

AG-179520  
BA-54357  
19 AOUT 1999

UNIVERSITÉ D'ANTANANARIVO  
Faculté des Sciences B.P 906  
Antananarivo  
MADAGASCAR

CIRAD-Forêt  
Programme Arbres et Plantations  
Laboratoire de Génétique B.P 5035  
34032 Montpellier - FRANCE

**MÉMOIRE DE DIPLOME D'ÉTUDES APPROFONDIES  
DE BIOLOGIE ET ÉCOLOGIE VÉGÉTALE**  
(Option : Physiologie végétale)

Présenté par

Sylvie RAZAFIARIVELO

**DESCRIPTION À L'AIDE DE MARQUEURS MICROSATELLITES  
DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DES ARBRES D'UN VERGER  
À GRAINES D'*EUCALYPTUS GRANDIS* À MADAGASCAR**

Soutenu le

**CIRAD-Dist**  
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE  
Baillarguet

Maître de stage : Dr. Daniel Verhaegen  
Rapporteurs : Dr. Didier Ravelomanana  
Période de stage : Janvier à juin 1999



\*TH03136\*

## Remerciements

Je tiens à remercier Mr. Bernard Mallet chef de programme Arbres et Plantations de m'avoir permis de réaliser mon stage au sein du CIRAD Forêt de Montpellier.

Mes remerciements plus particulièrement à Daniel Verhaegen pour m'avoir fait confiance dès le début, pour m'avoir permis d'effectuer mon stage au laboratoire de génétique, et pour son soutien lors de la rédaction de ce rapport de stage.

Qu'aurais-je fait sans vous Marie-Hélène, Alex, et surtout Mireille pour avoir soulager mon travail de laboratoire, pour votre aide, votre agréable compagnie et vos conseils techniques.

Je n'oublierai pas toute l'équipe du labo, les stagiaires (Elisabeth, Laurence, Isabelle, Franck), les thésards (Khady, Diallo, Jean-Marc), Sophie, pour leur sympathie, et leur soutien. Grâce à vous ce stage restera un très agréable souvenir.

Enfin je remercie de tout mon coeur mes parents qui m'ont encouragée.

## Sommaire

Introduction .....	1
Matériel et méthodes .....	3
1 Matériel végétal .....	3
11 <i>Eucalyptus grandis</i> .....	3
12 Verger à graines d'Andranokobaka .....	4
13 Prélèvement de feuilles dans le verger .....	4
2 Méthode de révélation du polymorphisme moléculaire .....	4
21 Extraction de l'ADN total .....	4
22 Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN .....	5
23 Choix et conditions de marquage moléculaire .....	5
24 Séparation des fragments par électrophorèse .....	5
25 Révélation du polymorphisme des individus du verger à graines .....	6
3 Méthode d'analyse du polymorphisme moléculaire .....	6
31 Lecture des gels .....	6
32 Interprétations des résultats .....	6
321 Distances génétiques .....	6
322 Fréquences alléliques, taux d'hétérozygotie, indices de Nei .....	7
323 Structure spatiale des populations et "statistiques F de Wright" .....	7
Résultats .....	8
1 Révélation du polymorphisme des individus du verger à graines .....	8
2 Interprétations des résultats .....	8
21 Distances génétiques .....	8
22 Fréquences alléliques, taux d'hétérozygotie, indices de Nei .....	8
23 Structure spatiale des populations et "statistiques F de Wright" .....	12
Conclusions .....	16
Bibliographie .....	17

## **Description à l'aide de marqueurs microsatellites de la variabilité génétique des arbres d'un verger à graines d'*Eucalyptus grandis* à Madagascar**

### **INTRODUCTION**

Le bois à Madagascar couvre 80 à 90 % des besoins en énergie domestique. A titre d'exemple les besoins en bois énergie de la capitale (1 million d'habitants) s'élevaient en 1992 à plus de 1.000.000 t/an. L'approvisionnement est couvert à 93 % par les taillis d'*Eucalyptus* des plantations paysannes qui représentent la première culture de rente dans les zones de production. Conséquence de la protection des forêts naturelles et de leur dégradation on constate que la part des *Eucalyptus* dans la production de bois de service et d'œuvre devient de plus en plus importante. Selon le dernier inventaire écologique forestier national, les peuplements forestiers artificiels couvrent 316.000 ha (Pins et *Eucalyptus*). Compte tenu des besoins grandissant de la population et du développement de Madagascar tout porte à croire que les surfaces reboisées vont s'étendre et connaître un développement important.

A Madagascar, pour subvenir à la demande en reboisement, le Silo National des Semences Forestières gère et exploite des sources de graines d'espèces introduites et principalement du genre *Eucalyptus*. Le programme d'amélioration réalisé par le FOFIFA (Centre National de Recherches Agronomiques pour le Développement Rural) et le CIRAD-Forêt porte sur la création variétale sous forme de variétés-populations produites par brassage génétique en fécondation libre dans des vergers à graines. Afin de fournir le meilleur matériel végétal, un large dispositif de production grainière a été planté sur l'ensemble des zones bioclimatiques de Madagascar. Ce dispositif, couvrant une surface de plus de 120 ha, permettra à terme une autosuffisance pour les principales espèces de reboisement.

Les dispositifs de vergers doivent permettre de se rapprocher des conditions du mode de reproduction idéal qui résulte du hasard des rencontres des individus et de leurs gamètes. La panmixie reste un modèle théorique qui subit certainement plusieurs déviations dans la réalité. La disposition des individus sur le terrain se fait généralement après randomisation des provenances, des familles ou clones, sous une contrainte d'éloignement maximal entre deux arbres apparentés. Ils visent à favoriser au maximum les croisements inter-provenances ou inter-familles. La parcelle est gérée de façon à promouvoir un développement rapide des houppiers et une floraison abondante et précoce par un travail cultural soigné (entretiens, éclaircies, déssouchage, fertilisation...). Ces dispositifs sont fréquemment

utilisés à plusieurs fins et on y combine à la fois la conservation des ressources génétiques, leur sélection, le recueil d'information et la production de graines.

Les caractéristiques génétiques, la qualité et la performance des variétés produites dépendent donc directement des génotypes parentaux en croisement et du brassage gamétique réalisé lors de l'hybridation naturelle dans ces vergers. Les vergers à graines de familles d'*Eucalyptus* sont généralement plantés à forte densité (2500 tiges par hectare). Par le jeu d'éclaircies successives, la densité finale des vergers à graines est ramenée entre 150 et 250 arbres par hectare. Les sélections phénotypiques régulières dans les vergers à graines conduisent à une réduction sévère de la variabilité génétique mais la quantification de cette érosion génétique n'a pas encore été étudiée. De plus, la fécondation entre les arbres dans les vergers à graines d'*Eucalyptus* reste à préciser car les écarts à la panmixie ont un impact sur la qualité génétique des variétés produites.

La biologie de la reproduction des principales espèces d'*Eucalyptus* est relativement bien décrite dans les régions d'origine. Par contre le régime de reproduction en zone d'introduction a été jusqu'à présent très peu étudié alors même que la pollinisation libre est le mode de recombinaison habituel utilisé dans les programmes d'amélioration génétique et de production grainière (Griffin *et al* 1987). Une seule étude compare à l'aide des marqueurs isoenzymatiques les paramètres génétiques pour *Eucalyptus globulus* (Hodge *et al.* 1996). Elle révèle que les paramètres génétiques en fécondation libre dans les populations naturelles sont très différents de ceux obtenus en vergers à graines. Compte tenu de l'importance des ressources génétiques autant pour la production en semences destinées au développement que pour la poursuite d'un programme d'amélioration génétique il convient d'apporter des éléments scientifiques à la gestion des vergers à graines. Car, malgré toutes les précautions prises lors de l'établissement de la parcelle, outre l'existence de croisements privilégiés entre voisins du seul fait des proximités géographiques, de nombreux facteurs incontrôlés sont sources d'écarts à la panmixie (manque de synchronisme de la floraison entre les individus ; abondance des fleurs ; pourcentage d'autofécondation ; flux polliniques ; incompatibilité stricte ou partielle...). Afin de répondre aux nombreuses questions scientifiques qui se posent sur la qualité des semences produites dans les vergers, le CIRAD-Forêt a entrepris des travaux de recherches sur un verger à graines d'*Eucalyptus grandis* à Madagascar.

Ce travail de DEA s'intègre dans la thématique de recherche dont l'objectif est d'étudier à l'aide des marqueurs moléculaires microsatellites, les écarts à la panmixie dans les vergers à graines. Il consiste à décrire à l'aide de séquences microsatellites, la variabilité génétique de tous les géniteurs du verger.

Ces empreintes génétiques seront utilisées comme références pour la suite des études, lors des recherches de paternité sur les descendants.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1 Matériel végétal

#### 1.1 *Eucalyptus grandis*

C'est une espèce originaire d'Australie qui appartient au sous-genre *Symphomyrtus*. L'aire naturelle est discontinue, la majeure partie se trouve entre 33 et 26° de latitude Sud dans les états du New South Wales et du Queensland. L'espèce est pratiquement absente jusqu'à 18° Sud où elle réapparaît avec une distribution très morcelée. Les conditions climatiques de ces régions sont très contrastées puisque la température moyenne varie de 14° à 22°C et la précipitation annuelle de 700 à 2500 mm/an. C'est une espèce à croissance rapide pouvant atteindre 75 mètres. A la base du tronc, sur les deux ou trois premiers mètres, l'écorce est brune et rugueuse, mais sur le reste du tronc et des branches l'écorce est lisse de couleur blanche ou gris bleue. C'est une espèce dont le bois clair est relativement moins dense que les autres espèces d'*Eucalyptus* et qui peut être utilisée pour la pâte à papier, le charbon de bois et le sciage.

*Eucalyptus grandis* est l'une des espèces majeures utilisées en reboisement. Elle couvre probablement plus de trois millions d'hectares dans la zone subtropicale et est utilisée à la fois pour la production de bois de trituration (papier, viscosé) et de bois de chauffe. Sa production est exceptionnellement forte, autour de 20-30 m<sup>3</sup>/ha/an couramment, mais atteignant souvent 40 à 50 m<sup>3</sup>/ha/an. Les programmes principaux d'amélioration génétique de part le monde (Brésil, Congo, Afrique du Sud) utilisent cette espèce pour sa valeur en croisement dans la production d'hybrides interspécifiques. L'importance de cette espèce est indéniable pour Madagascar. Celle-ci convient au reboisement pour la moitié du pays allant des Hautes Terres, la zone la plus peuplée avec une couverture forestière très faible, à toute la façade est de l'île fortement arrosée et représentant la zone potentielle de production ligneuse. Pour illustrer, les ventes de semences à Madagascar atteignent 35 kg par an pour cette espèce et avoisinent les 300 kg annuel pour l'ensemble du genre.

## 12 Verger à graines d'Andranokobaka

Le verger à graines étudié est constitué de 250 individus sélectionnés dans 12 descendance libres issues de 3 provenances récoltées dans l'aire naturelle de l'espèce (côte Est de l'Australie) et 1 provenance malgache. Il a été planté en 1987 et couvre une surface de 0,6 ha (voir plan en Annexe 1). Le dispositif retenu est en bloc monoarbre avec 40 répétitions. L'essai a été inventorié (circonférence et hauteur totale) à plusieurs reprises : 14, 27, 61, 101, 110, et 126 mois. Après élimination du traitement 5, il reste actuellement 11 descendance libres dans le verger.

Le dispositif planté à Andranokobaka doit permettre de se rapprocher des conditions du mode de reproduction idéal qui résulte du hasard des rencontres des individus et de leurs gamètes (panmixie). La disposition des individus sur le terrain a été faite après randomisation des provenances et des familles.

## 13 Prélèvement de feuilles dans le verger.

Pour démarrer cette étude, des feuilles de type juvénile ont été prélevées sur les 246 arbres du verger. Une équipe composée de 10 ouvriers, d'un grimpeur et d'un chef d'équipe a été constituée pour faire ce travail. Une tour en fer de 10 mètres de haut était déplacée dans la parcelle. A l'aide d'un échenilloir monté sur une perche, le grimpeur pouvait alors récolter une branche sur les 3 ou 4 arbres les plus proches. Sur cette branche feuillée 5 à 10 feuilles juvéniles (non anthocyanées et non coriaces) étaient prélevées et placées dans une enveloppe sur laquelle était noté le numéro du bloc et le numéro du traitement (= provenance). Ces feuilles ont été séchées à Ambatobe et constituent la réserve d'ADN en cas de besoin. L'extraction d'ADN à partir de matériel sec d'*Eucalyptus* donne de bons rendements lorsque le stade de prélèvement est bien respecté. Le reste des rameaux a été préparé puis conditionné pour être transporté en glacière jusqu'à Tananarive. C'est sur ce matériel frais qu'a été réalisée l'extraction directe d'ADN au Département des Recherches Forestières (DRFP) du FOFIFA.

