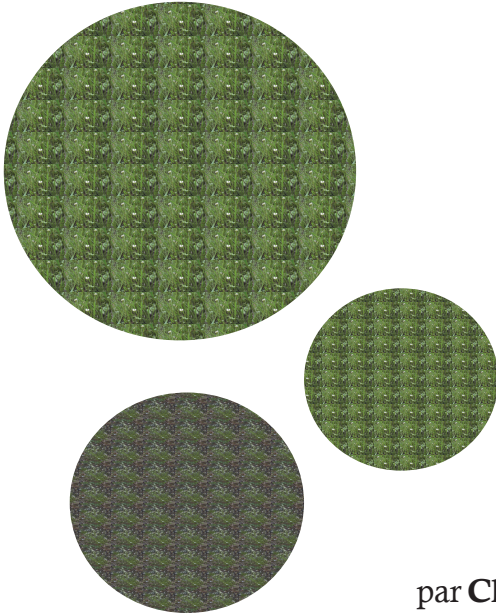


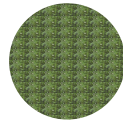
Université des Sciences et Technologies de Lille I
U.F.R de Biologie
Ecole doctorale SMRE
Laboratoire GEPV UMR 8016



Evolution des populations métalloles d'*Arabidopsis halleri* Étude sur les traits et sur le génomme en populations naturelles

par **Claire-Lise Meyer**

Soutenance publique le
19 juin 2009



en vue de l'obtention du grade
de Docteur de l'Université de
Lille 1
Discipline: Biologie évolutive

Membre du jury :

Ophélie Ronce, CR CNRS, Université de Montpellier II
Filip Volckaert, Professor, Katholieke Universiteit Leuven
Vincent Castric, MCF, Université Lille I
Joël Cuguen, Professeur, Université Lille I
Pauline Garnier-Géré, CR INRA
Pierre Saumitou-Laprade, DR CNRS, Université Lille 1

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur





Université des Sciences et Technologies de Lille I
U.F.R de Biologie
Ecole doctorale « Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement »
Laboratoire Génétique et Evolution des Populations Végétales UMR 8016

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lille I

Discipline : Biologie Evolutive et Ecologie

Par Claire-Lise Meyer

Evolution des populations métalloles d'*Arabidopsis halleri* (Brassicaceae)
Etude sur les traits et sur le génome en populations naturelles

Directeur de thèse : Pierre Saumitou-Laprade et Vincent Castric

Soutenance devant le jury constitué de :

Ophélie Ronce, Chargée de Recherche CNRS, Université Montpellier II	Rapporteur
Filip Volckaert, Professor, Katholieke Universiteit Leuven	Rapporteur
Vincent Castric, Maitre de conférence, Université de Lille I	Examineur
Joël Cuguen Professeur, Université de Lille I	Examineur
Pauline Garnier-Géré, Chargé de Recherche INRA	Examinatueur
Pierre Saumitou-Laprade, Directeur de Recherche CNRS, Université de Lille I	Examineur

Remerciements

Cela a commencé par une phrase bien étrange : « le bâtiment SN2 est à coté du grand camembert rose qui sert de bibliothèque ». Aidée de cette indication bien bucolique j'ai pu trouver le laboratoire GEPV et y faire mes premiers pas. Je ne pensais pas à l'époque y rester aussi longtemps et autant y grandir intellectuellement et humainement. Je voudrais remercier pour tout cela toutes les personnes du GEPV et plus particulièrement :

Pierre Saumitou-Laprade pour m'avoir donné la possibilité de faire une thèse, pour ses nombreuses idées et son implication tout au long de cette aventure

Vincent Castric pour toute l'aide dans l'apprentissage de la démarche scientifique, pour sa disponibilité à toute épreuve et ses conseils avisés

Toutes les personnes qui sont passées dans le bureau 107 et avec qui j'ai pu avoir de merveilleuses discussions scientifiques mais également des discussions sur tout le reste de la vie. Un grand merci plus particulièrement à Fabrice Roux pour toutes ses suggestions précieuses.

