

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

المعهد الوطني للفلاحة ( الحراش الجزائر )

Institut National Agronomique -El Harrach- Alger

## THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en sciences Agronomiques

Option : Sciences et Techniques de la Production Végétale

### Thème

**Diversité génétique interspécifique chez les  
graminées fourragères pérennes : étude de  
cas dans différentes populations  
sélectionnées de *Festulolium***

Présenté par Mr. :

**YEKKOUR Amine**

#### Jury:

Président: Mme. Mekliche L.

Maître de Conférences, INA

Promoteur : Mr. Abdelguerfi A.

Maître de Conférences, INA

Co- promoteur : Mr. Ghesquière M

Docteur INRA Lusignan (France)

Examineurs : Mme. Abdelgerfi-Laouar M.

MR, INRAA

Mr. M'Hammedi Bouzina M.

Maître de Conférences, Univ de Chlef

Mme. Ben Achour-Ayadi R.

Docteur, MAT Univ de Blida

Année universitaire : 2006- 2007

---

## Remerciements

---

J'adresse une reconnaissance particulière à **Mr. ABDELGERFI A. et à Mr. GHESQUIERE M.** , pour leurs encadrement et leurs constante disponibilité.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude :

**M<sup>me</sup> MEKLOCHE L.** pour l'honneur et le privilège qu'elle m'a accordés en présidant le jury.

**Mr. M'HAMMEDI BOUZINA M., M<sup>me</sup> ABDELGERFI-LAOURA M., et M<sup>me</sup> BEN ACHOUR-AYADI R.** pour m'avoir honoré en acceptant d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier également toutes les personnes qui ont participé au succès de se travail.

---

## ———— Liste des abréviations ————

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.

**AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism.

**BC** : Back Cross.

**EST** : Expressed sequence tag.

**F1** : Résultante de la première génération d'un croisement.

**GISH** : Genomic In situ Hybridization.

**Kb** : Kilos bases.

**KS** : Kolmogorov Smirnov.

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**RAPD** : Random Amplification of Polymorphic DNA.

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism.

**SSR** : Simple sequence repeat.

---

## Liste des tableaux

---

	<b>Pages</b>
<b>Tableau 1</b> : Structure génomique de trois espèces de fétuque.....	6
<b>Tableau 2</b> : Principales caractéristiques des espèces du genres <i>Lolium et Festuca</i> .....	8
<b>Tableau 3</b> : Taxonomie des principaux hybrides interspécifiques et intergénériques spontanés au sein du genre <i>Festuca</i> .....	11
<b>Tableau 4</b> : Résumé des effectifs et du type de marqueurs recensés.....	32
<b>Tableau 5</b> : Marqueurs sélectionnés à tester.....	33
<b>Tableau 6</b> : fréquences alléliques obtenues après génotypage des différentes populations au marqueur B1B6.....	36
<b>Tableau 7</b> : Fréquences alléliques obtenues après Génotypage des différentes populations au marqueur B1C8.....	37
<b>Tableau 8</b> : Fréquences alléliques obtenues après génotypage des différentes populations au marqueur B4D7.....	38
<b>Tableau 9</b> : Fréquences alléliques obtenues après génotypage des différentes populations au marqueur OSRB.....	38
<b>Tableau 10</b> : Fréquences alléliques de <i>a</i> et <i>c</i> et calcul de leurs intervalles de confiance pour les différentes populations étudiées.....	39
<b>Tableau 11</b> : Récapitulatif des valeurs du $X^2$ calculées pour les différentes populations .....	41
<b>Tableau 12</b> : Récapitulatif des valeurs du $X^2_{(c)}$ calculé pour les différentes populations.....	43
<b>Tableau 13</b> : Récapitulatif des valeurs $D_k$ calculées pour les différentes populations au marqueur B1B6.....	44
<b>Tableau 14</b> : Récapitulatif des valeurs $D_k$ calculées pour les différentes populations au marqueur B1C8.....	45
<b>Tableau 15</b> : Récapitulatif des valeurs $D_k$ calculées pour les différentes populations au marqueur B4D4.....	45
<b>Tableau 16</b> : Récapitulatif des valeurs $D_k$ calculées pour les différentes populations au marqueur OSRB.....	46
<b>Tableau 17</b> : Résumé des valeurs de $D_k$ obtenus lors du test d'ajustement de KS .....	46

# Liste des figures et des graphiques

	Pages
<b>Figure 1</b> : Une graminée végétative est constituée de talles.....	2
<b>Figure 2</b> : Structure interne d'une touffe végétative.....	3
<b>Figure 3</b> : Fétuque élevée ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreber ssp. <i>arundinacea</i> ) en début de floraison.....	4
<b>Figure 4</b> : Fétuque des prés ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreber ssp. <i>prantensis</i> ) en début de floraison.....	5
<b>Figure 5</b> : <i>Festuca arundinacea</i> var <i>glaucescens</i> en pépinière de plantes isolées en condition de Lusignan.....	5
<b>Figure 6</b> : Ray-grass anglais ( <i>Lolium perenne</i> L.) en début de floraison.....	6
<b>Figure 7</b> : Ray-grass d'Italie ( <i>Lolium multiflorum</i> Lam.) en début de floraison.....	7
<b>Figure 8</b> : Formation d'une variété synthétique avec deux générations de multiplication après la synthèse issue d'un polycross de départ à 6 parents.....	9
<b>Figure 9</b> : Principe de l'amphiploïdisation.....	11
<b>Figure 10</b> : La voie introgressive.....	12
<b>Figure 11</b> : Schéma d'amélioration des <i>Festulolium</i> à Lusignan .....	13
<b>Figure 12</b> : Structure générale des microsattellites.....	15
<b>Figure 13</b> : Arbre phylogénétique du complexe <i>Lolium-Festuca</i> .....	16
<b>Figure 14</b> : Représentation simplifiée de la généalogie des populations étudiées.....	23
<b>Figure 15</b> : Principe d'une PCR avec queue M13.....	25
<b>Figure 16</b> : Principe de fonctionnement d'un séquenceur LI-COR.....	26
<b>Figure 17</b> : Electrophorogramme obtenu par B1B6.....	35
<b>Histogramme 1</b> : Contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur B1B6.....	37
<b>Histogramme 2</b> : Contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur B1C8.....	37

<b>Histogramme 3</b> : Contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur B4D7.....	38
<b>Histogramme 4</b> : Contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur OSRB.....	38
<b>Histogramme 5</b> : Comparaison des distances entres populations par leurs $X^2$ aux fréquences alléliques .....	42
<b>Histogramme 6</b> : Comparaison des distances entres populations par leurs $X^2_{(-c)}$ aux fréquences alléliques.....	43
<b>Histogramme 7</b> : Comparaison des distances entres populations par leurs Dk au marqueur B1B6.....	44
<b>Histogramme 8</b> : Comparaison des distances entres populations par leurs Dk au marqueur B1C8.....	45
<b>Histogramme 9</b> : Comparaison des distances entres populations par leurs Dk au marqueur B1D4.....	45
<b>Histogramme 10</b> : Comparaison des distances entres populations par leurs Dk au marqueur OSRB.....	45

---

## Liste des annexes

---

**Annexe 1 :** Représentation des trois cartes de liaison génétique utilisées

**Annexe 2 :** Protocole d'extraction d'ADN CIMMYT

**Annexe 3 :** Protocole d'extraction d'ADN en plaque de 96 échantillons (Cheung)

**Annexe 4 :** Protocole d'amplification PCR

**Annexe 5 :** Schéma de montage des plaques de migration pour séquenceur

**Annexe 6 :** Préparation et coulage du gel d'acrylamide

**Annexe 7 :** Protocole de préparation de la plaque de dépôt et les conditions de migration

**Annexe 8 :** Marqueurs recensés

**Annexe 9 :** Détail des calculs pour les comparaisons des populations 2 à 2 sur la base des phénotypes observés par un test d'indépendance de Kolmogorov Smirnov : Diversité interpopulation

**Annexe 10 :** Détail des calculs pour l'étude de diversité à l'intérieur même de chaque population détail des calculs en annexe 10

---

# Table des matières

---

	<b>Pages</b>	
Introduction.....	1	
 <b>Chapitre I : Contexte général</b>		
I- Notions de botaniques élémentaires des graminées fourragères en général, fétuques et ray-grass en particulier.....	2	
I.1 Cycle de végétation d'une graminée fourragère.....	2	
I-2 Taxonomie et caractéristiques des espèces .....	4	
I-2.1 Le genre <i>Festuca</i> .....	4	
I-2.2 Le genre <i>Lolium</i> .....	6	
I-3 Résumé des principales caractéristiques des genres <i>Lolium et Festuca</i> .....	8	
I-4 Définition des <i>Festulolium</i> .....	8	
 II- Schémas d'améliorations et stratégie d'obtention des hybrides interspécifiques.....		9
II-1 Schémas classiques d'amélioration des graminées fourragères et inscription au catalogue officiel.....	9	
II-2 Proximité génétique des deux genres.....	11	
II-2.1 Des hybrides interspécifiques naturels.....	11	
II-2.2 Travaux de marquage génétique dans le complexe <i>Festulolium et études phylogénétiques</i> .....	11	
II-2.2.1 Stratégies d'obtention des hybrides.....	11	
II-2.2.2 Travaux de marquage génétique dans le complexe <i>Festulolium</i> .....	14	
II-2.2.3 Etudes cytogénétiques.....	16	
 III- Aperçu de quelques résultats phénotypiques obtenus par amphiploïdisation ou introgression.....		17
III-1 Résistance à la sécheresse et au froid.....	17	



III-2 Rendement, pérennité.....	17
III-3 Valeur alimentaire.....	18
III-4 Fertilité.....	18

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

I- Stratégie du travail expérimental.....	21
II- Matériel végétal.....	21
II-1 Les espèces parentales.....	21
II-2 Les hybrides de première génération (F1) ou hybrides primaires.....	21
II-3 Les rétrocroisements et intercroisements de back-cross I.....	22
III- Méthodes mises en œuvre.....	23
III-1 Extraction des ADN génomiques.....	23
III-1.1 Méthode CIMMYT.....	23
III-1.2 Méthode Cheung.....	24
III-2 Amplifications PCR.....	24
III-3 Migration des produits d'amplification sur gel d'acrylamide- séquenceur.....	26
III-3.1 Principe du séquenceur.....	26
III-3.2 Préparation des gels d'acrylamide.....	27
III-4 Méthodes statistiques utilisées dans l'étude.....	27
III-4.1 Suivi de l'évolution des fréquences alléliques chez les différentes populations et pour chacun des marqueur considéré.....	27
III-4.2 Comparaison des populations et étude de diversité.....	29

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

I- Recensement des marqueurs SSR-PCR cartographiés.....	32
II- Tester pour les marqueurs recensés (screening), retenus, la qualité des électrophorogrammes.....	34
III- Génotypage des populations étudié à l'aide d'un ensemble de marqueurs.....	35
III-1 Etude des fréquences alléliques.....	36

III-1.1 Informations délivrées par le marqueur spécifique B1B6.....	39
III-1.2 Informations délivrées par les marqueurs non spécifiques.....	40
III-2 Comparaison des populations par leurs fréquences alléliques au marqueur B1B6.....	41
III-2.1 Comparaison globale des populations 2 à 2 par un test $X^2$ (khi2) d'homogénéité du profil de leurs fréquences alléliques au seuil de 5%.....	41
III-2.2 Comparaisons des populations sur la base de leurs fréquences alléliques au marqueur B1B6, exemptées des fréquences de l'allèle <i>c</i> .....	43
III-3 Comparaisons des populations 2 à 2 sur la base des phénotypes observés par un test d'indépendance de Kolmogorov Smirnov : Diversité interpopulation.....	44
III-4 Etude de diversité à l'intérieur même de chaque population.....	46

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

## Introduction

Les principaux objectifs de l'amélioration des graminées fourragères concernent la pérennité, la valeur alimentaire et le rendement. La pérennité passe par l'obtention de variétés tolérantes à un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques : sécheresse, maladies (rouille, flétrissement bactérien...). La valeur alimentaire des fourrages est une caractéristique complexe qui dépend de nombreux facteurs (composition en éléments peu digestibles comme la lignine, remontaison et ingestibilité...).

Les espèces fourragères pérennes se caractérisent par leur allogamie (polygénotypique) et une pollinisation anémophile. En conséquence, les variétés créées sont des variétés synthétiques et le processus de sélection implique l'utilisation de croisements en polycross.

L'hybridation interspécifique permet d'augmenter la variabilité génétique disponible à tout processus de sélection.

La grande proximité génétique des espèces des genres *Festuca* et *Lolium* et leurs complémentarités pour de nombreux caractères agronomiques permet de combiner la pérennité et la tolérance à la sécheresse de la fétuque avec la productivité et la valeur alimentaire du ray-grass.

L'obtention de ces hybrides interspécifiques est possible par différentes voies tant par les espèces botaniques impliquées que par la stratégie utilisée (introgression ou amphiploïdisation). L'ensemble des hybrides ainsi obtenus est regroupé sous le terme « générique » de *Festulolium*.

L'intérêt « génétique » de l'étude du modèle *Festulolium* pour les sélectionneurs est de pouvoir agir sur la variabilité génétique intraspécifique de chaque composante de l'hybride en augmentant leur variabilité génétique interspécifique.

Aujourd'hui l'évolution des techniques de marquage moléculaire permet d'envisager de nouvelles possibilités d'investigation chez des espèces à structure génétique complexe (interspécifique, polyploïde) comme les *Festulolium*.

L'objectif principal de ce travail est d'identifier un pool de marqueurs microsatellites fiables (données lisibles et répétables) déjà cartographiés permettant d'étudier l'évolution de certaines populations sélectionnées (dérivant de l'hybride directe ou en génération de back-cross).

Dans un premier chapitre nous aborderons : les notions de botaniques élémentaires de la fétuque et du ray grass, le schémas d'améliorations et la stratégie d'obtention des hybrides interspécifiques et un aperçu de quelques résultats phénotypiques obtenus par amphiploïdisation ou introgression. Le deuxième chapitre porte sur le matériel génétique utilisé et les méthodes utilisées. Les résultats et discussion sont présentés dans le troisième chapitre. Nous terminerons par une conclusion et les perspectives de ce travail.

---

---

# **Chapitre I**

## **Contexte général**

---

---

# I- Notions de botaniques élémentaires des graminées fourragères en général, fétuques et ray-grass en particulier

## I.1 Cycle de végétation d'une graminée fourragère

On distingue 3 grandes phases dans le développement d'une graminée fourragère pluriannuelle (Gillet, 1980)

- le développement végétatif,
- le développement reproducteur,
- la maturation des graines.

Avant de développer le cycle proprement dit graminées prairiales il faut noter que ce dernier est perturbé à intervalles plus ou moins réguliers par l'exploitation sous forme de pâture ou bien de fauche.

Une graminée est constituée d'un ensemble de talles (figure 1). Après le semis et la levée commence la phase de tallage. La talle constitue l'unité de base des graminées fourragères et donc de la production végétative et grainière. Chaque talle est constituée d'une tige, même si elle n'est pas toujours visible, de feuilles et de racines. A l'aisselle de chaque feuille se trouve un bourgeon, par lequel se fait l'apparition des nouveaux organes aériens, c'est à dire les feuilles et la tige.

En phase végétative, seule la production de feuilles et de nouvelles talles est visible. La tige a alors des entre-noeuds très courts.



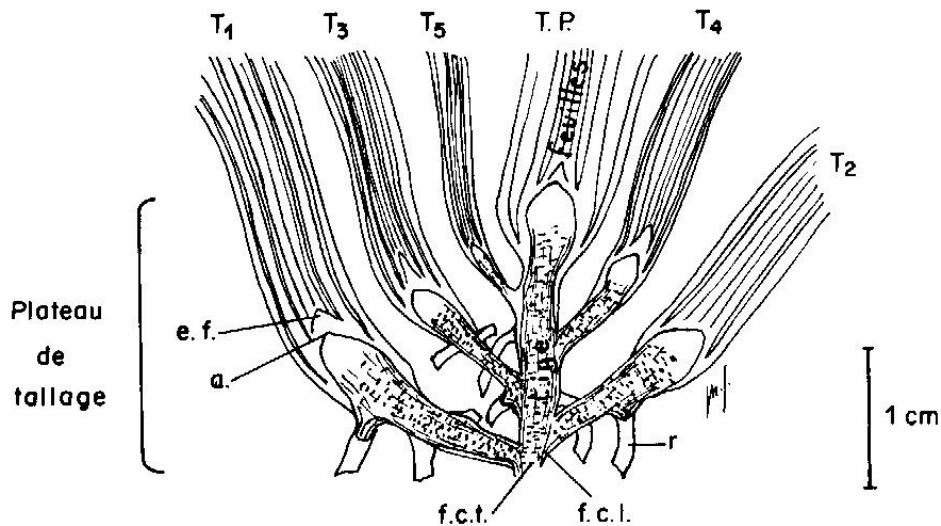
**Figure 1 :** Une graminée végétative est constituée de talles.D'après Gillet (1980).

TP : Talle primaire

T<sub>1</sub> : Première talle fille

La figure 2 montre la structure interne d'une touffe végétative.

La feuille naît sur le côté, à la base de l'apex. C'est une ébauche foliaire. La protubérance va ensuite faire le tour du sommet végétatif puis s'allonger sous forme d'un tube qui est caché dans la gaine de la feuille précédente. La zone de croissance correspond au tiers inférieur de la feuille. La feuille adulte est constituée d'une gaine et d'un limbe, la ligule sépare ces deux parties.



**Figure 2 :** Structure interne d'une touffe végétative. D'après Gillet (1980).

TP : Talle primaire,

T<sub>1</sub> à T<sub>5</sub> : Talles filles numérotées dans l'ordre d'apparition,

ef : Ebauche foliaire, a : Apex, fct et fcl : Faisceaux conducteurs transversaux et longitudinaux.

Lors du passage à l'état reproducteur, les entre-noeuds s'allongent et l'apex se différencie en inflorescence (épi ou panicule). On appelle montaison, la phase d'allongement de la tige qui va jusqu'à l'épiaison. Ce terme désigne également l'allongement de la tige dans son entier. On appelle épiaison, le moment où l'inflorescence vient de sortir de la gaine de la dernière feuille (feuille culminaire).

Au moment où l'allongement de la tige est le plus rapide, la plante subit la "crise de tallage". Il s'agit du blocage des bourgeons en vie ralentie et de la mort d'une partie des talles végétatives au bas de tiges. Tous les assimilats sont dirigés vers la tige, La crise de tallage entraîne donc un ralentissement du renouvellement végétatif de la plante.

La floraison a lieu au moment où se termine l'allongement de la tige. Les étamines sont visibles hors de la fleur. La floraison a lieu du bas vers le haut de l'inflorescence. Le pollen apporté par le vent tombe sur les stigmates. La fécondation a lieu dans les heures qui suivent. Il s'agit pour la majorité des graminées fourragères d'une allofécondation.

La formation puis la maturation des graines dure environ 1 mois. Contrairement aux céréales, les graines tombent au sol. C'est l'égrenage. Au cours de la maturation, la tige se dessèche.

Cependant, les bourgeons dormants à la base de la tige restent en vie ainsi que certaines racines.

Une espèce est dite "alternative" si elle entre en montaison l'année du semis de printemps.

Une plante "remonte" si elle produit encore des tiges après une coupe ayant interrompu une phase reproductrice. C'est la remontaison.

## I-2 Taxonomie et caractéristiques des espèces

Les fétuques (genre *Festuca*) et les ray-grass (genre *Lolium*) appartiennent à la famille des *Poaceae* (ou *graminées*). Ces deux genres sont regroupés dans la tribu des *Festuceae* avec les Dactyles (*Dactylis*) et les *Poa*.

### I-2.1 Le genre *Festuca*

Le genre *Festuca* rassemble des graminées allogames, en grande majorité pérennes, dont le niveau de ploïdie varie de  $2x$  à  $6x$  (voire  $8x$  et  $10x$ ). Elles se caractérisent notamment par une inflorescence en panicule d'épillets étalés assez flexible (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995).

On classe les espèces en deux sous-genres : *Bovinae* et *Ovinae*. Le sous-genre *Bovinae* regroupe les fétuques à grandes feuilles et à limbes plans (fétuques fourragères) et le sous-genre *Ovinae*, celles à petites feuilles et limbes pliés (fétuques à gazon) (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995).

Deux espèces sont cultivées en tant que fourrage :

-La fétuque élevée : *Festuca arundinacea* Schreber ssp. *arundinacea*,

-La fétuque des prés : *Festuca arundinacea* Hudson ssp. *pratensis*.

Nous parlerons aussi de *Festuca arundinacea* var *glaucescens* Boiss., fétuque sauvage utilisée en croisement.

✓ **La fétuque élevée** (figure 3) est une espèce hexaploïde  $2n=6x=42$ . Son hérédité est de type disomique grâce à un système génétique de contrôle de l'appariement des chromosomes (Jauhar, 1975). Des résultats d'hybridation *in situ* suggèrent que la fétuque élevée dériverait de la fétuque des prés ( $2n=2x=14$ ) et de *Festuca arundinacea* var *glaucescens* ( $2n=4x=28$ ) (Humphreys *et al.*, 1995), (tableau 1).

Au sein des fétuques élevées, on distingue la race géographique européenne et la race méditerranéenne. La race européenne est répandue dans presque toute l'Europe et elle a été introduite partout dans le monde au travers des variétés. La race méditerranéenne se trouve en Afrique du Nord et dans le sud de l'Espagne (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995). Ces deux races se distinguent par leur comportement en températures contrastées. En effet, la race méditerranéenne est sensible au froid, précoce au démarrage en végétation, alternative et à forte dormance estivale. La race européenne est à dormance hivernale, plus résistante au froid, à démarrage plus tardif, non alternative et présente une certaine croissance estivale.



**Figure 3** : Fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreber ssp. *arundinacea*) en début de floraison (fiches ACTA).

La fétuque élevée européenne est une espèce très pérenne, de grande taille, plus d'un mètre à floraison. Ses feuilles sont rigides, son tallage important et ses racines très profondes, jusqu'à 2 mètres. L'essentiel de sa croissance se fait au printemps et elle entre en semi-dormance en été avant de reprendre sa croissance en automne. Elle supporte aussi l'inondation. L'alternative est variable selon les variétés. La fétuque élevée ne remonte pratiquement pas (Gillet, 1980).

Les qualités responsables de son succès sont sa pérennité et sa productivité. La pérennité est notamment liée à la profondeur de son système racinaire qui permet une alimentation à partir des horizons inférieurs du sol en cas de sécheresse. De plus, elle diminue sa vitesse de pousse en réduisant la zone de croissance des feuilles de 30%. Elle résiste aussi très bien au piétinement. Par contre, elle est faiblement appétente, ce qui est dû principalement à la rigidité des limbes (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995). Le rendement total en matière sèche est variable en fonction des variétés : 13 à 18 t/ha/an (Gillet, 1980).

✓ *La fétuque des prés* (figure 4) est une espèce diploïde  $2n=2x=14$  (Tableau1). Elle dériverait d'un des ancêtres de la fétuque élevée (tableau 1). Ces deux espèces ont d'ailleurs longtemps été confondues.

C'est une espèce de taille moyenne à feuilles souples. Elle est très bien adaptée au froid mais supporte mal la sécheresse, sans doute à cause d'un système racinaire superficiel et parce qu'elle continue à pousser au début de l'été (Gillet, 1980). Elle est de bonne valeur alimentaire et supporte les excès d'eau. Elle est surtout utilisée dans le Nord et le Nord-Ouest de l'Europe du fait de sa tolérance au froid. Cette fétuque est pratiquement non alternative mais peut parfois remonter (Gillet, 1980). Le rendement annuel en matière sèche atteint 8 à 13 t/ha/an

✓ *Festuca glaucescens* (figure 5) est une espèce tétraploïde  $2n=4x=28$  (Tableau1). On la trouve dans les alpes méridionales, Embrun jusqu'à 1400m. C'est une fétuque très dure, très coupante dont les feuilles sont d'un vert/ bleu glauque, ce qui explique son nom. Elle a une bonne tolérance à la sécheresse et elle est très pérenne. Elle a une vitesse de pousse très lente.



**Figure 4 :** Fétuque des prés (*Festuca arundinacea* Schreber ssp. *prantensis*) début de floraison (fiches ACTA).



**Figure 5 :** *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* en pépinière de plantes isolées en condition de Lusignan (Photo M. Ghesquière)



**Tableau 1** : structure génomique de trois espèces de fétuque (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995)

Nom d'espèces	Nombre de chromosomes	Formule génomique proposée
Fétuque des prés ( <i>Festuca arundinacea</i> Hudson ssp. <i>pratensis</i> )	2n= 2x=14	PP
<i>Festuca arundinacea</i> var. <i>glaucescens</i>	2n=4x=28	G1G1G2G2
Fétuque élevée ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreber ssp. <i>arundinacea</i> )	2n=6x=42	PPG1G1G2G2

### I-2.2 Le genre *Lolium*

Ce genre de la tribu des *Festuceae* comprend uniquement des espèces diploïdes à l'état naturel. Certains auteurs considèrent que les dérivés polyploïdes des ray-grass pourraient se trouver dans les fétuques *Bovinae* (donc la fétuque élevée, la fétuque des prés, ...). En effet, les *Lolium* se croisent mieux avec ces fétuques que les fétuques *Ovinae* X. *Bovinae* entre elles. Les ray-grass se distinguent des fétuques par leur inflorescence en épi (Balfourier et Charmet, 1995).

Le genre *Lolium* comprend 8 espèces dont certaines sont allogames et d'autres autogames. Les espèces cultivées pour la production fourragère sont exclusivement allogames. Il s'agit du :

-ray-grass anglais : *Lolium perenne* L. et du,

-ray-grass d'Italie : *Lolium multiflorum* Lam.

✓ **Le ray-grass anglais** (figure 6) est une espèce naturellement diploïde  $2n=2x=14$ .

Certaines variétés fourragères sont tétraploïdes après doublement à la colchicine. L'appellation ray-grass provient de la francisation de l'anglais « ryegrass » qui signifie

« herbe à seigle » en raison de la morphologie de l'inflorescence. L'adjectif « anglais » est certainement lié au fait que les premières cultures ont été réalisées en Angleterre au XVIIème siècle. C'est la plus pérenne des espèces allogames du genre *Lolium*. L'aire de répartition naturelle du ray-grass anglais correspond à la zone tempérée de l'ancien monde: Europe et Asie. Il a été introduit aux Etats Unis, en Amérique du Sud, en Australie, en Nouvelle Zélande et au Japon.



**Figure 6** : Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) en début de floraison (fiches ACTA)

Il y a une grande variation à l'intérieur de l'espèce: très alternatif à peu alternatif, très pérenne à peu persistant, précoce et remontant à tardif et reproduction végétative dominante (Balfourier et Charmet, 1995).

Le ray-grass anglais fourrager est utilisé au pâturage, en culture pure ou en association avec le trèfle blanc. Il forme un gazon dense. Cette espèce est d'ailleurs utilisée comme graminée à gazon. On le trouve dans les prairies permanentes et les prairies temporaires. C'est une plante de petite taille, de 20 à 80cm à épiaison. Il est caractérisé par des feuilles étroites, brillantes et très souples. Gillet (1980) considère que ses racines sont très superficielles (10 premiers centimètres). La stratégie de pérennité du ray-grass anglais n'est pas la même que celle de la fétuque. Contrairement aux fétuques, le ray-grass anglais lève rapidement et vigoureusement ce qui en facilite l'implantation. Il est adapté aux températures fraîches mais sensible au froid et à la sécheresse, qui pénalisent sa pérennité. Il est peu ou pas alternatif et remonte. Sa production annuelle de matière sèche atteint 9 à 13 t/ha/an (Gillet, 1980).

✓ **Le ray-grass d'Italie** (figure 7) est une espèce naturellement diploïde. Il se différencie en deux taxons : l'un très alternatif et l'autre peu ou pas alternatif (Balfourier et Charmet, 1995). Le premier taxon correspond dans le catalogue des variétés aux types "westerwold" Ce sont des ray-grass d'Italie très productifs mais très peu pérennes. Les ray-grass d'Italie "classiques" sont un peu moins productifs mais plus pérennes. Le ray-grass d'Italie est une plante de taille moyenne (30 à 120 cm). Les feuilles sont brillantes et très souples. Son utilisation principale est la fauche après une culture en pure. Il est sensible à la sécheresse. Sa remontaison est très importante à chaque coupe tant que les jours sont longs. A l'épiaison il reste très peu de talles végétatives (Gillet, 1980). La levée est rapide et vigoureuse.

Un ray-grass d'Italie non alternatif produit en semis de printemps, 5 à 12 t/ha de matière sèche entre le semis et le premier hiver. Certaines variétés de ray-grass d'Italie sont tétraploïdes. Elles sont caractérisées par des organes plus gros et moins nombreux, et par une teneur en eau plus élevée de 2 à 4 points.

Le ray-grass d'Italie et le ray-grass anglais ont été croisés pour donner les ray-grass hybrides avec l'objectif d'obtenir des caractéristiques intermédiaires aux espèces de départ: meilleure pérennité et moindre remontaison.



**Figure 7 :** Ray-grass d'Italie (*Lolium multiflorum* Lam.) en début de floraison (fiches ACTA).

### I-3 Résumé des principales caractéristiques des genres *Lolium* et *Festuca*

Le tableau 2 résume les caractéristiques des espèces décrites précédemment.

**Tableau 2** : Principales caractéristiques des espèces du genre *Lolium* et genre *Festuca*

	genre <i>Lolium</i>		genre <i>Festuca</i>		
	Ray-grass d'Italie 2n= 2x=14	Ray-grass anglais 2n=2x=14	Fétuque des prés 2n=2x=14	Fétuque élevée 2n=6x=42	Fétuque glaucescens 2n=4x=28
Vitesse d'installation	+++	++	+	+	
Précocité de démarrage	+++	++	++	+++	++
Croissance estivale	+	++	++	+	
Qualité fourragère	+++	++	++	+	
Résistance au froid	+	++	++	+++	+++
Tolérance à la sécheresse	-	+		+++	+++
Pérennité	+	++	+	+++	+++
Pâturage	+	+++	++	++	
Conservation	+++	++	++	+++	

Les ray-grass et les fétuques sont donc d'une part complémentaires sur différents aspects, et d'autre part les genres *Lolium* et *Festuca* présentent suffisamment d'homologie pour que certaines espèces puissent s'hybrider entre elles naturellement (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995). De plus il a même été remarqué que certaines fétuques se croisent mieux avec les *Lolium* que les fétuques entre elles (Balfourier et Charmet, 1995).

En pratique le sauvetage d'embryons d'hybrides permet d'obtenir des plantes suffisamment fertiles Ceci a conduit les améliorateurs à envisager des travaux de sélection en hybridations intergénériques.

### I-4 Définition des *Festulolium*

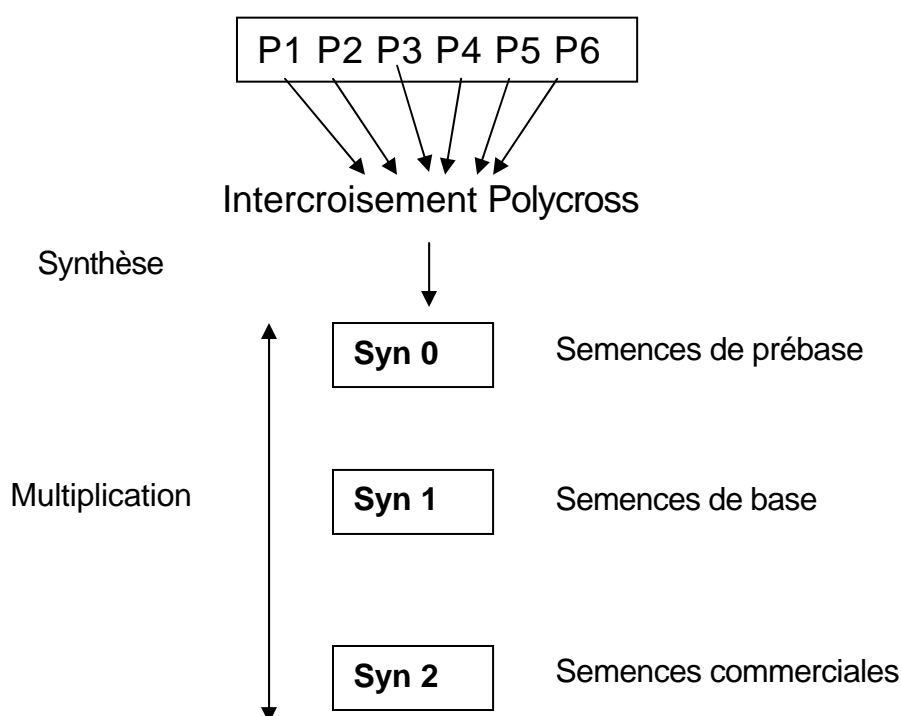
Un *Festulolium* est un hybride intergénérique (spontané occasionnel, ou artificiel) entre une espèce de fétuque et une espèce de ray-grass. Les botanistes du début de XX siècle ont forgé ce mot à partir de *Festuca* et *Lolium*, noms des deux genres à l'origine de cet hybride (Ghesquière et Mousset 2003).

## II- Schémas d'améliorations et stratégie d'obtention des hybrides interspécifiques

### II-1 Schémas classiques d'amélioration des graminées fourragères et inscription au catalogue officiel

La majorité des graminées fourragères sont allogames à pollinisation anémophile. Seuls les bromes sont autogames. Ceci a des implications dans les schémas de sélection utilisés et dans le type des variétés commercialisées.

La majorité des graminées fourragères est commercialisée sous forme de variétés synthétiques. Il s'agit de populations artificielles résultant de la multiplication d'un nombre déterminé de parents choisis pour leurs qualités agronomiques propres et leur aptitude à la combinaison. Un nombre (i) limité et connu de générations de multiplication sépare le croisement multiparental de départ (Syn 0) de la variété commerciale (Syn i) (figure 8). Les variétés synthétiques diffèrent des variétés-populations car c'est toujours la même génération de multiplication qui est commercialisée et le nombre de constituants est en théorie assez limité. Ceci permet une certaine utilisation de l'hétérosis chez ces espèces allogames où le contrôle de l'hybridation est difficile à grande échelle (Gallais, 1990).



**Figure 8 :** Formation d'une variété synthétique avec deux générations de multiplication après la synthèse issue d'un polycross de départ à 6 parents. D'après Gallais (1990).

Les constituants d'une variété sont des individus qui ont parfois subi quelques générations d'autofécondation ou des croisements frère x sœur. Ils ont été testés sur leur valeur propre et leur valeur en combinaison. Le type de croisement utilisé est le polycross. Il s'agit d'un dispositif où chaque plante mère a autant de chance d'être pollinisée par toutes les autres. La descendance du polycross est l'ensemble des familles demi-frère récoltées sur chaque plante mère.

Le nombre de parents dans le polycross est un élément important. S'il est trop faible, la consanguinité induite dans les descendance entraîne une baisse de la vigueur moyenne. S'il est trop élevé, la descendance risque de ne pas être très différente d'une population naturelle et de ce fait plutôt hétérogène.

Le nombre de générations de multiplication séparant le polycross de départ de la variété commerciale dépend des caractéristiques techniques liées à l'espèce comme : son taux de multiplication, la quantité de graines ayant été obtenue lors du croisement initial et la pérennité des clones qui constituent le polycross de départ. La vigueur des variétés synthétiques évolue vers une situation d'équilibre, le taux de multiplication peut dépendre de cette vigueur. Cependant, la compétition entre génotypes peut intervenir dans les multiplications. Si elle risque d'intervenir sur le rendement final, les constituants sont multipliés séparément et la synthèse est alors différée. Le numéro de la génération commerciale qui est déclaré est dans la pratique de 3 ou 4.

Comme pour toutes les autres espèces cultivées, la commercialisation des semences de graminées fourragères nécessite l'inscription au catalogue officiel des variétés et des semences.

Pour être inscrite, une variété doit être différente des autres et présenter des caractéristiques agronomiques et techniques intéressantes. Les épreuves sont donc de deux types

-DHS : distinction, homogénéité et stabilité,

-VAT : valeur agronomique et technologique.

Ces épreuves sont réalisées sur la semence commerciale et la semence de base, de façon simultanée et indépendante (quelquefois les expérimentations sont réalisées uniquement sur la semence de base).

Les épreuves de DHS consistent en des notations en pépinière de plantes isolées et en ligne pendant deux années successives. Il s'agit de mesures morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les épreuves de VAT consistent en des évaluations multilocales (7 à 8 lieux) en lignes et en parcelles pendant deux années. Les caractères notés concernent : la croissance et le développement, les niveaux de résistance (maladies, froid, verse, sécheresse), le rendement et sa répartition dans l'année. En fonction des espèces, les expérimentations "miment" les modes d'exploitation : fauche pour le ray-grass d'Italie, les ray-grass hybrides, et les ray-grass anglais précoces; fauche avec déprimage, c'est à dire une coupe en début de stade reproductif avant le stade épi à 10 cm, pour les fétuques et les dactyles ; essai en coupes fréquentes pour les ray-grass anglais intermédiaires et tardifs. D'autres critères sont également pris en compte comme : la pérennité, la remontaison et la production de graines, l'appétibilité mesurée avec des expérimentations sur moutons.

## II-2 Proximité génétique des deux genres

Divers arguments floristiques, moléculaires et cytogénétiques confirment la proximité génétique des genres *Lolium* et *Festuca*.

### II-2.1 Hybrides interspécifiques naturels

Des hybrides intergénériques naturels ont été décrits par Kerguélen et Plonka, 1989 *in* Marhadour, 2001. Il s'agit d'hybrides faisant intervenir la fétuque élevée, *Festuca gigantea*, la fétuque des prés et la fétuque rouge (*Festuca rubra*) d'une part et les ray-grass anglais et d'Italie d'autre part (tableau 3). Ceux-ci attestent de la proximité des ces deux genres et de leur potentiel de compatibilité.

**Tableau 3 :** Taxonomie des principaux hybrides interspécifiques et intergénériques spontanés au sein du genre *Festuca*, d'après Ghesquière et Jadas-Hécart (1995). "X" signifie "hybride".

	<i>L. perenne</i> L.	<i>L. multiflorum</i> Lam.
<i>F. arundinacea</i> ssp. <i>Arundinacea</i>	x <i>Festulolium holmbergii</i>	x <i>Festulolium braunii</i>
<i>F. gigantea</i>	x <i>Festulolium brinckmanii</i>	X <i>Festulolium nisonii cultivars</i>
<i>F. pratensis</i> ssp. <i>Pratensis</i>	x <i>Festulolium loliaceum*</i> et autres cultivars	
<i>F. rubra</i>	x <i>Festulolium frederici</i>	

\* synonymes : *Festulolium adscendens*.

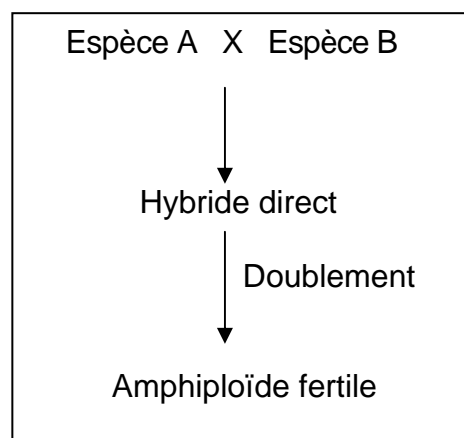
## II-2.2 Travaux de marquage génétique dans le complexe *Festulolium* et études phylogénétiques

### II-2.2.1 Stratégies d'obtention des hybrides

Deux stratégies sont possibles :

#### a) La voie amphiploïde

Elle consiste à additionner dans une seule structure le génome entier d'une espèce de fétuque et d'une espèce de ray-grass. Les hybrides directs obtenus doivent subir un doublement de leurs stocks chromosomiques afin de rétablir leur fertilité et de leur conférer un comportement disomique (Zwierzykowski, 2004) (Figure 9).



**Figure 9 :** Principe de l'amphiploïdisation

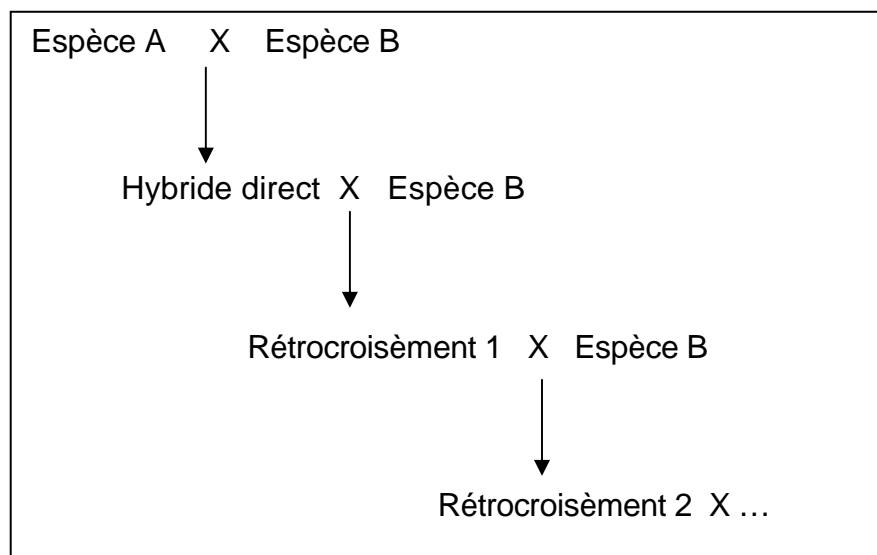
Pour que ces hybrides soient stables, les espèces parentales ne doivent pas être trop proches phylogénétiquement. En effet, les deux génomes doivent cohabiter en restant juxtaposés afin d'éviter le transfert de gènes qui compliquerait l'hérédité des caractères (Marhadour, 2001).

Il faut noter également que l'hybridation est plus facile si c'est le ray-grass qui est utilisé comme parent femelle dans le croisement. Il existe par exemple des variétés issues d'allotétraploïdes obtenues à partir de [*L. multiflorum* (4x) X *F. pratensis* (2x)] et [*L. perenne* (4x) X *F. pratensis* (2x)] qui combinent haute valeur nutritive du ray-grass, pérennité, résistance au froid et à la sécheresse de la fétuque (Zwierzykowski, 2004).

Les principaux problèmes de la voie amphiploïde sont l'instabilité du matériel obtenu et la faible productivité grainière (Thomas et al., 2002). L'instabilité est notamment dû au contrôle insuffisant de l'appariement des chromosomes homologues. Des études cytogénétiques par hybridation génomique *in situ* (GISH) ont révélé une composition génomique déséquilibrée (hétérologues) (Thomas et al 1994 ; Zwierzykowski, 2004).