## 2 Méthode de révélation du polymorphisme moléculaire

### 21 Extraction de l'ADN total.

Les extractions ont été faites à l'aide d'un kit d'extraction (Quiagene). Le protocole d'extraction de l'ADN à partir de matériel frais est fourni en Annexe 2. A Montpellier de nouvelles extractions ont été faites pour les arbres n'ayant pas donné de quantités d'ADN suffisantes soit à l'aide du kit d'extraction soit par la méthode de Saghai-Marooof *et al* 1984.

## 22 Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN.

Les quantités d'ADN obtenues après extraction sont mesurées à l'aide d'un fluorimètre. Les résultats obtenus sont donnés en Annexe 3. La qualité et la quantité d'ADN sont contrôlées (voir protocole en Annexe 4) en réalisant une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Agarose ultra pure GibcoBRL 15510-027) avec du TBE 0,5X (Tris Borate EDTA) utilisé comme tampon de migration.

## 23 Choix et conditions du marquage moléculaire.

De nombreuses études de cartographie génétique ont été développées pour les *Eucalyptus* avec les marqueurs moléculaires (Byrne *et al* 1995 ; Grattapaglia et Sederoff 1994 ; Verhaegen et Plomion 1996). Ces études ont abouti à une meilleure connaissance du génome et notamment les régions impliqués dans la variation de caractères quantitatifs (Byrne *et al* 1997 ; Grattapaglia *et al* 1995 ; Verhaegen *et al* 1997). Récemment, de nouveaux marqueurs microsatellites ont été développés pour les *Eucalyptus grandis* et *Eucalyptus urophylla* (Brondani *et al*, 1998). Ces marqueurs hyper variables et co dominants ont été retenus pour cette étude. Les vingt séquences publiées ont nécessité de nombreuses mises au point, la technique n'étant pas parfaitement maîtrisée au début du stage. Pour cette étude, les conditions de PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été optimisées (concentration de l'amorce et température d'hybridation lors de la réaction PCR) pour cinq amorces (voir Annexe 5)

## 24 Séparation des fragments par électrophorèse.

Les microsatellites sont constitués en une suite des motifs nucléotidiques répétés en tandem. Le mécanisme principal de la variation observée est l'ajout ou la suppression d'un motif. Cette mutation va entraîner la formation d'allèles de tailles différentes. La révélation de ce polymorphisme est réalisée par l'électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant. Les gels sont composés d'un mélange de 70 ml de solution d'acrylamide à 6%, de 240 µl d'APS (persulfate d'ammonium) à 10 % et de 100 µl de Temed. Les gels sont coulés entre deux plaques de verre. Un peigne est placé entre les plaques. La polymérisation dure environ 2 heures. Une heure de prémigration à 63 Watts permet d'éliminer l'excès de l'APS contenu entre les mailles du gel. Un mélange contenant 5 µl de chaque échantillon préalablement amplifié et 5 µl de bleu de charge (Bleu dénaturant) pour alourdir l'ADN est préparé sur une microplaque. Ce mélange est dénaturé pendant 3 mn à 96°C sur l'appareil thermocycleur pour séparer les deux brins, puis laissé sur de la glace pendant les dépôts pour éviter la renaturation de l'ADN. Pour environ 60 individus, un prélèvement de 5 µl du mélange est déposé par puits. Les puits extérieurs



aux échantillons sont réservés à l'échelle de référence (ladder à 10 paires de bases). La migration de ces échantillons est assurée par le contact du gel avec du tampon TBE 0,5X. La migration dure 3 heures à 65 Watts à 50°C. Le bleu de bromophénol et le vert de xylèncyanol servent de contrôle de migration (vitesse et uniformité). Le temps de migration est fonction de la taille des fragments, plus ceux-ci sont petits plus ils migrent rapidement.

#### 25 Révélation du polymorphisme des individus du verger à graines.

La révélation du polymorphisme se fait par une coloration des fragments d'ADN au nitrate d'argent (voir Annexe 6). Les gels sont visualisés sur une table lumineuse, puis photographiés avec un appareil photo numérique (Nikon Coolpix 900) dont la disquette sert à transférer les images sur l'ordinateur.

### 3 Méthode d'analyse du polymorphisme moléculaire

#### 31 Lecture des gels.

La technique PCR utilisée avec les loci microsatellites donne des profils d'électrophorèse difficiles à lire. En effet, l'enzyme utilisée n'amplifie pas toujours la totalité du fragment. De ce fait il y a de nombreuses bandes parasites. Pour interpréter les gels il faut choisir les fragments les plus colorés. Les échantillons ayant 2 bandes intenses sont hétérozygotes, ceux qui en ont une seule bande sont homozygotes. La taille des bandes est repérée à partir d'une échelle de référence à 10 paires de bases.

#### 32 Interprétations des résultats.

##### *321 Distances génétiques.*

Dans notre cas, le calcul de la distance génétique entre deux individus a simplement pour but de montrer qu'il est possible de distinguer tous les arbres du verger avec seulement 5 loci microsatellites. En raison du volume des données (233 arbres et 131 allèles), il n'a pas été possible de trouver un logiciel permettant de calculer des distances individuelles tenant compte de la co-dominance (par exemple l'indice de Dice), ni de conserver tous les allèles. Il a été possible de calculer une distance génétique de Sokal et Michener (1958) en éliminant les allèles rares (1 seule présence) et en considérant que les marqueurs sont dominants (confondre les homozygotes et les heterozygotes).

La distance entre deux individus est :

$D_{ij} = 1 - m/n$  où  $m$  est le nombre de marqueurs communs + le nombre d'absences de marqueurs communes aux deux individus  $i$  et  $j$  et  $n$  est le nombre total de marqueurs étudiés dans le tableau de données.

Cette distance est ensuite utilisée pour construire un dendrogramme utilisant la méthode de Neighbor Joining qui visualisera la séparation de tous les arbres du verger.

### 322 Fréquences alléliques, taux d'hétérozygotie. indices de Ney.

Différents calculs peuvent être réalisés sur la population totale des arbres du verger, sur les individus regroupés pour les 11 descendances (T1, T2, T3, T8, T9, T12, T13, T14, T16, T18 et T19) ou pour les 5 provenances (Andranokobaka, Atherton, Tinaroo, Ravenshoe et Paluma) :

$H_o$  : Hétérozygotie observée ;

$A_o$  : Nombre observé d'allèles par locus ;

$H_e$  : Hétérozygotie attendue de Nei =  $1 - \sum_i p_i^2$  où  $p_i$  est la fréquence de l'allèle  $i$  ;

$A_e$  : Nombre efficace d'allèles =  $1 / 1 - H_e$  ;

$F$  : Déficit en hétérozygote =  $1 - H_o / H_e$  (Nei, 1987) ;

### 323 Structure spatiale des populations et "statistiques F de Wright".

Dans une population, plusieurs causes d'écart à la structure de Hardy-Weinberg peuvent se superposer. La population peut être structurée spatialement avec plusieurs sous-populations différenciées (Effet Wahlund) ; chaque population peut s'écarter de la structure de Hardy-Weinberg (régime de reproduction non panmictique par exemple). Pour décrire de telles situations Wright (1969) a défini le jeu de paramètres suivant :

-  $F_{IT}$  mesure l'écart global à la structure de Hardy-Weinberg dans l'ensemble ;

-  $F_{ST}$  mesure le déficit dû à la différenciation entre sous-populations ;

-  $F_{IS}$  mesure l'écart à la structure de Hardy Weinberg à l'intérieur des sous-populations ;

Les F-statistiques ont été calculées avec le logiciel Popgene Version 1.21 (Yeh *et al.* 1997) selon le modèle de Weir and Cockerman 1984.

A partir de ces estimations on montre que  $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS}) * (1 - F_{ST})$ .

Cette formule permet de séparer ce qui dans la structure génotypique revient à la structure

spatiale en sous-populations différenciées ( $F_{ST}$ ) et ce qui revient aux effets internes propres aux sous-populations ( $F_{IS}$ ). Ces paramètres permettent de décrire la structuration de la variabilité en dégageant les parts intra et part inter-populations de la variation totale.

## RÉSULTATS

### 1 Révélation du polymorphisme des individus du verger à graines.

La figure 1 présente une partie du polymorphisme observé aux 5 loci microsatellites testés lors de ce stage sur les arbres du verger d'*Eucalyptus grandis* à Andranokobaka. Les tableaux en Annexe 7 et Annexe 8 présentent la variation observée sur la taille des allèles et la variation individuelle des arbres du verger.

### 2 Interprétations des résultats.

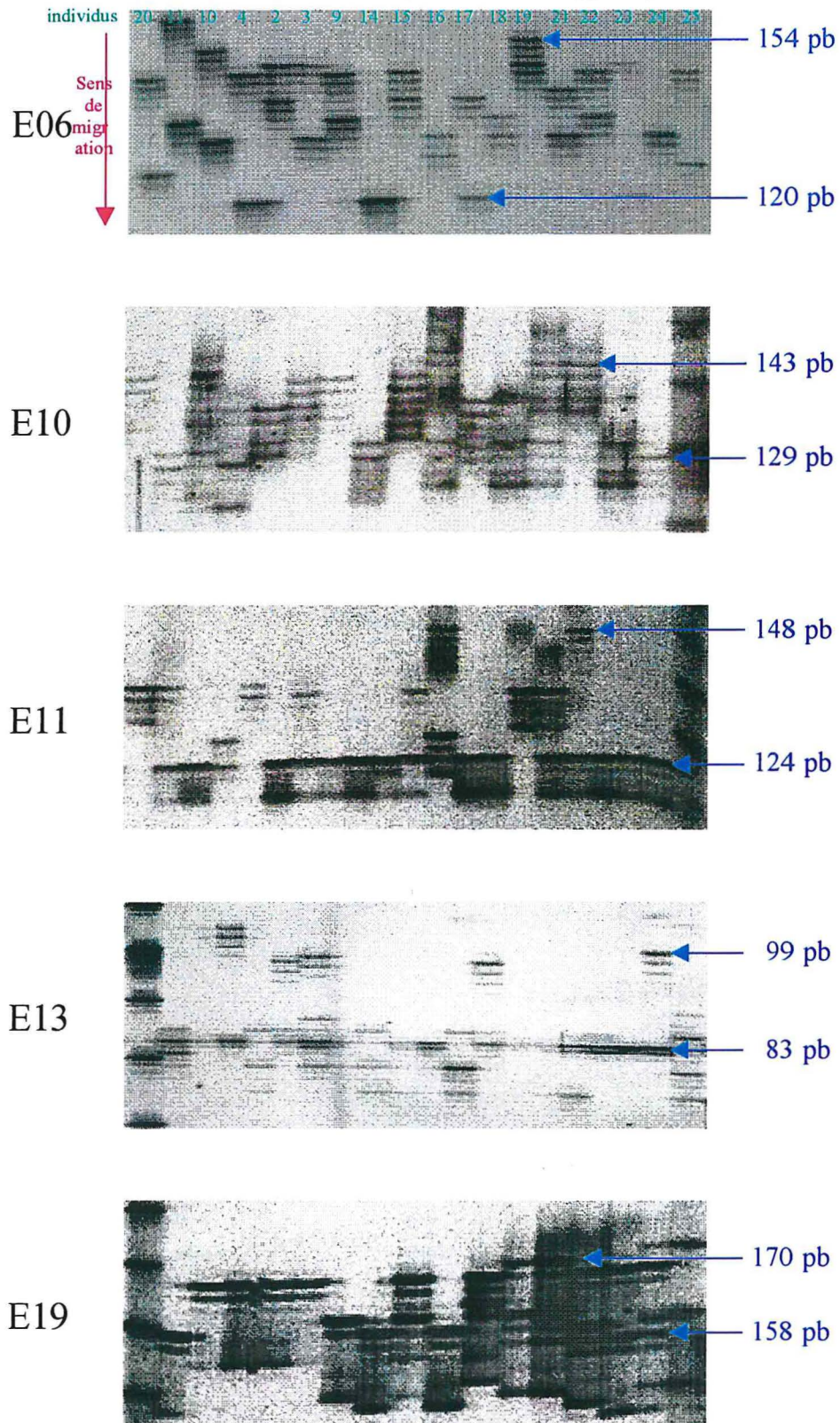
#### *Distances génétiques.*

Les distances génétiques calculées par la méthode de Sokal et Michener avec le logiciel NTSYS-pc (Rohlf 1995) permettent de tracer avec la méthode Neighbor Joining le dendrogramme présenté à la figure 2. Ce premier résultat montre que tous les arbres du verger se différencient par leurs génotypes avec seulement 5 loci microsatellites (Annexe 7 et figure 2). Ces empreintes génétiques sont essentielles pour la poursuite de l'étude, car elles vont permettre de rechercher les paternités sur les descendants de ce verger.