Merci à Hélène Frérot et Maxime Pauwels qui sont pour moi comme une grande sœur et un grand frère d'un point de vue scientifique mais également humain, merci beaucoup pour votre amitié !

Merci également à Renaud Vitalis (MNHN, Paris) pour toute son aide durant l'analyse des données et pour son enthousiasme et sa simplicité dans le travail.

La recherche ne serait pas possible sans aide technique donc un grand merci à toutes les personnes du laboratoire de biologie moléculaire, particulièrement à Cécile Godé avec qui j'ai travaillé et qui est d'un point de vue technique et humain quelqu'un de très précieux. Un grand merci également au personnel des serres pour sa disponibilité et son aide.

Merci à Marie-Hélène Bouchet et Arnaud Day pour leur compréhension et leur soutien durant cette dernière année ainsi qu'à tous les gens avec qui j'ai travaillé durant mon ATER

Le financement des études étant une chose peu négligeable je remercie également toutes les personnes qui y ont participé, mes parents bien sur mais également mes grands parents, Mr Cerf de la pharmacie St Nabor et le Chapitre St Thomas à Strasbourg.

En écrivant ces remerciements j'ai une pensée particulièrement émue pour ma famille, qui a toujours été là à coté de moi, qui m'a entouré d'encouragement et d'amour. Rien ne peut remplacer cela dans la vie. Il n'y aurait pas assez de remerciement pour mes parents, Patrick et Marcelle Meyer, ma sœur Caroline-Mélody et son ami Réda ainsi que mes grands parents, Paul et Rose Meyer.

La thèse a été également une belle aventure parce qu'elle a été émaillée de nombreuses amitiés et de quelques poses thé (quelques ?) : merci à Valentine, Alicja, Laetitia, Nassera, Hailey, Aude, Elvire, Stéphane, Maxim, Margot, Violaine, Adeline, Kristen, Martin ...

Enfin je voudrais remercier mille et mille fois Samuel, pour son amour, son aide et son soutien. Merci de m'avoir si souvent permis de relativiser et de voir les choses essentielles de la vie.

Et bien sur pour finir, un grand merci aux membres du jury. Merci en particulier à Ophélie Ronce et Filip Volckaert pour leurs remarques très intéressantes sur le manuscrit.

A mon grand-père Paul et ma grand-mère Rose

Sommaire

AVANT-PROPOS	1
CHAPITRE I : INTRODUCTION	3
I. L'ADAPTATION LOCALE	3
I.1 Définition et intérêt d'étude	3
I.2 Le processus évolutif	5
<i>I.2.1 Les forces évolutives en jeu</i>	5
<i>La sélection naturelle</i>	5
<i>La mutation</i>	7
<i>La migration</i>	7
<i>La dérive génétique</i>	8
<i>I.2.2 Théories sur l'adaptation locale</i>	8
I.3 Comprendre les mécanismes génétiques de l'adaptation locale	9
<i>I.3.1 Chercher les traces de la sélection disruptive</i>	9
<i>Dans le génome</i>	9
<i>Sur les traits</i>	13
<i>I.3.2 Identifier l'architecture des traits quantitatifs</i>	15
<i>Cartographie QTL</i>	15
<i>Génétique d'association</i>	16
<i>I.3.3 Complémentarité de ces approches</i>	17
II. LE CAS DE L'ADAPTATION LOCALE AUX SITES METALLIFERES	17
II.1 Définition et caractéristique écologique des sites métallifères	17

II.2 Les contraintes présentes dans les sites métallifères	19
<i>II.2.1 La présence de métaux lourds</i>	19
<i>Mesurer la tolérance aux métaux</i>	20
<i>Les stratégies de tolérance aux métaux</i>	21
<i>Evolution de la tolérance aux métaux</i>	23
<i>Les bases génétiques de la tolérance aux métaux</i>	25
<i>II.2.2 La sécheresse et la carence en nutriments</i>	27
<i>II.2.3 L'hétérogénéité de l'environnement</i>	28
III. LE MODELE <i>A. HALLERI</i> ET LES OBJECTIFS DE LA THESE	28
III.1 Le taxon	28
III.2 Distribution géographique et amplitude écologique	30
III.3 Le statut de modèle	31
<i>III.3.1 Tolérance et hyperaccumulation du Zn et Cd</i>	31
<i>III.3.2 Position phylogénétique et connaissance du génome</i>	32
<i>III.3.3 <i>A. halleri</i> et l'adaptation locale aux sites métallifères</i>	35
IV. REFERENCES	37
CHAPITRE II : RECHERCHE DE TRACES DE DIVERGENCE ADAPTATIVE DANS LE GENOME D'<i>A. HALLERI</i> CHEZ DES POPULATIONS METALLICOLES ET NON METALLICOLES	47
I. PRESENTATION DE L'ETUDE ET PRINCIPAUX RESULTATS	47
II. CONTRIBUTION SOUS FORME D'ARTICLE	48

