

RIEUX Adrien



Master 2 : Écologie, Biodiversité, Évolution
Parcours Ressources Phylogénétiques et Interactions Biologiques
Université Montpellier II

Rapport de Stage

Estimation des flux de gènes chez le champignon
phytopathogène *Mycosphaerella fijiensis* à une
échelle locale en fonction du paysage

Stage réalisé au sein de l'UMR Biologie et Génétique des Interactions Plante Parasite,
CIRAD / INRA / ENSAM

En collaboration avec le laboratoire de phytopathologie du CARBAP
(Cameroun, resp. Luc de Lapeyre de Bellaire)

Équipe d'accueil : Biologie et évolution des champignons phytopathogènes

Responsables de Stage : Fabien Halkett et Jean Carlier



Soutenu à Montpellier le 19 juin 2006

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
P. Lapeyre



Résumé

L'intensité des flux de gènes au sein d'un bassin de production agricole a été peu étudiée chez des champignons phytopathogènes. *Mycosphaerella fijiensis*, agent responsable de la maladie des raies noires du bananier, constitue un bon modèle d'étude pour aborder cette question. Les objectifs de ce travail étaient i) d'étudier l'effet du paysage sur les flux de gènes avec des méthodes de génétique des populations qui prennent en compte explicitement la localisation spatiale des échantillons (« Landscape genetics ») et ii) d'estimer plus précisément les flux de gènes de ce parasite à une échelle plus restreinte avec un modèle d'isolement par la distance en populations continues. Un échantillonnage a été réalisé au sein d'une zone cartographiée au Cameroun. Près de 850 isolats ont été analysés avec 14 marqueurs microsatellites. Deux algorithmes d'assignation génétique ont été utilisés, l'un spatialisé, l'autre non. L'analyse additionnelle d'un jeu de données simulé nous a permis de mettre évidence l'importance de la prise en compte de l'information spatiale dans le traitement des données. Les résultats ont permis de différencier deux populations au sein du paysage agricole échantillonné ($F_{ST}=0,111$). Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence une corrélation entre une barrière physique (interrompant potentiellement les flux de gènes) et la discontinuité génétique détectée. Au sein d'une population, la mise en évidence d'un patron d'isolement par la distance nous a permis d'estimer une distance de dispersion génétiquement efficace du champignon comprise entre 250 m et 1 km. En discussion, nous soulignons la pertinence de l'échelle géographique considérée (un bassin de production agricole) pour l'étude des flux de gènes de ce champignon phytopathogène.

Abstract

The level of gene flow in a farming production area has been rarely studied for a plant pathogenic fungus. *Mycosphaerella fijiensis*, causing black leaf streak disease of banana is a good model to study this question. The goals of this study were to i) study the effect of landscape features on the gene flows using population genetic methods taking the spatial location of individuals into account («Landscape genetics») and ii) to estimate more precisely the genes flows in this pathogen at a local scale using an isolation by distance model in a continuous population. A sampling was realized in a Cameroon coordinated area. Around 850 isolates were analysed using 14 microsatellites markers. Two Bayesian algorithms taking or not spatial location into account were employed for assignment analysis. An additional analysis of a simulated data set enabled the importance of the spatial information in the data analysis to be underlined. Applying this algorithm to our samples allowed the detection of two populations in the farming landscape ($F_{ST}=0,111$). Nonetheless we did not found any correlation between landscape features (which could potentially break gene flow) and the genetic structure observed. Results also showed an isolation by distance pattern among a continuous population. We were able to specify a distance class for the effective dispersion of *M. fijiensis* ranging from 250 m to 1 km. We discuss the pertinence of the geographical scale considered (a farming production area) for studying the gene flow of this pathogen.

REMERCIEMENTS

Ce stage a été réalisé au sein de l'UMR Biologie et Génétique des Interactions Plante – Parasite au sein de l'équipe « Biologie et évolution des champignons phytopathogènes » sous la direction de Fabien Halkett et de Jean Carlier dans le cadre du master 2 recherche «Ecologie, Biodiversité, Evolution», parcours «Ressources Phytogénétiques et Interactions Biologiques ».

Je tiens à remercier tout particulièrement Fabien et Jean pour l'excellente qualité de leur encadrement tout au long de ce stage. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette étude que j'ai sincèrement trouvée très intéressante, complète et formatrice. Merci également pour tous les moments que vous m'avez consacré, vos précieux conseils ainsi que votre grande sympathie. Fabien, toutes tes « macros » et ton ingénieux distributeur à billes m'ont permis de gagner énormément de temps ! Je t'en remercie encore et je te souhaite beaucoup de réussite pour ton futur poste...

Un grand merci également à Marie - Françoise Zapater pour l'aide qu'elle m'a apportée lors de mes manipulations en Biologie moléculaire, ainsi que pour sa bonne humeur habituelle. Courage Marie, tu seras bientôt une experte certaine de la Q-PCR !...

Je remercie fortement Luc Pignolet pour son aide indispensable durant toutes les étapes d'isolement des souches que nous avons réalisées ensemble. Merci pour ta grande disponibilité et ta gentillesse.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également à Henry Adreit, Véronique Roussel, Remy Habas, Anny renovell et Katia Bonnemayre pour leur aide et leur sympathie.

Je remercie de même Anne Loiseau du CBGP pour sa disponibilité au moment où nous avons utilisé le séquenceur capillaire ainsi que François Rousset pour m'avoir renseigné sur l'utilisation de son modèle.

Un clin d'œil amical à mes deux camarades de bureau, Tony et Belkacem. Je vous souhaite beaucoup de réussite pour la suite.

Finalement, un grand merci à toutes les personnes de l'UMR pour votre accueil très agréable...

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| <u>Introduction</u> | 1 |
| <u>Matériel et méthodes</u> | 4 |
| 1 - Zone d'étude & échantillonnage réalisé..... | 4 |
| 2 - Isolement des souches et extraction de l'ADN..... | 4 |
| 3 - Marqueurs moléculaires et Genotypage..... | 5 |
| 4 - L'analyse des données..... | 5 |
| a - <i>Analyses classiques de génétique des populations</i> | 5 |
| b - <i>Estimation de paramètres démographiques sous isolement par la distance</i> <i>en populations continues : Robustesse d'une méthode basée sur les Fst</i> | 6 |
| c - <i>Structuration des populations : Approches de génétique du paysage</i> | 6 |
| d - <i>Simulations</i> | 8 |
| e - <i>Analyses de données échantillonnées en 2001</i> | 9 |
| <u>Résultats</u> | 9 |
| 1 - Diversité génétique, génotypique et déséquilibre de liaison..... | 9 |
| 2 - Structuration génétique de la population échantillonnée..... | 9 |
| 3 - L'isolement par la distance..... | 11 |
| <u>Discussion</u> | 12 |
| <u>Conclusion et perspectives</u> | 14 |
| <u>Références Bibliographiques</u> | 16 |
| <u>Documents Annexes</u> | 18 |

Introduction

De nombreux systèmes de production sont menacés par des épidémies provoquées par des champignons phytopathogènes. Les stratégies actuelles de lutte (traitements fongicides, utilisation de résistances variétales sans gestion) ne sont pas durables et présentent de nombreuses limites (pollution, risques sanitaires, coût, contournement des résistances...). Afin d'assurer la durabilité des systèmes de production, de nouvelles stratégies de culture agricole basées sur une gestion de variétés résistantes aux maladies et/ou une utilisation raisonnée de fongicides sont indispensables. L'élaboration de telles stratégies doit se faire en prenant en compte le potentiel évolutif des populations pathogènes. Parmi les différents facteurs épidémiologiques et évolutifs devant être analysés, les capacités de dispersion des pathogènes et les flux de gènes qui en découlent jouent un rôle important dans la dynamique spatio-temporelle des épidémies et dans l'évolution des populations pathogènes (McDonald et Linde, 2002).

Nous pouvons distinguer deux modes de dissémination dans le cas des maladies provoquées par des champignons phytopathogènes aériens (Brown et Hovmøller, 2002). La première forme correspond à une invasion ponctuelle par des événements rares de dissémination du parasite. Ces événements peuvent se réaliser soit par la dispersion naturelle et occasionnelle de spores sur de longues distances soit par des mouvements de matériel végétal infecté. Ceci entraîne une dissémination stochastique des maladies plutôt aux échelles mondiale et continentale. La deuxième forme de dissémination est graduelle et permet l'extension d'une maladie dans un lieu donné. Elle intervient donc à une échelle plus locale et s'effectue principalement par les moyens naturels de dispersion du pathogène.

Les études antérieures relatives à la biologie des populations de champignons phytopathogènes ont été souvent réalisées aux échelles globale et continentale dans l'objectif de quantifier les phénomènes de migration entre continents (*e.g.* Banke et McDonald, 2005) ou de retracer l'expansion d'une pandémie (*e.g.* Carlier *et al.*, 1996 ; Rivas *et al.* 2004). Or c'est à une échelle plus locale que l'intensité des flux de gènes peut affecter le degré d'adaptation des populations phytopathogènes (Gandon et Michalakis, 2002 ; Laine, 2005). Seulement quelques études ont été réalisées à une échelle plus fine afin d'appréhender les processus d'adaptation locale dans un contexte sauvage (Thrall *et al.*, 2002 ; Capelle et Neema, 2005) ou expérimental (Zhan *et al.*, 2002). De plus, l'existence de barrières environnementales peut empêcher ou réduire les flux de gènes au sein d'un milieu et de ce fait entraîner la création de profondes discontinuités génétiques entre populations. Il apparaît donc nécessaire d'estimer les flux gènes chez un champignon phytopathogène dans une aire de production agricole en prenant en compte explicitement le paysage.

L'estimation de la dispersion chez un champignon phytopathogène peut être réalisée de façon complémentaire par des méthodes directes ou indirectes. Les approches directes se basent sur l'analyse du gradient de maladie dans une parcelle à partir d'une source d'inoculum primaire (McCartney et Fitt, 1998). Ces méthodes permettent d'estimer la distance moyenne de dispersion des spores. Cependant, elles ne sont pas suffisantes pour appréhender les flux de gènes sur un ensemble de parcelles. De plus, à cette échelle,

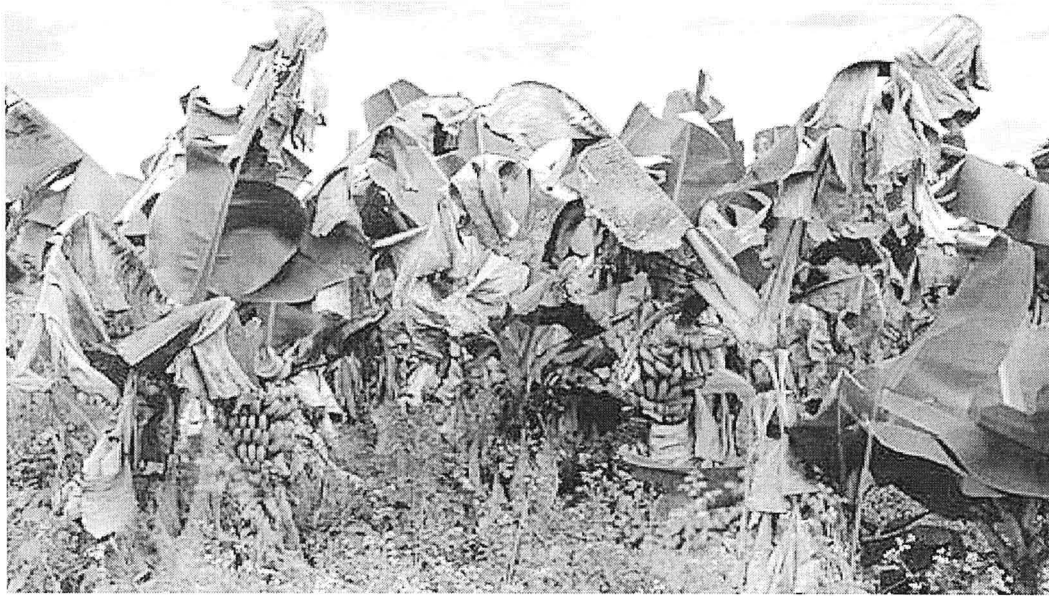


Photo n°1 :

*Bananiers infectés par la maladie des raies noires causée par le champignon *Mycosphaerella fijiensis**

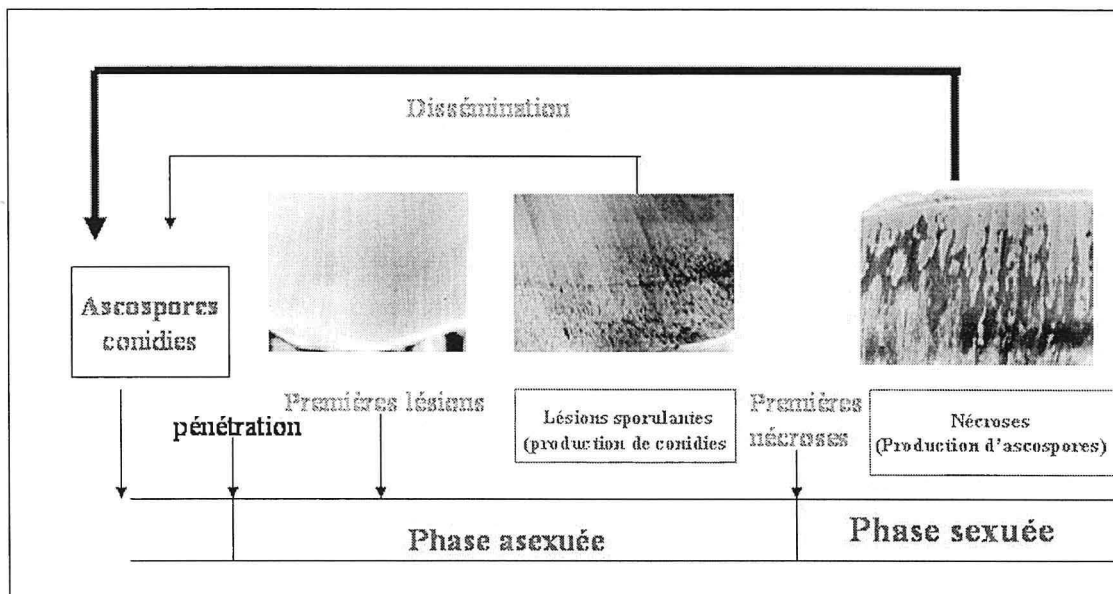


Figure n°1 :

*Représentation schématique du cycle infectieux de *Mycosphaerella fijiensis**

de nombreux facteurs tels que des barrières géographiques ou les discontinuités dans la répartition des populations hôtes peuvent limiter la dispersion.

