269-288.
- Grundy, A.C., Mead, A., Bond, W., Clark, G., Burston, S., 2011. The impact of herbicide management on long-term changes in the diversity and species composition of weed populations. *Weed Res.* 51, 187-200.
- Hyvönen, T., Huusela-Veistola, E., 2008. Arable weeds as indicators of agricultural intensity - A case study from Finland. *Biol. Conserv.* 141, 2857-2864.
- Jauzein, P., 2001. Biodiversité des champs cultivés : l'enrichissement floristique. Dossier de l'environnement de l'INRA. 21, 43-64.
- Kleijn, D., Kohler, F., Baldi, A., Batary, P., Concepcion, E.D., Clough, Y., Diaz, M., Gabriel, D., Holzschuh, A., Knop, E., Kovacs, A., Marshall, E.J.P., Tscharntke, T., Verhulst, J., 2009. On the relationship between farmland biodiversity and land-use intensity in Europe. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences.* 276, 903-909.
- Krebs, J.R., Wilson, J.D., Bradbury, R.B., Siriwardena, G.M., 1999. The second silent spring? *Nature.* 400, 611-612.
- Landres, P.B., Verner, J., Thomas, J.W., 1988. Ecological uses of vertebrate indicator species - A critique. *Conserv. Biol.* 2, 316-328.
- Leng, X., Musters, C.J.M., de Snoo, G.R., 2009. Restoration of plant diversity on ditch banks: Seed and site limitation in response to agri-environment schemes. *Biol. Conserv.* 142, 1340-1349.
- Magurran, A.E., 1988. *Ecological Diversity and its Measurement.* Croom Helm Limited, London.
- Marshall, E.J.P., Brown, V.K., Boatman, N.D., Lutman, P.J.W., Squire, G.R., Ward, L.K., 2003. The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. *Weed Res.* 43, 77-89.
- Marshall, E.J.P., 2009. The impact of landscape structure and sown grass margin strips on weed assemblages in arable crops and their boundaries. *Weed Res.* 49, 107-115.
- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis.* Island Press, Washington, DC.
- Minoshima, H., Jackson, L.E., Cavagnaro, T.R., Sanchez-Moreno, S., Ferris, H., Temple, S.R., Goyal, S., Mitchell, J.P., 2007. Soil food webs and carbon dynamics in response to conservation tillage in California. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 952-963.
- Newton, I., 2004. The recent declines of farmland bird populations in Britain: an appraisal of causal factors and conservation actions. *Ibis.* 146, 579-600.

- Nordén, B., Paltto, H., Götmark, F., Wallin, K., 2007. Indicators of biodiversity, what do they indicate? Lessons for conservation of cryptogams in oak-rich forest. *Biol. Conserv.* 135, 369-379.
- Pocock, M.J.O., Jennings, N., 2008. Testing biotic indicator taxa: the sensitivity of insectivorous mammals and their prey to the intensification of lowland agriculture. *J. Appl. Ecol.* 45, 151-160.
- Prendergast, J.R., Quinn, R.M., Lawton, J.H., Eversham, B.C., Gibbons, D.W., 1993. Rare species, the coincidence of diversity hotspots and conservation strategies. *Nature.* 365, 335-337.
- R Development Core Team, 2011. R/ a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org>.
- Robinson, R.A., Sutherland, W.J., 2002. Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *J. Appl. Ecol.* 39, 157-176.
- Romero, A., Chamorro, L., Sans, F.X., 2008. Weed diversity in crop edges and inner fields of organic and conventional dryland winter cereal crops in NE Spain. *Agric. Ecosyst. Environ.* 124, 97-104.
- Roschewitz, I., Gabriel, D., Tschardt, T., Thies, C., 2005. The effects of landscape complexity on arable weed species diversity in organic and conventional farming. *J. Appl. Ecol.* 42, 873-882.
- Storkey, J., 2006. A functional group approach to the management of UK arable weeds to support biological diversity. *Weed Res.* 46, 513-522.
- Sutcliffe, O.L., Kay, Q.O.N., 2000. Changes in the arable flora of central southern England since the 1960s. *Biol. Conserv.* 93, 1-8.
- Tilman, D., 1994. Competition and biodiversity in spatially structured habitats. *Ecology.* 75, 2-16.
- Ulber, L., Steinmann, H.H., Klimek, S., Isselstein, J., 2009. An on-farm approach to investigate the impact of diversified crop rotations on weed species richness and composition in winter wheat. *Weed Res.* 49, 534-543.
- Wagner, H.H., Wildi, O., Ewald, K.C., 2000. Additive partitioning of plant species diversity in an agricultural mosaic landscape. *Landscape Ecol.* 15, 219-227.
- Waldhardt, R., Otte, A., 2003. Indicators of plant species and community diversity in grasslands. *Agric. Ecosys. Environ.* 98, 339-351.
- Wilson, J.D., Morris, A.J., Arroyo, B.E., Clark, S.C., Bradbury, R.B., 1999. A review of the abundance and diversity of invertebrate and plant foods of granivorous birds in northern Europe in relation to agricultural change. *Agric. Ecosys. Environ.* 75, 13-30.
- Wilson, P.J., Aebischer, N.J., 1995. The distribution of dicotyledonous arable weeds in relation to distance from the field edge. *J. Appl. Ecol.* 32, 295-310.
- Wilson, P. J., 1993. Conserving Britain's cornfield flowers. Brighton crop protection conference, weeds. Proceedings of an international conference. 1, 411-416.
- WWF 1989. L'été des bleuets. Panda 39, F-G.
- XLSTAT, 2011. Version 2011.2.04. Paris, France: Addinsoft SARL 1995-2011.

Zobel, M., Otsus, M., Liira, J., Moora, M., Mols, T., 2000. Is small-scale species richness limited by seed availability or microsite availability? *Ecology*. 81, 3274-3282.

D- DISCUSSION GENERALE

Le bleuet n'est pas une espèce indicatrice d'une diversité floristique plus élevée au sein d'une parcelle agricole. Par contre, *C. cyanus* ainsi que les espèces messicoles peu fréquentes en Poitou-Charentes, semblent être cantonnés dans les mêmes parcelles, différentes d'une année sur l'autre, et ces résultats sont reproductibles. Ces parcelles peuvent être caractérisées comme étant des zones refuges pour les espèces rares. Ce résultat pourrait permettre une identification rapide, par l'intermédiaire du bleuet, des zones à intérêt pour la conservation des messicoles rares de cette région (par exemple, dans le cadre du Plan national d'action en faveur des messicoles). Les facteurs environnementaux et agricoles qui permettent le maintien de ces messicoles dans ces parcelles restent cependant à déterminer avant la mise en place de mesures de protection.

Ces résultats ne sont pas reproductibles à toutes les zones géographiques. En effet, en Bourgogne, où le statut du bleuet et le contexte paysager ne sont pas les mêmes, *C. cyanus* n'est ni indicateur d'une diversité floristique plus élevée ni indicateur de la présence de messicoles rares dans la parcelle agricole. Parmi les messicoles identifiées, aucune n'est une espèce indicatrice. Par contre, les zones caractérisées pour la présence de bleuets au cours de ces dernières années semblent avoir une diversité floristique plus élevée que celles sans populations de *C. cyanus*. Ce résultat indique que la répartition du bleuet dans le paysage agricole bourguignon n'est pas totalement aléatoire et que le bleuet est présent dans des zones présentant une diversité floristique plus importante.

Ces résultats confirment qu'une espèce rare dans un paysage serait plus sensible aux modifications de l'environnement telles que : les pratiques agricoles (Kleijn & Sutherland, 2003), le contexte paysager (Marshall, 2009), la dynamique spatio-temporelle (Waldhardt & Otte, 2003) associée aux caractéristiques biologiques de l'espèce (Fagan et al., 1999) et aux effets de voisinages (Tilman, 1994) ou l'interaction de l'ensemble de ces facteurs, étant ainsi, potentiellement une meilleure espèce indicatrice (Duelli & Obrist, 2003).

E- POINTS MARQUANTS DU CHAPITRE

- Le bleuet n'est pas une espèce indicatrice d'une diversité floristique élevée dans une parcelle cultivée.
- Le bleuet est présent dans des zones qui semblent favoriser une diversité floristique plus élevée indiquant que sa **répartition** dans le paysage agricole n'est **pas aléatoire**.
- Lorsqu'il est **peu fréquent**, *C. cyanus* peut permettre d'identifier des zones ou parcelles d'intérêt pour la conservation et la protection d'espèces messicoles rares à **l'échelle régionale**.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le bleuet (*Centaurea cyanus* L.) est une espèce messicole emblématique de la flore des champs en France. Il est actuellement en voie de raréfaction dans l'ouest de la France et encore fréquent dans l'est. *C. cyanus* est une espèce dont la répartition dans le paysage, la biologie et la génétique des populations ont été, jusqu'à présent, peu étudiées. De par son caractère emblématique, il existe une volonté de préserver cette espèce dans son habitat. La mise en place de projets de conservation requiert une compréhension au préalable des causes ayant entraîné le déclin de l'espèce. Ainsi, l'objectif de cette thèse a été, dans un premier temps, de déterminer les caractéristiques biologiques les plus critiques qui pourraient rendre compte de sa raréfaction dans le paysage agricole. Dans un deuxième temps, une première étude de la génétique des populations de bleuets a été effectuée afin de dresser un état des lieux de la structuration et du déclin éventuel de sa diversité génétique. Enfin, dans un troisième temps, nous avons essayé de mieux comprendre comment était distribué le bleuet dans le paysage.

- *Caractéristiques biologiques liées à la présence du bleuet dans l'agroécosystème*

La biologie du bleuet a été étudiée avec pour objectif de mieux comprendre son comportement dans l'agroécosystème. Plusieurs étapes de son cycle de vie ont ainsi été étudiées : la longévité des semences, la dormance et la capacité de germination des akènes de bleuets, la levée et l'installation de l'espèce dans la parcelle cultivée et enfin, le système de reproduction. Ces stades du développement sont fondamentaux pour une espèce végétale et peuvent permettre d'expliquer sa réussite ou non dans un écosystème.

Ainsi, plusieurs caractéristiques de la biologie de l'espèce peuvent expliquer ou avoir entraîné sa raréfaction dans l'ouest de l'Europe :

- Le fait que cette espèce soit strictement dépendante des pollinisateurs pour se reproduire peut entraîner des échecs complets de la reproduction certaines années car la densité de pollinisateurs est fortement dépendante des conditions environnementales (température et pesticides principalement).
- Le système d'auto-incompatibilité du bleuet est principalement un inconvénient dans le cas de populations de petites tailles et/ou isolées. En effet, la présence d'individus pseudo auto-compatibles permet leur maintien à court terme mais peut entraîner une

augmentation rapide du niveau de consanguinité induisant une chute de la valeur phénotypique des individus et finalement un accroissement du risque d'extinction. Dans le cas des grandes populations ou des métapopulations, ce système n'est pas défavorable. Au contraire, il induit le maintien d'une diversité génétique élevée dans les populations, comme celle observée en Bourgogne, ce qui permet aussi à ces populations d'avoir un potentiel adaptatif et évolutif plus élevé. Le coquelicot, autre messicole souvent prise comme symbole d'une campagne saine et traditionnelle, est aussi un bon exemple d'espèce auto-incompatible (Rea & Nasrallah, 2008) avec un succès important dans l'agroécosystème probablement dû à sa grande aire de répartition. Finalement, plus la taille des populations est grande et plus les flux entre populations seront élevés, plus ce système de reproduction représentera un avantage.