CHAPITRE III : CARACTERISATION DES PARTIES DU GENOME IDENTIFIEES COMME POTENTIELLEMENT SOUS SELECTION DANS LES POPULATIONS METALLICOLES D’<i>A. HALLERI</i> – PREMIER RESULTATS SUR 5 MARQUEURS	62
I. INTRODUCTION	62
II. MATERIEL ET METHODES	63
III. RESULTATS	66
IV. DISCUSSION ET CONCLUSION	71
V. REFERENCES	73
CHAPITRE IV : VARIABILITE DE LA TOLERANCE AU ZINC ENTRE ET AU SEIN DES POPULATIONS D’<i>A. HALLERI</i> A UNE ECHELLE LOCALE ET ROLE POSSIBLE DE LA SELECTION DISRUPTIVE	75
I. PRESENTATION DE L’ETUDE ET PRINCIPAUX RESULTATS	75
II. CONTRIBUTION SOUS FORME D’ARTICLE	76
CHAPITRE V : EXPLORER LES BASES GENETIQUES DE LA VARIABILITE DE LA TOLERANCE AU ZINC D’<i>A. HALLERI</i> PAR L’APPROCHE DE LA GENETIQUE D’ASSOCIATION	103
I. PRESENTATION DE L’ETUDE ET PRINCIPAUX RESULTATS	103
II. CONTRIBUTION SOUS FORME D’ARTICLE	104
CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE	123
I. PROCESSUS MICRO-EVOLUTIFS DANS LES POPULATIONS METALLICOLES D’ <i>A. HALLERI</i>	123
I.1 Evolution de la tolérance au zinc	123
I.2 L’adaptation locale aux sites métallifères	125
II. LES BASES GENETIQUES IMPLIQUES DANS L’EVOLUTION DES POPULATIONS METALLICOLES	127

III. VERS UNE MEILLEURE COMPREHENSION DES PROCESSUS EVOLUTIFS DANS LES POPULATIONS METALLICOLES D' <i>A. HALLERI</i>	128
IV. REFERENCES	131

Avant-propos

Comprendre l'influence des différentes forces évolutives (sélection, mutation, migration et dérive génétique) dans la différenciation phénotypique entre les populations est un thème central de la biologie évolutive. En effet, cela permet d'appréhender, à travers le phénomène de l'adaptation locale, les processus fondamentaux que sont le maintien de la diversité génétique et la spéciation. L'intérêt pour ce champ d'étude est d'autant plus grand ces dernières années du fait de la prise de conscience des changements évolutifs rapides induits par l'activité humaine. Une meilleure compréhension de ces processus permet à la fois d'appréhender l'impact de ces activités sur la trajectoire évolutive mais également d'utiliser le potentiel des espèces dans un but de conservation ou de remédiation.

Dans ce cadre d'étude, un modèle qui a particulièrement suscité l'intérêt des scientifiques, est celui des milieux pollués par les métaux lourds sur lesquels ne se développent que des espèces ou populations dites « tolérantes ». Deux espèces ont récemment émergé comme modèle dans ce contexte : *Thlaspi caerulescens* et *Arabidopsis halleri* qui sont toutes deux des Brassicaceae pseudométallophytes. Elles sont capables de se développer à la fois sur des sites pollués et sur des sites non pollués, et elles présentent des capacités de tolérance et d'hyperaccumulation des métaux dans toutes les populations. La plupart des études sur ces espèces sont focalisées sur le contrôle génétique, les bases physiologiques et l'évolution de ce trait au niveau inter-spécifique. En revanche peu d'études se sont intéressées aux processus évolutifs qui peuvent prendre place au sein de l'espèce entre types édaphiques différents. Le travail présenté ici consiste à utiliser des approches complémentaires (génomique des populations, biologie évolutive et génétique d'association) pour mieux comprendre à une échelle locale les processus micro-évolutifs qui peuvent se dérouler chez *A.halleri* dans les populations métallocoles et leurs bases génétiques.