#### b) La voie introgressive

Elle consiste à effectuer un rétrocroisement de l'hybride [fétuque x ray-grass] dans ce même ray-grass. Cette voie cherche à introduire un petit nombre de gènes de l'espèce donneuse (fétuque) dans le fond génétique de l'espèce receveuse (ray-grass). (Figure 10)



**Figure 10** : La voie introgressive , (Le donneur est l'espèce A et le receveur l'espèce B)

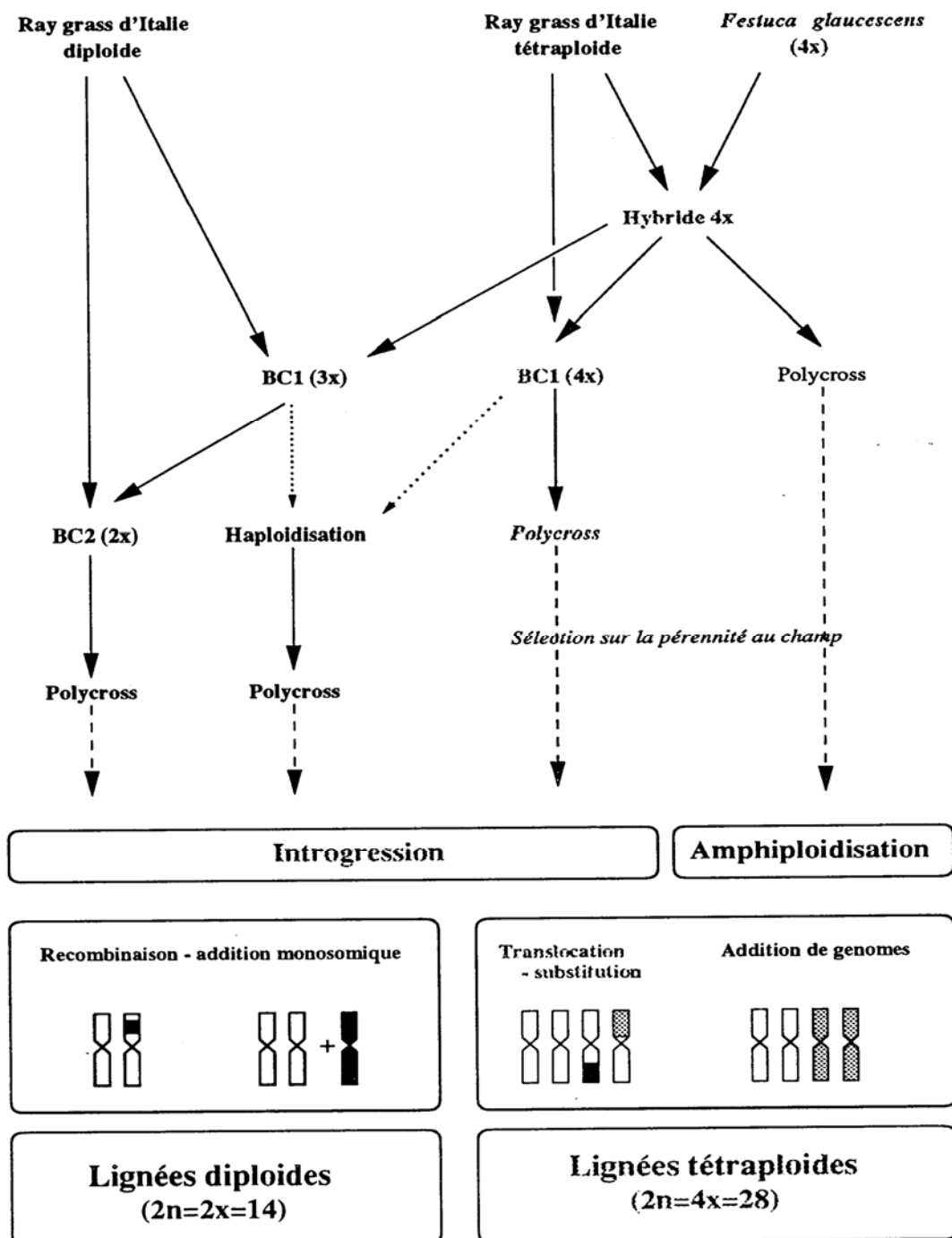
Ainsi, les individus résultants sont plus stables que les hybrides directs et leur fertilité est rapidement restaurée car le fond génétique ray-grass n'est que peu altéré par la quantité minimale de matériel étranger introduit.

Cette stratégie est particulièrement intéressante quand les caractères à introduire sont gouvernés par des gènes à effet majeur.

King et al. (1999) ont analysé par GISH la méiose d'un allotriple (Lp Lp Fp) issu d'un croisement entre *L. perenne* (4x) (LpLpLpLp) et de *F. pratensis* 2x (FpFp). Cette analyse a montré que les chromosomes d'origine *Lolium* et *Festuca* se recombinent de façon libre avec une grande fréquence. Cependant, il existe au niveau des trivalents une plus grande fréquence de chiasma Lp-Lp que de chiasma Fp-Lp.

Dans notre étude, les deux voies sont suivies en parallèle (figure 11) avec plusieurs objectifs de sélection : la pérennité, la tolérance à la sécheresse, et la production de semences. Les parents utilisés sont le ray-grass d'Italie ( $2n=4x=28$ ) et la fétuque glaucescens ( $2n=4x=28$ ). Le choix de cette fétuque qui est d'un faible intérêt agronomique par elle-même (vitesse d'installation, croissance foliaire et valeur alimentaire faibles) s'explique par sa tétraploïdie et par le fait qu'elle est plus éloignée du ray-grass d'Italie que la fétuque élevée. Ceci devrait éviter, en théorie, un trop fort taux de recombinaison préjudiciable à la stabilité des hybrides amphiploïdes.

Il s'est cependant avéré que la recombinaison a tout de même lieu (Marhadour, 1997), ce qui a relancé l'intérêt pour la voie introgressive.



**Figure 11** : Schéma d'amélioration des *Festulolium* à Lusignan : voie de l'introgession et de l'amphiploïdisation. Les diagrammes représentent quelques réarrangements chromosomiques.



Afin de faciliter la sélection, le matériel génétique introgressé doit pouvoir être repéré dans la descendance présentant des translocations.

Le recours à l'hybridation génomique *in situ* (GISH) permet de distinguer et de quantifier la proportion chromosomique parentale au sein de l'hybride. Les travaux de Kopecky et al. (2005) ont montré que le nombre de recombinaisons chromosomiques est beaucoup plus élevé chez les hybrides [ray-grass d'Italie x fétuque des prés] que chez les hybrides [ray-grass d'Italie x fétuque glaucescens] et [ray-grass d'Italie x fétuque élevée]. On peut ainsi dire que ces deux derniers hybrides se rapprochent plus de l'amphiploïde strict, alors que les hybrides [ray-grass d'Italie x fétuque des prés] permettent une plus large introgression de portions génomiques de la fétuque dans le ray-grass.

L'hybridation génomique *in situ* a permis de suivre ces réarrangements chromosomiques jusqu'à un certain point, mais la difficulté potentielle de détecter des segments introgressés de plus en plus petits au cours des générations a mené les améliorateurs à recourir au marquage génétique (Humphreys et al., 1998).

### II-2.2.2 Travaux de marquage génétique dans le complexe *Festulolium*

Un marqueur génétique ou un locus marqueur est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Ceci permet une utilisation en génétique des populations (De Vienne & Santoni, 1998).

#### II-2.2.2.1 Les isoenzymes

Ghesquière et al., (2000) ont montré grâce à l'étude du locus isoenzymatique phosphoglucosomerase (Pgi-2) qu'en rétrocroisant dans le ray-grass hybride réalisé avec la fétuque élevée, une partie des gènes seulement, ceux attribués à la fétuque des prés, étaient transmis et avec un taux faible de recombinaison. En revanche à partir d'hybrides à 28 chromosomes réalisés entre *F. glaucescens* rétrocroisée dans le ray-grass d'Italie tétraploïde, la transmission de marqueurs spécifiques de la fétuque est considérablement augmentée donnant une forte proportion de marqueurs spécifiques.

Les isozymes n'échantillonnent cependant qu'une infime partie des gènes localisés sur les chromosomes. Pour remédier à cet handicap, on a recours au marquage moléculaire afin d'exploiter la variabilité quasi-illimitée qu'offrent ces derniers (Hayward et al., 1994).

#### II-2.2.2.2 Les marqueurs moléculaires

Au départ, les techniques RFLP ont permis la réalisation d'une carte génétique chez la fétuque élevée (Xu et al., 1995), la fétuque des prés (Chen et al., 1998) mais les lourdes contraintes liées à la mise en œuvre de la technique (radioactivité) et la mise au point de techniques PCR ont justifié l'abandon de la RFLP devenue trop contraignante pour l'étude du potentiel d'introgression de la fétuque dans le ray-grass.

De Loose et al (1994) ont détecté quelque loci RAPD de ray-grass d'Italie, corrélés à la tolérance à la rouille couronnée.

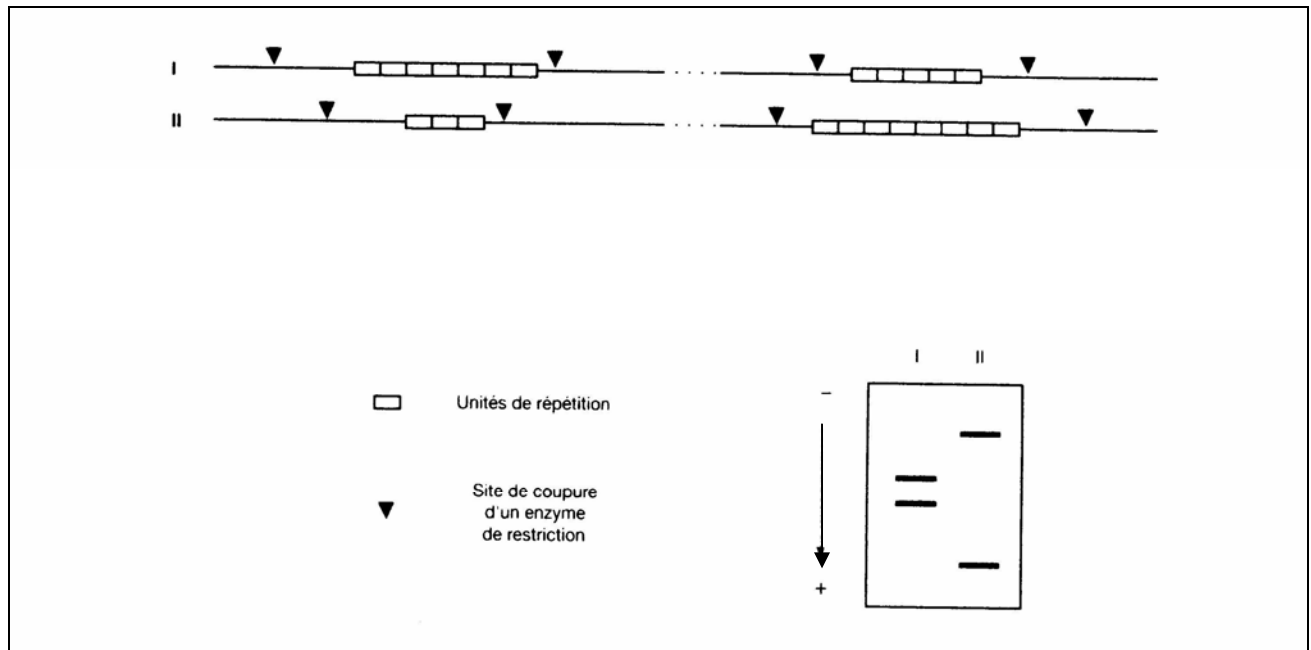
Le développement de méthodes AFLP<sup>TM</sup> et sa généralisation dans le domaine végétal ont permis la réalisation de plusieurs cartes génétiques : *Lolium perenne* (Bert et al., 1999), *Lolium multiflorum* (Fujimori et al., 2000 ; Inoue et al., 2004).

En effet cette technique, en plus de sa rapidité d'exécution et son faible coût, présente l'avantage de révéler en masse des loci (marqueurs anonymes) et de pouvoir ainsi saturer le génome de l'espèce étudiée. Cependant le manque de reproductibilité et le fait que ceux sont des marqueurs dominants, ne nous permettent pas d'accéder facilement au génome des individus, ceci restreint énormément les potentialités de détection des remaniements chromosomiques potentiels chez les populations introgressées.

### II-2.2.2.3 Les marqueurs microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat)

a) *Technique proprement dite (De Vienne et al., 1998)*

Les SSR sont constitués de répétitions et de tandems de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques. Les plus courants sont  $(A)_n$   $(TC)_n$   $(TAT)_n$   $(GATA)_n$ . La valeur de  $n$  peut aller de quelques unités à plusieurs dizaines (figure12).



**Figure 12 :** Structure générale des microsatellites. En un locus, les allèles différents par le nombre d'unités de répétitions, donc par leur longueur.

Chez les végétaux supérieurs, on estime qu'il y aurait en moyenne un microsatellite tous les 30 à 100 kb (Morgante & Olivieri, 1993 *in* De vienne *et al.*, 1998).

Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt des microsatellites en génétique, reside dans leur polymorphisme extrêmement élevé. Il s'agit ici d'un polymorphisme de nombre d'unités de répétitions. En effet, si un motif microsatellite donné n'est pas spécifique d'un locus, les régions flanquantes, par contre, le sont. Une paire d'amorces spécifiques de ces régions flanquantes amplifiera donc ce seul locus microsatellite.

b) *Essor des marqueurs SSR*

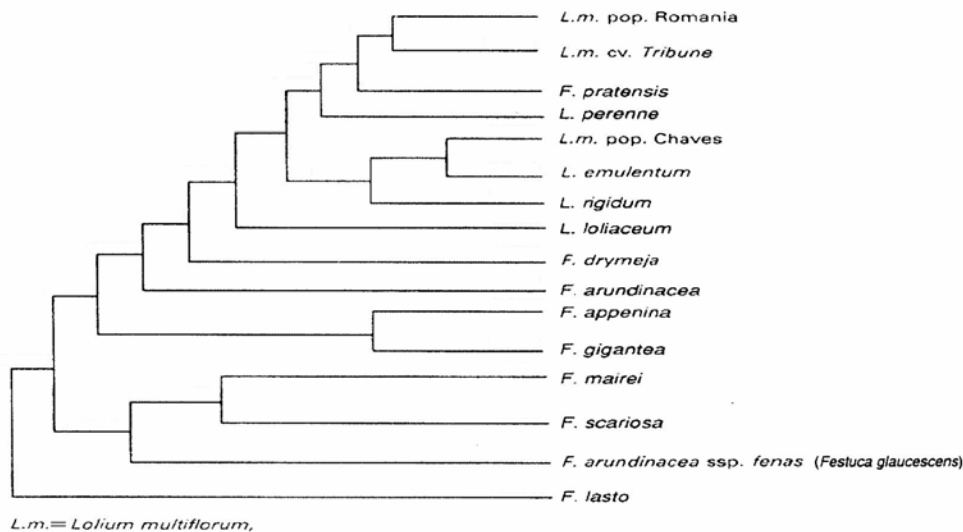
Les microsatellites fournissent des marqueurs de choix par leur abondance, leur reproductibilité élevée et la détection à un niveau multiallèliques de loci (Toshihiko & Momotaz, 2004).

Le développement de marqueurs microsatellites à partir de banques génomiques, d'EST (Expressed sequence tag) et d'autres séquences d'ADN, ainsi que l'évolution de la bioinformatique ont considérablement réduit les coûts de développement de ces marqueurs.

En effet, les approches de synténie et l'étude d'homologie de séquences entre la fétuque ou le ray-grass et certaines espèces de graminées ayant déjà fait l'objet d'un séquençage plus ou moins complet de portions génomiques et dont les informations sont disponibles via des banques de données sur internet. Ils permettent le transfert de loci SSR à travers les espèces apparentées (Saha *et al.*, 2004 a).

Lehvaslaiho *et al.* (1987) élaborent un arbre phylogénétique à l'aide de données de polymorphisme de restriction d'ADN chloroplastique. Cet arbre présente l'avantage d'intégrer *Festuca glaucescens* (figure13).

Lehvaslaiho *et al.* (1987) concluent qu'il est possible de séparer les deux genres; et que le ray-grass d'Italie est proche de la fétuque des prés et de la fétuque élevée; et qu'il y a plus de distance entre les fétuques ovines et bovines qu'entre les fétuques bovines et les ray-grass.



**Figure 13 :** Arbre phylogénétique du complexe *Lolium-Festuca* (d 'après Stammers *et al.*, 1995 *in* Marhadour, 2001).

### II-2.2.3 Etudes cytogénétiques

La présence de bivalents et de chiasmats dans différents hybrides directs entre espèces d'intérêt agronomique atteste que les chromosomes s'apparient même si les espèces sont distantes génétiquement, et même s'il existe des différences de taille de chromosomes entre elles. Le sauvetage d'embryon est le plus souvent nécessaire pour les hybrides directs. L'expérience montre que l'utilisation du *Lolium* comme parent femelle augmente les chances de réussite. La fertilité des hybrides directs est en général variable mais le doublement chromosomique la rétablit en partie (Jauhar, 1993).

Les hybrides montrent un haut niveau d'appariement méiotique, et les appariements sous forme de bivalents sont les plus fréquents même s'il y a des uni, tri et tétravalents. Des amphidiploïdes sont obtenus par doublement à la colchicine ou spontanément des hybrides directs précédents. Ils montrent des bivalents à la méiose mais quelques univalents et multivalents attestent que la méiose n'est pas totalement équilibrée (Kleijer et Morel, 1984 *in* Marhadour, 2001) L'appariement chromosomique ne semble pas augmenter après doublement des hybrides directs.

Le complexe *Festuca/Lolium* constitue donc un ensemble d'espèces suffisamment proches pour permettre l'hybridation entre les espèces, partager des marqueurs moléculaires obtenus par RAPD RFLP ou SSR et permettre la détection du polymorphisme dans une espèce en utilisant des sondes ADN provenant d'une autre. Les espèces sont cependant suffisamment différentes pour que les chromosomes de chacune soient distinguables à l'aide de l'hybridation génomique *in situ* ou que des bandes soient déclarées spécifiques d'une espèce.

### III- Aperçu de quelques résultats phénotypiques obtenus par amphiploïdisation ou introgression

Les études phénotypiques réalisées ont concerné des caractères complémentaires du genre *Festuca* et *lolium* : résistance à la sécheresse et au froid, pérennité, productivité, valeur alimentaire, fertilité, ...etc.

#### III-1 Résistance à la sécheresse et au froid

Une sélection efficace pour la résistance à la sécheresse dans des hybrides dérivés de la voie introgressive utilise l'hybride pentaploïde. Ce dernier a été rétrocroisé 2 fois dans le ray-grass d'Italie diploïde puis des polycross ont permis de multiplier le matériel. La sélection a eu lieu ensuite sur 44 lignées d'introgression, chacune représentée par 10 génotypes. Elle a été réalisée sous abris à pluie et se basait sur une notation de 0 pour les plantes mortes à 5 pour les plantes vigoureuses après deux mois de sécheresse estivale l'année suivant un semis d'automne. La moyenne des notes des lignées d'introgression était inférieure à celle du ray-grass d'Italie mais 3% des plantes avaient une note supérieure à celle de la fétuque élevée. La notation a eu lieu indépendamment de la taille des plantes. Le caryotype des plantes résistantes a été réalisé par hybridation génomique *in situ*. Ces plantes résistantes ont été étudiées en parallèle sous abris à pluie où elles ont été comparées à des amphiploïdes dérivés de *Festuca glaucescens*).

Les résultats ont montré que les amphiploïdes étaient supérieurs à tous les autres en terme de rendement dans les conditions de sécheresse naturelle de Lusignan.

La tolérance au manque d'eau des amphiploïdes précédemment cités pourrait être due à une aptitude à extraire l'eau profondément dans le sol, ce qui est une caractéristique de la fétuque.

Le profil d'alimentation en eau d'amphiploïdes dérivés de *Festuca glaucescens* et du ray-grass d'Italie a été évalué. Les résultats ont montré que les hybrides avaient une profondeur d'extraction de l'eau intermédiaire aux espèces parentales. Les mesures ont été réalisées avec une sonde à neutrons. Les deux espèces de fétuque ainsi que le ray-grass anglais extrayaient l'eau jusqu'à 180 cm alors que le ray-grass d'Italie n'extrayait pas d'eau en dessous de 80 cm. Les hybrides extrayaient l'eau jusqu'à une profondeur proche de 120 cm.

Le transfert de la résistance au froid de la fétuque des prés au ray-grass d'Italie a été recherché. Une augmentation de 32% de la survie des talles au froid a été avancée. Des amphiploïdes dérivés de ces mêmes espèces seraient plus tolérants au froid et plus pérennes. Des plantes haploïdes dérivées de l'hybride pentaploïde ray-grass d'Italie diploïde x fétuque élevée hexaploïde ont été testées pour leur tolérance au froid en chambre de culture. Cette tolérance était variable mais 6% des plantes étaient plus tolérantes que le ray-grass d'Italie est donc possible d'obtenir des hybrides interspécifiques introgressés par la fétuque qui ont une tolérance à la sécheresse du niveau de la fétuque élevée ou une tolérance au froid supérieure à celle du ray-grass d'Italie. De plus, la voie amphiploïde permet d'obtenir des caractéristiques intermédiaires aux espèces parentales pour l'extraction de l'eau.

#### III-2 Rendement, pérennité

Différents travaux montrent que des hybrides interspécifiques ont de bonnes caractéristiques en terme de productivité, de précocité et de pérennité. Des résultats ont été obtenus à partir d'intercroisements d'amphiploïdes *Lolium multiflorum* ( $2n=4x=28$ ) x *Festuca glaucescens*. L'expérience a duré 2 ans, en parcelle dense, qui étaient fauchées et pâturées.

Les hybrides s'installaient plus vite et étaient plus précoces que la fétuque élevée. Leur rendement annuel était comparable ou supérieur à celui de la fétuque élevée. La pérennité pouvait être supérieure à 3 années (Marhadour, 2001).

Des amphiploïdes dérivés de la fétuque élevée et du ray-grass d'Italie ont été évalués pour différents caractères. Des témoins parentaux étaient inclus. La croissance des semis amphiploïdes était généralement supérieure à celle des semis de fétuque. C'était aussi le cas de la taille, de la largeur des feuilles et du rendement en matière verte.

Des amphiploïdes d'origine variée peuvent donc combiner la rapidité d'installation du ray-grass d'Italie et une pérennité accrue provenant certainement des fétuques.

### III-3 Valeur alimentaire

On peut chercher à améliorer la valeur alimentaire de la fétuque en introduisant des caractères ray-grass ou bien à conserver la valeur du ray-grass en introduisant des caractères de résistance aux stress de la fétuque.

La teneur en perloline, alcaloïde pouvant inhiber la digestion des ruminants, a été mesurée dans des descendances d'hybrides entre le ray-grass d'Italie ou le ray-grass anglais et la fétuque élevée.

Les hybrides directs avaient des teneurs inférieures à celle de la fétuque élevée (716 µg/g).

Les hybrides dérivés du ray-grass d'Italie en avaient le moins : 138 µg/g (17 µg/g pour le ray-grass d'Italie).

Le même matériel (descendances d'hybrides entre le ray-grass d'Italie ou le ray-grass anglais et la fétuque élevée) a été sélectionné pour la succulence c'est à dire la teneur en eau : l'idée était que du matériel avec une plus forte teneur en eau serait plus appétible. Des corrélations positives entre la succulence, la digestibilité et l'appétibilité ont été montrées. L'appétibilité et la digestibilité d'hybrides provenant d'intercroisements d'amphiploïdes *Lolium multiflorum* (2n=4x=28) x *Festuca glaucescens* a été évaluée en comparaison avec la fétuque élevée ; Les notes d'appétibilité (échelle de 1 à 9) des familles étudiées étaient toujours supérieures à la variété de fétuque élevée la moins appétante (note 1.4) et elles pouvaient excéder la variété la plus appétante (4.6) avec des valeurs allant jusqu'à 9. La digestibilité des hybrides, mesurée par une digestion pepsine-cellulase, était variable et souvent proche de 80% alors que celle des témoins fétuque élevée était de 75 et 77%.

Il est donc possible d'améliorer certaines composantes de la valeur alimentaire des fétuques par hybridation interspécifique. L'avantage d'utiliser cette méthode est sa rapidité par rapport à une sélection classique dans la fétuque pure.

### III-4 Fertilité

La fertilité est un des problèmes les plus importants rencontrés en hybridation intergénériques. Le développement variétal dépend de la productivité grainière.

Zwierzykowski *et al.* (2004) ont sélectionné sur la fertilité dans des générations d'intercroisement d'hybrides ray-grass d'Italie doublés par la fétuque des prés doublée. Les résultats ont montré que la fertilité mâle du matériel était de 80% en moyenne même si elle était très variable ; 50% des fleurs de l'épi ont produit une graine. Zwierzykowski *et al.* (2004) ont également noté que les plantes ayant des inflorescences en forme d'épi avaient une fertilité femelle supérieure à celle ayant des inflorescences en panicules.

La fertilité moyenne de familles dérivées d'intercroisements d'amphiploïdes *Lolium multiflorum* ( $2n=4x=28$ ) x *Festuca glaucescens* était équivalente à celle de la fétuque élevée mais il y avait une grande variabilité (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995). Les comptages chromosomiques ont montré des aneuploïdes mais leur proportion tendait à diminuer avec les générations d'intercroisements. Là encore, les inflorescences en épi étaient plus fertiles que les inflorescences en panicules.

---

---

# **Chapitre II**

## **Matériel et méthodes**

---

---

## I- Stratégie du travail expérimental

### I-1 Le recensement des marqueurs SSR-PCR

Le recensement des marqueurs SSR-PCR cartographiés porte sur ceux qui ont été publiés dans le complexe *Festuca / Lolium*, et ceux ayant déjà fait l'objet d'un pré-screening et développés par le laboratoire de biologie moléculaire de l'unité de Lusignan (France).

Les publications considérées sont les suivantes :

A- Carte de liaison génétique de la fétuque élevée (6x) établie à partir de marqueurs SSR et AFLP (Saha et al., 2004 b).

B- Carte génétique d'un ray-grass hybride (2x) [*Lolium multiflorum* x *Lolium perenne*] (Waranke et al., 2004).

C- Carte génétique de ray-grass anglais (2x) établie exclusivement avec des marqueurs SSR (Jensen et al., 2005). Les trois cartes sont représentées en annexe 1.

### I-2 Tester les marqueurs recensés

Tester pour les marqueurs recensés, retenus, la qualité des électrophorogrammes (lisibilité des gels).

### I-3 Génotypage :

Le génotypage se fait à l'aide de ces marqueurs (retenus) des populations d'hybrides directs ou de back-cross en générations plus ou moins avancées.

## II- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est issu des divers programmes de croisement réalisés à la station INRA de Lusignan (France) initiés en 1986 (figure 14). Il se compose de trois groupes de matériel.

### II-1 Espèces parentales

- *L. multiflorum*: 10 individus de 3 variétés diploïdes, "Shoot", "Starter" et "Fastyl" et d'une variété tétraploïde, "Lipo", soit 40 individus;
- *F. glaucescens*: 25 individus issus des populations originales prospectées par Jadas-Hécart en 1982;

**II-2 Hybrides de première génération (F1) ou hybrides primaires** : 25 individus ont été échantillonnés parmi les 50 hybrides obtenus en 1987 par 12 croisements entre *L. multiflorum* ( $2n=4x=28$ ), pris comme parent femelle, et *F. glaucescens* suivis de culture d'embryons immatures.

- Population 8007 : il s'agit de la génération F2 des hybrides de Lusignan obtenue sans sélection par un polycross des 50 hybrides F1.



- Population 9198 :

Il s'agit de la multiplication, sans sélection, de la récolte d'un polycross de 20 individus retenus après 1 à 6 cycles de sélection (générations F2 à F7). La population 9198 est donc en génération F4-F9.

les deux origines, Lusignan et Poznan, sont représentées dans cette population, dans une proportion approximative de 2/1 respectivement à la suite d'un polycross réalisé entre 44 hybrides F2 de Lusignan et 29 hybrides F3-F4 de Poznan.

### **II-3 Rétrocroisements et intercroisements de back-cross1**

Le premier rétrocroisement (back cross 1) est issu du croisement entre l'hybride direct –au sens de l'espèce- et le ray-grass d'Italie.

Intercroisement de back cross 1 (BC1) : les individus du BC1 ont été installés en polycross. Les descendants de ces polycross maximisent les chances de présenter de la variabilité phénotypique pour des caractères de nature interspécifique.

- Population 7992 :

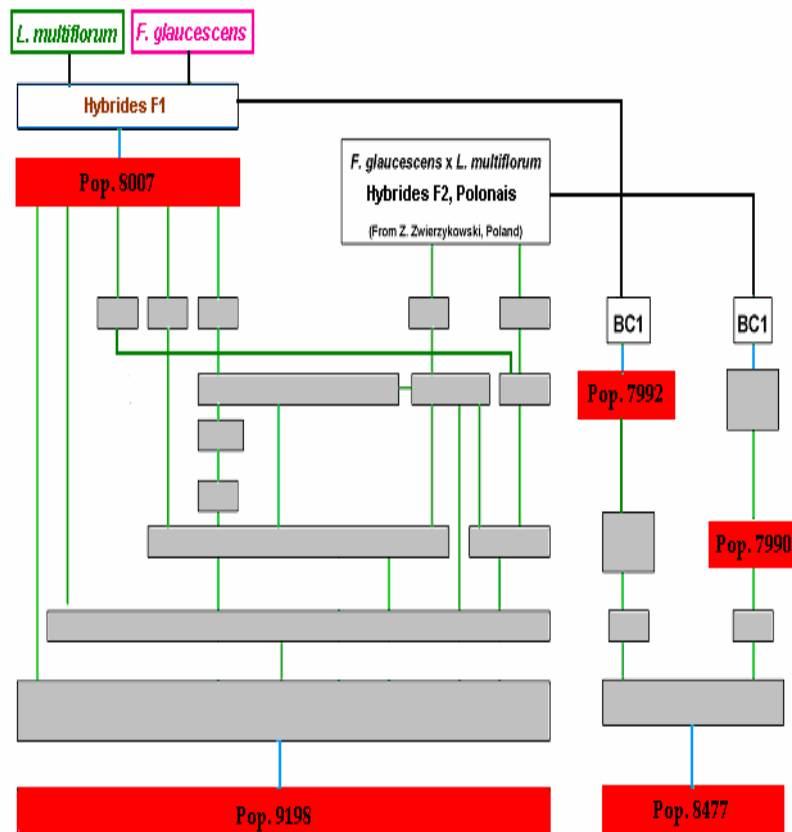
Cette population résulte d'un polycross de 28 individus échantillonnés dans 7 croisements BC1 de 5 hybrides F1 de Lusignan; les individus de la population sont donc en génération F3.

- Population 7990 :

La population provient aussi de BC1 mais dont les parents hybrides ont été sélectionnés parmi ceux de Poznan en F2-F3; deux polycross ont suivi la génération de backcross. Au final, la population étudiée est en génération F5-F6.

- Population 8477 :

Cette population a été réalisée à partir de la multiplication, sans sélection, de la récolte d'un polycross de 11 individus retenus après 2 cycles de sélection au sein des deux populations BC1 précédentes. La population 8477 est donc environ pour moitié d'origine Lusignan, en F6, et d'origine Poznan, en F8-F9.



### Légende :

- Plantes étudiées
- Polycross
- Croisements contrôlés
- Multiplication après sélection
- Multiplication sans sélection

**Figure 14 :** Représentation simplifiée de la généalogie des populations étudiées (communication personnelle).

## III- Méthodes mises en œuvre

### III-1 Extraction des ADN génomiques

Deux protocoles ont été suivis

#### III-1.1 Méthode CIMMYT : Le protocole est décrit en détail dans l'annexe 2

Comme tout notre travail expérimental repose sur la qualité des électrophorogrammes des marqueurs recensés, nous avons opté dans la partie screening (sélection) des marqueurs pour la méthode d'extraction CIMMYT.

En effet, bien qu'elle soit fastidieuse et lente (25 échantillons d'ADN extrait/jour en moyenne), cette méthode permet d'extraire de grandes quantités d'ADN (jusqu'à 500 $\mu$ l d'ADN à une concentration de 300-400ng/ $\mu$ l).

Cette méthode permet également d'obtenir des ADN de très bonne qualité en purifiant au maximum des débris cellulaires et autres molécules protéiques.

### **III-1.2 Méthode Cheung (extraction rapide en plaque de 96 échantillons)**

Le protocole est décrit en détail dans l'annexe 3

Pour cette méthode, on utilise des plaques de 96 puits ; ceci nous permet d'extraire l'ADN de 96 plantes différentes en une seule manipulation. En moyenne il est possible d'extraire 4 fois 96 ADN /jour.

Dans chaque puit on ajoute 100 mg de feuille avec une bille en acier.

La plaque est ensuite placée dans un agitateur permettant ainsi un broyage très poussé des feuilles.

Toutefois, cette méthode ne permet qu'une extraction de qualité et de quantité moyenne (50 $\mu$ l d'ADN à une concentration de 100ng/ $\mu$ l).

Vu le nombre total d'individus des populations à génotyper et la rapidité d'extraction par cette méthode, il nous a semblé que cette méthode était la plus appropriée pour cette partie du travail expérimental.

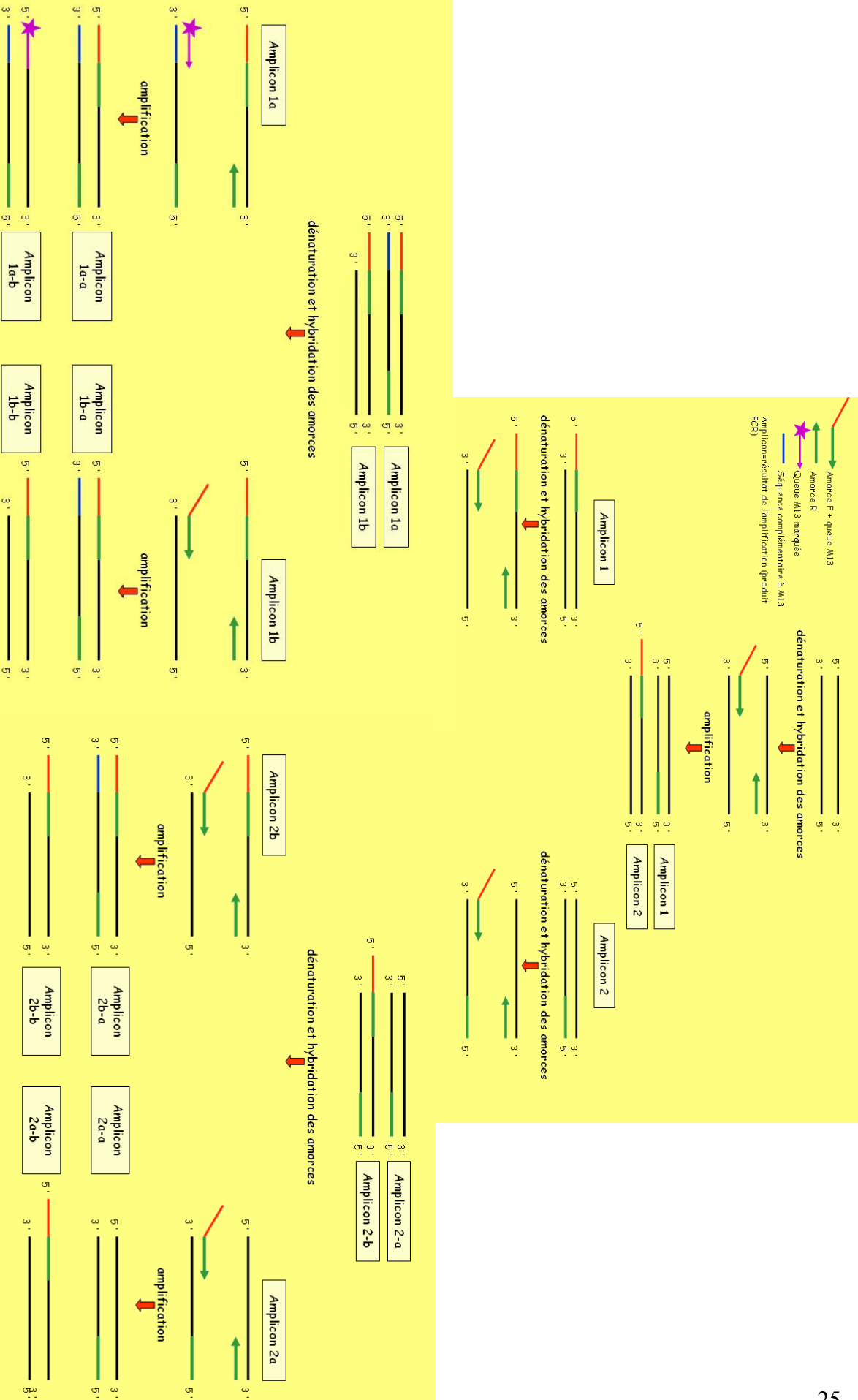
### **III-2 Amplifications PCR**

Le protocole est décrit en détail dans l'annexe 4

L'amplification est réalisée dans un volume final de 20 $\mu$ l de milieu contenant :

- 50ng d'ADN
- 0,2 mM de dNTP
- 0,5U de Taq polymerase
- Les amorces utilisées possèdent à leur extrémité une extension M13 qui permet après son amplification d'amorcer une queue M13 fluorescente à une certaine longueur d'onde (figure 15).

## Utilisation de la queue M13 dans la PCR



Au bout de 3 cycles, la queue M13 joue son rôle d'amorce et permet l'amplification d'un fragment marqué à son extrémité 5' (amplicon 1a-b). Au cycle suivant, 4 fragments vont hybrider à leur tour la queue M13 marquée (1a-a/1b-a/1a-b/2b-a) et amplifier 4 fragments marqués. Ce sont ces fragments qui seront détectés par le laser du séquenceur au cours de la migration sur le gel d'acrylamide.

Figure 15 : Principe d'une PCR avec queue M13

### III-3 Migration des produits d'amplification sur gel d'acrylamide- séquenceur

#### III-3.1 Principe du séquenceur

Le principe du séquenceur est basé sur l'utilisation de substances fluorescentes pour détecter l'ADN. Avec le séquenceur Li-COR deux substances fluorescentes peuvent être utilisées, ce qui permet de détecter à la fois deux signaux différents. Les caractéristiques des substances fluorescentes sont:

IRD800 (heptaméthine cyanine) qui fluoresce à 819 nm.

IRD700 (pentaméthine carbocyanine) qui fluoresce à 760 nm.

Les amorces utilisées lors de la PCR sont marquées avec un des deux fluorochromes (queue M13) de façon à ce que les fragments amplifiés soient marqués. Ces fluorochromes sont capables d'émettre un rayonnement si ils sont excités par un faisceau laser. La longueur d'onde d'émission est spécifique du fluorochrome (700 et 800 nm) et détectable par un système d'analyse. (Séquenceur - logiciel d'analyse). Ainsi, le séquenceur permet d'avoir une image en temps réel de la migration. Comme l'on dépose deux plaques de 96 échantillons avec deux fluorochromes différents, l'un à 700 et l'autre à 800 nm, on peut observer deux images en même temps (Figure 16).

### Séquenceur LI-COR

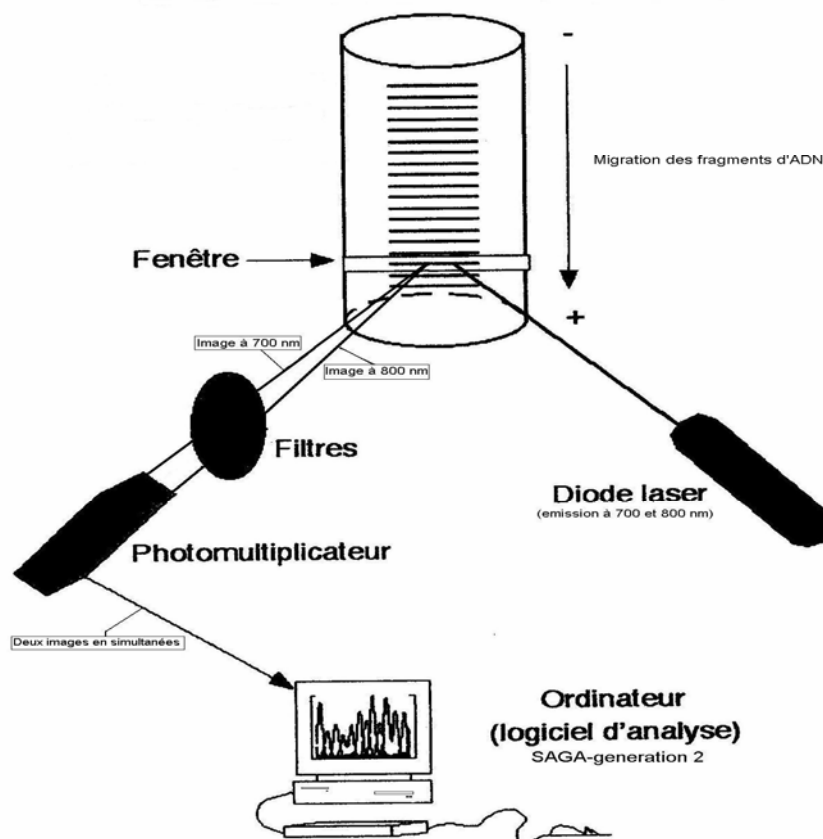


Figure 16 : Principe de fonctionnement d'un séquenceur LI-COR

### III-3.2 Préparation des gels d'acrylamide

- Préparation des plaques de verre

Les plaques de verre utilisées sont nettoyées méticuleusement, mais n'ont cependant pas besoin d'un traitement spécial car elles sont déjà prétraitées et directement prêtes à l'emploi.

- Montage des plaques :

On place les espaceurs (épaisseur de 0,25 mm) aux deux extrémités de la grande plaque, puis on positionne la plus petite plaque sur les espaceurs. Ensuite on serre grâce aux serre-joints de manière homogène sur les deux extrémités (voir schéma en annexe 5)

- Préparation et coulage du gel : Voir annexe 6

- Le pré-run :

Permet de préchauffer le gel et de régler le focus de la lentille laser du séquenceur

Les conditions de pré-run sont :

- Température : 45°C
- Voltage : 1500 V
- Puissance : 40W
- Durée : 20 min

- Préparation de la plaque de dépôt et migration proprement dite :

Un des avantages du séquenceur est de pouvoir passer deux plaques PCR en même temps car l'une sera visualisée à une longueur d'onde de 700 nm et l'autre à 800 nm (2 migrations à la fois) selon le type de fluorochrome incorporé.

Il faut également noter que le gel peut servir pour 2 dépôts successifs. Ainsi, un gel permet de réaliser 4 migrations de 96 individus.

Le protocole de préparation de la plaque de dépôt ainsi que les conditions de migration sont détaillés dans l'annexe 7.

### III-4 Méthodes statistiques utilisées dans l'étude

#### III-4.1 Suivi de l'évolution des fréquences alléliques chez les différentes populations et pour chacun des marqueurs considérés

Dans cette partie, nous raisonnerons en fonction des effectifs efficaces ( $N_e$ ) et non pas en fonction des effectifs réels ( $N$ ).

Les équations employées pour décrire le processus stochastique supposent que l'effectif est constant au cours du temps et que chaque individu contribue de façon identique au pool des gamètes et donc à la formation des zygotes. Or, en réalité, un certain nombre d'individus ne se reproduisent pas.

Afin d'utiliser ces équations, on recherche alors un nombre «  $N_e$  », sorte de « moyenne pondérée » qui remplace  $N$  dans les formules. Une population d'effectif réel  $N$  se comportera en fait comme une population « idéale » d'effectif  $N_e$ .

Dans notre cas,  $N_e$  est approximativement égal à la moyenne harmonique des effectifs réels  $N$  à la génération  $i$  ( $N_i$ ) sur la période considérée  $t$  (nombre total de générations).

$$N_e = \frac{t}{\sum_{i=1}^t (1/N_i)}$$

Si F et L sont les fréquences des allèles spécifiques f et l dans les population de *F. glaucescens* et *L. multiflorum* respectivement, alors les fréquences sont F/2 et L/2 dans les populations hybrides, et F/4 et 3L/4 dans les populations BC1.

**Remarque :** Comme toutes les populations étudiées sont tétraploïdes, le nombre maximum d'allèle observable pour un locus chez une population correspond à 4 fois  $N_e$

Pour les populations hybrides, dont l'effectif efficace  $N_e$  est assez grand ( $4N_e \geq 30$ ), on peut estimer la variance des fréquences par l'approximation de la binomiale par une loi normale, de variance:

$$F/2(1-L/2)/4N_e \text{ et } L/2(1-L/2)/4N_e$$

Et l'intervalle de confiance des fréquences au risque de 5% par :

$$\pm 1,96 \sqrt{F/2(1-F/2)/4N_e} \text{ et } \pm 1,96 \sqrt{L/2(1-L/2)/4N_e}$$

Pour les populations BC1 de petites tailles ( $N_e < 7.5$ ), on utilise le test exact de la loi binomiale au risque de 5%.

$$P(x=k) = C_n^k p^k (1-p)^{n-k}$$

Avec dans notre cas :

p (fréquence de l'allèle dans la population BC1) = F/4 pour l'allèle f et 3L/4 pour l'allèle l.

n (nombre d'allèles) =  $4N_e$ .