- La faible persistance des akènes dans le sol, tout d'abord, est un caractère désavantageux pour le bleuet dans un milieu constamment perturbé et régulièrement défavorable avec les rotations de cultures. Il faudrait que *C. cyanus* puisse renouveler son stock semencier au moins une fois tous les deux ans. Au-delà, la mortalité des akènes dans le sol augmente très rapidement. Le coquelicot, contrairement au bleuet, est connu pour avoir une forte persistance des semences dans le sol (Holm et al., 1997) expliquant probablement en partie son succès dans l'agroécosystème.
- La faible tolérance à la compétition de l'espèce (Svensson & Wigren, 1985) nous éclaire un peu sur son absence dans des compartiments hors champ tels que les bordures herbacées, les bandes enherbées, ... A titre de comparaison, le coquelicot est reconnue pour être très compétitive et peut faire baisser le rendement de la culture lorsqu'elle est présente en forte densité dans la parcelle (Wright et al., 1997). Cette espèce est aussi une ubiquiste dont la niche écologique ne se limite pas à l'agroécosystème. D'autres pratiques culturales peuvent, cependant, expliquer l'absence de *C. cyanus* hors de la parcelle cultivée telles que le travail du sol. L'effet du non labour sur la levée et l'installation des populations de bleuet est un facteur agricole qu'il serait intéressant d'étudier avec l'évolution des pratiques de semis direct (sans travail du sol).

Les caractéristiques qui peuvent être liées à sa réussite en Bourgogne ou à son maintien limité dans l'ouest de la France sont les suivantes :

- Le succès reproducteur du bleuet. Certaines plantes peuvent, en absence d'une forte compétition, produire plus de 1.000 capitules soit plus de 10.000 akènes. A titre de

comparaison, le coquelicot peut produire jusqu'à 800.000 graines par plante sans compétition et jusqu'à 40.000 graines par plante en condition de compétition avec le blé (Holm et al., 1997).

- Cette espèce est une opportuniste avec une simple dormance saisonnière. Dès que les conditions sont favorables, les akènes initient la germination laissant ainsi le temps aux individus d'accomplir l'ensemble de leur cycle avant les moissons. Ce facteur biologique est probablement un critère important du maintien de cette espèce dans l'est de la France où la plage de conditions favorables est plus courte qu'à l'ouest de la France (pas de gaspillage des semences). Cependant, les akènes doivent se trouver dans des conditions compatibles aux exigences de germination de l'espèce, soit à une profondeur inférieure à 8 cm, ce qui laisse toujours dormante une partie du stock de semences.
- Il existe de deux cohortes de germination, une en automne et une au printemps. La présence d'une cohorte de printemps s'avère être un avantage lorsqu'une culture de printemps est semée. Ces deux cohortes peuvent être issues d'une différenciation génétique en deux sous-populations encouragées par une séparation des floraisons. Il est aussi possible que ce phénomène soit simplement dû aux conditions environnementales : les akènes qui n'ont pas initiés la germination en automne doivent attendre les prochaines conditions favorables, qui arrivent au printemps suivant, pour germer. Des différences de fertilité et de fécondité, provoquées par des conditions de développement différentes (température, humidité,...), sont souvent observées entre les deux cohortes entraînant un succès différent chez plusieurs espèces (Lindström & Kokko, 2002). Par ailleurs, la présence de deux cohortes de germination est souvent observée chez les adventices des cultures. Par exemple, le coquelicot présente deux cohortes, une automnale et une printanière chacune avec une émergence, une croissance, une fécondité et une dormance différentes (Torra & Recasens, 2008).

- *Diversité génétique et structuration des populations en Bourgogne*

Les populations de bleuets étudiées en Bourgogne (sur le site de la zone atelier de Fénay et ses alentours) seraient connectées par des flux de gènes formant, ainsi, une grande métapopulation. Ce type de distribution est généralement associé à une dynamique d'extinction et de recolonisation (Mac Arthur & Wilson, 1963) qui correspond à ce qui est attendu dans un habitat qui est régulièrement défavorable à *C. cyanus*. La diversité génétique

observée au sein des populations ne semble pas montrer que les populations de Bourgogne soient en danger.

Il est probable que cette diversité génétique soit la caractéristique qui fait défaut aux populations du Poitou-Charentes. En effet, la rareté entraîne généralement un isolement par la distance des populations. L'isolement entraîne une diminution du nombre de reproducteurs possibles et donc une diminution de la diversité génétique (Mitton, 1997) qui, dans le cas du bleuet, peut provoquer des échecs de la reproduction *via* le système d'auto-incompatibilité. Ces hypothèses seront à confirmer, notamment en recherchant le nombre et la fréquence des allèles d'incompatibilité dans les deux régions.

- *Distribution du bleuet dans le paysage agricole et communautés végétales associées*

Sur un territoire, le bleuet est essentiellement observé à l'intérieur des parcelles cultivées malgré une aptitude à se développer dans les zones hors champs lorsque la compétition n'y est pas trop élevée. Il semble qu'un des facteurs influençant la répartition de *C. cyanus* au sein des compartiments de la parcelle est la culture. Historiquement présent dans les céréales d'hiver, il est maintenant communément observé avec les Brassicacées (dicotylédones). Plusieurs éléments pourraient expliquer cette évolution. Les molécules herbicides appliquées dans les cultures de Brassicacées, tout d'abord, sont moins nuisibles pour les dicotylédones que celles utilisées dans les céréales, spécifiquement appliquées contre celles-ci (Ulber, 2010). L'application d'herbicide n'a pas été prise en compte dans cette étude mais elle est définie comme la pression la plus forte rencontrée par la flore des champs dans une culture (Marshall et al., 2003). En effet, 24% de la variation du couvert de bleuet peut être expliquée par les traitements herbicides (Ulber, 2010). Dans cette expérimentation, *C. cyanus* est apparu sensible à toutes les molécules testées et plus particulièrement au Mecoprop (acide méthylchlorophénoxypropionique). A titre de comparaison, 26% de la variation de couvert du coquelicot est expliquée par les traitements herbicides. Par contre, toutes les molécules n'ont pas un effet significatif sur la densité de couvert du coquelicot (par ex. le fluroxypyr) (Ulber, 2010). Généralement, l'application d'herbicides relègue au mieux les adventices au niveau de l'interface où l'efficacité du traitement y est souvent moindre. C'est par exemple le cas de *Lithospermum arvense* et *Scandix pecten-veneris* deux autres messicoles encore communes (Friel et al., 2007). Ainsi, dans l'agroécosystème, on peut s'attendre à observer le bleuet suivant un gradient de densité qui augmenterait du plein champ vers l'interface de la parcelle cultivée. Ce gradient est déjà observé dans les cultures de moutarde en absence de traitement

herbicide. Par contre, dans le blé, nous observons le résultat contraire avec une densité qui augmente vers le plein champ. Dans les champs où il a été observé, même dans l'ouest de la France où il n'est pas fréquent, et avec traitements herbicides, il a été noté présent en moyenne dans 10 quadrats sur 32 (sans l'interface), montrant que le bleuet est plutôt bien représenté à l'intérieur de la parcelle. Ainsi, la culture et les traitements herbicides ne semblent pas être des facteurs suffisants pour expliquer la répartition du bleuet au sein des compartiments de la parcelle cultivée.

Les communautés végétales associées à *C. cyanus* dans l'agroécosystème semblent être dépendantes de la région étudiée et du statut de l'espèce. Lorsque le bleuet est peu fréquent, il est associé, dans la parcelle, à des espèces messicoles rares de la région. Il semble que les causes liées au déclin des messicoles rares dans l'ouest de la France aient contraint ces espèces dans des parcelles qui peuvent être caractérisées comme des refuges. Le bleuet, en tant qu'espèce facilement reconnaissable peut, ainsi, être utilisé comme espèce indicatrice de la présence de messicoles rares à l'intérieur d'une parcelle dans la région du Poitou-Charentes. Lorsque *C. cyanus* est plus fréquent, cette conclusion n'est plus vraie. Le bleuet n'apparaît plus lié à une communauté adventice particulière mais les zones (ensemble de parcelles) où le bleuet est présent (dans le stock semencier ou en tant que plante) ont une diversité floristique plus élevée. La distribution du bleuet dans le paysage agricole, quel que soit son statut, ne semble donc pas aléatoire. Pour en déterminer les règles de distribution, il semble donc nécessaire d'approfondir les caractéristiques paysagères et/ou agronomiques qui impactent sur la répartition des adventices en général, et les contraintes biologiques du bleuet en particulier.

Nos résultats apportent les premières données quantifiées sur le fonctionnement des populations de bleuets, que ce soit leur distribution dans le paysage agricole ou les facteurs biologiques et génétiques qui peuvent influencer la réussite ou le déclin de l'espèce. Dans l'ouest de la France, la fragmentation des populations de bleuets est probablement ce qui a entraîné leur déclin *via* un isolement géographique ayant provoqué un isolement reproductif. Actuellement, la question qui semble primordiale concernant ces populations est la diversité génétique. Si elle est présente, les risques d'extinction ne sont probablement pas très élevés. En revanche, s'il n'y a pas ou peu de diversité génétique, le maintien des populations semble compromis à moyen terme, lorsque la banque de semences sera épuisée. Par contre, on peut se demander si des mesures de protection pourraient permettre à ces populations en voie

d'épuisement de reconstruire une diversité génétique et des effectifs suffisants. Il faudrait pour cela pouvoir analyser les causes agronomiques de cette potentielle fragmentation en les croisant avec les facteurs environnementaux, biologiques et génétiques.

- Des enquêtes agronomiques pourront être réalisées auprès des agriculteurs dans les deux régions de France où le statut du bleuet diffère (Poitou-Charentes et Bourgogne). Des informations sur les itinéraires techniques comme les rotations de culture, le travail du sol ou le désherbage devront être recueillies. D'autres renseignements concernant la structure du paysage comme la taille des parcelles, la présence de barrières écologiques ou de voies de passages, la distance à la ferme et la distance géographique séparant les populations de bleuets pourront aussi être caractérisées.
- Parmi les facteurs biologiques, il est important d'inventorier les pollinisateurs du bleuet, leur mobilité (transport de pollen inter-populations) et leur abondance en fonction de l'effectif des populations. La capacité de dispersion est en effet un facteur important qui peut limiter le recrutement entre les populations (Clark et al., 2007), les flux de gènes (Jordano et al., 2007), et la dynamique de la métapopulation (Spiegel & Nathan, 2007),...
- Parmi les facteurs génétiques, on devra mieux cerner le périmètre des populations, surtout celles qui semblent *a priori* isolées, leur degré de structuration, la diversité des allèles d'incompatibilité, et rechercher si le polymorphisme de gènes sélectionnés en réponse aux pressions anthropiques n'est pas particulier aux populations du Poitou-Charentes.

Une fois l'ensemble des informations récoltées, un plan de préservation du bleuet pourrait être mis en place par l'intermédiaire du Plan national d'action des messicoles. Cependant, en contrepartie de la réapparition de ces capitules d'un bleu intense dans nos campagnes pour satisfaire à une demande sociétale, il faudrait aussi trouver les consensus entre leurs éventuels services écologiques et leur nuisibilité, et définir une abondance acceptable pour respecter les besoins de la production agricole.

Une question importante, sous-jacente à ce travail, apparaît donc : quelle nature veut-on conserver ? La discussion qui suit n'a pas pour objectif de répondre à cette question, elle expose des éléments de réflexions à prendre en compte lors de la mise en place d'un plan de préservation d'un écosystème ou d'une espèce.