Les approches indirectes d'estimation des flux géniques sont basées sur des méthodes de génétique des populations (Rousset, 2001). Les premiers modèles d'isolement par la distance prenaient en compte des populations discrètes et considéraient que la différenciation génétique à des locus neutres augmente avec la distance géographique (Rousset, 1997). Or la distribution des populations pathogènes dépend en grande partie de la répartition des plantes hôtes. En milieu agricole on peut donc s'attendre à ce que les champignons pathogènes forment des populations continues. Les paramètres de dispersion d'un champignon phytopathogène doivent donc être estimés à partir de modèles plus récents d'isolement par la distance en populations continues (Hardy et Vekemans, 1999 ; Rousset, 2000).

En outre, la compréhension des patrons de flux de gènes conditionnant l'adaptation locale nécessite de savoir quelles sont les caractéristiques du paysage qui structurent les populations. L'avènement de nouvelles méthodes reposant sur des algorithmes itératifs de type Bayésien permet d'analyser des données génétiques sans que des populations discrètes soient identifiées à l'avance (Pritchard *et al.*, 2000 ; Manel *et al.*, 2005). Cette méthode a permis l'essor d'une nouvelle discipline, «landscape genetics» ou «génétique du paysage» qui permet d'identifier les variables environnementales et géographiques pertinentes qui structurent les populations (Manel *et al.*, 2003 ; Guillot *et al.*, 2005). Cette approche semble particulièrement adaptée à l'étude de la structuration locale d'une population de pathogène au sein d'un milieu hétérogène.

Mycosphaerella fijiensis est l'agent causal de la maladie des raies noires du bananier (cf photo n°1), considérée comme la maladie foliaire la plus importante de cette culture. Cette maladie s'est répandue dans presque toutes les zones de production du bananier depuis sa découverte en 1964 dans le sud-est des îles Fidji. Les pertes de rendement qui peuvent être de l'ordre de 100% ont des conséquences socio-économiques très importantes. *M. fijiensis* est un ascomycète haploïde et hétérothallique (cf cycle de vie figure n°1) qui se propage selon trois modes: le transport de matériel végétal infecté (des rejets infectés ou des feuilles malades utilisées dans l'emballage de nourriture ou d'autres produits), la dissémination d'ascospores (produites lors de la reproduction sexuée) et la dissémination de conidies (produites lors de la reproduction asexuée). Alors que les conidies se propagent surtout sur de courtes distances (sur la plante elle-même et sur les plantes voisines), les ascospores viables peuvent être transportées par le vent.

Des études ont été réalisées sur la structuration génétique des populations de *M.fijiensis* à une échelle globale (Carlier *et al.*, 1996) ont montré que le niveau de différenciation génétique du champignon est le plus élevé à l'échelle mondiale et presque nul à l'échelle locale (cf figure n°2). Ces résultats reflètent l'importance relative, en fonction de l'échelle géographique, de la propagation de l'agent pathogène par le matériel végétal infecté et par les ascospores. En effet, les résultats reflètent les deux modes de propagation des champignons phytopathogènes présentés précédemment. La propagation de *M. fijiensis* sur de longues distances (échelle mondiale et continentale) semble être stochastique ce qui a entraîné des effets

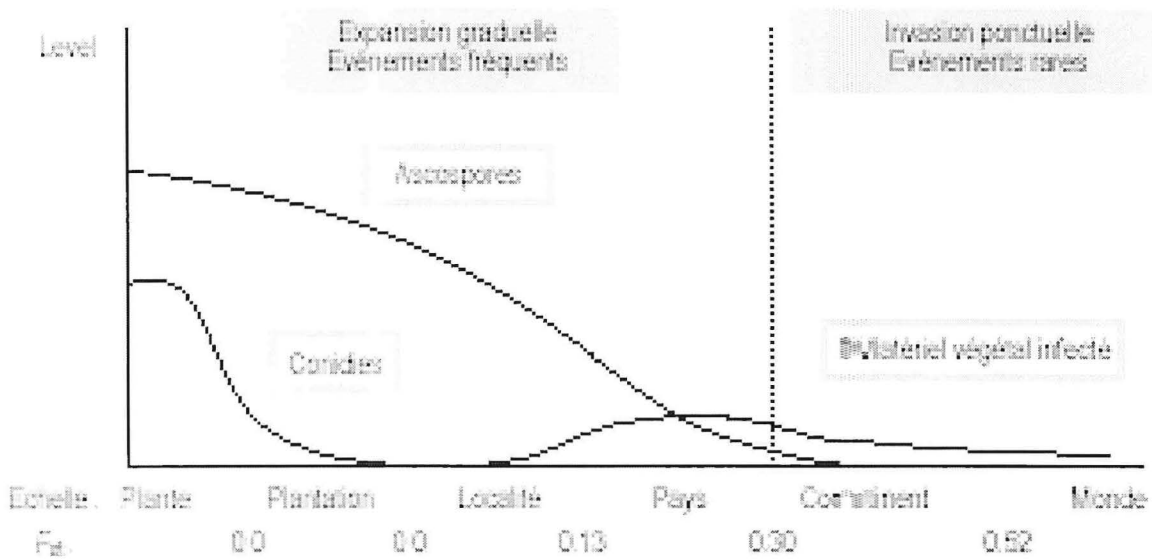


Figure n°2 :

*Importance relative hypothétique des 3 modes de dispersion du champignon *Mycosphaerella fijiensis* en fonction de l'échelle géographique et de la différenciation génétique entre les populations (F_{st}) (d'après Carlier, 2004)*

fondateurs, des flux de gènes limités entre les populations établies et, par conséquent, un niveau élevé de différenciation génétique entre celles-ci. Plus la distance est courte, plus la propagation par les ascospores est importante et graduelle, d'où le niveau moins élevé de différenciation génétique.

Le pathosystème *M.fijiensis*-bananier constitue donc aujourd'hui un bon modèle d'étude pour comprendre l'adaptation des champignons phytopathogènes à une échelle locale. En effet, contrairement à la plupart des champignons phytopathogènes, les populations *M. fijiensis* sont panmictiques (reproduction sexuée majoritaire et dispersion par le vent des ascospores). Dans de nombreux pays dont le Cameroun qui constituera notre zone d'étude, les cultures bananières sont majoritairement vivrières et aucune résistance variétale n'est utilisée à grande échelle à ce jour. De plus, le bananier est en culture continue c'est à dire que des feuilles sont présentes tout au long de l'année (réceptivité constante). Les fluctuations démographiques au sein d'une parcelle sont donc relativement faibles. En outre, la durée d'occupation des sols est relativement longue (durée moyenne d'une culture de 5 ans) ce qui limite les phases d'extinction-recolonisation. Par conséquent, les populations au Cameroun peuvent être considérées à l'équilibre mutation-dérive (Coste, 2003). Pour toutes ces raisons, les différentes méthodes de génétique des populations pourront être appliquées sans trop de biais lors de l'analyse des données.

Les dernières études concernant la structuration des populations de *M. fijiensis* (Coste, 2003) ont permis de suggérer que les flux de gènes au travers de la dispersion des ascospores se font sur des distances relativement courtes (largement inférieures à 100km). Une analyse génétique a été réalisée récemment à l'échelle d'une zone de production au Cameroun le long d'un transect de 300 Km (10 populations distantes de 30 km). L'isolement par la distance s'est avéré faible mais significatif si les tests sont effectués sur une portion restreinte du transect. La même année une méthode directe a permis l'estimation d'une distance de dispersion des ascospores d'environ 50 mètres (Abadie et al., in prep.). Cette précédente étude d'isolement par la distance a néanmoins montré plusieurs limites dans le sens où :

- i) L'échelle géographique considérée de 300 Km était très grande par rapport aux capacités de dispersion physique du champignon.
- ii) La méthode d'analyse génétique utilisée considérait l'existence de dèmes et non des populations continues, ce qui a pu biaiser les estimations.
- iii) La présence de barrières éventuelles à la dispersion des ascospores (forêts, ravins, montagnes...) n'a pas été prise en compte lors de l'échantillonnage ce qui a pu fausser l'estimation des paramètres reliés aux flux de gènes.

L'objectif de ce stage est double. Tout d'abord nous avons cherché à déterminer l'aire de répartition d'une population pathogène selon une approche paysagère. L'effet du paysage sur les flux de gènes sera appréhendé au travers de différentes méthodes de génétique des populations prenant en compte explicitement la localisation spatiale des échantillons (« Landscape genetics »). Dans un second temps nous chercherons à estimer plus précisément les flux de gènes chez *M.fijiensis* à une échelle locale afin de

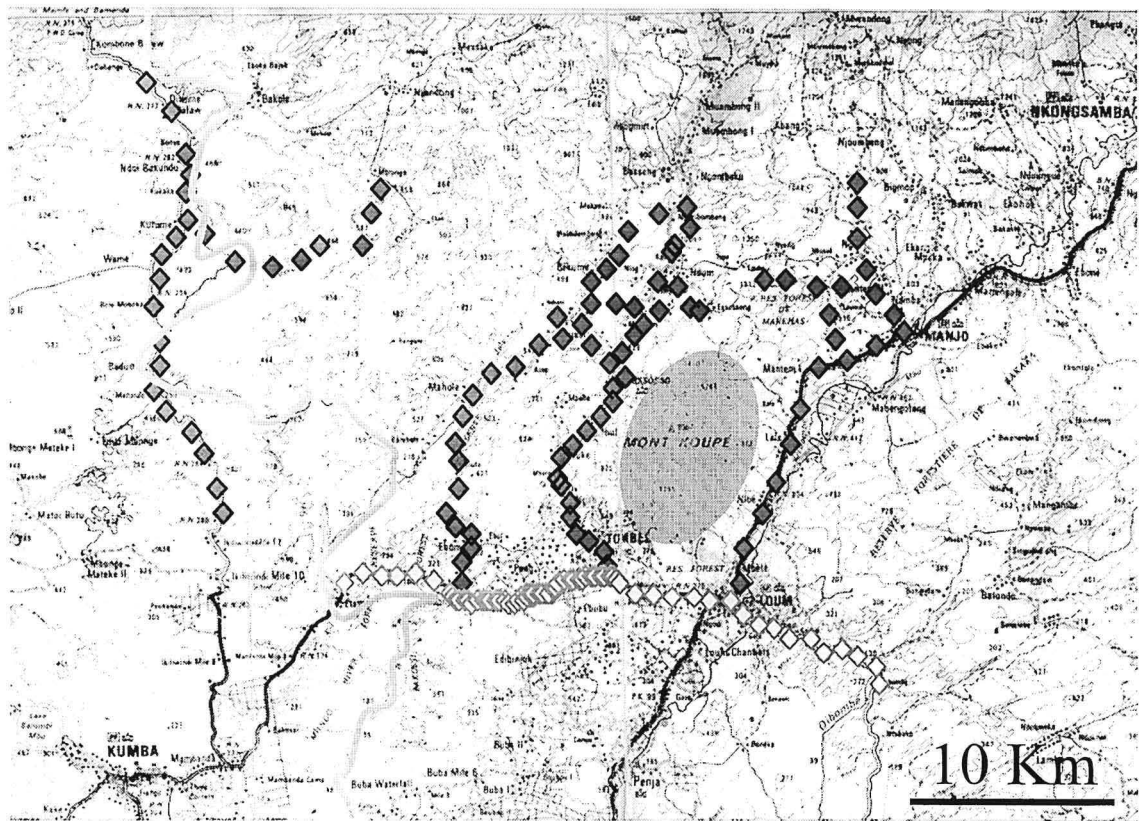


Figure n°3 :

*Echantillonnage d'isolats de *M.fijiensis* réalisé au Cameroun. Les différents sites de prélèvements correspondant à des bananiers infectés sont schématisés par des losanges.*

*En bleu : échantillonnage pour l'analyse paysagère
En orange : transect pour le test d'isolement par la distance*

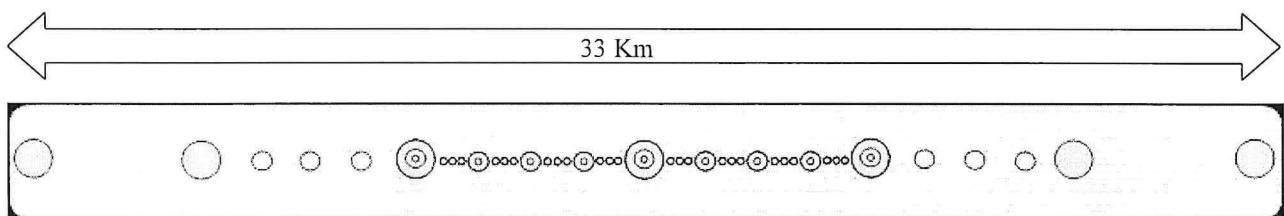


Figure n°4 :

Schématisme du transect « embôité » selon trois classes de distance

Légende :

- Points Z distants d'1 Km (33 points)
- Points Y distants de 250 m (41 points)
- Points X distants de 50 m (32 points)

déterminer la classe de distance la plus pertinente pour la dispersion de ce champignon. Dans ce cadre là, les analyses seront basées sur des méthodes testant l'isolement par la distance en populations continues.

Pour cela un échantillonnage spécifique a été réalisé dans une zone cartographiée au Cameroun et nous avons privilégié une méthode indirecte en analysant les individus à l'aide de marqueurs microsatellites.

Matériel et méthodes

1- Zone d'étude & échantillonnage réalisé

L'échantillonnage réalisé pour répondre aux objectifs de ce stage (figure n°3) a été construit en prenant en compte les limites de l'étude précédente énoncées en introduction.

- Dans l'objectif de préciser la nature et l'importance des barrières aux flux de gènes du champignon dans le paysage, un échantillonnage global a été réalisé sur 105 sites répartis au sein d'une zone cartographiée d'environ 50 x 50 Km. Cette zone étant fragmentée par différentes barrières d'origine humaine (villages, ponts, routes...) ou naturelles (forêt, montagne, ravins, cours d'eau...). Environ six isolats par site ont été isolés puis analysés.
- Puis afin d'estimer les paramètres de dispersion de *M. fijiensis* au sein d'une population continue, 90 prélèvements ont été réalisés le long d'un transect de 33 Km, situé dans une zone de peuplement bananier continu au sein de la zone cartographiée. Trois classes de distance ont été considérées : 1 Km, 250 mètres et 50 mètres (figure n°4). Au moins un couple d'isolat a été isolé et analysé par site. Cet échantillonnage particulier a pour but de déterminer la classe de distance la plus adéquate (parmi celles testées) pour l'estimation de la dispersion des spores du champignon. Les analyses seront basées sur des méthodes de mesure de l'isolement par la distance en populations continues.
- Considérant les analyses en populations continues, nous avons privilégié le nombre de sites échantillonnés (bananiers) au détriment du nombre d'isolats analysés par site. Néanmoins pour tous les sites, au moins deux individus par feuille ont été prélevés afin de pouvoir estimer une variance intra site (dans le cas d'un organisme diploïde, un seul individu aurait suffi). Afin de réduire cette variance, tous les individus d'un site donné ont été isolés à partir d'une même feuille de bananier. Ces individus provenaient de fragments découpés au hasard dans la feuille. Pour les individus isolés à partir du même fragment foliaire, nous avons respecté une distance minimale permettant de garantir qu'ils ne provenaient pas du même périthèce. Cette procédure d'isolement a permis de respecter au mieux les conditions de panmixie caractérisant le champignon.

