

AFPP – 23^e CONFÉRENCE DU COLUMA
JOURNÉES INTERNATIONALES SUR LA LUTTE CONTRE LES MAUVAISES HERBES
DIJON – 6, 7 ET 8 DÉCEMBRE 2016

**DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET DYNAMIQUE D'UNE ESPECE ENVAHISSANTE, L'AMBROISIE À FEUILLES
D'ARMOISE (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)**

L. MEYER⁽¹⁾, B. CHAUVEL⁽¹⁾, V. LE CORRE⁽¹⁾, G. BAILLY⁽²⁾ et C. DÉLYE⁽¹⁾

⁽¹⁾ Agroécologie, INRA, F-21000 Dijon, France, Lucie.meyer@dijon.inra.fr

⁽²⁾ BASF France SAS, Sustainable Agriculture Department, F-69134 Ecully, France

RÉSUMÉ

Des marqueurs microsatellites ont été développés pour étudier la diversité génétique et la structure en populations de l'ambrosie à feuilles d'armoise dans diverses zones de colonisation. Des populations ont été échantillonnées en Bourgogne au sein de zones agricoles et non agricoles. Cette étude a permis de mettre en évidence des proximités génétiques entre populations d'une même origine ou d'une origine différente. Sur la base de ces résultats, des hypothèses sur les mécanismes de propagation de cette espèce nuisible sont discutés.

Mots-clés : *Ambrosia artemisiifolia*, marqueurs microsatellites, diversité génétique, structure en population, génétique du paysage.

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY AND POPULATION DYNAMICS OF AN INVASIVE WEED, *AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.

New microsatellites markers have been developed for population genetics studies in *Ambrosia artemisiifolia* in recently colonized areas. *A. artemisiifolia* populations were sampled in two types of environments: agricultural landscapes and non-agricultural areas. This study allowed to determine genetic relationships among populations in an agricultural landscape and also among populations originating from agricultural and non-agricultural areas. Thus, hypotheses regarding the spread of this species in different environments are discussed.

Keywords: *Ambrosia artemisiifolia*, microsatellites markers, genetic diversity, population structure, landscape genetics.

INTRODUCTION

Les espèces végétales envahissantes entraînent de sérieux impacts sur l'environnement (diminution du nombre d'espèces natives présentes dans un écosystème, dispersion dans divers habitats, toxicité pour les animaux, etc.), sur l'économie des pays (coûts financiers de plusieurs millions d'euros pour éradiquer ou contrôler ces espèces, notamment en agriculture et dans les milieux naturels) et sur la santé publique (certaines plantes émettent du pollen allergène, telle que l'ambrosie à feuilles d'armoise, *Ambrosia artemisiifolia* L.). L'étude de telles espèces permet d'obtenir des connaissances sur la biologie, l'écologie et l'évolution génétique des populations ainsi que sur la dispersion des espèces envahissantes au sein de divers écosystèmes. L'étude de la variabilité génétique et du potentiel d'évolution des populations de plantes envahissantes apporte des informations pour comprendre leur dynamique au sein des environnements natifs et colonisés. Ces informations pourront aussi aider à déterminer quels facteurs permettent aux plantes envahissantes de coloniser plusieurs milieux, de nature parfois très variée. Les connaissances recueillies sur ces espèces pourront être utilisées dans des modèles de prédiction de la sensibilité d'un écosystème à la colonisation par une nouvelle espèce (Sakai et al., 2001).

À partir d'une population actuelle, il est possible de retracer les mouvements des individus dans leur environnement en utilisant les outils de la génétique des populations, tels que les marqueurs moléculaires. Des avancées récentes en analyses génétiques ont été permises grâce à la montée en puissance des marqueurs moléculaires pour répondre à des problématiques écologiques. Les microsatellites font partie des marqueurs moléculaires les plus diversifiés et les plus utilisés dans le cadre d'études en génétique des populations afin d'estimer des taux de migration, la taille de populations, les relations génétiques entre les individus, l'impact des goulots d'étranglements sur les populations, etc (Selkoe et Toonen, 2006 ; Hamilton, 2009).