Une nature composée par des espèces charismatiques et présentes historiquement dans les habitats ? Cela sous-entend une nature figée alors que les écosystèmes sont, par définition, dynamiques et qu'ils évoluent constamment dans le temps. Les événements d'extinction et de recolonisation sont courants dans les milieux naturels. Il est donc aberrant de vouloir préserver un écosystème dans l'état où il était.

Le deuxième point important est l'échelle à laquelle le plan de gestion doit être mis en place. Doit-il concerner l'habitat dans son ensemble ou bien impliquer seulement l'espèce ? Actuellement, de plus en plus de directives (par exemple, la Directive Habitat, 1992) sont prises pour la protection d'un milieu renfermant des espèces considérées comme d'intérêt. Il est souvent considéré que les causes ayant entraîné le déclin de la diversité biologique sont dues à quatre facteurs : la dégradation et la destruction des habitats, les invasions biologiques et la spirale d'extinction, *via* les processus stochastiques, suivit par les petites populations (Diamond, 1989). Les trois premiers facteurs sont des conséquences de la pression humaine sur les écosystèmes. Le quatrième est un résultat des trois premiers. Il semble donc plus intéressant de préserver un habitat dans son ensemble puisque ce sont ses modifications qui ont provoqué le déclin de la diversité biologique. Cependant, ce système (écosystème) est, par définition complexe où les causes des modifications sont difficiles à définir.

Le troisième point est le choix des populations d'une espèce que l'on souhaite préserver. Faut-il protéger celles en déclin ou bien celles encore communes ? La conservation des espèces (ou populations) communes est importante pour plusieurs raisons. Elles sont essentielles pour le maintien des réseaux trophiques (Gaston, 2010), elles peuvent permettre de maintenir les rôles fonctionnels de l'écosystème (Dickman and Steeves, 2004), elle contribuent considérablement aux variations spatio-temporelles de la richesse spécifique (Lennon et al., 2010) et elles ont un meilleur potentiel adaptatif aux modifications de l'environnement (changement climatique) (Steffen et al., 2009). A titre de comparaison, les populations en déclin ont généralement une faible diversité génétique entraînant un potentiel adaptatif et évolutif plus faible que les populations stables. Il est d'ailleurs reconnu que la plus grande part de la diversité génétique (adaptative et évolutive) est présente dans les espèces avec une aire de distribution large (Mitton, 1997).

REFERENCES

Clark, C.J., Poulsen, J.R., Levey, D.J., Osenberg, C.W., 2007. Are plant populations seed limited? A critique and meta-analysis of seed addition experiments. *Am. Nat.* 170, 128-142.

- Diamond, J., 1989. Overview of recent extinctions. In Western D., Pearl M., eds. Conservation for the Twenty-first century. New-York, USA: Wildlife Conservation International.
- Dickman, C.R., Steeves, T.E., 2004. Use of habitat by mammals in eastern Australian forests: are common species important in forest management? In: Conservation of Australia's Forest Fauna. Royal Zoological Society of New South Wales, Sydney, 76-773.
- Fried, G., Girod, C., Jacquot, M., Dessaint, F., 2007. Repartition de la flore adventice a l'échelle d'un paysage agricole : analyse de la diversité des pleins champs et des bordures. Conference du COLUMA - journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes (afpp), 245-254. afpp, Dijon.
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J., Herberger, J., 1997. *Papaver rhoeas* L. World Weeds Natural Histories and Distribution. New York: J. Wiley. 555-561.
- Gaston, K.J., 2010. Valuing common species. Science 327, 154-155.
- Jordano, P., Garcia, C., Godoy, J.A., Garcia-Castano, J.L., 2007. Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104, 3278-3282.
- Lennon, J.J., Beale, C.M., Reid, C.L., Kent, M., Pakeman, R.J., 2010. Are richness patterns of common and rare species equally well explained by environmental variables? Ecography 34, 529-539.
- Lindström, J., Kokko, H., 2002. Cohort effects and population dynamics. Ecol. Lett. 5, 338-344.
- MacArthur, R.H. and Wilson, E.O., 1963. An equilibrium theory of insular zoogeography. Evolution 17, 373-387.
- Marshall, E., Brown, V., Boatman, N., Lutman, P., Squire, G., Ward, L., 2003. The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. Weed Res. 43, 77-89.
- Mitton, J., 1997. Selection in natural populations. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Rea, A.C., Nasrallah, J.B., 2008. Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. Int. J. Dev. Biol. 52, 627-636.
- Spiegel, O., Nathan, R., 2007. Incorporating dispersal distance into the disperser effectiveness framework: frugivorous birds provide complementary dispersal to plants in a patchy environment. Ecol. Lett. 10, 718-728.
- Steffen, W., Burbidge, A., Hughes, L., Kitching, R., Lindenmayer, D.B., Musgrave, W., Stafford-Smith, M., Werner, P., 2009. Australia's Biodiversity and Climate Change. CSIRO Publishing, Melbourne.
- Svensson, R., Wigren, M., 1985. History and biology of *Centaurea cyanus* in Sweden. Sven. Bot. Tidskr. 79, 273-297.
- Torra, J., Recasens, J., 2008. Demography of Corn Poppy (*Papaver rhoeas*) in Relation to Emergence Time and Crop Competition. Weed Sci. 56, 826-833.
- Ulber, L., Steinmann, H.H., Klimek, S., 2010. Using selective herbicides to manage beneficial and rare weed species in winter wheat. J. Plant Dis. Prot. 117, 233-239.

Wright, K.J., Seavers, G.P., Wilson, B.J., 1997. Competitive effects of multiple weed species on weed biomass and wheat yield. In Proceedings 1997 Brighton Crop Protection Conference—Weeds. Brighton, UK: British Crop Protection Council. 497-502.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, R.J., Forbes, D.G., 1993. Outcrossing rate and self-incompatibility in the colonising species *Senecio squalidus*. *Heredity*. 71, 155-159.
- Aboucaya, A., 2011. Plan d'action national Messicoles, Conservatoire Botanique National de Porquerolles, Available from: http://www.telabotanica.org/page:plantes_messicoles_liste (accessed February 2011).
- Addison, J., Hart, M., 2005. Spawning, copulation and inbreeding coefficients in marine invertebrates. *Biol. Lett.* 1, 450-453.
- Agreste, 2001. Fertilisation azotée minérale : assagissement à la fin des années 80. *Agreste Cahiers* 2, 3-10.
- Albrecht, H., 2003. Suitability of arable weeds as indicator organisms to evaluate species conservation effects of management in agricultural ecosystems. *Agric. Ecosys. Environ.* 98, 201-211.
- Andersson, T.N., Milberg, P., 1998. Weed flora and the relative importance of site, crop, crop rotation, and nitrogen. *Weed Sci.* 46, 30-38.
- ArcView GIS, 1999. Geographic Information Software v 9.3. Environmental Systems Research Institute (ESRI), Redlands, California.
- Armbruster, P., Reed, D.H., 2005. Inbreeding depression in benign and stressful environments. *Heredity*. 95, 235-242.
- Armstrong, J. A., 2002. *Zieria* (Rutaceae) a systematic and evolutionary study. *Aust. Syst. Bot.* 15, 277-463
- Balvanera, P., Pfisterer, A.B., Buchmann, N., He, J.S., Nakashizuka, T., Raffaelli, D., et al. 2006. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecol. Lett.* 9, 1146-1156.
- Baron, Y., 1989. Élément pour un bilan de la flore messicole en Poitou-Charentes. *Plantes sauvages menacées. Actes. Brest.* 79-86.
- Barua, M., 2011. Mobilizing metaphors: the popular use of keystone, flagship and umbrella species concepts. *Biodivers. Conserv.* 20, 1427-1440.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C., 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14, 1-16.
- Baudry, J., 1989. Interactions between agriculture and ecological systems at the landscape level. *Agric. Ecosys. Environ.* 27, 119-130.
- Bekker, R.M., Bakker, J.P., Grandin, U., et al. 1998. Seed size, shape and vertical distribution in the soil: indicators of seed longevity. *Funct. Ecol.* 12, 834-842.
- Belanger, D.H., Perkins, S.L., Rockwell, R.F., 2011. Inference of Population Structure and Patterns of Gene Flow in Canine Heartworm (*Dirofilaria immitis*). *J. Parasitol.* 97, 602-609.
- Bellanger, S., Guillemin, J.P., Bretagnolle, V., Darmency, H., 2011. *Centaurea cyanus* L. as a biological indicator of segetal richness in agricultural ecosystems. Submitted.

- Bellanger, S., Darmency, H., Guillemin, J.P., 2009. Relationships between weed diversity and *Centaurea cyanus*. XIII^{ème} Colloque International sur la Biologie des Mauvaises Herbes, Dijon, France, 8-10 Septembre 2009, 8-15, 2009.
- Benton, T.G., Bryant, D.M., Cole, L., Crick, H.Q.P., 2002. Linking agricultural practice to insect and bird populations: a historical study over three decades. *J. Appl. Ecol.* 39, 673-687.
- Benvenuti, S., Macchia, M., Miele, S., 2001. Quantitative analysis of emergence of seedlings from buried weed seeds with increasing soil depth. *Weed Sci.* 49, 528-535.
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemueller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*. 313, 351-354.
- Bolnick, D.I., Svanbäck, R., Fordyce, J.A., Yang, L.H., Davis, J.M., Hulsey, C.D., Forister, M.L., 2003. The ecology of individuals: incidence and implications of individual specialization. *Am. Nat.* 161, 1-28.
- Bond, W.J., 1994. Do mutualisms matter? Assessing the impact of pollinator and disperser disruption on plant extinction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 344, 83-90.
- Booth, B.D., Swanton, C.J., 2002. Assembly theory applied to weed communities. *Weed. Sci.* 50, 2-13.
- Boutin, C., Baril, A., Martin, P.A., 2008. Plant diversity in crop fields and woody hedgerows of organic and conventional farms in contrasting landscapes. *Agri. Ecosyst. Environ.* 123, 185-193.
- Brennan, A.C., Harris, S.A., Hiscock, S.J., 2005. Modes and rates of selfing and associated inbreeding depression in the self-incompatible plant *Senecio squalidus* (Asteraceae): a successful colonizing species in the British Isles. *New. Phytol.* 168, 475-486.
- Brook, B.W., Sodhi, N.S., Bradshaw, C.J.A., 2008. Synergies among extinction drivers under global change. *Trends Ecol. Evol.* 23, 453-460.
- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., DaFonseca, G.A.B., Rylands, A.B., Konstant, W.R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G., Hilton-Taylors, C., 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conserv. Biol.* 16, 909-923.
- Brun, C., Dessaint, F., Richard, H., Bretagnolle, F., 2007. Arable-weed flora and its pollen representation: A case study from the eastern part of France. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 146, 29-+.
- Brunet, J., Sweet, H.R., 2006. Impact of insect pollinator group and floral display size on outcrossing rate. *Evolution.* 60, 234-246.
- Brunet, J., 1992. Sex allocation in hermaphroditic plants. *Trends Ecol. Evol.* 7, 79-84.
- Buckland, S.T., Magurran, A.E., Green, R.E., Fewster, R.M., 2005. Monitoring change in biodiversity through composite indices. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 243-254.
- Busch, J., 2005. Inbreeding depression in self-incompatible and self-compatible populations of *Leavenworthia alabamica*. *Heredity.* 94, 159-165.