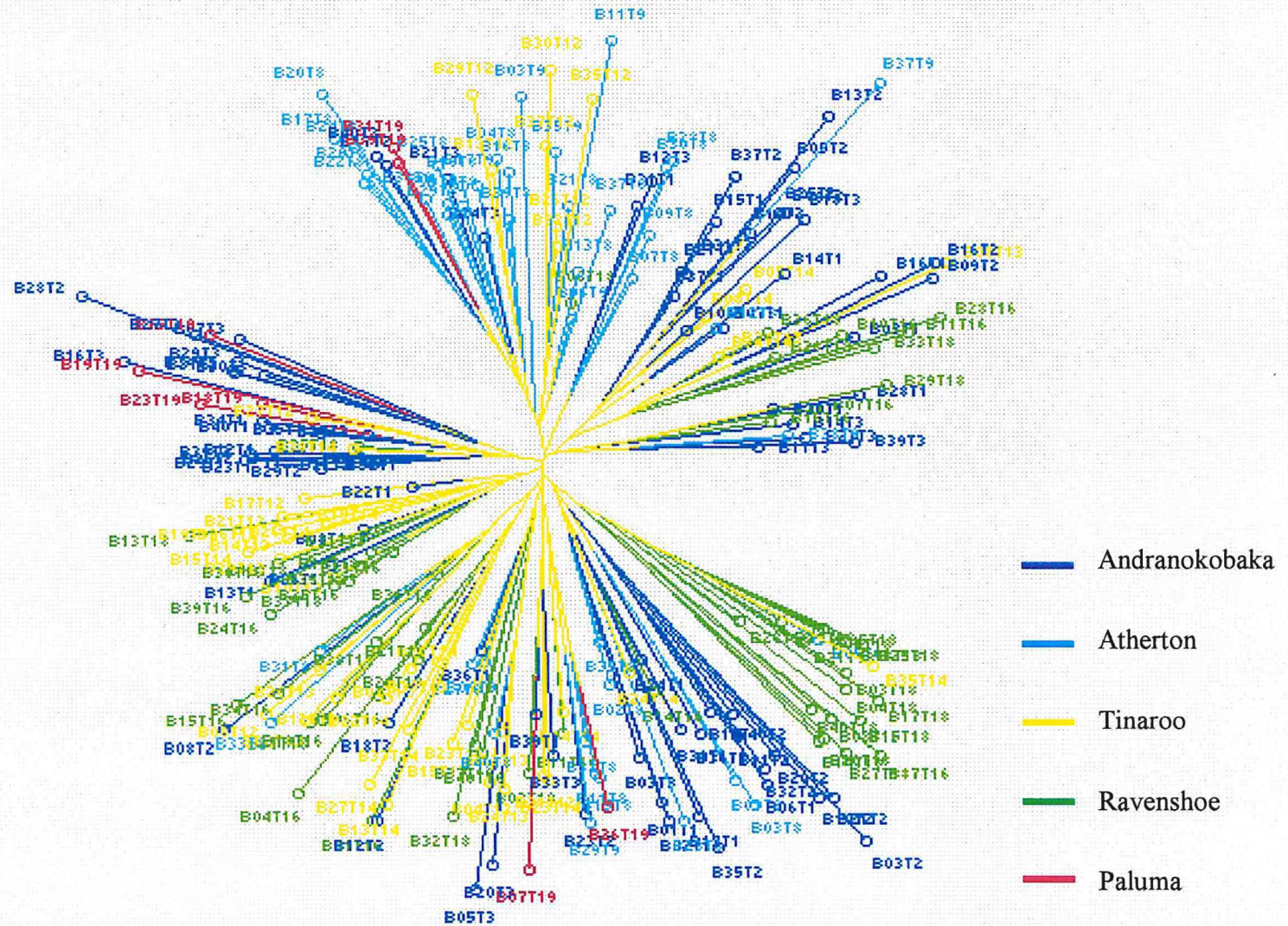
#### *Fréquences alléliques, taux d'hétérozygotie, indices de Ney.*

Le tableau 1 donne les principaux résultats et calculs obtenus à partir des allèles observés. Le nombre d'allèles observé varie de 15 (locus E19) à 39 (locus E10). Pour deux locus (E06 et E10), deux allèles ont une fréquence proche de 25 % (E06 : 120 = 26,7% et 132 = 21,5% ; E10 : 129 = 20,0% et 131 = 23,4%). Pour deux autres locus (E19 et E11), un seul allèle est représenté à près de 50 % (E19 : 168 = 49,1% et E11 : 124 = 51,7%). L'allèle 83 paires de bases du locus E13 a une fréquence de 34 % dans la population du verger à graines.

Figure 1 : Polymorphisme observé aux 5 loci microsatellites sur les arbres du verger à graines d'*Eucalyptus grandis*



**Figure 2 :** Dendrogramme obtenu par la méthode Neighbor Joining à partir des distances génétiques de Sokal et Michener sur les *Eucalyptus grandis* du verger à graines d'Andranokobaka



**Tableau 1** : Masse Moléculaire (Mw) en paires de bases, Nombre d'allèles (n) et fréquences observées sur l'ensemble de la parcelle d'*Eucalyptus grandis* pour chacun des loci microsatellites.

N°	E06			E10			E19			E11			E13		
	Mw	n	%	Mw	n	%	Mw	n	%	Mw	n	%	Mw	n	%
1	116	1	0.22	113	1	0.22	144	1	0.24	114	8	1.90	74	7	1.55
2	118	7	1.52	114	2	0.43	150	5	1.18	116	5	1.19	75	1	0.22
3	120	123	26.74	115	2	0.43	152	1	0.24	118	6	1.43	76	3	0.66
4	122	3	0.65	116	1	0.22	154	3	0.71	120	6	1.43	77	2	0.44
5	126	10	2.17	117	2	0.43	156	3	0.71	122	7	1.67	78	6	1.33
6	128	25	5.43	118	10	2.16	158	41	9.67	124	217	51.67	79	24	5.31
7	130	3	0.65	119	4	0.86	160	46	10.85	126	11	2.62	80	11	2.43
8	132	99	21.52	120	8	1.72	162	60	14.15	128	31	7.38	81	11	2.43
9	134	2	0.43	121	5	1.08	164	4	0.94	130	17	4.05	82	16	3.54
10	136	33	7.17	122	14	3.02	166	20	4.72	132	14	3.33	83	155	34.29
11	138	22	4.78	123	36	7.76	168	208	49.06	134	9	2.14	84	86	19.03
12	140	37	8.04	124	9	1.94	170	28	6.60	136	42	10.00	85	29	6.42
13	142	7	1.52	125	11	2.37	172	2	0.47	138	18	4.29	86	12	2.65
14	146	32	6.96	126	3	0.65	180	1	0.24	140	3	0.71	87	9	1.99
15	148	31	6.74	127	2	0.43	184	1	0.24	144	3	0.71	88	3	0.66
16	150	9	1.96	128	2	0.43				146	6	1.43	89	3	0.66
17	152	3	0.65	129	93	20.04				148	14	3.33	90	4	0.88
18	154	6	1.30	130	2	0.43				150	1	0.24	91	9	1.99
19	156	2	0.43	131	108	23.28				152	1	0.24	92	5	1.11
20	158	2	0.43	132	2	0.43				154	1	0.24	93	7	1.55
21	160	2	0.43	133	15	3.23							94	2	0.44
22	162	1	0.22	134	1	0.22							98	10	2.21
23				135	21	4.53							99	14	3.10
24				136	3	0.65							100	3	0.66
25				137	23	4.96							101	3	0.66
26				138	2	0.43							102	3	0.66
27				139	14	3.02							103	1	0.22
28				140	1	0.22							104	1	0.22
29				141	29	6.25							105	3	0.66
30				142	1	0.22							106	2	0.44
31				143	11	2.37							107	1	0.22
32				144	2	0.43							108	2	0.44
33				145	8	1.72							110	2	0.44
34				146	3	0.65							111	1	0.22
35				147	3	0.65							120	1	0.22
36				148	1	0.22									
37				149	7	1.51									
38				153	1	0.22									
39				154	1	0.22									
<b>Total</b>	460	100		464	100		424	100		420	100		452	100	

Les principaux résultats observés, notamment les mesures de déficience en hétérozygotes, sur la population totale, sur les populations regroupées en provenances ou analysées par descendances séparées sont présentés dans les tableaux 2 et 3.

Le déficit en hétérozygotes observé sur l'ensemble des arbres de la parcelle est faible ( $F = 0,06$ ) par rapport aux proportions attendues sous l'équilibre de Hardy Weinberg. Le déficit en hétérozygotes varie de 2 % pour les provenances d'Andranokobaka et Ravenshoe à 7 % pour la provenance d'Atherton. Les provenances de Tinaroo et de Paluma présentent un excès d'hétérozygotes respectivement de 3 et 5 %. Les résultats au niveau des loci marqueurs sont beaucoup plus variables puisqu'il existe un déficit en hétérozygotes de près de 40 % pour le marqueur E19 et un excès d'hétérozygotes de 11 % pour le locus E13.

L'observation des paramètres de diversité génétique sur les descendances montre un déficit en hétérozygotes variant de 2 % (T2) à 6 % (T3) et un excès en hétérozygotes de 2 % (T1) à 16 % (T13).

Lorsque l'on mélange des sous-populations panmictiques dont les fréquences alléliques sont différentes, on observe sur l'ensemble un déficit en hétérozygotes par rapport à la structure de Hardy Weinberg même si les sous-unités ont chacune la structure de Hardy-Weinberg. Cet effet lié à une structuration spatiale des populations, est appelé l'effet Wahlund. Pour l'ensemble des *Eucalyptus grandis* étudiés le déficit en hétérozygotes peut être dû à un effet Wahlund mais aussi lorsque les sous populations s'écartent de la structure de Hardy-Weinberg pour diverses raisons (régime de reproduction, consanguinité, sélection, dérive génétique...). Dans notre étude les sous populations (provenances ou descendances) présentent toutes des écarts plus ou moins importants entre les taux d'hétérozygotie observées et les taux d'hétérozygotie attendues.

#### *Structure spatiale des populations et "statistiques F de Wright".*

Les principaux résultats des calculs des F-statistiques sont présentés dans le tableau 4. Les résultats diffèrent légèrement en fonction des regroupements choisis. Ainsi il apparaît que les *Eucalyptus grandis* testés dans ce verger présentent un fort niveau de diversité et une forte différenciation entre populations. Le regroupement des arbres en 5 provenances montre que la part de variation lié à la structuration en sous populations représente près de 90 % de la variation totale. Une représentation de cette structuration est donné dans la figure 3.

**Tableau 2** : Paramètres de diversité génétique pour 5 loci microsatellites sur les 5 provenances d'*Eucalyptus grandis* testées dans le verger et sur le total des arbres.