Ceci correspond par exemple à la probabilité de tirer parmi n allèles, k allèles *F. glaucescens* dans une population où la fréquence attendue est de F/4

### III-4.2 Comparaison des populations et étude de diversité

#### III-4.2.1 Comparaison des populations par rapport aux fréquences de leurs allèles

Les populations peuvent être comparées globalement 2 à 2 par un test de  $X^2$  (Khi2) d'homogénéité (au risque de 5%) du profil de leurs fréquences alléliques (en regroupant les classes de petites tailles  $\leq 5$ ). Pour ce test, on utilise les nombres de bandes ( $\approx$  allèles) observés réellement dans chaque population.

On peut aussi par ce même teste  $X^2$  comparer les populations pour la fréquence d'un allèle particulier.

#### III-4.2.2 Comparaisons des populations par rapport aux phénotypes observés

Dans cette partie nous avons utilisé les différentes possibilités qu'offrent le test de Kolmogorov-Smirnov (KS) <sup>(1)</sup> : test de KS appliqué à un ou à deux échantillons (au risque de 5%).

- L'étude de l'existence d'une diversité à l'intérieur même de la population (diversité intra-population) est testée par un test d'ajustement de KS (test d'un échantillon).
- L'étude de l'existence d'une diversité entre les populations (diversité inter-population) est testée par test de KS d'indépendance (test de deux échantillons). Dans ce cas l'ensemble des populations est comparé 2 à 2 pour chacun des marqueurs considérés

Le test proprement dit est effectué avec les effectifs observés dans chacune des classes de génotype ou de génotype partiellement déterminable

**Note :** dans la suite de nos propos et dans un souci de simplification nous désignerons, par abus de langage, sous le terme "phénotype" le génotype déterminé ou partiellement déterminé.

#### III-4.2.2.1 Principe du test de Kolmogorov Smirnov (KS)

##### a) Le test d'ajustement

Étant donné un échantillon  $X_1, \dots, X_n$  et une fonction de répartition de référence  $F_0(x)$  le test de KS teste l'hypothèse  $H_0$  selon laquelle l'échantillon a été prélevé dans une population de fonction de répartition  $F_0(x)$ . Pour cela, il calcule sur l'échantillon une quantité  $D_k$ , appelée "statistique de Kolmogorov", dont la distribution est connue lorsque  $H_0$  est vraie. Une valeur élevée de  $D$  est une indication que la distribution de l'échantillon s'éloigne sensiblement de la distribution de référence  $F(x)$ , et qu'il est donc peu probable que  $H_0$  soit correcte.

$$D_k(F_0, F) = \max_{i=1, \dots, n} \left\{ F_0(X_{(i)}) - \frac{i}{n}, \left| F_0(X_{(i)}) - \frac{i-1}{n} \right| \right\}.$$

<sup>(1)</sup> le test de KS représente une alternative intéressante au test du  $X^2$  car il est plus souple et permet de conclure même lorsque les effectifs théoriques sont insuffisant ( $\leq 5$ ).



Où  $F$  est la fonction de répartition empirique de l'échantillon définie comme suit :

$$F : R \rightarrow [0,1]$$

$$x \mapsto F(x) = \begin{cases} 0 & \text{pour } x < X_{(1)} \\ \vdots & \\ \frac{i}{n} & \text{pour } X_{(i)} \leq x < X_{(i+1)} \\ \vdots & \\ 1 & \text{pour } x \geq X_{(n)}, \end{cases}$$

Où les  $X_{(i)}$  sont les statistiques d'ordre de l'échantillon (valeurs de l'échantillon rangées par ordre croissant).

### ***b) le test indépendance***

C'est une extension du test précédent. C'est un test de comparaison de la distribution de 2 variables à partir de 2 échantillons indépendants ; il est basé sur l'écart maximum entre les fonctions de répartitions empiriques des deux échantillons comparé à une table dite table de Kolmogorov Smirnov pour 2 échantillons.

Calcul de la différence max  $D_{n,m}$  :

$D_{n,m} = \text{Max}_{x \in R} |F_n(x) - G_m(x)|$ , avec  $F_n(x)$  et  $G_m(x)$  les fonctions de répartition pour les échantillons  $m$  et  $n$ .

L'hypothèse nulle  $H_0$  à rejeter : il n'existe pas de différence entre les deux distributions

Si  $D_{\max} \text{ Calculé} \geq \text{Valeur critique lue sur la table de Kolmogorov Smirnov à } P=5\%$

---

---

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**

---

---

## I- Recensement des marqueurs SSR-PCR cartographiés

Les marqueurs recensés sont décrits en détail dans un tableau en annexe 8

Sur les 3 cartes génétiques utilisées (Carte fétuque élevée 6x, carte ray-grass hybride 4x, carte ray-grass anglais 2x), nous avons recensé 148 marqueurs microsatellites cartographiés sur au moins une carte, 10 marqueurs sont communs aux cartes de la fétuque élevée et du ray-grass anglais. Le tableau 4 résume les effectifs et le type de marqueurs recensés.

**Tableau 4 :** Résumé des effectifs et du type de marqueurs recensés. La lecture du tableau doit se faire en « L ».

Carte comparée Carte considérée	Fétuque élevée	Ray-grass Anglais	Ray-grass hybride	Total marqueurs/ par carte
Fétuque élevée	5 Cornell 45 Noble 1 UGAPF	12 UGAPF	4 Cornell 13 Noble	80
Ray-grass Anglais		20 DIAS 5 DLF 3 DVP 19 Kubik 13 UGAPF		72
Ray-grass hybride			2 CNL 6 Nobel	25
Total marqueurs cartographiés	148			

Sur ces 148 marqueurs recensés nous en avons sélectionnés 28 plus un (OSRB retenu d'office car ayant déjà fait l'objet de travaux par l'unité) (tableau 5) à tester en fonction des critères de sélections suivantes

- *Balayer le génome le plus largement possible* : en sélectionnant au moins un marqueur sur chaque groupe de liaison afin que tous les chromosomes soient représentés.
- *Distances génétiques entre marqueurs au sein du même groupe de liaisons* : choisir des marqueurs suffisamment éloignés entre eux pour maximiser les chances de les voir séparément (plus les marqueurs sont éloignés, plus ils ont de chance de se recombiner indépendamment au cours de la méiose).
- *Eviter les marqueurs qui nous semblent « douteux »* :
  - a) Les marqueurs dupliqués au sein du même groupe de liaison ou dupliqués entre deux groupes de liaisons différents.
  - b) Les marqueurs dont la taille attendue des allèles varie fortement entre deux cartes génétiques différentes.

**Note :** lors de notre tri de marqueurs, nous avons privilégié de capitaliser au maximum les informations délivrées par la carte génétique de L. Junsehn (ray-grass anglais) pour diverses raisons :

Tableau 5 : marqueurs sélectionnés à tester

Origine	Marqueurs	Lofium							Festuca							Amorce L	Amorce R
		GL	Taille des Allèles (Pb)	GL sur génome A	Taille des Allèles (Pb)	GL sur génome B	Taille des Allèles (Pb)	GL sur génome C	Taille des Allèles (Pb)	GL	Taille des Allèles (Pb)	GL sur génome C	Taille des Allèles (Pb)				
UGAPF	B4-D7	LG1	215				2	216	CGGGAAGCTCTCTCTCTCT	TCCAGAACCCTTCTCGAGGTC							
UGAPF	B3-B7	LG1	286			2(2)	300-290	ATCTCTGATGGCTTTGTGGC	AGGCCGACCAATACGTCGTCTC								
UGAPF	B1-B6	LG1	291					GCAAACCCAGACACCCATT	GGAGCTGCATCTTCTTGCT								
UGAPF	B3-D12	LG2	298	3	288			TACAAAGGAAGTCGGCCATC	GGGCATCACTGAGAAAGGGA								
DIAS	LpSSR076	LG2	280					AAATTCCTCCCATCAGAGAAC	CCCATACTTCGAGGCATAAA								
DIAS	LpSSR112	LG2	260					ACGCATATGTTCTTCAGAA	GACCCCGAGACAGCTA								
Kublik 1999	M4-136	LG2	183-207					TCTGGAAAGAAATTTCCCTTG	AGAGAACCATCACCAAGCC								
Kublik 2001	PR3	LG2	183-185					GCCGCCCTGCCATGCTG	GTATAGTACCCATTCCGT								
Kublik 2001	PR8	LG2	119-134					GCCGTCCGACCCCTG	AGGGTTCGCTGCTGCTTC								
Kublik 2001	PR24	LG2	148-150					GTATAGTACCCATTCCGTTGTC	TGCTGTGATGCTGAATG								
UGAPF	B1-C9	LG3	193	6(3)	200-202-220			AAAGGAAAGCCCGCTAATCAC	GAGCCGATGCACAGGTTACT								
UGAPF	B1-A2	LG3	218			6	252	AGCATCGGGAGCTATGAATG	GTGCAGCAGTTTGAATTGGA								
UGAPF	B3-B8	LG3	307			6	330	GAGAGTGGGGATCATCTTC	TGTCATGTCCGCTGTCTACG								
UGAPF	B1-A10	LG3	200					TAAAGCGTAAGGCAGCAGTG	GCGACAGGAGTGAACACTGA								
UGAPF	B4-D9	LG4	251				15	GCGAATCAAAAGAAAGCATGTG	GACGTCATACCTGCCGTGCTA								
DIAS	LpSSR006	LG4	290					TACCTGGCCAAATCTTG	CAATGGAGTCCCAACAG								
DIAS	LpSSR023	LG4	300					GCGGAGGCTTAAGGTG	ATGCACGGGTTTTATTCAIT								
Kublik 2001	PRG	LG4	140-158					CITTTTTGCCCTTCGTA	GCCGAGTGTCAATCAAGGT								
Noble	NFFA087	LG5				3	395	GCTCCAGTCACTGAAATCTCC	GATCTTGCTCCACTCGATCTG								
DIAS	LpSSR059	LG5	200					GAAAGCCACCTTCTGTTTCT	GATCGGATCGGTACAGGAGA								
Noble	NFFA069	LG5						ACGACCCGAATGGACAGAGAC	CCCAAGAAAGACGACCAA								
UGAPF	B2-F1	LG5	178					TCCATTTGTTCTTGGGAGA	CCAACCATATGCAACGATGA								
UGAPF	B4-E1	LG5	207					TGATATGCAATTTGTATGGAGG	AAACATCAACGGAAAGGATGC								
UGAPF	OSRB	LG5															
UGAPF	B3-D4	LG6	112	4	192			GGCGTCTGTGAGAGTGAAGTG	AAACCCATACCCGACATACCG								
DIAS	LpSSR058	LG6	320					GCAACCGGCTAGGGGACAGAA	CGATGAACCTCAAGGGGATTT								
UGAPF	B1-A8	LG6	295					CCCAGCTCCATTTTAATGC	GACTTTCAAGGCATCGGTCAAT								
UGAPF	B1-C8	LG7	198			5	270	GTCACGGGTTGGAGCAGTG	TTCTGGCCATGTTGATTTGC								
DLF	DLF020	LG7	280					ATAAGCGACGAGAAAGGTAA	ATGACGACGAGGAGGAAT								

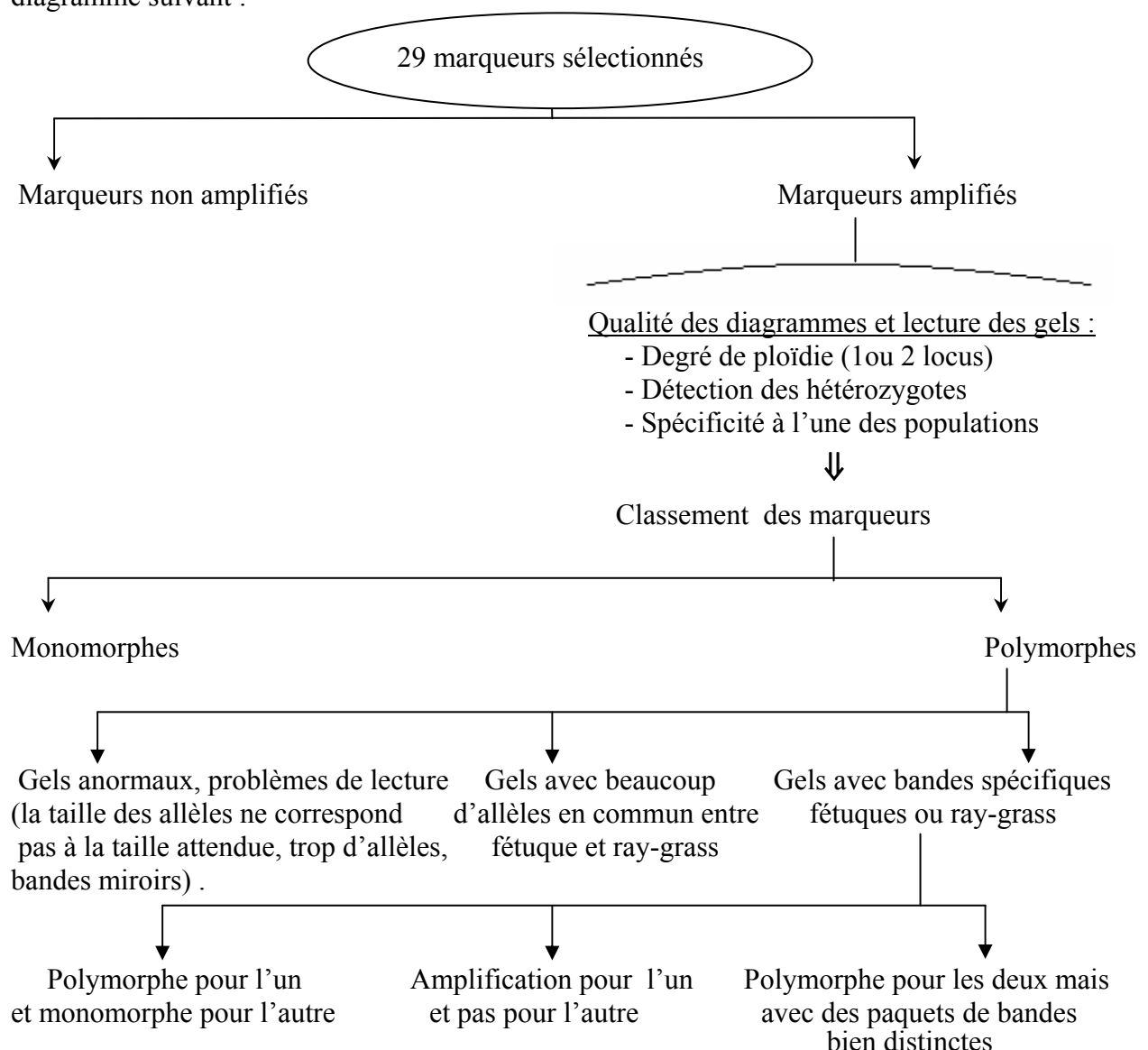
Le nombre entre ( ) correspond au nombre de duplications d'un marqueur sur un même groupe de liaison

**Note** : lors de notre tri de marqueurs, nous avons privilégié de capitaliser au maximum les informations délivrées par la carte génétique de L. Jensen et *al.*, 2005 sur le ray-grass anglais pour diverses raisons :

- cette carte a été établie avec des marqueurs déjà utilisés par le laboratoire de biologie moléculaire de l'unité. De ce fait ces marqueurs sont les mieux connus par notre laboratoire (polymorphisme, optimisation des conditions PCR, taille obtenue sur certaines populations de cartographie).
- La carte génétique de la fétuque élevée montre de multiples incohérences (taille attendue des allèles différents, marqueurs dupliqués au sein du même groupe de liaison et entre deux groupes de liaisons différents). Ces incohérences pourraient être associées à la difficulté d'établir une carte génétique au niveau hexaploïde.
- La carte du ray-grass hybride réalisée au niveau interspécifique, nous laisse penser que l'élaboration des groupes de liaisons a pu être biaisée par le fait que les allèles mâles, comme les allèles femelles, ont tendance à rester groupés entre eux.

## II- Tester pour les marqueurs recensés (screening) , retenus, la qualité des électrophorogrammes

Le screening des 29 marqueurs retenus a montré plusieurs cas de figures résumés dans le diagramme suivant :



Nous avons essayé de réduire au maximum le nombre de marqueurs dont les profils sont trop complexes (bandes miroirs, allèles en commun dont l'origine fétuque ou ray-grass est inaffirmable, nombre trop faible d'allèles détectés à l'état hétérozygote) en réduisant les quantités d'ADN à amplifier, dans le but de diminuer l'intensité des bandes et les effets miroirs.

**Remarque :** le seuil de distinction (entre chaque bande) que nous nous sommes fixés pour la lecture des électrophorogrammes (2 à 3 paires de bases) nous amène à éliminer de la suite de notre travail tous les marqueurs dont les gels ne sont pas assez lisibles à ce seuil de distinction.

Notre obligation à faire des lectures très précises est dictée par le fait que nous voulons comparer plusieurs populations apparentées, ce qui nous oblige à distinguer la moindre différence entre les profils électrophorétiques obtenus.

### III- Génotypage des populations étudiées à l'aide d'un ensemble de marqueurs

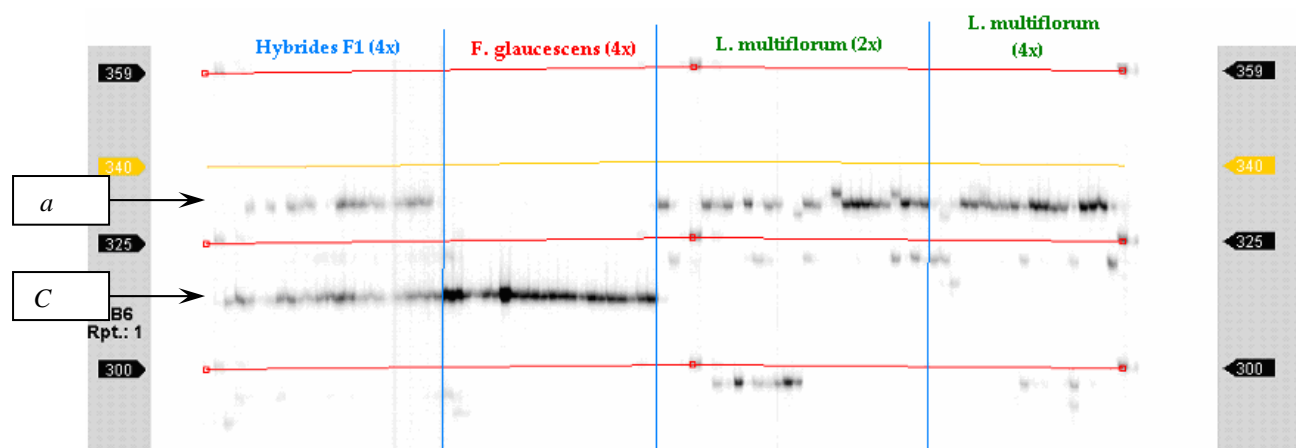
Lors de ce travail nous nous sommes heurtés à de grosses difficultés de correspondance des allèles entre profils parentaux (lors du screening) et les profils obtenus sur les différentes populations de descendants.

Ceci nous laisse penser qu'il est très probable que les ADN stocks utilisés soient de mauvaise qualité. En effet non seulement ces derniers ont été extraits il y a 3 ans mais en plus une partie a été utilisée lors de divers travaux de recherche menés à l'unité, ce qui a pu contribuer d'une part à la dégradation des ADN stocks et d'autre part à leur pollution par des ADN exogènes.

Compte tenu du seuil de précision que nous nous sommes fixés au départ et au regard des difficultés mentionnées plus haut ; nous nous sommes trouvés dans l'obligation de n'exploiter que les informations délivrées par un ensemble restreint de marqueurs qui sont les suivants : OSRB, B4D7, B1C8, B1B6.

B1B6 présente la particularité de reconnaître spécifiquement des séquences fétuque ou ray-grass et les amplifie (Figure 17).

Cela veut dire que ce genre de marqueurs permettrait de localiser et de suivre au cours de générations interspécifiques des allèles dont l'origine (fétuque ou ray-grass) ce qui le rend très informatif au niveau allélique. Par conséquent nous apporterons un intérêt particulier à B1B6 dans la suite de notre étude (considéré comme référentiel dans notre étude).



**Figure 17 :** électrophorogramme obtenu par B1B6 sur une plaque contenant des *F. glaucescens* (4x), *L. multiflorum* (2x et 4x) et 20 hybrides primaires entre les 2 espèces.

### III-1 Etude des fréquences alléliques

Le génotypage des électrophorogrammes des différentes populations étudiées, obtenues à partir des marqueurs retenus (OSRB, B4D7, B1C8, et B1B6) est exprimé sous forme de fréquences alléliques (effectif de l'allèle considéré/effectif d'allèles total) dans les tableaux 6, 7, 8 et 9 respectivement.

Les histogrammes 1, 2, 3 et 4 sont des représentations en proportions relatives d'allèles : contribution de chaque allèle dans le pool total d'allèles pour un locus (marqueur) dans une population donnée. Ce type de représentation nous permet de faire un suivi de chaque allèle dans les différentes populations pour chacun des marqueurs.

Note : Du fait que B1B6 reconnaît spécifiquement les séquences fétuque (Allèle *C*) ou ray-grass (Allèle *a*) il est très intéressant de calculer les fréquences parentales. En effet ce dernier nous permettent de faire un suivi de fréquence chez les descendants (populations étudiées) suivant leurs généalogies et de les comparer à ces dites fréquences parentales.

**Tableau 6 :** fréquences alléliques obtenues après génotypage des différentes populations au marqueur B1B6

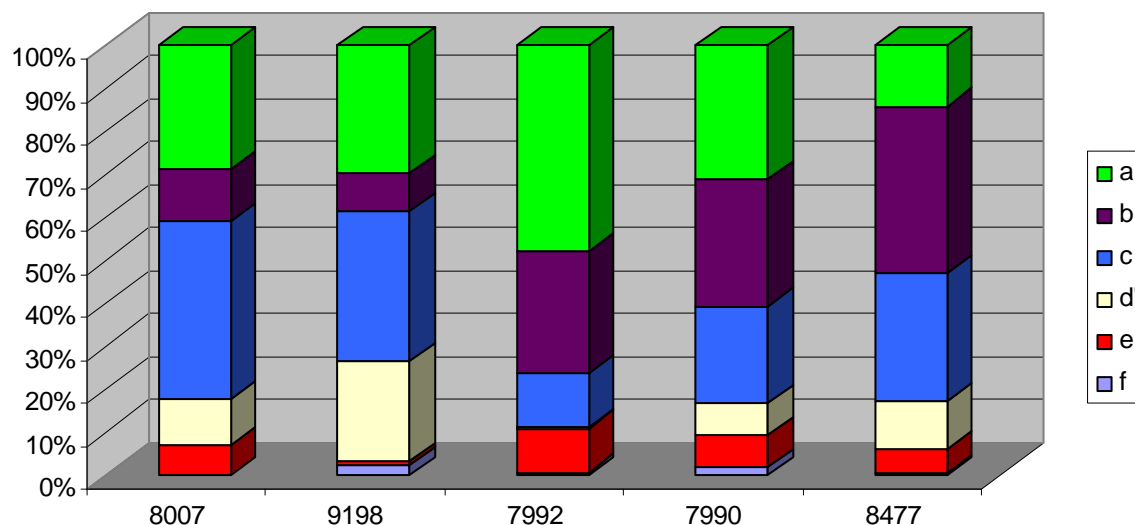
B1B6	<i>F.glaucescens</i>	<i>L.multiflorum</i>	Hybrides F1	Pop 8007	Pop 9198	Pop 7992	Pop 7990	Pop 8477	
Effectif d'individus	23	39	18	162	177	163	173	164	
Effectif d'allèles	23	97	30	456	495	443	533	445	
Fréquences d'allèles	<i>a</i>	0.773	0.433	0.287	0.296	0.470	0.309	0.140	
	<i>b</i>		0.093	0.123	0.089	0.296	0.296	0.390	
	<i>c</i>	1.000		0.414	0.351	0.124	0.229	0.299	
	<i>d</i>			0.105	0.230	0.002	0.075	0.111	
	<i>e</i>		0.124		0.070	0.008	0.102	0.073	0.054
	<i>f</i>		0.010			0.024	0.007	0.017	0.005

Les allèles « *a* » et « *c* » sont spécifiques de *Lolium multiflorum* et de *Festuca glaucescens* respectivement.

Avec :

La fréquence parentale de l'allèle *a* est de 0.773

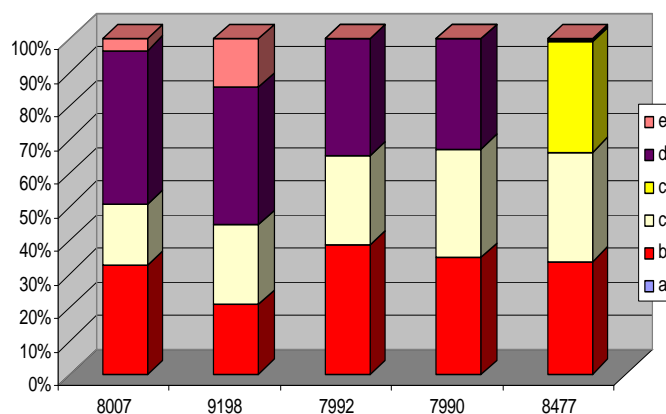
La fréquence parentale de l'allèle *c* est de 1.000



**Histogramme 1 :** contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur B1B6.

**Tableau 7 :** Fréquences alléliques obtenues après Génotypage des différentes populations au marqueur B1C8

	B1C8	Pop 8007	Pop 9198	Pop 7992	Pop 7990	Pop 8477
	Effectif d'individus	169	181	169	185	172
	effectif d'allèles	514	598	486	547	513
Fréquences d'allèles	a		0,002			0,002
	b	0,327	0,207	0,385	0,349	0,335
	c	0,181	0,237	0,267	0,324	0,326
	c'					0,329
	d	0,457	0,408	0,348	0,327	0,002
	e	0,035	0,145			0,006

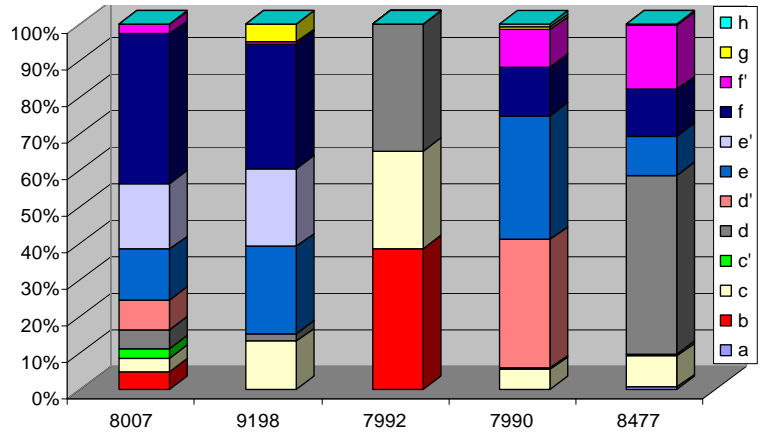


**Histogramme 2:** contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur B1C8



**Tableau 8 :** Fréquences alléliques obtenues après génotypage des différentes populations au marqueur B4D7

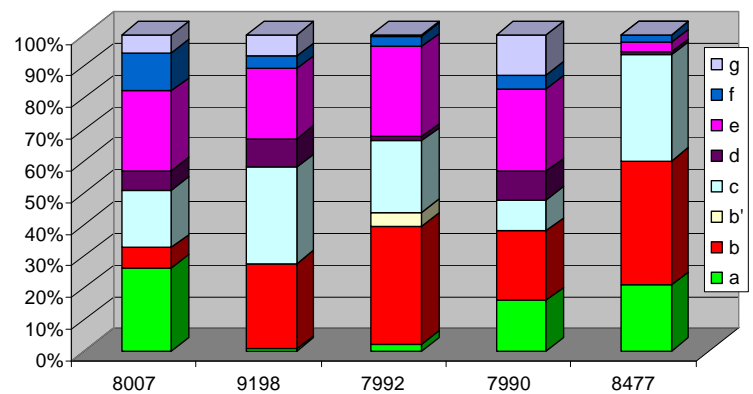
	B4D7	Pop 8007	Pop 9198	Pop 7992	Pop 7990	Pop 8477
	Effectif d'individus	178	181	169	185	165
	effectif d'allèles	541	478	486	560	531
Fréquences d'allèles	a					0,006
	b	0,048		0,385		
	c	0,037	0,132	0,267	0,054	0,085
	c'	0,026				0,006
	d	0,052	0,021	0,348	0,004	0,490
	d'	0,081			0,352	
	e	0,139	0,238		0,339	0,107
	e'	0,181	0,213			
	f	0,409	0,339		0,134	0,128
	f'	0,026	0,006		0,102	0,175
	g	0,002	0,050		0,007	0,004
	h				0,009	



**Histogramme 3 :** contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur B4D7

**Tableau 9 :** Fréquences alléliques obtenues après génotypage des différentes populations au marqueur OSRB

	OSRB	Pop 8007	Pop 9198	Pop 7992	Pop 7990	Pop 8477
	Effectif d'individus	165	145	164	124	53
	effectif d'allèles	468	435	439	334	125
Fréquences d'allèles	a	0,264	0,007	0,023	0,162	0,208
	b	0,062	0,269	0,371	0,219	0,392
	b'			0,046		
	c	0,183	0,306	0,226	0,099	0,336
	d	0,060	0,090	0,011	0,090	0,008
	e	0,252	0,221	0,285	0,260	0,032
	f	0,122	0,039	0,034	0,042	0,024
	g	0,058	0,069	0,005	0,129	



**Histogramme 4 :** contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur OSRB

Au regard des résultats exprimés dans le tableau 6 nous pouvons étudier l'évolution des fréquences aux allèles  $a$  et  $c$  pour les différentes populations par rapport aux fréquences parentales :

- 1/2 de la dose parentale chez les hybrides
- 3/4 de la dose parentale *L.multiflorum*, et 1/4 de la dose parentale *F.glaucescens* chez les BC1.

Comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe III-4 du chapitre II (méthodes statistiques utilisées) l'estimation de la variance et de l'intervalle de confiance des fréquences alléliques obtenues se fait pour les populations hybrides par une approximation de la binomiale par une loi normale ; alors que pour les BC1 d'effectifs faibles on utilise le test exact de la loi binomiale. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau 10.

**Tableau 10** : Fréquences alléliques de  $a$  et  $c$  et calcul de leurs intervalles de confiance pour les différentes populations étudiées.

	<i>F.glaucescens</i>	<i>L.multiflorum</i>	Hybrides F1	Pop 8007	Pop 9198	Pop 7992	Pop 7990	Pop 8477
Effectif d'individus	23	39	18	162	177	163	173	164
Effectif efficace $N_e$			24	16.28	16.59	3.82	3.27	4.08
Effectif d'allèles	23	97	30	456	495	443	533	445
Fréquences d'allèles	$a$	0.773	0.433	0.287*	0.296*	0.580	0.309*	0.140*
	$c$	1.000	0.567	0.414	0.351*	0.124	0.229	0.299
Intervalles de confiances	$a$			[0.29, 0.50]	[0.38, 0.62]	[0.33, 0.83]	[0.46, 0.86]	[0.43, 0.93]
	$c$			[0.36, 0.63]	[0.40, 0.59]	[0.06, 0.40]	[0.06, 0.40]	[0.06, 0.43]

\* : Correspond aux fréquences qui n'appartiennent pas à l'intervalle de confiance déterminé.

### III-1.1 Informations délivrées par le marqueur spécifique B1B6

#### Pour l'allèle $a$ :

Nous remarquons que pour cet allèle toutes les fréquences hormis celles de la population 7992 sont plus basses que la borne inférieure définie par l'intervalle de confiance. Ceci indique que chez les populations 8007, 9198, 7990, et 8477 l'allèle  $a$  a fait l'objet d'une contre sélection.

- Chez les populations hybrides cette contre sélection serait intervenue de manière subite dès la première génération de polycross des hybrides F1 (population 8007).

Cependant les effets de cette contre sélection ne semble pas s'accroître au cours des générations suivantes, de tel sorte qu'une fois contre sélectionnée dans la population 8007 la fréquence de l'allèle *a* semble se stabiliser pour se maintenir jusqu'à la population 9198.

- Chez les populations BC1 la contre sélection semble intervenir chez les populations 7990 et 8477 mais pas chez la population 7992. Ceci pourrait s'expliquer d'une part par des recombinaisons méiotiques intervenues lors des polycross précédents à la création de la population 7992 et d'autre part par le fait que la population 8477 soit issue d'un polycross entre 7992 et 7990. Il est évident qu'en plus des recombinaison éventuelles, la contre sélection de l'allèle *a* en amont au niveau de la population 7990 serait également à l'origine de la contre sélection de l'allèle *a* dans la population 8477.

#### **Pour l'allèle *c* :**

Hormis pour la population 9198, les fréquences de l'allèle *c* chez les différentes populations appartiennent aux intervalles de confiance définis, ce qui nous laisse penser que globalement, la fréquence de l'allèle *c* n'a évolué par rapport à celle dans les populations parentales que uniquement par effet de dérive génétique ; c'est à dire par réduction de la taille des populations au cours des générations.

Nous pouvons également supposer que d'une manière générale les effets de dérive puissent être suffisamment forts pour contrecarrer les effets de la sélection à travers les générations.

- Chez les populations hybrides, contrairement à l'allèle *a* la fréquence de l'allèle *c* n'a pas été contre sélectionnée dès la première génération de polycross des hybrides F1 (8007),
- Chez les populations BC1, les intervalles de confiance calculés par le biais du test exact sont tellement grands que la pertinence du test en devient amoindrie. Par conséquent la discussion des résultats devient possible par la comparaison des fréquences dans l'absolu.

Les fréquences des différentes populations pour l'allèle *c* n'ont pas évolué significativement par rapport aux fréquences parentales. On peut même dire que dans l'absolu la fréquence de l'allèle *c* a augmenté à travers les générations de BC1, ce qui revient à dire que seul le jeu de la dérive génétique suffit à expliquer cette évolution.

#### **III-1.2 Informations délivrées par les marqueurs non spécifiques**

Les histogramme de fréquences relatives (2, 3 et 4) obtenues pour chacun de ces marqueurs (OSRB, B4D7, et B1C8) montrent une apparition de nouveaux allèles au niveau de générations (populations) plus ou moins avancées. Ce qui en principe ne devait pas être le cas. Ces aberrations nous renvoient directement à la qualité de nos gels et aux difficultés de lecture (bandes miroirs, bandes trop épaisses) rencontrées.

Malgré nos multiples essais d'optimisation de la qualité des gels (dilution des quantités d'ADN pour la PCR) la persistance des artefacts de manipulation (PCR ou Licor) nous laisse penser que cela est lié à la qualité des ADN (dégradations du aux différentes manipes menées à l'unité).

Du fait de ces artefacts nous, discuterons cette partie de manière globale ;

Chez les populations hybrides : au niveau de chaque marqueur, nous remarquons que pour les allèles majeurs (grande fréquence relative), l'évolution reste relativement lente.

Chez les populations BC1 : contrairement aux populations hybrides les fréquences des allèles majeurs évoluent de façon beaucoup plus prononcée ; surtout entre la population 7992 et 8477.

L'étude des fréquences de l'allèle *a* et *c* du marqueur spécifique B1B6 et l'étude plus globale avec les autres marqueurs (OSRB, B4D7, B1C8) montre que les générations hybrides successives à la population 8007 correspondraient à des populations allopolyploïdes ou les deux génomes *Festuca* et *Lolium* cohabiteraient tout en évoluant de manière relativement indépendante (structure disomique se rapprochant de l'amphiploïdie stricte), ce qui pourrait expliquer la relative stabilité des hybrides. Cependant la contre sélection de l'allèle *c* dans la population 9198 nous laisse penser que cet allotétraploïde aurait évolué par recombinaison au moment du polycross entre les hybrides de Lusignan et ceux de Poznan. L'évolution plus prononcée chez les populations BC1 correspondrait à une structure allotétraploïde ou les appariements homéologues seraient plus aisés.

### III-2 Comparaison des populations par leurs fréquences alléliques au marqueur B1B6

#### III-2.1 Comparaison globale des populations 2 à 2 par un test $X^2$ (khi2) d'homogénéité du profil de leurs fréquences alléliques au seuil de 5%

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 11.

*Note* : les classes correspondant aux allèles *d*, *e*, *f* ont été regroupées (*d+e+f*) car elles avaient une taille trop faible ( $\leq 5$ ).

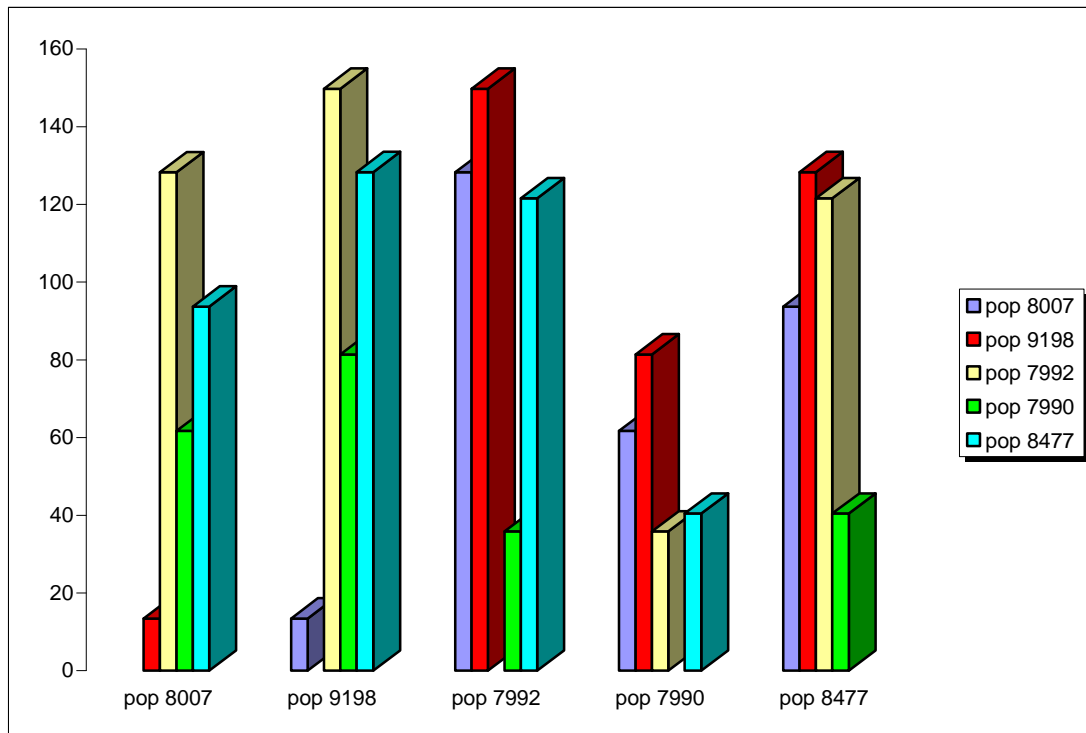
Nous remarquons que les valeurs du  $X^2$  sont significatives à très significatives entre certaines paires de populations, particulièrement entre les hybrides et les BC1 (Tableau 11).

**Tableau 11** : Récapitulatif des valeurs du  $X^2$  calculées pour les différentes populations

Avec ddl = 3 et  $X^2_{(3;0.05)} = 7,814$

	pop 8007	pop 9198	pop 7992	pop 7990	pop 8477
pop 8007		13,462	128,280	61,7083	93,7385
pop 9198			149,73995	81,4128451	128,337
pop 7992				35,851	121,557
pop 7990					40,4313
pop 8477					

La valeur du  $X^2$  devient alors une sorte de mesure de la distance génétique entre les populations (voir l'histogramme 5).



**Histogramme 5** : Comparaison des distances entre populations par leurs  $X^2$  aux fréquences alléliques

*Note* : les distances exprimées par  $X^2$  ne sont pas des mesures géométriques, elles ne sont donc pas additionnables.

Comme nous l'avons supposé, nous remarquons que les populations hybrides et BC1 sont très éloignées. Cet éloignement semble s'accroître au fur et à mesure de l'avancée en générations des BC1.

Les deux populations 8007 et 9198 qui dérivent directement des hybrides semblent très proches l'une de l'autre.

La population 7992 (BC1 des hybrides de Lusignan) semble être relativement proche de la population 7990 (BC des hybrides Polonais). Cependant la population 7992 est très éloignée de la population 8477, alors que cette dernière résulte d'un croisement en descendance de polycross de 7992 et 7990.

La population 8477 est donc quasiment aussi éloignée de la population 7992 que des populations hybrides.

### III-2.2 Comparaisons des populations sur la base de leurs fréquences alléliques au marqueur B1B6, exemptées des fréquences de l'allèle *c*

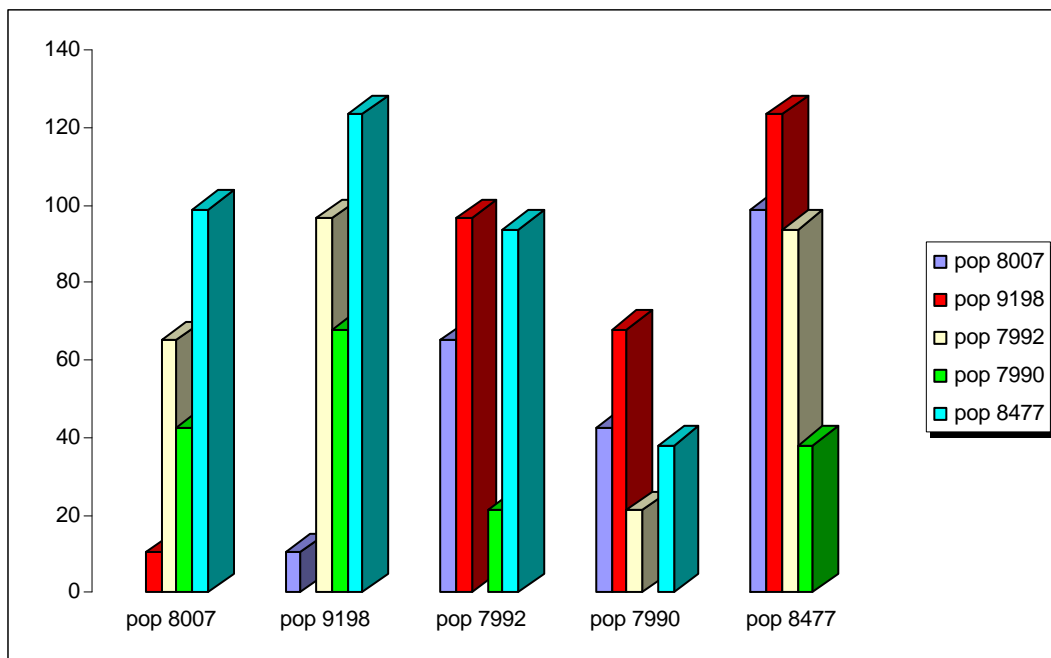
Dans cette partie nous avons tenté comme précédemment de calculer le  $X^2$  par test d'homogénéité du profil des fréquences alléliques, sauf que dans ce cas nous n'avons considéré que les classes correspondantes aux fréquences alléliques non attribuées à *Festuca glaucescens* (omission délibérée des fréquences de l'allèle *c*). Ceci revient à dire que nous cherchons à évaluer les distances génétiques entre populations expliquées par les allèles non *F. glaucescens*. Nous noterons ce khi2 par :  $X^2_{(-c)}$

Les résultats sont exprimés dans le tableau 12 et l'histogramme 6.

**Tableau 12 :** Récapitulatif des valeurs du  $X^2_{(-c)}$  calculé pour les différentes populations

Avec ddl = 2 et  $X^2_{(2;0.05)} = 5,991$

	pop 8007	pop 9198	pop 7992	pop 7990	pop 8477
pop 8007		10,36942355	65,0891176	42,5159514	99,0139327
pop 9198			96,6519501	67,9504682	123,376766
pop 7992				21,1930738	93,5872136
pop 7990					38,1498407
pop 8477					



**Histogramme 6 :** Comparaison des distances entre populations par leurs  $X^2_{(-c)}$  aux fréquences alléliques

Hormis que les valeurs de  $X^2$  soient plus faibles pour  $X^2_{(-c)}$  que pour le  $X^2$  calculé par l'ensemble des fréquences alléliques sans distinction à cause d'un ddl plus faible (2 au lieu de 3 au départ), l'allure générale des deux histogrammes (1 et 2) est rigoureusement identique.