Pour replacer cette étude dans le contexte scientifique et préciser l'intérêt des approches utilisées, les différentes parties de l'introduction aborderont successivement :

- le cadre conceptuel de l'adaptation locale et les différentes méthodes pour rechercher les bases génétiques des traits adaptatifs,
- le cas de l'adaptation locale aux sites métallifères,
- le modèle d'étude utilisé dans ce travail : *A. halleri*

Ce travail comporte ensuite quatre chapitres dont trois sont des articles scientifiques en anglais publiés ou en cours de rédaction¹. Le premier chapitre traite de la recherche par la méthode du criblage génomique (« genome scan ») de traces de sélection dans le génome d'*A. halleri* liées à l'adaptation aux sites métallifères. Le deuxième chapitre en français présente les premiers résultats de la caractérisation des locus potentiellement sous sélection identifiés par le criblage génomique. Le troisième chapitre focalise sur la variabilité de la tolérance au zinc chez cette espèce, entre et au sein des populations, et sur le possible rôle de la sélection disruptive dans la distribution de ce trait. Enfin le dernier chapitre rapporte les résultats de test d'association entre les locus utilisés pour le criblage génomique et le trait de la tolérance au zinc chez des populations métallicoles et non métallicoles. La conclusion générale rappelle les résultats majeurs et propose des perspectives à ce travail.

¹ La contribution des différents auteurs cités dans chaque chapitre se trouve en Annexe 1

CHAPITRE I : Introduction

I. L'adaptation locale

I.1. Définition et intérêt d'étude :

L'adaptation locale est un cas particulier de ce qui en biologie évolutive est appelé « l'adaptation ». Ce terme désigne, à la fois le **processus** par lequel une population accroît sa survie et son succès reproducteur (c'est-à-dire sa fitness) dans un environnement donné sous l'influence de la sélection naturelle, mais également **l'état résultant de ce processus**. L'évolution d'une population par l'action de la sélection n'est possible que s'il existe une **variabilité** des caractères influençant la valeur sélective des individus et si ces caractères sont **contrôlés génétiquement** et ne varient pas uniquement en fonction de l'environnement.

L'adaptation locale quand à elle, concerne uniquement des **populations d'une même espèce**. En effet les individus d'une même espèce doivent survivre et se reproduire dans un environnement qui est rarement homogène dans le temps et dans l'espace. Par conséquent la sélection naturelle peut provoquer, dans une population, l'évolution de certains traits qui confère un avantage dans cet habitat en comparaison aux autres habitats. L'adaptation locale est classiquement mise en évidence par des **transplantations réciproques**. Dans ce type d'expérience, si une population à une meilleur fitness dans son propre environnement par rapport aux autres sites où elle a été transplantée, on considère qu'il y a adaptation locale pour cette population. La figure 1 illustre la description de l'adaptation locale que nous venons de donner. Ce processus évolutif peut donc être considérée comme « micro-évolutif », puisqu'il concerne des changements entre et au sein des populations (Hendry & Kinnison 2001). Il a été montré que les principaux facteurs écologiques amenant à l'adaptation locale sont de quatre types: il peut s'agir d'un changement des **ressources trophiques**, de changements biophysiques de **l'environnement**, d'un changement des **prédateurs** ou d'un changement des relations de **compétition** entre les espèces (voir la synthèse de Reznick & Ghalambor 2001).