2 - Isolement des souches et extraction de l'ADN total

Les cultures mycéliennes obtenues à partir des isollements d'ascospores se sont développées sur milieu nutritif pendant un mois à une température de 25°C (figure n°5). Le mycélium a ensuite été prélevé, séché

Préparation du matériel végétal (feuilles de bananier infectées par le champignon)

- Séchage à température ambiante : 4 jours
- Contact avec de l'eau stérile : 30 minutes
- Disposition dans le couvercle d'une boîte de pétri renversée contenant de l'eau gélosée à 3% : 24h
- Le stress hydrique fait exploser les périthèces et les ascospores sont projetées sur le milieu

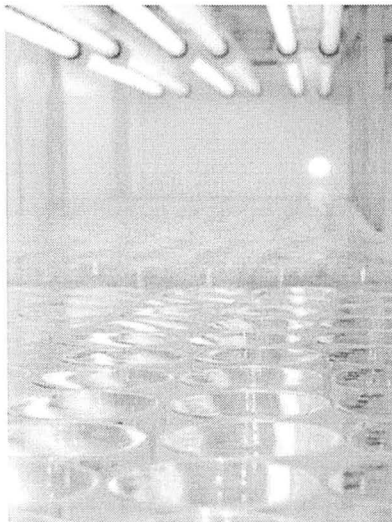
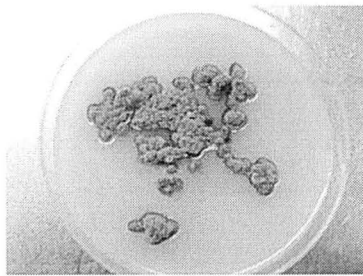


- Possibilité d'isoler une seule ascospore (donc un seul génotype certifié) ?



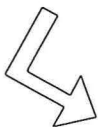
- OUI (échantillon isolé)

→ Le mycélium provenant de la germination d'une ascospore est transféré sur milieu nutritif PDA (Potatoes Dextrose Agar, Bio-Mérieux) solide avec de la pénicilline (100UI/ml) et de la streptomycine (100µg/ml) durant 10 jours à 25°C puis transféré sur milieu V8 300 gélosé (milieu nutritif contenant de la soupe de légumes) durant 10 jours à 25 °C



- NON (échantillon non cloné)

→ Les ascospores sont transférées sur milieu PDA durant 7 à 10 jours à 25°C, puis mis en sporulation sur milieu V8 sp durant 7 à 14 jours à 20° en lumière continue (toutes les autres étapes se passent en 12 h jour / 12h nuit). Par la suite, une suspension de conidies est réalisée sur milieu agar à partir du milieu V8 sp (48 h à 25°C) et à la loupe binoculaire, une seule conidie ayant germé est prélevée puis placée sur PDA durant 10 jours à 25°C. Par la suite, le mycélium provenant de la germination de l'ascospore est transféré sur milieu V8300 et placé 10 jours à 25°C.



- Séchage et broyage des isolats
- Extraction d'ADN, PCR et Genotypage (Séquenceur capillaire)
- Conservation des isolats (Glycérol à 10 % : - 80°C en microtubes)

Figure n°5 :

Protocole simplifié d'isolement des souches de M. fijiensis et résumé des manipulations

à 55°C pendant 24 heures avant d'être broyées pour l'extraction d'ADN. L'extraction de l'ADN a été réalisée en plaques de 96 puits (cf protocole en annexe n°2). Les solutions mère obtenues ont été diluées afin d'obtenir une concentration en ADN d'environ 5ng/μl.

3 - Marqueurs moléculaires et Genotypage

Les échantillons ont été analysés à l'aide de 14 marqueurs microsatellites multiplexés (cf annexe n°3). Le multiplexage permet d'amplifier plusieurs locus en une seule réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) à partir d'une matrice ADN et des paires d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de chaque locus. Initialement, il était prévu de multiplexer 20 marqueurs microsatellites, cependant certaines séquences amplifiées se sont avérées trop proches en termes de nombre de paires de bases causant ainsi des «entraînements» entre ces motifs microsatellites lors de l'électrophorèse en capillaire.

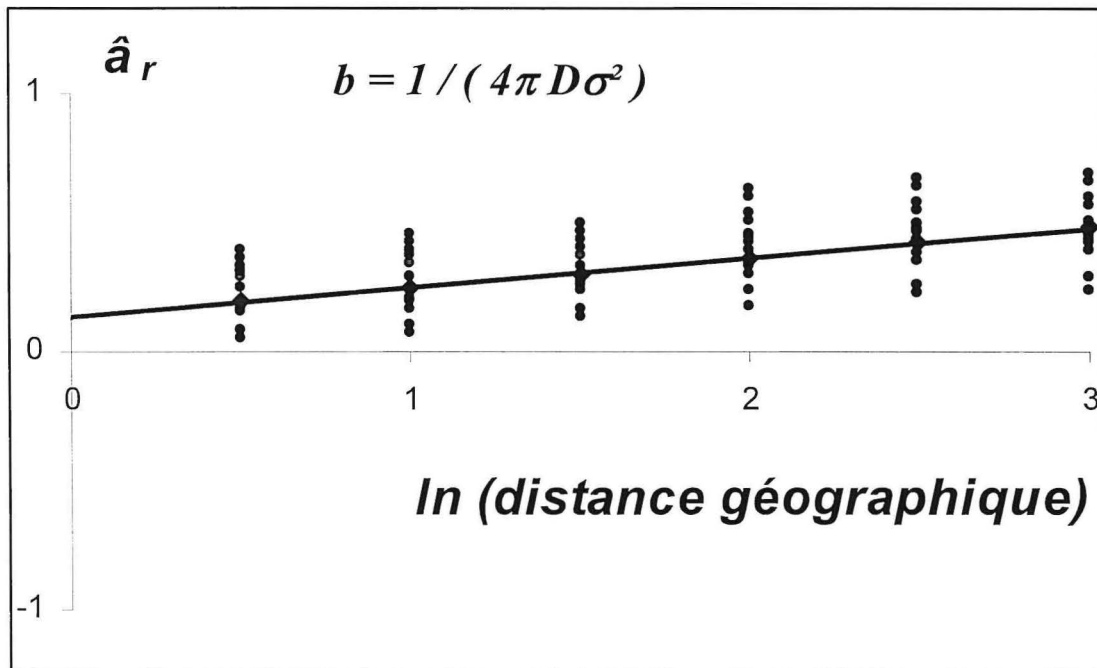
Pour l'analyse moléculaire des isolats durant ce stage, nous avons donc utilisé un premier panel de 14 marqueurs microsatellites. Par la suite, il est prévu de mettre au point et de tester un second panel comprenant les autres marqueurs microsatellites afin de compléter l'analyse moléculaire.

Le polymorphisme des fragments amplifiés a été détecté à l'aide d'un séquenceur capillaire «MEGABACE 1000 AMERSHAM» situé au Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP). Pour chaque locus, une des amorces présentait en 5' un marquage fluorescent portant l'un des trois fluorochromes (Hex, Ned, Fam). Ces fluorochromes sont détectés par deux lasers émettant des longueurs d'ondes de 480 nm (Bleu-Argon) et 532 nm (Vert). Les produits PCR fluorescents migrent de la cathode vers l'anode. Les électrophoregrammes obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel GENETIC PROFILER (*version 1.05*). Les allèles ont été attribués selon la taille des fragments obtenus.

4 - L'analyse des données

a - Analyses classiques de génétique des populations

- Le nombre moyen d'allèles par locus, la fréquence allélique par locus et l'estimation de l'indice de diversité génétique non biaisé de Nei (Nei, 1978a) ont été calculés à l'aide du programme F-STAT (*version 2.9.3*, Goudet, 2002).
- Les déséquilibres de liaison (associations préférentielles) entre paires de locus polymorphes sont testés par un test exact de Fisher implémenté sur ce même logiciel. En raison du grand nombre de tests réalisés, une correction par ajustement séquentiel de Bonferroni (Rice, 1989) est effectuée pour diminuer les erreurs de type 1 (rejet de H₀ à tort).
- Le nombre de génotypes différents et la diversité génotypique, qui se définit comme la probabilité que deux individus pris au hasard aient un génotype différent, sont calculés par le logiciel MULTILOCUS



$$a_r = (Q_w - Q_r) / (1 - Q_w)$$

Probabilité d'identité de deux paires de gènes :

Q_w = au sein d'un individu diploïde (même site)

Q_r = pris dans deux individus (2 sites) séparés par une certaine distance géographique r .

Figure n°6:

Modèle génétique pour l'isolement par la distance en population continue : Régression du paramètre a_r par le logarithme de la distance

| Isolat | Site | Lat en ° | Long en ° | Fh12b | F62 | N244 | F75 | Fe05b | N203 | N194 | Ff01 | Fb10 |
|--------|------|----------|-----------|-------|-----|------|-----|-------|------|------|------|------|
| X03-01 | X03 | 4,7248 | 9,6380 | 145 | 183 | 216 | 122 | 200 | 231 | 292 | 135 | 210 |
| X03-02 | X03 | 4,7248 | 9,6380 | 145 | 183 | 223 | 122 | 197 | 228 | 292 | 153 | 210 |



| Isolat | Site | Lat en ° | Long en ° | Fh12b | F62 | N244 | F75 | Fe05b | N203 | N194 | Ff01 | Fb10 |
|--------|------|----------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | X03 | 4,7248 | 9,6380 | 145 145 | 183 183 | 216 223 | 122 122 | 200 197 | 231 228 | 292 292 | 135 153 | 210 210 |

Figure n°7:

Exemple de la transformation des données haploïdes en données diploïdes pour l'utilisation du modèle d'isolement par la distance en population continue

(*version 1.3*, Agapow et Burt, 2001). La diversité génotypique varie entre 0 si tous les individus ont le même génotype multilocus et 1 si chaque individu porte un génotype différent.

- Le déséquilibre de liaison multilocus se mesure traditionnellement par l'indice d'association (IA) (Maynard Smith et al., 1993). Il est cependant nécessaire de corriger cet indice pour le nombre de locus utilisés. La statistique résultante, \bar{r}_d , a été estimée à l'aide du logiciel MULTILOCUS. L'idée de base de ce test est que le fait que deux individus soient liés à un locus donné peut augmenter leur probabilité d'être liés à un autre locus.

b - Estimation de paramètres démographiques sous isolement par la distance en populations continues : Robustesse d'une méthode basée sur les F_{ST}

- La méthode de Rousset utilisée, (Rousset, 2000) repose sur une régression du paramètre a_r , calculé entre paires d'individus (analogue à $F_{ST}/1-F_{ST}$) et le logarithme de la distance géographique. La pente b de cette relation est fonction de $D\sigma^2$ (D étant la densité d'individus sur le réseau et σ^2 le moment d'ordre 2 de la distribution de la distance de dispersion parent-descendant (figure n° 6)).

Ce modèle semble être assez performant pour plusieurs raisons : (i) le modèle démographique sous jacent fait peu d'hypothèse quant aux distributions de dispersion et il est particulièrement robuste pour des distributions leptokurtiques ii) un autre intérêt majeur de cette méthode est que l'analyse de la différenciation est faite à une petite échelle géographique (échelle locale). Or les hypothèses de stabilité démographique sont moins critiques lorsqu'on considère des petites surfaces. Plus précisément, les études à des échelles géographiques locales donnent de meilleures estimations car l'hétérogénéité des paramètres démographiques (tels que la densité ou la dispersion) est réduite et leur influence sur l'hétérogénéité des processus génétiques tels que la dérive le sont aussi.

- L'isolement par la distance est testé par le logiciel GENEPOP (*version 3.03* ; Raymond & Rousset, 1995) selon la méthode de Rousset (2000). L'indépendance entre la matrice génétique et la matrice des distances géographiques est testée par le test de permutations de Mantel (100 000 itérations). Si un isolement par la distance est détecté, il est possible d'estimer les flux de gènes grâce à la pente de la droite de régression.

- La méthode en population continue intégrée dans le logiciel GENEPOP n'a pas été conçue pour traiter des données haploïdes. En effet, le logiciel ne peut pas calculer une variance intra individu puisque chaque allèle ne s'y trouve qu'en une seule copie. Afin de palier à ce problème, nous avons créé un individu diploïde à partir de deux individus haploïdes échantillonnés sur la même feuille de bananier (cf figure n° 7).

c - Structuration des populations : Approches de génétique du paysage

La structure génétique de la population de champignon phytopathogène échantillonnée a été analysée à l'aide de deux méthodes d'assignation génétique reposant sur des modèles Bayésiens. Nous

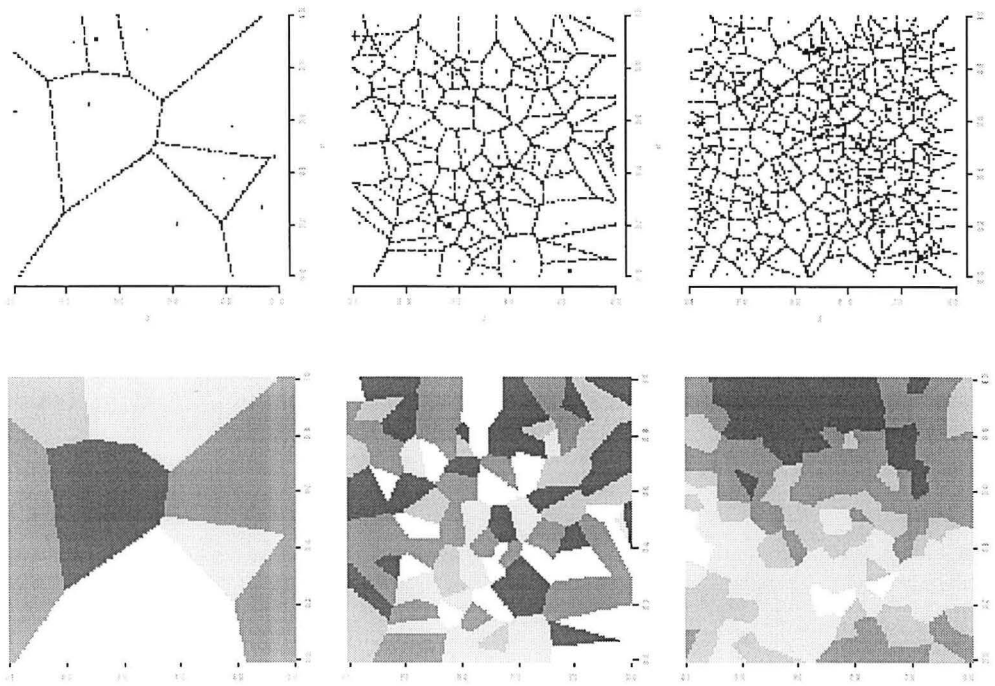


Figure 8 :

Modélisation de la structure spatiale par une partition aléatoire (logiciel GENELAND)

Illustration du modèle statistique pour le partitionnement de l'espace géographique. Chaque population est supposée occuper un territoire. Les frontières de ce territoire sont des inconnues du problème. Nous supposons que chaque territoire peut être décomposé en une réunion de polygones convexes engendrés par un semis Poissoniens (points répartis au hasard dans le domaine). La Figure montre trois simulations de tels découpages de l'espace selon le modèle de partitionnement a priori.