- Busch, J.W., Schoen, D.J., 2008. The evolution of self-incompatibility when mates are limiting. *Trends Plant Sci.* 13, 128-136.
- Byers, D.L., Meagher, T.R., 1992. Mate availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity.* 68, 353-359.
- Cabin, R.J., Mitchell, R.J., Marshall, D.L., 1998. Do surface plant and soil seed bank populations differ genetically? A multipopulation study of the desert mustard *Lesquerella fendleri* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 85, 1098-1109.
- Castric, V., Vekemans, X., 2004. Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Mol. Ecol.* 13, 2873-2889.
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P., Piazza, A., 1994. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- CETIOM 2002. *Tournesol : les techniques culturales, le contexte économique*. Grignon, CETIOM.
- Chadoeuf, R., Barralis, G., Lonchamp, J.P., 1984. Evolution of the seed potential of annual weeds in cultivated soil. *Comptes rendus du 7eme colloque international sur l'écologie, la biologie et la systématique des mauvaises herbes.* 63-70.
- Chapin, F.S., III, Zavaleta, E.S., Eviner, V.T., Naylor, R.L., Vitousek, P.M., Reynolds, H.L., et al. 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature.* 405, 234-242.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1979. Evolution and breakdown of S-allele systems. *Heredity.* 43, 41-55.
- Cheptou, P.O., Lepart, J., Escarre, J., 2002. Mating system variation along a successional gradient in the allogamous and colonizing plant *Crepis sancta* (Asteraceae). *J. Evolution. Biol.* 15, 753-762.
- Clark, C.J., Poulsen, J.R., Levey, D.J., Osenberg, C.W., 2007. Are plant populations seed limited? A critique and meta-analysis of seed addition experiments. *Am. Nat.* 170, 128-142.
- Colas, B., Olivieri, I., Riba, M., 1997. *Centaurea corymbosa*, a cliff-dwelling species tottering on the brink of extinction: a demographic and genetic study. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 3471-3476.
- Cordeau, S., 2010. *Conséquences de la mise en place des bandes enherbées sur l'évolution de la flore adventice*. Thèse de l'Université de Bourgogne.
- Critchley, C.N.R., Fowbert, J.A., Sherwood, A.J., 2006. The effects of annual cultivation on plant community composition of uncropped arable field boundary strips. *Agric. Ecosyst. Environ.* 113, 196-205.
- Culman, S.W., Young-Mathews, A., Hollander, A.D., Ferris, H., Sanchez-Moreno, S., O'Geen, A.T., Jackson, L.E., 2010. Biodiversity is associated with indicators of soil ecosystem functions over a landscape gradient of agricultural intensification. *Landscape Ecol.* 25, 1333-1348.
- Dale, V.H., Beyeler, S.C., 2001. Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecol. Indicators.* 1, 3-10.

- Demauro, M.M., 1993. Relationship of breeding system to rarity in the lakeside daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). *Conserv. Biol.* 7, 542-550.
- de Nettancourt, D., 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag, Berlin.
- de Vere, N., Jongejans, E., Plowman, A., Williams, E., 2009. Population size and habitat quality affect genetic diversity and fitness in the clonal herb *Cirsium dissectum*. *Oecologia* 159, 59-68.
- Devictor, V., Clavel, J., Julliard, R., Lavergne, S., Mouillot, D., Thuiller, W. et al., 2010. Defining and measuring ecological specialization. *J. Appl. Ecol.* 47, 15-25.
- Diamond, J., 1989. Overview of recent extinctions. In Western D., Pearl M., eds. *Conservation for the Twenty-first century*. New-York, USA: Wildlife Conservation International.
- Dickman, C.R., Steeves, T.E., 2004. Use of habitat by mammals in eastern Australian forests: are common species important in forest management? In: *Conservation of Australia's Forest Fauna*. Royal Zoological Society of New South Wales, Sydney, 76-773.
- Dierssen, K., 2006. Indicating botanical diversity - Structural and functional aspects based on case studies from Northern Germany. *Ecol. Indicators*. 6, 94-103.
- Dole, J., Ritland, K., 1993. Inbreeding depression in two *Mimulus* taxa measured by multigenerational changes in the inbreeding coefficient. *Evolution*. 47, 361-373.
- Donald, P.F., Sanderson, F.J., Burfield, I.J., van Bommel, F.P.J., 2006. Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990-2000. *Agric. Ecosys. Environ.* 116, 189-196.
- Dornelas, M., Moonen, A.C., Magurran, A.E., Barberi, P., 2009. Species abundance distributions reveal environmental heterogeneity in modified landscapes. *J. Appl. Ecol.* 46, 666-672.
- Dudley, N., Baldock, D., Nasi, R., Stolton, S., 2005. Measuring biodiversity and sustainable management in forests and agricultural landscapes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 457-470.
- Duelli, P., Obrist, M.K., 2003. Biodiversity indicators: the choice of values and measures. *Agric. Ecosys. Environ.* 98, 87-98.
- Duelli, P., Obrist, M.K., 1998. In search of the best correlates for local organismal biodiversity in cultivated areas. *Biodivers. Conserv.* 7, 297-309.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L., 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11, 2571-2581.
- Dupont, L., Viard, F., Dowell, M.J., Wood, C., Bishop, J.D.D., 2009. Fine- and regional-scale genetic structure of the exotic ascidian *Styela clava* (Tunicata) in southwest England, 50 years after its introduction. *Mol. Ecol.* 18, 442-453.
- Duran, S., Pascual, M., Estoup, A., Turon, X., 2004. Strong population structure in the marine sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) as revealed by microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 13, 511-522.

- Dutoit, T., Buisson, E., Gerbaud, E., Roche, P., Tatoni, T., 2007. The status of transitions between cultivated fields and their boundaries: ecotones, ecoclines or edge effects? *Acta. Oecol.* 31, 127-136.
- Dutoit, T., Gerbaud, E., Ourcival, J.M., Roux, M., Alard, D., 2001. Recherche prospective sur la dualité entre caractéristiques morphologiques et capacités de compétition des végétaux : le cas des espèces adventices et du blé. *Life. Sci.* 324, 261-272.
- Ehlers, B.K., Olesen, J.M., Agren, J., 2002. Floral morphology and reproductive success in the orchid *Epipactis helleborine*: regional and local across-habitat variation. *Plant Syst. Evol.* 236, 19-32.
- Ellmer, M., Andersson S., 2004. Inbreeding depression in *Nigella degenii* (Ranunculaceae): Fitness components compared with morphological and phenological characters. *Int. J. Pl. Sci.* 165, 1055-1061.
- England, P.R., Benyon, F., Ayre D.J., Whelan, R.J., 2001. A molecular genetic assessment of mating-system variation in a naturally bird-pollinated shrub: contributions from birds and introduced honeybees. *Conserv. Biol.* 15, 1645-1655.
- Epperson, B.K., 2004. Multilocus estimation of genetic structure within populations. *Theor. Popul. Biol.* 65, 227-237.
- Epperson, B.K., 1993. Recent advances in correlation analysis of spatial patterns of genetic variation. *Evol. Biol.* 27, 95-155.
- Evanno, G., Regnaut, R., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2006. An integrated software package for population genetics data analysis. Arlequin v3.1. <http://cmpg.unibe.ch/software>
- Fagan, W.E., Cantrell, R.S., Cosner, C., 1999. How habitat edges change species interactions. *Am. Nat.* 153, 165-182.
- Fenner, M., Thompson, K., 2005. The ecology of seeds, Cambridge: Cambridge University Press.
- Ferrer, M.M., Good-Avila, S.V., Montana, C., Dominguez, C.A., Eguiarte, L.E., 2009. Effect of variation in self-incompatibility on pollen limitation and inbreeding depression in *Flourensia cernua* (Asteraceae) scrubs of contrasting density. *Ann. Bot.* 103, 1077-1089.
- Ferrer, M.M., Good-Avila, S.V., 2007. Macrophylogenetic analyses of the gain and loss of self-incompatibility in the Asteraceae. *New Phytol.* 173, 401-414.
- Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171, 501-523.
- Fischer, M., Hock, M., Paschke, M., 2003. Low genetic variation reduces cross-compatibility and offspring fitness in populations of a narrow endemic plant with a self-incompatibility system. *Conserv. Genet.* 4, 325-336.
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., van Kleunen, M., Schmid, B., 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *Am. J. Bot.* 87, 1128-1137.

- Fischer, M., Matthies, D. 1998. Effects of population size on performance in the rare plant *Gentianella germanica*. J. Ecol. 86, 195-204.
- Fitzgerald, J.D., Solomon, M.G., 2004. Can flowering plants enhance numbers of beneficial arthropods in UK apple and pear orchards? Biocontrol Sci. Techn. 14, 291-300.
- Font, M., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R., Roquet, C., Susanna, A., 2009. Evolution and biogeography of *Centaurea* section *Acrocentron* inferred from nuclear and plastid DNA sequence analyses. Ann. Bot. 103, 985-997.
- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. Biol. Conserv. 126, 131-140.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fridman, J., Walheim, M., 2000. Amount, structure and dynamics of dead wood on managed forest land in Sweden. For. Ecol. Manag. 131, 23-36.
- Fried, G., Petit, S., Dessaint, F., Reboud, X., 2009. Arable weed decline in Northern France : Crop edges as refugia for weed conservation? Biol. Conserv. 142, 238-243.
- Fried, G., Norton, L., Reboud, X., 2008. Environmental and management factors determining weed species composition and diversity in France. Agric. Ecosys. Environ. 128, 68-76.
- Fried, G., Girod, C., Jacquot, M., Dessaint, F., 2007. Repartition de la flore adventice a l'échelle d'un paysage agricole : analyse de la diversité des pleins champs et des bordures. Conference du COLUMA - journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes (afpp), Dijon 245-254.
- Gaba, S., Chauvel, B., Dessaint, F., Bretagnolle, V., Petit, S., 2010. Weed species richness in winter wheat increases with landscape heterogeneity. Agric. Ecosys. Environ. 138, 318-323.
- Garcia-Jacas, N., Uysal, T., Romashchenko, K., Suarez-Santiago, V.N., Ertugrul, K., Susanna, A., 2006. *Centaurea* revisited: A molecular survey of the *Jacea* group. Ann. Bot-Lond. 98, 741-753.
- Gardarin, A., Durr, C., Mannino, M.R., Busset, H., Colbach, N., 2010. Seed mortality in the soil is related to seed coat thickness. Seed Sci. Res. 20, 243-256.
- Gardarin, A., Tremoy, M., Bretagnolle, F., Chauvel, B., 2007. Repartition de la flore adventice a l'échelle d'un paysage : gradient écologique des espèces observées. Conference du COLUMA – journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes (afpp). Dijon 305-314.
- Gargano, D., Gullo, T., Bernardo, L., 2009. Do inefficient selfing and inbreeding depression challenge the persistence of the rare *Dianthus guliae* Janka (Caryophyllaceae)? Influence of reproductive traits on a plant's proneness to extinction. Plant Species Biol. 24, 69-76.
- Gasquez, J., 2005. Les adventices, composante inhérente des cultures. In : Livre Blanc « Gestion Responsable des Herbicides Céréales» (Ed. Bayer Crop Science), 9-15. Lyon, France.
- Gaston, K.J., 2010. Valuing common species. Science 327, 154-155.
- Gaston, K.J., 1994. Rarity. Chapman and Hall, London