Ceci nous laisse penser que la proportion en allèles d'origine *F.glaucescens* ne suffit pas à expliquer les différences entre populations ; bien au contraire ce sont les fréquences aux autres allèles (non attribuées à *F.glaucescens*) qui expliqueraient une grande partie de ces différences.

L'évaluation des distances génétiques entre populations par  $X^2$  de fréquences alléliques globales est très cohérente avec l'origine génétique des populations (généalogie).

Ainsi il semble que l'évolution des populations hybrides 8007 et 9198 est très lente. Ceci laisse penser que la composition en chromosomes *F.glaucescens* et *L.multiflorum* ne change que relativement peu. Ces hybrides se rapprocheraient donc d'une structure amphiploïde (tétraploïde à hérédité disomique).

Par contre chez les trois populations de BC1 étudiées, comme nous pouvions nous y attendre, l'évolution est beaucoup plus prononcée, surtout entre la population 7992 et 8477. Ceci s'explique par le fait que chez les BC1, les chromosomes d'origine *F.glaucescens* ne se retrouvent qu'en un seul exemplaire, ce qui les oblige à faire des appariements homéologues pour pouvoir se maintenir, alors que les chromosomes d'origine *L.multiflorum* ont la possibilité de réaliser des appariements homologues.

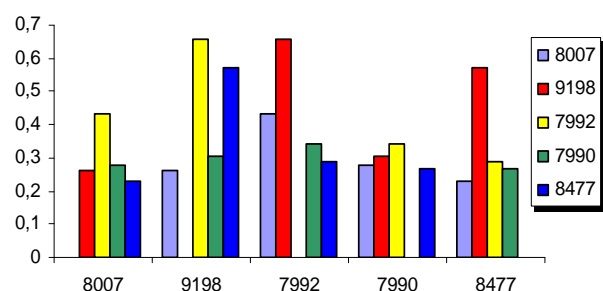
### III- 3 Comparaisons des populations 2 à 2 sur la base des phénotypes observés par un test indépendance de Kolmogorov Smirnov : Diversité interpopulation

Dans cette partie nous avons effectué un test d'indépendance des phénotypes obtenus pour les populations prises 2 à 2 de kolmogrov (test de kolmogrov pour 2 échantillons) : lorsque le test est significatif, la valeur de la statistique Dk nous donne une idée sur la distance entre les populations. Dans le cas contraire (non significatif) cela revient à dire que les populations ne diffèrent pas par leurs effectifs phénotypiques.

Les résultats obtenus, pour les différents marqueurs, sont reportés dans les tableaux 13, 14 15 et 16 et les histogrammes 7, 8, 9, 10 et 11, respectivement (voir le détail des calculs en annexe 9)

**Tableau 13** : Récapitulatif des valeurs Dk calculées pour les différentes populations au marqueur B1B6

B1B6	8007	9198	7992	7990	8477
8007		0,263	0,432	0,277	0,232
9198			0,655	0,302	0,571
7992				0,34	0,287
7990					0,266
8477					



**Histogramme 7** : Comparaison des distances entre populations par leurs Dk au marqueur B1B6

Nous remarquons que les résultats de la comparaison des populations sur la base de leurs fréquences alléliques et sur la base des différents phénotypes observés semblent globalement se rejoindre ; avec cependant plus de nuance pour l'étude de diversité sur la base des phénotypes : Les deux populations 8007 et 9198 dérivant directement de l'hybride reste très proches. Néanmoins il semblerait qu'au niveau phénotypique la population 8007 soit aussi proche de 9198 que de 7990 et 8477. Alors que 9198 se rapprocherait de 7990.

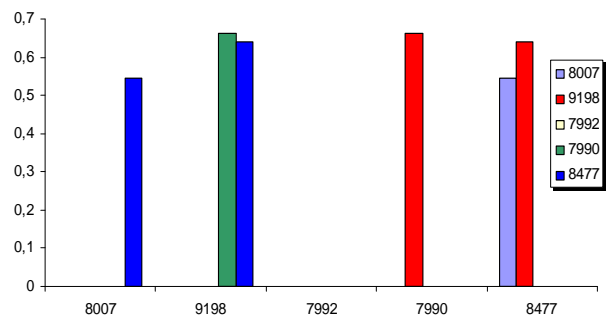
La population 7992 (BC1 des hybrides de Lusignan) est phénotypiquement plus proche de 8477 que de 7990. Cependant 7990 semble avoir quasiment la même distance vis-à-vis de l'ensemble des populations (issues des hybrides et des BC1).

La population 8477 est donc aussi éloignée de 7992 et 7990 que de 8007.

**Tableau 14** : Récapitulatif des valeurs Dk calculées pour les différentes populations au marqueur B1C8

B1C8	8007	9198	7992	7990	8477
8007		NS*	NS	NS	0,545
9198			NS	0,663	0,639
7992				NS	NS
7990					NS
8477					

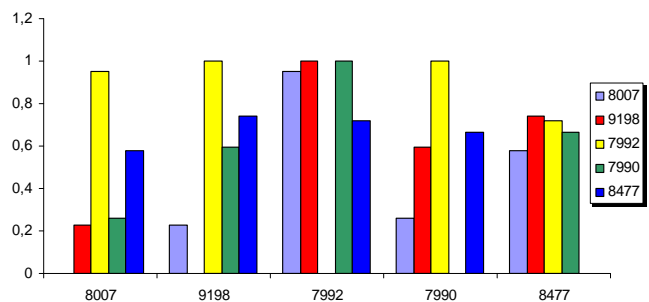
\* Non significatif



**Histogramme 8** : Comparaison des distances entre populations par leurs Dk au marqueur B1C8

**Tableau 15** : Récapitulatif des valeurs Dk calculées pour les différentes populations au marqueur B4D4

B4D4	8007	9198	7992	7990	8477
8007		0,228	0,949	0,257	0,579
9198			1	0,597	0,74
7992				1	0,721
7990					0,665
8477					

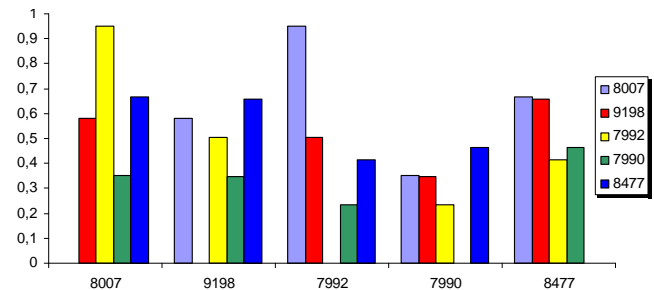


**Histogramme 9** : Comparaison des distances entre populations par leurs Dk au marqueur B1D4



**Tableau 16** : Récapitulatif des valeurs Dk Calculées pour les différentes populations au marqueur OSRB

OSRB	8007	9198	7992	7990	8477
8007		0,582	0,952	0,352	0,667
9198			0,503	0,345	0,657
7992				0,236	0,414
7990					0,464
8477					



**Histogramme 10** : Comparaison des distances entre populations par leurs Dk au marqueur OSRB

Le nombre trop important de phénotypes révélés (pour les marqueurs OSRB, B4D7, B1C8) ne nous permet pas de pouvoir comparer les populations l'une à l'autre de façon détaillée sans biais. Autrement dit l'intégration de toute les bandes (l'ensemble de l'information) risque d'amplifier l'effet des artefacts de manipulation Licor et PCR.

L'ensemble des contraintes énumérées ci-dessus ne nous permet pas de tirer des conclusions précises mais juste avoir une vue d'ensemble de la diversité exprimée par les marqueurs OSRB, B4D7, B1C8.

On peut seulement dire que ces résultats ne contredisent pas les conclusions tirées à partir de B1B6.

### III- 4 Etude de diversité à l'intérieur même de chaque population

Dans cette partie nous avons effectué un test d'ajustement de Kolmogrov sur les phénotypes obtenus dans chacune des populations et pour chaque marqueur. Ce qui revient à dire que nous avons voulu chercher l'existence de différences entre les effectifs de chaque phénotype (diversité intra population).

Le tableau 17 : résume les valeurs de Dk obtenus lorsque le test de Kolmogrov est significatif (voir le détail des calculs en annexe 10)

**Tableau 17** : Résumé des valeurs de Dk obtenus lors du test d'ajustement de KS

	OSRB	B4D7	B1C8	B1B6
7990	NS	NS	NS	NS
7992	NS	NS	NS	NS
8007	NS	NS	NS	NS
8477	0,414	NS	0,483	NS
9198	NS	NS	NS	NS

A l'exception des deux valeurs Dk qui ont à peine atteint la significativité au seuil de 5% le reste du tableau montre une grande homogénéité à l'intérieur de chaque population.

Etant donné que le matériel génétique (populations étudiées) utilisé dans ce travail dérive des différents programmes de croisement sélection réalisés à la station INRA de Lusignan, l'absence de significativité pour ce test démontre la fiabilité du schéma de sélection vis-à-vis de l'homogénéité variétale.

## Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus lors de nos travaux mettent en évidence l'utilité des marqueurs neutres comme les microsatellites pour l'étude d'un génome interspécifique.

Le recensement de marqueurs SSR cartographiés publiés a permis d'en sélectionner 29 potentiellement intéressants.

Lors du génotypage nous nous sommes heurtés à de grosses difficultés de lecture des gels (bandes miroirs, nombre trop faible d'allèles détectés à l'état hétérozygote). Afin de réduire ces artefacts, nous avons essayé d'améliorer la lisibilité des gels obtenus lors du screening en jouant sur la quantité d'ADN à amplifier.

Cependant, notre obligation à faire des lectures très précises, dictée par le fait que nous voulons comparer plusieurs populations apparentées, nous a forcé à n'exploiter que les informations délivrées par un pool restreint de marqueurs qui sont : OSRB, B4D7, B1C8, B1B6.

Le marqueur B1B6 présente la particularité de reconnaître spécifiquement des séquences fétuque ou ray-grass et les amplifie, ce qui le rend très informatif au niveau allélique.

L'étude des populations par leurs fréquences alléliques montre que chez les populations hybrides, la fréquence relative des allèles majeurs (grande fréquence) évoluent de façon relativement lente au regard des populations BC1, qui au contraire, ont des allèles qui évoluent de façon beaucoup plus prononcée.

Ces observations lors de l'étude des populations par leurs fréquences nous laissent établir certaines formulations quant à la structuration cytogénétique des populations :

- La relative stabilité des hybrides correspondrait à une structure génomique se rapprochant de l'amphiploïdie stricte,
- Alors que l'évolution plus prononcée chez les populations BC1 correspondrait à une structure allotétraploïde ou partiellement autopolyploïde où les appariements hétérologues seraient plus aisés (un chromosome fétuque en un seul exemplaire, ce qui permet des appariements homéologues et des introgressions progressives à chaque méiose).

De plus l'étude des fréquences aux deux allèles spécifiques (*a* et *c*) du marqueur B1B6 révèlent que les allèles fétuques se maintiennent et ne sont pas éliminés au cours des générations, alors que la pression de sélection se répercute sur la partie du génome d'origine ray-grass.

Les conclusions tirées de la comparaison des populations sur la base des fréquences alléliques au marqueur B1B6 et sur la base des phénotypes obtenus pour l'ensemble des marqueurs se rejoignent :

- Les populations d'hybrides évoluent peu,
- Alors que les populations BC1 semblent s'éloigner progressivement au fur et à mesure de leur avancée en génération.

L'étude de diversité intra-population a révélé une grande homogénéité à l'intérieur de chaque population.

Les marqueurs B1B6 et OSRB, B4D7, B1C8 nous ont permis d'avoir une idée plus ou moins précise de la structuration et de l'évolution du génome au niveau interspécifique. Cependant, la confirmation des informations délivrées par ces marqueurs devra être entreprise, d'une part, par une meilleure optimisation des conditions PCR lors du screening pour avoir des profils les plus propres possibles et, d'autre part, afin d'éviter les problèmes de correspondance d'allèles. Il faudra tout d'abord établir des plans de gels avec des individus parentaux comme témoins dans les plaques des populations à tester. Si le problème de correspondance persiste, cela voudra dire que le problème réside dans la qualité des ADN des différentes populations. Il faudra dans ce cas les réextraire.

De plus, il faudrait envisager d'effectuer des dilutions des amplifias de PCR afin d'optimiser la qualité des profils obtenus.

L'étude des fréquences alléliques a permis de soulever certaines questions relatives aux populations étudiées et au programme de sélection dont elles sont issues.

En effet, nous constatons que chez les BC1, les effectifs efficaces n'excèdent jamais 4, ce qui revient à dire que la diversité, résultant de ces programmes de croisement, est équivalente à la diversité de 4 individus. Il devient donc évident que ces populations BC1 ne se prêtent pas du tout au type d'études que nous en avons fait.

Il serait, cependant, possible d'augmenter cette diversité tout en permettant aux fragments fétuques introgressées d'être fixés (homozygote au locus). Il faudrait pour cela entreprendre des croisements assistés par marqueurs spécifiques fétuques lors des croisements des BC1 existants avec du ray-grass.

La sélection subie par les populations étudiées a été très intense et cela dès les premiers polycross générés par le programme, ceci induit une baisse rapide de la diversité et une dérive génétique élevée.

La confirmation des résultats obtenus devra être aussi entreprise par un élargissement du panel de populations étudiées en considérant les populations intermédiaires à celles considérées dans notre étude. Ceci permettrait d'évaluer plus précisément l'effet de la sélection et de la dérive génétique.

A plus long terme, on devra déterminer des marqueurs liés à un caractère intéressant [marqueurs spécifiques fétuque liée à la pérennité, à la tolérance à la sécheresse...et parallèlement des marqueurs spécifiques ray-grass liés à la lignification (digestibilité) et à la valeur agronomique] : sélection assistée par marqueur.

La compréhension des mécanismes guidant l'évolution génétique des *Festulolium* permettra aussi de répondre à certaines questions relatives au couvert végétal interspécifique : relations entre évolution génétique et évolution de la valeur agronomique (valeur d'usage) en quantifiant les changements de composition génétique par rapport à la valeur adaptative du couvert.

---

---

# **Références bibliographiques**

---

---

1. **Balfourier F., Charmet G., 1995** : Les ray-grass ou le genre *Lolium*. In Ressource génétiques des plantes fourragères à gazon ; Prosperit, Guy M. et Balfourier F. INRA BRG. Paris, pp.87-112.
2. **Bert PF., Charmet G., Sourdille P., Hayward MD., Balfourier F., 1999** : A high-density molecular map of raygrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. Theor.Appl.Genet. 99:445-452.
3. **Chen C., Sleper D.A., Johal G.S., 1998** : Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue. Theor.Appl.Genet., 97 n1-2: 255-260.
4. **De Vienne D., Santoni S., 1998** : Les principales sources de marqueurs moléculaires. In Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. D.de Vienne ed. 130p.
5. **De Loose M., Van Laecke K., Depicker A., Van Bockstaele E., 1994**: Identification of ryegrass using DNA markers. 9<sup>th</sup> meeting of selection of biometrics in plant breeding. Eucarpia, Wageningen, Netherlands.
6. **Fujimori M., Hirata M., Sugita S., Inoue M., Cai H., Akiyama F., Mano Y., Komatsu T., 2000** : Development of a high density map in Italian raygrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using AFLP. In Proceeding of Molecular Breeding of Forage crop 2000 2<sup>nd</sup> International Symposium Victoria, Australia 52p.
7. **Gallais A., 1990** : Théorie de la selection et amelioration des plantes. Masson ed. 369p
8. **Ghesquière M., Barre Ph., Marhadour S., Kerlan M.-C., 2000** : Estimation of introgression of isozymatic marker into tetraploide Italian rayegrass at early generations of backcross. Euphitica 114: 223-231.
9. **Ghesquière M., Mousset C., 2003** : *Festulolium* ; définitions et perspectives. Fourrage n.176.479-492.
10. **Ghesquière M., Jadas-hécart J., 1995** : Les fétuques ou le genre *Festuca*. Ressources génétiques des plantes fourragères à gazon .INRA BRG, Paris.53-70.
11. **Gillet M., 1980** : Les graminées fourragères. Gauthier-villars ed. 306 p.
12. **Hayward M.D., Mc Adam N.J., Jones J.G., Evans C., Evans GM., Forester J.W., Ustin A., Hossain K.G., Quader B., Stammers M., Will J.K., 1994** : Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. In Possibilités nouvelles offertes par les biotechnologies chez les plantes fourragères. Julier B., Ghesquière M. Fourrage (1996) 147, 273-292.
13. **Humphreys M.W., Honne B., 1995** : Potential for improved winterhardiness in reygrass throuth hybridation with fescues. In proceeding of XIVth Eucarpia congress, Jyvaskyla, Finlande, pp.79.

14. **Humphreys MW., Pasakininskiene I., James AR., Thomas H., 1998** : Physically mapping quantitative traits stress-resistance in forage grass. *J.Exp.Bot.* 49 : 1611-1618.
15. **Inoue M., Gao Z., Hirata M., Fujimori M., Cai H., 2004** : Construction of a high density linkage map of Italian raygrass (*Lolium multiflorum* lam.) using RFLP, AFLP and TAS markers. In *Toward markers assisted introgression from Lolium sp. to Festuca arundiculata*. Yamada et al., 2004. 59-61. International workshop of grass genetics and breeding. April 2005, Poland.
16. **Jauhar P.P., 1975** : Génétique contrôle of diploide-like meiosis in hexaploide tall fescue. *Nature* n.254.595-597.
17. **Jauhar P.P., 1993** : Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex. Relevance to Breeding. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 18, Springer-Verlag, Berlin, pp.255
18. **King IP Morgan WG Harper J.A., Thomad H.M., 1999** : Introgression mapping in the grass. II meiotic analysis of the *Lolium perenne* / *Festuca pratensis* triploide hybride. *Heredity* 82.pp.107-112.
19. **Kopecky D. Cernoch V., Capkar., Dolezel J., 2005** : Preferential recombinaison among parental genomes in *Festulolium*. In international workshop of grass genetics and breeding. April 2005, Poland.
20. **Jensen L.B., Muylle H., Arsens P., Handersen C., Holm P.B., Ghesquière M., Julier B., Lubberstedt T., Nielsen K.K., De Riek J., Roldan-Ruiz I., Roulund N., Taylor C., Vosman B., Barre P., ( communication personnel).**
21. **Lehvaslaiho H., Saura A., Lokki J., 1987** : Chloroplast DNA variation in the grass tribe *Festuceae*. *Theor.Appl.Genet.*, 74: 298-302.
22. **Marhadours S., 1997** : Potentiel d'introgression de la fétuque glaucescens dans le ray-grass d'Italie, marqueurs moléculaires et caracteres asocies a la perinnité. Rapport de stage DEA biologie et Agronomie, université de Renne I, ENSA, 26p.
23. **Marhadour S., 2001**: Introgression de la fétuque dans le ray-grass au niveau tétraploide ; approche morphogénétique et apports du marquage moléculaire. Thèse doctorat de Rennes.126p.
24. **Saha M.C., Rouf Mian M.A., Eujayl I., Zwonitzer J.C., Wang L., May G.D., 2004 a** : Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theor. Appl. Genet.*104:526-532.
25. **Saha M.C., Rouf Mian M.A., Zwonitzer J.C., Chekhovskiy K., Hopkins A.A., 2004 b** : An SSR- and AFLP-based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theor. Appl.Genet.* (2005) 110: 323–336.

- 
26. **Thomas H., Morgan H.M., Meredith M.R., Humphreys M.W., 1994** : Identification of parental and recombined chromosomes of *Lolium multiflorum* X *Festuca prentensis* by genome in situ hybridation. *Theor.App.Genet.*88:909-913.
  27. **Thomas M.H., Morgan W.G., Humphreys M.W., 2002** : Designing grass with a future-combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. *Euphytica* 133, pp.19-26.
  28. **Toshihiko Y., Momotaz A., 2004**: Usefulness of simple sequence repeat (SSR) polymorphism for breeding programs in *Festulolium*. In *Development of novel grass with environmental stress tolerance and high forage quality through intergeneric hybridisation between Lolium and Festuca*. Yamada T., and Takamizo T.ed.pp.43-47.
  29. **Warnke S.E., Barker R.E., Jung G., Sim S., Rouf Mian M.A., Saha M.C., Brilman L.A., Dupal M.P., Forester J.W., 2004** : Genetic linkage mapping of an annual × perennial ryegrass population . *Theor. Appl. Genet.* (2004) 109: 294–304.
  30. **Xu W., Sleper D.A., Chao S., 1995**: Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Shreb.) with RFLP markers. *Theor.Appl.Genet.*91, 947-955.
  31. **Zwierzykowski Z.2004**: Amphiploid and introgression breeding within the *Lolium-Festuca* complex- achievements and perspectives. In *Development of novel grass with environmental stress tolerance and high forage quality through intergeneric hybridisation between Lolium and Festuca*. Yamada T., and Takamizo T.ed.pp.17-29.



---

---

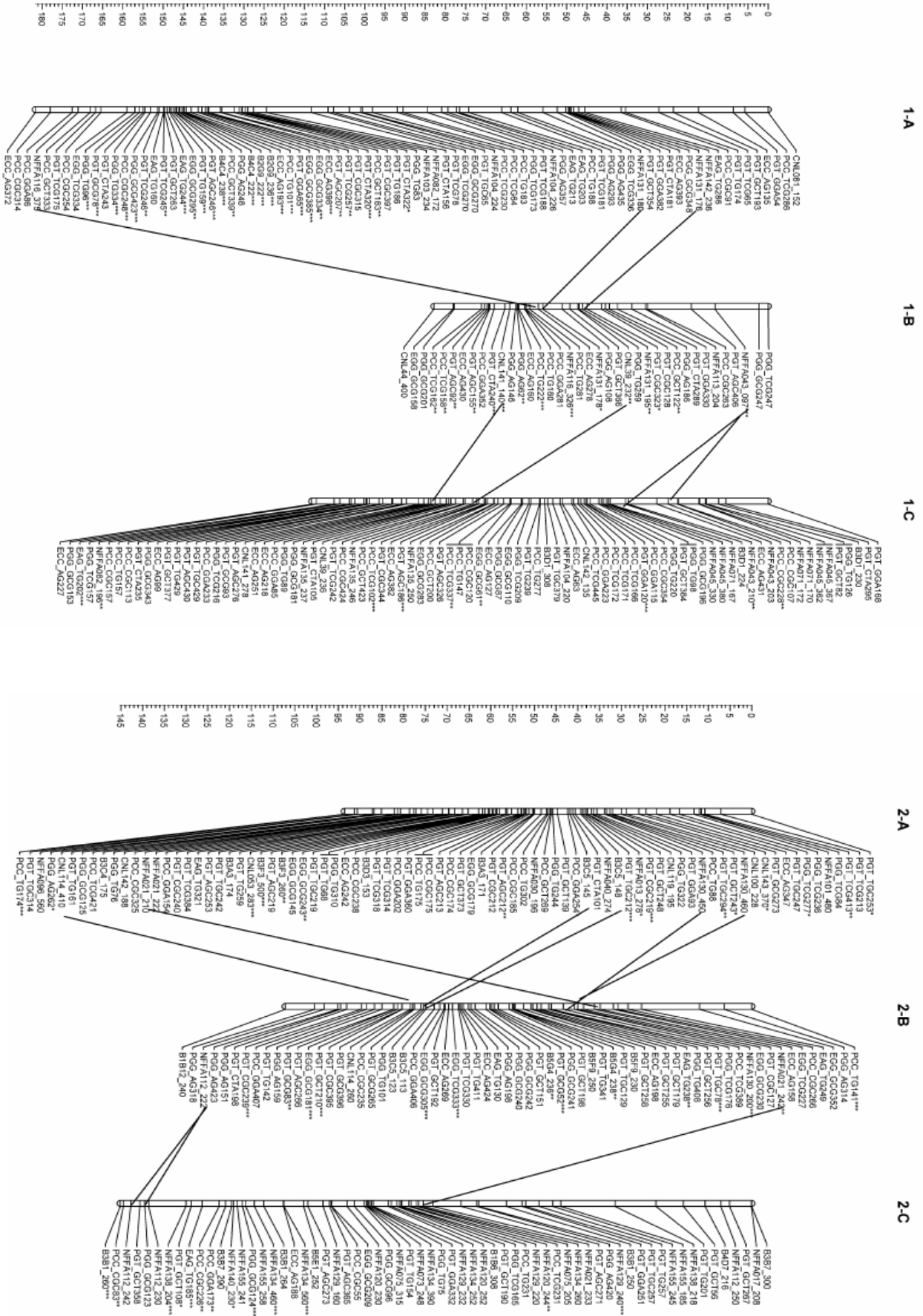
# **Annexes**

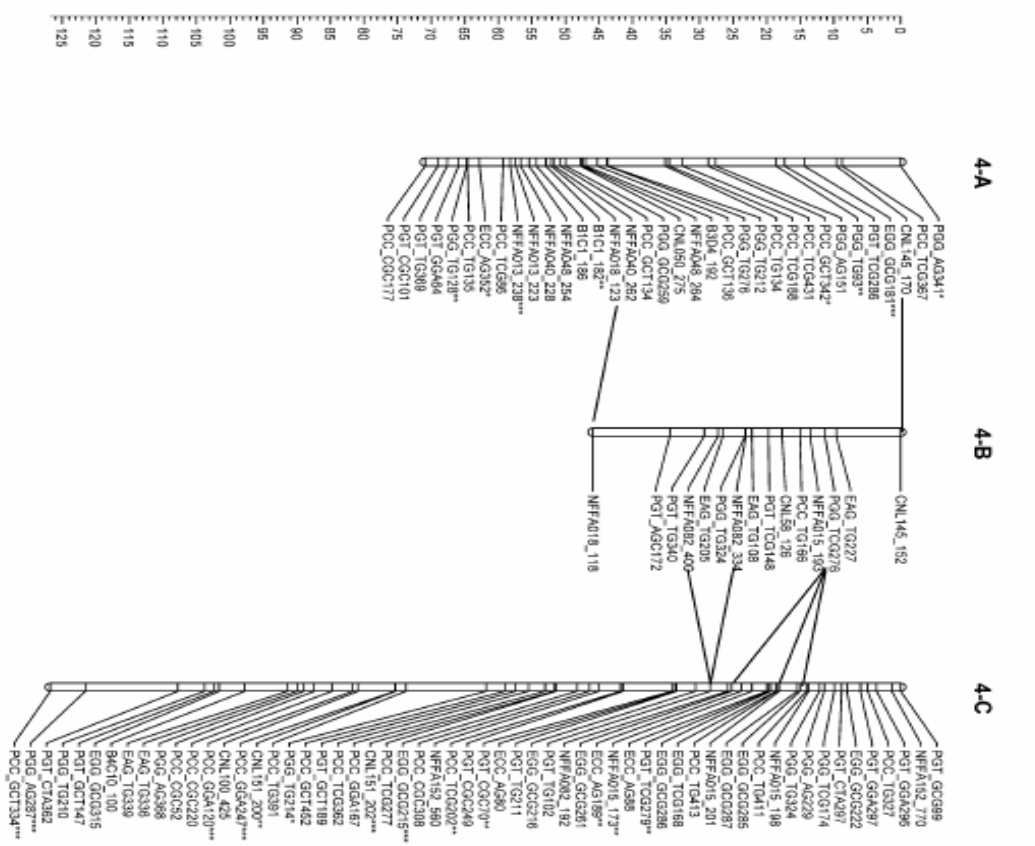
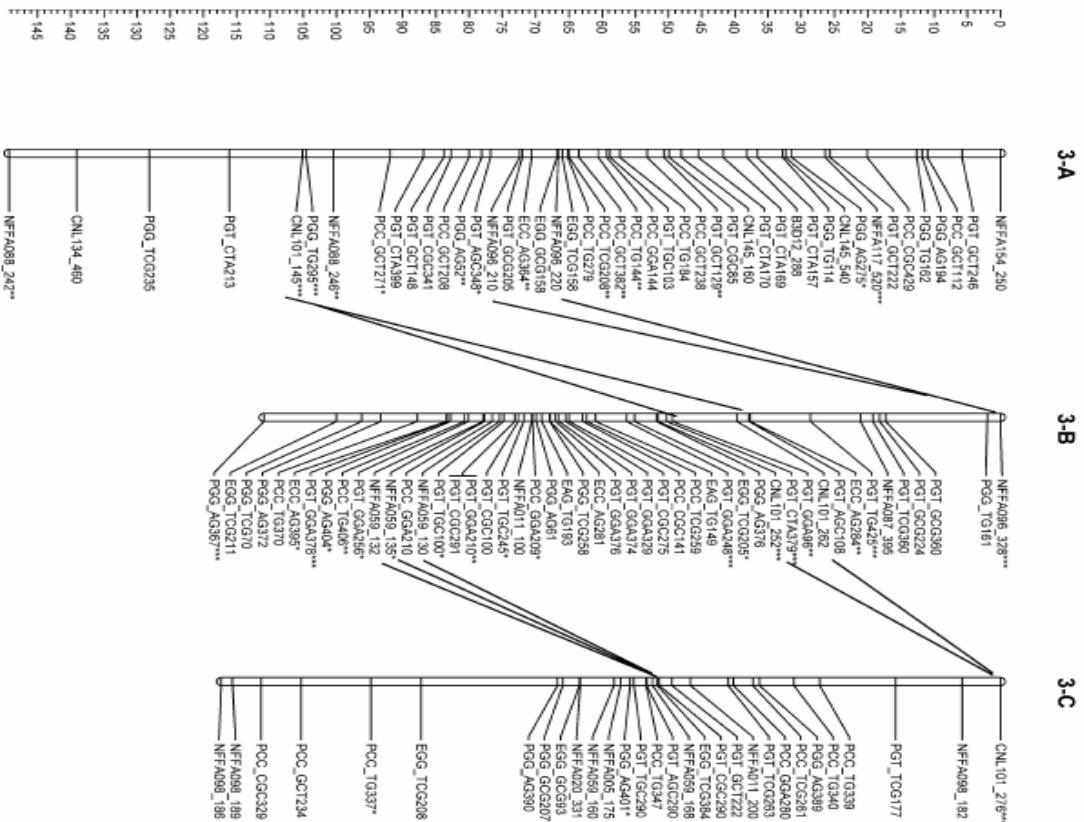
---

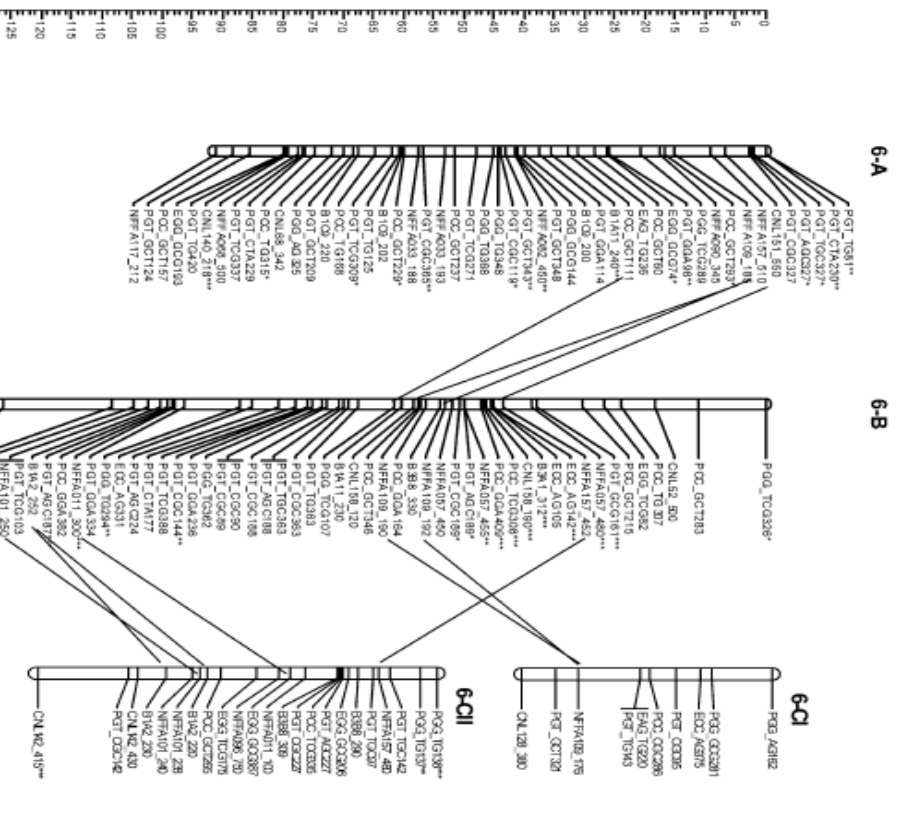
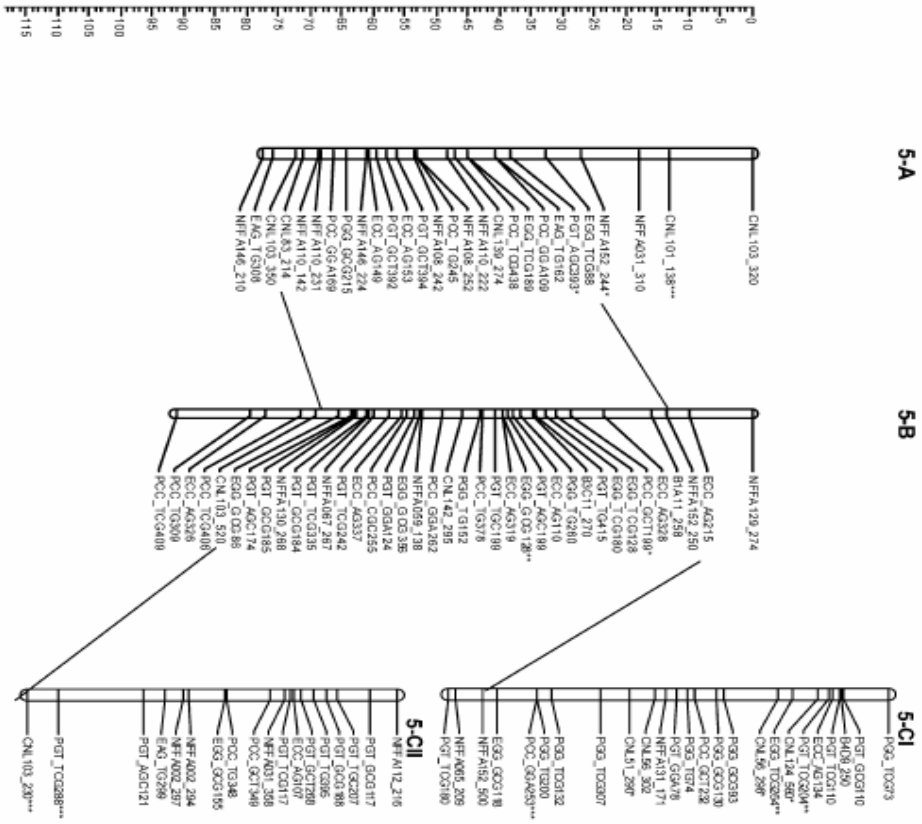
---

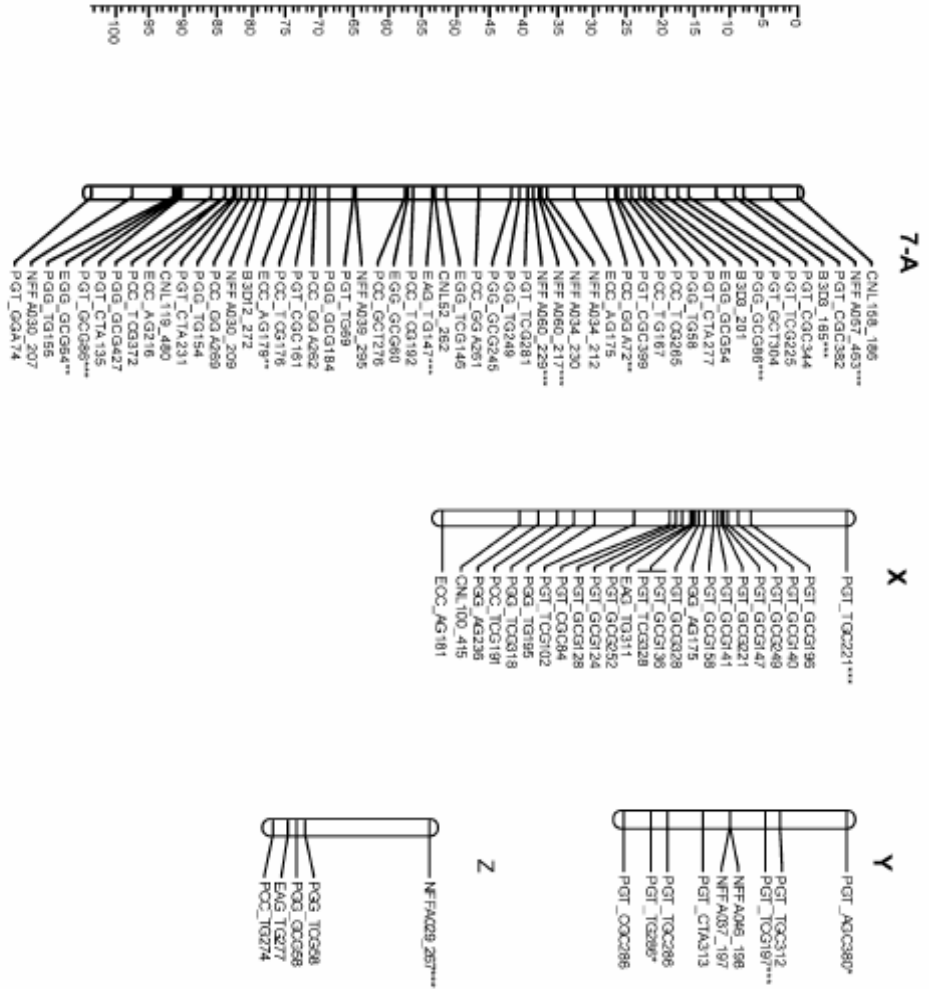
# ***Annexe 1***

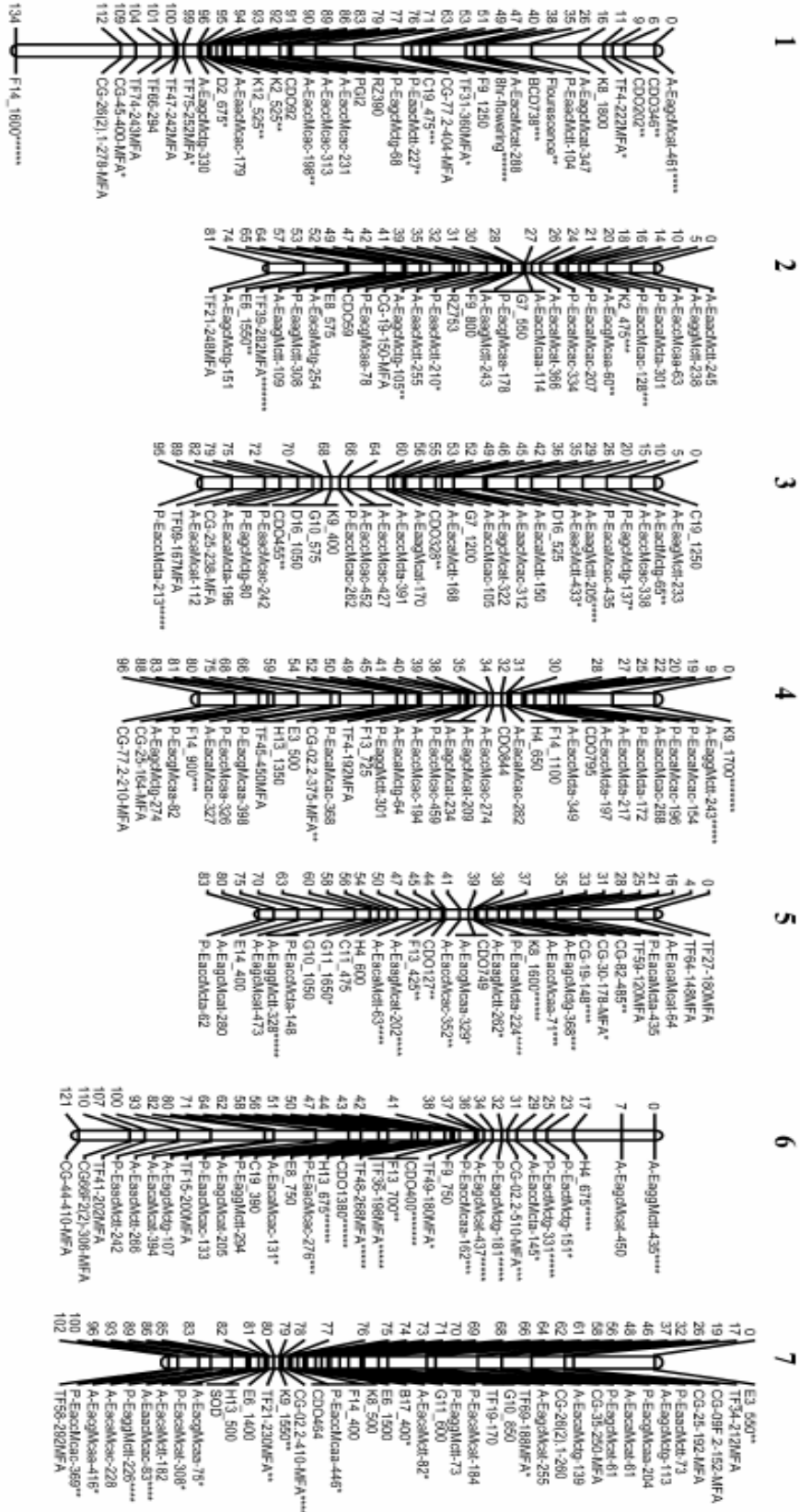
- Annexe 1.1 -  
 Carte la fétuque élevée (6x) établie (Saha et al., 2004).

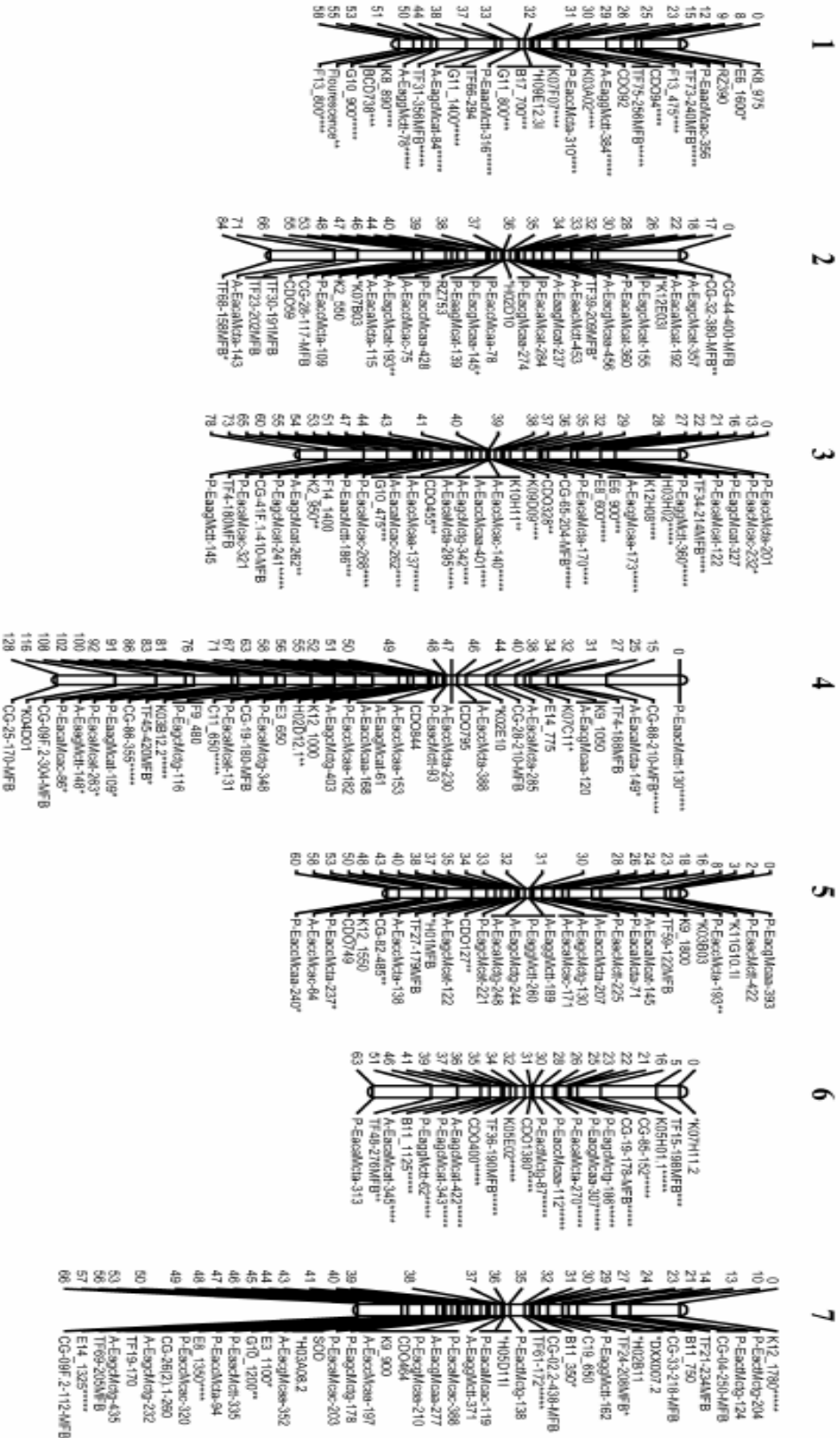

















## ***Annexe 2***

 <p>Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan</p>	<p><b>Mode opératoire</b></p> <p><b>Prélèvement d'échantillons verts</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-22
		Version : 01
		Date : 24/09/03 Page : 1/2

Recommandations :

Il est nécessaire de préparer le matériel (identification des sachets et plan de plaque) avant de commencer à prélever.