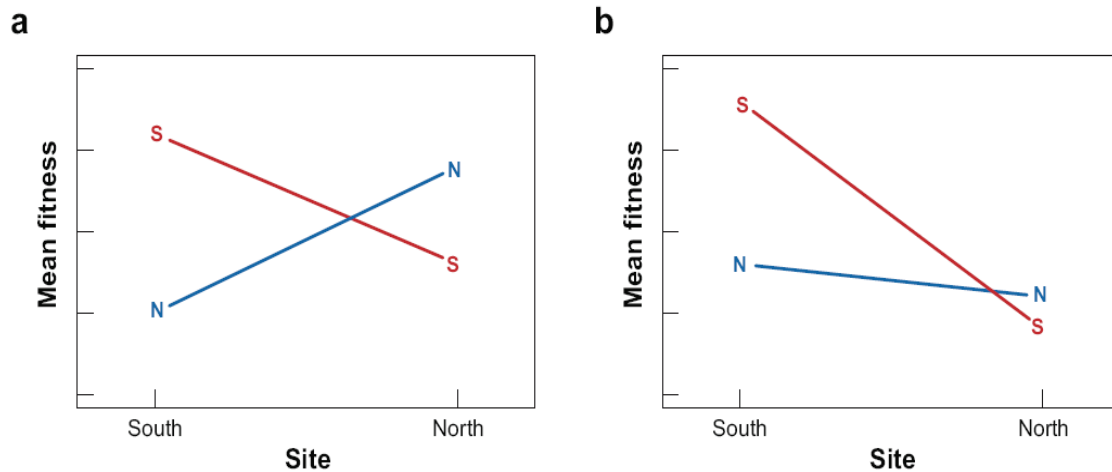


Figure 1 : Illustration de la définition de l'adaptation locale (D'après Savolainen *et al.* 2007). La fitness des populations nord (N) et sud (S) montre une interaction génotype \times environnement. Dans l'exemple (a) chaque population a une plus forte fitness absolue et relative dans son environnement alors que dans l'exemple (b) les deux populations ont une fitness absolue plus grande dans le sud mais chacune a une fitness relative plus grande dans son environnement. Dans ces deux exemples chaque population a une fitness plus faible en dehors de son environnement, on parlera donc d'adaptation locale.

L'étude de l'adaptation locale est un thème central en biologie évolutive, parce que ce processus est impliqué dans d'autres mécanismes incontournables, comme le maintien de la **diversité génétique** (Levene 1953) et la **spéciation** (Schluter 2001). En effet l'adaptation locale des populations à leur environnement permet le maintien d'une diversité dans l'espèce, cette diversité étant un garant de la biodiversité puisqu'elle assure la présence d'une variabilité génétique sur laquelle la sélection peut agir en cas de changement dans le milieu. A l'opposé, la divergence entre populations, sous l'effet de la sélection naturelle, peut amener à la mise en place de barrières à la reproduction et donc aboutir à l'apparition de nouvelles espèces. De nombreuses études sur la dynamique adaptative se sont centrées sur des **changements de l'environnement dus à l'action de l'homme**, tels que la pollution de l'air, la contamination par les métaux lourds ou la présence d'insecticides et d'herbicides, parce qu'ils représentent de très fortes contraintes pour les organismes. La récente prise de conscience des changements évolutifs importants et rapides résultant de l'activité humaine (Palumbi 2001) a imposé la nécessité de **comprendre la trajectoire évolutive** présente dans ces milieux pour intégrer ces connaissances à des démarches de conservation. L'intérêt croissant pour ce domaine s'est illustré par la tenue d'un colloque international en 2007 à Los

Angeles sur le thème de « Evolutionary change in Human-altered environments : An international summit to translate science into policy ».

I.2. Le processus évolutif :