- Gerlach, G., Musolf, K., 2000. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conserv. Biol.* 14, 1066-1074.
- Glaetli, M., Goudet, J., 2006. Variation in the intensity of inbreeding depression among successive life-cycle stages and generations in gynodioecious *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). *J. Evol. Biol.* 19, 1995-2005.
- Glemin, S., Gaude, T., Guillemin, M., Lourmas, M., Olivieri, I., Mignot, A., 2005. Balancing selection in the wild: Testing population genetics theory of self-incompatibility in the rare species *Brassica insularis*. *Genetics*. 171, 279-289.
- Godinho, I., 1984. Les définitions d' "adventice" et de "mauvaise herbe". *Weed. Res.* 24, 121-125.
- Goodwillie, C., Sargent, R.D., Eckert, C.G., Elle, E., Geber, M.A., Johnston, M.O., Kalisz, S., Moeller, D.A., Ree, R.H., Vallejo-Marin, M., Winn, A.A., 2010. Correlated evolution of mating system and floral display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New. Phytol.* 185, 311-21.
- Goodwillie, C., Kalisz, S., Eckert, C., 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Ann. Rev. Ecol. Evol. S.* 36, 47-79.
- Goodwillie, C., 2000. Inbreeding depression and mating systems in two species of *Linanthus* (Polemoniaceae). *Heredity*. 84, 283-293.
- Goudet, J., 1995. Fstat (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86, 485-486.
- Greaves, M.P., Marshall, E.J.P., 1987. Field margins: definitions and statistics. *Field margins*, British Crop Protection Council, London (Way, J.M., Greig-Smith, P.W.), 3-10.
- Gregory, R.D., van Strien, A., Vorisek, P., Meyling, A.W.G., Noble, D.G., Foppen, R.P.B., Gibbons, D.W., 2005. Developing indicators for European birds. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 269-288.
- Groom, M.J., Meffe, G.K., Carroll, C.R., 2006. *Principle of Conservation Biology*. Sinauer Inc, Sunderland MA.
- Grundy, A.C., Mead, A., Bond, W., Clark, G., Burston, S., 2011. The impact of herbicide management on long-term changes in the diversity and species composition of weed populations. *Weed Res.* 51, 187-200.
- Guiral, D., 1992. Physical instability : factor of organization and structuration of a shallow brackish tropical ecosystem. *Vie Milieu*. 42, 73-92.
- Gunton, R.M., Petit, S., Gaba, S., 2011. Functional traits relating arable weed communities to crop characteristics. *J. Veg. Sci.* 22, 541-550.
- Gutiérrez-Rodríguez, C., Lasker, H.R., 2004. Microsatellite variation reveals high levels of genetic variability and population structure in the gorgonian coral *Pseudopterogorgia elisabethae* across the Bahamas. *Mol. Ecol.* 13, 2211-2221.
- Håkansson, S., 2003. *Weeds and weed management on arable land: an ecological approach*. CABI Publishing, Oxon, UK.

- Hallgren, E., Palmer, M.W., Milberg, P., 1999. Data diving with cross-validation: an investigation of broad-scale gradients in Swedish weed communities. *J. Ecol.* 87, 1037-1051.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2008- PAST - PALaeontological STatistics, ver. 1.77.
- Hanski, I., 1999. Metapopulation ecology. Oxford: Oxford University Press.
- Harding, J., Barnes, K., 1977. Genetics of *Lupinus*. 10. Genetic variability, heterozygosity and outcrossing in colonial populations of *Lupinus succulentus*. *Evolution*. 31, 247-255.
- Hardy, O.J., 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.
- Harrod, R.J., Taylor, R.J., 1995. Reproduction and pollination biology of centaurea and acroptilon species, with emphasis on *Centaurea-diffusa*. *Northwest Sci.* 69, 97-105.
- Hedrick, P.W., Savolainen, O., Karkkainen, K., 1999. Factors influencing the extent of inbreeding depression: an example from Scots pine. *Heredity*. 82, 441-450.
- Hensen, I., Oberprieler, C., 2005. Effects of population size on genetic diversity and seed production in the rare *Dictamnus albus* (Rutaceae) in central Germany. *Conserv. Genet.* 6, 63-73.
- Hensen, I., Oberprieler, C., Wesche, K., 2005. Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill (Ranunculaceae) in Central Germany. *Flora*. 200, 3-14.
- Heschel, M.S., Paige, K.N., 1995. Inbreeding depression, environmental stress, and population size variation in scarlet gilia (*Ipomopsis aggregata*). *Conserv. Biol.* 9,126-133.
- Höglund, J., 2009. Evolutionary conservation genetics. Oxford: Oxford University Press.
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J., Herbereger, J., 1997. *Papaver rhoeas* L. World Weeds Natural Histories and Distribution. New York: J. Wiley. 555-561.
- Hubbell, S.P., 2001. The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography, Princeton University Press.
- Husband, B., Schemske, D., 1995. Magnitude and timing of inbreeding depression in a diploid population of *Epilobium-angustifolium* (Onagraceae). *Heredity*. 75, 206-215.
- Hutchinson, G.E., 1957. Concluding remarks. Cold Spring Harbor Symposium. *Quant. Biol.* 22, 415-427.
- Hyvönen, T., Huusela-Veistola, E., 2008. Arable weeds as indicators of agricultural intensity - A case study from Finland. *Biol. Conserv.* 141, 2857-2864.
- Igic, B., Bohs, L., Kohn, J., 2006. Ancient polymorphism reveals unidirectional breeding system shifts. *P.Natl. Acad. Sci. USA*. 103, 1359-1363.
- Isik, K., 2011. Rare and endemic species: why are they prone to extinction? *Turk. J. Bot.* 35, 411-417.
- Ivey, C.T., Carr, D.E., 2005. Effects of herbivory and inbreeding on the pollinators and mating system of *Mimulus guttatus* (Phrymaceae). *Am. J. Bot.* 92, 1641-1649.

- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., 2007. CLUMPP, a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 23, 1801-1806.
- Jauzein, P., 2001. Biodiversité des champs cultivés : l'enrichissement floristique. Dossier de l'environnement de l'INRA. 21, 43-64.
- Johnston, M.O., 1998. Evolution of intermediate selfing rates in plants: pollination ecology versus deleterious mutations. *Genetica*. 102/103, 267-278.
- Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genet.* 11, 94.
- Jordano, P., Garcia, C., Godoy, J.A., Garcia-Castano, J.L., 2007. Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 104, 3278-3282.
- Kalisz, S., Vogler, D.W., Hanley, K.M., 2004. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* 430, 884-887.
- Karoly, K., 1994. Inbreeding effects on mating system traits for two species of *Lupinus* (Leguminosae). *Am. J. Bot.* 81, 1538-1544.
- Kassen, R., 2002. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* 15, 173-190.
- Keller, L.F., Waller, D.M., 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends. Ecol. Evol.* 17, 230-241.
- Kennedy, B.F., Elle, E., 2008. The inbreeding depression cost of selfing: importance of flower size and population size in *Collinsia parviflora* (Veronicaceae). *Am. J. Bot.* 95, 1596-1605.
- Kéry, M., Matthies, D., Spillman, H.H., 2000. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *J. Ecol.* 88, 17-30.
- Kimura, M., Crow, J.F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. 49, 725-738.
- Kleijn, D., Kohler, F., Baldi, A., Batary, P., Concepcion, E.D., Clough, Y., Diaz, M., Gabriel, D., Holzschuh, A., Knop, E., Kovacs, A., Marshall, E.J.P., Tschardt, T., Verhulst, J., 2009. On the relationship between farmland biodiversity and land-use intensity in Europe. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 276, 903-909.
- Kleijn, D., Sutherland, W.J., 2003. How effective are European agri-environment schemes in conserving and promoting biodiversity? *J. Appl. Ecol.* 40, 947-969.
- Koizumi, I., 2011. Integration of ecology, demography and genetics to reveal population structure and persistence: a mini review and case study of stream-dwelling Dolly Varden. *Ecol. Freshwat. Fish*. 20, 352-363.
- Kolb, A., Diekmann, M., 2005. Effects of life history traits on responses of plant species to forest fragmentation. *Conserv. Biol.* 19, 929-938.
- Kollmann, J., Bassin, S., 2001. Effects of management on seed predation in wildflower strips in northern Switzerland. *Agric. Ecosys. Environ.* 83, 285-296.

- Kowyama, Y., Takahasi, H., Muraoka, K., Tani, T., Hara, K., Shiotani, I., 1994. Number, frequency and dominance relationships of S-alleles in diploid *Ipomoea trifida*. *Heredity*. 73, 275-283.
- Krebs, J.R., Wilson, J.D., Bradbury, R.B., Siriwardena, G.M., 1999. The second silent spring? *Nature*. 400, 611-612.
- Kubota, S., Ohara, M., 2009. The evolution of self-compatible and self-incompatible populations in a hermaphroditic perennial, *Trillium camschatcense* (Melanthiaceae). *J. Plant Res.* 122, 497-507.
- Kubota, S., Kameyama, Y., Hirao, A.S., Ohara, M., 2008. Adaptive significance of self-fertilization in a hermaphroditic perennial, *Trillium camschatcense* (Melanthiaceae). *Am. J. Bot.* 95, 482-489.
- Lande, R., 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*. 241, 1455-1460.
- Lande, R., Schemske, D.W., 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*. 39, 24-40.
- Landres, P.B., Verner, J., Thomas, J.W., 1988. Ecological uses of vertebrate indicator species - A critique. *Conserv. Biol.* 2, 316-328.
- Latch, E.K., Dharmarajan, G., Glaubitz, J.C., Rhodes, O.E., 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conserv. Genet.* 7, 295-302.
- Le Coeur, D., Baudry, J., Burel, F., 1997. Field margins plant assemblages: variation partitioning between local and landscape factors. *Landsc. Urban Plan.* 37, 57-71.
- Ledoux, J., Garrabou, J., Bianchimani, O., Drap, P., Féral, J.P., Aurelle, D., 2010. Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*. *Mol. Ecol.* 19, 4204-4216.
- Leng, X., Musters, C.J.M., de Snoo, G.R., 2009. Restoration of plant diversity on ditch banks: Seed and site limitation in response to agri-environment schemes. *Biol. Conserv.* 142, 1340-1349.
- Lennon, J.J., Beale, C.M., Reid, C.L., Kent, M., Pakeman, R.J., 2010. Are richness patterns of common and rare species equally well explained by environmental variables? *Ecography* 34, 529-539.
- Levin, D.A., 1996. The evolutionary significance of pseudo-self-fertility. *Am. Nat.* 148, 321-332.
- Levins, R., 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 15, 237-240.
- Lienert, J., Fischer, M., 2003. Habitat fragmentation affects the common wetland specialist *Primula farinosa* in north-east Switzerland. *J. Ecol.* 91, 587-599.
- Lindenmayer, D.B., Wood, J.T., McBurney, L., MacGregor, C., Youngentob, K., Banks, S.C., 2011. How to make a common species rare: A case against conservation complacency. *Biol. Conserv.* 144, 1663-1672.