Ici on suppose que l'espace est occupé par quatre populations distinctes. Les graphes du haut montrent la répartition des points poissonniens et les polygones de Voronoï qu'ils engendrent, les graphes du bas les mêmes polygones après affectation à une population.

avons utilisé le logiciel STRUCTURE (*version 2.01*, Pritchard et al., 2000) qui est le logiciel de référence pour les études d'assignation génétique. Ce logiciel est intéressant car il présente une grande variété d'options de modélisation. Nous avons également utilisé le logiciel GENELAND (*version 0.3*) développé récemment par Guillot et al. (2005). L'avantage de cette méthode est qu'elle prend explicitement en compte la localisation spatiale des individus. L'idée centrale est qu'en général, les populations sont spatialement organisées ou structurées, au sens où deux individus géographiquement proches ont une probabilité plus grande d'appartenir à la même population que deux individus géographiquement éloignés. Les assignations génétiques devraient donc être plus fiables et la corrélation des discontinuités génétiques avec des barrières environnementales envisageable.

Le principe général d'un modèle de type Bayésien est de traiter les données et les paramètres en tant que variables aléatoires (Beaumont & Rannala, 2004). Ces deux variables aléatoires suivent alors une distribution spécifiée par un modèle probabilistique. Cette distribution est déterminée par le produit de la vraisemblance des données et de la distribution des paramètres *a priori*.

C'est à ce niveau là qu'il existe une différence entre les deux logiciels utilisés. En effet, dans STRUCTURE (comme dans tous les méthodes d'assignation non spatialisées), la distribution *a priori* est uniforme sur tout le domaine d'étude. Les coordonnées géographiques sont uniquement utilisés pour la représentation *a posteriori* des unités génétiques détectés. Dans le logiciel GENELAND, la distribution *a priori* est modélisée par une partition aléatoire du territoire (grâce à des polygones de Voronoi engendrés par un processus de Poisson sur le domaine d'étude, cf figure n°8). Ce type de modèle est caractérisé de «pleinement probabilistique» puisque la valeur des paramètres est elle-même traitée comme une variable aléatoire. Les valeurs des paramètres sont inférées par des itérations de Monte Carlo en chaînes de Markov (MCMC).

- Dans le logiciel STRUCTURE, le nombre de populations K est un paramètre fixe du modèle. La procédure consiste à exploiter de nombreuses itérations de Monte Carlo par chaînes de Markov avec des valeurs croissantes de K afin de déterminer laquelle est la plus vraisemblable. Nous avons fait varier K de 1 à 8. Nous avons utilisé un modèle d'admixture c'est-à-dire que nous autorisons l'idée que le génome d'un individu peut avoir dériver de plusieurs populations sources. L'information *a priori* intègre le fait que les fréquences alléliques au sein des populations devraient être corrélées. Nous avons réalisé 30 000 itérations de «Burning» (chauffe), puis 1200 000 itérations de MCMC. Nous avons réalisé trois répétitions afin de pouvoir vérifier la bonne convergence des chaînes de Markov. Pour chaque valeur de K testée il est ensuite possible de déterminer les probabilités d'appartenance de chaque individu aux populations trouvées.

- Le logiciel GENELAND se présente sous la forme d'un module à installer dans le logiciel de statistique R (Ihaka et al., 1996). L'avantage de cet algorithme est qu'il permet dans un premier temps de déterminer le nombre de populations le plus vraisemblable (K variant de 1 à 30) en une seule étape de simulation (même chaîne de Markov). Dans un second temps, l'estimation de tous les autres paramètres se fait pour une valeur de K fixée par l'utilisateur (correspondant à la plus vraisemblable). Toutes les chaînes

| Nombre d'individus total | Nombre de locus | Nom |
|--------------------------|-----------------|---------------|
| 2000 | 40 | F1-204 |
| 2000 | 20 | F1-202 |
| 2000 | 10 | F1-201 |
| 500 | 40 | F1-54 |
| 500 | 20 | F1-52 |
| 500 | 10 | F1-51 |
| 100 | 40 | F1-14 |
| 100 | 20 | F1-12 |
| 100 | 10 | F1-11 |

Tableau n°1 :

Dispositif expérimental pour la création des populations simulées

de Markov lancées comprenaient 500 000 itérations. Nous avons également lancé trois chaînes de Markov en gardant les paramètres du modèle fixés pour tester leur convergence.

Le nombre maximum de «noyaux» engendrant la structuration spatiale a été fixé à 200 sur tout le territoire. Les fréquences alléliques dans chaque population sont modélisées grâce à une méthode qui consiste à faire référence à une population ancestrale. Les fréquences alléliques dans cette population ancestrale sont supposées suivre des lois de Dirichlet indépendantes d'une population à l'autre, et d'un locus à l'autre. Les populations présentes sont supposées avoir dériver de la population ancestrale selon un vecteur de dérives (d_1, \dots, d_K).

Afin de modéliser les génotypes, l'idée consiste à supposer qu'à l'intérieur de chaque population, les individus sont à l'équilibre d'Hardy-Weinberg sans déséquilibre de liaison. Autrement dit, conditionnellement à la partition de l'espace et aux fréquences alléliques, il y a indépendance de toutes les variables observées. Les individus d'une même sous population sont "conditionnellement indépendants" ; en termes moins techniques, une fois les paramètres estimés, il ne reste plus de dépendance résiduelle et les frontières entre populations expliquent totalement l'écart à l'indépendance observée. La simulation est réalisée par un algorithme à sauts réversibles.

Les résultats issus de ce logiciel présentent en plus des probabilités d'appartenance aux différentes populations (sous la même forme que celles fournies par STRUCTURE), des graphes représentant la probabilité d'appartenance *a posteriori* de chaque pixel du domaine aux différentes populations détectées.

d – Simulations

Parallèlement à l'analyse des isolats échantillonnés au Cameroun, nous avons réalisé d'autres analyses à partir de données simulées afin de comparer la capacité de deux logiciels à assigner correctement des individus à des populations ancestrales selon la puissance de l'échantillonnage. Les jeux de données ont été obtenus selon le dispositif présenté par le tableau n°1.

Dans un premier temps, nous avons simulé 2000 coordonnées spatialement organisées autour de deux «noyaux» (pour deux populations de tailles équivalentes) à l'aide du logiciel GENELAND. Ensuite, les génotypes multilocus de chaque individu pour les deux populations ont été simulés à l'aide du logiciel EASY-POP (version 1.8 ; Balloux, 2001) avec un maximum de 5 allèles par locus pour 40 marqueurs. Nous avons fixé un taux de migration de 0,001 entre populations pour obtenir une différenciation génétique (F_{ST}) avoisinant 0,05 (F_{ST} (réel) de 0,0428). Le jeu de données complet a été obtenu en associant coordonnée et génotype pour chaque individu. Des tirages aléatoires dans ce jeu de donnée (comprenant 2000 individus) sont ensuite réalisés pour former les sous échantillons de 500 et 100 individus soit respectivement environ 250 et 50 individus par population. Pour ces trois puissances d'échantillonnage on restreint de même la puissance de génotypage des 40 locus initiaux à 20 et 10 locus. Chacune de ces 9 modalités a été analysée par le logiciel STRUCTURE et par le logiciel GENELAND selon le protocole décrit dans la section précédente. Nous avons ensuite testé la capacité de chaque logiciel à discriminer deux populations et à assigner correctement les individus simulés à ces deux populations. Pour les mesures d'assignation nous avons fixé deux seuils permettant de mesurer les probabilités d'appartenance à chaque population ($p=0,90$ et $0,99$; stringence respectivement moyenne ou élevée).

| Locus | Fh12b | Ff01 | Fe05b | N137 | N203 | N244 | N194 | Fd10b | Fb10 | Fe09 | F62 | Fc12b | F19 | F75 | μ |
|----------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|--------------|
| H de Nei | 0,781 | 0,67 | 0,605 | 0,523 | 0,515 | 0,469 | 0,455 | 0,407 | 0,401 | 0,399 | 0,175 | 0,085 | 0,06 | 0,003 | 0,396 |
| Nbre allèles / locus | 22 | 10 | 3 | 9 | 3 | 7 | 3 | 4 | 6 | 5 | 4 | 4 | 5 | 2 | 6,21 |

Tableau n°2 : Diversité génétique (Nei, 1978) et nombre d'allèles par locus de l'échantillon de M.fijiensis étudié

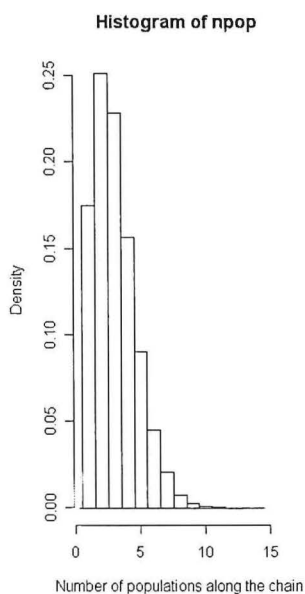


Figure 9 : Diagramme du nombre de population(s) le plus vraisemblable obtenu par le logiciel GENELAND pour l'échantillon de l'analyse paysagère

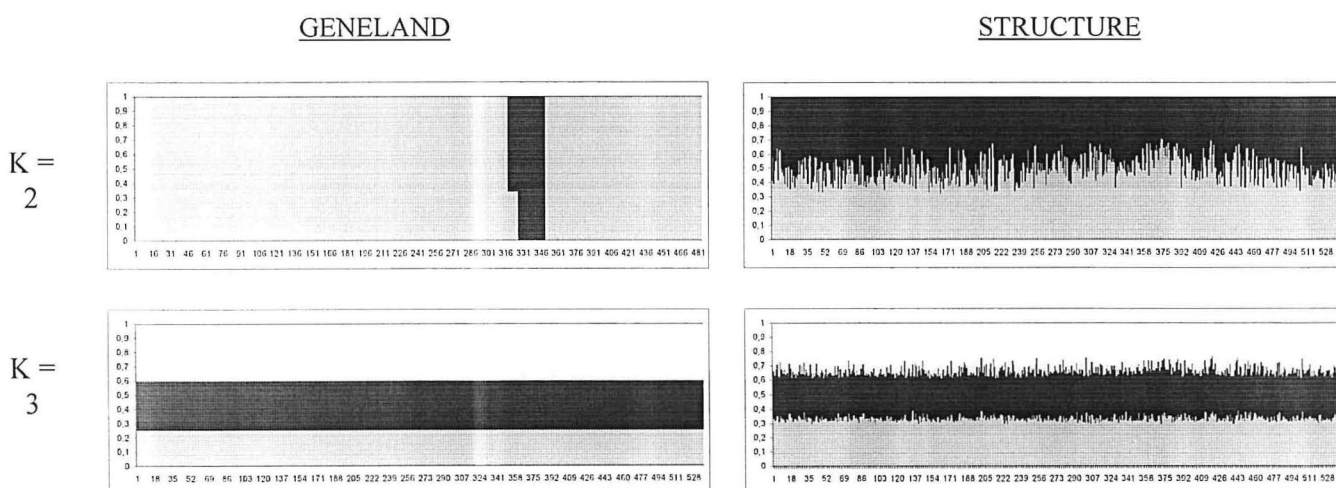


Figure 10 : Probabilités d'appartenance (en ordonné) des individus (en abscisse) issus de l'échantillonnage paysagé à K populations ancestrales selon le logiciel utilisé. Le génome de chaque individu est représenté par une barre partitionnée en K couleurs (une par population ancestrale).

Nous avons également utilisé le logiciel STRUCTURE sur des données recueillies en 2001 au Cameroun (Coste 2003). Nous avons défini un sous échantillon de 100 individus collectés en trois localités situées dans la partie ouest de notre zone d'étude (cf annexe n°4). Ces 100 individus analysés se répartissent en deux populations ($F_{ST} = 0,14$). Les tentatives d'assignation ont été réalisées selon deux modalités correspondants à deux panels de marqueurs microsatellites : le premier renferme les 11 locus que nous avons utilisés lors de l'analyse pour ce stage et le second ces mêmes 11 locus ainsi que 4 locus supplémentaires (locus qui devaient à l'origine être utilisés durant mon stage et qui sont prévus de figurer dans le panel n°2).

Résultats

1 – Diversité génétique, génotypique et déséquilibre de liaison

- Le nombre d'allèles observés par locus varie entre 2 et 22 pour une moyenne de 6,2 (Tableau n°2). Sur les 14 locus, 3 sont quasi monomorphes (F75, Fc12b et F19). Les fréquences alléliques pour chaque locus sont présentées dans l'annexe n°1.
- L'indice de diversité génétique non biaisé de Nei (NEI, 1978b) varie entre 0,003 pour le locus F75 et 0,781 pour le locus Fh12b. La diversité génétique moyenne est de 0,396 (Tableau n°2).
- La diversité génotypique observée est très proche de 1 (0,999).
- Aucune paire de locus n'est significativement liée (annexe n°1). La statistique de déséquilibre de liaison multilocus confirme ce résultat ($\bar{r}_d = -0,044$). Ceci montre bien l'importance de la recombinaison lors de la reproduction sexuée chez *M.fijiensis* et la présence de populations panmictiques comme montré dans une étude antérieure (Rivas&Platero, 2003).