I.2.1. Les forces évolutives en jeu

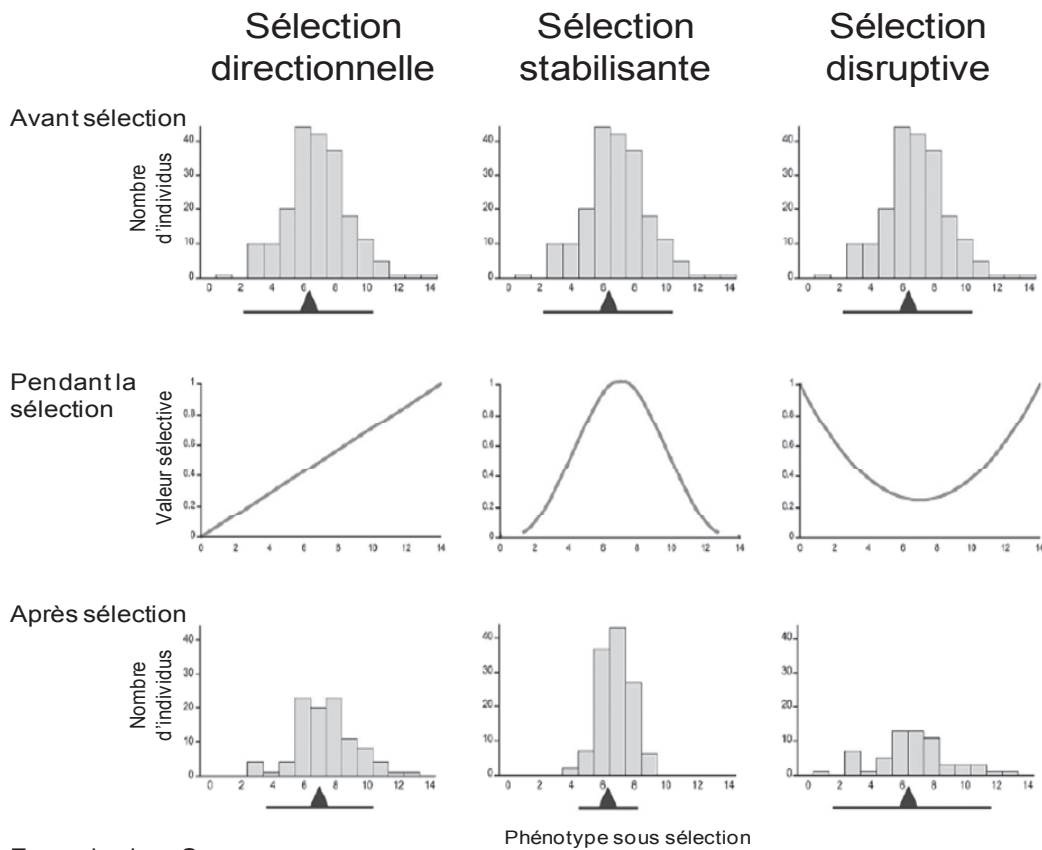
Le moteur de l'adaptation locale est la **sélection naturelle**, mais les autres forces évolutives (mutation, migration et dérive génétique) participent à ce processus en le facilitant ou le contrecarrant (Kawecki & Ebert 2004).

- La sélection naturelle

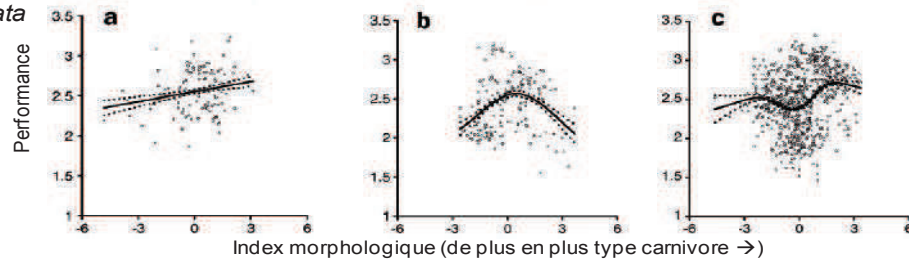
La sélection naturelle peut être définie comme le fait que des individus phénotypiquement différents aient une survie et un succès reproducteur différents et non distribués au hasard. Le processus de la sélection naturelle demande donc la présence de variations phénotypiques, avec certains individus ayant une meilleur fitness que d'autres à cause de leurs caractéristiques. Lorsque ces caractéristiques sont hérissables, la sélection peut amener à des changements évolutifs de la distribution de ces caractères. Il a été classiquement décrit que sur des caractères quantitatifs la sélection peut agir de 3 manières différentes (voir encadré I). La sélection **directionnelle** est caractérisée par une augmentation (ou diminution) de la fitness avec la valeur du trait et elle tend à diminuer la variabilité entre populations et à augmenter celle entre espèces. Dans le cas de la sélection **stabilisante** les individus avec des phénotypes intermédiaires ont une meilleure fitness, ce n'est alors pas la valeur moyenne du trait qui va changer mais la variabilité. La sélection **disruptive**, appelée également diversifiante ou divergente, favorise deux ou plus de deux phénotypes extrêmes et va amener souvent à une augmentation de la variabilité. Deux autres qualificatifs sont également utilisés pour décrire la sélection : on parlera de sélection **positive** quand une nouvelle mutation est avantageuse et de sélection **négative** quand à l'inverse une nouvelle mutation est contre sélectionnée. C'est la sélection disruptive qui décrit le mieux le cas de l'adaptation locale puisque dans chaque environnement il y aura un optimum phénotypique différent. Cependant dans la littérature sur l'adaptation locale, les termes de sélection directionnelle et sélection positive sont également utilisés puisque dans une population il y a sélection des mutations avantageuses qui confèrent un phénotype optimal.