- Lindenmayer, D.B., 2009. Forest Pattern and Ecological Process: A Synthesis of 25 Years of Research. CSIRO Publishing, Melbourne.
- Lindström, J., Kokko, H., 2002. Cohort effects and population dynamics. *Ecol. Lett.* 5, 338-344.
- Llaurens, V., Billiard, S., Castric, V., Vekemans, X., 2009. Evolution of dominance in sporophytic self-incompatibility systems: i. genetic load and coevolution of levels of dominance in pollen and pistil. *Evolution*. 63, 2427-243.
- Lloyd, D.G., 1987. Allocations to pollen, seeds and pollination mechanisms in self-fertilizing plants. *Funct. Ecol.* 1, 83-89.
- Loiselle, B.A., Sork, V.L., Nason, J., Graham, C., 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 82, 1420-1425.
- Lopez-Villavicencio, M., Genton, B.J., Porcher, E., Shykoff, J.A., 2005. The role of pollination level on the reproduction of females and hermaphrodites in the gynodioecious plant *Gypsophila repens* (Caryophyllaceae). *Am. J. Bot.* 92, 1995-2002.
- Lowe, A., Harris, S., Ashton, P., 2004. Ecological genetics: design analysis and application. Blackwell Publishing, USA, 70-72.
- MacArthur, R.H., Wilson, E.O., 1967. The Theory of Island Biogeography. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- MacArthur, R.H. and Wilson, E.O., 1963. An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution*. 17, 373-387.
- Magurran, A.E., 2004. Measuring biological diversity. Oxford: Blackwell Science.
- Magurran, A.E., 1988. Ecological Diversity and its Measurement. Croom Helm Limited, London.
- Malécot, G., 1973. Isolation by distance. In: Genetic Structure of Populations (ed. Morton NE), 72-75. University of Hawaii Press, Honolulu.
- Marczewska, K., Rola, H., 2006. Identification of chlorsulfuron-resistant *Apera spica-venti* and *Centaurea cyanus* biotypes and chemical methods of their control in winter wheat. *Progress in Plant Protection* 46, 215-222.
- Marshall, E.J.P., 2009. The impact of landscape structure and sown grass margin strips on weed assemblages in arable crops and their boundaries. *Weed Res.* 49, 107-115.
- Marshall, E.J.P., Brown, V.K., Boatman, N.D., Lutman, P.J.W., Squire, G.R., Ward, L.K., 2003. The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. *Weed. Res.* 43, 77-89.
- Martin, E., Dinc, M., Duran, A., 2009. Karyomorphological Study of Eight *Centaurea* L. Taxa (Asteraceae) from Turkey. *Turkish Journal of Botany* 33, 97-104.
- May, R.M., 1975. Patterns of species abundance and diversity. Ecology and evolution of communities (ed. Cody, M.L., Diamond, J.M.), 81-120. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Menges, E.S., 1991. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. *Conserv. Biol.* 5, 158-164.

- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Island Press, Washington, DC.
- Minoshima, H., Jackson, L.E., Cavagnaro, T.R., Sanchez-Moreno, S., Ferris, H., Temple, S.R., Goyal, S., Mitchell, J.P., 2007. Soil food webs and carbon dynamics in response to conservation tillage in California. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 952-963.
- Mitton, J., 1997. Selection in natural populations. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Mohammaddoust, H.R., Asghari, A., Tulikov, A.M., Hasanzadeh, M., Saidi, M.R., 2008. Effect of fertilizer application on density, dry matter and seed characteristics of garden cornflower (*Centaurea cyanus* L.) and corn spurrey (*Spergula vulgaris* L.). *Pakistan J. Weed Sci. Res.* 14, 73-80.
- Moles, A.T., Westoby, M., 2006. Seed size and plant strategy across the whole life cycle. *Oikos*. 113, 91-105.
- Morin, P.J., 1999. Community Ecology. Blackwell Science, Malden, USA.
- Moriuchi, K.S., Venable, D.L., Pake, C.E., Lange, T., 2000. Direct measurement of the seed bank age structure of a Sonoran desert annual plant. *Ecology*. 81, 1133-1138.
- Muraya, M.M., Mutegi, E., Geiger, H.H., de Villiers, S.M., Sagnard, F., Kanyenji, B.M., Kiambi, D., Parzies, H.K., 2011. Wild sorghum from different eco-geographic regions of Kenya display a mixed mating system. *Theor. Appl. Genet.* 122, 1631-1639.
- Mustajärvi, K., Siikamäki, P., Åkerberg, A., 2005. Inbreeding depression in perennial *Lychnis viscaria* (Caryophyllaceae): effects of population mating history and nutrient availability. *Am. J. Bot.* 92, 1853-1861.
- Newton, I., 2004. The recent declines of farmland bird populations in Britain: an appraisal of causal factors and conservation actions. *Ibis*. 146, 579-600.
- Nordén, B., Paltto, H., Götmark, F., Wallin, K., 2007. Indicators of biodiversity, what do they indicate ? Lessons for conservation of cryptogams in Oak-rich forest. *Biol. Conserv.* 35, 369-379.
- Novacek, M.J., Cleland, E.E., 2001. The current biodiversity extinction event: scenarios for mitigation and recovery. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 5466-5470.
- Oliverau, F., 1996. Les plantes messicoles des plaines françaises. *Courrier de l'Environnement*. 28, 5-18.
- Oostermeijer, J.G.B., van Eijck, M.W., van Leeuwen, N.C., den Nijs, J.C.M., 1995. Analysis of the relationship between allozyme heterozygosity and fitness in the rare *Gentiana pneumonanthe*. *J. Evol. Biol.* 8, 739-759.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*. 6, 288-295.
- Peeters, A., Janssens, F., 1995. Agriculture et nature Concilier la biodiversité et une production agricole performante en prairie : est-ce possible ? *Annales de Gembloux*. 101, 127-147.
- Pérez-Portela, R., Turon, X., 2008. Cryptic divergence and strong population structure in the colonial invertebrate *Pycnoclavella communis* (Ascidacea) inferred from molecular data. *Zoology*. 111, 163-178.

- Perju, T., Moldovan I., 1991. Entomofauna of *Centaurea* species with a view to biological control. Buletinul Institutului Agronomic Cluj Napoca. Seria Agricultura si Horticultura. 45,73-84.
- Petit, C., 2006. Approche de la génétique des populations de *Centaurea cyanus*. Rapport de M2, Univ. Bourgogne.
- Pico, F.X., Mix, C., Ouborg, N.J., Van Groenendael, J.M., 2007. Multigenerational inbreeding in *Succisa pratensis*: effects on fitness components. Biol. Plant. 51, 185-188.
- Pimm, S.L., Raven, P., 2000. Extinction by numbers. Nature. 403, 843-845.
- Pimm, S.L., Lawton, J.H., 1998. Ecology – planning for biodiversity. Science. 279, 2068-2069.
- Pluess, A.R., Stöcklin, J., 2004. Genetic diversity and fitness in *Scabiosa columbaria* in the Swiss Jura in relation to population size. Conserv. Genet. 5, 145-156.
- Pocock, M.J.O., Jennings, N., 2008. Testing biotic indicator taxa: the sensitivity of insectivorous mammals and their prey to the intensification of lowland agriculture. J. Appl. Ecol. 45, 151-160.
- Poisot, T., Bever, J.D., Nemri, A., Thrall, P.H., Hochberg, M.E., 2011. A conceptual framework for the evolution of ecological specialisation. Ecol. Lett. 14, 841-851.
- Polato, N.R., Concepcion, G.T., Toonen, R.J., Baums, I.B., 2010. Isolation by distance across the Hawaiian Archipelago in the reefbuilding coral *Porites lobata*. Mol. Ecol. 19, 4661-4677.
- Poloni, E.S., Semino, O., Passarino, G., Santachiara-Benerecetti, A.S., Dupanloup, I., Langaney, A., Excoffier, L., 1997. Human genetic affinities for Y-chromosome P49a,f/TaqI haplotypes show strong correspondence with linguistics. Am. J. Hum. Genet. 61, 1015-1035.
- Porcher, E., Lande, R., 2005. Loss of gametophytic self-incompatibility with evolution of inbreeding depression. Evolution. 59, 46-60.
- Porcher, E., Lande, R., 2005. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. J. Evolutionary Biol. 18, 497-508.
- Prendergast, J.R., Quinn, R.M., Lawton, J.H., Eversham, B.C., Gibbons, D.W., 1993. Rare species, the coincidence of diversity hotspots and conservation strategies. Nature. 365, 335-337.
- Priestley, D.A., 1986. Seed aging – implications for seed storage and persistence in the soil. New York: Comstock Publishing.
- Primack, R.B., 2006. Essentials of Conservation Biology. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, MA.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155, 945-959.
- Pujol, B., Zhou, S.R., Vilas, J.S., Pannell, J.R., 2009. Reduced inbreeding depression after species range expansion. P. Natl. Acad. Sci. USA. 106, 15379-15383.
- Purvis, A., Hector, A., 2000. Getting the measure of biodiversity. Nature. 405, 212-219.

- Rahman, A., James, T. K., Grbavac, N., 2006. Correlation between the soil seed bank and weed populations in maize fields. *Weed Biol. Manag.* 6, 228-234.
- R Development Core Team, 2011. R/ a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org>.
- Rea, A.C., Nasrallah, J.B., 2008. Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 627-636.
- Reed, D.A., 2004. Extinction risk in fragmented habitats. *Anim. Conserv.* 7, 181-191.
- Reed, D.H., 2005. Relationship between population size and fitness. *Conserv. Biol.* 19, 563-568.
- Rees, J.M., Mills, L.S., Dunning, J.B., et al., 2002. Emerging issues in population viability analysis. *Conserv. Biol.* 16, 7-19.
- Reibel, C., Guillemin, J.P., Cordeau, S., Chauvel, B., 2010. Ability of seedling emergence and plant establishment of weeds in sown grass strips. Conference du COLUMA - journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes (afpp), Dijon 177-184.
- Reinartz, J.A., Les, D.H., 1994. Bottleneck-induced dissolution of self-incompatibility and breeding system consequences in *Aster Furcatus* (Asteraceae). *Am. J. Bot.* 81, 446-455.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution.* 43, 223-225.
- Robinson, R.A., Sutherland, W.J., 2002. Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *J. Appl. Ecol.* 39, 157-176.
- Romero, A., Chamorro, L., Sans, F.X., 2008. Weed diversity in crop edges and inner fields of organic and conventional dryland winter cereal crops in NE Spain. *Agric. Ecosyst. Environ.* 124, 97-104.
- Roschewitz, I., Gabriel, D., Tschardtke, T., Thies, C., 2005. The effects of landscape complexity on arable weed species diversity in organic and conventional farming. *J. Appl. Ecol.* 42, 873-882.
- Rosenberg, N.A., 2004. DISTRUCT, a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes.* 4, 137-138.
- Saatkamp, A., Affre, L., Dutoit, T., Poschlod, P., 2011. Germination traits explain soil seed persistence across species: the case of Mediterranean annual plants in cereal fields. *Ann. Bot.* 107, 415-426.
- Saatkamp, A., Affre, L., Dutoit, T., Poschlod, P., 2009. The seed bank longevity index revisited: limited reliability evident from a burial experiment and database analyses. *Ann. Bot.* 104, 715-724.
- Sawma, J.T., Mohler, C.L., 2002. Evaluating seed viability by an unimbibed seed crush test in comparison with the tetrazolium test. *Weed Technol.* 16, 781-786.
- Schafer, M., Kotanen, P.M., 2003. The influence of soil moisture on losses of buried seeds to fungi. *Acta. Oecol.* 24, 255-263.
- Segarra-Moragues, J.G., Catalan, P., 2010. The fewer and the better: prioritization of populations for conservation under limited resources, a genetic study with *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae) in the Pyrenean National Park. *Genetica.* 138, 363-376.