L'ambrosie à feuilles d'armoise, espèce envahissante et plante adventice des cultures, appartient à la famille des Asteracées. Originaires d'Amérique du Nord, l'ambrosie à feuilles d'armoise a été introduite non intentionnellement en France au XIX^{ème} siècle et colonise, actuellement, la majorité du territoire français. Elle possède un spectre écologique large ce qui lui permet de se développer dans différents types d'habitats, tels que les friches, les zones en construction, les bords de rivières et les espaces agricoles. L'ambrosie à feuilles d'armoise est une espèce allogame et anémophile. (Smith *et al.*, 2013). En milieu agricole, l'ambrosie à feuilles d'armoise se développe principalement dans les cultures de printemps, comme le tournesol, le maïs et le soja, où la compétition avec la culture et les autres espèces adventices est faible (Observatoire des Ambrosies).

L'ambrosie à feuilles d'armoise est aujourd'hui citée dans la liste des espèces envahissantes en France et dans de nombreux pays (Hongrie, Suisse, Allemagne, etc.) en raison de son extension en surface et de l'augmentation de la densité de ses populations. Dans le domaine de l'écologie, l'espèce est étudiée en tant que plante envahissante : les principales recherches sont axées sur les modes de dispersion de l'espèce, la diversité génétique, les systèmes reproducteurs, la comparaison de la compétitivité des biotypes américains et français ainsi que l'écologie des populations dans plusieurs pays (Chauvel, 2005). En France, l'ambrosie à feuilles d'armoise a été identifiée pour la première fois en 1863 dans le département de l'Allier. De multiples introductions de cette plante ont ensuite eu lieu dans plusieurs régions françaises. Actuellement, l'ambrosie à feuilles d'armoise est majoritairement présente dans la vallée du Rhône, avec des extensions de son aire de répartition vers le sud et vers le nord de la France (Observatoire des Ambrosies).

En Bourgogne, l'espèce est en forte extension dans les départements de Saône-et-Loire et de Côte d'Or, principalement dans les parcelles cultivées. En Saône-et-Loire, l'ambrosie à feuilles d'armoise est très répandue et se présente en tant qu'adventice des cultures et plante des bords de

routes. En Côte d'Or (principalement au sud de Dijon), le scénario est quelque peu différent : deux types de populations d'ambrosie coexistent. Les populations dites « agricoles » marquent un front de colonisation récent (de 1 à 10 ans) : un gradient de distribution de l'espèce est observé du sud vers le nord du département. La présence de populations plus anciennes serait liée à un front de colonisation antérieur (plus de 50 ans). Ces populations anciennes sont aujourd'hui naturalisées en Côte d'Or, c'est-à-dire bien adaptées à leur environnement (Carvin et al., 2003).

Les cours d'eau ainsi que les activités anthropiques jouent un rôle dans la dispersion des semences d'ambrosie à feuilles d'armoise. L'implantation de l'ambrosie à feuilles d'armoise en Bourgogne serait plutôt liée aux pratiques culturales (lots de semences contaminés, transport par les engins agricoles, amendement minéral ou organique en cultures de printemps permettant une bonne implantation de l'ambrosie dans la culture, etc.) et aux agrosystèmes, qu'à la proximité de la Saône. En effet, les espaces agricoles représentent la majorité des sites prospectés en Côte d'Or où la plante est présente. Elle est principalement retrouvée dans des inter-cultures de colza (Carvin *et al.*, 2003; Chauvel, 2010). Suivant les années, le nombre d'individus d'ambrosie à feuilles d'armoise présents dans les parcelles cultivées en Côte d'Or est variable. Les populations de cette espèce restent majoritairement cantonnées en bordure de parcelles. La dispersion des individus inter et intra-parcelle est faible pour les zones étudiées mais dans quelques cas, le contrôle de l'ambrosie à feuilles d'armoise échappe aux agriculteurs, notamment dans le cas de la culture de tournesol en raison de la proximité botanique des deux espèces (Chauvel, 2010). La plante colonise aussi des milieux très pauvres (peu de ressources nutritives du sol, stress hydrique important, etc.) telles que les friches non agricoles ou des gravières. Quelles que soient les zones étudiées, les vecteurs responsables de l'introduction et de la dispersion de cette espèce n'ont jamais été déterminés avec précision (Chauvel, 2010).

Dans ce contexte, l'objectif est d'étudier la connectivité des populations d'ambrosie à feuilles d'armoise dans les paysages agricoles afin de comprendre comment évolue la diversité génétique de ces populations sur plusieurs campagnes culturales et de déterminer les facteurs (facteurs biotiques et/ou abiotiques) permettant la colonisation des populations d'ambrosie à feuilles d'armoise dans divers milieux. Dans cette étude, nous nous proposons (1) d'étudier la diversité génétique de populations d'ambrosie à une échelle locale, (2) de déterminer s'il existe des différences de structure en populations entre des paysages agricoles et non agricoles et entre paysages agricoles et (3) d'étudier l'effet de la structure du paysage sur les flux de gènes.