Encadré I : les différentes formes de sélection affectant les trait quantitatifs. (D'après Kingsolver & Pfennig 2007)

La moyenne du trait dans la population est indiquée par les triangles sous les histogrammes et les barres horizontales représentent la variation autour de la moyenne (± 2 fois l'écart type).



Exemple chez *Spea bombifrons* et *S. multiplicata*



Exemple chez 2 espèces d'amphibien : Chez *Spea bombifrons* et *S. multiplicata*, qui sont en sympatrie dans le sud-est des États-Unis, les têtards utilisent de différentes manières les ressources trophiques. Il existe des formes omnivores, des formes carnivores (voir photo ci-dessus) et toute une gamme de variation entre les deux. Il a été montré par Pfennig *et al.* (2007) que, selon l'espèce et la population, le mode de sélection variait. Quand les espèces sont en sympatrie, la sélection directionnelle agit sur *S. bombifrons* (figure a) et favorise les formes carnivores. Chez *S. multiplicata* (figure b) par contre on observe une sélection stabilisante, avec des phénotypes intermédiaires. Ces processus peuvent s'expliquer par le fait que les têtards carnivores de *S. bombifrons* sont plus compétitifs que ceux de *S. multiplicata*, et que les omnivores ont un désavantage sélectif du fait d'une métamorphose plus tardive à un poids plus faible. Par contre, dans les milieux où on retrouve uniquement *S. multiplicata* c'est la sélection diversifiante qui agit (figure c). Les deux formes extrêmes sont sélectionnées ce qui permet d'éviter la compétition au sein de l'espèce.

- La mutation

La force qui permet l'apparition de nouveaux variants génétiques est appelée la mutation. Ce terme est utilisé pour décrire toutes les **modifications génétiques** aussi diverses que les délétions, les duplications ou les transpositions. Les modèles classiques qui ont exploré le processus adaptatif et la sélection naturelle supposent que l'évolution d'un caractère se fait à partir de l'apparition de **nouvelles mutations**. Le taux de mutation est à un certain niveau dans les populations, du fait de la présence de mutations avantageuses qui contrecarrent l'effet des mutations délétères qui tendent à imposer un faible taux de mutation (Kimura 1960). Il a été montré que probablement sous l'effet de la sélection naturelle, les organismes ont développé des systèmes générateurs de mutations et donc de variabilité génétique leur permettant d'affronter les contraintes environnementales (Ancel Meyers & Bull 2002). Récemment il a été proposé que la sélection puisse également agir sur la **variabilité présente dans la population** de départ (= « standing variation », voir la synthèse de Barrett & Schluter 2007) et non pas sur de nouvelles mutations. Dans ce cas l'adaptation peut se dérouler plus rapidement, puisque la mutation est déjà présente et dans une plus forte proportion. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la présence en faible fréquence d'allèles neutres ou délétères dans la population ancestrale: tout d'abord l'action de la mutation et la dérive génétique peuvent maintenir ces variants à une fréquence supérieure à $N/2$ (N =taille de la population). Ensuite des flux de gènes relativement forts ainsi que des phénomènes d'hybridation peuvent préserver ces variants malgré la sélection négative, et enfin ces variants peuvent ne pas avoir d'effet sur le phénotype dans un environnement donné (Barrett & Schluter 2007).