- Shao, J.W., Zhang, X.P., Zhang, Z.X., Zhu, G.P., 2008. Effects of population size on reproductive success of the endangered and endemic species *Primula merrilliana*. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1151-1160.
- Silvertown, J., McConway, K., Gowing, D., et al., 2006. Absence of phylogenetic signal in the niche structure of meadow plant communities. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* 273, 39-44.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non equilibrium populations. *Evolution.* 47, 264-279.
- Smart, S.M., Bunce, R.G.H., Firbank, L.G., Coward, P., 2002. Do field boundaries act as refugia for grassland plant species diversity in intensively managed agricultural landscapes in Britain? *Agric. Ecosyst. Environ.* 91, 73-87.
- Sodhi, N.S., Ehrlich, P.R., 2010. *Conservation Biology for All*. Oxford University Press, Oxford, England. (Eds.).
- Sosnoskie, L.M., Luschei, E.C., Fanning, M.A., 2007. Field margin weed-species diversity in relation to landscape attributes and adjacent land use. *Weed Sci.* 55, 129-136.
- Spiegel, O., Nathan, R., 2007. Incorporating dispersal distance into the disperser effectiveness framework: frugivorous birds provide complementary dispersal to plants in a patchy environment. *Ecol. Lett.* 10, 718-728.
- Steffen, W., Burbidge, A., Hughes, L., Kitching, R., Lindenmayer, D.B., Musgrave, W., Stafford-Smith, M., Werner, P., 2009. *Australia's Biodiversity and Climate Change*. CSIRO Publishing, Melbourne.
- Steinbachs, J. E., Holsinger, K. E., 2002. S-RNase-mediated gametophytic self-incompatibility is ancestral in Eudicots. *Mol. Biol. Evol.* 19, 825-829.
- Stephenson, A.G., Good, S.V., Vogler, D.W., 2000. Interrelationships among inbreeding depression, plasticity in the self-incompatibility system, and the breeding system of *Campanula rapunculoides* L. (Campanulaceae). *An. Bot. London.* 85, 211-220.
- Stöcklin, J., Fischer, M., 1999. Plants with longer-lived seeds have lower local extinction rates in grassland remnants 1950–1985. *Oecologia.* 120, 539-543.
- Stone, J.L., 2004. Sheltered load associated with S-alleles in *Solanum carolinense*. *Heredity.* 92, 335-342.
- Stork, N.E., 2010. Re-assessing current extinction rates. *Biodivers. Conserv.* 19, 357-371.
- Storkey, J., Westbury, D.B., 2007. Managing arable weeds for biodiversity. *Pest Manag. Sci.* 63, 517-523.
- Storkey, J., 2006. A functional group approach to the management of UK arable weeds to support biological diversity. *Weed Res.* 46, 513-522.
- Sutcliffe, O.L., Kay, Q.O.N., 2000. Changes in the arable flora of central southern England since the 1960s. *Biol. Conserv.* 93, 1-8.
- Svensson, R., Wigren, M., 1985. History and biology of *Centaurea cyanus* in Sweden. *Sven. Bot. Tidskr.* 79, 273-297.
- Takayama, S., Isogai, A., 2005. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 467-489.

- Telewski, F.W., Zeevart, J.A.D., 2002. The 120-yr period for Dr Beal's seed viability experiment. *Am. J. Bot.* 89, 1285-1288.
- Thomas, J.A., Telfer, M.G., Roy, D.B., Preston, C.D., Greenwood, J.J.D., Asher, J., Fox, R., Clarke, R.T., Lawton, J.H., 2004. Comparative losses of British butterflies, birds, and plants and the global extinction crises. *Science*. 303, 1879-1881.
- Tilman, D., 1994. Competition and biodiversity in spatially structured habitats. *Ecology*. 75, 2-16.
- Torra, J., Recasens, J., 2008. Demography of Corn Poppy (*Papaver rhoeas*) in Relation to Emergence Time and Crop Competition. *Weed Sci.* 56, 826-833.
- Traba, J., Azcarate, F.M., Peco, B., 2004. From what depth do seeds emerge? A soil seed bank experiment with Mediterranean grassland species. *Seed Sci. Res.* 14, 297-303.
- Trakhtenbrot, A., Nathan, R., Perry, G., Richardson, D.M., 2005. The importance of long-distance characterization of nine new microsatellite markers in *Taraxacum* (Asteraceae). *Mol. Ecol. Notes*. 4, 645-648.
- Turchin, P., 2003. Complex population dynamics: a theoretical / empirical synthesis. Princeton: Princeton University Press.
- Turner, C.E., Piper, G.L., Coombs, E.M., 1996. *Chaetorellia australis* (Diptera: Tephritidae) for biological control of yellow starthistle, *Centaurea solstitialis* (Compositae), in the western USA: Establishment and seed destruction. *Bull. Entomol. Res.* 86, 177-182.
- Ulber, L., Steinmann, H.-H., Klimek, S., 2010. Using selective herbicides to manage beneficial and rare weed species in winter wheat. *J. Plant Dis. Prot.* 117, 233-239.
- Ulber, L., Steinmann, H.H., Klimek, S., Isselstein, J., 2009. An on-farm approach to investigate the impact of diversified crop rotations on weed species richness and composition in winter wheat. *Weed Res.* 49, 534-543.
- Violle, C., Navas, M.L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos*. 116, 882-892.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M., 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science*. 277, 494-499.
- Vogler, D.W., Kalisz, S., 2001. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution*. 55, 202-204.
- Wagner, H.H., Wildi, O., Ewald, K.C., 2000. Additive partitioning of plant species diversity in an agricultural mosaic landscape. *Landscape Ecol.* 15, 219-227.
- Waites, A.R., Agren, J., 2004. Pollinator visitation, stigmatic pollen loads and among-population variation in seed set in *Lythrum salicaria*. *J. Ecol.* 92, 512-526.
- Waldhardt, R., Otte, A., 2003. Indicators of plant species and community diversity in grasslands. *Agric. Ecosys. Environ.* 98, 339-351.
- Wang, Y., Liu, W., Wang, G.M., Zhong, W., Wan, X., 2011. Genetic Consequences of Group Living in Mongolian Gerbils. *J. Hered.* 102, 554-561.
- Waples, R.S., Gaggiotti, O., 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol. Ecol.* 15, 1419-1439.

- Weiher, E., Keddy, P.A., 1999. Assembly rules as general constraints on community composition. In: Ecological assembly rules: perspectives, advances, retreats (Eds Weiher, E., Keddy, P.A.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Weiss, E., Stettmer, C., 1991. Unkräuter in der Agrarlandschaft locken blütenbesuchende Nutzinsekten an. Hauptverlag, Bern, Stuttgart.
- Willi, Y., 2009. Evolution towards self-compatibility when mates are limited. J. Evolution Biol. 22, 1967-1973.
- Willi, Y., Dietrich, S., van Kleunen, M., Fischer, M., 2007. Interspecific competitive stress does not affect the magnitude of inbreeding depression. Evol. Ecol. Res. 9, 959- 974.
- Wilson, E.O., 2000. The future of conservation biology. Conserv. Biol. 14, 1.
- Wilson, J.D., Morris, A.J., Arroyo, B.E., Clark, S.C., Bradbury, R.B., 1999. A review of the abundance and diversity of invertebrate and plant foods of granivorous birds in northern Europe in relation to agricultural change. Agric. Ecosys. Environ. 75, 13-30.
- Wilson, P.J., Aebischer, N.J., 1995. The distribution of dicotyledonous arable weeds in relation to distance from the field edge. J. Appl. Ecol. 32, 295-310.
- Wilson, P.J., 1993. Conserving Britain's cornfield flowers. Brighton crop protection conference, weeds. Proceedings of an international conference. 1, 411-416.
- WWF 1989. L'été des bleuets. Panda. 39, F-G.
- XLSTAT, 2011. Version 2011.2.04. Paris, France: Addinsoft SARL 1995-2011.
- Young, A.G., Brown, A.H.D., Zich, F.A., 1999. Genetic Structure of fragmented Populations of the endangered Daisy *Rutidosis leptorrynchoides*. Conserv. Biol. 13, 256-265.
- Young, A.G., Boyle, T., Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Trends. Ecol. Evol. 11, 413-418.
- Zobel, M., Otsus, M., Liira, J., Moora, M., Mols, T., 2000. Is small-scale species richness limited by seed availability or microsite availability? Ecology. 81, 3274-3282.

ANNEXES

ANNEXE 1 : LISTE DES PLANTES MESSICOLES

Liste des plantes messicoles classées par niveau de précarité réalisée dans le cadre du Plan d'action national Messicole, sous la direction d'Annie Aboucaya, Conservatoire Botanique National de Porquerolles.

Plantes messicoles encore abondantes (14 taxons)

- *Alopecurus myosuroides* Hudson.
- *Apera spica-venti* (L.) P. Beauv.
- *Aphanes arvensis* L.
- *Arrhenatherum elatius* (L.) P. Beauv. ex J. & C. Pr subsp. *bulbosum* (Willd.) Schü
- *Avena sativa* L. subsp. *fatua* (L.) Thell.
- *Galium aparine* L. subsp. *aparine*
- *Lithospermum arvense* L.
- *Papaver rhoeas* L.
- *Scandix pecten-veneris* L.
- *Scleranthus annuus* L.
- *Sinapis alba* L.
- *Spergula arvensis* L.
- *Vicia villosa* Roth subsp. *varia* (Host) Corb.
- *Viola tricolor* L.

Plantes messicoles à surveiller (30 taxons)

- *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber
- *Allium scorodoprasum* L. subsp. *rotundum* (L.) Stearn
- *Anchusa arvensis* (L.) M. Bieb.
- *Anthemis altissima* L. emend Sprengel, 1826
- *Bromus arvensis* L.
- *Bunium bulbocastanum* L.
- *Calepina irregularis* (Asso) Thell.
- *Caucalis platycarpos* L. [1753]
- *Centaurea cyanus* L.
- *Cnicus benedictus* L.
- *Consolida regalis* S.F. Gray
- *Euphorbia falcata* L.
- *Gagea villosa* (M. Bieb.) Sweet

- *Galium tricornutum* Dandy
- *Gladiolus italicus* Miller
- *Iberis pinnata* L.
- *Legousia hybrida* (L.) Delarbre
- *Legousia speculum-veneris* (L.) Chaix
- *Papaver argemone* L.
- *Papaver hybridum* L.
- *Ranunculus arvensis* L.
- *Stachys annua* (L.) L.
- *Thlaspi arvense* L.
- *Torilis leptophylla* (L.) Reichenb. fil.
- *Tulipa sylvestris* L.
- *Valerianella coronata* (L.) DC.
- *Valerianella dentata* (L.) Pollich
- *Valerianella rimosa* Bast
- *Vicia pannonica* Crantz
- *Vicia villosa* Roth

Plantes messicoles en situation précaire (56 taxons)

- *Adonis aestivalis* L.
- *Adonis annua* L.
- *Adonis flammea* Jacq.
- *Adonis microcarpa* DC.
- *Agrostemma githago* L.
- *Androsace maxima* L.
- *Asperula arvensis* L.
- *Bifora radians* M. Bieb.
- *Bifora testiculata* (L.) Sprengel in Schultes
- *Bromus secalinus* L.
- *Bunium pachypodum* P.W. Ball
- *Bupleurum rotundifolium* L.
- *Bupleurum subovatum* Link ex Sprengel
- *Camelina sativa* (L.) Crantz
- *Cephalaria syriaca* (L.) Roemer & Schultes
- *Ceratocephalus falcatus* (L.) Pers.
- *Conringia orientalis* (L.) Dumort.
- *Consolida ajacis* (L.) Schur
- *Consolida hispanica* (Costa) Greuter & Burdet
- *Consolida pubescens* (DC.) Soo
- *Cuscuta epilinum* Weihe
- *Delphinium halteratum* Sibth. & Sm.
- *Delphinium verdunense* Balbis
- *Galium spurium* L.