Le prélèvement et la pesée se font avec une paire de gants.

Il faut compter 2 heures par plaque pour prélever et peser à 2 personnes.

Matériel nécessaire :


- sachets kraft.
- étiquettes.
- gants.
- bac de glace.
- balance de précision.
- plaque 96 puits 2.2ml à puits carrés.
- couvercle de plaque.
- billes d'acier.
- azote liquide.
- congélateur -80°C.

Identifier les sachets kraft.

Préparer le plan de la plaque 96 puits en fonction du plan de gel.

Identifier la plaque.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom	Equipe du labo Biologie moléculaire	Gibelin Chrystel	Huyghe Christian
Fonction		Responsable labo Biologie moléculaire	Directeur d'unité
Visa			

 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	<b>Mode opératoire</b> <b>Prélèvement d'échantillons</b> <b>verts</b>	Référence : BM-MO-MAR-22  Version : 01 Date : 24/09/03 Page : 2/2
--	---	--

Prélever avec des gants des tissus jeunes : foliole à peine dépliée pour la luzerne, gaine enroulée pour les graminées.

Les placer dans le sachet kraft correspondant.

Placer le sachet kraft dans la glace.

Après prélèvement d'une série d'échantillons correspondant à une plaque de 96 puits, positionner la plaque sur un lit de glace.

Peser avec une balance de précision environ 50mg de tissu.


Les placer dans un puit en fonction du plan de plaque définie.

Placer une bille d'acier dans chaque puit.

Placer le couvercle pour fermer les puits.

Stocker la plaque dans le congélateur -80°C.

Il est possible de transporter les plaques en les plaçant dans un récipient rempli d'azote liquide.

 <p>Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan</p>	<p><b>Mode opératoire</b></p> <p><b>Extraction d'ADN en grande quantité (protocole CIMMYT ou GIMITI)</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-07
		Version : 02
		Date : 16/09/03 Page : 1/5


Recommandations :

Mettre une blouse et une paire de gants que vous changerez régulièrement.  
Nettoyer la paillasse à l'alcool avant et après manipulation.  
L'extraction se fait à partir de 1 gr de matière fraîche.  
Le pesage des échantillons, leur stockage dans le congélateur -80°C et la préparation des tubes peut se faire la veille de l'extraction, tout comme la préparation des différentes solutions.  
Les solutions sont stockées au frigo.  
L'utilisation du chloroforme/octanol se fait sous la sorbonne.

Matériel nécessaire :

azote liquide.  
28 mortiers/pilons.  
84 tubes 15 ml Greiner.  
28 pipettes Pasteur en crochet.  
56 microtubes de 2 ml.  
spatule.  
bain-marie à 65°C.  
étuve à 37°C.  
centrifugeuse GR4-12 avec portoir bleu.  
tampon de lyse.  
solution de nettoyage 1 et solution de nettoyage 2.  
Rnase (10mg/ml).  
isopropanol.  
chloroforme/octanol (24/1).  
TE.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom	Equipe du labo Biologie moléculaire	Gibelin Chrystel	Huyghe Christian
Fonction		Responsable labo Biologie moléculaire	Directeur d'unité
Visa			

 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	<b>Mode opératoire</b> <b>Extraction d'ADN en grande quantité (protocole CIMMYT ou GIMITI)</b>	Référence : BM-MO-MAR-07
		Version : 02
		Date : 16/09/03 Page : 2/5

Préparation des solutions :

- Tampon de lyse : pour 100 ml (à stocker au frigo)

eau 65 ml.

1 M Tris 7.5 10 ml.

5 M NaCl 14 ml.

0.5 M EDTA 8.0 14 ml.

Chauffer à 65°C puis ajouter 2 g de CTAB et 0.5 g de bisulfite de sodium.

- Solution de nettoyage 1 : pour 100 ml (à stocker au frigo)

éthanol absolu 76 ml.

2.5 M NaOAc 8 ml.

Eau 16 ml.

- Solution de nettoyage 2 : pour 100 ml (à stocker au frigo)

éthanol absolu 76 ml.

1 M NH<sub>4</sub>OAc 1 ml.

Eau 23 ml.

Peser 1 gr de feuilles fraîches et saines.

Les placer dans des pochettes de papier aluminium identifiées.


Plonger les pochettes dans l'azote liquide.

Préparer 3 séries de 28 tubes tubes Greiner de 15ml en les identifiant.

Ajouter 9 ml de tampon de lyse à une série de 28 tubes.

Récupérer les pochettes de papier aluminium.

Déposer les feuilles dans un mortier.

 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	<b>Mode opératoire</b> <b>Extraction d'ADN en grande quantité (protocole CIMMYT ou GIMITI)</b>	Référence : BM-MO-MAR-07
		Version : 02
		Date : 16/09/03 Page : 3/5

Ajouter de l'azote liquide.

Broyer avec le pilon afin d'obtenir une poudre fine.

Transférer la poudre à l'aide d'une spatule dans le tube Greiner 15 ml.

Mélanger vigoureusement.

Placer les tubes dans le bain-marie à 65°C pendant 1h45.

Les agiter de temps en temps.

Changer de paire de gants.

Retirer les tubes du bain-marie.

Les laisser refroidir.

Changer de paire de gants.

Se placer sous la sorbonne.


Ajouter 4.5 ml de chloroforme/octanol(24/1).

Agiter par retournement pendant environs 5 min.

Centrifuger dans la centrifugeuse GR4-12 10 min à 15°C-2500tr/min.

Se placer sous la sorbonne.

Verser le surnageant dans un nouveau tube de 15 ml.

 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	<b>Mode opératoire</b> <b>Extraction d'ADN en grande quantité (protocole CIMMYT ou GIMITI)</b>	Référence : BM-MO-MAR-07
		Version : 02
		Date : 16/09/03
		Page : 4/5

Jeter la phase inférieure (phase chloroformique) dans la bonbonne rouge placée sous la sorbonne.

Ajouter 4.5 ml de chloroforme/octanol(24/1) au surnageant récupéré.

Agiter par retournement pendant environs 5 min.

Centrifuger dans la centrifugeuse GR4-12 10 min à 15°C-2500tr/min.

Se placer sous la sorbonne.

Pipetter le surnageant et le mettre dans un nouveau tube de 15 ml.

Jeter la phase inférieure (phase chloroformique) dans la bonbonne prévue à cet effet.

Ajouter 5  $\mu$ l de Rnase au surnageant récupéré.

Agiter.

Laisser 30 min à l'étuve à 37°C.


Changer de paire de gants.

Préparer 56 (2 séries de 28) microtubes de 2 ml en les identifiant.

Ajouter 1.8 ml de solution de nettoyage 1 à une série de 28.

Ajouter 1.8 ml de solution de nettoyage 2 à une série de 28.



 <p><b>INRA</b> Institut National de la Recherche Agronomique</p>	<p><b>Mode opératoire</b></p> <p><b>Extraction d'ADN en grande quantité (protocole CIMMYT ou GIMITI)</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-07
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 16/09/03 Page : 5/5

Ajouter 6 ml d'isopropanol dans le tube de 15 ml.

Agiter doucement pour obtenir la pelote d'ADN.

Retirer la pelote à l'aide d'un crochet.

Placer le crochet dans un microtube de 2 ml contenant la solution de nettoyage 1.

Laisser pendant 20 min.

Placer le crochet dans un microtube de 2 ml contenant la solution de nettoyage 2.

Laisser pendant 2 min.

Préparer une série de 28 microtubes de 1.5 ml en les identifiant.

Ajouter 500  $\mu$ l de solution TE.


Libérer l'ADN du crochet dans un microtube de 1.5 ml.

Laisser à température ambiante toute la nuit.

Enlever les gants et les jeter à la poubelle.

Se laver les mains à l'évier de la cuisine (salle extraction ADN).

## ***Annexe 3***

	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation des solutions</b> <b>nécessaires à l'extraction en</b> <b>plaque 96 puits</b>	Référence : BM-MO-MAR-23
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 01
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 24/09/03
		Page : 1/4

Recommandations :

Il est nécessaire de porter une blouse et une paire de gants.

Nettoyer le plan de travail à l'alcool après manipulation.

Les solutions doivent être préparées quelques jours avant l'extraction car les solutions doivent être autoclavées.

Matériel nécessaire :

balance.

agitateur.

verrerie (bêchers, éprouvettes, fioles jaugées, bouteilles).

**Tampon d'extraction:**

Mesurer 200 ml d'eau ultra-pure dans une éprouvette.

Poser un bêcher de 500 ml sur un agitateur.

Y ajouter un barreau aimanté.


Ajouter 100 à 120 ml d'eau ultra-pure.

Peser 25.38 g de NaCl.

Les ajouter au volume d'eau.

Mettre en fonctionnement l'agitateur.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom	Equipe du labo Biologie moléculaire	Gibelin Chrystel	Huyghe Christian
Fonction		Responsable labo Biologie moléculaire	Directeur d'unité
Visa			

	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation des solutions</b> <b>nécessaires à l'extraction en</b> <b>plaque 96 puits</b>	Référence : BM-MO-MAR-23
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 01
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 24/09/03 Page : 2/4

Peser 4.85 g de Tris (R36/37/38 S26/36) ☒.

Les ajouter au volume d'eau.

Peser 5.2 g d'EDTA (R22-36/37/38 S26/36) ☒.

Les ajouter au volume d'eau.

Attendre que toutes les poudres soient dissoutes, ajouter de l'eau si ce n'est pas le cas.

Mettre la solution dans une fiole jaugée de 200 ml ou dans une éprouvette de 200 ml.

Veiller à laisser le barreau aimanté dans le bécher.

Ajuster le volume à 200 ml.

Transvaser de nouveau le volume dans le bécher.


Mettre le bécher sur un agitateur.

Mettre en fonctionnement l'agitateur.

Étalonner le pH mètre avec les 2 solutions étalon (pH4 et pH7).

Positionner la sonde du pH mètre dans la solution.

Vérifier la valeur du pH qui doit être de 8.

	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation des solutions</b> <b>nécessaires à l'extraction en</b> <b>plaque 96 puits</b>	Référence : BM-MO-MAR-23
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 01
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 24/09/03 Page : 3/4

Si la valeur de pH est différente de 8, ajouter goutte à goutte du HCl jusqu'à atteindre la valeur 8.

Transvaser le volume dans une bouteille à bouchon bleu.  
Ne pas laisser le barreau aimanté dans la solution.

Coller un scotch d'autoclavage.

Y noter le type de solution, la date et les initiales du préparateur.

Autoclaver.

Avant l'utilisation, peser 1 g de bisulfite de sodium(R20/21/22 S26/36)  .

Les ajouter à la solution directement dans la bouteille.

Ajouter un barreau aimanté.

Mettre la bouteille sur un agitateur.

Mettre en fonctionnement l'agitateur.


Attendre que le bisulfite de sodium soit dissout avant utilisation.

**Acétate d'ammonium 10M:**

Mesurer 50 ml d'eau ultra-pure dans une éprouvette.

Poser un bécher de 50 ml sur un agitateur.

Y ajouter un barreau magnétique.

 <p><b>INRA</b> Institut National de la Recherche Agronomique</p>	<p><b>Mode opératoire</b> <b>Préparation des solutions</b> <b>nécessaires à l'extraction en</b> <b>plaque 96 puits</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-23
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 01
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 24/09/03
		Page : 4/4

Ajouter 25 à 30 ml d'eau ultra-pure.

Peser 38.5 g d'acétate d'ammonium (R36/37/38).

Les ajouter au volume d'eau.

Mettre en fonctionnement l'agitateur.

Attendre que toutes les poudres soient dissoutes, ajouter de l'eau si ce n'est pas le cas.

Mettre la solution dans une fiole jaugée de 50 ml ou dans une éprouvette de 50 ml.

Veiller à laisser le barreau aimanté dans le bécher.

Ajuster le volume à 50 ml.

Transvaser le volume dans une bouteille à bouchon bleu.


Coller un scotch d'autoclavage.

Y noter le type de solution, la date et les initiales du préparateur.

Autoclaver.

Enlever les gants et les jeter à la poubelle.

Se laver les mains à l'évier de la cuisine (salle extraction ADN).

 <p>Institut National de la Recherche Agronomique</p>	<p align="center"><b>Mode opératoire</b>  <b>Extraction rapide en plaque</b>  <b>96 puits</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-24
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 01
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 24/09/03 Page : 1/5

**Recommandations :**

Il est obligatoire de porter une blouse et une paire de gants que vous changerez régulièrement.


Nettoyer la paillasse à l'alcool avant et après manipulation.

Les tampons d'extraction doivent être préparés d'avance car il faut les autoclaver, ne pas oublier d'ajouter le bisulfite de sodium au tampon d'extraction avant utilisation. Les échantillons ont été prélevés et placés dans une plaque 96 puits à puits carrés de 2,2 ml dans lesquels on ajoute une bille d'acier. L'extraction se fait à partir de cette plaque, l'ADN extrait doit être dilué 20 fois pour être utilisé pour des PCR.

**Matériel nécessaire :**

- broyeur.
- four à 60°C.
- thermosoudeuse.
- centrifugeuse Jouan GR 4-12 à plaques.
- pipette multicanaux Biohit.
- tampon d'extraction et acétate d'ammonium 10M.
- isopropanol.
- tampon TE 10,1 pH8.
- éthanol 70%.
- plaque 96 puits 0.6 ml.
- thermoseal.
- easypeal.
- étuve à 60°C.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom	Equipe du labo Biologie moléculaire	Gibelin Chrystel	Huyghe Christian
Fonction		Responsable labo Biologie moléculaire	Directeur d'unité
Visa			

 <p><b>INRA</b> Institut National de la Recherche Agronomique</p>	<p><b>Mode opératoire</b> <b>Extraction rapide en plaque</b> <b>96 puits</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-24
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 01
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 24/09/03 Page : 2/5

Mettre une paire de gants.

Récupérer la plaque 96 puits au congélateur -80°C.

Ouvrir la porte du secoueur.

Monter le levier.

Placer la plaque dans le secoueur.

Positionner la plaque plastique sur la plaque 96 puits.

Abaisser le levier.

Bloquer le levier vers la droite.

Fermer la porte.

Programmer le temps en tournant le bouton sur 3.

Appuyer sur le bouton vert START.

Le secoueur s'arrête à la fin du temps programmé.

En cas de problème, appuyer sur le bouton rouge STOP.


Mettre sous tension la thermosoudeuse.

Allumer le four à 60°C.

Se placer sous la sorbonne du laboratoire d'extraction d'ADN.

Ajouter 500µl de tampon d'extraction avec la pipette distributrice Proline.



 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	<b>Mode opératoire</b> <b>Extraction rapide en plaque</b> <b>96 puits</b>	Référence : BM-MO-MAR-24
		Version : 01
		Date : 24/09/03
		Page : 3/5

Placer la plaque entre les supports de la thermosoudeuse.

Placer un film thermoseal sur la plaque.

Appuyer sur la poignée pour coller le thermoseal sur la plaque.

Laisser appuyer pendant 4 secondes.

Relâcher la pression.  
Attention au bloc chaud.

Agiter en inversant la plaque.

Incuber 1 heure à 60°C et agiter tous les quarts d'heure en inversant la plaque.

Centrifuger 30 min-4000 rpm-20°C avec la centrifugeuse Jouan GR 4-12.


Pendant ce temps, changer de paire de gants et préparer une plaque 96 puits 0.6ml.

Se placer sous la sorbonne du laboratoire d'extraction d'ADN.

Ajouter 50µl d'acétate d'ammonium 10M et 120µl d'isopropanol avec la pipette distributrice Proline.

A la fin de la centrifugation, prélever 200µl de surnageant avec la pipette distributrice Proline (option P pipettage) et le transférer dans la plaque 96 puits 0.6ml.

Placer la plaque entre les supports de la thermosoudeuse.

 Institut National de la Recherche Agronomique	<b>Mode opératoire</b> <b>Extraction rapide en plaque</b> <b>96 puits</b>	Référence : BM-MO-MAR-24
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 01
UGAPF		Date : 24/09/03
86600 Lusignan		Page : 4/5

Placer un film easypeal sur la plaque.

Appuyer sur la poignée pour coller le easypeal sur la plaque.

Laisser appuyer pendant 4 secondes.

Relâcher la pression.

**Attention au bloc chaud!**

Agiter en retournant la plaque plusieurs fois.

Placer la plaque à -20°C pendant 15 min.

Refroidir la centrifugeuse à 4°C.

Centrifuger 30 min-4000 rpm-4°C avec la centrifugeuse Jouan GR 4-12.

Retourner la plaque afin d'éliminer le surnageant à l'évier.

Eponger en inversant la plaque sur du papier absorbant.

Ajouter 100µl d'éthanol 70% avec la pipette distributrice Proline.


Centrifuger 10 min-4000 rpm-4°C avec la centrifugeuse Jouan GR 4-12.

Retourner la plaque afin d'éliminer l'éthanol à l'évier.

Eponger en inversant la plaque sur du papier absorbant.

Il est possible de répéter cette étape de rinçage à l'éthanol 70%.

Placer la plaque 20 min à l'étuve à 60°C pour sécher les culots.

 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	<b>Mode opératoire</b> <b>Extraction rapide en plaque</b> <b>96 puits</b>	Référence : BM-MO-MAR-24
		Version : 01
		Date : 24/09/03
		Page : 5/5

Ajouter 50µl de tampon TE 10,1 pH8.

Placer un film easypeal sur la plaque.

Appuyer sur la poignée pour coller le easypeal sur la plaque.

Laisser appuyer pendant 4 secondes.

Relâcher la pression.

**Attention au bloc chaud!**


Placer la plaque au frigo à 4°C.

Y laisser la plaque pendant une nuit pour resuspendre les culots.

Enlever les gants et les jeter à la poubelle.

Se laver les mains à l'évier de la cuisine (salle extraction ADN).

## ***Annexe 4***

 <p>Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan</p>	<p><b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de la PCR</b> <b>microsatellites avec</b> <b>marquage IRD700 ou 800</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-13
		Version : 02
		Date : 19/09/03
		Page : 1/4

Recommandations :

Mettre une paire de gants et la blouse.

Nettoyer la paillasse à l'alcool avant et après manipulation.

Le marquage IRD700 ou 800 étant sensible à la lumière, il est nécessaire de travailler à l'obscurité.

Matériel nécessaire :

bac de glace.

boîtes de cônes blancs, jaunes et bleus.

micropipettes.

micropipette distributrice.

plaques 96 puits.

film adhésif.

tubes 1.5 ou 0.5 ml autoclavés.

eau autoclavée.

solution dNTPs.

tampon 10X de la taq.

MgCl<sub>2</sub>.

amorces L et R.


queue M13 marquée à 700 ou 800.

Taq (à sortir au dernier moment).

thermocycleur MJ PTC100 ou PTC200.

Compléter la fiche de manip disponible sur Biotech/protocole2003/fiche de manip en précisant toutes les informations demandées.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom	Equipe du labo Biologie moléculaire	Gibelin Chrystel	Huyghe Christian
Fonction		Responsable labo Biologie moléculaire	Directeur d'unité
Visa			

	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de la PCR</b> <b>microsatellites avec</b> <b>marquage IRD700 ou 800</b>	Référence : BM-MO-MAR-13
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 19/09/03
		Page : 2/4

Noter sur le tube de 1.5 ou 0.5 ml le nom du mix.

Entourer le tube de papier aluminium.

Effectuer toutes les étapes dans un bac de glace.

Déposer dans le tube mix le volume d'eau défini dans la fiche de manip.

Déposer le volume de tampon PCR défini dans la fiche de manip.

Déposer le volume de MgCl<sub>2</sub> défini dans la fiche de manip.

Déposer le volume d'amorce L défini dans la fiche de manip.

Déposer le volume d'amorce R défini dans la fiche de manip.

Déposer le volume de dNTPs défini dans la fiche de manip.

Déposer le volume de Taq défini dans la fiche de manip.


Déposer le volume de queue M13 défini dans la fiche de manip.

Mélanger en tapotant le tube.

Préparer le plan de la plaque 96 puits en fonction du plan de dépôt à faire sur gel.

Noter sur la plaque la date, le nom du manipulateur ainsi que les informations d'amorces et de géotypes correspondant à la fiche de manip.

La placer dans le bac de glace.

	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de la PCR</b> <b>microsatellites avec</b> <b>marquage IRD700 ou 800</b>	Référence : BM-MO-MAR-13
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 19/09/03 Page : 3/4

Déposer le volume défini de mix dans chacun des puits avec la pipette distributrice.

Placer une feuille de papier aluminium sur la plaque.  
Ne l'enlever que pour manipuler.

Ajouter le volume de solution de travail d'ADN défini dans la fiche de manip.

Coller le film adhésif sur la plaque 96 puits.

Placer la plaque 96 puits dans la centrifugeuse Jouan GR 4-12 en utilisant le portoir noir à 96 puits.

Fermer le couvercle de la centrifugeuse.

Tourner la molette de programmation du temps.

Appuyer sur Start.


Appuyer sur Stop lorsque la vitesse atteints la valeur de 1000 rpm.

Lorsque la centrifugeuse est à l'arrêt, appuyer simultanément sur le bouton bleu situé sur le côté droit de l'appareil et le bouton marqué Lid.

Récupérer la plaque 96 puits et la placer dans le bac de glace sous la feuille de papier aluminium.

Placer la plaque 96 puits dans un thermocycleur MJ PTC100 ou 200.

Fermer le capot et tourner la molette sur la gauche.

	<p align="center"><b>Mode opératoire</b>  <b>Préparation de la PCR</b>  <b>microsatellites avec</b>  <b>marquage IRD700 ou 800</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-13
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 19/09/03 Page : 4/4

Allumer l'appareil en appuyant sur l'interrupteur situé à l'arrière droite de l'appareil.

Sélectionner l'option RUN en appuyant sur les flèches.

Valider en appuyant sur PROCEED.

Sélectionner le nom du programme défini dans la fiche de manip en appuyant sur les flèches.

Valider en appuyant sur PROCEED.

Valider l'option du couvercle chauffant en appuyant sur PROCEED.

Lorsque le cycle est fini, appuyer sur CANCEL.

Eteindre l'appareil en appuyant sur l'interrupteur situé à l'arrière droite de l'appareil.

Tourner la molette du capot sur la droite et ouvrir le capot.

Enrober la plaque dans du papier aluminium.

Noter sur la feuille de papier aluminium la date, le nom du manipulateur ainsi que les informations d'amorces et de génotypes correspondant à la fiche de manip.

Stocker la plaque à 4°C.

Enlever les gants et les jeter à la poubelle normale.

Se laver les mains à l'évier de la cuisine (salle extraction ADN).



-ANNEXE 4.2 –  
Fiche de manip PCR

nom :	date :	N° :
type de manip : PCR		
conditions particulières :		
Espece     hybride/ fétuque/ ray-grass		

amorces :

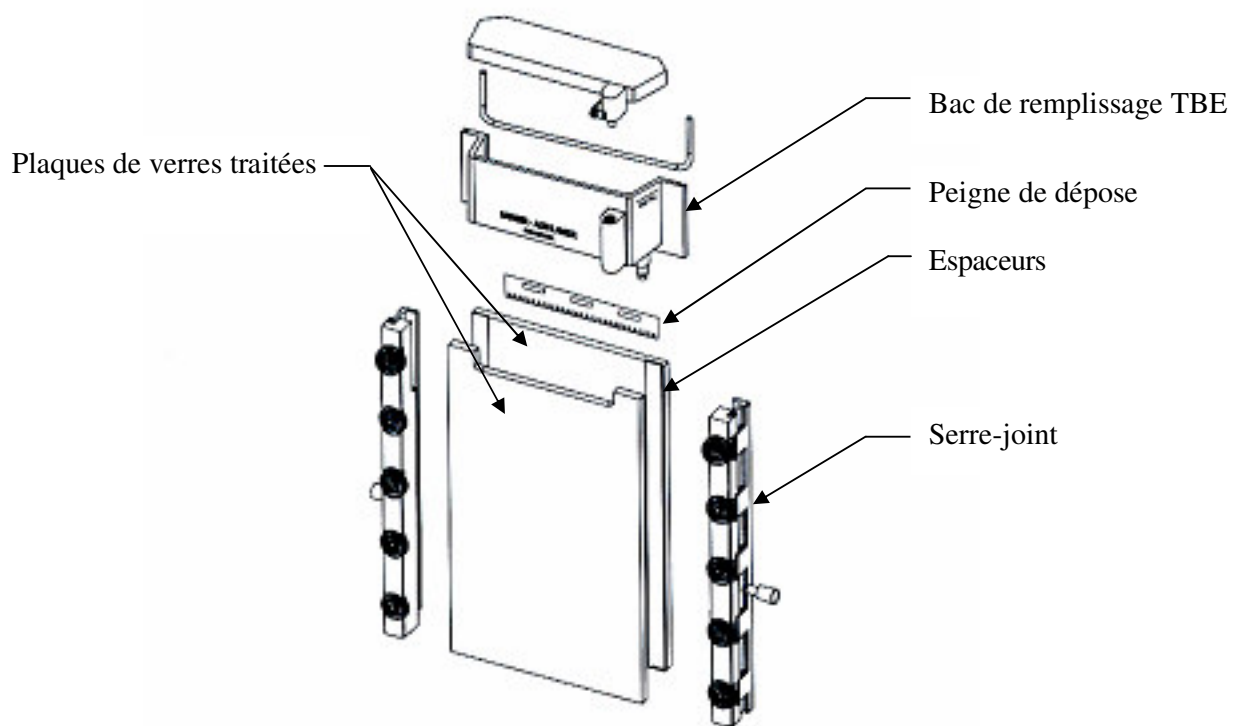
conditions PCR :

	<i>[initiale]</i>	<i>[finale]</i>	1 puit	100
H <sub>2</sub> O			12,87	1287
tampon PCR	10 X	1 X	2	200
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,6	60
amorce R avec M13 sens	10 μM	0,2 μM	0,4	40
amorce F	10 μM	0,1 μM	0,2	20
QUEUE    sens                    700	10 μM	0,1 μM	0,2	20
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	1,6	160
Taq	5 U/μL	0,5 U	0,13	13
ADN	25 ng/μL	50 ng	2	


mixe            18μl/puits  
total/puits = 20μl

## ***Annexe 5***

Schéma du dispositif de migration au séquenceur



## ***Annexe 6***

 <p>Centre de recherches Poitou-Charentes</p> <p>UGAPF 86600 Lusignan</p>	<p><b>Mode opératoire</b></p> <p><b>Préparation de gel d'acrylamide pour le séquenceur</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-14
		Version : 02
		Date : 19/09/03
		Page : 1/10

Recommandations :

Porter une blouse et une paire de gants que vous changerez régulièrement, 2 paires de gants lors de la manipulation directe d'acrylamide.

La préparation de la solution d'acrylamide se fait sous la hotte et le coulage du gel sur la paillasse.

L'acrylamide KB+ de Licor et le Temed sont stockés dans le frigo. l'APS est stocké dans le tiroir commun du congélateur, il est aliquoté en tubes de 150 ou 200µl.


Tous les déchets souillés par de l'acrylamide doivent être déposés dans la poubelle spécifique acrylamide.

Informations :

**1) MICROSATELLITES**

PARAMETRES	PLAQUE 18CM	PLAQUE 25CM
COMPOSITION DU GEL	6.5% ou 5.5% KB LICOR	6.5% ou 5.5% KB LICOR
VOLUME ACRYL	20 ml	20 ml
PEIGNE	0.25mm (64 ou 96 puits)	0.25mm (64 ou 96 puits)
TEMED	15 µl	15 µl
APS	150 µl	150 µl

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom	Equipe du labo Biologie moléculaire	Gibelin Chrystel	Huyghe Christian
Fonction		Responsable labo Biologie moléculaire	Directeur d'unité
Visa			

 <p><b>INRA</b> Institut National de la Recherche Agronomique</p>	<p><b>Mode opératoire</b></p> <p><b>Préparation de gel d'acrylamide pour le séquenceur</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-14
		Version : 02
		Date : 19/09/03
Centre de recherches Poitou-Charentes		Page : 2/10
UGAPF 86600 Lusignan		

## 2) AFLP

PARAMETRES	PLAQUE 25CM	PLAQUE 41CM
COMPOSITION DU GEL	6.5% KB LICOR	5.5% KB LICOR
VOLUME ACRYL	20 ml	30 ml
PEIGNE	0.25mm (64puits)	0.25mm (64puits)
TEMED	15 $\mu$ l	20 $\mu$ l
APS	150 $\mu$ l	200 $\mu$ l


## 3) SEQUENCAGE



PARAMETRES	PLAQUE 41CM
COMPOSITION DU GEL	5.5% KB LICOR
VOLUME ACRYL	30 ml
PEIGNE	0.2mm (64puits)
TEMED	20 $\mu$ l
APS	200 $\mu$ l


### Matériels et produits nécessaires :

KB+.  
 Temed.  
 APS.  
 micropipette P100.  
 micropipette P20.  
 système de migration Licor.  
 peigne.  
 bécher de 100ml.  
 éprouvette de 100ml.

Mettre une blouse et 2 paires de gants dont une paire à manchette pour recouvrir les manches de la blouse.

 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de gel</b> <b>d'acrylamide pour le</b> <b>séquenceur</b>	Référence : BM-MO-MAR-14
		Version : 02
		Date : 19/09/03 Page : 3/10

Sortir la bouteille de Temed (R11-34-20/22 S53-16-26-45-36/37/39)   du frigo et la placer sous la sorbonne.

Sortir le tube d'APS (R8-22-36/37/38-42/43 S22-24-26-37)  du tiroir commun du congélateur et le placer sous la sorbonne.

Sortir le flacon de KB+ (contenant de l'acrylamide R45-46-60-63-24/25-36/38-42/43 S53-45-36/37/39-23  ) et le placer sous la sorbonne.

Prendre un bécher.

Prendre une éprouvette.

Mesurer dans l'éprouvette le volume de KB+ suivant le tableau défini ci-dessus.

Transférer la solution dans le bécher.

Replacer la bouteille de KB+ dans le frigo.


Laisser en attente sous la sorbonne le flacon de Temed, le tube d'APS et le bécher de KB+.

Enlever les 2 paires de gants et les jeter dans la poubelle acrylamide.

Mettre une paire de gants.

Prendre les 2 plaques de verre complémentaires du système de migration.

Les nettoyer à l'eau puis à l'alcool avec des Kimwippes.

 <p>INRA Institut National de la Recherche Agronomique</p>	<p><b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de gel</b> <b>d'acrylamide pour le</b> <b>séquenceur</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-14
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 19/09/03
		Page : 4/10

Nettoyer les espaceurs.

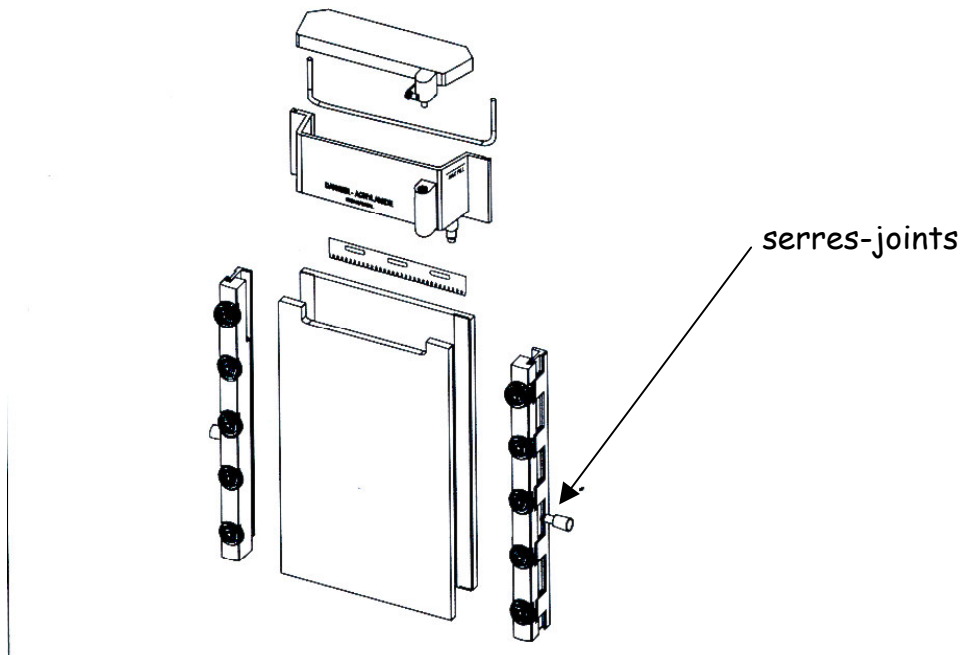
Positionner les espaceurs sur la plaque la plus grande.

Positionner la plaque la plus petite au dessus des espaceurs.


Attention faire correspondre les 2 coins biseautés des plaques (côtés biseautés à l'intérieur).

Mettre les serres-joints correspondant à la longueur des plaques.

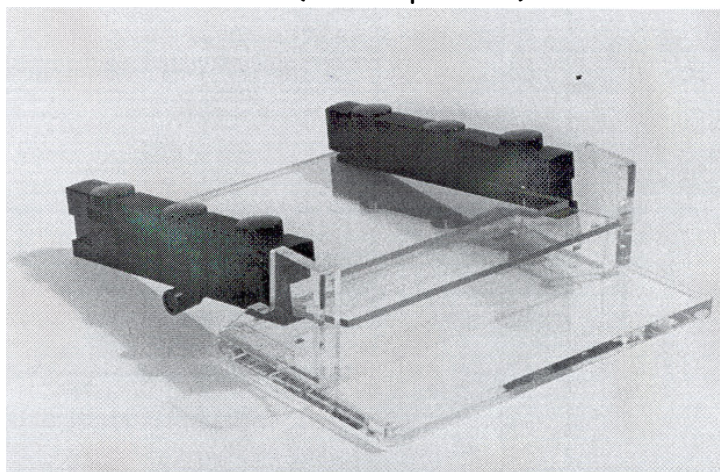
Serrer les vis sans forcer.





 <p>INRA Institut National de la Recherche Agronomique</p>	<p><b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de gel</b> <b>d'acrylamide pour le</b> <b>séquenceur</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-14
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 19/09/03 Page : 5/10

Positionner le système sur un socle (bloc supérieur) afin de le maintenir incliné.



Mettre une deuxième paire de gants à manchette pour recouvrir les manches de la blouse.

Ajouter les quantités de Temed et d'APS définies dans le tableau dans le bécher contenant l'acrylamide.


Mélanger par rotation du bécher.

Couler le mélange entre les 2 plaques en effectuant des vas et viens d'un côté à l'autre de façon à éviter la formation de bulles.

Tapoter les plaques si nécessaire pour assurer un front de migration régulier.

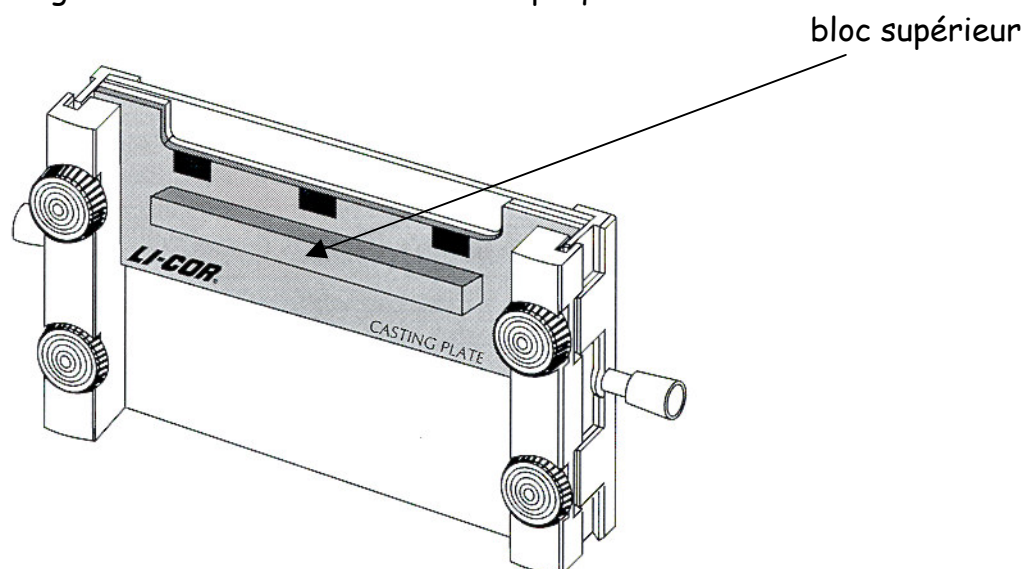
Lorsque le liquide arrive en bout de plaque, enlever le socle afin de positionner le système à l'horizontale.

Positionner la ligne de base sans introduire de bulles d'air et combler l'espace situé entre ligne de base et plaque avec le reste d'acrylamide.

	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de gel</b> <b>d'acrylamide pour le</b> <b>séquenceur</b>	Référence : BM-MO-MAR-14
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 19/09/03 Page : 6/10

Faire attention à positionner la ligne de base au centre c'est-à-dire que l'espace situé à gauche entre plaque et ligne de base soit identique à l'espace situé à droite entre plaque et ligne de base.

Mettre en place le bloc supérieur et serrer la vis supérieure de façon à assurer une pression régulière sur toute la surface des plaques.



Vérifier que les autres vis soient suffisamment serrées.


Enlever les 2 paires de gants et les jeter à la poubelle acrylamide.

Attendre  $\frac{3}{4}$  d'heure le temps de la polymérisation.

Mettre 2 paires de gants dont une paire à manchette pour recouvrir les manches de la blouse.

Desserrer la vis supérieure.

Enlever le bloc supérieur.

 <p>Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan</p>	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de gel</b> <b>d'acrylamide pour le</b> <b>séquenceur</b>	Référence : BM-MO-MAR-14  Version : 02 Date : 19/09/03 Page : 7/10
---	---	---

Déposer de l'eau ultra-pure (pissette bleue) au niveau de l'espace situé entre la ligne de base et la plaque.

Enlever la ligne de base.

Nettoyer le petit matériel avec du papier absorbant et jeter le papier dans la poubelle acrylamide.

Éliminer les filaments d'acrylamide à l'aide de la petite spatule.

Récupérer les filaments sur du papier absorbant qui sera jeté dans la poubelle acrylamide.

Nettoyer le gel à l'eau déminéralisée au niveau de la ligne de base.

Le placer directement dans l'évier sous le robinet.

Frotter avec les doigts au niveau de la ligne de base.


Nettoyer les plaques à l'eau et à l'alcool de façon à éviter d'éventuels bruits de fond lors de la lecture par le laser.

Positionner la cuve inférieure.

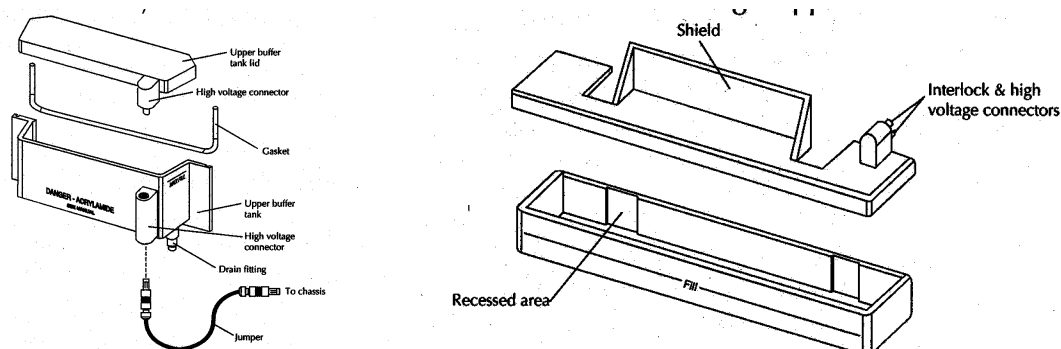
Positionner le système de plaques sur l'appareil en calant les 2 bras.

Enlever la paire de gants à manchette et la jeter dans la poubelle acrylamide.

Positionner la cuve supérieure.

 <p>INRA Institut National de la Recherche Agronomique</p>	<p><b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de gel</b> <b>d'acrylamide pour le</b> <b>séquenceur</b></p>	Référence : BM-MO-MAR-14
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 19/09/03
Page : 8/10		

Faire attention à ce que le joint soit bien positionné dans la goulotte afin d'assurer une bonne étanchéité (il est possible d'humidifier ce dernier pour faciliter sa mise en place).



Serrer la vis supérieure.

Préparer 1 litre de tampon TBE1X à partir de tampon TBE10X soit 100 ml de 10X dans 900 ml d'eau ultra pure.


Remplir de tampon 1X la cuve supérieure jusqu'au niveau indiqué.

Pour la cuve inférieure, verser sans précipitation le tampon sur le côté afin d'éviter de mouiller la fenêtre du laser.

Placer la feuille de couleur argentée derrière le gel afin de visualiser la ligne de base.

Nettoyer la ligne de base à l'aide d'une seringue pour éliminer toute trace d'acrylamide et pour chasser l'urée.

Placer les capots des cuves supérieure et inférieure.

	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de gel</b> <b>d'acrylamide pour le</b> <b>séquenceur</b>	Référence : BM-MO-MAR-14
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 19/09/03 Page : 9/10

Mettre en place le fil de connexion entre la cuve supérieure et l'appareil.

Fermer le capot.

Lancer le prerun.

Lorsque le prerun est fini, ouvrir le capot.

Débrancher le fil de connexion.

Enlever le capot de la cuve supérieure.

Nettoyer de nouveau la ligne de base à l'aide d'une seringue pour éliminer les petites bulles.

Changer la feuille de couleur argentée par la feuille jaune.

Prendre le peigne (plastique ou papier) aux 2 extrémités.

Le positionner incliné à 45° vers soi par rapport aux plaques.


Le glisser doucement de façon à faire pénétrer les dents entre les 2 plaques.

Le redresser pour le plaquer sur la plaque arrière.

Enfoncer le peigne doucement dans le gel : les dents doivent se poser sur le gel.

Faire les dépôts suivant BM-MO-MAR-08.

Enlever les gants et les jeter à la poubelle acrylamide.

 <p><b>INRA</b> Institut National de la Recherche Agronomique</p>	<b>Mode opératoire</b> <b>Préparation de gel</b> <b>d'acrylamide pour le</b> <b>séquenceur</b>	Référence : BM-MO-MAR-14
Centre de recherches Poitou-Charentes		Version : 02
UGAPF 86600 Lusignan		Date : 19/09/03 Page : 10/10

Se laver les mains à l'évier de la cuisine (salle extraction ADN).