Locus	Provenance	n	Ao	Ae	Ho	He	F	Test de neutralité (Probabilité)
E06	Andranokobaka	156	19	5.90	0.9103	0.8305	-0.096	0.28
	Atherton	88	14	5.07	0.8182	0.8027	-0.019	0.33
	Tinaroo	90	12	4.76	0.7778	0.7901	0.0156	0.39
	Ravenshoe	112	17	7.81	0.9286	0.8720	-0.0649	0.29
	Paluma	16	7	4.92	0.8750	0.7969	-0.0980	0.35
	<b>Total</b>	<b>462</b>	<b>22</b>	<b>6.88</b>	<b>0.8701</b>	<b>0.8545</b>	<b>-0.018</b>	<b>0.33</b>
E10	Andranokobaka	158	32	12.33	0.8861	0.9189	0.036	0.13
	Atherton	88	17	5.44	0.8182	0.8161	-0.0025	0.26
	Tinaroo	90	18	5.43	0.9556	0.8158	-0.1713	0.25
	Ravenshoe	112	25	5.30	0.8929	0.8114	-0.1004	0.16
	Paluma	16	7	4.57	0.6250	0.7812	0.2000	0.35
	<b>Total</b>	<b>464</b>	<b>39</b>	<b>8.70</b>	<b>0.8793</b>	<b>0.8850</b>	<b>0.006</b>	<b>0.15</b>
E11	Andranokobaka	142	16	2.76	0.5352	0.6373	0.160	0.34
	Atherton	86	11	2.00	0.4419	0.4995	0.1153	0.47
	Tinaroo	80	15	4.11	0.8250	0.7569	-0.0900	0.29
	Ravenshoe	96	13	5.22	0.7917	0.8084	0.0207	0.37
	Paluma	16	6	3.05	0.8750	0.6719	-0.3023	0.42
	<b>Total</b>	<b>420</b>	<b>20</b>	<b>3.44</b>	<b>0.6429</b>	<b>0.7093</b>	<b>0.094</b>	<b>0.36</b>
E13	Andranokobaka	158	23	5.29	0.9367	0.8108	-0.155	0.20
	Atherton	82	18	9.19	1.000	0.8911	-0.1222	0.24
	Tinaroo	84	17	4.58	0.8333	0.7817	-0.0660	0.24
	Ravenshoe	112	19	3.45	0.9107	0.7101	-0.2824	0.23
	Paluma	16	8	7.11	1.000	0.8594	-0.1636	0.28
	<b>Total</b>	<b>452</b>	<b>35</b>	<b>5.97</b>	<b>0.9248</b>	<b>0.8326</b>	<b>-0.111</b>	<b>0.18</b>
E19	Andranokobaka	150	12	3.67	0.5867	0.7276	0.194	0.49
	Atherton	84	9	2.26	0.2381	0.5575	0.5730	0.55
	Tinaroo	76	8	2.31	0.4211	0.5668	0.2572	0.59
	Ravenshoe	98	9	3.70	0.3265	0.7299	0.5526	0.56
	Paluma	16	5	3.28	0.6250	0.6953	0.1011	0.57
	<b>Total</b>	<b>424</b>	<b>15</b>	<b>3.46</b>	<b>0.4292</b>	<b>0.7112</b>	<b>0.397</b>	<b>0.48</b>
Tous loci	Andranokobaka	153	20.4	5.99	0.7710	0.7850	0.0178	-
	Atherton	86	13.8	4.79	0.663	0.7134	0.0706	-
	Tinaroo	84	14	4.24	0.7625	0.7423	-0.0276	-
	Ravenshoe	106	16.6	5.10	0.7701	0.7864	0.0207	-
	Paluma	16	6.6	4.59	0.8000	0.7609	-0.0513	-
<b>Total</b>	<b>444</b>	<b>26.2</b>	<b>5.69</b>	<b>0.7493</b>	<b>0.7985</b>	<b>0.06</b>		



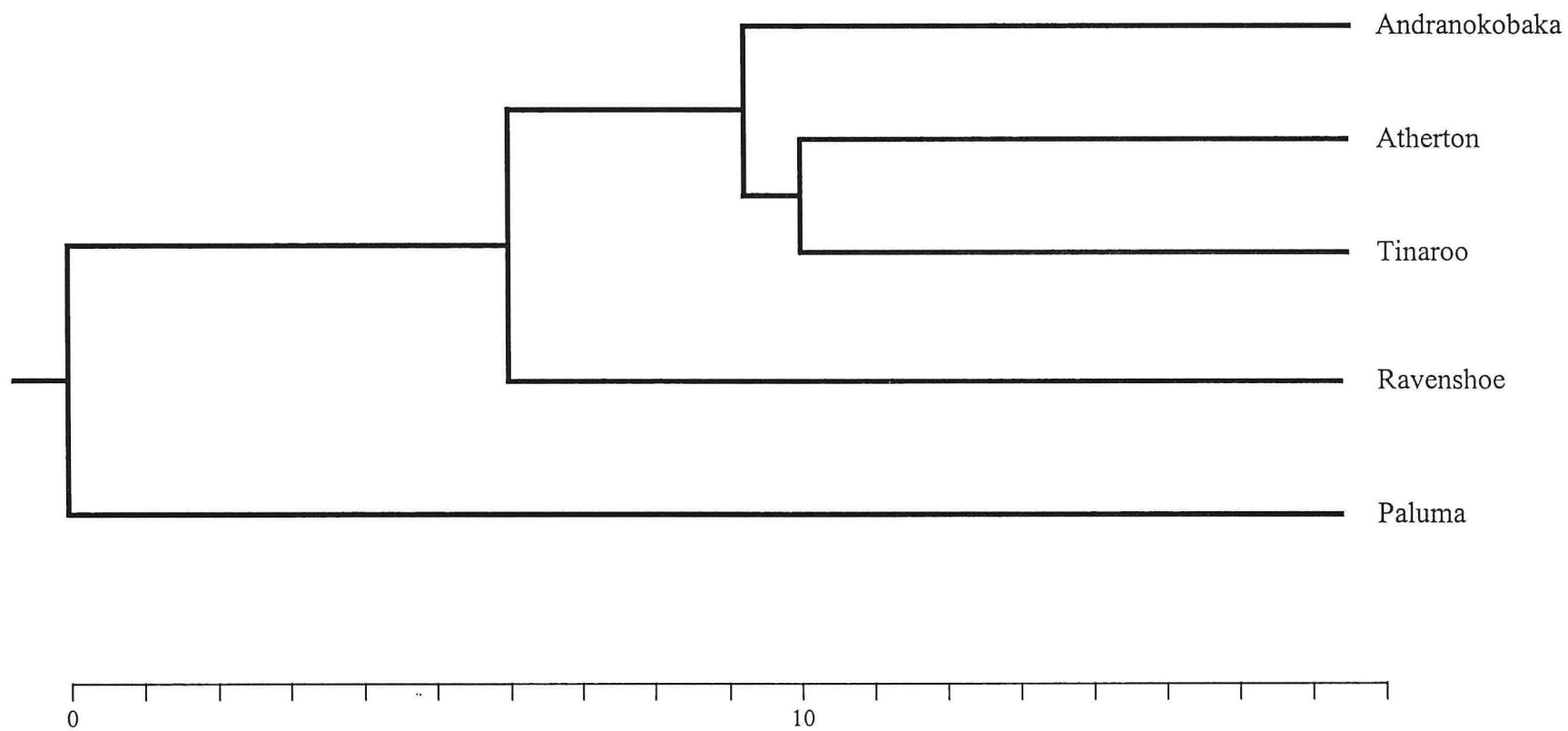
**Tableau 3 :** Paramètres de diversité génétique pour tous les loci microsatellites sur les 11 descendances libres plantées dans le verger d'Andranokobaka.

Traitements	n	Ao	Ae	Ho	He	F
Andranokobaka T1	58	12.2	4.73	0.7307	0.7194	-0.0157
Andranokobaka T2	53	13.6	5.63	0.7815	0.8094	0.0345
Andranokobaka T3	41	11.8	5.81	0.8138	0.7653	-0.0634
Atherton T8	69	12.2	4.48	0.6489	0.6885	0.0575
Atherton T9	17	7.2	4.68	0.7222	0.7060	-0.0229
Tinaroo T12	30	8.4	3.80	0.7523	0.7033	-0.0697
Tinaroo T13	24	7.2	3.89	0.8551	0.7344	-0.1644
Tinaroo T14	30	7.8	3.85	0.6991	0.6486	-0.0779
Ravenshoe T16	42	11.2	5.06	0.7751	0.7869	0.0150
Ravenshoe T18	64	13.4	4.29	0.7665	0.7513	-0.0202
Paluma T19	16	6.6	4.59	0.8000	0.7609	-0.0514
<b>Total</b>	<b>444</b>	<b>26.2</b>	<b>5.69</b>	<b>0.7493</b>	<b>0.7985</b>	<b>0.0616</b>

**Tableau 4 :** F-Statistiques pour tous les loci. :  $F_{IT}$  mesure l'écart global à la structure de Hardy-Weinberg dans l'ensemble ;  $F_{ST}$  mesure le déficit dû à la différenciation entre sous-populations ;  $F_{IS}$  mesure l'écart à la structure de Hardy Weinberg à l'intérieur des sous-populations.

Regroupement par descendances (11 groupes)	N	Fis	Fit	Fst
E06	462	-0.0942	-0.0069	0.0798
E10	464	-0.0568	0.0202	0.0729
E19	424	0.2623	0.3430	0.1094
E11	420	-0.0442	0.0653	0.1049
E13	452	-0.1750	-0.0888	0.0734
<b>Total</b>	<b>444</b>	<b>-0.0323</b>	<b>0.0572</b>	<b>0.0867</b>
Regroupement par provenances (5 groupes)	N	Fis	Fit	Fst
E06	462	-0.0532	-0.0067	0.0441
E10	464	-0.0083	0.0574	0.0652
E19	424	0.3295	0.3809	0.0767
E11	420	-0.0281	0.0341	0.0605
E13	452	-0.1548	-0.0907	0.0555
<b>Total</b>	<b>444</b>	<b>0.0068</b>	<b>0.0663</b>	<b>0.0599</b>

Figure 3 : Dendrogramme basé sur les distances génétiques de Nei (1978) : méthode UPGMA pour 5 provenances d'*Eucalyptus grandis*.



## CONCLUSIONS

Le stage a été l'occasion de mettre au point un protocole d'amplification et de révélation du polymorphisme de séquences microsatellites adapté aux *Eucalyptus*. Cette méthodologie sera à l'avenir utilisée par le laboratoire de génétique du programme Arbres et Plantations du CIRAD-Forêt. Même si la technique est difficile à maîtriser, elle permet cependant de révéler rapidement le polymorphisme très élevé de ces régions particulières du génome des espèces forestières. Les gels de migration sont suffisamment grands pour permettre d'obtenir les empreintes génétiques pour une soixantaine d'individus. La prochaine étape pour une meilleure maîtrise de l'utilisation de ces marqueurs pourrait être le mélange des allèles de taille très différentes afin de lire directement deux séquences amplifiées par individu.

Le typage de 243 arbres du verger et l'identification possible de chaque individu à l'aide de seulement 5 loci microsatellites montrent que le polymorphisme observé dans ces séquences est très élevé chez les *Eucalyptus*. Les résultats obtenus concernant les déficits en hétérozygotes sont voisins de ceux obtenus avec le chêne (Streff, 1998). Ainsi pour l'*Eucalyptus grandis* le déficit en hétérozygotes est de 0,06, il est de 0,06 pour le *Quercus petrae* et de 0,08 pour le *Quercus robur*.

Les analyses de structuration au niveau d'un peuplement naturel sont difficilement comparables quantitativement entre espèces en raison de l'hétérogénéité des échantillonnages, des densités de populations, des classes d'âge et des statistiques utilisées. Cependant la plupart des travaux détectent une structuration intrapopulation faible voire aléatoire de la diversité génétique. La faible organisation spatiale est expliquée par les capacités de dispersion fortes des graines ou du pollen de ces espèces allogames. L'essai d'Andranokobaka a été planté à partir de graines récoltées sans sélection dans l'aire naturelle de l'espèce. La variabilité observée dans cet essai au niveau de marqueurs neutres est réalisée sur un échantillon représentatif de la variabilité naturelle de l'espèce. Le résultat obtenu avec les *Eucalyptus* est donc similaire à ces études puisque la plus grande part de variation a été trouvée inter populations.

Cette première étude sera poursuivie par l'étude de 50 descendants de 11 arbres du verger à graines choisis comme arbres mères. La connaissance des empreintes génétiques de chaque arbre du verger facilitera les recherches de paternité dans l'étude des descendance. Connaissant le génome maternel au niveau des loci microsatellites, il devrait être possible d'identifier l'arbre ayant fourni le pollen pour la fécondation des ovules maternels. Ces études aboutiront à une meilleure connaissance des

mécanismes de reproduction dans les vergers à graines. A terme il deviendra possible de définir des règles sylvicoles favorisant la recombinaison et assurant une production de variétés plus productives et plus homogènes.