2 - Structuration génétique de la population échantillonnée

- Pour les deux logiciels utilisés, la vraisemblance maximum des données est obtenue pour des nombres de populations (K) égaux à deux et trois (figure n°9).
- La capacité d'assignation des individus à ces populations est donnée pour $K=2$ et $K=3$ (figure n°10)
- Dans aucun des cas testés, le logiciel STRUCTURE ne parvient à assigner préférentiellement les individus à une population. Le graphe montre donc des probabilités d'appartenance aux populations équivalentes pour tous les individus. On retrouve également ce résultat avec GENELAND pour $K=3$.
- Cependant, pour $K=2$, le logiciel GENELAND distingue nettement deux populations de 452 et de 32 individus. Les probabilités d'appartenance des individus à la population 1 sont toutes égales à 1. Les probabilités d'appartenance des individus à la population 2 sont elles aussi toutes égales à 1 à l'exception

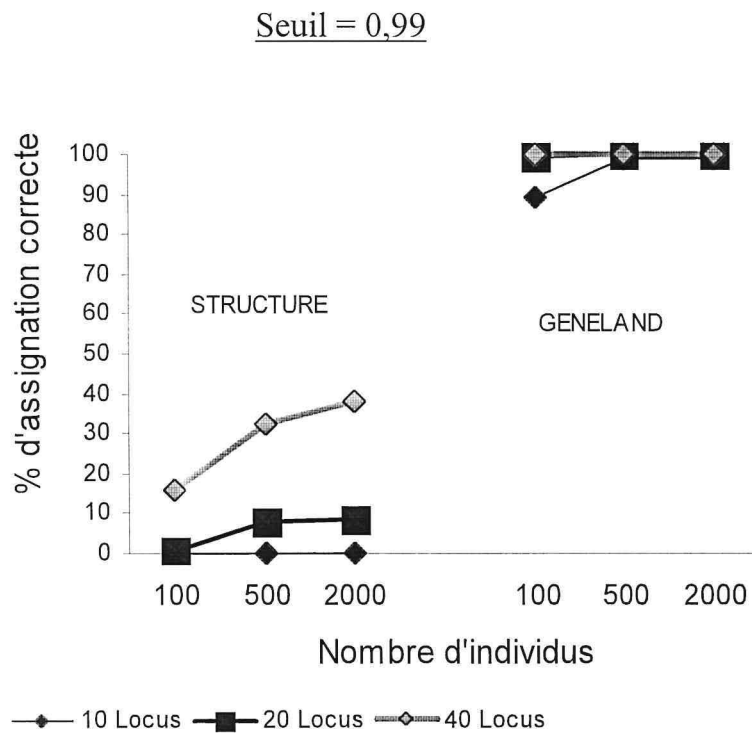
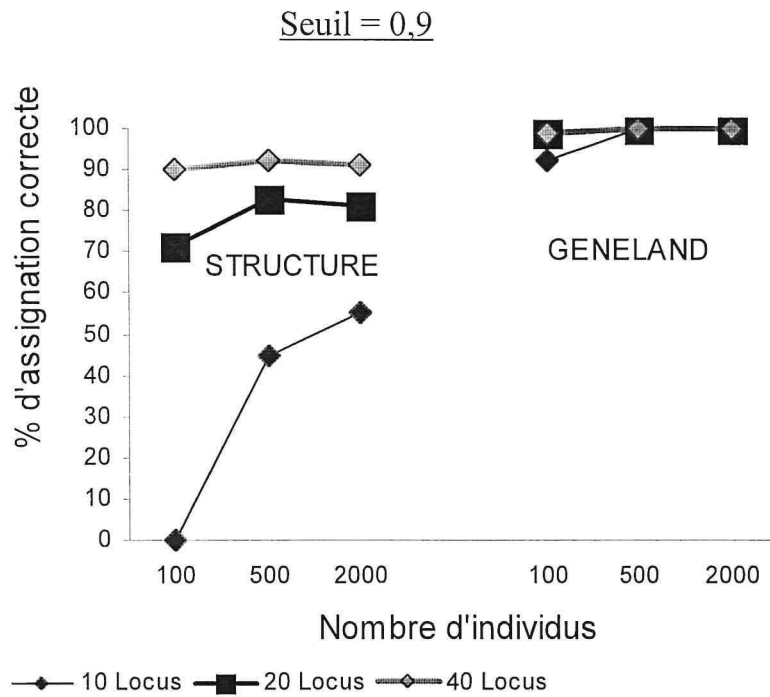


Figure 12 : Comparaison des capacités d'assignation des logiciels STRUCTURE et GENELAND avec des populations simulées en fonction de la taille des populations, du nombre de locus et du seuil fixé pour les assignations.

de 3 sites (zone jaune sur la figure n°11) ou les individus sont assignés avec une probabilité de 0,7 à la population 2 et de 0,3 à la population 1 (admixture).

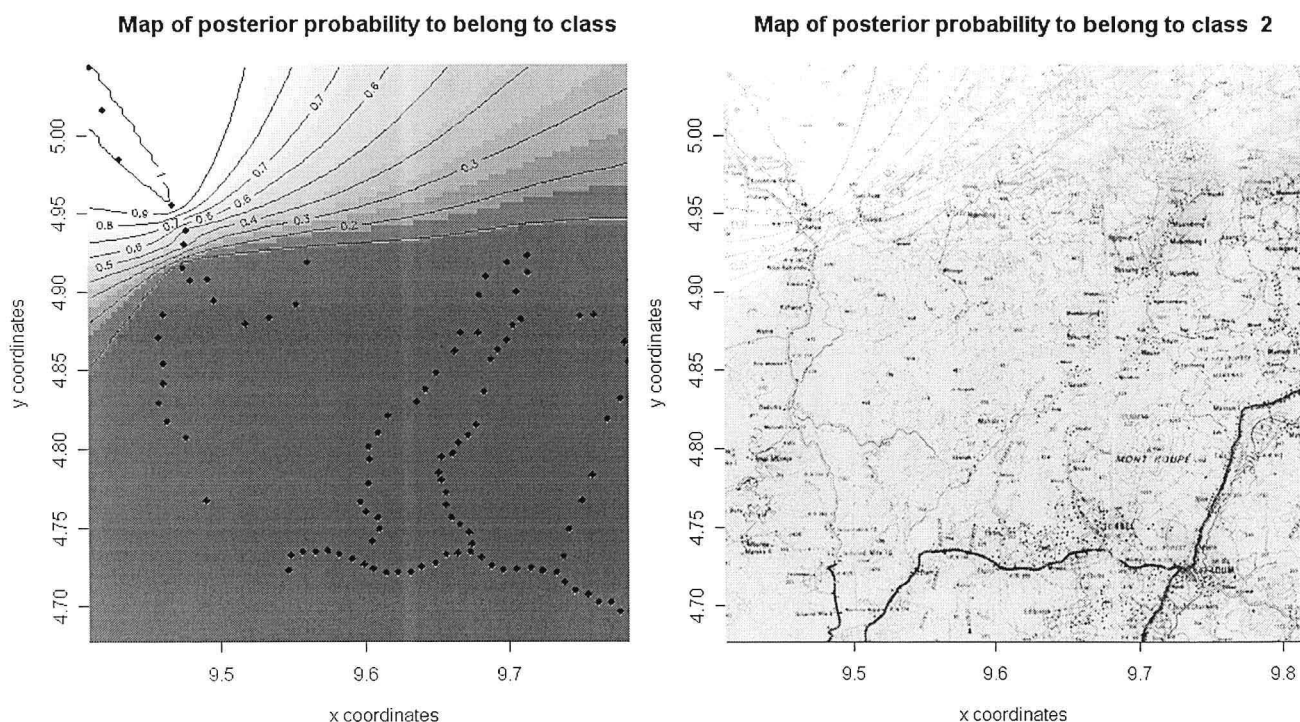


Figure n° 11 : probabilité *a posteriori* de chaque pixel du domaine d'appartenir à la première population (forte probabilité en rouge et faible probabilité en blanc). Le fond de carte IGN correspondant a été superposé pour réaliser la figure de droite.

- La différenciation génétique moyenne entre les deux populations détectées est de 0,111
- La confrontation de ces résultats avec la topologie de la zone d'échantillonnage (figure 11) ne nous a pas permis de mettre en évidence de barrières physiques pouvant expliquer cette discontinuité génétique. La zone de frontière entre les deux sous-populations différenciées ne présente aucun relief particulier, ni fleuve ou forêt.

- Les résultats des données simulées (figure n°12) montrent qu'avec le logiciel GENELAND, le pourcentage d'assignation correcte est proche de 100 % quelque soit le nombre d'individus, de locus et le seuil d'assignation considéré. Les mêmes résultats obtenus avec le logiciel STRUCTURE montrent que pour un jeu de donnée de 10 locus et un seuil de 0,9, le pourcentage d'assignation correcte ne dépasse 50 % que pour la population de taille maximale. Lorsque le seuil d'assignation considéré est fort (0,99), aucune modalité ne permet d'assigner correctement plus de 50 % des individus. La prise en compte d'autres modalités aurait pu être intéressante pour enrichir cette comparaison (par exemple niveau de différenciation variable) mais la durée des simulations prenant jusqu'à une semaine par logiciel pour les plus denses (2000 individus et 40 locus) a dû freiner cette entreprise.

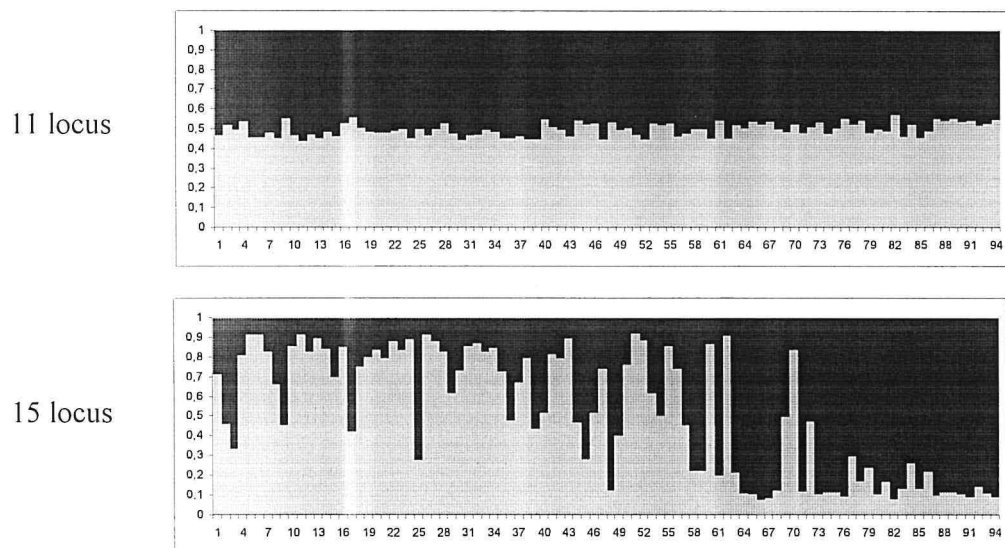
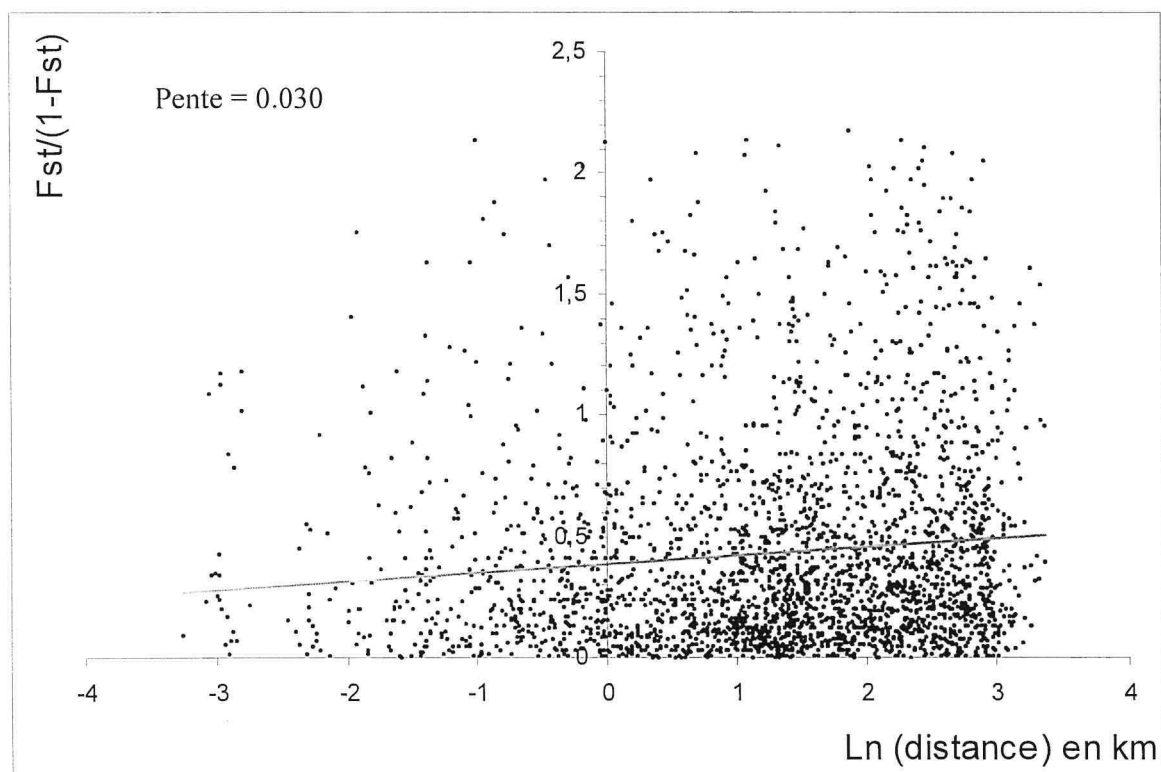


Figure 13 : Probabilités d'appartenance (en ordonné) des individus échantillonnés en 2001 (en abscisse) à 2 populations ancestrales (2 couleurs) selon le nombre de locus considéré



*Figure 14 : Isolement par la distance chez *M. fijiensis* au sein d'une population continue. Toutes les classes de distances du transect ($X=50m$, $Y=250m$ et $Z=1Km$) ont été prises en compte*

• Nous avons également mis en perspective nos résultats par un test réalisé avec les isolats échantillonnés en 2001 au Cameroun de part et d'autre de la discontinuité génétique (figure n° 13). Dans un premier temps, cette analyse avec le logiciel STRUCTURE confirme les résultats de notre analyse paysagère menée avec le logiciel GENELAND, puisque avec 15 locus on peut mettre en évidence un patron d'assignation différent entre individus échantillonnés de part et d'autre de la discontinuité. Néanmoins si on considère seulement les 11 locus correspondant à ceux de notre analyse (qui sont les locus les plus polymorphes de notre étude) les différences s'estompent complètement. Les 4 locus supplémentaires qui ont été pris en compte dans l'analyse des échantillons de 2001 semblent cruciaux pour une assignation correcte des génotypes multilocus. Ces locus sont en effet polymorphes et montrent même des allèles exclusifs aux deux populations. Cette petite analyse montre que le manque de puissance statistique constatée pour notre étude paysagère pourrait être aisément dépassé par l'analyse additionnelle d'un nouveau panel comportant ces locus informatifs.

3 – L'isolement par la distance

• L'isolement par la distance a été testé sur les données provenant du transect selon toutes les combinaisons possibles pour les 3 classes de distances (X : 50 m, Y : 250 m et Z : 1 km ; Tableau n°3).

| Classes de distance : | Test de Mantel de l'IBD Pr(correlation > observed correlation) = | Fitting Fst to a + b ln (distance) |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| X, Y, Z | 0.01100 (under null hypothesis) | a = 0,1721625, b = 0,03077192 |
| X | 0.62700 (under null hypothesis) | a = 0.1846991, b = -0.00395701 |
| Y | 0.24970 (under null hypothesis) | a = 0.1260045, b = 0.00991658 |
| Z | 0.24050 (under null hypothesis) | a = 0.3110969, b = 0.00664856 |
| X&Y | 0.38130 (under null hypothesis) | a = 0.1675787, b = 0.00226216 |
| X&Z | 0.00580 (under null hypothesis) | a = 0.2082223, b = 0.03170224 |
| Y&Z | 0.00268 (under null hypothesis) | a = 0.1432338, b = 0.03883385 |

Tableau n° 3 : Test de Mantel et paramètres de la droite de régression obtenus pour les différents tests d'isolement par la distance

Le test de Mantel est significatif lorsque toutes les données (X,Y,Z) sont prises en compte (P=0,011, b=0,030 ; figure n°18). Ce test est également significatif lorsque les classes de distance extrêmes (X&Z) et supérieures (Y&Z) sont prises en considération (tableau n°3).