- *Garidella nigellastrum* L.
- *Glaucium corniculatum* (L.) J.H. Rudolph
- *Hypecoum imberbe* Sm.
- *Hypecoum pendulum* L.
- *Lolium temulentum* L.
- *Myagrum perfoliatum* L.
- *Neslia paniculata* (L.) Desv.
- *Nigella arvensis* L.
- *Nigella gallica* Jordan
- *Orlaya daucoides* (L.) W. Greuter
- *Orlaya grandiflora* (L.) Hoffm.
- *Ornithogalum nutans* L.
- *Polycnemum arvense* L.
- *Polycnemum majus* A. Braun
- *Polygonum bellardii* All.
- *Ridolfia segetum* Moris
- *Roemeria hybrida* (L.) DC.
- *Silene conoidea* L.
- *Silene cretica* L.
- *Silene linicola* C.C. Gmelin
- *Silene muscipula* L.
- *Sinapis alba* L. subsp. *dissecta* (Lag.) Simonkai [1887]
- *Spergularia segetalis* (L.) G. Don fil.
- *Thymelaea passerina* (L.) Cosson & Germ.
- *Tulipa agenensis* DC.
- *Tulipa clusiana* DC.
- *Tulipa gesneriana* L.
- *Tulipa raddii* Reboul
- *Turgenia latifolia* (L.) Hoffm.
- *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert
- *Valerianella echinata* (L.) DC.
- *Vicia articulata* Hornem.

ANNEXE 2 : SENSIBILITE DU BLEUET AUX HERBICIDES

LEGENDE :																	
	Efficacité très satisfaisante au moins supérieure à 95%																
	Efficacité satisfaisante comprise entre 85% et 95%																
	Efficacité moyenne comprise entre 70% et 85%																
	Efficacité insuffisante inférieure à 70%																
	Efficacité très satisfaisante à satisfaisante	Variation de l'efficacité de la molécule															
	Efficacité très satisfaisante à moyenne																
	Efficacité satisfaisante à moyenne																
	Efficacité satisfaisante à insuffisante																
	Efficacité moyenne à insuffisante																
		COLZA	CEREALES	GRAMINEES POUR FOURRAGE	LUZERNE	TREFLE VIOLET	FEVEROLE	POIS	BETTERAVE	LIN	POMME DE TERRE	SOJA	TOURNESOL	MAIS	SORGHO		
chlorsulfuron + méthabenzthiazuron																	
chlorsulfuron																	
chlorsulfuron + diflufénicanil																	
chlorsulfuron + isoxaben																	
chlorsulfuron + pendiméthaline																	
cinidon-éthyl																	
clodinafop-propargyl + cloquintocet-mexyl + ioxynil + mécoprop-P																	
clomazone																	
clomazone + diméthachlore																	
clomazone + diméthachlore + napropamide																	
clomazone + métazachlore																	
clopyralid																	
clopyralid + 2,4-d + 2,4-MCPA																	
clopyralid + fluoxypyr + 2,4-MCPA																	
clopyralid + 2,4-MCPA																	
2,4-D																	
2,4-d + 2,4-MCPA																	
2,4-d + 2,4-MCPA + mécoprop + piclorame																	
2,4-d + 2,4-MCPA + piclorame																	
2,4-d + mécoprop																	
2,4-DB																	
desméthylphame + éthofumesate + phenméthylphame																	
dicamba																	
dicamba + 2,4-MCPA + mécoprop																	
dicamba + mécoprop																	
dichlorprop-P + 2,4-mcpa + mécoprop-P																	
diflufénicanil + ioxynil + mécoprop(-P)																	
diflufénicanil + isoproturon (AD)																	
diflufénicanil + isoproturon (AG + AD)																	
diflufénicanil + isoproturon + pyraflufen-éthyl																	
diquat + paraquat																	
fénoxaprop-P-éthyl + iodosulfuron-méthyl-sodium + méfenpyr																	
fénoxaprop-P-éthyl + ioxynil + mécaprop-P + méfenpyr																	
fénoxaprop-P-éthyl + isoproturon + méfenpyr																	
florasulam																	
flupyrsulfuron-méthyle																	
flupyrsulfuron-méthyle + metsulfuron méthyle																	
flupyrsulfuron-méthyle + thifensulfuron-méthyle																	
flurochloridone																	
fluoxypyr																	
fluoxypyr + métosulam																	

	COLZA	CEREALES	GRAMINÉES POUR FOURRAGE	LUZERNE	TREPLE VIOLET	FEVEROLE	POIS	BETTERAVE	LIN	POMME DE TERRE	SOJA	TOURNESOL	MAIS	SORGHO
Imazaméthabenz-méthyl + pendiméthaline		■												
Iodosulfuron (0.6%) + mésosulfuron + méfenpyr		■												
Iodosulfuron (3%) + mésosulfuron + méfenpyr		■												
ioxynil + isoproturon + mécoprop		■												
ioxynil + mécoprop(-P)		■	■											
ioxynil + prosulfocarbe		■												
Isoproturon		■												
isoproturon + pendiméthaline		■												
isoxaben		■												
isoxaben + linuron + trifluraline		■												
lénacile								■						
Lénacile + linuron									■					
linuron										■				
Linuron + pendiméthaline		■			■	■								
Linuron + trifluraline		■			■	■								
2,4-MCPA		■								■				
2,4-MCPA + mécoprop		■												
2,4-MCPB		■												
mécoprop		■												
métazachlore	■													
Métazachlore + quinmérac	■													
méthabenzthiazuron		■				■								
métribuzine										■				
Metsulfuron méthyle		■												
Metsulfuron méthyle + thifensulfuron-méthyle		■												
Napropamide	■													
pendiméthaline		■			■	■								
pendiméthaline + picolinafén		■												
phenmédiphame								■						
propyzamide					■	■								
Prosulfocarbe		■												
rimsulfuron										■				
Rimsulfuron + thifensulfuron-méthyle													■	
sulfosulfuron		■												
thifensulfuron-méthyle			■	■										
thifensulfuron-méthyle + tribénuron-méthyle		■												
tribénuron-méthyle		■												
trifluraline	■											■		

Figure 1 : Efficacité des différents produits herbicides sur *Centaurea cyanus* L. pour chaque culture. L'efficacité correspond ici à une moyenne qui se rapporte à un grand nombre d'essais et qui est représentée suivant neuf symboles suivant le pourcentage de destruction du bleuet dans la culture. Une case blanche signifie soit que le produit n'est pas utilisé sur la culture,

soit que l'efficacité n'est pas connue (Sensibilité des mauvaises herbes aux herbicides en grandes cultures, ACTA, ed. 2003).

RESUME

Depuis les années 1950, l'intensification des pratiques agricoles concourt à une augmentation de la pression anthropique entraînant une raréfaction des espèces spécialistes des parcelles cultivées, ce qui contribue à l'érosion de la diversité biologique des agroécosystèmes. Parmi les espèces en déclin, on compte de nombreuses messicoles dont le bleuet (*Centaurea cyanus* L.), fleur emblématique des moissons. Or, cette espèce peut rendre des services écosystémiques comme hôte de prédateurs de ravageurs des cultures et ressource privilégiée de certains pollinisateurs qui justifieraient son maintien dans les champs. Nous étudions ici des facteurs biologiques qui pourraient potentiellement contribuer à son déclin : distribution spatiale, potentialité de croissance, diversité génétique des populations, survie des semences, système de reproduction.

Nous avons montré, par deux campagnes de relevés, que *C. cyanus* n'est pas une espèce indicatrice de diversité floristique dans la parcelle cultivée. Toutefois, lorsque le bleuet est rare dans une région, il est associé à d'autres messicoles peu fréquentes. Par contre, s'il est commun, il est associé aux zones ayant la plus forte diversité végétale. Une expérience de semis dans différents compartiments de l'agrosystème, en absence de traitements herbicides, a mis en évidence que la potentialité de croissance des bleuets est plus élevée dans le plein champ du blé que dans la moutarde et les interfaces blé/bordure. Cette croissance est limitée de manière variable par les communautés adventices présentes dans les compartiments hors champs (bordures). L'analyse de la diversité génétique à l'aide de marqueurs microsatellites de bleuets dans une petite zone agricole montre que les populations sont connectées par des flux de gènes importants. Les barrières écologiques telles que les chemins, semblent être des facteurs de structuration plus importants que la distance géographique séparant les populations. La répartition du bleuet dans le paysage agricole n'est donc pas aléatoire et apparaît dépendante de la fréquence de l'espèce dans la région ainsi que des différents éléments du paysage.

Les caractéristiques du cycle biologique du bleuet ont été étudiées grâce à des expériences au champ et en serre. Nous avons montré que la longévité des akènes enfouis dans le sol chute rapidement après deux ans. Le cycle saisonnier de la dormance permet deux cohortes de levées (automne et printemps). L'étude du système de reproduction a permis de mettre en évidence que les pollinisateurs sont nécessaires pour la fécondation et que les populations sont majoritairement auto-incompatibles. Il existe cependant des individus pseudo auto-incompatibles mais leur fréquence n'est pas liée à la taille des populations ou à leur niveau d'isolement spatial. Par ailleurs, dès que le coefficient de consanguinité augmente dans les populations, la valeur phénotypique des individus baisse. La dépression de consanguinité s'exprime alors principalement pendant la phase de la germination. L'ensemble de ces caractéristiques biologiques peuvent s'avérer défavorables au bleuet dans les agroécosystèmes simplifiés actuels et ont pu entraîner son déclin dans certaines régions.

Mots clés : bleuet, adventices, répartition dans le paysage, persistance des semences, système d'auto-incompatibilité, consanguinité, structure génétique.

Study of the biology of a declining segetal species: cornflower (*Centaurea cyanus* L.)

ABSTRACT

Agroecosystems are currently experiencing high biodiversity loss, in particular among the plant species specifically adapted to this habitat. This decline results from cropping systems that have been intensified in Western Europe since the 1950s. The cornflower (*Centaurea cyanus* L.), considered as emblem of the flora associated with traditional cereals, appears as a species that may be at risk and should be monitored. Indeed, cornflower can serve as a host to predators of crop pests and is strongly attractive for the pollinators. This study examines the biological factors that could potentially cause the decline of this species: spatial distribution, potential for growth, population's genetic diversity, seeds survival and mating system.

We have shown that *C. cyanus* is not a biological indicator of the weed diversity of a field. However, when it is not frequent in a region, cornflower is associated with other rare segetal species. When it is common in a region, *C. cyanus* is present in areas with higher weed diversity. Sowing seeds in different components of the agrosystem, without herbicide application, shows that the growth of cornflower was higher in the centre of a wheat field than in mustard and the crop edge. Growth success in field margins was variably limited according to the weed communities in the field boundaries. The analysis of the genetic diversity using microarrays has shown that populations in a small agricultural area are connected by important genes flow. The ecological barriers as country road seem to be factors more determinant than geographical distance to structure and divide populations. Therefore, the cornflower distribution in the agricultural landscape is not random and appears to be linked to species frequency in the area and to landscape elements.

The cornflower life cycle characteristics were studied through field and greenhouse experiments. We have shown that the longevity of achenes buried in the soil falls rapidly after two years. There is a seasonal dormancy cycle that allows the emergence of two seedling cohorts (fall and spring). Our study of the mating system highlights the fact that pollinators are required for fertilization and that cornflower is strongly self-incompatible. However, there are pseudo self-incompatible individuals, but their frequency is not related to the population size or the spatial isolation level. Individual fitness decreases as the inbreeding coefficient increases in a population. Inbreeding depression is mainly expressed during the germination stage. All these biological characteristics can be detrimental to the cornflower in current simplified agroecosystems and may have led to cornflower decline in some areas.

Keywords: Cornflower, weeds, landscape distribution, seed persistence, system of self-incompatibility, inbreeding, genetic structure.