MATERIEL ET MÉTHODES

MATERIEL VEGETAL

35 populations d'ambrosie à feuilles d'armoise ont été échantillonnées en 2014 (Figure 1) dans deux paysages agricoles proches de Dijon, Genlis (22 populations) et Pagny-la-Ville (10 populations), ainsi que dans deux zones non agricoles, une ancienne gravière à Lux (deux populations) et une ancienne carrière à Spoy (une population).

Figure 1 : Cartographie des populations d'ambrosie à feuilles d'armoise échantillonnées.
Map showing the *A. artemisiifolia* populations sampled



Les populations représentées en rouge et en vert sur la Figure 1 sont celles qui ont été analysées génétiquement pour cette étude. Les populations représentées en jaune restent à étudier.

DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX MARQUEURS MICROSATELLITES

Trois méthodes ont été utilisées pour développer de nouveaux marqueurs microsattellites. Des marqueurs SSR (nucléaires, régions aléatoires du génome) ont été développés par séquençage Roche GS Flex 454 d'une banque enrichie (effectuée par Genoscreen) (Malauza *et al.*, 2011) ainsi que par séquençage direct avec la méthode Illumina. La troisième méthode a consisté à utiliser une banque de données d'EST (Expressed Sequence Tags) existante et disponible dans Genbank (SRA-NCBI). Pour chaque type de marqueurs (SSR 454, SSR Illumina et EST-SSR), une centaine de couples d'amorces a été testée pour une amplification stable des produits PCR sur six individus de référence.

Les marqueurs pour lesquels l'amplification PCR était nette ont été validés par le génotypage d'individus des populations européennes et françaises (plateforme Gentyane de l'INRA de Clermont-Ferrand).

Les logiciels Peakscanner version 1.0 et R version 3.1.2 (package MsatAllele) ont été utilisés pour lire les génotypes (Alberto, 2009 ; Applied Biosystems). Le logiciel MICROCHECKER 2.2.0.3 et INEST ont été utilisés pour vérifier la présence/absence d'allèles nuls et estimer leur fréquence pour chaque marqueur (Van Oosterhout *et al.*, 2004 ; Chybicki et Burczyk, 2009). Les marqueurs ont été

sélectionnés sur la base des critères suivants : polymorphisme, facilité de lecture, peu ou pas d'allèles nuls (fréquence inférieure à 20%).

GENOTYPAGE

Un bout de feuille a été prélevé sur chaque individu pour en extraire l'ADN (Délye *et al.*, 2002). Au total, 652 individus ont été génotypés : 300 pour la zone de Genlis, 231 pour la zone de Pagny-la-Ville, 68 pour la zone de Lux et 53 pour la zone de Spoy. Les logiciels Peakscanner version 1.0 et R version 3.1.2 (package MsatAllele) ont été utilisés pour lire les génotypes (Alberto, 2009 ; Applied Biosystems).

DIVERSITE GENETIQUE ET STRUCTURE EN POPULATIONS

L'étude de la diversité génétique et de la structure en population a été réalisée sur la base de 16 marqueurs microsatellites. Le logiciel STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) permettra de tester l'hypothèse d'une structure en populations à l'échelle des parcelles agricoles de Genlis et de Pagny-la-Ville et des zones non agricoles de Lux et de Spoy.

Deux populations (LUX14-02, SPO14-01 indiquées par des points verts, Figure 1) et six populations du paysage agricole de Genlis (points rouges, Figure 1) ont été analysées. La proximité génétique de ces populations a été étudiée à l'aide de la méthode UPGMA.