Inversement le test n'est pas significatif pour les 3 classes de distance prises séparément ainsi que pour la paire de classe de distances les plus faibles (X&Y). La pente de la droite de régression est même négative dans le cas où la plus petite classe de distance (X) a été testée séparément (tableau n°3).

• La figure n° 14 montre la régression du paramètre a_r par le logarithme de la distance géographique

Ces résultats nous permettent de dire que :

i) La classe de distance de 50 mètres n'est pas cohérente avec la dispersion des spores du champignon puisqu'il s'agit de la seule classe de distance pour laquelle la pente de la régression est négative (cela signifierait même si cela n'est pas biologiquement interprétable que la proximité génétique augmenterait avec la distance géographique). De plus, la catégorie pour laquelle l'isolement par la distance est le plus significatif, et la pente est la plus forte, est le couple de données Y&Z (les classes de distances 250 mètres et 1km). L'isolement sur ce couple de classes de distance y est statistiquement plus important que sur toutes les classes de distances alors que la puissance statistique y est probablement plus faible (moins d'individus et donc moins de paires de classes de distance analysées) ce qui veut donc dire que la classe de distance de 50 m « brouille » une partie du signal dans l'analyse.

ii) La non significativité des tests réalisés sur les classes de distance Y et Z séparées est probablement due à un manque de puissance statistique du fait d'un nombre trop faible de sites échantillonnés.

Discussion

Récemment, l'avènement de nouvelles méthodes statistiques a permis d'étudier l'influence du paysage avec différentes approches de génétique des populations (Manel *et al.*, 2003). Progressivement, des études visant à comprendre la structuration génétique des populations à une échelle de plus en plus fine ont donc de ce fait pu être envisagées (Coulon *et al.*, 2005). Cependant, dans le cas de l'étude de la structuration génétique d'une population de champignons phytopathogènes, l'échelle géographique la plus pertinente à considérer peut varier énormément selon l'espèce considérée en fonction de son mode de reproduction et de ses paramètres de dispersion. De ce fait, il est difficile mais important de pouvoir définir une population de pathogène puisque son aire de répartition va conditionner l'échelle à laquelle on pourra observer son adaptation.

Les populations de *Mycosphaerella fijiensis*, agent causal de la maladie des raies noires du bananier ont jusqu'à présent été étudiées à une échelle mondiale (Carlier *et al.*, 1996), continentale (Rivas *et al.*, 2004) et nationale (Coste, 2003). Les résultats de ces études ont dans un premier temps montré que le champignon se propageait par des événements rares et stochastiques de dispersion à grande distance et de façon progressive sur des distances plus courtes par les voies naturelles de dissémination des ascospores. Dans un second temps, il a été démontré que la propagation graduelle de la maladie se réalisait à une échelle inférieure à 30 km. La mise en place de stratégies de lutte contre ce champignon n'est donc envisageable qu'à une échelle locale d'où l'intérêt de l'étude réalisée durant ce stage.

Les résultats obtenus durant ce stage ont montré que l'échelle correspondant à une zone de production agricole est pertinente pour appréhender plus précisément les flux géniques et les processus d'adaptation locale chez *M. fijiensis*. Plus précisément, les analyses nous ont permis de : i) détecter deux populations génétiquement distinctes et de bien les cerner géographiquement et ii) détecter un patron d'isolement par la distance résultant de la dispersion de ce pathogène à une échelle de l'ordre du kilomètre.

Lors de la détermination de l'aire de répartition des populations de champignon phytopathogène au sein d'un milieu fragmenté, nous avons observé des résultats contrastés selon le type de méthode Bayésienne utilisée (figure n°10). Les résultats générés par le logiciel STRUCTURE ne suggèrent la présence que d'une seule entité génétique alors que GENELAND en détecte deux. Cette variation dans la capacité d'assignation entre ces deux logiciels a déjà été mise en évidence dans une étude récente (Coulon *et al.*, 2005).

Afin de mieux comprendre cette différence, nous avons étudié la capacité d'assignation de ces logiciels sur des populations simulées. Les résultats obtenus confirment bien la différence observée dans l'analyse des données échantillonnées (figure n°12). La prise en compte de la localisation spatiale des individus *a priori* par le logiciel GENELAND améliore leur assignation génétique. En effet, l'algorithme de ce logiciel est extrêmement robuste pour l'assignation des individus aux populations simulées puisque l'efficacité de l'assignation est très bonne dans toutes les modalités testées (locus, nombre d'individus et seuil de réussite de l'assignation). Au contraire, l'efficacité de l'algorithme du logiciel STRUCTURE varie fortement entre les analyses et dépend donc de la puissance statistique autorisée par le jeu de données. Pour le logiciel STRUCTURE, les résultats montrent d'après les modalités analysées (nombre de locus et nombre d'individus croissant) que la résolution d'un jeu de données est meilleure lorsqu'on augmente le nombre de locus plutôt que le nombre d'individus échantillonnés.

De façon complémentaire, nous avons voulu appréhender la puissance statistique de notre jeu de données en la comparant à celle issue de données du précédent échantillonnage au Cameroun (2001). Les résultats vont dans le sens d'un manque de puissance du jeu de données analysé durant ce stage dû à l'absence de certains locus (figure n°13). Dans un premier temps, cela nous permet de confirmer la baisse drastique de puissance d'assignation lors d'un déficit en locus informatifs. De plus, cela nous encourage donc à rester prudent quand à l'homogénéité observée au sein de la population 1. En effet, en considérant les barrières potentielles aux flux de tant environnementales (montagne : Mont Koupé-2800 m, rivières, forêts denses) qu'anthropiques (villages, ravins, routes...), on s'attend à ce que certains groupes d'individus puissent se différencier en entités génétiquement différentes.

Dans tous les cas la détection par l'algorithme du logiciel GENELAND d'une population isolée au Nord-Ouest de la zone d'échantillonnage est un résultat intéressant qui est conforté par une étude antérieure (Coste 2003). Lors de cette étude, une discontinuité génétique de même ampleur avait été détectée dans la même zone entre deux populations distantes de 30 Km (analyse d'isolement par la distance en populations discrètes réalisée en 2001). Nous avons retrouvé cette discontinuité 4 ans plus tard et nous avons également pu préciser géographiquement l'emplacement de cette ligne de fracture.

Dans l'objectif d'étudier plus précisément les paramètres de dispersion du champignon phytopathogène *M. fijiensis* à l'échelle de cette population, nous avons réalisé des analyses statistiques spécifiques sur des données échantillonnées au sein d'une zone continue de 33 Km. Tout d'abord il est rassurant (par rapport à la cohérence de l'échantillonnage réalisé) de noter que l'analyse cartographique n'a pas détecté de discontinuités génétiques au niveau de cette zone.

Les résultats obtenus nous ont permis de détecter un isolement par la distance significatif ($P=0,011$ avec une pente $b=0,031$) sur la totalité des points échantillonnés le long de ce transect de 33 km

(Tableau n°3). Ici encore, les résultats obtenus sont cohérents avec l'étude de 2001 qui n'avait détecté de l'isolement par la distance significatif qu'entre les premières populations échantillonnées (distantes de 30 km).

En outre, cette année la réalisation d'un transect emboîté avec 3 classes de distances nous a permis d'affiner la classe de distance cohérente caractérisant la dispersion du pathogène. Nous avons déterminé qu'une classe de distance de 50m était certainement trop faible pour détecter un isolement par la distance. En revanche ces mêmes analyses ont permis d'affirmer que la classe de distance pertinente caractérisant la dispersion du champignon est comprise entre 250 m et 1 km. Cette distance étant elle-même cohérente avec une analyse directe de la dispersion réalisée en mesurant le gradient de maladie au sein d'une parcelle expérimentale en 2001. Cette expérience avait permis de mesurer une distance moyenne de dispersion d'environ 50 mètres. Toutefois, les paramètres estimés par des approches indirectes ne sont pas nécessairement identiques ou équivalents à ceux estimés par les approches directes. En effet, les flux de gènes correspondent aux mouvements d'individus qui se sont reproduits avec succès hors de leurs lieux de naissance, et non pas aux mouvements nets d'individus entre les différents sites d'études (Rousset, 2000). De plus, les analyses directes détectent la distance moyenne de dispersion des spores et ne prennent donc pas en compte le fait que les distributions de dispersion sont souvent leptokurtiques, c'est-à-dire qu'elles ont un excès de distribution à faible et à longues distances par rapport à la dispersion à des distances intermédiaires. Finalement, certaines études ont mis en évidence une influence des hétérogénéités spatiales et temporelles dans l'estimation de paramètres démographiques par des analyses indirectes (Leblois et *al.*, 2004).

Néanmoins, grâce à la pente de la droite de régression du paramètre a_r mesurant la différenciation génétique par le logarithme de la distance nous avons pu estimer le produit $D\sigma^2$ caractérisant la dispersion de *M. fijiensis*. La valeur de ce produit dans notre contexte est de 2,0509. Cependant il est difficile d'aller plus loin dans la dissociation de ce produit puisque nous n'avons aucune approximation disponible de la densité génétiquement efficace en individus pour *Mycosphaerella fijiensis* au sein de la zone échantillonnée. En effet, ce type de méthode n'a jamais été utilisé pour caractériser la dispersion des spores de champignons. La plupart des études visant à estimer des paramètres de dispersion ont été réalisables car la densité en individus échantillonnés était connue ou déterminée par des observations directes (plus facile pour des organismes macroscopiques) (Garnier et *al.*, 2004 ; Rousset, 2000). Ce type d'estimation étant fastidieuse dans le cas d'individus représentés par des ascospores.

Conclusion et perspectives

L'échelle géographique considérée lors de cette analyse, certes originale pour l'étude d'un champignon phytopathogène, nous a permis de préciser le processus de dissémination graduelle des spores de *M.fijiensis*. De plus, elle nous a également permis de détecter des événements rares de dissémination du parasite par des invasions ponctuelles lors de la propagation de la maladie. En effet, la découverte de deux entités génétiques ainsi que la détection d'isolement par la distance le long d'une population continue confirment au sein d'une même zone de production agricole l'interaction existante entre ces deux modes de dissémination.

Afin d'approfondir l'étude réalisée durant ce stage, il serait donc nécessaire d'améliorer la puissance statistique en intégrant dans l'analyse génétique d'autres locus d'ores et déjà disponibles. De plus, l'élargissement de la zone échantillonnée vers le Nord-Ouest pourrait permettre d'observer plus finement comment se répartit la population 2 que nous avons détecté à l'aide du logiciel GENELAND. A ce niveau, si aucune barrière géographique ne se précise, il pourrait être intéressant de prendre en considération d'autres hypothèses pour expliquer cette structuration, dont une éventuelle barrière « ethnique » entre ces deux localités.

Finalement, la précision des paramètres démographiques caractérisant *M. fijiensis* à cette échelle réalisée durant ce stage constitue une première estimation fiable de paramètres qui pourraient servir à alimenter un modèle numérique ayant pour but de prédire et de tester des stratégies de lutte efficaces et durables à mettre en place à l'échelle d'une zone de production.

Références bibliographiques

- Agapow, P-M & Burt, A. (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium, *Molecular Ecology Notes* **1**, 101-102.
- Balloux, F. (2001) EASYPOP (version 1.7): A computer program for population genetics simulations. *Journal of Heredity*, **92**, 301-302.
- Banke, S. & McDonald, B.A. (2005) Migration patterns among global populations of the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* **14**, 1881-1896.
- Beaumont, M.A., Rannala, B. (2004) The Bayesian revolution in genetics. *Genetics* **5**, 251-261.
- Brown, J.K.M. & Hovmøller, M.S. (2002) Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* **297**, 537-541.
- Capelle, J. & Neema, C. (2005) Local adaptation and population structure at a micro-geographical scale of a fungal parasite on its host plant. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 1445-1454.
- Carlier, J., Lebrun, M.H., Zapater, M.F. Dubois, C. & Mourichon, X. (1996) Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* **5**, 499-510.
- Carlier et al. (2000) Fungal diseases of the foliage. Sigatoka leaf spot..
- Carlier, J. (2004) Population genetic structure and dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*. *The international journal on banana and plantain* **13**, 17-20.
- Coste, D. (2003) Isolement par la distance chez *Mycosphaerella fijiensis*, champignon responsable de la maladie des raies noires du bananier. *Mémoire de DEA RPI*.
- Coulon, A. Guillot, G., Cosson, J-F., Angibault, M-A., Aulagnier, S., Cargnelutti, B., Galan, M., Hewison, A.J. (2005) Genetic structure is influenced by landscape features : empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology* **10**, 1-9.
- Gandon, S. & Michalakis, S. (2002) Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 451-462.
- Garnier, S., Alibert, P., Audiot, P., Prieur, B. and Rasplus, J-Y. (2004) Isolation by distance and sharp discontinuities in gene frequencies: implications for the phylogeography of an alpine insect species, *Carabus solieri*. *Molecular Ecology* **10**, 1-15.
- Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet, J. (1995). FSTAT v-1.2. A computer program to calculate F-statistics. *J Heredity*. **86**, 485-6.
- Guillot, G., Estoup, A. Mortier, F. & Cosso, J.F. (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* **170**, 1261-1280.
- Laine, A.L. (2005) Spatial scale of local adaptation in a plant-pathogen metapopulation. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 930-938.

- Leblois,R., Rousset,F. & Estoup,A. (2004) Influence of spatial and temporal heterogeneities on the estimation of demographic parameters in a continuous population using individual microsatellite data. *Genetics* **166**, 1081-1092.
- Manel,S., Schwartz,M.K., Luikart,G. & Taberlet,P. (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 189-197.
- Manel,S., Gaggiotti,O.E. & Waples,S. (2005) Assignment methods : matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 136-142.
- Maynard Smith, J., Smith, N.H., Orourke, M., Spratt, B.G., (1993) How clonal are bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4384-4388.
- McDonald,B.A.. & Linde,C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349-379.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Pritchard,J.K., Stephens,M. & Donnelly,P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995) Genepop (Version-1.2) Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Heredity* **86**, 248-249.
- Rice, W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rivas,G.G., Zapater,M.F., Abadie,C. & Carlier,J. (2004) Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* **13**, 471-482.
- Rousset,F. (2001) Inference from spatial population genetics. in *Handbook of Statistical Genetics*. Editeurs D.J. Balding, M. Bishop et Cannings C., pp. 239-269. Wiley, Chichester, U.K.
- Rousset,F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-Statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Rousset,F. (2000) Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 58-62.
- Slatkin,M. (1993) Isolation by distance in equilibrium and non equilibrium populations. *Evolution* **47**, 264-279.
- Thrall,P.H. & Burdon,J.J. (2002) Evolution of gene-for-gene systems in metapopulations : the effect of spatial scale of host and pathogen dispersal. *Plant pathology* **51**, 169-184.
- Wright,S. (1951) The genetical structure of populations. *Ann. Eugen* **15**, 323-354.
- Zhan,J., Mundt,C., Hoffer,M.E. & McDonald,B.A. (2002) Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 634-647
- Weir,B.S & Cockerman, C.C. (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**(6), 1358-1371.