## Bibliographie

- Brondani R. P. V., Campinhos E. N. and Grattapaglia D. (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*.
- Byrne M., Murrell J. C., Allen B. and Moran G. F. (1995) An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* **91** (6-7) : 869-875.
- Byrne M., Murrell J. C., Owen J. V., Kriedemann P., Williams E. R. and Moran G. F. (1997) Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens*. *Theoretical and Applied Genetics* **94** (5) : 674-681.
- Grattapaglia D., Bertolucci F. L. and Sederoff R. R. (1995) Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **90** (7-8) : 933-947.
- Grattapaglia D. and Sederoff R. (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* **137** (4) : 1121-1137.
- Griffin A. R., Moran G. F. and Frupp Y. J. (1987) Preferential outcrossing in *Eucalyptus regnans* F. Muell." *Australian Journal of Botany* **35** (4) : 465-475.
- Hodge G. R., Volker P. W., Potts B. M. and Owen J. V. (1996) A comparison of genetic information from open-pollinated and control-pollinated progeny tests in two eucalypt species. *Theoretical and Applied Genetics* **92** (1) : 53-63.
- House A. P. N. and Bell J. C. (1994) Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. *Silvae Genetica* **43** (2-3) : 167-176.
- House A. P. N. and Bell J. C. (1996) Genetic diversity, mating system and systematic relationships in two red mahoganies, *Eucalyptus pellita* and *E. scias*. *Australian Journal of Botany* **44** (2) : 157-174.
- Leite S. M. M., Bonine C. A., Lopes C. R., Mori E. S. Valle C. F. and Marino C. L. (1997) Genetic variation within a base population of *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden using RAPD markers. *Proceedings of the IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts. Salvador Brazil August 24 to 29, 1997. Vol 2* : Biotechnology applied to genetic improvement of trees species : 71-74.
- Moran G. F., Bell J. C. and Griffin A. R. (1989) Reduction in levels of inbreeding in a seed orchard of *Eucalyptus regnans* F. Muell. compared with natural populations. *Silvae Genetica* **38** (1) : 32-36.
- Pryor L. D. (1976) The biology of eucalypts. Arnold, London.
- Nei M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York.
- Rohlf F. J. (1995) NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.80
- Saghai-Marouf M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A. and Allard R. W. (1984) Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley : Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81** : 8014-8018.
- Sokal R. R. and Michener C. D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* **38** : 1409-1438.
- Streiff R. (1998) Structure génétique spatiale et flux polliniques dans une chênaie mixte : *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus robur* L. Thèse de l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du

Languedoc.

Verhaegen D. and Plomion C. (1996) Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. *Genome* **39** : 1051-1096.

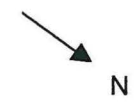
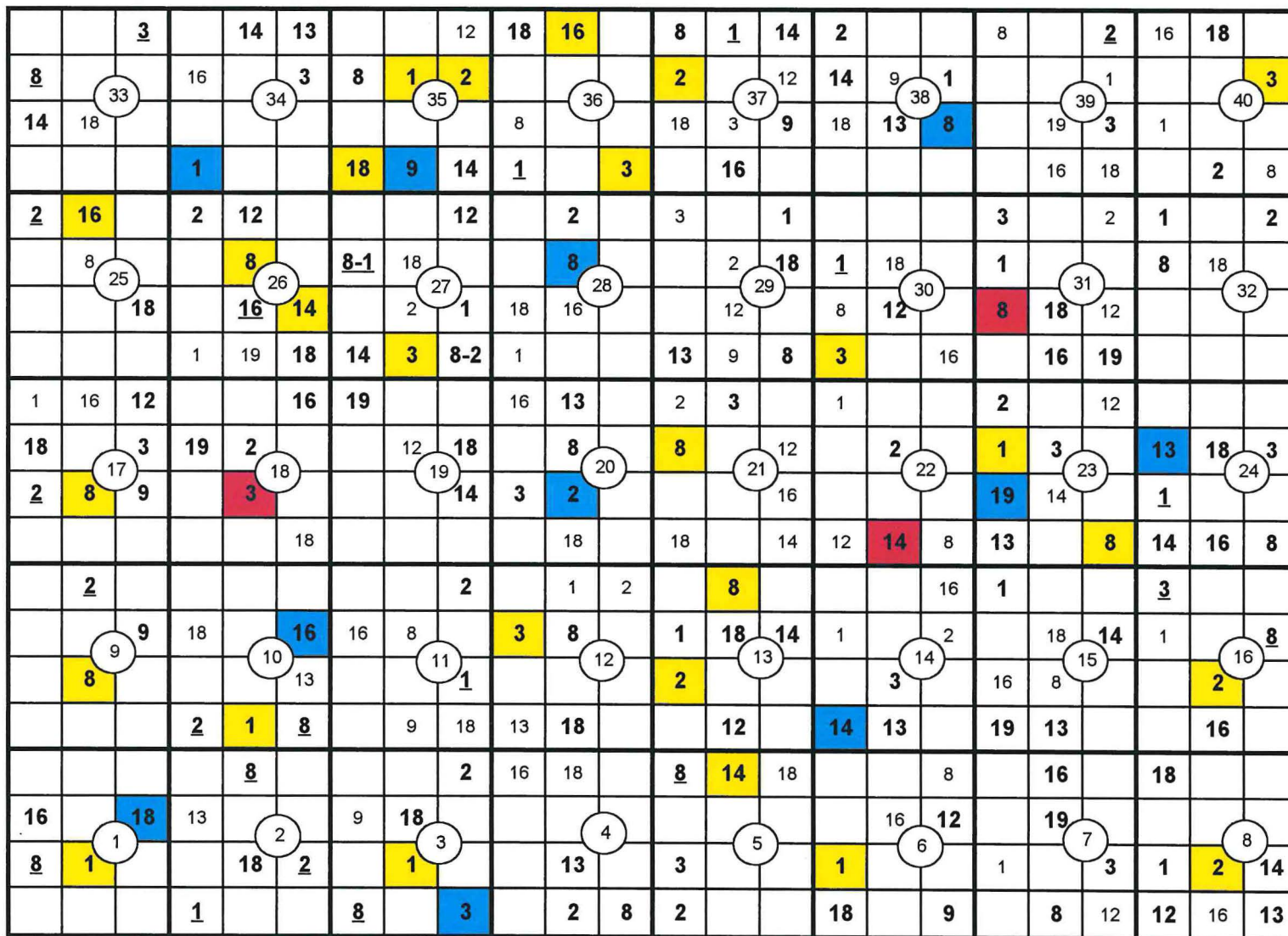
Verhaegen D., Plomion C., Gion J. M., Poitel M., Costa P. and Kremer A. (1997) Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers : 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. *Theoretical and Applied Genetics* **95** (4) : 597-608.

Weir B. S. and Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38** : 1358-1370.

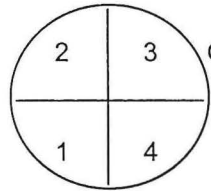
Wright S. (1969) *Evolution and the Genetics of Populations. Vol 2. The Theory of Genes Frequencies.* University of Chicago Press, Chicago.

Yeh F.C. Yang R-C. and Boyle T. (1997) Popgene Version 1.21. Microsoft Window-based Freeware for population Genetic analysis.

## ANNEXES



- 1 11 arbres récoltés (ATP)
- 1 27 arbres récoltés (étude totale)
- 14 3 arbres récoltés et retenus pour la pollinisation contrôlée
- 13 Fruits au sommet des arbres
- 1 Arbres récoltables
- 14 Sans fruits de l'année



Codification de récolte

Plantation le 29/01/87  
 Plantation bordures le 02/02/87  
 Ecartement 3 x 3 mètre  
 Engrais 200g NPKZn (8-16-24-2),  
 + 50 g d'urée/trou le 23/01/87  
 Dispositif en bloc monoarbre  
 12 traitements, 40 blocs  
 2 lignes de plantation en bordure  
 Surface totale 0,6 ha

40 Numéro de bloc

Trait	N° lot	Provenance	Pays	Long	Latitude	Altitude
1	86027	Andranokobaka	Madagascar	48°14'E	18°56'E	900
2	86034	Andranokobaka	Madagascar	48°14'E	18°56'E	900
3	86055	Andranokobaka	Madagascar	48°14'E	18°56'E	900
5	80/2757N	Sf 185, E Atherton	Australie Qld	148°31'E	21°16'S	720
8	80/3033N	Sf 185, E Atherton	Australie Qld	145°42'E	17°15'S	700
9	80/3034N	Sf 185, E Atherton	Australie Qld	145°42'E	17°15'S	700
12	80/3041N	Tinaroo falls down	Australie Qld	145°36'E	17°11'S	800
13	80/3044N	Tinaroo falls down	Australie Qld	145°36'E	17°11'S	800
14	80/3046N	Tinaroo falls down	Australie Qld	145°36'E	17°11'S	800
16	80/3054N	SO Ravenshoe	Australie Qld	145°28'E	17°42'S	940
18	80/3056N	SO Ravenshoe	Australie Qld	145°28'E	17°42'S	940
19	84/4555N	O Paluma	Australie Qld	146°08'E	19°01'S	920



**Annexe 2 : Protocoles d'extraction de l'ADN méthode du kit Qiagene et méthode de Saghai-Marooif.**

**Extraction par méthode mini KIT QUIAGEN:**

Lyse des cellules :

- Peser 50mg de feuilles séchées
- couper les échantillons en petits morceaux et lmes mettre dans les mortiers
- Ajouter de l'azote liquide et broyer en fine poudre. Ne pas laisser les échantillons décongeler
- Quand l'azote est évaporé, ajouter 400µl de tampon AP1, le tampon peut congeler si le mortier est trop froid. Dans ce cas attendre la décongélation.
- Transférer dans un tube de 1,5 ml
- ajouter 4µl de Rnase
- vortexer vigoureusement
- laisser incuber 10mn à 65°C (bain-marie). Mélanger 2 ou 3 fois par inversion

Précipitation des protéines polysaccharides et détergent :

- Ajouter au mélange 130µl de tampon AP2
- mélanger au vortexe
- incuber 1 mn dans la glace

Elimination des débris et précipités

- centrifuger le mélange 5mn à vitesse maximale
- verser la surnageant dans une colonne violette
- centrifuger 2mn à vitesse maximale
- Transférer le filtrat dans tube de 1.5ml (non fourni) à la pipette. Estimer le volume recueilli

Purification sur résine :

- Ajouter 0,5 volume de tampon et 1 volume d'éthanol 100% dans le filtrat
- mélanger par aspirations-refoulement à la pipette
- déposer un volume d'échantillon de 650µl maximum sur une colonne blanche
- centrifuger 1 mn à vitesse  $\geq 6000xg$
- Eliminer le liquide du tube. Si l'échantillon avait un volume  $>650\mu l$ , repasser la reste sur la même colonne blanche
- placer les colonnes sur des nouveaux tubes de 2 ml fournis (jeter les anciens)

Lavage:

- mettre 500µl de tampon AW sur chaque colonne
- centrifuger 1mn à vitesse  $\geq 6000xg$
- éliminer le liquide du tube, puis y replacer la colonne
- remettre 500µl de tampon AW sur chaque colonne
- Centrifuger 2 mn à vitesse maximale. La colonne doit sécher
- Retirer précautionneusement les colonnes des tubes sans que la membrane ne touche le liquide, et les placer sur des tubes de 1,5ml.

Elution:

- ajouter 100µl de tampon AE à 65°C sur chaque colonne
- laisser au minimum 5 mn à 65°C au bain-marie (attention à ce que des gouttes ne tombent pas sur les capuchons)
- centrifuger 1 mn à vitesse  $\geq 6000xg$
- Récupère l'éluat et s'en servir une seconde élution (répéter les opérations ci-dessus)

Conservier la solution ainsi réalisée à 4°C (quelques jours ou à - 20°C (si plus longtemps) en attendant le dosage

## Extraction par méthode de Saghai-Marroof.

### Extraction:

L'ADN est extrait avec un protocole standard modifié (Saghai-Marroof et al 1984). Approximativement 300mg de feuilles séchées sont broyées dans un mortier en présence d'azote liquide et de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) insoluble, la poudre obtenue est introduite dans les tubes de 15ml contenant de 9ml tampon d'extraction (détail tableau). Le mélange est placé à 65°C, 90mn sous agitation lente le choc thermique facilite la lyse des cellules

Solution de tampon d'extraction : (conservation à 4°C)

Produit	Poids moléculaire	stock	quantité utilisée	Action
NaCl 5M	58,5	292,5g dissout dans 1L d'eau à froid	280 ml	précipite l'ADN
TRIS HCL 1M pH8		121,1g dissout dans 1L d'eau	100 ml	tamponne la solution
EDTA, 2H <sub>2</sub> O 0,5M pH8 (Éthylène Diamine Tétracétique)				Inhibe la dégradation de l'ADN en chélatant Mg <sup>++</sup> cofacteur d'ADNases
ATMAB (Bromure d'Alkyl Triméthyl Ammonium)			20 g	complexe les polysaccharides et les protéines libérées lors du broyage
Chauffer pour permettre la dissolution de l'ATMAB à 65°C ; H <sub>2</sub> O qsp.1000ml Autoclaver				

Au moment de l'emploi ajouter : Mercaptoéthanol 0,1% (hotte aspirante)

PVPP soluble 1% (antioxydant)

### Deprotéinisation:

Après refroidissement des tubes, 4.5ml de dichloromethane sont additionnés, puis centrifugés 10mn à 1620xg à température ambiante. La phase aqueuse contenant de l'ADN et de l'ARN, des polysaccharides, des parois cellulaires des pigments est prélevée à l'aide d'une pipette poire sans toucher l'interphase blanche constitué de protéines et de PVPP, puis déposer dans un tube de 15ml et émulsionnée à nouveau avec 4.5ml de dichloromethane. Cette étape est répétée une 2ème fois. Ensuite on élimine l'ARN par l'addition de 2µl de ribonucléase A 2.5U (1µl=1µg) incubée 30mn au bain-marie à 37° sous agitation

### Précipitation de l'ADN :

6ml d'isopropanol froid est ajouté pour favoriser l'apparition de la pelote d'ADN et laissé une nuit en chambre froide. Après 10mn de centrifugation à 1620xg. Le culot d'ADN est séché au speed-vac pour éliminer toute trace d'alcool. La pelote d'ADN séchée est dissout pendant 2heures après l'addition de 1ml de tampon de stockage sous douce agitation. On peut faciliter la dissolution en chauffant à 65°C.