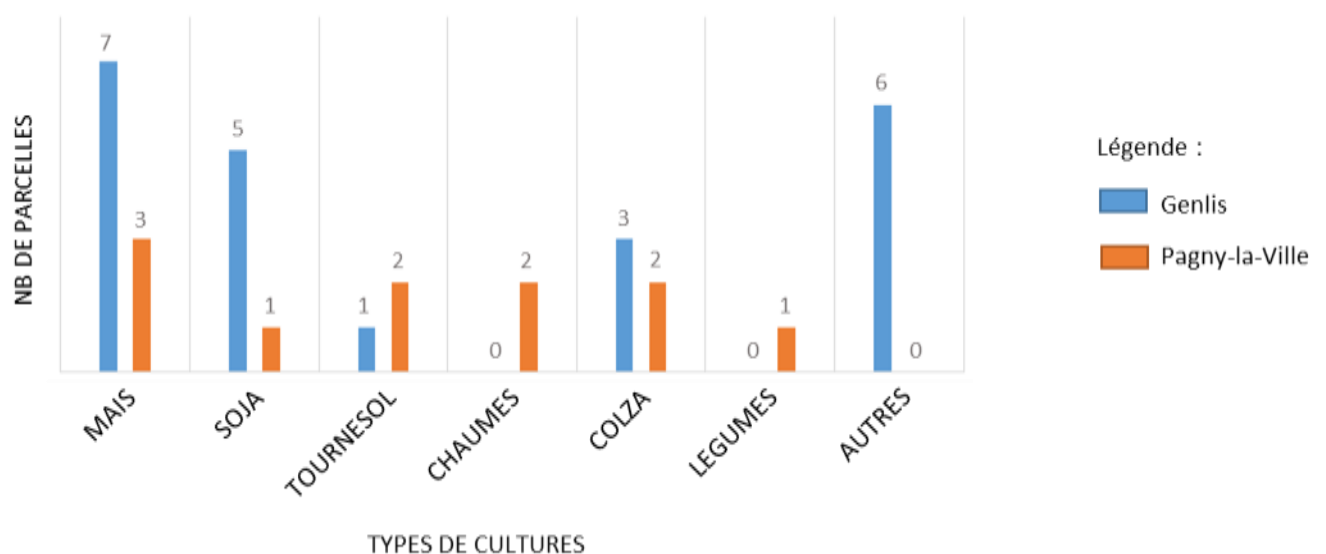
RESULTATS

CARACTÉRISTIQUES DES PAYSAGES AGRICOLES

Le paysage agricole de Genlis est majoritairement représenté par des cultures de printemps (maïs et soja) et par une culture d'hiver, le colza (Figure 2). La classe « autres » regroupe les parcelles qui étaient labourées lorsque l'échantillonnage a été réalisé (les populations de cette classe ont été échantillonnées sur la bordure herbacée). Le paysage agricole de Pagny-la-Ville se compose à la fois de cultures de printemps (maïs, soja, tournesol) et de cultures d'hiver - blé/orge qui étaient déjà récoltées lors de l'échantillonnage – et colza. (Figure 2). Les semences d'ambrosie à feuilles d'armoise ont été échantillonnées à l'été 2014 dans l'ensemble des cultures représentées sur la Figure 2.

Figure 2 : Types de cultures présente dans les paysages agricoles de Genlis (en bleu) et de Pagny-la-Ville (en orange).

Crops in the agricultural landscapes of Genlis (blue) and of Pagny-la-Ville (orange).

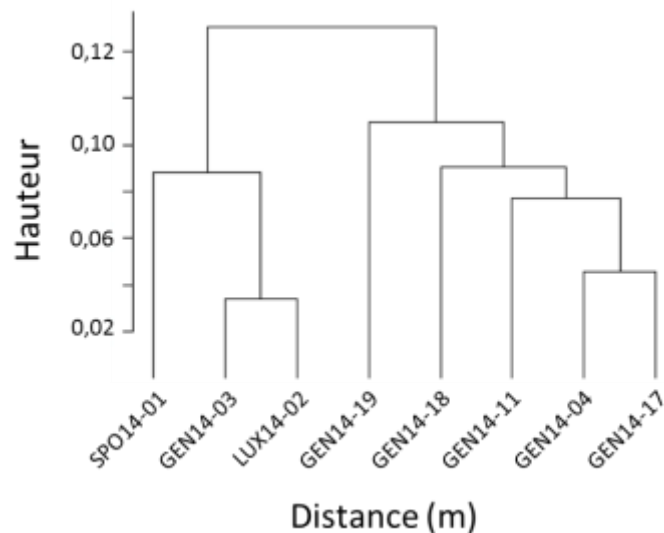


DIVERSITE GENETIQUE ET STRUCTURE EN POPULATION

D'un point de vue purement géographique (Figure 1), trois lots de populations peuvent être distingués : le premier lot regroupe l'ensemble des populations échantillonnées au sein du paysage agricole de Genlis, au sud-est de Dijon, le deuxième rassemble les populations échantillonnées dans le paysage agricole de Pagny-la-Ville au sud de Dijon et enfin, le troisième lot se compose de trois populations échantillonnées en zone non agricole au nord de Dijon.