Documents annexes

Annexe n° 1 : Fréquences alléliques par locus

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|------|-----|----------|----------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|--------|--------|--------|--------|-----------|--------|--|--------|--------|--------|--|----------|--------|--------|--------|----------|--------|---|--------|-----|--------|-----|----------|-----|--------|--|--------|--------|--------|--------|--|------|--------|--------|--------|--|-----|--------|--------|-----|----------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|-----|--------|-----|--------|----------|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|--|-------|--|-----|--|----------|--|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|--|------|--|-----|--|----------|--|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|
| <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">Fh12b</td></tr> <tr><td colspan="2">N=22</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 1,41%</td></tr> <tr><td>141</td><td>0.3017</td></tr> <tr><td>143</td><td>0.2783</td></tr> <tr><td>145</td><td>0.2055</td></tr> <tr><td>147</td><td>0.0793</td></tr> <tr><td>139</td><td>0.0351</td></tr> <tr><td>149</td><td>0.0273</td></tr> <tr><td>151</td><td>0.0182</td></tr> <tr><td>117</td><td>0.0169</td></tr> <tr><td>153</td><td>0.0104</td></tr> <tr><td>137</td><td>0.0065</td></tr> <tr><td>155</td><td>0.0052</td></tr> <tr><td>128</td><td>0.0026</td></tr> <tr><td>96</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>109</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>115</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>121</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>123</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>125</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>131</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>133</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>161</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>165</td><td>0.0013</td></tr> </table> | Fh12b | | N=22 | | M= 1,41% | | 141 | 0.3017 | 143 | 0.2783 | 145 | 0.2055 | 147 | 0.0793 | 139 | 0.0351 | 149 | 0.0273 | 151 | 0.0182 | 117 | 0.0169 | 153 | 0.0104 | 137 | 0.0065 | 155 | 0.0052 | 128 | 0.0026 | 96 | 0.0013 | 109 | 0.0013 | 115 | 0.0013 | 121 | 0.0013 | 123 | 0.0013 | 125 | 0.0013 | 131 | 0.0013 | 133 | 0.0013 | 161 | 0.0013 | 165 | 0.0013 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">F62</td></tr> <tr><td colspan="2">N=4</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 0,26%</td></tr> <tr><td>183</td><td>0.9036</td></tr> <tr><td>185</td><td>0.0938</td></tr> <tr><td>181</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>187</td><td>0.0013</td></tr> </table> | F62 | | N=4 | | M= 0,26% | | 183 | 0.9036 | 185 | 0.0938 | 181 | 0.0013 | 187 | 0.0013 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">F19</td></tr> <tr><td colspan="2">N=5</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 0,13%</td></tr> <tr><td>271</td><td>0.9692</td></tr> <tr><td>273</td><td>0.0154</td></tr> <tr><td>269</td><td>0.0090</td></tr> <tr><td>272</td><td>0.0051</td></tr> <tr><td>274</td><td>0.0013</td></tr> </table> | F19 | | N=5 | | M= 0,13% | | 271 | 0.9692 | 273 | 0.0154 | 269 | 0.0090 | 272 | 0.0051 | 274 | 0.0013 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">Fc12b</td></tr> <tr><td colspan="2">N=4</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 0,26%</td></tr> <tr><td>179</td><td>0.9563</td></tr> <tr><td>178</td><td>0.0257</td></tr> <tr><td>177</td><td>0.0154</td></tr> <tr><td>181</td><td>0.0026</td></tr> </table> | Fc12b | | N=4 | | M= 0,26% | | 179 | 0.9563 | 178 | 0.0257 | 177 | 0.0154 | 181 | 0.0026 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">Fe09</td></tr> <tr><td colspan="2">N=5</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 2,18%</td></tr> <tr><td>101</td><td>0.7313</td></tr> <tr><td>118</td><td>0.2582</td></tr> <tr><td>120</td><td>0.0079</td></tr> <tr><td>103</td><td>0.0013</td></tr> <tr><td>116</td><td>0.0013</td></tr> </table> | Fe09 | | N=5 | | M= 2,18% | | 101 | 0.7313 | 118 | 0.2582 | 120 | 0.0079 | 103 | 0.0013 | 116 | 0.0013 |
| Fh12b | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=22 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 1,41% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 141 | 0.3017 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 143 | 0.2783 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 145 | 0.2055 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 147 | 0.0793 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 139 | 0.0351 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 149 | 0.0273 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 151 | 0.0182 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 117 | 0.0169 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 153 | 0.0104 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 137 | 0.0065 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 155 | 0.0052 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 128 | 0.0026 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 96 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 109 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 115 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 121 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 123 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 125 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 131 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 133 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 161 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 165 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F62 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 0,26% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 183 | 0.9036 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 185 | 0.0938 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 181 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 187 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 0,13% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 271 | 0.9692 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 273 | 0.0154 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 269 | 0.0090 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 272 | 0.0051 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 274 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fc12b | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 0,26% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 179 | 0.9563 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 178 | 0.0257 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 177 | 0.0154 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 181 | 0.0026 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fe09 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 2,18% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 101 | 0.7313 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 118 | 0.2582 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 120 | 0.0079 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 103 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 116 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">N244</td></tr> <tr><td colspan="2">N=7</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 3,08%</td></tr> <tr><td>216</td><td>0.6984</td></tr> <tr><td>223</td><td>0.2024</td></tr> <tr><td>218</td><td>0.0450</td></tr> <tr><td>214</td><td>0.0212</td></tr> <tr><td>225</td><td>0.0185</td></tr> <tr><td>221</td><td>0.0079</td></tr> <tr><td>220</td><td>0.0066</td></tr> </table> | N244 | | N=7 | | M= 3,08% | | 216 | 0.6984 | 223 | 0.2024 | 218 | 0.0450 | 214 | 0.0212 | 225 | 0.0185 | 221 | 0.0079 | 220 | 0.0066 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">F75</td></tr> <tr><td colspan="2">N=2</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 0,26%</td></tr> <tr><td>122</td><td>0.9987</td></tr> <tr><td>120</td><td>0.0013</td></tr> </table> | F75 | | N=2 | | M= 0,26% | | 122 | 0.9987 | 120 | 0.0013 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">Fe05b</td></tr> <tr><td colspan="2">N=3</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 0,26%</td></tr> <tr><td>197</td><td>0.1478</td></tr> <tr><td>200</td><td>0.5000</td></tr> <tr><td>202</td><td>0.3522</td></tr> </table> | Fe05b | | N=3 | | M= 0,26% | | 197 | 0.1478 | 200 | 0.5000 | 202 | 0.3522 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">Ff01</td></tr> <tr><td colspan="2">N=10</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 9,87%</td></tr> <tr><td>131</td><td>0.4239</td></tr> <tr><td>135</td><td>0.3599</td></tr> <tr><td>153</td><td>0.1422</td></tr> <tr><td>133</td><td>0.0356</td></tr> <tr><td>155</td><td>0.0171</td></tr> <tr><td>151</td><td>0.0142</td></tr> <tr><td>139</td><td>0.0028</td></tr> <tr><td>129</td><td>0.0014</td></tr> <tr><td>137</td><td>0.0014</td></tr> <tr><td>143</td><td>0.0014</td></tr> </table> | Ff01 | | N=10 | | M= 9,87% | | 131 | 0.4239 | 135 | 0.3599 | 153 | 0.1422 | 133 | 0.0356 | 155 | 0.0171 | 151 | 0.0142 | 139 | 0.0028 | 129 | 0.0014 | 137 | 0.0014 | 143 | 0.0014 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N244 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 3,08% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 216 | 0.6984 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 223 | 0.2024 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 218 | 0.0450 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 214 | 0.0212 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 225 | 0.0185 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 221 | 0.0079 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 220 | 0.0066 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F75 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 0,26% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 122 | 0.9987 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 120 | 0.0013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fe05b | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 0,26% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 197 | 0.1478 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 200 | 0.5000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 202 | 0.3522 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ff01 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 9,87% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 131 | 0.4239 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 135 | 0.3599 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 153 | 0.1422 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 133 | 0.0356 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 155 | 0.0171 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 151 | 0.0142 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 139 | 0.0028 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 129 | 0.0014 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 137 | 0.0014 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 143 | 0.0014 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">N137</td></tr> <tr><td colspan="2">N=9</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 0,26%</td></tr> <tr><td>234</td><td>0.6607</td></tr> <tr><td>242</td><td>0.1864</td></tr> <tr><td>236</td><td>0.0681</td></tr> <tr><td>244</td><td>0.0334</td></tr> <tr><td>240</td><td>0.0283</td></tr> <tr><td>245</td><td>0.0103</td></tr> <tr><td>232</td><td>0.0077</td></tr> <tr><td>238</td><td>0.0026</td></tr> <tr><td>247</td><td>0.0026</td></tr> </table> | N137 | | N=9 | | M= 0,26% | | 234 | 0.6607 | 242 | 0.1864 | 236 | 0.0681 | 244 | 0.0334 | 240 | 0.0283 | 245 | 0.0103 | 232 | 0.0077 | 238 | 0.0026 | 247 | 0.0026 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">Fd10b</td></tr> <tr><td colspan="2">N=4</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 0,26%</td></tr> <tr><td>154</td><td>0.7275</td></tr> <tr><td>153</td><td>0.2532</td></tr> <tr><td>152</td><td>0.0141</td></tr> <tr><td>155</td><td>0.0051</td></tr> </table> | Fd10b | | N=4 | | M= 0,26% | | 154 | 0.7275 | 153 | 0.2532 | 152 | 0.0141 | 155 | 0.0051 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">N203</td></tr> <tr><td colspan="2">N=3</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 0,13%</td></tr> <tr><td>228</td><td>0.5276</td></tr> <tr><td>231</td><td>0.4544</td></tr> <tr><td>234</td><td>0.0180</td></tr> </table> | N203 | | N=3 | | M= 0,13% | | 228 | 0.5276 | 231 | 0.4544 | 234 | 0.0180 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N137 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 0,26% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 234 | 0.6607 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 242 | 0.1864 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 236 | 0.0681 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 244 | 0.0334 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 240 | 0.0283 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 245 | 0.0103 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 232 | 0.0077 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 238 | 0.0026 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 247 | 0.0026 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fd10b | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 0,26% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 154 | 0.7275 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 153 | 0.2532 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 152 | 0.0141 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 155 | 0.0051 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N203 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 0,13% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 228 | 0.5276 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 231 | 0.4544 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 234 | 0.0180 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">N194</td></tr> <tr><td colspan="2">N=3</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 1,79%</td></tr> <tr><td>295</td><td>0.6710</td></tr> <tr><td>292</td><td>0.3081</td></tr> <tr><td>298</td><td>0.0209</td></tr> </table> | N194 | | N=3 | | M= 1,79% | | 295 | 0.6710 | 292 | 0.3081 | 298 | 0.0209 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">Fb10</td></tr> <tr><td colspan="2">N=6</td></tr> <tr><td colspan="2">M= 32,44%</td></tr> <tr><td>210</td><td>0.7343</td></tr> <tr><td>224</td><td>0.2448</td></tr> <tr><td>226</td><td>0.0095</td></tr> <tr><td>212</td><td>0.0057</td></tr> <tr><td>222</td><td>0.0038</td></tr> <tr><td>220</td><td>0.0019</td></tr> </table> | Fb10 | | N=6 | | M= 32,44% | | 210 | 0.7343 | 224 | 0.2448 | 226 | 0.0095 | 212 | 0.0057 | 222 | 0.0038 | 220 | 0.0019 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N194 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 1,79% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 295 | 0.6710 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 292 | 0.3081 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 298 | 0.0209 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fb10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N=6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M= 32,44% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 210 | 0.7343 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 224 | 0.2448 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 226 | 0.0095 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 212 | 0.0057 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 222 | 0.0038 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 220 | 0.0019 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

N correspond au nombre d'allèles par locus

M correspond au pourcentage de données manquantes par locus

Matrice des déséquilibres de liaison

| P_value for genotypic disequilibrium - 1820 permutations - P-value adjusted for 5% = 0,000549 | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Fh12b | F62 | N244 | N137 | F19 | F75 | Fd10b | Fc12b | Fe05b | N203 | N194 | Fe09 | Ff01 | Fb10 |
| Fh12b | | 0,263 | 0,041 | 0,436 | 0,104 | 1,000 | 0,635 | 0,305 | 0,352 | 0,422 | 0,475 | 0,420 | 0,873 | 0,615 |
| F62 | 0,263 | | 0,143 | 0,307 | 0,273 | 1,000 | 0,880 | 0,019 | 0,360 | 0,997 | 0,532 | 0,514 | 0,846 | 0,753 |
| N244 | 0,041 | 0,143 | | 0,941 | 0,017 | 0,537 | 0,412 | 0,094 | 0,035 | 0,078 | 0,151 | 0,338 | 0,181 | 0,415 |
| N137 | 0,436 | 0,307 | 0,941 | | 0,691 | 0,073 | 0,036 | 0,732 | 0,470 | 0,170 | 0,362 | 0,131 | 0,066 | 0,572 |
| F19 | 0,104 | 0,273 | 0,017 | 0,691 | | 1,000 | 0,242 | 0,007 | 0,821 | 0,470 | 0,260 | 0,494 | 0,069 | 0,071 |
| F75 | 1,000 | 1,000 | 0,537 | 0,073 | 1,000 | | 0,604 | 0,126 | 0,430 | 1,000 | 1,000 | 0,636 | 0,288 | NA |
| Fd10b | 0,635 | 0,880 | 0,412 | 0,036 | 0,242 | 0,604 | | 0,257 | 0,433 | 0,880 | 0,173 | 0,799 | 0,819 | 0,328 |
| Fc12b | 0,305 | 0,019 | 0,094 | 0,732 | 0,007 | 0,126 | 0,257 | | 0,082 | 0,952 | 0,423 | 0,447 | 0,031 | 0,266 |
| Fe05b | 0,352 | 0,360 | 0,035 | 0,470 | 0,821 | 0,430 | 0,433 | 0,082 | | 0,136 | 0,088 | 0,023 | 0,493 | 0,695 |
| N203 | 0,422 | 0,997 | 0,078 | 0,170 | 0,470 | 1,000 | 0,880 | 0,952 | 0,136 | | 0,342 | 0,709 | 0,224 | 0,442 |
| N194 | 0,475 | 0,532 | 0,151 | 0,362 | 0,260 | 1,000 | 0,173 | 0,423 | 0,088 | 0,342 | | 0,443 | 0,810 | 0,392 |
| Fe09 | 0,420 | 0,514 | 0,338 | 0,131 | 0,494 | 0,636 | 0,799 | 0,447 | 0,023 | 0,709 | 0,443 | | 0,608 | 0,087 |
| Ff01 | 0,873 | 0,846 | 0,181 | 0,066 | 0,069 | 0,288 | 0,819 | 0,031 | 0,493 | 0,224 | 0,810 | 0,608 | | 0,853 |
| Fb10 | 0,615 | 0,753 | 0,415 | 0,572 | 0,071 | NA | 0,328 | 0,266 | 0,695 | 0,442 | 0,392 | 0,087 | 0,853 | |

Annexe n° 2 : Protocole d'extraction d'ADN de champignon sur plaque 96 puits :

Objectif :

Extraire de l'ADN à partir de colonies mycéliennes déshydratées, à haut débit, directement dans une plaque 96 puits.