### Purification:

L'ADN est précipité par l'addition de 50µl de NaCl 5M et 2.5ml d'éthanol absolu, puis Centrifugé pendant 10mn à 1620xg (3000T/mn). Eliminer le surnageant en ajoutant à la pelote d'ADN 4 à 5ml de solution de lavage 1 et après 20mn centrifuger 10mn à 3000T/mn. Garder les culots en égouttant par inclinaison des tubes. Puis effectuer un 2ème rinçage avec 2ml de solution de lavage 2 et mélanger doucement. Le mélange est centrifugé 10mn à 3000T/mn, à température

ambiante puis éliminer le surnageant, puis laver uniquement le culot à l'éthanol à 76° pendant 10mn. Après une dernière centrifugation, éliminer le surnageant. Sécher l'ADN au speed- vac (30' à 40°C), l'ADN est dissout dans de l'eau stérile dont la quantité dépend de la grosseur du culot. La solution d'ADN peut être conservée au congélateur -20°C avant le dosage.

**Solution de tampon d'extraction :** (conservation à 4°C)

Produit	Poids moléculaire	stock	quantité utilisée	Action
NaCl 5M	58,5	292,5g dissout dans 1L d'eau à froid	280ml	précipite l'ADN
TRIS HCL 1M pH8		121,1g dissout dans 1L d'eau	100ml	tamponne la solution
EDTA, 2H <sub>2</sub> O 0,5M pH8 (Éthylène Diamine Tétracétique)				Inhibe la dégradation de l'ADN en chélatant Mg <sup>2++</sup> cofacteur d'ADNases
ATMAB (Bromure d'Alkyl Triméthyl Ammonium)			20g	complexe les polysaccharides et les protéines libérées lors du broyage
Chauffer pour permettre la dissolution de l'ATMAB à 65°C H <sub>2</sub> O qsp.1000ml Autoclaver				

Au moment de l'emploi ajouter : Mercaptoéthanol 0,1% (hotte aspirante)  
PVPP soluble 1% (antioxydant)

**ARNase T1=Ribonucléase(conservation à -20°C) :**

5ml ARNase pancréatique 10mg/ml soit 0.88U/μl sont dissous dans une solution d'acétate de sodium 0,01M (pH5.2). Chauffer à 100°C pendant 15'. Laisser refroidir à température ambiante. Ajuster le pH en ajoutant 0,1 volume de Tris Hcl (pH4, 7).

**Solution des tampons de lavage 1, de lavage 2 et de stockage :**

PRODUIT	PM	lavage 1	lavage 2	stockage
Ethanol 95°		79,5 ml	79,2 ml	
NaOAc(acétate de sodium) 2,5M	82,03	8 ml		
NH <sub>4</sub> OAc(Acétate d'ammonium)	77,08		1ml	2 ml
EDTA 0,1M				1 ml
H <sub>2</sub> O qsp		100 ml	100 ml	1000 ml

EDTA 0,1M pH8

Diluer au 1/5e la solution d'EDTA ,2H<sub>2</sub>O 0,5M pH 8 utilisée pour le tampon d'extraction . Autoclaver.

NH<sub>4</sub>OAc 5M

PM= 77,08

Pour 100ml : peser 38,54g d'acétate d'ammonium. Dissoudre dans de l'eau distillée, ajuster et compléter à 100ml. Autoclaver

### Annexe 3 : Résultats des dosages d'ADN après extraction

N	Bloc	Trait	Extr	[ADN] ng/μl	N	Bloc	Trait	Extr	[ADN] ng/μl
1	1	1	3K	4	67	13	2	1K	4.9
2	1	8	1K	3.3	68	13	8	3K	8
3	1	16	1K	5.6	69	13	12	1K	8.3
4	1	18	L	60	70	13	14	1K	17.3
5	2	1	3K	4	71	13	18	1K	11.4
6	2	2	3K	1.5	72	14	1	1K	22.7
7	2	8	3k	4	73	14	2	1K	12.1
8	2	13	1K	3.5	74	14	3	1K	6.3
9	2	18	1K	3.8	75	14	13	1K	3
10	3	1	L	20	76	14	14	1K	15.1
11	3	2	L	25	77	14	16	1K	14.7
12	3	3	3K	4	78	15	1	L	125.1
13	3	8	1K	4.1	79	15	8	1K	12.6
14	3	9	1K	6.1	80	15	13	1K	4.8
15	3	18	1K	7.4	81	15	14	1K	5
16	4	2	1K	25.8	82	15	16	1K	5.4
17	4	8	1K	19.2	83	15	18	1K	5.3
18	4	13	1K	29.6	84	15	19	L	120.3
19	4	16	1K	3.6	85	16	1	1K	3
20	4	18	1K	15.5	86	16	2	1K	4.5
21	5	2	1K	8.5	87	16	3	1K	5
22	5	3	1K	10.1	88	16	8	1K	10
23	5	8	1K	18.4	89	16	16	2K	7
24	5	14	1K	16.4	90	17	1	1K	29.9
25	5	18	1K	15.1	91	17	2	1K	20.8
26	6	1	1K	3	92	17	3	2K	5
27	6	8	1K	15.9	93	17	8	1K	12.1
28	6	9	1K	15.1	94	17	9	1K	14.9
29	6	12	1K	5.6	95	17	12	1K	16.5
30	6	16	1K	23.9	96	17	16	1K	15.3
31	6	18	1K	25.2	97	17	18	1K	16.4
32	7	1	1K	15.1	98	18	2	1K	17.5
33	7	3	1K	3.6	99	18	3	1K	16.3
34	7	8	1K	3.4	100	18	16	2K	6
35	7	12	1K	5	101	18	18	1K	10.4
36	7	16	1K	5	102	18	19	1K	12.5
37	7	19	1K	4.3	103	19	12	1K	21.7
38	8	1	1K	6	104	19	14	1K	14.8
39	8	2	1K	7	105	19	18	1K	16.9
40	8	12	1K	6	106	19	19	1K	3.5
41	8	13	1K	3.8	107	20	2	1K	3
42	8	14	1K	19.4	108	20	3	1K	13.6
43	8	16	2K	12	109	20	8	1K	5.2
44	8	18	3K	5	110	20	13	1K	4.1
45	9	2	1K	6.6	111	20	16	3K	1
46	9	8	1K	3.9	112	20	18	1K	5.1
47	9	9	1K	5.2	113	21	2	3K	5
48	10	1	1K	18.3	114	21	3	1K	15.6
49	10	2	1K	8.3	115	21	8	1K	10
50	10	8	1K	12	116	21	12	1K	20.8
51	10	13	1K	26.5	117	21	14	1K	12.3
52	10	16	1K	21	118	21	16	1K	22.5
53	10	18	1K	20.5	119	21	18	1K	29
54	11	1	1K	22	120	22	1	1K	19.7
55	11	2	1K	17.2	121	22	2	1K	15.7
56	11	8	1K	21.3	122	22	8	1K	7.9
57	11	9	1K	7.6	123	22	12	1K	11.8
58	11	16	3k	4	124	22	14	1K	3.5
59	11	18	1K	11.8	125	23	1	3k	5
60	12	1	1K	20.8	126	23	2	L	90
61	12	2	1K	15.3	127	23	3	1K	4.6
62	12	3	1K	13.4	128	23	8	1K	3.1
63	12	8	3K	8	129	23	12	L	75
64	12	13	1K	8.1	130	23	13	L	134.7
65	12	18	1K	15	131	23	14	3K	5
66	13	1	1K	130.8	132	23	19	3K	5

N	Bloc	Trait	Extr	[ADN] ng/μl	N	Bloc	Trait	Extr	[ADN] ng/μl
133	24	1	L	153	202	35	2	1K	17.6
134	24	3	L	138	203	35	8	1K	12.5
135	24	8	L	156.6	204	35	9	1K	12.6
136	24	13	L	113.7	205	35	12	1K	9.6
137	24	14	1K	4.4	206	35	14	1K	18.6
138	24	16	1K	5.5	207	35	18	1K	11.7
139	24	18	3K	5	208	36	1	1K	17.6
140	25	2	1K	14.5	209	36	3	L	100
141	25	8	1K	23.1	210	36	8	1K	18
142	25	16	1K	17.1	211	36	16	3K	4
143	25	18	1K	12.6	212	36	18	1K	26.7
144	26	1	1K	16.9	213	37	1	1K	12.9
145	26	2	1K	14.3	214	37	2	1K	14.8
146	26	8	1K	18.6	215	37	3	1K	8.1
147	26	12	1K	28.7	216	37	8	1K	29.6
148	26	14	1K	12.7	217	37	9	1K	9.7
149	26	16	3K	2	218	37	12	3K	4
150	26	18	1K	17	220	37	14	3K	0.5
151	26	19	1K	10.1	221	37	16	L	25
152	27	1	1K	28.1	222	37	18	1K	7.9
153	27	2	1K	14.1	223	38	1	1K	17.7
154	27	3	1K	21.3	224	38	2	3K	1.2
155	27	8 1	3K	8	225	38	8	L	45
156	27	8-2	3K	1	226	38	9	1K	5.3
157	27	12	1K	19.4	227	38	13	2K	15.7
158	27	14	1K	6.2	228	38	14	3K	8
159	27	18	1K	3.5	229	38	18	L	40
160	28	1	1K	9.2	230	39	1	1K	23.1
161	28	2	1K	20.1	231	39	2	1K	10.3
162	28	8	1K	8.4	232	39	3	1K	6.3
163	28	16	1K	3.6	233	39	8	1K	6.2
164	28	18	1K	10	234	39	16	1K	6.4
165	29	1	1K	16.7	235	39	18	1K	13.8
166	29	2	1K	11.3	236	39	19	1K	13.7
167	29	3	1K	9.7	237	40	1	1K	15.8
168	29	8	1K	11.4	238	40	2	1K	8.1
169	29	9	1K	13.2	239	40	3	1K	13.5
170	29	12	1K	14	240	40	8	1K	20.5
171	29	13	1K	13.4	241	40	16	1K	20.5
172	29	18	1K	9.3	242	40	18	1K	11.7
173	30	1	1K	10.2	243	14	18	1K	9.9
174	30	3	L	25					
175	30	8	1K	7.1					
176	30	12	1K	5.7					
177	30	16	L	114					
178	30	18	3K	2					
179	31	1	1K	3.8					
180	31	2	1K	17.6					
181	31	3	3K	1					
182	31	8	1K	6					
183	31	12	1K	7					
184	31	16	1K	17					
185	31	18	1K	10					
186	31	19	3K	6					
187	32	1	1K	7					
188	32	2	1K	10					
189	32	8	1K	12					
190	32	18	L	105					
191	33	3	L	103.5					
192	33	8	1K	3.5					
193	33	14	1K	6.5					
194	33	18	1K	6.4					
195	34	1	1K	14.8					
196	34	3	1K	6.7					
197	34	13	1K	23.3					
198	34	14	1K	20.1					
199	34	16	1K	3.8					
201	35	1	1K	22.2					

## Annexe 4 : Protocole de dosage de l'ADN et d'électrophorèse en gel d'agarose

### Protocole de dosage de l'ADN

#### Tampon TNE (Tris sodium EDTA) :

Produit	PM	[finale]	Pour 1L
TRIS base	(PM 121,14)	10mM	1,211g
Nacl	(PM 58,44)	1M	58,44g
EDTA Na <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	(PM 372,2)	1mM	0,372g
H <sub>2</sub> O pure	qsp.1L		

#### SOLUTION HOECHST 200ng/ml :

Cette solution doit être fraîchement préparée à partir de la solution HOECHST à 1mg/ml. Prévoir la quantité nécessaire et suffisante pour l'étalonnage et le dosage (3ml/échantillon). TOXIQUE

TNE filtré, pH 7,3      100ml      200ml

HOECHST 1mg/ml      20µl      40µl

Ne pas autoclaver. Mettre à l'abri.