## ***Annexe 7***

- ANNEXE 7.1 -  
Fiche de manip dépôt séquenceur

<b>nom :</b>	<b>date :</b>	<b>N° :</b>
<b>type de manip :</b>		

**nom du projet :**

**nom de l'image (chemin d'accès):**

**type de gel :**

longueur	25 cm
%acrylamide	6,50%
temed	15 $\mu$ L
APS	150 $\mu$ L
TBE	1 X
nombre de puits	96

<b>conditions de prerun :</b>	
température	45 °C
voltage	1500 V
puissance	40 W
durée	20 min (ou 15 min)


<b>conditions de migration :</b>	
température	45 °C
voltage	1500 V
puissance	40 W
durée	01.45.00

<b>dépôts :</b>	
volume PCR <sub>1</sub> :	1 $\mu$ L
volume PCR <sub>2</sub> :	1 $\mu$ L
volume marqueur :	0,5 $\mu$ L du standard 700 + 0,5 $\mu$ L du standard 800
volume solution stop :	1 $\mu$ L

**Conditions particulières :** peigne papier 96 puits

**programme dénaturation :** "denat" sur les PTC 100 et 200 ou "01" sur crocodile



 Institut National de la Recherche Agronomique	<b>Mode opératoire</b>  <b>Dépôt sur gel d'acrylamide séquenceur</b>	Référence : BM-MO-MAR-08
		Version : 02
		Date : 17/09/03
Centre de recherches Poitou-Charentes		Page : 1/4
UGAPF 86600 Lusignan		

**Recommandations :**

Porter une blouse et une paire de gants que vous changerez régulièrement.  
Nettoyer la paillasse à l'alcool avant et après manipulation.

**Matériel nécessaire :**

centrifugeuse Jouan.  
thermocycleur Cocodile.  
plaque 96 puits Costar.  
film adhésif aluminium.  
tapis souple.  
bac de glace.  
seringue multicanaux hamilton (seringue 8 canaux).

Récupérer la plaque 96 puits de l'amplification PCR.

Préparer une plaque 96 puits Costar en fonction du plan de dépôt sur le gel.


Transférer le produit d'amplification dans la nouvelle plaque 96 puits Costar.

Recoller le film adhésif sur la plaque des produits d'amplification et stocker la plaque à -20°C.

Si besoin ajouter dans la plaque Costar le volume d'eau défini suivant la fiche de manip.

Se placer sous la sorbonne.

	<b>Rédacteur</b>	<b>Vérificateur</b>	<b>Approbateur</b>
<b>Nom</b>	Equipe du labo Biologie moléculaire	Gibelin Chrystel	Huyghe Christian
<b>Fonction</b>		Responsable labo Biologie moléculaire	Directeur d'unité
<b>Visa</b>			

 Institut National de la Recherche Agronomique	<b>Mode opératoire</b>  <b>Dépôt sur gel d'acrylamide séquenceur</b>	Référence : BM-MO-MAR-08
		Version : 02
		Date : 17/09/03
Centre de recherches Poitou-Charentes		Page : 2/4
UGAPF 86600 Lusignan		

Mettre 2 paires de gants dont une paire à manchette pour recouvrir les manches de la blouse.

Ajouter le volume de rouge Congo défini suivant la fiche de manip (1/3 du volume final).

Ajouter dans les puits correspondant les marqueurs de taille MWS700 et MWS800 suivant le volume défini dans la fiche de manip.

Tous les déchets contaminés par du rouge congo sont jetés dans la poubelle placée sous la sorbonne.

Changer de paire de gants.

Entourer un tapis souple de film plastique.

Placer le tapis sur la plaque de dépôt.

Placer la plaque 96 puits dans la centrifugeuse Jouan GR 4-12 en utilisant le portoir noir à 96 puits.

Fermer le couvercle de la centrifugeuse.


Tourner la molette de programmation du temps.

Appuyer sur Start.

Appuyer sur Stop lorsque la vitesse atteints la valeur de 1000 rpm.

Lorsque la centrifugeuse est à l'arrêt, appuyer simultanément sur le bouton bleu situé sur le côté droit de l'appareil et le bouton marqué Lid.

Récupérer la plaque 96 puits.

 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	<b>Mode opératoire</b> <b>Dépôt sur gel d'acrylamide</b> <b>séquenceur</b>	Référence : BM-MO-MAR-08
		Version : 02
		Date : 17/09/03
		Page : 3/4

Placer la plaque dans un thermocycleur Crocodile.

Fermer le couvercle.

Allumer l'appareil en appuyant sur l'interrupteur situé à l'arrière droite de l'appareil.

Appuyer sur l'interrupteur POWER du couvercle.

Appuyer sur l'interrupteur pour sélectionner MANUAL.

Se déplacer dans le menu en appuyant sur la touche NEXT pour aller à l'option RUN.

Valider en appuyant sur ENTR.

Lancer le programme 01 en appuyant 0 puis 1 puis valider en appuyant sur ENTR.

Pour interrompre le cycle, appuyer sur la touche OOPS.

Valider en appuyant sur ENTR.


A la fin du cycle, placer la plaque dans un bac de glace.

Placer du papier aluminium sur la plaque.

Il est possible de stocker la plaque à -20°C si le dépôt des échantillons se fait le lendemain.

Préparer le plan de travail dans la salle séquenceur : seringue 8 canaux/seringue monocanal / goulotte remplie d'eau ultra pure / papier absorbant.

Prélever un volume de solution PCR colorée.

 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	<b>Mode opératoire</b>  <b>Dépôt sur gel d'acrylamide séquenceur</b>	Référence : BM-MO-MAR-08
		Version : 02
		Date : 17/09/03
		Page : 4/4

Visualiser une gouttelette de solution PCR colorée à chacun des 8 canaux.

Eliminer les gouttelettes sur du papier absorbant.

Se caler les bras au niveau de la cuve supérieure.

Positionner chacun des 8 canaux au niveau des puits.

Appuyer doucement sur la barre supérieure de la seringue afin de faire s'écouler la solution PCR colorée.

Remplir les puits.

Vider le reste de la solution PCR colorée dans la plaque de dépôt.

Nettoyer la seringue avec de l'eau ultrapure et répéter l'opération de dépôt.

Si vous ressentez une résistance au niveau du coulissement des pistons, nettoyer la seringue à l'alcool 70%.

Enlever les gants et les jeter à la poubelle acrylamide.

Se laver les mains à l'évier de la cuisine (salle extraction ADN).

## ***Annexe 8***





## ***Annexe 9***



# 1 / B1B6

	9198	8007	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.
Phéno	effectif observé	effectif observé			
bf	1	1	0,00564972	0,00617284	0
cd	18	8	0,10734463	0,05555556	10
cde	13	12	0,18079096	0,12962963	1
cdef	11	6	0,24293785	0,16666667	5
cdf	52	20	0,53672316	0,29012346	32
cf	5	2	0,56497175	0,30246914	3
d	2	14	0,57627119	0,38888889	12
de	2	7	0,58757062	0,43209877	5
def	17	18	0,68361582	0,54320988	1
df	39	35	0,9039548	0,75925926	4
f	2	8	0,91525424	0,80864198	6
acdf	12	0	0,98305085	0,80864198	12
bcd	1	0	0,98870056	0,80864198	1
bcd	1	0	0,99435028	0,80864198	1
bcd	1	0	1	0,80864198	1
bcd	1	0	1	0,81481481	1
b	0	1	1	0,85802469	7
bd	0	7	1	0,88271605	4
bde	0	4	1	0,98148148	16
bdf	0	16	1	0,99382716	2
e	0	2	1	1	1
ef	0	1			

## Kolmogorov-Smirnov for two samples

N	42
n1	21
n2	21
S1	177
S2	162
m1	8,429
m2	7,714
Dk	0,263
Kd	5
pD	
D critical 0.05	0,21
D critical 0.01	0,2515
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7992	effectif observé8007	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
bde	6	4	0,03680982	0,02469136	2	0,01211846
bdf	3	16	0,05521472	0,12345679	13	0,06824207
bf	8	1	0,10429448	0,12962963	7	0,02533515
de	2	7	0,11656442	0,17283951	5	0,05627509
def	15	18	0,20858896	0,28395062	3	0,07536166
df	23	35	0,34969325	0,5	12	0,15030675
e	9	2	0,40490798	0,51234568	7	0,1074377
ef	45	1	0,6809816	0,51851852	44	0,16246308
f	23	8	0,82208589	0,56790123	15	0,25418466
abd	1	0	0,82822086	0,56790123	1	0,26031962
abde	1	0	0,83435583	0,56790123	1	0,26645459
abdf	1	0	0,8404908	0,56790123	1	0,27258956
bdef	3	0	0,85889571	0,56790123	3	0,29099447
be	5	0	0,88957055	0,56790123	5	0,32166932
bef	17	0	0,99386503	0,56790123	17	0,4259638
cef	1	0	1	0,56790123	1	0,43209877
b	0	1	1	0,57407407	1	0,42592593
bd	0	7	1	0,61728395	7	0,38271605
cd	0	8	1	0,66666667	8	0,33333333
cde	0	12	1	0,74074074	12	0,25925926
cdef	0	6	1	0,77777778	6	0,22222222
cdf	0	20	1	0,90123457	20	0,09876543
cf	0	2	1	0,91358025	2	0,08641975
d	0	14	1	1	14	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	48
n1	24
n2	24
S1	163
S2	162
m1	6,792
m2	6,75
Dk	0,432
Kd	10
pD	
D critical 0.05	0,1965
D critical 0.01	0,2355
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif		Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
	observé8477	observé8007				
bd	1	7	0,00609756	0,04320988	6	0,03711232
bde	8	4	0,05487805	0,06790123	4	0,01302319
bdf	1	16	0,06097561	0,16666667	15	0,10569106
cd	1	8	0,06707317	0,21604938	7	0,14897621
cde	14	12	0,15243902	0,29012346	2	0,13768443
cdef	4	6	0,17682927	0,32716049	2	0,15033123
cf	1	2	0,18292683	0,33950617	1	0,15657934
d	3	14	0,20121951	0,42592593	11	0,22470641
de	53	7	0,52439024	0,4691358	46	0,05525444
def	19	18	0,6402439	0,58024691	1	0,05999699
df	2	35	0,65243902	0,7962963	33	0,14385727
e	7	2	0,69512195	0,80864198	5	0,11352002
ef	12	1	0,76829268	0,81481481	11	0,04652213
f	0	8	0,76829268	0,86419753	8	0,09590485
b	0	1	0,76829268	0,87037037	1	0,10207769
bf	0	1	0,76829268	0,87654321	1	0,10825053
cdf	0	20	0,76829268	1	20	0,23170732
abdf	1	0	0,77439024	1	1	0,22560976
acde	1	0	0,7804878	1	1	0,2195122
bcef	2	0	0,79268293	1	2	0,20731707
be	1	0	0,79878049	1	1	0,20121951
bef	3	0	0,81707317	1	3	0,18292683
cc'ef	1	0	0,82317073	1	1	0,17682927
cc'f	2	0	0,83536585	1	2	0,16463415
ce	4	0	0,8597561	1	4	0,1402439
c'e	4	0	0,88414634	1	4	0,11585366
cef	3	0	0,90243902	1	3	0,09756098
c'ef	1	0	0,90853659	1	1	0,09146341
bdef	7	0	0,95121951	1	7	0,04878049
c'de	4	0	0,97560976	1	4	0,02439024
c'def	3	0	0,99390244	1	3	0,00609756
c'd	1	0	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	64
n1	32
n2	32
S1	164
S2	162
m1	5,125
m2	5,063
Dk	0,232
Kd	7
pD	
D critical 0.05	0,17
D critical 0.01	0,204
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé8007	effectif observé7990	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
cde	12	2	0,07407407	0,01156069	10	0,06251338
cdef	6	14	0,11111111	0,09248555	8	0,01862556
cdf	20	1	0,2345679	0,0982659	19	0,13630201
de	7	2	0,27777778	0,10982659	5	0,16795119
def	18	73	0,38888889	0,53179191	55	0,14290302
df	35	7	0,60493827	0,57225434	28	0,03268394
e	2	1	0,61728395	0,57803468	1	0,03924927
ef	1	23	0,62345679	0,71098266	22	0,08752587
f	8	2	0,67283951	0,72254335	6	0,04970385
b	1	0	0,67901235	0,72254335	1	0,04353101
bd	7	0	0,72222222	0,72254335	7	0,00032113
bde	4	0	0,74691358	0,72254335	4	0,02437023
bdf	16	0	0,84567901	0,72254335	16	0,12313566
bf	1	0	0,85185185	0,72254335	1	0,1293085
cd	8	0	0,90123457	0,72254335	8	0,17869122
cf	2	0	0,91358025	0,72254335	2	0,19103689
d	14	0	1	0,72254335	14	0,27745665
abdf	0	2	1	0,73410405	2	0,26589595
abe	0	3	1	0,75144509	3	0,24855491
abef	0	3	1	0,76878613	3	0,23121387
adef	0	1	1	0,77456647	1	0,22543353
bcd	0	1	1	0,78034682	1	0,21965318
bcde	0	2	1	0,79190751	2	0,20809249
bcdf	0	2	1	0,80346821	2	0,19653179
bce	0	2	1	0,8150289	2	0,1849711
bcef	0	5	1	0,84393064	5	0,15606936
bcf	0	3	1	0,86127168	3	0,13872832
bdef	0	15	1	0,94797688	15	0,05202312
bef	0	1	1	0,95375723	1	0,04624277
ce	0	1	1	0,95953757	1	0,04046243
cef	0	7	1	1	7	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	62
n1	31
n2	31
S1	162
S2	173
m1	5,226
m2	5,581
Dk	0,277
Kd	8
pD	
D critical 0.05	0,1725
D critical 0.01	0,207
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7992	effectif observé9198	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
bf	8	1	0,04907975	0,00564972	7	0,04343004
de	2	2	0,06134969	0,01694915	0	0,04440054
def	15	17	0,15337423	0,11299435	2	0,04037988
df	23	39	0,29447853	0,33333333	16	0,03885481
f	23	2	0,43558282	0,34463277	21	0,09095005
cef	1	0	0,44171779	0,34463277	1	0,09708502
e	9	0	0,49693252	0,34463277	9	0,15229975
ef	45	0	0,77300613	0,34463277	45	0,42837337
bde	6	0	0,80981595	0,34463277	6	0,46518318
bdef	3	0	0,82822086	0,34463277	3	0,48358809
bdf	3	0	0,84662577	0,34463277	3	0,501993
be	5	0	0,87730061	0,34463277	5	0,53266785
bef	17	0	0,98159509	0,34463277	17	0,63696232
abd	1	0	0,98773006	0,34463277	1	0,64309729
abde	1	0	0,99386503	0,34463277	1	0,64923226
abdf	1	0	1	0,34463277	1	0,65536723
acdf	0	12	1	0,41242938	12	0,58757062
bcd	0	1	1	0,4180791	1	0,5819209
bcdf	0	1	1	0,42372881	1	0,57627119
bcef	0	1	1	0,42937853	1	0,57062147
cd	0	18	1	0,53107345	18	0,46892655
cde	0	13	1	0,60451977	13	0,39548023
cdef	0	11	1	0,66666667	11	0,33333333
cdf	0	52	1	0,96045198	52	0,03954802
cf	0	5	1	0,98870056	5	0,01129944
d	0	2	1	1	2	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	52
n1	26
n2	26
S1	163
S2	177
m1	6,269
m2	6,808
Dk	0,655
Kd	17
pD	
D critical 0.05	0,1885
D critical 0.01	0,226
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif		Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.
	observé7990	observé9198			
bcd	2	1	0,01156069	0,00564972	1
bcef	5	1	0,04046243	0,01129944	4
cde	2	13	0,05202312	0,08474576	11
cdef	14	11	0,13294798	0,14689266	3
cdf	1	52	0,13872832	0,44067797	51
de	2	2	0,15028902	0,4519774	0
def	73	17	0,57225434	0,5480226	56
df	7	39	0,61271676	0,76836158	32
f	2	2	0,62427746	0,77966102	0
bcd	1	1	0,6300578	0,78531073	0
abdf	2	0	0,6416185	0,78531073	2
abe	3	0	0,65895954	0,78531073	3
abef	3	0	0,67630058	0,78531073	3
adef	1	0	0,68208092	0,78531073	1
bcde	2	0	0,69364162	0,78531073	2
bce	2	0	0,70520231	0,78531073	2
bcf	3	0	0,72254335	0,78531073	3
bdef	15	0	0,80924855	0,78531073	15
bef	1	0	0,8150289	0,78531073	1
ce	1	0	0,82080925	0,78531073	1
cef	7	0	0,86127168	0,78531073	7
e	1	0	0,86705202	0,78531073	1
ef	23	0	1	0,78531073	23
acdf	0	12	1	0,85310734	12
bf	0	1	1	0,85875706	1
cd	0	18	1	0,96045198	18
cf	0	5	1	0,98870056	5
d	0	2	1	1	2

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	56
n1	28
n2	28
S1	173
S2	177
m1	6,179
m2	6,321
Dk	0,302
Kd	8
pD	
D critical 0.05	0,1815
D critical 0.01	0,218
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif		Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
	observé9198	observé8477				
bcef	1	2	0,00564972	0,01980198	1	0,01415226
cd	18	1	0,10734463	0,02970297	17	0,07764166
cde	13	14	0,18079096	0,16831683	1	0,01247413
cdef	11	4	0,24293785	0,20792079	7	0,03501706
cf	5	1	0,27118644	0,21782178	4	0,05336466
d	2	3	0,28248588	0,24752475	1	0,03496112
de	2	53	0,29378531	0,77227723	51	0,47849192
def	17	19	0,38983051	0,96039604	2	0,57056553
df	39	2	0,61016949	0,98019802	37	0,37002853
acdf	12	0	0,6779661	0,98019802	12	0,30223192
bf	1	0	0,68361582	0,98019802	1	0,2965822
cdf	52	0	0,97740113	0,98019802	52	0,00279689
f	2	0	0,98870056	0,98019802	2	0,00850255
bcd	1	0	0,99435028	0,98019802	1	0,01415226
bcdf	1	0	1	0,98019802	1	0,01980198
abdf	0	1	1	0,99009901	1	0,00990099
acde	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	34
n1	17
n2	17
S1	177
S2	101
m1	10,412
m2	5,941
Dk	0,571
Kd	9
pD	p < 0.01
D critical 0.05	0,471
D critical 0.01	0,529
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	8
Kd critical 0.01	9

Phéno	effectif observé7992	effectif observé7990	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
abdf	1	2	0,00613497	0,01169591	1	0,00556094
bef	17	1	0,11042945	0,01754386	16	0,09288559
bdef	3	14	0,12883436	0,0994152	11	0,02941915
cef	1	7	0,13496933	0,14035088	6	0,00538155
de	2	2	0,14723926	0,15204678	0	0,00480752
def	15	73	0,2392638	0,57894737	58	0,33968356
df	23	7	0,3803681	0,61988304	16	0,23951494
e	9	1	0,43558282	0,62573099	8	0,19014817
ef	45	23	0,71165644	0,76023392	22	0,04857748
f	23	2	0,85276074	0,77192982	21	0,08083091
abd	1	0	0,85889571	0,77192982	1	0,08696588
abde	1	0	0,86503067	0,77192982	1	0,09310085
bde	6	0	0,90184049	0,77192982	6	0,12991067
bdf	3	0	0,9202454	0,77192982	3	0,14831557
be	5	0	0,95092025	0,77192982	5	0,17899042
bf	8	0	1	0,77192982	8	0,22807018
cdf	0	1	1	0,77777778	1	0,22222222
ce	0	1	1	0,78362573	1	0,21637427
abe	0	3	1	0,80116959	3	0,19883041
abef	0	3	1	0,81871345	3	0,18128655
adef	0	1	1	0,8245614	1	0,1754386
bcd	0	1	1	0,83040936	1	0,16959064
bcde	0	2	1	0,84210526	2	0,15789474
bcdf	0	2	1	0,85380117	2	0,14619883
bce	0	2	1	0,86549708	2	0,13450292
bcef	0	5	1	0,89473684	5	0,10526316
bcf	0	3	1	0,9122807	3	0,0877193
bdef	0	15	1	1	15	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	56
n1	28
n2	28
S1	163
S2	171
m1	5,821
m2	6,107
Dk	0,34
Kd	9
pD	
D critical 0.05	0,1815
D critical 0.01	0,218
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	



Phéno	effectif		Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
	observé7992	observé8477				
bde	6	8	0,03680982	0,04878049	2	0,01197067
bdef	3	7	0,05521472	0,09146341	4	0,03624869
bdf	3	1	0,07361963	0,09756098	2	0,02394134
be	5	1	0,10429448	0,10365854	4	0,00063594
bef	17	3	0,20858896	0,12195122	14	0,08663774
cef	1	3	0,21472393	0,1402439	2	0,07448002
de	2	53	0,22699387	0,46341463	51	0,23642077
def	15	19	0,3190184	0,57926829	4	0,26024989
df	23	2	0,4601227	0,59146341	21	0,13134072
e	9	7	0,51533742	0,63414634	2	0,11880892
ef	45	12	0,79141104	0,70731707	33	0,08409397
bf	8	0	0,8404908	0,70731707	8	0,13317372
f	23	0	0,98159509	0,70731707	23	0,27427802
abd	1	0	0,98773006	0,70731707	1	0,28041299
abde	1	0	0,99386503	0,70731707	1	0,28654796
abdf	1	1	1	0,71341463	0	0,28658537
acde	0	1	1	0,7195122	1	0,2804878
bcef	0	2	1	0,73170732	2	0,26829268
bd	0	1	1	0,73780488	1	0,26219512
cc'ef	0	1	1	0,74390244	1	0,25609756
cc'f	0	2	1	0,75609756	2	0,24390244
cd	0	1	1	0,76219512	1	0,23780488
c'd	0	1	1	0,76829268	1	0,23170732
cde	0	14	1	0,85365854	14	0,14634146
c'de	0	4	1	0,87804878	4	0,12195122
cdef	0	4	1	0,90243902	4	0,09756098
c'def	0	3	1	0,92073171	3	0,07926829
ce	0	4	1	0,94512195	4	0,05487805
c'e	0	4	1	0,9695122	4	0,0304878
c'ef	0	1	1	0,97560976	1	0,02439024
cf	0	1	1	0,98170732	1	0,01829268
d	0	3	1	1	3	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	64
n1	32
n2	32
S1	163
S2	164
m1	5,094
m2	5,125
Dk	0,287
Kd	9
pD	
D critical 0.05	0,17
D critical 0.01	0,204
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7990	effectif observé8477	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
abdf	2	1	0,01156069	0,00609756	1	0,00546313
bcde	2	1	0,02312139	0,01219512	1	0,01092627
bcef	5	2	0,05202312	0,02439024	3	0,02763288
bdef	15	7	0,13872832	0,06707317	8	0,07165515
bef	1	3	0,14450867	0,08536585	2	0,05914282
cde	2	14	0,15606936	0,17073171	12	0,01466234
cdef	14	4	0,23699422	0,19512195	10	0,04187227
ce	1	4	0,24277457	0,2195122	3	0,02326237
cef	7	3	0,28323699	0,23780488	4	0,04543212
de	2	53	0,29479769	0,56097561	51	0,26617792
def	73	19	0,71676301	0,67682927	54	0,03993374
df	7	2	0,75722543	0,68902439	5	0,06820104
e	1	7	0,76300578	0,73170732	6	0,03129846
ef	23	12	0,89595376	0,80487805	11	0,09107571
cdf	1	0	0,9017341	0,80487805	1	0,09685606
f	2	0	0,9132948	0,80487805	2	0,10841675
abe	3	0	0,93063584	0,80487805	3	0,12575779
abef	3	0	0,94797688	0,80487805	3	0,14309883
adef	1	0	0,95375723	0,80487805	1	0,14887918
bcd	1	0	0,95953757	0,80487805	1	0,15465952
bcdf	2	0	0,97109827	0,80487805	2	0,16622022
bce	2	0	0,98265896	0,80487805	2	0,17778091
bcf	3	0	1	0,80487805	3	0,19512195
bd	0	1	1	0,81097561	1	0,18902439
bde	0	8	1	0,8597561	8	0,1402439
bdf	0	1	1	0,86585366	1	0,13414634
be	0	1	1	0,87195122	1	0,12804878
cc'ef	0	1	1	0,87804878	1	0,12195122
cc'f	0	2	1	0,8902439	2	0,1097561
cd	0	1	1	0,89634146	1	0,10365854
c'd	0	1	1	0,90243902	1	0,09756098
c'de	0	4	1	0,92682927	4	0,07317073
c'def	0	3	1	0,94512195	3	0,05487805
c'e	0	4	1	0,9695122	4	0,0304878
c'ef	0	1	1	0,97560976	1	0,02439024
cf	0	1	1	0,98170732	1	0,01829268
d	0	3	1	1	3	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	74
n1	37
n2	37
S1	173
S2	164
m1	4,676
m2	4,432
Dk	0,266
Kd	9
pD	

D critical 0.05            0,158  
D critical 0.01            0,1895  
pKd                            p < 0.01  
Kd critical 0.05  
Kd critical 0.01

---

2/ B1C8 :

Phéno	effectif observé8007	effectif observé9198	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
bc	10	0	0,0591716	0,00552486	9	0,05364674
bcd	57	0	0,3964497	0,33701657	3	0,05943313
bcde	7	0	0,43786982	0,64640884	49	0,20853902
bde	2	0	0,44970414	0,6519337	1	0,20222956
be	2	0	0,46153846	0,66850829	1	0,20696983
c	2	0	0,47337278	0,67403315	1	0,20066037
cd	8	0	0,52071006	0,71823204	0	0,19752199
cde	3	0	0,53846154	0,7679558	6	0,22949426
d	32	0	0,72781065	0,90055249	8	0,17274184
de	4	0	0,75147929	0,97237569	9	0,2208964
b	16	0	0,84615385	0,97237569	16	0,12622184
bd	26	0	1	0,97237569	26	0,02762431
bce	0	3	1	0,98895028	3	0,01104972
ce	0	1	1	0,99447514	1	0,00552486
ade	0	0	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N                            30  
n1                            15  
n2                            15  
S1                            169  
S2                            181  
m1                            11,267  
m2                            12,067  
Dk                            0,229  
Kd                            3  
pD                            NS  
D critical 0.05            0,467  
D critical 0.01            0,6  
pKd                            NS  
Kd critical 0.05            7  
Kd critical 0.01            9

Phéno	effectif observé7992	effectif observé8007	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
b	3	16	0,04733728	0,10457516	8	0,05723789
bc	3	10	0,0887574	0,16993464	3	0,08117724
bcd	3	57	0,81065089	0,54248366	65	0,26816723
bd	3	26	0,96449704	0,7124183	0	0,25207874
cd	4	8	0,9704142	0,76470588	7	0,20570832
d	3	32	1	0,97385621	27	0,02614379
de		4	1	1	4	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	13
n1	6
n2	7
S1	169
S2	153
m1	28,167
m2	21,857
Dk	0,268
Kd	1
pD	NS
D critical 0.05	0,857
D critical 0.01	0,714
pKd	
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7990	effectif observé8007	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
b	3	16	0,01081081	0,09467456	14	0,08386375
bc	3	10	0,03243243	0,15384615	6	0,12141372
bcd	3	57	0,96756757	0,49112426	116	0,47644331
bd	3	26	1	0,64497041	20	0,35502959
bde	0	2	1	0,65680473	2	0,34319527
be	0	2	1	0,66863905	2	0,33136095
c	0	2	1	0,68047337	2	0,31952663
cd	0	8	1	0,72781065	8	0,27218935
cde	0	3	1	0,74556213	3	0,25443787
d	0	32	1	0,93491124	32	0,06508876
de	0	4	1	0,95857988	4	0,04142012
bcde	0	7	1	1	7	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	24
n1	12
n2	12
S1	185
S2	169
m1	15,417
m2	14,083
Dk	0,476
Kd	5
pD	NS
D critical 0.05	0,5
D critical 0.01	0,667
pKd	NS
Kd critical 0.05	6
Kd critical 0.01	8

Phéno	effectif observé8477	effectif observé8007	F <sub>n1</sub> (x)	G <sub>n2</sub> (x)	diff.	D n1,n2
b	3	16	0,00581395	0,09467456	15	0,0888606
bcd	3	57	0,97674419	0,43195266	110	0,54479152
bd	3	26	0,98255814	0,58579882	25	0,39675932
de	3	4	0,98837209	0,60946746	3	0,37890464
ae	1	0	0,99418605	0,60946746	1	0,38471859
e	1	0	1	0,60946746	1	0,39053254
bc	0	10	1	0,66863905	10	0,33136095
bcde	0	7	1	0,71005917	7	0,28994083
bde	0	2	1	0,72189349	2	0,27810651
be	0	2	1	0,73372781	2	0,26627219
c	0	2	1	0,74556213	2	0,25443787
cd	0	8	1	0,79289941	8	0,20710059
cde	0	3	1	0,81065089	3	0,18934911
d	0	32	1	1	32	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	28
n1	14
n2	14
S1	172
S2	169
m1	12,286
m2	12,071
Dk	0,545
Kd	7
pD	p < 0.05
D critical 0.05	0,5
D critical 0.01	0,571
pKd	p < 0.05
Kd critical 0.05	7
Kd critical 0.01	8

Phéno	effectif observé7992	effectif observé9198	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
b	6	1	0,04733728	0,00552486	7	0,04181242
bc	6	1	0,0887574	0,01104972	6	0,07770767
bcd	1	60	0,81065089	0,34254144	62	0,46810945
cd	4	8	0,81656805	0,38674033	7	0,42982772
d	1	24	0,84615385	0,51933702	19	0,32681683
bd	16	0	1	0,51933702	26	0,48066298
bcde	0	56	1	0,82872928	56	0,17127072
bce	0	3	1	0,84530387	3	0,15469613
bde	0	1	1	0,85082873	1	0,14917127
be	0	3	1	0,86740331	3	0,13259669
c	0	1	1	0,87292818	1	0,12707182
cde	0	9	1	0,92265193	9	0,07734807
ce	0	1	1	0,9281768	1	0,0718232
de	0	13	1	1	13	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	28
n1	14
n2	14
S1	169
S2	181
m1	12,071
m2	12,929
Dk	0,481
Kd	6
pD	NS
D critical 0.05	0,5
D critical 0.01	0,571
pKd	NS
Kd critical 0.05	7
Kd critical 0.01	8

Phéno	effectif observé7990	effectif observé9198	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
bc	6	1	0,02162162	0,00552486	3	0,01609676
bcd	1	60	0,95675676	0,33701657	113	0,61974018
b	2	0	0,96756757	0,33701657	2	0,63055099
bd	6	0	1	0,33701657	6	0,66298343
ade	0	1	1	0,34254144	1	0,65745856
bcde	0	56	1	0,6519337	56	0,3480663
bce	0	3	1	0,66850829	3	0,33149171
bde	0	1	1	0,67403315	1	0,32596685
be	0	3	1	0,69060773	3	0,30939227
c	0	1	1	0,6961326	1	0,3038674
cd	0	8	1	0,74033149	8	0,25966851
cde	0	9	1	0,79005525	9	0,20994475
ce	0	1	1	0,79558011	1	0,20441989
d	0	24	1	0,9281768	24	0,0718232
de	0	13	1	1	13	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	30
	n1
n2	15
S1	185
S2	181
m1	12,333
m2	12,067
Dk	0,663
Kd	9
pD	p < 0.01
D critical 0.05	0,467
D critical 0.01	0,6
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	7
Kd critical 0.01	9

15

Phéno	effectif observé8477	effectif observé9198	F <sub>n1</sub> (x)	G <sub>n2</sub> (x)	diff.	D n1,n2
bcd	1	60	0,97093023	0,33149171	107	0,63943852
de	1	13	0,97674419	0,40331492	12	0,57342927
ae	1	0	0,98255814	0,40331492	1	0,57924322
b	1	0	0,98837209	0,40331492	1	0,58505718
bd	1	0	0,99418605	0,40331492	1	0,59087113
e	1	0	1	0,40331492	1	0,59668508
ade	0	1	1	0,40883978	1	0,59116022
bc	0	1	1	0,41436464	1	0,58563536
bcde	0	56	1	0,72375691	56	0,27624309
bce	0	3	1	0,74033149	3	0,25966851
bde	0	1	1	0,74585635	1	0,25414365
be	0	3	1	0,76243094	3	0,23756906
c	0	1	1	0,7679558	1	0,2320442
cd	0	8	1	0,8121547	8	0,1878453
cde	0	9	1	0,86187845	9	0,13812155
ce	0	1	1	0,86740331	1	0,13259669
d	0	24	1	1	24	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	34
	n1
n2	17
S1	172
S2	181
m1	10,118
m2	10,647
Dk	0,639
Kd	10
pD	p < 0.01
D critical 0.05	0,471
D critical 0.01	0,529
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	8
Kd critical 0.01	9

17

Phéno	effectif observé7990	effectif observé7992	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
b	4	8	0,01081081	0,04733728	6	0,03652647
bc	2	7	0,03243243	0,0887574	3	0,05632496
bcd	0	122	0,96756757	0,81065089	51	0,15691668
bd	3	26	1	0,96449704	20	0,03550296
cd	0	1	1	0,9704142	1	0,0295858
d	0	5	1	1	5	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	12
	n1
n2	6
S1	185
S2	169
m1	30,833
m2	28,167
Dk	0,157
Kd	0
pD	NS
D critical 0.05	0,833
D critical 0.01	1
pKd	NS
Kd critical 0.05	5
Kd critical 0.01	6

6



Phéno	effectif observé4877	effectif observé7992	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
b	2	7	0,00581395	0,04142012	6	0,03560616
bcd	0	122	0,97674419	0,76331361	45	0,21343058
bd	3	26	0,98255814	0,91715976	25	0,06539838
de	16	0	0,98837209	0,91715976	1	0,07121233
e	16	0	0,99418605	0,91715976	1	0,07702628
ae	16	0	1	0,91715976	1	0,08284024
cd	0	1	1	0,92307692	1	0,07692308
d	0	5	1	0,95266272	5	0,04733728
b	0	8	1	1	8	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	18
n1	9
n2	9
S1	172
S2	169
m1	19,111
m2	18,778
Dk	0,213
Kd	1
pD	NS
D critical 0.05	0,667
D critical 0.01	0,778
pKd	NS
Kd critical 0.05	6
Kd critical 0.01	7

9

Phéno	effectif observé7990	effectif observé8477	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
b	3	16	0,01081081	0,00581395	1	0,00499686
bcd	173	167	0,94594595	0,97674419	6	0,03079824
bd	6	1	0,97837838	0,98255814	5	0,00417976
bc	18	0	1	0,98255814	4	0,01744186
ae	0	3	1	0,98837209	1	0,01162791
de	0	0	1	0,99418605	1	0,00581395
e	0	0	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	14
	n1
n2	7
S1	185
S2	172
m1	26,429
m2	24,571
Dk	0,031
Kd	0
pD	NS
D critical 0.05	0,714
D critical 0.01	0,857
pKd	NS
Kd critical 0.05	5
Kd critical 0.01	6

3/ B4D7 :

Phéno	effectif observé9198	effectif observé8007	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
ce	1	1	0,05555556	0,00680272	2	0,04875283
ce'	1	2	0,09259259	0,02040816	0	0,07218443
ce'f	1	1	0,12962963	0,02721088	1	0,10241875
cf	1	3	0,18518519	0,04761905	0	0,13756614
cf'	1	1	0,24074074	0,05442177	2	0,18631897
de	1	2	0,2962963	0,06802721	1	0,22826909
df	1	6	0,33333333	0,10884354	4	0,2244898
e	1	10	0,38888889	0,17687075	7	0,21201814
e'	1	18	0,42592593	0,29931973	16	0,1266062
ee'	1	2	0,46296296	0,31292517	0	0,15003779
ef	1	23	0,51851852	0,46938776	20	0,04913076
e'f	1	4	0,55555556	0,49659864	2	0,05895692
e'g	1	1	0,59259259	0,50340136	1	0,08919123
f	1	42	0,64814815	0,78911565	39	0,1409675
fg	1	0	0,68518519	0,78911565	2	0,10393046
f'g	1	0	0,7037037	0,78911565	1	0,08541194
eg	1	0	0,72222222	0,78911565	1	0,06689342
ee'f	1	0	0,74074074	0,78911565	1	0,04837491
ee'f'	1	0	0,75925926	0,78911565	1	0,02985639
ee'fg	1	0	0,77777778	0,78911565	1	0,01133787
ee'g	1	0	0,7962963	0,78911565	1	0,00718065
e'f'	1	0	0,81481481	0,78911565	1	0,02569917
eff'	1	0	0,85185185	0,78911565	2	0,06273621
efg	1	0	0,88888889	0,78911565	2	0,09977324
e'fg	1	0	0,90740741	0,78911565	1	0,11829176
deff'	1	0	0,92592593	0,78911565	1	0,13681028
defg	1	0	0,94444444	0,78911565	1	0,1553288
deg	1	0	0,96296296	0,78911565	1	0,17384732
cg	1	0	0,98148148	0,78911565	1	0,19236584
cde	1	0	1	0,78911565	1	0,21088435
b	0	2	1	0,80272109	2	0,19727891
bc	0	2	1	0,81632653	2	0,18367347
bcd'	0	2	1	0,82993197	2	0,17006803
bc'f	0	1	1	0,83673469	1	0,16326531
bd'	0	2	1	0,85034014	2	0,14965986
be	0	1	1	0,85714286	1	0,14285714
be'	0	6	1	0,89795918	6	0,10204082
bf	0	4	1	0,92517007	4	0,07482993
c	0	1	1	0,93197279	1	0,06802721
c'	0	1	1	0,93877551	1	0,06122449
cc'd'	0	1	1	0,94557823	1	0,05442177
cc'f	0	1	1	0,95238095	1	0,04761905
cd	0	1	1	0,95918367	1	0,04081633
c'd'	0	2	1	0,97278912	2	0,02721088
cd'f	0	1	1	0,97959184	1	0,02040816
f'	0	3	1	1	3	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	92
n1	46
n2	46
S1	54
S2	147
m1	1,174
m2	3,196
Dk	0,228
Kd	10
pD	
D critical 0.05	0,142
D critical 0.01	0,17
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7992	effectif observé8007	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.
b	8	2	0,04733728	0,01123596	6
bc	7	2	0,0887574	0,02247191	5
cd	1	1	0,09467456	0,02808989	0
d	5	4	0,12426036	0,0505618	1
bcd	122	0	0,84615385	0,0505618	122
bd	26	0	1	0,0505618	26
bcd'	0	2	1	0,06179775	2
bc'f	0	1	1	0,06741573	1
bd'	0	2	1	0,07865169	2
be	0	1	1	0,08426966	1
be'	0	6	1	0,11797753	6
bf	0	4	1	0,14044944	4
c	0	1	1	0,14606742	1
c'	0	1	1	0,15168539	1
cc'd'	0	1	1	0,15730337	1
cc'f	0	1	1	0,16292135	1
c'd'	0	2	1	0,1741573	2
cd'f	0	1	1	0,17977528	1
ce	0	1	1	0,18539326	1
c'e	0	2	1	0,19662921	2
ce'	0	2	1	0,20786517	2
c'e'	0	2	1	0,21910112	2
c'ef	0	1	1	0,2247191	1
ce'f	0	1	1	0,23033708	1
cf	0	3	1	0,24719101	3
cf'	0	1	1	0,25280899	1
d'	0	5	1	0,28089888	5
dd'	0	1	1	0,28651685	1
dd'e'f	0	1	1	0,29213483	1

de	0	2	1	0,30337079	2
d'e'	0	7	1	0,34269663	7
d'ef	0	1	1	0,34831461	1
de'f	0	2	1	0,35955056	2
df	0	6	1	0,39325843	6
d'f	0	4	1	0,41573034	4
df'	0	1	1	0,42134831	1
e	0	10	1	0,47752809	10
e'	0	18	1	0,57865169	18
ee'	0	2	1	0,58988764	2
ef	0	23	1	0,71910112	23
e'f	0	4	1	0,74157303	4
e'g	0	1	1	0,74719101	1
f	0	42	1	0,98314607	42
f'	0	3	1	1	3