Matériel :

2 Plaques dites de stockage 96 puits 0,8 mL
 200 tubes longs (ref ?) et leurs capuchons.
 Distributeur de billes
 Billes de verre (3mm de diamètre)
 (1 Film plastique adhésif transparent)
 2 Couvercles caoutchouc (ref. AB-0674)
 Pipette multi-canal 300µL,
 Pipette électronique multidistributrice (Vortex, avec adaptateur pour plaques)
 Etuve à 65°C à allumer avant le broyage
 Centrifugeuse disposant d'un rotor à plaque (Pompe à vide)

| Solutions : | | | |
|----------------|--------------------|--|---|
| Noms | volume / 2 plaques | Solutions mère / réactifs | Stockage |
| Tampon de lyse | 80 mL | pour 100mL - NaCl 5M : 14 mL - Tris HCl pH8 1M : 5 mL - EDTA pH8 0.5M : 2 mL - CTAB : 1 g (dissoudre à chaud) - β Mercaptoethanol : 1 mL (manipuler sous hotte chimique) - H ₂ O UP stérile ? 77 mL | - une solution contenant NaCl, Tris et EDTA peut être préparée à l'avance (la veille) puis stockée au frigo ; - avant utilisation ajouter l'eau, plonger au bain marie 65°C ; - au dernier moment ajouter le CTAB, attendre la dissolution et ajouter le β Mercaptoethanol - cette solution doit être distribuée à 65°C. |
| CIAA | 60 mL | pour 100mL - Chloroforme : 96 mL - Alcool Isoamylique : 4 mL | armoire de sécurité salle d'extraction, T° ambiante |
| Isopropanol | 50 mL | | -20°C, salle d'extraction |
| Ethanol 70% | 160 mL | | -20°C, salle d'extraction |
| TE | 6 mL | pour 10 mL - Tris-HCl 1M, pH8 : 100 µL - EDTA 0.5M, pH8 : 20 µL qsp 10mL H ₂ O ultrapure | frigo filtrer sous cartouche avant utilisation |
| ou Light TE | 6 mL | pour 10 mL - Tris-HCl 1M, pH8 : 100 µL - EDTA 0.5M, pH8 : 2 µL qsp 10mL H ₂ O UP (stérile) | frigo filtrer sous cartouche avant utilisation |
| TE + RNase | 6 mL | pour 6 mL - RNase 10mg/mL : 60 µL - TE : 6 mL | Aucun stockage, utilisation de solution fraîche filtrée (penser à décongeler les RNases) |

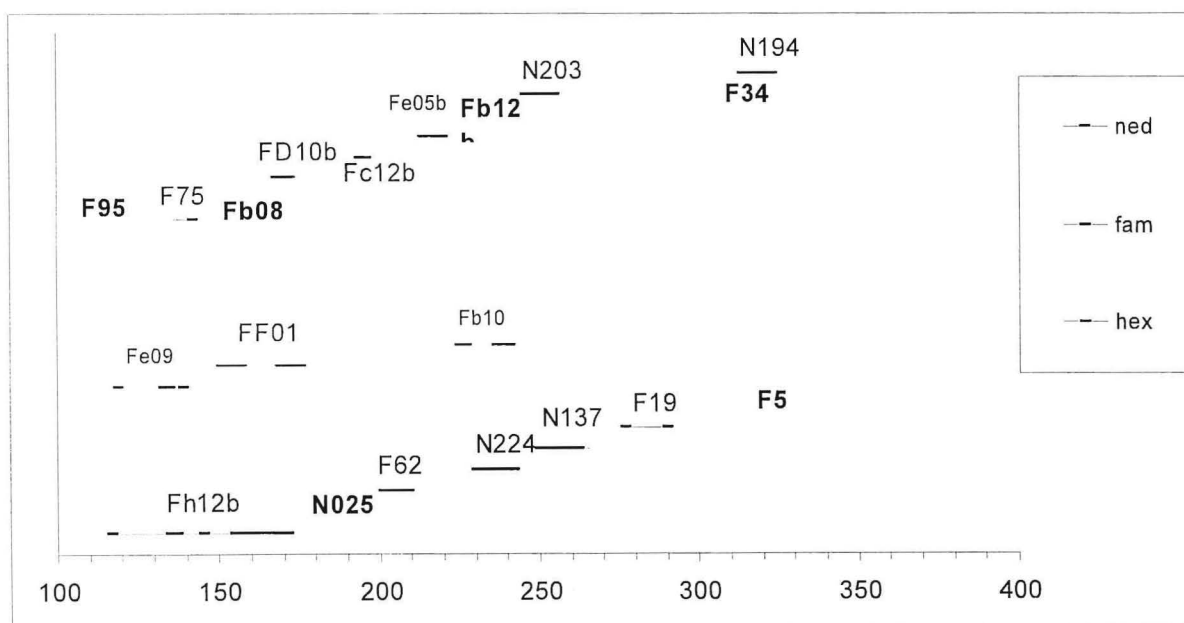
Méthode

- Préparation du broyage :**
 - disposer 3/4 billes de verre dans chaque tube
 - (sous hotte à flux laminaire ?) prélever une colonie, la déposer dans le tube (scalpel effilé ?)
 - numéroter les tubes
 - composer le plan de plaque (espaces vide = témoin (6/plaque) - 180 isolats / 2 plaques)
- Déshydrater** le mycélium en mettant les plaques (tubes + portoirs) à 55°C pendant la nuit.
- Broyage :** durée 1 à 2 minutes. Procéder en 2 fois pour inverser (haut-bas) les tubes.
- Lyse :** (sous hotte chimique, sorbone)
 - ajouter 400 (ou 300 ?) µL de tampon de lyse chaud (+65°C) dans chaque tube
 - boucher les tubes, agiter fortement pour mettre le broyat mycélien en suspension
 - laisser digérer 3/4h à 1h dans l'étuve 65°C en agitant de temps à autres.
- Purification CIAA :** (sous hotte chimique, sorbone)
 - ajouter 300 µL de CIAA
 - boucher les tubes, mettre en émulsion en agitant longtemps et lentement par inversion
 - centrifuger 40min à 3500 rpm, T° ambiante
- Préparation des nouvelles plaques :** distribuer 250µL d'isopropanol 100% dans les puits de la plaque de stockage (800µL). Réserver les plaques au congélateur -20°C.
- Précipitation :** (sous hotte chimique, sorbone)
 - prélever 290 µL de surnageant (phase aqueuse, ancienne plaque) et homogénéiser avec la pipette avec l'isopropanol dans la nouvelle plaque.
 - laisser agir 10 min minimum à -20 °C. Etape non limitante.
 - centrifuger 40min à 3500 rpm, T° ambiante (4°C)
- Rincage :**
 - éliminer le surnageant en retournant la plaque, immédiatement après centrifugation.
 - rincer le culot avec 800µL d'éthanol 70% (-20°C).
 - centrifuger 30min à 3500 rpm, T° ambiante (4°C)
- Séchage :** Eliminer l'éthanol en retournant la plaque. Faire sécher les culots en plaçant la plaque sous cloche à vide pendant 20 min, ou à l'air libre (minimum 1 heure, au mieux une nuit).
- Reprise** du culot dans 20 à 50µL de TE, en fonction de la quantité de mycélium. Ajuster les tapis en caoutchouc (couvercles). Laisser 2 à 3 h sur la paillasse (T° ambiante) pour la suspension du culot avant de procéder à un dosage (fluorimétrie ou électrophorèse sur gel d'agarose 1%, TBE 1X). Stocker au frigo (utilisation dans la semaine) ou au congélateur -20°C.

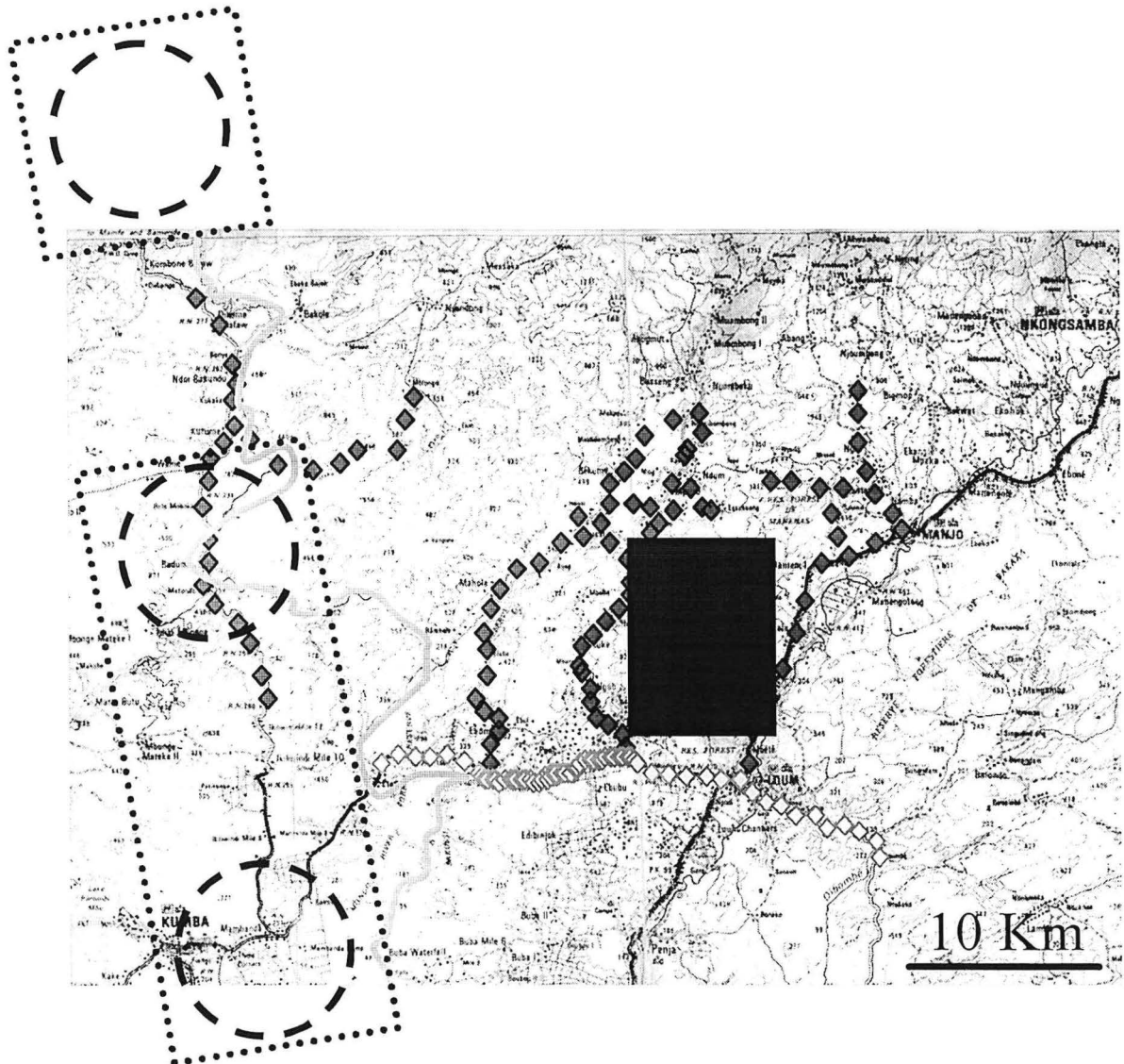
Annexe n° 3 : Marqueurs micro satellites utilisés pour l'analyse des populations
de *Mycosphaerella fijiensis*

| Locus | Amorce F | Amorce R |
|-------|-----------------------|------------------------|
| FH12b | TGCAATTTCTGACTGCTGTTC | GCTAGCAACCAAAGAGAGACTG |
| F62 | TTCCCACTACATCCGAAAG | CCCTCCTTTTCTCAACACA |
| N244 | GGCATTTCATTTGCAAGAC | ATGCCACAAAATCTCCATCC |
| N137 | GGCTCGAAGTGGACTAGCAC | CTGGTCGAGGGTCTCGGG |
| F19 | CGTCATCGGGCTTTATGTCT | ATCATGGGTAGGGGGGAGAAC |
| F75 | CTAAATTCCCAATGCTGGA | AGCCCAAAGATGAAGTGTGC |
| FD10b | CCAATGCAAACCAGTCAATG | AAACGACAGCAACAGCACAG |
| FC12b | GAGCGACCTTCTCTTTCAA | CGAGAGCTTGGAAAAAGTG |
| FE05b | GCGCAACAGGTACATAAGA | AGTCCTCTGGGAGGCATTCT |
| N203 | CTCTGTGGCGTAAGTGGGTG | TGATTGCACAGCAGGAAGAG |
| N194 | CATCTTTGAGGAGGCAAAGC | AGATTCCTTAGGCGGCATTT |
| FE09 | ACAGACGAACGACCGACGAC | ATTACGCCCAGAACACCTTT |
| FF01 | GGAAGTGCCAAGAAAAGG | GACAGTGAGGAGATGAGC |
| Fb10 | GCGCATGATGAGAAAAA | GGATGTTGAGGAGTTGT |


Panel des marqueurs microsatellites multiplexés utilisés pour l'analyse moléculaire
En abscisse : taille des fragment amplifiés (en paire de bases)
(Les marqueurs en noir ont été ôtés de l'analyse car ils étaient entraînés lors de l'électrophorèse)




Annexe n° 4 : Localisation des 3 sites échantillonnés en 2001 et utilisés pour certaines analyses par rapport à la zone échantillonnée en 2006



Légende supplémentaire (par rapport à la figure n°3) :

 Sites échantillonnées en 2001 (distants de 30 Km)...

 ... regroupés en deux populations ($F_{ST} = 0,14$)