#### SOLUTION DE CALF THYMUS 1mg/ml (1000ng/µl) (conservation à +4°C)

Etalonnage du fluorimètre en concentration directe

Faire un gamme étalon avec le Calf thymus. On choisira les points de gamme en fonction de la méthode d'extraction utilisée

Concentration en (ng/µl) : 300    200    100    50    25

Pour 100µl

Eau pure (µl)                      70    80    90    95    2.5

Calf thymus (µl)                    30    20    10    5    97,5

#### ETALONNAGE

HOECHST 200ng/ml      3ml

Calf thymus étalon      3µl

#### DOSAGE

HOECHST 200ng/µl      3ml

Echantillon ADN      3µl

Résultats directs en ng/µl

### Protocole d'électrophorèse en gel d'agarose

#### 1 Préparation des gels et dépôts des échantillons :

Dans le TBE 0,5 X, on fait fondre de l'agarose ultra pur jusqu'à ce qu'elle devienne limpide. Le mélange est refroidi à température en voisinant les 50°C, puis coulé dans un plateau transparent muni des peignes.

15 µl d'ADN extrait dilué et 2µl de solution de bleu de bromophenol, sont déposés dans chaque cupule de la microplaque Elisa. Certains puits sont remplis de 10µl de marqueur ADN de Phage Lambda (référence 25250010-GIBCO-BRL) puis additionné de 2µl de bleu de bromophenol pour repérer le front de migration. Différentes quantités des marqueurs ont été utilisés pour le test d'identification de l'ADN sur quelques échantillons (10ng, 25ng, 50ng, 75ng, 100ng) (annexe 4). Et l'ADN de Phage LAMBDA à 50ng donne le profil proportionnel à l'ADN testé. Les mélanges de l'ADN extraits sont transférés dans les puits du gel, et l'échelle sont déposés sur certains puits. Puis on fait migrer les échantillons dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 0,5X.

## 2 Migration :

Les acides nucléiques en solution portant une charge négative (groupement phosphate ), migrent de la cathode vers l'anode. La migration dure 1H 30mn à 110 volts. Pour le contrôle de la qualité et de quantité d'ADN, on obtient une seule bande par échantillon.

## 3 Révélation :

Après la migration le gel est placé dans un bain de coloration BET (bromure d'ethidium) pendant 10mn à l'abri de la lumière, puis rincé dans l'eau distillée pendant 20mn pour décolorer. Les différents fragments sont visualisés et photographiés sur un transilluminateur à lumière ultraviolette. Le BET s'intercale dans la double hélice de l'ADN et le rend visible sous lumière ultraviolette.

## Annexe 5 : Conditions PCR pour les marqueurs microsatellites

### Les tampons de réaction

#### Tampon 10X pour PCR

PRODUIT	[stock]	[finale]	pour 100ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1M	166mM	1,66ml
Tris HCL pH8	1M	100mM	6,70ml
MgCL <sub>2</sub>	50mM	20mM	200ml
Mercptoéthanol		0,7%	70ml
H <sub>2</sub> O qsp.10ml			1,37ml

#### Tampon 2X pour PCR : (Conservation à -20°C)

PRODUIT	ABREVIATION	CONC.	QUANTITÉ 1ml
diNucléotides Tri Phosphates (100mM)	dNTP	5mM	40µl
Bovine Sérum Albumine	BSA	20mg/ml	20µl
détergent (fourni avec la taq)	W1		50µl
tampon 10X (autoclaver)	10X	10X	200µl
eau distillée stérile qsp.1ml	H <sub>2</sub> O		690µl

#### Les mélanges réactionnels de PCR : 1Réaction/échantillon :

Tampon 2X	6,25µl
Amorce U 3µM	1,3µl
Amorce L 3µM	1,3µl
Eau distillée	1,55µl

Taq Polymerase 5U/µl (0,04U finale) 0,1µl

#### Elements utilisés pour la PCR:

Éléments	concentration	Effets
Quantité d'ADN		-quantité insuffisante ne permet pas l'amplification -quantité trop importante peut conduire à la génération des signaux aspécifiques
Tris Hcl		- sert à tamponner le milieu réactionnel pour l'activité de la taq polymérase
Mgcl <sub>2</sub>	1M	-un cofacteur essentiel de la taq polymerase -Interagit avec les charges négatives de la chaîne d'ADN -favorise la stabilité de l'hybridation
Taq polymerase	5U/µl(0,04U final)	-copie les molécules d'ADN



dNTPs (diNucléotides Tri Phosphates)	5mM	-Influe la fidélité de la taq polymerase -trop de dNTPs augmentent les erreurs d'incorporation -concentration trop faible diminue le rendement de la réaction d'amplification
BSA (Bovine Sérum Albumine)	20mg/ml	-Améliore la dénaturation de la matrice d'ADN en facilitant la rupture des liaisons hydrogènes reliant les deux brins d'ADN

### Optimisation des conditions PCR

La technique microsatellite (SSR Simple Séquence Repeats) est dérivée de la Technique PCR (Polymerase Chaîne Réaction). Les microsatellites, sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri-, ou tétranucléotidiques (Vogt, 1990). L'amorce utilisée en PCR se lie à une région d'acide nucléique qui va s'amplifier sélectivement à l'aide d'une enzyme : la DNA polymerase (Taq polymerase).

Le volume réactionnel utilisé en PCR est de 10,5µl, il contient des dNTP, du tampon, la Taq et 2,5µl d'ADN génomique dilués à 3ng/µl et 6ng/µl. Ce milieu réactionnel est recouvert d'huile pour éviter l'évaporation au cours de l'amplification, celle-ci est effectuée dans l'appareil Robocycleur. (Gradient 96, stratagène).

Les différentes étapes des cycles sont :

- 1 cycle de dénaturation préliminaire 2mn à 96°C
- 29 cycles de 3 étapes :
  - dénaturation des doubles brins d'ADN 1mn à 94°C
  - 1mn à température d'hybridation des amorces
  - 2mn d'élongation des fragments à 72°C
- élongation finale 7mn à 72°C

Pour cinq loci microsatellites, les conditions PCR sont les suivantes :

Intitulé des amorces	Séquence des 2 amorces	Concentration de l'amorce	Température d'hybridation	Nombre de cycles
Embra 06	5'-AGAGAATTGCTCTTCATGG-3' 5'-GAAAAGTCTGCAAAGTCTGC-3'	3µM	60°C	29
Embra 10	5'-GTAAAGACATAGTGATGACATTC-C-3' 5'-AGACAGTACGTTCTCTAGCTCA-3'	3µM	60°C	29
Embra 11	5'-GCTTAGAATTTGCCTAAACC-3' 5'-GTAAAATCCATGGGCAAG-3'	3µM	56°C	29
Embra 13	5'-ATTTCCCTAGGTTTGACATG-3' 5'-TCCAACATCTTACTCAACCA-3'	3µM	54°C	29
Embra 19	5'-GACGGTTGATTCCTGATT-3' 5'-GTGGTGCTCCTCTCCTCT-3'	3µM	58°C	29

**Annexe 6 : Protocole de coloration au nitrate d'argent de séquences microsatellites amplifiées par PCR et séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide.**

**Préparation des gels d'acrylamide**

Solution d'acrylamide 19:1 à 6% : pour 100ml

TBE 10X 10ml

Urée 42g (Dissout à chaud 40°C -50°C)

Eau 30ml

Acrylamide 19:1 15ml

compléter H<sub>2</sub>O qsp 1000ml

Pour l'échelle: -10paire de base à 0,1µg/µl : 90µl de bleu dénaturant

10µl échelle en solution stock 1µg/µl

-dépôt sur gel : 2,3µl

**Coloration et révélation par gel acrylamide :**

	solution par gel	temps
Bain d'acide acétique	150 ml acide acétique pur 1,350 L eau distillée sous la hotte	30mn avec agitation
4 bains d'eau distillée		2mn par bain avec agitation
Bain de coloration	qsp. 1,5 L d'eau 7,5 ml AgNO <sub>3</sub> à 20% 2,25 ml formaldéhyde	30mn avec agitation
Rinçage eau distillée		5 secondes
Bain de révélation	45 g carbonate de sodium Eau distillée 1,5 L qsp 150 µl thiosulfate de sodium 10 mg/ml	
Bain de fixation	solution acide acétique 10%	15mn
Rinçage eau distillée		10mn

Annexe 7 : Variation allélique observée sur 244 *E. grandis* pour 5 loci microsatellites

N°	Bloc	Trait	E06	E06	E10	E10	E19	E19	E11	E11	E13	E13
1	1	1	120	130	118	124	160	160	124	146	83	99
2	1	8	140	148	118	129	162	162	114	124	83	92
3	1	16	132	148	129	139	158	158	122	136	83	110
4	1	18	120	146	131	137	158	168	122	136	82	83
5	2	1	120	136	118	124	160	170	124	128	83	91
6	2	2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
7	2	8	120	120	129	131	160	160	124	130	83	98
8	2	13	136	136	131	145	158	168	130	136	82	83
9	2	18	136	146	116	129	162	168	126	134	83	83
10	3	1	132	152	135	148	160	168	128	138	83	111
11	3	2	136	160	117	129	158	170	118	128	83	100
12	3	3	120	128	131	131	156	160	124	146	83	92
13	3	8	140	140	117	129	162	170	114	124	80	84
14	3	9	120	120	138	146	164	168	114	124	78	86
15	3	18	140	146	129	131	160	160	114	128	83	84
16	4	2	128	132	123	129	162	168	..	..	84	98
17	4	8	120	140	131	137	168	168	114	124	79	87
18	4	13	132	136	129	131	158	168	..	..	79	85
19	4	16	148	154	120	131	160	160	122	136	82	83
20	4	18	126	146	120	131	160	160	114	124	83	101
21	5	2	132	142	123	131	160	168	..	..	79	89
22	5	3	136	146	131	141	162	168	120	132	79	85
23	5	8	146	148	129	129	160	160	124	124	84	91
24	5	14	130	132	129	133	168	168	122	124	83	84
25	5	18	126	146	127	129	158	158	124	124	83	84
26	6	1	120	140	118	123	170	170	124	128	84	88
27	6	8	120	138	129	131	162	168	124	124	78	85
28	6	9	120	132	129	131	168	168	124	124	83	90
29	6	12	118	120	120	131	162	168	114	124	83	84
30	6	16	148	154	131	154	168	168	..	..	84	105
31	6	18	146	152	129	136	160	184	124	124	83	84
32	7	1	132	162	125	144	168	168	..	..	83	84
33	7	3	120	132	128	136	162	162	116	124	83	99
34	7	8	120	132	122	131	168	168	116	124	83	91
35	7	12	146	148	122	131	168	168	124	124	82	83
36	7	16	120	132	135	153	170	170	124	140	82	83
37	7	19	140	146	131	146	162	162	118	126	83	86
38	8	1	120	120	131	146	168	168	..	..	83	90
39	8	2	132	160	115	123	172	180	130	130	83	100
40	8	12	132	140	122	131	154	166	114	124	82	83
41	8	13	132	148	122	131	166	166	128	134	77	84
42	8	14	132	136	129	131	168	168	..	..	84	84
43	8	16	120	128	133	149	..	..	128	136	83	108
44	8	18	120	132	125	131	158	168	124	124	83	107
45	9	2	132	142	122	129	160	172	128	128	83	98
46	9	8	120	140	122	129	168	168	116	124	83	94
47	9	9	120	120	125	131	..	..	124	148	83	86
48	10	1	132	136	129	129	162	168	124	124	83	84
49	10	2	132	136	120	129	170	170	128	152	81	88
50	10	8	120	120	120	129	168	168	116	124	80	85
51	10	13	120	136	129	131	..	..	138	138	83	84
52	10	16	132	148	120	129	160	168	138	138	83	84
53	10	18	120	146	129	131	168	168	124	128	83	84
54	11	1	120	128	123	133	168	170	124	128	83	84
55	11	2	132	136	115	123	170	170	124	128	83	84
56	11	8	138	140	122	131	168	168	124	124	81	86
57	11	9	120	132	124	135	154	168	130	148	81	86
58	11	16	132	154	129	131	160	160	132	138	83	91
59	11	18	138	146	119	129	168	168	124	136	83	84
60	12	1	132	132	135	141	168	168	120	124	83	99