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	88
n1	44
n2	44
S1	169
S2	178
m1	3,841
m2	4,045
Dk	0,949
Kd	41
pD	
D critical 0.05	0,145
D critical 0.01	0,174
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé8007	effectif observé7990	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
c	1	4	0,00819672	0,02162162	3	0,0134249
cd'f	1	1	0,01639344	0,02702703	0	0,01063358
ce	1	1	0,02459016	0,03243243	0	0,00784227
cf	3	1	0,04918033	0,03783784	2	0,01134249
cf'	1	5	0,05737705	0,06486486	4	0,00748782
d'	5	31	0,09836066	0,23243243	26	0,13407178
de	2	1	0,1147541	0,23783784	1	0,12308374
d'ef	1	12	0,12295082	0,3027027	11	0,17975188
d'f	4	7	0,1557377	0,34054054	3	0,18480284
df'	1	1	0,16393443	0,34594595	0	0,18201152
e	10	29	0,24590164	0,5027027	19	0,25680106

ef	23	9	0,43442623	0,55135135	14	0,11692512
f	42	9	0,77868852	0,6	33	0,17868852
f'	3	6	0,80327869	0,63243243	3	0,17084626
cd'	0	1	0,80327869	0,63783784	1	0,16544085
cd'e	0	1	0,80327869	0,64324324	1	0,16003545
cd'f	0	2	0,80327869	0,65405405	2	0,14922463
cefg	0	1	0,80327869	0,65945946	1	0,14381923
cff'	0	1	0,80327869	0,66486486	1	0,13841382
dd'e	0	1	0,80327869	0,67027027	1	0,13300842
d'e	0	33	0,80327869	0,84864865	33	0,04536996
d'ef'	0	2	0,80327869	0,85945946	2	0,05618077
d'eff'	0	1	0,80327869	0,86486486	1	0,06158618
d'ef'h	0	1	0,80327869	0,87027027	1	0,06699158
d'f'	0	7	0,80327869	0,90810811	7	0,10482942
d'ff'	0	2	0,80327869	0,91891892	2	0,11564023
d'f'h	0	1	0,80327869	0,92432432	1	0,12104564
ef'	0	8	0,80327869	0,96756757	8	0,16428888
eff'	0	1	0,80327869	0,97297297	1	0,16969428
efg	0	1	0,80327869	0,97837838	1	0,17509969
eh	0	1	0,80327869	0,98378378	1	0,1805051
ff'h	0	1	0,80327869	0,98918919	1	0,1859105
fg	0	1	0,80327869	0,99459459	1	0,19131591
gh	0	1	0,80327869	1	1	0,19672131
b	2	0	0,81967213	1	2	0,18032787
bc	2	0	0,83606557	1	2	0,16393443
bcd'	2	0	0,85245902	1	2	0,14754098
bc'f	1	0	0,86065574	1	1	0,13934426
bd'	2	0	0,87704918	1	2	0,12295082
be	1	0	0,8852459	1	1	0,1147541
be'	6	0	0,93442623	1	6	0,06557377
bf	4	0	0,96721311	1	4	0,03278689
d	4	0	1	1	4	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	86
n1	43
n2	43
S1	122
S2	185
m1	2,837
m2	4,302
Dk	0,257
Kd	11
pD	
D critical 0.05	0,1465
D critical 0.01	0,176
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif		Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
	observé8477	observé8007				
c	1	1	0,00549451	0,00561798	0	0,00012347
c'df'	1	1	0,01098901	0,01123596	0	0,00024694
ce	2	1	0,02197802	0,01685393	1	0,00512409
cf	3	3	0,03846154	0,03370787	0	0,00475367
cf'	5	1	0,06593407	0,03932584	4	0,02660822
d	46	4	0,31868132	0,06179775	42	0,25688357
de	3	2	0,33516484	0,07303371	1	0,26213113
df	15	6	0,41758242	0,10674157	9	0,31084084
df'	17	1	0,51098901	0,11235955	16	0,39862946
e	8	10	0,55494505	0,16853933	2	0,38640573
f	4	42	0,57692308	0,40449438	38	0,17242869
f'	8	3	0,62087912	0,42134831	5	0,19953081
ad	2	0	0,63186813	0,42134831	2	0,21051982
adf	1	0	0,63736264	0,42134831	1	0,21601432
c'd	1	0	0,64285714	0,42134831	1	0,22150883
cdef	1	0	0,64835165	0,42134831	1	0,22700333
cdef'	4	0	0,67032967	0,42134831	4	0,24898136
cdf	5	0	0,6978022	0,42134831	5	0,27645388
cdf'	1	0	0,7032967	0,42134831	1	0,28194839
cdff'	16	0	0,79120879	0,42134831	16	0,36986048
c'dff'	1	0	0,7967033	0,42134831	1	0,37535498
cef'	3	0	0,81318681	0,42134831	3	0,3918385
cef'g	1	0	0,81868132	0,42134831	1	0,397333
cff'	1	0	0,82417582	0,42134831	1	0,40282751
def	3	0	0,84065934	0,42134831	3	0,41931103
def'	3	0	0,85714286	0,42134831	3	0,43579454
dff'	1	0	0,86263736	0,42134831	1	0,44128905
dfg	1	0	0,86813187	0,42134831	1	0,44678355
ef'	3	0	0,88461538	0,42134831	3	0,46326707
eff'	3	0	0,9010989	0,42134831	3	0,47975059
ff'	1	0	0,90659341	0,42134831	1	0,48524509
cdff'	16	0	0,99450549	0,42134831	16	0,57315718
c'dff'	1	0	1	0,42134831	1	0,57865169
b	0	2	1	0,43258427	2	0,56741573
bc	0	2	1	0,44382022	2	0,55617978
bcd'	0	2	1	0,45505618	2	0,54494382
bc'f	0	1	1	0,46067416	1	0,53932584
bd'	0	2	1	0,47191011	2	0,52808989
be	0	1	1	0,47752809	1	0,52247191
be'	0	6	1	0,51123596	6	0,48876404
bf	0	4	1	0,53370787	4	0,46629213
c'	0	1	1	0,53932584	1	0,46067416
cc'd'	0	1	1	0,54494382	1	0,45505618
cc'f	0	1	1	0,5505618	1	0,4494382
cd	0	1	1	0,55617978	1	0,44382022
c'd'	0	2	1	0,56741573	2	0,43258427
c'e	0	2	1	0,57865169	2	0,42134831
ce'	0	2	1	0,58988764	2	0,41011236
c'e'	0	2	1	0,6011236	2	0,3988764
c'ef	0	1	1	0,60674157	1	0,39325843
ce'f	0	1	1	0,61235955	1	0,38764045
d'	0	5	1	0,64044944	5	0,35955056
dd'	0	1	1	0,64606742	1	0,35393258

dd'e'f	0	1	1	0,65168539	1	0,34831461
d'e'	0	7	1	0,69101124	7	0,30898876
d'ef	0	1	1	0,69662921	1	0,30337079
de'f	0	2	1	0,70786517	2	0,29213483
d'f	0	4	1	0,73033708	4	0,26966292
e'	0	18	1	0,83146067	18	0,16853933
ee'	0	2	1	0,84269663	2	0,15730337
ef	0	23	1	0,97191011	23	0,02808989
e'f	0	4	1	0,99438202	4	0,00561798
e'g	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	126
n1	63
n2	63
S1	182
S2	178
m1	2,889
m2	2,825
Dk	0,579
Kd	36
pD	
D critical 0.05	0,121
D critical 0.01	0,145
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7992	effectif observé9198	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
b	8	0	0,04733728	0	8	0,04733728
bc	7	0	0,0887574	0	7	0,0887574
bcd	122	0	0,81065089	0	122	0,81065089
bd	26	0	0,96449704	0	26	0,96449704
cd	1	0	0,9704142	0	1	0,9704142
d	5	0	1	0	5	1
cde	0	1	1	0,00552486	1	0,99447514
ce	0	9	1	0,05524862	9	0,94475138
ce'	0	1	1	0,06077348	1	0,93922652
cee'	0	9	1	0,11049724	9	0,88950276
cee'f	0	3	1	0,12707182	3	0,87292818
cef	0	7	1	0,16574586	7	0,83425414
ce'f	0	13	1	0,23756906	13	0,76243094
cefg	0	2	1	0,24861878	2	0,75138122
ceg	0	2	1	0,25966851	2	0,74033149
ce'g	0	2	1	0,27071823	2	0,72928177
cf	0	12	1	0,33701657	12	0,66298343
cf'	0	1	1	0,34254144	1	0,65745856
cg	0	1	1	0,3480663	1	0,6519337
de	0	1	1	0,35359116	1	0,64640884
deff'	0	1	1	0,35911602	1	0,64088398
defg	0	1	1	0,36464088	1	0,63535912



deg	0	1	1	0,37016575	1	0,62983425
df	0	5	1	0,39779006	5	0,60220994
e	0	6	1	0,43093923	6	0,56906077
e'	0	5	1	0,45856354	5	0,54143646
ee'	0	9	1	0,50828729	9	0,49171271
ee'f	0	6	1	0,54143646	6	0,45856354
ee'f'	0	2	1	0,55248619	2	0,44751381
ee'fg	0	3	1	0,56906077	3	0,43093923
ee'g	0	3	1	0,58563536	3	0,41436464
ef	0	27	1	0,73480663	27	0,26519337
e'f	0	25	1	0,87292818	25	0,12707182
e'f'	0	1	1	0,87845304	1	0,12154696
eff'	0	1	1	0,8839779	1	0,1160221
efg	0	1	1	0,88950276	1	0,11049724
e'fg	0	2	1	0,90055249	2	0,09944751
eg	0	1	1	0,90607735	1	0,09392265
e'g	0	3	1	0,92265193	3	0,07734807
f	0	12	1	0,98895028	12	0,01104972
fg	0	1	1	0,99447514	1	0,00552486
f'g	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	84
n1	42
n2	42
S1	169
S2	181
m1	4,024
m2	4,31
Dk	1
Kd	42
pD	
D critical 0.05	0,1485
D critical 0.01	0,178
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7990	effectif observé9198	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
ce	1	9	0,00540541	0,04972376	8	0,04431835
cefg	1	2	0,01081081	0,06077348	1	0,04996267
cf	1	12	0,01621622	0,12707182	11	0,11085561
cf'	5	1	0,04324324	0,13259669	4	0,08935344
de	1	1	0,04864865	0,13812155	0	0,0894729
e	29	6	0,20540541	0,17127072	23	0,03413469
ef	9	27	0,25405405	0,32044199	18	0,06638793

eff'	1	1	0,25945946	0,32596685	0	0,06650739
efg	1	1	0,26486486	0,33149171	0	0,06662685
f	9	12	0,31351351	0,39779006	3	0,08427654
fg	1	1	0,31891892	0,40331492	0	0,084396
c	4	0	0,34054054	0,40331492	4	0,06277438
cd'	1	0	0,34594595	0,40331492	1	0,05736897
cd'e	1	0	0,35135135	0,40331492	1	0,05196357
cd'f	1	0	0,35675676	0,40331492	1	0,04655816
cd'f'	2	0	0,36756757	0,40331492	2	0,03574735
cff'	1	0	0,37297297	0,40331492	1	0,03034194
d'	31	0	0,54054054	0,40331492	31	0,13722562
dd'e	1	0	0,54594595	0,40331492	1	0,14263103
d'e	33	0	0,72432432	0,40331492	33	0,32100941
d'ef	12	0	0,78918919	0,40331492	12	0,38587427
d'ef'	2	0	0,8	0,40331492	2	0,39668508
d'eff'	1	0	0,80540541	0,40331492	1	0,40209049
d'ef'h	1	0	0,81081081	0,40331492	1	0,40749589
d'f	7	0	0,84864865	0,40331492	7	0,44533373
df'	1	0	0,85405405	0,40331492	1	0,45073914
d'f'	7	0	0,89189189	0,40331492	7	0,48857697
d'ff'	2	0	0,9027027	0,40331492	2	0,49938779
d'f'h	1	0	0,90810811	0,40331492	1	0,50479319
ef'	8	0	0,95135135	0,40331492	8	0,54803643
eh	1	0	0,95675676	0,40331492	1	0,55344184
f'	6	0	0,98918919	0,40331492	6	0,58587427
ff'h	1	0	0,99459459	0,40331492	1	0,59127968
gh	1	0	1	0,40331492	1	0,59668508
cde	0	1	1	0,40883978	1	0,59116022
ce'	0	1	1	0,41436464	1	0,58563536
cee'	0	9	1	0,4640884	9	0,5359116
cee'f	0	3	1	0,48066298	3	0,51933702
cef	0	7	1	0,51933702	7	0,48066298
ce'f	0	13	1	0,59116022	13	0,40883978
ceg	0	2	1	0,60220994	2	0,39779006
ce'g	0	2	1	0,61325967	2	0,38674033
cg	0	1	1	0,61878453	1	0,38121547
deff'	0	1	1	0,62430939	1	0,37569061
defg	0	1	1	0,62983425	1	0,37016575
deg	0	1	1	0,63535912	1	0,36464088
df	0	5	1	0,66298343	5	0,33701657
e'	0	5	1	0,69060773	5	0,30939227
ee'	0	9	1	0,74033149	9	0,25966851
ee'f	0	6	1	0,77348066	6	0,22651934
ee'f'	0	2	1	0,78453039	2	0,21546961
ee'fg	0	3	1	0,80110497	3	0,19889503
ee'g	0	3	1	0,81767956	3	0,18232044
e'f	0	25	1	0,9558011	25	0,0441989
e'f'	0	1	1	0,96132597	1	0,03867403
e'fg	0	2	1	0,97237569	2	0,02762431
eg	0	1	1	0,97790055	1	0,02209945
e'g	0	3	1	0,99447514	3	0,00552486
f'g	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	118
n1	59
n2	59
S1	185
S2	181
m1	3,136
m2	3,068
Dk	0,597
Kd	35
pD	
D critical 0.05	0,125
D critical 0.01	0,15
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif		Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
	observé8477	observé9198				
ce	2	9	0,01212121	0,04972376	7	0,03760254
cf	3	12	0,03030303	0,1160221	9	0,08571907
cf'	5	1	0,06060606	0,12154696	4	0,0609409
de	3	1	0,07878788	0,12707182	2	0,04828394
df	15	5	0,16969697	0,15469613	10	0,01500084
e	8	6	0,21818182	0,1878453	2	0,03033651
eff'	3	1	0,23636364	0,19337017	2	0,04299347
f	4	12	0,26060606	0,25966851	8	0,00093755
ad	2	0	0,27272727	0,25966851	2	0,01305876
adf	1	0	0,27878788	0,25966851	1	0,01911937
c	1	0	0,28484848	0,25966851	1	0,02517998
c'd	1	0	0,29090909	0,25966851	1	0,03124058
cdef	1	0	0,2969697	0,25966851	1	0,03730119
cdef'	4	0	0,32121212	0,25966851	4	0,06154361
cdf	5	0	0,35151515	0,25966851	5	0,09184664
cdf'	1	0	0,35757576	0,25966851	1	0,09790725
c'df'	1	0	0,36363636	0,25966851	1	0,10396786
cdff'	16	0	0,46060606	0,25966851	16	0,20093755
c'dff'	1	0	0,46666667	0,25966851	1	0,20699816
cef'	3	0	0,48484848	0,25966851	3	0,22517998
cef'g	1	0	0,49090909	0,25966851	1	0,23124058
cff'	1	0	0,4969697	0,25966851	1	0,23730119
d	46	0	0,77575758	0,25966851	46	0,51608907
def	3	0	0,79393939	0,25966851	3	0,53427089
def'	3	0	0,81212121	0,25966851	3	0,5524527
df'	17	0	0,91515152	0,25966851	17	0,65548301
dff'	1	0	0,92121212	0,25966851	1	0,66154361
dfg	1	0	0,92727273	0,25966851	1	0,66760422
ef'	3	0	0,94545455	0,25966851	3	0,68578604
f'	8	0	0,99393939	0,25966851	8	0,73427089
ff'	1	0	1	0,25966851	1	0,74033149
cde	0	1	1	0,26519337	1	0,73480663
ce'	0	1	1	0,27071823	1	0,72928177
cee'	0	9	1	0,32044199	9	0,67955801
cee'f	0	3	1	0,33701657	3	0,66298343

cef	0	7	1	0,37569061	7	0,62430939
ce'f	0	13	1	0,44751381	13	0,55248619
cefg	0	2	1	0,45856354	2	0,54143646
ceg	0	2	1	0,46961326	2	0,53038674
ce'g	0	2	1	0,48066298	2	0,51933702
cg	0	1	1	0,48618785	1	0,51381215
deff'	0	1	1	0,49171271	1	0,50828729
defg	0	1	1	0,49723757	1	0,50276243
deg	0	1	1	0,50276243	1	0,49723757
e'	0	5	1	0,53038674	5	0,46961326
ee'	0	9	1	0,5801105	9	0,4198895
ee'f	0	6	1	0,61325967	6	0,38674033
ee'f'	0	2	1	0,62430939	2	0,37569061
ee'fg	0	3	1	0,64088398	3	0,35911602
ee'g	0	3	1	0,65745856	3	0,34254144
ef	0	27	1	0,80662983	27	0,19337017
e'f	0	25	1	0,94475138	25	0,05524862
e'f'	0	1	1	0,95027624	1	0,04972376
efg	0	1	1	0,9558011	1	0,0441989
e'fg	0	2	1	0,96685083	2	0,03314917
eg	0	1	1	0,97237569	1	0,02762431
e'g	0	3	1	0,98895028	3	0,01104972
fg	0	1	1	0,99447514	1	0,00552486
f'g	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	118
n1	59
n2	59
S1	165
S2	181
m1	2,797
m2	3,068
Dk	0,74
Kd	43
pD	
D critical 0.05	0,125
D critical 0.01	0,15
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif		Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
	observé7992	observé7990				
b	8	0	0,04733728	0	8	0,04733728
bc	7	0	0,0887574	0	7	0,0887574
bcd	122	0	0,81065089	0	122	0,81065089
bd	26	0	0,96449704	0	26	0,96449704
cd	1	0	0,9704142	0	1	0,9704142
d	5	0	1	0	5	1
c	0	4	1	0,02162162	4	0,97837838
cd'	0	1	1	0,02702703	1	0,97297297
cd'e	0	1	1	0,03243243	1	0,96756757
cd'f	0	1	1	0,03783784	1	0,96216216
cd'f'	0	2	1	0,04864865	2	0,95135135
ce	0	1	1	0,05405405	1	0,94594595
cefg	0	1	1	0,05945946	1	0,94054054
cf	0	1	1	0,06486486	1	0,93513514
cf'	0	5	1	0,09189189	5	0,90810811
cff'	0	1	1	0,0972973	1	0,9027027
d'	0	31	1	0,26486486	31	0,73513514
dd'e	0	1	1	0,27027027	1	0,72972973
de	0	1	1	0,27567568	1	0,72432432
d'e	0	33	1	0,45405405	33	0,54594595
d'ef	0	12	1	0,51891892	12	0,48108108
d'ef'	0	2	1	0,52972973	2	0,47027027
d'eff'	0	1	1	0,53513514	1	0,46486486
d'ef'h	0	1	1	0,54054054	1	0,45945946
d'f	0	7	1	0,57837838	7	0,42162162
df'	0	1	1	0,58378378	1	0,41621622
d'f'	0	7	1	0,62162162	7	0,37837838
d'ff'	0	2	1	0,63243243	2	0,36756757
d'f'h	0	1	1	0,63783784	1	0,36216216
e	0	29	1	0,79459459	29	0,20540541
ef	0	9	1	0,84324324	9	0,15675676
ef'	0	8	1	0,88648649	8	0,11351351
eff'	0	1	1	0,89189189	1	0,10810811
efg	0	1	1	0,8972973	1	0,1027027
eh	0	1	1	0,9027027	1	0,0972973
f	0	9	1	0,95135135	9	0,04864865
f'	0	6	1	0,98378378	6	0,01621622
ff'h	0	1	1	0,98918919	1	0,01081081
fg	0	1	1	0,99459459	1	0,00540541
gh	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	80
n1	40
n2	40
S1	169
S2	185
m1	4,225
m2	4,625
Dk	1

Kd 40  
 pD  
 D critical 0.05 0,152  
 D critical 0.01 0,182  
 pKd p < 0.01  
 Kd critical 0.05  
 Kd critical 0.01

Phéno	effectif observé7992	effectif observé8477	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
d	5	46	0,0295858	0,27878788	41	0,24920208
b	8	0	0,07692308	0,27878788	8	0,2018648
bc	7	0	0,1183432	0,27878788	7	0,16044468
bcd	122	0	0,84023669	0,27878788	122	0,56144881
bd	26	0	0,99408284	0,27878788	26	0,71529496
cd	1	0	1	0,27878788	1	0,72121212
ad	0	2	1	0,29090909	2	0,70909091
adf	0	1	1	0,2969697	1	0,7030303
c	0	1	1	0,3030303	1	0,6969697
c'd	0	1	1	0,30909091	1	0,69090909
cdef	0	1	1	0,31515152	1	0,68484848
cdef'	0	4	1	0,33939394	4	0,66060606
cdf	0	5	1	0,36969697	5	0,63030303
cdf'	0	1	1	0,37575758	1	0,62424242
c'df'	0	1	1	0,38181818	1	0,61818182
cdff'	0	16	1	0,47878788	16	0,52121212
c'dff'	0	1	1	0,48484848	1	0,51515152
ce	0	2	1	0,4969697	2	0,5030303
cef'	0	3	1	0,51515152	3	0,48484848
cef'g	0	1	1	0,52121212	1	0,47878788
cf	0	3	1	0,53939394	3	0,46060606
cf'	0	5	1	0,56969697	5	0,43030303
cff'	0	1	1	0,57575758	1	0,42424242
de	0	3	1	0,59393939	3	0,40606061
def	0	3	1	0,61212121	3	0,38787879
def'	0	3	1	0,63030303	3	0,36969697
df	0	15	1	0,72121212	15	0,27878788
df'	0	17	1	0,82424242	17	0,17575758
dff'	0	1	1	0,83030303	1	0,16969697
dfg	0	1	1	0,83636364	1	0,16363636
e	0	8	1	0,88484848	8	0,11515152
ef'	0	3	1	0,9030303	3	0,0969697
eff'	0	3	1	0,92121212	3	0,07878788
f	0	4	1	0,94545455	4	0,05454545
f'	0	8	1	0,99393939	8	0,00606061
ff'	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	72
n1	36
n2	36
S1	169
S2	165
m1	4,694
m2	4,583
Dk	0,721
Kd	25
pD	
D critical 0.05	0,1605
D critical 0.01	0,192
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif		Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
	observé7990	observé8477				
c	4	1	0,02162162	0,00598802	3	0,0156336
ce	1	2	0,02702703	0,01796407	1	0,00906296
cf	1	3	0,03243243	0,03592814	2	0,00349571
cff'	1	1	0,03783784	0,04191617	0	0,00407833
de	1	3	0,04324324	0,05988024	2	0,016637
df'	1	17	0,04864865	0,16167665	16	0,113028
e	29	8	0,20540541	0,20958084	21	0,00417543
ef'	8	3	0,24864865	0,22754491	5	0,02110374
eff'	1	3	0,25405405	0,24550898	2	0,00854507
f	9	4	0,3027027	0,26946108	5	0,03324162
f'	6	8	0,33513514	0,31736527	2	0,01776987
ad	0	2	0,33513514	0,32934132	2	0,00579382
adf	0	1	0,33513514	0,33532934	1	0,00019421
c'd	0	1	0,33513514	0,34131737	1	0,00618223
cdef	0	1	0,33513514	0,34730539	1	0,01217025
cdef'	0	4	0,33513514	0,37125749	4	0,03612235
cdf	0	5	0,33513514	0,4011976	5	0,06606247
cdf'	0	1	0,33513514	0,40718563	1	0,07205049
c'df'	0	1	0,33513514	0,41317365	1	0,07803852
cdff'	0	16	0,33513514	0,50898204	16	0,1738469
c'dff'	0	1	0,33513514	0,51497006	1	0,17983492
cef'	0	3	0,33513514	0,53293413	3	0,197799
cef'g	0	1	0,33513514	0,53892216	1	0,20378702
cf'	0	5	0,33513514	0,56886228	5	0,23372714
d	0	46	0,33513514	0,84431138	46	0,50917624
def	0	3	0,33513514	0,86227545	3	0,52714031
def'	0	3	0,33513514	0,88023952	3	0,54510439
df'	0	17	0,33513514	0,98203593	17	0,64690079
dff'	0	1	0,33513514	0,98802395	1	0,65288882
dfg	0	1	0,33513514	0,99401198	1	0,65887684
ff'	0	1	0,33513514	1	1	0,66486486
cd'	1	0	0,34054054	1	1	0,65945946
cd'e	1	0	0,34594595	1	1	0,65405405
cd'f	1	0	0,35135135	1	1	0,64864865
cd'f'	2	0	0,36216216	1	2	0,63783784

cefg	1	0	0,36756757	1	1	0,63243243
cf'	5	0	0,39459459	1	5	0,60540541
d'	31	0	0,56216216	1	31	0,43783784
dd'e	1	0	0,56756757	1	1	0,43243243
d'e	33	0	0,74594595	1	33	0,25405405
d'ef	12	0	0,81081081	1	12	0,18918919
d'ef'	2	0	0,82162162	1	2	0,17837838
d'eff'	1	0	0,82702703	1	1	0,17297297
d'ef'h	1	0	0,83243243	1	1	0,16756757
d'f	7	0	0,87027027	1	7	0,12972973
d'f'	7	0	0,90810811	1	7	0,09189189
d'ff'	2	0	0,91891892	1	2	0,08108108
d'f'h	1	0	0,92432432	1	1	0,07567568
ef	9	0	0,97297297	1	9	0,02702703
efg	1	0	0,97837838	1	1	0,02162162
eh	1	0	0,98378378	1	1	0,01621622
ff'h	1	0	0,98918919	1	1	0,01081081
fg	1	0	0,99459459	1	1	0,00540541
gh	1	0	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	108
n1	54
n2	54
S1	185
S2	167
m1	3,426
m2	3,093
Dk	0,665
Kd	35
pD	
D critical 0.05	0,131
D critical 0.01	0,157
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	



#### 4/ OSRB :

Phéno	effectif observé9198	effectif observé8007	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
be	3	4	0,02068966	0,02424242	1	0,00355277
ac	2	14	0,03448276	0,10909091	12	0,07460815
cd	2	2	0,04827586	0,12121212	0	0,07293626
ce	8	4	0,10344828	0,14545455	4	0,04200627
eg	1	1	0,11034483	0,15151515	0	0,04117032
fg	1	1	0,11724138	0,15757576	0	0,04033438
ace	1	18	0,12413793	0,26666667	17	0,14252874
bcd	10	1	0,19310345	0,27272727	9	0,07962382
bce	43	3	0,48965517	0,29090909	40	0,19874608
bcf	4	2	0,51724138	0,3030303	2	0,21421108
bcg	2	1	0,53103448	0,30909091	1	0,22194357
bde	1	1	0,53793103	0,31515152	0	0,22277952
bef	1	5	0,54482759	0,34545455	4	0,19937304
bcde	5	1	0,57931034	0,35151515	4	0,22779519
bcdf	3	1	0,6	0,35757576	2	0,24242424
bcef	2	3	0,6137931	0,37575758	1	0,23803553
bdef	2	3	0,62758621	0,39393939	1	0,23364681
e	4	3	0,65517241	0,41212121	1	0,2430512
c	3	1	0,67586207	0,41818182	2	0,25768025
bc	19	0	0,80689655	0,41818182	19	0,38871473
bd	1	0	0,8137931	0,41818182	1	0,39561129
bdf	1	0	0,82068966	0,41818182	1	0,40250784
bdg	1	0	0,82758621	0,41818182	1	0,40940439
beg	5	0	0,86206897	0,41818182	5	0,44388715
cdg	2	0	0,87586207	0,41818182	2	0,45768025
bcdg	7	0	0,92413793	0,41818182	7	0,50595611
bceg	6	0	0,96551724	0,41818182	6	0,54733542
bcfg	1	0	0,97241379	0,41818182	1	0,55423197
cdeg	2	0	0,9862069	0,41818182	2	0,56802508
cdfg	2	0	1	0,41818182	2	0,58181818
a	0	4	1	0,44242424	4	0,55757576
g	0	1	1	0,44848485	1	0,55151515
ad	0	2	1	0,46060606	2	0,53939394
ae	0	27	1	0,62424242	27	0,37575758
af	0	5	1	0,65454545	5	0,34545455
bf	0	3	1	0,67272727	3	0,32727273
ef	0	2	1	0,68484848	2	0,31515152
acd	0	4	1	0,70909091	4	0,29090909
acf	0	3	1	0,72727273	3	0,27272727
acg	0	3	1	0,74545455	3	0,25454545
ade	0	1	1	0,75151515	1	0,24848485
adf	0	1	1	0,75757576	1	0,24242424
aef	0	6	1	0,79393939	6	0,20606061
aeg	0	7	1	0,83636364	7	0,16363636
bf	0	1	1	0,84242424	1	0,15757576
cdf	0	1	1	0,84848485	1	0,15151515
cef	0	1	1	0,85454545	1	0,14545455
ceg	0	1	1	0,86060606	1	0,13939394
efg	0	1	1	0,86666667	1	0,13333333
cde	0	1	1	0,87272727	1	0,12727273
acde	0	2	1	0,88484848	2	0,11515152
acdf	0	4	1	0,90909091	4	0,09090909
acef	0	5	1	0,93939394	5	0,06060606

aceg	0	3	1	0,95757576	3	0,04242424
adeg	0	1	1	0,96363636	1	0,03636364
aefg	0	2	1	0,97575758	2	0,02424242
cdef	0	3	1	0,99393939	3	0,00606061
cefg	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	116
n1	58
n2	58
S1	145
S2	165
m1	2,5
m2	2,845
Dk	0,582
Kd	33
pD	
D critical 0.05	0,1265
D critical 0.01	0,1515
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7992	effectif observé8007	F <sub>n1</sub> (x)	G <sub>n2</sub> (x)	diff.	D n1,n2
bcd	1	1	0,00641026	0,00606061	0	0,00034965
bce	57	3	0,37179487	0,02424242	54	0,34755245
cef	2	1	0,38461538	0,03030303	1	0,35431235
bcef	3	3	0,40384615	0,04848485	0	0,35536131
bceg	1	0	0,41025641	0,04848485	1	0,36177156
b	6	0	0,44871795	0,04848485	6	0,4002331
b'	3	0	0,46794872	0,04848485	3	0,41946387
d	1	0	0,47435897	0,04848485	1	0,42587413
e	3	0	0,49358974	0,04848485	3	0,4451049
ab	1	0	0,5	0,04848485	1	0,45151515
af	1	0	0,50641026	0,04848485	1	0,45792541
ae	1	0	0,51282051	0,04848485	1	0,46433566

bc	23	0	0,66025641	0,04848485	23	0,61177156
b'c	1	0	0,66666667	0,04848485	1	0,61818182
be	37	0	0,90384615	0,04848485	37	0,85536131
b'e	7	0	0,94871795	0,04848485	7	0,9002331
bf	1	0	0,95512821	0,04848485	1	0,90664336
abc	2	0	0,96794872	0,04848485	2	0,91946387
abe	3	0	0,98717949	0,04848485	3	0,93869464
abce	1	0	0,99358974	0,04848485	1	0,9451049
abeg	1	0	1	0,04848485	1	0,95151515
a	0	4	1	0,07272727	4	0,92727273
c	0	1	1	0,07878788	1	0,92121212
e	0	3	1	0,0969697	3	0,9030303
g	0	1	1	0,1030303	1	0,8969697
ac	0	14	1	0,18787879	14	0,81212121
ad	0	2	1	0,2	2	0,8
ae	0	27	1	0,36363636	27	0,63636364
af	0	5	1	0,39393939	5	0,60606061
be	0	4	1	0,41818182	4	0,58181818
bf	0	3	1	0,43636364	3	0,56363636
cd	0	2	1	0,44848485	2	0,55151515
ce	0	4	1	0,47272727	4	0,52727273
ef	0	2	1	0,48484848	2	0,51515152
eg	0	1	1	0,49090909	1	0,50909091
fg	0	1	1	0,4969697	1	0,5030303
acd	0	4	1	0,52121212	4	0,47878788
ace	0	18	1	0,63030303	18	0,36969697
acf	0	3	1	0,64848485	3	0,35151515
acg	0	3	1	0,66666667	3	0,33333333
ade	0	1	1	0,67272727	1	0,32727273
adf	0	1	1	0,67878788	1	0,32121212
aef	0	6	1	0,71515152	6	0,28484848
aeg	0	7	1	0,75757576	7	0,24242424
bcf	0	2	1	0,76969697	2	0,23030303
bcg	0	1	1	0,77575758	1	0,22424242
bde	0	1	1	0,78181818	1	0,21818182
bef	0	5	1	0,81212121	5	0,18787879
bfg	0	1	1	0,81818182	1	0,18181818
cdf	0	1	1	0,82424242	1	0,17575758
ceg	0	1	1	0,83030303	1	0,16969697
efg	0	1	1	0,83636364	1	0,16363636
cde	0	1	1	0,84242424	1	0,15757576
acde	0	2	1	0,85454545	2	0,14545455
acdf	0	4	1	0,87878788	4	0,12121212
acef	0	5	1	0,90909091	5	0,09090909
aceg	0	3	1	0,92727273	3	0,07272727
adeg	0	1	1	0,93333333	1	0,06666667
aefg	0	2	1	0,94545455	2	0,05454545
bcde	0	1	1	0,95151515	1	0,04848485
bcdf	0	1	1	0,95757576	1	0,04242424
bdef	0	3	1	0,97575758	3	0,02424242
cdef	0	3	1	0,99393939	3	0,00606061
cefg	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	128
n1	64
n2	64
S1	156
S2	165
m1	2,438
m2	2,578
Dk	0,952
Kd	60
pD	
D critical 0.05	0,12
D critical 0.01	0,144
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7990	effectif observé8007	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
a	2	4	0,01612903	0,02424242	2	0,00811339
e	2	3	0,03225806	0,04242424	1	0,01016618
g	5	1	0,07258065	0,04848485	4	0,0240958
ae	18	27	0,21774194	0,21212121	9	0,00562072
af	1	5	0,22580645	0,24242424	4	0,01661779
ac	2	14	0,24193548	0,32727273	12	0,08533724
be	20	4	0,40322581	0,35151515	16	0,05171065
cd	1	2	0,41129032	0,36363636	1	0,04765396
ce	2	4	0,42741935	0,38787879	2	0,03954057
eg	3	1	0,4516129	0,39393939	2	0,05767351
acd	1	4	0,45967742	0,41818182	3	0,0414956
ace	4	18	0,49193548	0,52727273	14	0,03533724
aeg	2	7	0,50806452	0,56969697	5	0,06163245
bce	11	3	0,59677419	0,58787879	8	0,00889541
bcg	1	1	0,60483871	0,59393939	0	0,01089932
bde	1	1	0,61290323	0,6	0	0,01290323
bef	2	5	0,62903226	0,63030303	3	0,00127077
bfq	3	1	0,65322581	0,63636364	2	0,01686217
ceg	1	1	0,66129032	0,64242424	0	0,01886608
adeg	1	1	0,66935484	0,64848485	0	0,02086999
b	2	0	0,68548387	0,64848485	2	0,03699902
d	5	0	0,72580645	0,64848485	5	0,0773216
bc	5	0	0,76612903	0,64848485	5	0,11764418
bf	3	0	0,79032258	0,64848485	3	0,14183773
bg	1	0	0,7983871	0,64848485	1	0,14990225
dg	4	0	0,83064516	0,64848485	4	0,18216031
bd	1	0	0,83870968	0,64848485	1	0,19022483
ab	1	0	0,84677419	0,64848485	1	0,19828935
abe	4	0	0,87903226	0,64848485	4	0,23054741
abf	1	0	0,88709677	0,64848485	1	0,23861193
bdf	1	0	0,89516129	0,64848485	1	0,24667644
beg	4	0	0,92741935	0,64848485	4	0,27893451
cdg	1	0	0,93548387	0,64848485	1	0,28699902
cfg	1	0	0,94354839	0,64848485	1	0,29506354

abce	5	0	0,98387097	0,64848485	5	0,33538612
abfg	1	0	0,99193548	0,64848485	1	0,34345064
adef	1	0	1	0,64848485	1	0,35151515
c	0	1	1	0,65454545	1	0,34545455
ad	0	2	1	0,66666667	2	0,33333333
bf	0	3	1	0,68484848	3	0,31515152
ef	0	2	1	0,6969697	2	0,3030303
fg	0	1	1	0,7030303	1	0,2969697
acf	0	3	1	0,72121212	3	0,27878788
acg	0	3	1	0,73939394	3	0,26060606
ade	0	1	1	0,74545455	1	0,25454545
adf	0	1	1	0,75151515	1	0,24848485
aef	0	6	1	0,78787879	6	0,21212121
bcd	0	1	1	0,79393939	1	0,20606061
bcf	0	2	1	0,80606061	2	0,19393939
cdf	0	1	1	0,81212121	1	0,18787879
cef	0	1	1	0,81818182	1	0,18181818
efg	0	1	1	0,82424242	1	0,17575758
cde	0	1	1	0,83030303	1	0,16969697
acde	0	2	1	0,84242424	2	0,15757576
acdf	0	4	1	0,86666667	4	0,13333333
acef	0	5	1	0,8969697	5	0,1030303
aceg	0	3	1	0,91515152	3	0,08484848
aefg	0	2	1	0,92727273	2	0,07272727
bcde	0	1	1	0,93333333	1	0,06666667
bcdf	0	1	1	0,93939394	1	0,06060606
bcef	0	3	1	0,95757576	3	0,04242424
bdef	0	3	1	0,97575758	3	0,02424242
cdef	0	3	1	0,99393939	3	0,00606061
cefg	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	128
n1	64
n2	64
S1	124
S2	165
m1	1,938
m2	2,578
Dk	0,352
Kd	22
pD	
D critical 0.05	0,12
D critical 0.01	0,144
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif		Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
	observé8477	effectif observé8007				
ae	1	27	0,01886792	0,14754098	26	0,12867306
be	1	4	0,03773585	0,16939891	3	0,13166306
bf	1	3	0,05660377	0,18579235	2	0,12918858
ace	1	18	0,0754717	0,28415301	17	0,20868131
bce	1	3	0,09433962	0,30054645	2	0,20620683
bcf	2	2	0,13207547	0,31147541	0	0,17939994
a	2	4	0,16981132	0,33333333	2	0,16352201
b	2	0	0,20754717	0,33333333	2	0,12578616
bc	26	0	0,69811321	0,33333333	26	0,36477987
ac	6	0	0,81132075	0,33333333	6	0,47798742
ab	3	0	0,86792453	0,33333333	3	0,53459119
abc	6	0	0,98113208	0,33333333	6	0,64779874
abd	1	0		0,33333333	1	0,66666667
c	0	1		0,33879781	1	0,66120219
e	0	3		0,35519126	3	0,64480874
g	0	1		0,36065574	1	0,63934426
ac	0	14		0,43715847	14	0,56284153
ad	0	2		0,44808743	2	0,55191257
af	0	5		0,47540984	5	0,52459016
cd	0	2		0,4863388	2	0,5136612
ce	0	4		0,50819672	4	0,49180328
ef	0	2		0,51912568	2	0,48087432
eg	0	1		0,52459016	1	0,47540984
fg	0	1		0,53005464	1	0,46994536
acd	0	4		0,55191257	4	0,44808743
ace	0	18		0,65027322	18	0,34972678
acf	0	3		0,66666667	3	0,33333333
acg	0	3		0,68306011	3	0,31693989
ade	0	1		0,68852459	1	0,31147541
adf	0	1		0,69398907	1	0,30601093
aef	0	6		0,72677596	6	0,27322404
aeg	0	7		0,76502732	7	0,23497268
bcd	0	1		0,7704918	1	0,2295082
bcg	0	1		0,77595628	1	0,22404372
bde	0	1		0,78142077	1	0,21857923
bef	0	5		0,80874317	5	0,19125683
bfg	0	1		0,81420765	1	0,18579235
cdf	0	1		0,81967213	1	0,18032787
cef	0	1		0,82513661	1	0,17486339
ceg	0	1		0,83060109	1	0,16939891
efg	0	1		0,83606557	1	0,16393443
cde	0	1		0,84153005	1	0,15846995
acde	0	2		0,85245902	2	0,14754098
acdf	0	4		0,87431694	4	0,12568306
acef	0	5		0,90163934	5	0,09836066
aceg	0	3		0,91803279	3	0,08196721
adeg	0	1		0,92349727	1	0,07650273
aefg	0	2		0,93442623	2	0,06557377
bcde	0	1		0,93989071	1	0,06010929
bcdf	0	1		0,94535519	1	0,05464481
bcef	0	3		0,96174863	3	0,03825137
bdef	0	3		0,97814208	3	0,02185792
cdef	0	3		0,99453552	3	0,00546448

cefg 0 1 1 1 1 0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	108
n1	54
n2	54
S1	53
S2	183
m1	0,981
m2	3,389
Dk	0,667
Kd	36
pD	
D critical 0.05	0,131
D critical 0.01	0,157
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7992	effectif observé9198	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
e	3	4	0,01829268	0,02758621	1	0,00929352
be	37	3	0,24390244	0,04827586	34	0,19562658
bcd	1	10	0,25	0,11724138	9	0,13275862
bce	57	43	0,59756098	0,4137931	14	0,18376787
bcf	8	4	0,64634146	0,44137931	4	0,20496215
bcef	3	2	0,66463415	0,45517241	1	0,20946173
bceg	1	6	0,67073171	0,49655172	5	0,17417998
b	6	0	0,70731707	0,49655172	6	0,21076535
b'	3	0	0,72560976	0,49655172	3	0,22905803
d	1	0	0,73170732	0,49655172	1	0,23515559
ab	1	0	0,73780488	0,49655172	1	0,24125315
af	1	0	0,74390244	0,49655172	1	0,24735071
ae	1	0	0,75	0,49655172	1	0,25344828
bc	23	0	0,8902439	0,49655172	23	0,39369218
b'c	1	0	0,89634146	0,49655172	1	0,39978974
b'e	7	0	0,93902439	0,49655172	7	0,44247267
bf	1	0	0,94512195	0,49655172	1	0,44857023
abc	2	0	0,95731707	0,49655172	2	0,46076535
abe	3	0	0,97560976	0,49655172	3	0,47905803
cef	2	0	0,98780488	0,49655172	2	0,49125315
abce	1	0	0,99390244	0,49655172	1	0,49735071
abeg	1	0	1	0,49655172	1	0,50344828
bc	0	19	1	0,62758621	19	0,37241379
ac	0	2	1	0,64137931	2	0,35862069
bd	0	1	1	0,64827586	1	0,35172414
cd	0	2	1	0,66206897	2	0,33793103
ce	0	8	1	0,71724138	8	0,28275862
eg	0	1	1	0,72413793	1	0,27586207
fg	0	1	1	0,73103448	1	0,26896552

ace	0	1	1	0,73793103	1	0,26206897
bcg	0	2	1	0,75172414	2	0,24827586
bde	0	1	1	0,75862069	1	0,24137931
bdf	0	1	1	0,76551724	1	0,23448276
bdg	0	1	1	0,77241379	1	0,22758621
bef	0	1	1	0,77931034	1	0,22068966
beg	0	5	1	0,8137931	5	0,1862069
cdg	0	2	1	0,82758621	2	0,17241379
bcde	0	5	1	0,86206897	5	0,13793103
bcdf	0	3	1	0,88275862	3	0,11724138
bcdg	0	7	1	0,93103448	7	0,06896552
bcfg	0	1	1	0,93793103	1	0,06206897
bdef	0	2	1	0,95172414	2	0,04827586
cdeg	0	2	1	0,96551724	2	0,03448276
cdfg	0	2	1	0,97931034	2	0,02068966
c	0	3	1	1	3	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	90
n1	45
n2	45
S1	164
S2	145
m1	3,644
m2	3,222
Dk	0,503
Kd	22
pD	
D critical 0.05	0,1435
D critical 0.01	0,172
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7990	effectif observé9198	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
e	2	4	0,01612903	0,02758621	2	0,01145717
bc	5	19	0,05645161	0,15862069	14	0,10216908
ac	2	2	0,07258065	0,17241379	0	0,09983315
be	20	3	0,23387097	0,19310345	17	0,04076752
cd	1	2	0,24193548	0,20689655	1	0,03503893
ce	2	8	0,25806452	0,26206897	6	0,00400445
eg	3	1	0,28225806	0,26896552	2	0,01329255
ace	4	1	0,31451613	0,27586207	3	0,03865406
bce	11	43	0,40322581	0,57241379	32	0,16918799
bcg	1	2	0,41129032	0,5862069	1	0,17491657
bde	1	1	0,41935484	0,59310345	0	0,17374861
bdf	1	1	0,42741935	0,6	0	0,17258065
bef	2	1	0,44354839	0,60689655	1	0,16334816
beg	4	5	0,47580645	0,64137931	1	0,16557286
cdg	1	2	0,48387097	0,65517241	1	0,17130145



a	2	0	0,5	0,65517241	2	0,15517241
b	2	0	0,51612903	0,65517241	2	0,13904338
d	5	0	0,55645161	0,65517241	5	0,0987208
g	5	0	0,59677419	0,65517241	5	0,05839822
ae	18	0	0,74193548	0,65517241	18	0,08676307
af	1	0	0,75	0,65517241	1	0,09482759
bf	3	0	0,77419355	0,65517241	3	0,11902113
bg	1	0	0,78225806	0,65517241	1	0,12708565
dg	4	0	0,81451613	0,65517241	4	0,15934372
bd	1	0	0,82258065	0,65517241	1	0,16740823
ab	1	0	0,83064516	0,65517241	1	0,17547275
abe	4	0	0,86290323	0,65517241	4	0,20773081
abf	1	0	0,87096774	0,65517241	1	0,21579533
acd	1	0	0,87903226	0,65517241	1	0,22385984
aeg	2	0	0,89516129	0,65517241	2	0,23998888
bf <sub>g</sub>	3	0	0,91935484	0,65517241	3	0,26418242
ceg	1	0	0,92741935	0,65517241	1	0,27224694
cf <sub>g</sub>	1	0	0,93548387	0,65517241	1	0,28031146
abce	5	0	0,97580645	0,65517241	5	0,32063404
abf <sub>g</sub>	1	0	0,98387097	0,65517241	1	0,32869855
ade <sub>f</sub>	1	0	0,99193548	0,65517241	1	0,33676307
ade <sub>g</sub>	1	0	1	0,65517241	1	0,34482759
bd	0	1	1	0,66206897	1	0,33793103
fg	0	1	1	0,66896552	1	0,33103448
bcd	0	10	1	0,73793103	10	0,26206897
bc <sub>f</sub>	0	4	1	0,76551724	4	0,23448276
bd <sub>g</sub>	0	1	1	0,77241379	1	0,22758621
bcde	0	5	1	0,80689655	5	0,19310345
bcd <sub>f</sub>	0	3	1	0,82758621	3	0,17241379
bcd <sub>g</sub>	0	7	1	0,87586207	7	0,12413793
bce <sub>f</sub>	0	2	1	0,88965517	2	0,11034483
bce <sub>g</sub>	0	6	1	0,93103448	6	0,06896552
bcf <sub>g</sub>	0	1	1	0,93793103	1	0,06206897
bde <sub>f</sub>	0	2	1	0,95172414	2	0,04827586
cde <sub>g</sub>	0	2	1	0,96551724	2	0,03448276
cdf <sub>g</sub>	0	2	1	0,97931034	2	0,02068966
c	0	3	1	1	3	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	104
n1	52
n2	52
S1	124
S2	145
m1	2,385
m2	2,788
Dk	0,345
Kd	17
pD	
D critical 0.05	0,1335
D critical 0.01	0,16
pKd	p < 0.01