Au niveau génétique, la valeur moyenne du coefficient de différenciation génétique F_{ST} est faible ($F_{ST} = 0,113$) : il existe peu de différences génétiques entre les populations. Le dendrogramme (Figure 3), construit sur une matrice de distance (F_{ST} pairwise), montre que les deux populations isolées au nord de Dijon (gravière de Lux et ancienne carrière de Spoy) sont génétiquement distinctes des populations agricoles échantillonnées autour de Genlis.

Figure 3 : Dendrogramme représentant la proximité génétique entre huit populations d'ambroisie à feuilles d'armoise et construit avec la méthode UPGMA et la fonction hclust sous R v3.1.2. Clustering tree of genetic proximities of eight ragweed populations using UPGMA method and hclust function performed on R v3.1.2.



Seule une population du paysage agricole de Genlis, GEN14-03, apparaît comme génétiquement proche d'une population de la gravière de Lux, LUX14-02, contrairement à ce qui aurait pu être attendu. Les autres populations du paysage agricole de Genlis s'avèrent être, quant à elles, proches génétiquement.

Les populations GEN14-04, GEN14-07 et GEN14-11 sont les plus proches génétiquement alors que la population GEN14-11 se trouve plus éloignée des deux premières populations (à 3,5 km au nord du paysage agricole) que les populations GEN14-18 et GEN14-19 qui se situent dans un rayon inférieur à 1 km (Figure 1).

DISCUSSION

Nous nous attendions à ce que les populations les plus proches spatialement soit aussi proches génétiquement en raison des flux de pollen plus élevés entre des populations proches qu'entre des populations distantes. L'indice F_{ST} , qui donne une estimation de la diversité génétique inter-populations, a permis de construire un dendrogramme pour vérifier cette hypothèse. En effet, d'après les résultats obtenus, les deux populations isolées au nord de Dijon étaient proches génétiquement (hypothèse validée). De plus, aucune population d'ambroisie à feuilles d'armoise agricole n'a été retrouvée à proximité des populations isolées dans les carrières et la gravière. De ce fait, ces deux populations ont

évolué indépendamment de celles du paysage agricole de Genlis. Les raisons pour lesquelles les populations isolées dans les gravières et la carrière ne se sont pas élargies au milieu agricole restent encore inconnues. Une hypothèse serait qu'aucun vecteur de dispersion des semences n'a permis l'introduction de nouvelles populations à proximité de ces deux endroits non exploités à ce jour. Quant aux flux de pollen en provenance de ces deux populations isolées, le nuage pollinique a pu être dilué en raison de la distance séparant ces populations des populations agricoles et de la concentration du nuage pollinique émis par chaque population agricole.

Néanmoins, une population du paysage agricole de Genlis, GEN14-03, s'est aussi avérée être génétiquement proche de ces deux populations et notamment de la population LUX14-02. GEN14-03 a été échantillonnée en bord d'une parcelle de colza située près d'un étang artificiel (ancienne gravière ou sablière). Bien que les informations manquent pour valider totalement cette hypothèse, on peut supposer que la population GEN14-03 possède une origine commune avec les populations des anciennes gravières du nord de Dijon ou est issue de ces populations par dispersion de graines. Les échanges entre ces différents sites se seraient faits via les camions de transport ou l'utilisation des mêmes engins d'extraction.

Les cinq autres populations échantillonnées dans le paysage agricole de Genlis se sont avérées être proches génétiquement. L'une d'entre elles, la population GEN14-11, se situe à 3,5 km au nord des quatre autres populations mais est génétiquement proches de GEN14-04 et GEN14-17. De plus, ces deux populations ont été échantillonnées sur des parcelles appartenant au même agriculteur tandis que la population GEN14-11 a été échantillonnée sur une parcelle appartenant à un autre exploitant. Les proximités génétiques peuvent s'expliquer par des dispersions de semences *via* les engins agricoles, plus importantes entre parcelles appartenant à une même exploitation.

En 2013, le même type d'étude avait été réalisé pour le paysage agricole de Genlis afin d'étudier l'effet de la structure du paysage sur la différenciation génétique des 17 populations échantillonnées. Une des conclusions de l'étude était que certains événements récents de dispersion des semences pouvaient être associés au transport des semences par les engins agricoles (Meyer et al., 2014). Le résultat obtenu concernant la proximité génétique des trois populations d'ambrosie à feuilles d'armoise semble confirmer ce point. Ces analyses pourraient aussi permettre de mettre en évidence des phénomènes d'introduction multiples de l'ambrosie à feuilles d'armoise en Côte d'Or, comme cela avait été démontré en 2013 dans le paysage agricole de Genlis (Meyer et al., 2014).