61	12	2	132	148	129	139	168	168	128	136	80	89
62	12	3	128	132	114	122	168	170	124	124	83	99
63	12	8	120	132	125	131	168	168	124	124	84	91
64	12	13	120	132	131	141	158	168	132	136	82	83
65	12	18	120	126	131	131	168	168	132	140	83	84
66	13	1	120	142	131	135	168	170	130	130	83	84
67	13	2	132	136	123	143	168	168	120	128	80	89
68	13	8	120	132	131	131	158	158	124	124	..	..
69	13	12	120	120	131	137	162	168	116	124	81	82
70	13	14	132	148	139	145	168	168	..	..	..	..
71	13	18	120	146	123	131	160	160	124	134	84	93
72	14	1	120	132	125	133	168	168	118	124	84	99
73	14	2	132	146	123	144	..	..	..	..	84	84
74	14	3	120	132	119	131	154	168	124	128	82	83
75	14	13	120	132	131	139	168	168	124	136	84	90
76	14	14	132	138	119	131	168	168	136	136	83	84
77	14	16	120	140	137	149	..	..	124	140	83	83
78	15	1	128	132	123	141	168	170	..	..	83	84
79	15	8	138	140	118	131	..	..	124	124	79	86
80	15	13	120	136	125	131	156	168	120	124	76	83
81	15	14	132	140	131	139	168	168	124	136	84	92
82	15	16	120	132	124	131	158	170	130	144	82	83
83	15	18	146	154	131	141	158	158	124	130	84	88
84	15	19	120	140	133	143	162	168	124	130	84	86
85	16	1	132	150	123	129	160	160	124	130	84	86
86	16	2	132	158	122	129	160	166	124	128	84	87
87	16	3	140	148	139	141	160	166	124	124	84	98
88	16	8	120	132	129	137	168	168	124	132	79	91
89	16	16	120	132	123	129	..	..	124	134	82	83
90	17	1	120	128	137	139	164	164	144	144	79	83
91	17	2	140	148	129	137	158	158	124	124	79	120
92	17	3	132	132	137	137	168	168	124	134	83	98
93	17	8	138	140	129	129	168	168	126	128	79	85
94	17	9	132	138	131	137	168	168	124	124	85	93
95	17	12	120	120	135	135	160	168	124	136	81	83
96	17	16	150	150	133	149	158	158	..	..	85	108
97	17	18	146	158	129	131	158	170	128	136	83	84
98	18	2	132	148	127	137	168	168	124	124	84	87
99	18	3	132	136	121	129	162	168	124	146	84	99
100	18	16	120	132	126	131	158	158	126	136	82	83
101	18	18	126	146	121	129	160	160	124	136	83	84
102	18	19	120	140	129	141	162	168	124	150	74	84
103	19	12	120	120	123	131	162	162	124	134	74	84
104	19	14	120	120	131	139	168	168	124	124	83	84
105	19	18	120	146	129	129	160	160	124	124	74	84
106	19	19	120	140	133	139	166	166	124	126	74	84
107	20	2	134	148	123	129	170	170	124	128	83	87
108	20	3	128	136	123	131	158	158	..	..	79	87
109	20	8	136	140	121	129	166	166	122	124	79	85
110	20	13	132	140	123	131	166	166	124	136	82	83
111	20	16	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
112	20	18	146	150	121	129	158	158	118	124	76	83
113	21	2	128	136	125	129	170	170	128	138	78	83
114	21	3	120	136	129	131	162	168	124	128	85	99
115	21	8	120	132	123	131	168	168	..	..	85	94
116	21	12	120	120	123	131	168	168	118	124	76	84
117	21	14	132	148	131	139	168	168	124	124	83	84
118	21	16	148	148	131	147	168	168	..	..	83	84
119	21	18	132	146	129	149	160	160	..	..	83	84
120	22	1	120	120	135	135	168	168	124	124	83	84
121	22	2	120	132	135	135	162	168	124	124	83	84
122	22	8	138	140	129	135	168	168	124	124	79	85
123	22	12	120	120	123	131	168	168	124	148	81	81
124	22	14	122	148	133	142	168	168	124	136	82	83

125	23	1	120	132	135	141	162	168	124	124	74	74
126	23	2	138	140	128	132	168	168	136	136	83	99
127	23	3	120	132	145	147	160	168	124	124	83	98
128	23	8	120	142	133	145	166	166	124	124	79	85
129	23	12	120	120	125	131	..	..	128	148	81	83
130	23	13	136	140	131	131	158	168	124	136	79	83
131	23	14	120	138	129	135	168	168	128	136	78	83
132	23	19	120	142	141	141	156	162	124	128	80	83
133	24	1	120	128	137	137	168	168	122	124	83	84
134	24	3	..	..	131	141	168	168	124	124	85	98
135	24	8	138	140	121	131	162	162	124	124	79	85
136	24	13	120	136	123	131	158	168	124	136	79	85
137	24	14	120	142	123	131	166	166	124	124	83	83
138	24	16	120	132	129	131	158	158	136	138	84	104
139	24	18	148	156	129	131	..	..	124	124	82	83
140	25	2	132	136	123	141	168	168	124	128	84	98
141	25	8	120	156	129	141	162	168	124	124	85	93
142	25	16	120	148	129	131	168	168	124	138	84	84
143	25	18	126	146	129	129	158	158	136	138	83	84
144	26	1	120	150	129	131	168	168	124	138	83	85
145	26	2	122	132	123	141	162	168	124	124	83	85
146	26	8	138	140	129	131	168	168	122	124	85	87
147	26	12	120	120	129	131	168	168	124	148	81	82
148	26	14	120	140	131	139	168	168	124	136	83	84
149	26	16	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
150	26	18	128	132	129	131	160	168	124	138	83	84
151	26	19	138	138	131	143	160	168	124	126	79	86
152	27	1	128	132	118	123	168	168	124	124	83	84
153	27	2	120	120	141	141	162	162	124	124	83	84
154	27	3	120	128	118	123	162	162	124	124	86	99
155	27	8	140	140	125	131	168	168	124	124	83	91
156	27	8	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
157	27	12	120	140	129	141	168	168	124	146	83	84
158	27	14	132	148	136	145	152	166	124	136	87	83
159	27	18	146	154	123	129	158	166	124	132	80	83
160	28	1	130	132	123	135	..	..	124	124	..	..
161	28	2	136	146	123	143	162	170	124	130	87	99
162	28	8	136	138	122	129	168	168	124	124	87	93
163	28	16	132	136	122	129	158	158	132	138	80	83
164	28	18	140	146	124	131	168	168	124	124	84	103
165	29	1	120	122	123	141	162	168	124	134	83	84
166	29	2	120	132	132	141	162	168	124	124	83	84
167	29	3	120	132	126	133	162	168	124	124	85	100
168	29	8	120	138	129	129	162	168	124	124	79	85
169	29	9	138	140	133	133	168	168	148	148	..	..
170	29	12	118	120	135	137	162	168	124	148	..	..
171	29	13	118	120	131	149	..	..	132	136	83	83
172	29	18	132	138	135	137	160	170	124	124	83	101
173	30	1	120	132	135	137	..	..	124	124	83	101
174	30	3	120	132	125	133	162	168	124	132	80	83
175	30	8	126	152	122	129	150	168	124	124	83	93
176	30	12	120	138	123	131	158	168	136	148	..	..
177	30	16	118	120	131	143	168	168	132	138	83	83
178	30	18	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
179	31	1	132	154	122	129	158	168	124	124	83	99
180	31	2	128	132	..	..	..	..	..	..	83	83
181	31	3	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
182	31	8	120	132	124	131	166	166	124	130	83	92
183	31	12	120	136	122	129	162	168	136	148	83	84
184	31	16	120	148	129	131	..	..	..	..	83	84
185	31	18	120	126	129	129	168	168	..	..	83	84
186	31	19	126	140	143	143	162	168	124	124	78	85
187	32	1	120	132	134	141	162	168	124	124	83	84
188	32	2	132	132	123	145	162	170	124	128	84	99

**CIRAD-Dist**  
 UNITÉ BIBLIOTHÈQUE  
 Baillarguet

189	32	8	116	138	124	131	168	168	124	124	77	86
190	32	18	136	146	126	131	150	168	132	132	83	93
191	33	3	..	..	124	129	162	168	128	128	83	102
192	33	8	120	132	118	131	162	166	136	148	83	93
193	33	14	132	148	135	140	162	168	136	136	83	105
194	33	18	150	150	118	129	144	160	124	138	80	83
195	34	1	120	128	124	141	162	168	124	136	83	84
196	34	3	120	136	123	133	162	168	120	124	80	83
197	34	13	132	150	129	131	..	..	124	136	83	84
198	34	14	132	148	129	131	..	..	124	136	83	84
199	34	16	132	148	119	131	..	..	130	138	83	106
200	34	18	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
201	35	1	128	136	131	141	..	..	124	154	83	84
202	35	2	120	136	123	139	150	170	146	146	83	102
203	35	8	120	120	129	131	162	162	124	124	83	92
204	35	9	120	120	129	131	168	168	134	148	74	79
205	35	12	132	148	129	131	162	162	126	148	81	81
206	35	14	138	146	129	145	..	..	124	134	84	91
207	35	18	120	132	129	141	168	168	124	136	83	84
208	36	1	..	..	113	125	162	168	124	124	79	83
209	36	3	148	148	131	147	162	170	124	124	83	90
210	36	8	126	146	129	129	168	168	124	124	79	85
211	36	16	132	132	131	143	..	..	..	..	83	83
212	36	18	128	132	129	129	160	160	124	136	83	84
213	37	1	128	132	129	139	168	168	124	124	83	84
214	37	2	128	132	114	123	164	168	126	136	83	84
215	37	3	120	136	123	133	162	168	124	126	83	99
216	37	8	128	132	129	131	168	168	124	124	86	91
217	37	9	132	146	123	135	150	168	128	148	..	..
218	37	12	120	120	131	138	158	168	..	..	80	110
219	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
220	37	14	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
221	37	16	120	146	120	131	150	168	124	138	83	106
222	37	18	120	148	118	129	160	168	124	124	83	84
223	38	1	120	128	135	137	162	170	124	124	83	84
224	38	2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
225	38	8	120	140	120	131	168	168	124	124	78	85
226	38	9	120	132	137	137	160	168	124	130	83	102
227	38	13	132	148	131	145	..	..	124	132	83	83
228	38	14	120	132	139	141	168	168	..	..	83	83
229	38	18	132	140	129	131	168	168	130	136	75	83
230	39	1	140	146	141	141	162	168	..	..	83	83
231	39	2	132	146	137	141	162	168	120	124	83	83
232	39	3	128	132	130	137	168	168	118	124	83	98
233	39	8	120	132	129	137	168	168	124	124	79	85
234	39	16	120	138	131	143	160	168	130	136	83	84
235	39	18	120	132	129	131	160	160	..	..	83	84
236	39	19	126	132	143	143	168	168	124	126	79	85
237	40	1	118	128	141	141	162	162	124	124	83	84
238	40	2	118	128	129	131	168	170	124	128	83	99
239	40	3	140	148	129	137	162	168	124	124	85	98
240	40	8	118	136	131	131	168	168	124	124	79	85
241	40	16	134	136	131	149	168	168	124	136	83	105
242	40	18	128	150	131	131	158	158	126	138	83	84
243	14	18	142	146	130	149	158	168	124	132	83	85

**Annexe 8** : Variation de la taille observée des allèles exprimée en paires de bases (pb) avec les 5 loci microsatellites. La taille attendue est donnée par Brondani *et al* 1998.

A	Motifs répétés	Taille attendue (pb)	Taille observée (pb)
E06	(AG)19	120-170	116-162
E10	(CCT)3(AG)14	110-155	113-154
E11	(AG)4GG(AG)13	123-165	114-154
E13	(AG)27	75-120	74-120
E19	(AG)23	65-145	144-184