Kd critical 0.05

Kd critical 0.01

Phéno	effectif observé8477	effectif observé9198	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
bc	26	19	0,63414634	0,13103448	7	0,50311186
ac	6	2	0,7804878	0,14482759	4	0,63566022
be	1	3	0,80487805	0,16551724	2	0,63936081
ace	1	1	0,82926829	0,17241379	0	0,6568545
bce	1	43	0,85365854	0,46896552	42	0,38469302
bcf	2	4	0,90243902	0,49655172	2	0,4058873
a	2	0	0,95121951	0,49655172	2	0,45466779
b	2	0		1	2	0,50344828
bd	0	1		1	1	0,49655172
cd	0	2		1	2	0,48275862
ce	0	8		1	8	0,42758621
eg	0	1		1	1	0,42068966
fg	0	1		1	1	0,4137931
bcd	0	10		1	10	0,34482759
bcg	0	2		1	2	0,33103448
bde	0	1		1	1	0,32413793
bdf	0	1		1	1	0,31724138
bdg	0	1		1	1	0,31034483
bef	0	1		1	1	0,30344828
beg	0	5		1	5	0,26896552
cdg	0	2		1	2	0,25517241
bcde	0	5		1	5	0,22068966
bcdf	0	3		1	3	0,2
bcdg	0	7		1	7	0,15172414
bcef	0	2		1	2	0,13793103
bceg	0	6		1	6	0,09655172
bcfg	0	1		1	1	0,08965517
bdef	0	2		1	2	0,07586207
cdeg	0	2		1	2	0,06206897
cdfg	0	2		1	2	0,04827586
e	0	4		1	4	0,02068966
c	0	3		1	3	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	64
n1	32
n2	32
S1	41
S2	145
m1	1,281
m2	4,531
Dk	0,657
Kd	21
pD	
D critical 0.05	0,17

D critical 0.01 0,204  
 pKd p < 0.01  
 Kd critical 0.05  
 Kd critical 0.01

---

Phéno	effectif observé7990	effectif observé7992	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
b	2	6	0,01612903	0,03658537	4	0,02045633
d	5	1	0,05645161	0,04268293	4	0,01376869
e	2	3	0,07258065	0,06097561	1	0,01160504
ae	18	1	0,21774194	0,06707317	17	0,15066876
bc	5	23	0,25806452	0,20731707	18	0,05074744
af	1	1	0,26612903	0,21341463	0	0,0527144
be	20	37	0,42741935	0,43902439	17	0,01160504
bf	3	1	0,4516129	0,44512195	2	0,00649095
ab	1	1	0,45967742	0,45121951	0	0,00845791
abe	4	3	0,49193548	0,4695122	1	0,02242329
bce	11	57	0,58064516	0,81707317	46	0,23642801
a	2	0	0,59677419	0,81707317	2	0,22029898
g	5	0	0,63709677	0,81707317	5	0,1799764
ac	2	0	0,65322581	0,81707317	2	0,16384736
bg	1	0	0,66129032	0,81707317	1	0,15578285
cd	1	0	0,66935484	0,81707317	1	0,14771833
ce	2	0	0,68548387	0,81707317	2	0,1315893
dg	4	0	0,71774194	0,81707317	4	0,09933124
eg	3	0	0,74193548	0,81707317	3	0,07513769
bd	1	0	0,75	0,81707317	1	0,06707317
abf	1	0	0,75806452	0,81707317	1	0,05900865
acd	1	0	0,76612903	0,81707317	1	0,05094414
ace	4	0	0,7983871	0,81707317	4	0,01868607
aeg	2	0	0,81451613	0,81707317	2	0,00255704
bcg	1	0	0,82258065	0,81707317	1	0,00550747
bde	1	0	0,83064516	0,81707317	1	0,01357199
bdf	1	0	0,83870968	0,81707317	1	0,02163651
bef	2	0	0,85483871	0,81707317	2	0,03776554
beg	4	0	0,88709677	0,81707317	4	0,0700236
bfg	3	0	0,91129032	0,81707317	3	0,09421715
cdg	1	0	0,91935484	0,81707317	1	0,10228167
ceg	1	0	0,92741935	0,81707317	1	0,11034618
cfg	1	0	0,93548387	0,81707317	1	0,1184107
abfg	1	0	0,94354839	0,81707317	1	0,12647522
adef	1	0	0,9516129	0,81707317	1	0,13453973
adeg	1	0	0,95967742	0,81707317	1	0,14260425
abce	5	0	1	0,81707317	5	0,18292683
b'	0	3	1	0,83536585	3	0,16463415
b'c	0	1	1	0,84146341	1	0,15853659
b'e	0	7	1	0,88414634	7	0,11585366
abc	0	2	1	0,89634146	2	0,10365854
bcd	0	1	1	0,90243902	1	0,09756098
bcf	0	8	1	0,95121951	8	0,04878049
cef	0	2	1	0,96341463	2	0,03658537
abce	0	1	1	0,9695122	1	0,0304878
abeg	0	1	1	0,97560976	1	0,02439024

bcef	0	3	1	0,99390244	3	0,00609756
bceg	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	96
n1	48
n2	48
S1	124
S2	164
m1	2,583
m2	3,417
Dk	0,236
Kd	11
pD	
D critical 0.05	0,139
D critical 0.01	0,1665
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé8477	effectif observé7992	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
bc	26	23	0,49056604	0,1402439	3	0,35032214
ae	1	1	0,50943396	0,14634146	0	0,3630925
ab	3	1	0,56603774	0,15243902	2	0,41359871
be	1	37	0,58490566	0,37804878	36	0,20685688
bf	1	1	0,60377358	0,38414634	0	0,21962724
abc	6	2	0,71698113	0,39634146	4	0,32063967
bce	1	57	0,73584906	0,74390244	56	0,00805338
bcf	2	8	0,77358491	0,79268293	6	0,01909802
b	2	6	0,81132075	0,82926829	4	0,01794754
ac	6	0	0,9245283	0,82926829	6	0,09526001
abd	1	0	0,94339623	0,82926829	1	0,11412793
ace	1	0	0,96226415	0,82926829	1	0,13299586
a	2	0	1	0,82926829	2	0,17073171
b'	0	3	1	0,84756098	3	0,15243902
d	0	1	1	0,85365854	1	0,14634146
e	0	3	1	0,87195122	3	0,12804878
af	0	1	1	0,87804878	1	0,12195122
b'c	0	1	1	0,88414634	1	0,11585366
b'e	0	7	1	0,92682927	7	0,07317073
abe	0	3	1	0,94512195	3	0,05487805
bcd	0	1	1	0,95121951	1	0,04878049
cef	0	2	1	0,96341463	2	0,03658537
abce	0	1	1	0,9695122	1	0,0304878
abeg	0	1	1	0,97560976	1	0,02439024
bcef	0	3	1	0,99390244	3	0,00609756
bceg	0	1	1	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for two samples**

N	52
n1	26
n2	26
S1	53
S2	164
m1	2,038
m2	6,308
Dk	0,414
Kd	10
pD	
D critical 0.05	0,1885
D critical 0.01	0,226
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

Phéno	effectif observé7990	effectif observé8477	Fn1 (x)	Gn2 (x)	diff.	D n1,n2
a	2	2	0,01612903	0,03773585	0	0,02160682
b	2	2	0,03225806	0,0754717	0	0,04321363
ae	18	1	0,17741935	0,09433962	17	0,08307973
bc	5	26	0,21774194	0,58490566	21	0,36716372
ac	2	6	0,23387097	0,69811321	4	0,46424224
be	20	1	0,39516129	0,71698113	19	0,32181984
bf	3	1	0,41935484	0,73584906	2	0,31649422
ab	1	3	0,42741935	0,79245283	2	0,36503348
ace	4	1	0,45967742	0,81132075	3	0,35164334
bce	11	1	0,5483871	0,83018868	10	0,28180158
d	5	0	0,58870968	0,83018868	5	0,241479
e	2	0	0,60483871	0,83018868	2	0,22534997
g	5	0	0,64516129	0,83018868	5	0,18502739
af	1	0	0,65322581	0,83018868	1	0,17696287
bg	1	0	0,66129032	0,83018868	1	0,16889836
cd	1	0	0,66935484	0,83018868	1	0,16083384
ce	2	0	0,68548387	0,83018868	2	0,14470481
dg	4	0	0,71774194	0,83018868	4	0,11244674
eg	3	0	0,74193548	0,83018868	3	0,0882532
bd	1	0	0,75	0,83018868	1	0,08018868
abe	4	0	0,78225806	0,83018868	4	0,04793061
abf	1	0	0,79032258	0,83018868	1	0,0398661
acd	1	0	0,7983871	0,83018868	1	0,03180158
aeg	2	0	0,81451613	0,83018868	2	0,01567255
bcg	1	0	0,82258065	0,83018868	1	0,00760803
bde	1	0	0,83064516	0,83018868	1	0,00045648
bdf	1	0	0,83870968	0,83018868	1	0,008521
bef	2	0	0,85483871	0,83018868	2	0,02465003
beg	4	0	0,88709677	0,83018868	4	0,05690809
bfq	3	0	0,91129032	0,83018868	3	0,08110164
cdg	1	0	0,91935484	0,83018868	1	0,08916616
ceg	1	0	0,92741935	0,83018868	1	0,09723068
cfg	1	0	0,93548387	0,83018868	1	0,10529519
abce	5	0	0,97580645	0,83018868	5	0,14561777

abfg	1	0	0,98387097	0,83018868	1	0,15368229
adef	1	0	0,99193548	0,83018868	1	0,1617468
adeg	1	0	1	0,83018868	1	0,16981132
abc	0	6	1	0,94339623	6	0,05660377
abd	0	1	1	0,96226415	1	0,03773585
bcf	0	2	1	1	2	0

---

***Kolmogorov-Smirnov for two samples***

---

N	80
n1	40
n2	40
S1	124
S2	53
m1	3,1
m2	1,325
Dk	0,464
Kd	18
pD	
D critical 0.05	0,152
D critical 0.01	0,182
pKd	p < 0.01
Kd critical 0.05	
Kd critical 0.01	

---

## ***Annexe 10***

1/ B1-B6 :

Phéno7990	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigenique	F <sub>n</sub> (x)	F (x)	d	
abdf	2				2	0,04347826	0,01156069	0,032	
abe	3			3		0,08695652	0,02890173	0,058	
abef	3				3	0,13043478	0,04624277	0,084	
adef	1				1	0,17391304	0,05202312	0,122	
bcd	1			1		0,2173913	0,05780347	0,16	
bcde	2				2	0,26086957	0,06936416	0,192	
bcdf	2				2	0,30434783	0,08092486	0,223	
bce	2			2		0,34782609	0,09248555	0,255	
bcef	5				5	0,39130435	0,12138728	0,27	
bcf	3			3		0,43478261	0,13872832	0,296	
bdef	15				15	0,47826087	0,22543353	0,253	
bef	1			1		0,52173913	0,23121387	0,291	
cde	2			2		0,56521739	0,24277457	0,322	
cdef	14				14	0,60869565	0,32369942	0,285	
cdf	1			1		0,65217391	0,32947977	0,323	
ce	1		1			0,69565217	0,33526012	0,36	
cef	7			7		0,73913043	0,37572254	0,363	
de	2		2			0,7826087	0,38728324	0,395	
def	73			73		0,82608696	0,80924855	0,017	
df	7		7			0,86956522	0,84971098	0,02	
e	1	1				0,91304348	0,85549133	0,058	
ef	23		23			0,95652174	0,98843931	0,032	
f	2	2							
tot	173	3	33	93	44	173	1	1	0
freq		0,01734104	0,19075145	0,53757225	0,2543352				6

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,395
n rank	23
N	173
m	7,52
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49



Phéno7992	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigenique				
abd	1				1				
abde	1					1			
abdf	1						1		
bde	6				6				
bdef	3						3		
bdf	3				3				
be	5		5						
bef	17			17					
bf	8		8						
cef	1			1					
de	2		2						
def	15			15					
df	23		23						
e	9	9							
ef	45		45						
f	23	23							
tot	163	32	83	43	5	163	1	1	0
freq		0,19631902	0,50920245	0,26380368	0,0306748				

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,393
n rank	16
N	163
m	10,19
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno 8007	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigeni que			
b	1	1				Fn (x)	F (x)	d
bd	7		7			0,05882353	0,00617284	0,053
bde	4			4		0,11764706	0,04938272	0,068
bdf	16			16		0,17647059	0,07407407	0,102
bf	1		1			0,23529412	0,17283951	0,062
cd	8		8			0,29411765	0,17901235	0,115
cde	12			12		0,35294118	0,22839506	0,125
cdef	6				6	0,41176471	0,30246914	0,109
cdf	20			20		0,47058824	0,33950617	0,131
cf	2		2			0,52941176	0,46296296	0,066
d	14	14				0,58823529	0,47530864	0,113
de	7		7			0,64705882	0,5617284	0,085
def	18			18		0,70588235	0,60493827	0,101
df	35		35			0,76470588	0,71604938	0,049
e	2	2				0,82352941	0,93209877	0,109
ef	1		1			0,88235294	0,94444444	0,062
f	8	8				0,94117647	0,95061728	0,009
tot	162	25	61	70	6	162	1	1
freq		0,15432099	0,37654321	0,43209877	0,0370370			0

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,131
n rank	17
N	162
m	9,53
p	NS
D critical	
0.05	0,41
D critical	
0.01	0,49

Phéno8477	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigenique				
abdf	1				1	Fn (x)	F (x)	d	
acde	1				1	0,03571429	0,00609756	0,03	
bcef	2				2	0,07142857	0,01219512	0,059	
bd	1		1			0,10714286	0,02439024	0,083	
bde	8			8		0,14285714	0,0304878	0,112	
bdef	7				7	0,17857143	0,07926829	0,099	
bdf	1			1		0,21428571	0,12195122	0,092	
be	1		1			0,25	0,12804878	0,122	
bef	3			3		0,28571429	0,13414634	0,152	
cc'ef	1				1	0,32142857	0,15243902	0,169	
cc'f	2			2		0,35714286	0,15853659	0,199	
cd	1		1			0,39285714	0,17073171	0,222	
c'd	1		1			0,42857143	0,17682927	0,252	
cde	14			14		0,46428571	0,18292683	0,281	
c'de	4			4		0,5	0,26829268	0,232	
cdef	4				4	0,53571429	0,29268293	0,243	
c'def	3				3	0,57142857	0,31707317	0,254	
ce	4		4			0,60714286	0,33536585	0,272	
c'e	4		4			0,64285714	0,3597561	0,283	
cef	3			3		0,67857143	0,38414634	0,294	
c'ef	1			1		0,71428571	0,40243902	0,312	
cf	1		1			0,75	0,40853659	0,341	
d	3	3				0,78571429	0,41463415	0,371	
de	53		53			0,82142857	0,43292683	0,389	
def	19			19		0,85714286	0,75609756	0,101	
df	2		2			0,89285714	0,87195122	0,021	
e	7	7				0,92857143	0,88414634	0,044	
ef	12		12			0,96428571	0,92682927	0,037	
tot	164	10	80	55	19	164	1	1	0
freq		0,06097561	0,48780488	0,33536585	0,11585366				6

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,389
n rank	28
N	164
m	5,86
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno9198	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigenique				
acdf	12				12	F <sub>n</sub> (x)	F (x)	d	
bcd	1				1	0,06666667	0,06779661	0,001	
bcdf	1				1	0,13333333	0,07344633	0,06	
bcef	1				1	0,2	0,07909605	0,121	
bf	1		1			0,26666667	0,08474576	0,182	
cd	18		18			0,33333333	0,09039548	0,243	
cde	13			13		0,4	0,1920904	0,208	
cdef	11				11	0,46666667	0,26553672	0,201	
cdf	52			52		0,53333333	0,32768362	0,206	
cf	5		5			0,6	0,62146893	0,021	
d	2	2				0,66666667	0,64971751	0,017	
de	2		2			0,73333333	0,66101695	0,072	
def	17			17		0,8	0,67231638	0,128	
df	39		39			0,86666667	0,76836158	0,098	
f	2	2				0,93333333	0,98870056	0,055	
tot	177	4	65	82	26	177	1	1	0
					0,1468926				
freq		0,02259887	0,36723164	0,46327684	6	1			

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,243
n rank	15
N	177
m	11,8
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

2 / C1C8 :

Phéno7990	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadri genique
b	2	2			
bc	4		4		
bcd	173			173	
bd	6		6		
tot	185	2	10	173	0
freq		0,01081081	0,05405405	0,93513514	0

Fn (x)	F (x)	d
0,25	0,01081081	0,239
0,5	0,03243243	0,468
0,75	0,96756757	0,218
1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,468
n rank	4
N	185
m	46,25
p	p < 0.05
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno7992	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadri genique
b	8	8			
bc	7		7		
bcd	122			122	
bd	26		26		
cd	1		1		
d	5	5			
tot	169	13	34	122	0
freq		0,07692308	0,20118343	0,72189349	0

Fn (x)	F (x)	d
0,16666		
0,33333	0,04733728	0,119
0,5	0,0887574	0,245
0,66666	0,81065089	0,311
0,83333	0,96449704	0,298
1	0,9704142	0,137

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,311
n rank	6
N	169
m	28,17
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno 8007	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadri genique				
b	16	16							
bc	10		10						
bcd	57			57					
bcde	7				7				
bd	26		26						
bde	2			2					
be	2		2						
c	2	2							
cd	8		8						
cde	3			3					
d	32	32							
de	4		4						
tot	169	50	50	62	7	169	1	1	0
freq		0,29585799	0,29585799	0,36686391	0,04142012	1			

Fn (x)	F (x)	d
0,083333		
0,166666	0,09467456	0,011
0,25	0,15384615	0,013
0,333333	0,49112426	0,241
0,416666	0,53254438	0,199
0,5	0,68639053	0,27
0,583333	0,69822485	0,198
0,666666	0,71005917	0,127
0,75	0,72189349	0,055
0,833333	0,76923077	0,019
0,916666	0,78698225	0,046
1	0,97633136	0,06

**Kolmogorov-Smirnov  
for one sample**

Dk 0,27  
n rank 12  
N 169  
m 14,08  
p NS  
D critical 0,41  
D critical 0,05 0,41  
D critical 0,01 0,49

Phéno8477	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadri genique
ae	1	1			
b	1	1			
bcd	167			167	
bd	1		1		
de	1		1		
e	1	1			
tot	172	3	2	167	0
freq		0,01744186	0,01162791	0,97093023	0

Fn (x)	F (x)	d
0,16666		
0,33333	0,00581395	0,161
0,5	0,01162791	0,322
0,66666	0,98255814	0,483
0,83333	0,98837209	0,322
1	0,99418605	0,161

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,483
n rank	6
N	172
m	28,67
p	p < 0.05
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno9198	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadri genique
ade	1			1	
bc	1		1		
bcd	60			60	
bcde	56				56
bce	3			3	
bde	1			1	
be	3	3			
c	1	1			
cd	8		8		
cde	9			9	
ce	1		1		
d	24	24			
De	13		13		

Fn (x)	F (x)	d
0,07692	0,00552486	0,071
0,15384	0,01104972	0,143
0,23076	0,34254144	0,112
0,30769	0,6519337	0,344
0,38461	0,66850829	0,284
0,46153	0,67403315	0,212
0,53846	0,69060773	0,152
0,61538	0,6961326	0,081
0,69230	0,74033149	0,048
0,76923	0,79005525	0,021
0,84615	0,79558011	0,051
0,92307	0,9281768	0,005

tot	181	25	26	74	56	181	1	1	0
freq		0,13812155	0,14364641	0,40883978	0,30939227	1			

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,344		
n rank	13		
N			18
m	13,92		
p	NS		
D critical 0.05	0,41		
D critical 0.01			0,49



3/ B4-D7 :

Phéno7990	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigeni que				
c	4	4				Fn (x)	F (x)	d	
cd'	1		1			0,02941176	0,02162162	0,008	
cd'e	1			1		0,05882353	0,02702703	0,032	
cd'f	1			1		0,08823529	0,03243243	0,056	
cd'f'	2			2		0,11764706	0,03783784	0,08	
ce	1		1			0,14705882	0,04864865	0,098	
cefg	1	1				0,17647059	0,05405405	0,122	
cf	1		1			0,20588235	0,05945946	0,146	
cf'	5		5			0,23529412	0,06486486	0,17	
cff'	1			1		0,26470588	0,09189189	0,173	
d'	31	31				0,29411765	0,0972973	0,197	
dd'e	1			1		0,32352941	0,26486486	0,059	
de	1		1			0,35294118	0,27027027	0,083	
d'e	33		33			0,38235294	0,27567568	0,107	
d'ef	12			12		0,41176471	0,45405405	0,042	
d'ef'	2			2		0,44117647	0,51891892	0,078	
d'eff'	1				1	0,47058824	0,52972973	0,059	
d'ef'h	1				1	0,5	0,53513514	0,035	
d'f	7		7			0,52941176	0,54054054	0,011	
df'	1		1			0,55882353	0,57837838	0,02	
d'f'	7		7			0,58823529	0,58378378	0,004	
d'ff'	2			2		0,61764706	0,62162162	0,004	
d'f'h	1			1		0,64705882	0,63243243	0,015	
e	29	29				0,67647059	0,63783784	0,039	
ef	9		9			0,70588235	0,79459459	0,089	
ef'	8		8			0,73529412	0,84324324	0,108	
eff'	1			1		0,76470588	0,88648649	0,122	
efg	1			1		0,79411765	0,89189189	0,098	
eh	1		1			0,82352941	0,8972973	0,074	
f	9	9				0,85294118	0,9027027	0,05	
f'	6	6				0,88235294	0,95135135	0,069	
ff'h	1			1		0,91176471	0,98378378	0,072	
fg	1		1			0,94117647	0,98918919	0,048	
gh	1		1			0,97058824	0,99459459	0,024	
tot	185	80	77	26	2	185	1	1	0
		0,432			0,010				
		4324	0,416	0,1405	8108				
freq		3	21622	4054	1	1			

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,197
n rank	34
N	185
m	5,44
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno7992	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigénique				
b	8	8				Fn (x)	F (x)	d	
bc	7		7			0,16666667	0,04733728		0,119
bcd	122			122		0,33333333	0,0887574		0,245
bd	26		26			0,5	0,81065089		0,311
cd	1		1			0,66666667	0,96449704		0,298
d	5	5				0,83333333	0,9704142		0,137
tot	169	13	34	122	0	169	1	1	0
		0,076							
		9230	0,201	0,7218					
freq		8	18343	9349	0	1			

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,311
n rank	6
N	169
m	28,17
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno 8007	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigénique				
b	2	2				Fn (x)	F (x)	d	
bc	2		2			0,02380952	0,01123596		0,013
bcd'	2			2		0,04761905	0,02247191		0,025
bc'f	1			1		0,07142857	0,03370787		0,038
bd'	2		2			0,0952381	0,03932584		0,056
be	1		1			0,11904762	0,0505618		0,068
be'	6		6			0,14285714	0,05617978		0,087
bf	4		4			0,16666667	0,08988764		0,077
c	1	1				0,19047619	0,11235955		0,078
c'	1	1				0,21428571	0,11797753		0,096
cc'd'	1			1		0,23809524	0,12359551		0,114
cc'f	1			1		0,26190476	0,12921348		0,133
cd	1		1			0,28571429	0,13483146		0,151
c'd'	2		2			0,30952381	0,14044944		0,169
cd'f	1			1		0,33333333	0,15168539		0,182
ce	1		1			0,35714286	0,15730337		0,2
c'e	2		2			0,38095238	0,16292135		0,218
ce'	2		2			0,4047619	0,1741573		0,231
c'e'	2		2			0,42857143	0,18539326		0,243
c'ef	1			1		0,45238095	0,19662921		0,256
ce'f	1			1		0,47619048	0,20224719		0,274
cf	3		3			0,5	0,20786517		0,292
cf'	1		1			0,52380952	0,2247191		0,299
d	4	4				0,54761905	0,23033708		0,317
d'	5	5				0,57142857	0,25280899		0,319
dd'	1		1			0,5952381	0,28089888		0,314

dd'e'f	1			1	0,61904762	0,28651685	0,333
de	2	2			0,64285714	0,29213483	0,351
d'e'	7	7			0,66666667	0,30337079	0,363
d'ef	1		1		0,69047619	0,34269663	0,348
de'f	2		2		0,71428571	0,34831461	0,366
df	6	6			0,73809524	0,35955056	0,379
d'f	4	4			0,76190476	0,39325843	0,369
df'	1	1			0,78571429	0,41573034	0,37
e	10	10			0,80952381	0,42134831	0,388
e'	18	18			0,83333333	0,47752809	0,356
ee'	2		2		0,85714286	0,57865169	0,278
ef	23		23		0,88095238	0,58988764	0,291
e'f	4		4		0,9047619	0,71910112	0,186
e'g	1		1		0,92857143	0,74157303	0,187
f	42	42			0,95238095	0,74719101	0,205
f'	3	3			0,97619048	0,98314607	0,007
tot	178	86	80	11	1	1	0
		0,483		0,005			
		1460	0,449	0,0617	6179		
freq		7	4382	9775	8	1	

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,388
n rank	42
N	178
m	4,24
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno9198	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigeni que				
ad	2		2						
adf	1			1					
c	1	1							
c'd	1		1						
cdef	1				1				
cdef'	4				4				
cdf	5			5					
cdf'	1			1					
c'df'	1			1					
cdff'	16				16				
c'dff'	1				1				
ce	2		2						
cef'	3			3					
cef'g	1				1				
cf	3		3						
cf'	5		5						
cff'	1			1					
d	46	46							
de	3		3						
def	3			3					
def'	3			3					
df	15		15						
df'	17		17						
dff'	1			1					
d'fg	1			1					
e	8	8							
ef'	3		3						
eff'	3		3						
f	4	4							
f'	8	8							
ff'	1		1						
tot	165	67	55	20	23	165			
		0,406			0,139				
		0606	0,333	0,1212	3939				
freq		1	33333	1212	4	1			

Fn (x)	F (x)	d
0,03225806	0,01212121	0,02
0,06451613	0,01818182	0,046
0,09677419	0,02424242	0,073
0,12903226	0,03030303	0,099
0,16129032	0,03636364	0,125
0,19354839	0,06060606	0,133
0,22580645	0,09090909	0,135
0,25806452	0,0969697	0,161
0,29032258	0,1030303	0,187
0,32258065	0,2	0,123
0,35483871	0,20606061	0,149
0,38709677	0,21818182	0,169
0,41935484	0,23636364	0,183
0,4516129	0,24242424	0,209
0,48387097	0,26060606	0,223
0,51612903	0,29090909	0,225
0,5483871	0,2969697	0,251
0,58064516	0,57575758	0,005
0,61290323	0,59393939	0,019
0,64516129	0,61212121	0,033
0,67741935	0,63030303	0,047
0,70967742	0,72121212	0,012
0,74193548	0,82424242	0,082
0,77419355	0,83030303	0,056
0,80645161	0,83636364	0,03
0,83870968	0,88484848	0,046
0,87096774	0,9030303	0,032
0,90322581	0,92121212	0,018
0,93548387	0,94545455	0,01
0,96774194	0,99393939	0,026
	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,251
n rank	31
N	165
m	5,32
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigeni que				
cde	1			1					
ce	9		9						
ce'	1		1						
cee'	9			9					
cee'f	3				3				
cef	7			7					
ce'f	13			13					
cefg	2				2				
ceg	2			2					
ce'g	2			2					
cf	12		12						
cf'	1		1						
cg	1		1						
de	1		1						
deff'	1				1				
defg	1				1				
deg	1			1					
df	5		5						
e	6	6							
e'	5	5							
ee'	9		9						
ee'f	6			6					
ee'f'	2			2					
ee'fg	3				3				
ee'g	3			3					
ef	27		27						
e'f	25		25						
e'f'	1		1						
eff'	1			1					
efg	1			1					
e'fg	2			2					
eg	1		1						
e'g	3		3						
f	12	12							
fg	1		1						
f'g	1		1						
tot	181	23	98	50	10	181			
		0,127			0,055				
		0718	0,541	0,2762	2486				
freq		2	43646	4309	2	1			

Fn (x)	F (x)	d
0,02777778	0,00552486	0,022
0,05555556	0,05524862	0
0,08333333	0,06077348	0,023
0,11111111	0,11049724	0,001
0,13888889	0,12707182	0,012
0,16666667	0,16574586	0,001
0,19444444	0,23756906	0,043
0,22222222	0,24861878	0,026
0,25	0,25966851	0,01
0,27777778	0,27071823	0,007
0,30555556	0,33701657	0,031
0,33333333	0,34254144	0,009
0,36111111	0,3480663	0,013
0,38888889	0,35359116	0,035
0,41666667	0,35911602	0,058
0,44444444	0,36464088	0,08
0,47222222	0,37016575	0,102
0,5	0,39779006	0,102
0,52777778	0,43093923	0,097
0,55555556	0,45856354	0,097
0,58333333	0,50828729	0,075
0,61111111	0,54143646	0,07
0,63888889	0,55248619	0,086
0,66666667	0,56906077	0,098
0,69444444	0,58563536	0,109
0,72222222	0,73480663	0,013
0,75	0,87292818	0,123
0,77777778	0,87845304	0,101
0,80555556	0,8839779	0,078
0,83333333	0,88950276	0,056
0,86111111	0,90055249	0,039
0,88888889	0,90607735	0,017
0,91666667	0,92265193	0,006
0,94444444	0,98895028	0,045
0,97222222	0,99447514	0,022
1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,123
n rank	36
N	181
m	5,03
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

#### 4/ OSRB :

Phéno7990	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigeni que	Fn (x)	F (x)	d
a	2	2				0,02702703	0,01612903	0,011
b	2	2				0,05405405	0,03225806	0,022
d	5	5				0,08108108	0,07258065	0,009
e	2	2				0,10810811	0,08870968	0,019
g	5	5				0,13513514	0,12903226	0,006
ae	18		18			0,16216216	0,27419355	0,112
bc	5		5			0,18918919	0,31451613	0,125
af	1		1			0,21621622	0,32258065	0,106
ac	2		2			0,24324324	0,33870968	0,095
be	20		20			0,27027027	0,5	0,23
bf	3		3			0,2972973	0,52419355	0,227
bg	1		1			0,32432432	0,53225806	0,208
cd	1		1			0,35135135	0,54032258	0,189
ce	2		2			0,37837838	0,55645161	0,178
dg	4		4			0,40540541	0,58870968	0,183
eg	3		3			0,43243243	0,61290323	0,18
bd	1		1			0,45945946	0,62096774	0,162
ab	1		1			0,48648649	0,62903226	0,143
abe	4			4		0,51351351	0,66129032	0,148
abf	1			1		0,54054054	0,66935484	0,129
acd	1			1		0,56756757	0,67741935	0,11
ace	4			4		0,59459459	0,70967742	0,115
aeg	2			2		0,62162162	0,72580645	0,104
bce	11			11		0,64864865	0,81451613	0,166
bcg	1			1		0,67567568	0,82258065	0,147
bde	1			1		0,7027027	0,83064516	0,128
bdf	1			1		0,72972973	0,83870968	0,109
bef	2			2		0,75675676	0,85483871	0,098
beg	4			4		0,78378378	0,88709677	0,103
bfg	3			3		0,81081081	0,91129032	0,1
cdg	1			1		0,83783784	0,91935484	0,082
ceg	1			1		0,86486486	0,92741935	0,063
cfg	1			1		0,89189189	0,93548387	0,044
abce	5				5	0,91891892	0,97580645	0,057
abfg	1				1	0,94594595	0,98387097	0,038
adef	1				1	0,97297297	0,99193548	0,019
adeg	1				1		1	1
	124	16	62	38	8			0

#### Kolmogorov-Smirnov for one sample

Dk	0,23
n rank	37
N	124
m	3,35
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

Phéno7992	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigénique	Fn (x)	F (x)
b	6	6					
b'	3	3				0,04545455	0,03658537
d	1	1				0,09090909	0,05487805
e	3	3				0,13636364	0,06097561
ab	1		1			0,18181818	0,07926829
af	1		1			0,22727273	0,08536585
ae	1		1			0,27272727	0,09146341
bc	23		23			0,31818182	0,09756098
b'c	1		1			0,36363636	0,23780488
be	37		37			0,40909091	0,24390244
b'e	7		7			0,45454545	0,4695122
bf	1		1			0,5	0,51219512
abc	2			2		0,54545455	0,51829268
abe	3			3		0,59090909	0,5304878
bcd	1			1		0,63636364	0,54878049
bce	57			57		0,68181818	0,55487805
bcf	8			8		0,72727273	0,90243902
cef	2			2		0,77272727	0,95121951
abce	1				1	0,81818182	0,96341463
abeg	1				1	0,86363636	0,9695122
bcef	3				3	0,90909091	0,97560976
bceg	1				1	0,95454545	0,99390244
	164	13	72	73	6		1

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk		0,221
n rank		22
N		164
m		7,45
p	NS	
D critical 0.05		0,41
D critical 0.01		0,49

Phéno 8007	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quad rigeni que	Fn (x)	F (x)	d	
a	4	4							
c	1	1				0,0212766	0,02424242	0,003	
e	3	3				0,04255319	0,03030303	0,012	
g	1	1				0,06382979	0,04848485	0,015	
ac	14		14			0,08510638	0,05454545	0,031	
ad	2		2			0,10638298	0,13939394	0,033	
ae	27		27			0,12765957	0,15151515	0,024	
af	5		5			0,14893617	0,31515152	0,166	
be	4		4			0,17021277	0,34545455	0,175	
bf	3		3			0,19148936	0,36969697	0,178	
cd	2		2			0,21276596	0,38787879	0,175	
ce	4		4			0,23404255	0,4	0,166	
ef	2		2			0,25531915	0,42424242	0,169	
eg	1		1			0,27659574	0,43636364	0,16	
fg	1		1			0,29787234	0,44242424	0,145	
acd	4			4		0,31914894	0,44848485	0,129	
ace	18			18		0,34042553	0,47272727	0,132	
acf	3			3		0,36170213	0,58181818	0,22	
acg	3			3		0,38297872	0,6	0,217	
ade	1			1		0,40425532	0,61818182	0,214	
adf	1			1		0,42553191	0,62424242	0,199	
aef	6			6		0,44680851	0,63030303	0,183	
aeg	7			7		0,46808511	0,66666667	0,199	
bcd	1			1		0,4893617	0,70909091	0,22	
bce	3			3		0,5106383	0,71515152	0,205	
bcf	2			2		0,53191489	0,73333333	0,201	
bcg	1			1		0,55319149	0,74545455	0,192	
bde	1			1		0,57446809	0,75151515	0,177	
bef	5			5		0,59574468	0,75757576	0,162	
bfg	1			1		0,61702128	0,78787879	0,171	
cdf	1			1		0,63829787	0,79393939	0,156	
cef	1			1		0,65957447	0,8	0,14	
ceg	1			1		0,68085106	0,80606061	0,125	
efg	1			1		0,70212766	0,81212121	0,11	
cde	1			1		0,72340426	0,81818182	0,095	
acde	2				2	0,74468085	0,82424242	0,08	
acdf	4				4	0,76595745	0,83636364	0,07	
acef	5				5	0,78723404	0,86060606	0,073	
aceg	3				3	0,80851064	0,89090909	0,082	
adeg	1				1	0,82978723	0,90909091	0,079	
aefg	2				2	0,85106383	0,91515152	0,064	
bcde	1				1	0,87234043	0,92727273	0,055	
bcdf	1				1	0,89361702	0,93333333	0,04	
bcef	3				3	0,91489362	0,93939394	0,025	
bdef	3				3	0,93617021	0,95757576	0,021	
cdef	3				3	0,95744681	0,97575758	0,018	
cefg	1				1	0,9787234	0,99393939	0,015	
	165	9	65	62	29		1	1	0

*Kolmogorov-Smirnov for one*



**sample**

Dk		0,22
n rank		47
N		165
m		3,51
p	NS	
D critical 0.05		0,41
D critical 0.01		0,49

Phéno8477	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigénique	Fn (x)	F (x)	d
bc	26		26			0,07692308	0,49056604	0,414
ae	1		1			0,15384615	0,50943396	0,356
ac	6		6			0,23076923	0,62264151	0,392
ab	3		3			0,30769231	0,67924528	0,372
be	1		1			0,38461538	0,69811321	0,313
bf	1		1			0,46153846	0,71698113	0,255
abc	6			6		0,53846154	0,83018868	0,292
abd	1			1		0,61538462	0,8490566	0,234
ace	1			1		0,69230769	0,86792453	0,176
bce	1			1		0,76923077	0,88679245	0,118
bcf	2			2		0,84615385	0,9245283	0,078
a	2	2				0,92307692	0,96226415	0,039
b	2	2						
	53	4	38	11	0	1	1	0

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk		0,414
n rank		13
N		53
m		4,08
p	p < 0.05	
D critical 0.05		0,41
D critical 0.01		0,49

Phéno9198	effectif observé	Mono	Di	Tri	Quadrigénique

				Fn (x)	F (x)	d
bc	19	19				
be	3	3		0,03333333	0,13103448	0,098
ac	2	2		0,06666667	0,15172414	0,085
bd	1	1		0,1	0,16551724	0,066
cd	2	2		0,13333333	0,17241379	0,039
ce	8	8		0,16666667	0,1862069	0,02
eg	1	1		0,2	0,24137931	0,041
fg	1	1		0,23333333	0,24827586	0,015
ace	1		1	0,26666667	0,25517241	0,011
bcd	10		10	0,3	0,26206897	0,038
bce	43		43	0,33333333	0,33103448	0,002
bcf	4		4	0,36666667	0,62758621	0,261
bcg	2		2	0,4	0,65517241	0,255
bde	1		1	0,43333333	0,66896552	0,236
bdf	1		1	0,46666667	0,67586207	0,209
bdg	1		1	0,5	0,68275862	0,183
bef	1		1	0,53333333	0,68965517	0,156
beg	5		5	0,56666667	0,69655172	0,13
cdg	2		2	0,6	0,73103448	0,131
bcde	5		5	0,63333333	0,74482759	0,111
bcdf	3		3	0,66666667	0,77931034	0,113
bcdg	7		7	0,7	0,8	0,1
bcef	2		2	0,73333333	0,84827586	0,115
bceg	6		6	0,76666667	0,86206897	0,095
bcfg	1		1	0,8	0,90344828	0,103
bdef	2		2	0,83333333	0,91034483	0,077
cdeg	2		2	0,86666667	0,92413793	0,057
cdfg	2		2	0,9	0,93793103	0,038
e	4	4		0,93333333	0,95172414	0,018
c	3	3		0,96666667	0,97931034	0,013
	145	7	37	71	30	
					1	1
						0

**Kolmogorov-Smirnov for one sample**

Dk	0,261
n rank	30
N	145
m	4,83
p	NS
D critical 0.05	0,41
D critical 0.01	0,49

**YEKKOUR A., 2007: Diversité génétique interspécifique chez les graminées fourragères pérennes : étude de cas dans différentes populations sélectionnées de *Festulolium***

**RESUME :**

L'étude de la variabilité chez les *Festulolium* est un moyen de modéliser l'évolution chez les graminées en utilisant la variabilité interspécifique.

L'hybridation entre fêtuques et ray-grass permet d'envisager de nouveaux progrès génétiques chez les graminées fourragères en combinant pérennité et valeur alimentaire des deux espèces.

Les marqueurs SSR permettent d'envisager de nouvelles possibilités d'investigation chez des espèces à structure génétique complexe comme les *Festulolium*.

L'une des applications les plus prometteuses du marquage moléculaire dans le complexe *Festuca-Lolium* est la détection de gènes de fétuque liés à la pérennité et à la résistance à la sécheresse que l'on pourrait introgresser par simple back-cross dans le ray-grass.

29 marqueurs ont été sélectionnés après recensement. Lors du génotypage nous nous sommes heurtés à de grosses difficultés de lecture des gels. Ces artefacts nous ont forcé à n'exploiter que les informations délivrées par un pool restreint de marqueur qui sont : OSRB, B4D7, B1C8, et B1B6. B1B6 présente la particularité de reconnaître spécifiquement des séquences fétuque ou ray-grass.

La sélection subie par les populations étudiées a été très intense et cela dès les premiers polycross.

La comparaison des populations sur la base des fréquences alléliques au marqueur B1B6 et sur la base des phénotypes obtenus pour l'ensemble des marqueurs se rejoignent : Les populations d'hybrides évoluent peu, alors que les populations BC1 semblent s'éloigner progressivement au fur et à mesure de leur avancée en génération.

La relative stabilité des hybrides correspondrait à une structure génomique se rapprochant de l'amphiploïdie stricte, alors que la l'évolution plus prononcée chez les populations BC1 correspondrait à une structure allotétraploïde ou partiellement autopolyploïde.

L'étude de diversité intra-population a révélé une grande homogénéité à l'intérieur de chaque population

**Mots clés :** Hybridation interspécifique, *Festulolium*, Cartographie génétique, Marqueur moléculaire, Graminées pérennes, SSR, *Festuca glaucescens*, *Lolium multiflorum*.

---

**YEKKOUR A., 2007: Genetic interspecific diversity survey on perennial forage gramineous : case of *Festulolium* bred populations.**

**ABSTRACT:**

*Festulolium* variability survey is a way of modelling gramineous evolution using intergeneric variability.

Intergeneric hybridization between fescue and ryegrass offers further opportunities in forage grass breeding through combination of persistency and feeding value of both species.

SSR markers allow to face new investigation possibilities for species with a complex genetic structure like *Festulolium*.

The most promising scope of application for molecular markers in *Festuca-Lolium* complex is detection of perennial and drought resistance fescue genes which can be introduced in ryegrass by simple back crossing.

29 markers were selected. At the time of genotyping we faced big difficulties of gels reading which obliged us to work just with most informative markers OSRB, B4D7, B1C8, and B1B6. B1B6 reveals specifically fescue or ryegrass genes.

From first polycross the selection pressure was very hard.

Population survey using allelic frequency with B1B6 or using phenotypes obtained through all markers concord: Hybrids populations relatively do not change; BC1 populations seem to move away progressively with the generation number.

Relative stability of hybrids would correspond to strict amphidiploid genetic structure. Intra population survey showed a high homogeneity degree for each population.

**Key words:** Intergeneric hybridization, *Festulolium*, genetic mapping, Molecular marker, perennial grasses, SSR, *Festuca glaucescens*, *Lolium multiflorum*.

---

## يكور أ 2007 : التغيرات الوراثية ما بين الأصناف عند النجليات العلفية الدائمة : دراسة عند مجتمعات مختارة من الفيستولوليوم ملخص:

دراسة النجليات والتقدم عند فيستولوليوم هي طريقة لتكوين نموذج فهم تغيرات الوراثة عند النجليات. التهجين بين فيستوكا والري غراس يمكننا فرض تحسنات وراثية عند النجليات العلفية من خلال الجمع بين الثبات والقيمة الغذائية لكل نوع .

العلامات SSR تمكننا عرض احتمالات جديدة لتحقيق عند أصناف ذو تركيبة وراثية معقدة كالفيستولوليوم. التطبيق المباشر لاستخدام العلامات الجزئية عند فيستوكا – لوليوم هو إكتشاف جينات فيستوكا متعلقة بالدائمة ومقاومة الجفاف التي يمكن إدخالها في الري غراس بواسطة الباك كروس .  
29 علامة اختيارات في وقت التنظيم الجيني ولكن وجهنا صعوبات كبيرة لقراءة العلامات ، ولذلك اضطرنا إلى العمل بمجموعة محدودة من العلامات, B1B6, OSRB B1B6, B4D7, B1C8 يكشف حديثا جينات فيستوكا أولوليوم .

من أول بوليكرس الضغط الاختياري كان قاسيا جدا مقارنة المجتمعات بواسطة نسبة الأليليك باستخدام B1B6 أو باستخدام الظاهريات الوراثة المحصول عليها عن طريق كل العلامات تبدو أنها تتعد تدريجيا عبر الأجيال.

الإستقرار النسبي عند الهجاء تتطابق لتركيبية Amphiploïde تام . أما BC1 نسبة التغيرات المرتفعة تتطابق هيكلية Allotetraploïde أو Autopoliploïde جزئي دراسة التغيرات داخل كل المجتمعات أظهرت نسبة تجانس مرتفعة.

**الكلمات الأساسية :** تهجين ما بين الأصناف ، فيستولوليوم ، خريطة وراثية ، علامات الجزيئية الغرامنيات الدائمة ، SSR ، *Festuca glaucescens* , *Lolium multiflorum* ,

---