CONCLUSION

L'étude de différentes zones infestées par l'ambrosie à feuilles d'armoise a permis de mettre en évidence des variations génétiques entre les populations agricoles et non agricoles, mais aussi au sein des populations agricoles provenant d'un même paysage. Les populations d'ambrosie à feuilles d'armoise échantillonnées dans les gravières et dans une ancienne sablière ont évolué indépendamment de celles échantillonnées en milieu agricole (paysage agricole de Genlis). Il semble donc ne pas y avoir d'échanges entre ces deux types d'habitats.

Par ailleurs, la proximité génétique de certaines populations agricoles, pourtant éloignées au sein du paysage, suggère que des flux de gènes s'opèrent entre des populations distantes *via*, par exemple, le transport des semences par les machines agricoles.

Une analyse plus fine (structure en populations, effet du paysage sur la différenciation génétique) de l'ensemble des 35 populations d'ambrosie à feuilles d'armoise échantillonnées en Côte d'Or permettra de déterminer s'il existe des vecteurs de dissémination des semences entre les deux paysages agricoles et/ou entre les paysages agricoles et les deux zones non-agricoles au nord de Dijon.

REMERCIEMENTS

Nous remercions BASF France SAS pour l'appui financier dédié à ce projet.

BIBLIOGRAPHIE

Alberto F. 2009. MsatAllele_1.0: An R package to visualize the binning of microsatellite alleles. *Journal of Heredity*. Vol.100, pp. 394–7.

Applied Biosystems. Available from: <http://www.appliedbiosystems.com>

Carvin, C., Chauvel, B., Bretagnolle, F., Cuénot, E. 2003. Mise au point sur la présence de l'espèce *Ambrosia artemisiifolia* L. dans les départements de Côte d'Or et de Saône-et-Loire. *Bulletin Sciences Bourgogne*. 51, pp. 18-23.

Chauvel, B., Fumanal, B., Bretagnolle, F. 2005. Ambroisie à feuilles d'armoise : situation et état des lieux en France et en Europe. *17ème Colloque pluridisciplinaire de l'AFEDA*. Novembre 2005, 22, p. 11.

Chauvel, B. 2010. Quel est le statut de l'Ambroisie à feuilles d'armoise en Côte d'Or ? *Bourgogne Nature*. 12, pp. 80-90.

Chybicki IJ, Burczyk J. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity*. Vol. 100, pp.106–113.

Chun, Y.J., Fumanal, B., Laitung, B., Bretagnolle, F. 2010. Gene flow and population admixture as the primary post-invasion processes in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) populations in France. *New Phytologist*. Vol. 185, pp. 1100-1107.

Délye C, Matějček A, Gasquez J. 2002. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* gaud). *Pest Management Science*. Vol. 58, pp.474–8.

Lavergne, S., Molofsky, J. 2007. Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *PNAS*. Vol. 104, 10, pp. 3883-3888.

Gard, B. 2012. *Processus écologiques et évolutifs influençant la colonisation de l'ambroisie à feuilles d'armoise (Ambrosia artemisiifolia L.) en France*. p. 186, Thèse.

Hamilton, M.B. 2009. *Population Genetics*. s.l. : Blackwell Publishing, p. 407.

Malausa T, Gilles A, Megléczy E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, et al. 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*. Vol.11, pp. 638–44.

Meyer, L., Bailly G., Chauvel, B., Délye, C., Le Corre, V. 2014. Genetic structure & dispersal of an invasive plant, *Ambrosia artemisiifolia*, within an agricultural landscape. *Joint Meeting BESfé (British Ecological Society et Société Française d'Ecologie)*. Lille, Décembre 2014.

Observatoire des Ambroisies. Available from: <http://www.ambroisie.info/>

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. Vol. 155, pp. 945-959.

Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holet, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C., McCauley, D.E., O'Neil, P., Parker, I.M., Thompson, J.N., Weller, S.G. 2001. The Population Biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 32, pp. 305-332.

Selkoe, K.A. and Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists : a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. Vol. 9, pp. 615-629.

Smith, M., Cecchi, L., Skjoth, C.A., Karrer, G., Sikoparija, B. 2013. Common ragweed : a threat to environmental health in Europe. *Environment International*. Vol. 61, pp. 115-126.

SRA - NCBI. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Molecular Ecology Notes*. Vol. 4, pp. 535–538.