- La migration

Dans la nature, les populations d'une même espèce ne sont pas isolées génétiquement. A chaque génération il peut se produire des **flux géniques** entre populations qui sont généralement d'autant plus importants que les populations sont proches géographiquement. La migration est la principale force qui s'oppose à l'adaptation locale puisqu'elle entraîne une **homogénéisation** des fréquences alléliques entre populations. Dans le cas de petites populations recevant d'importants flux de gènes de grandes populations, l'interaction entre la dérive génétique et la migration peut réduire la diversité génétique, entraver l'action de la sélection et amener à la fixation de génotypes localement mal adaptés (Dias 1996 ; Bolnick & Nosil 2007). Cependant la migration peut aussi être considérée comme une force qui favorise

l'adaptation locale. L'apport de nouveaux gènes dans une population peut assurer une certaine **diversité génétique** nécessaire au potentiel adaptatif (Hoekstra *et al.* 2005).

- La dérive génétique

La dérive génétique qui est un événement stochastique peut être définie comme la **fluctuation aléatoire des fréquences alléliques** à chaque génération. Son influence est particulièrement visible dans les petites populations ou au bout d'un grand nombre de générations. Dans certains cas la dérive génétique peut être un frein à l'adaptation locale. En effet elle peut provoquer, surtout dans les petites populations, la fixation d'allèles délétères ou la perte de variants en fréquences faibles. A l'inverse, comme cela a été mentionné dans le cas de la « standing variation », cette force évolutive peut maintenir à de fortes fréquences des mutations neutres qui pourraient être avantageuses dans un autre environnement.

1.2.2. Théories sur l'adaptation locale

Le mécanisme évolutif de l'adaptation locale va dépendre de l'interaction entre la sélection naturelle et les autres forces évolutives, particulièrement la migration. Une **limitation des flux de gènes** a souvent été décrit comme un pré-requis à l'adaptation locale (Kawecki & Ebert 2004). Cette limitation peut être due à une faible dispersion mais également à un choix de l'habitat. La dispersion va également dépendre du succès des migrants dans leur nouvel habitat.

Les études théoriques sur l'adaptation locale ont montré que, dans le cas de traits quantitatifs, la différenciation entre populations est facilitée par de **faibles flux de gènes** et une forte **sélection** (voir la synthèse de Kawecki & Ebert 2004). Le cas le plus propice à l'adaptation locale semble être celui où dans un habitat 1 la sélection est forte contre les génotypes adaptés à l'habitat 2 (et vice et versa) alors que la sélection contre les génotypes intermédiaires est faible. En effet, si la sélection est forte sur les phénotypes intermédiaires la colonisation d'un nouvel habitat par une population adaptée à un autre habitat va être difficile (Kawecki 1995 ; Day 2000 ; Kisdi 2002). Il en résultera alors un « équilibre asymétrique », montrant des flux de gènes asymétriques et une structure de populations de type source - puits. Il est alors difficile pour les allèles adaptatifs d'augmenter en fréquence. A l'inverse une trop faible

sélection sur les phénotypes intermédiaires conduit à une augmentation en fréquence des génotypes généralistes et donc à une faible différenciation.

Un autre facteur qui paraît déterminer la dynamique adaptative est la **variation temporelle des forces de sélection**. En effet la fluctuation temporelle de la qualité de l'habitat va favoriser les phénotypes généralistes, augmenter la migration et donc limiter l'adaptation locale (Kisdi 2002).

L'incapacité des populations à évoluer vers une plasticité optimale semble également un pré-requis à l'adaptation locale. En effet, en l'absence de **contraintes et de coût à la plasticité**, dans un environnement hétérogène, un génotype ayant la meilleur fitness dans chaque habitat peut être fixé. Il y aura alors une différenciation phénotypique mais pas génétique.

Un dernier facteur qui a été montré comme influençant l'adaptation locale est la capacité de **croissance des populations** dans un nouvel environnement (Reznick & Ghalambor 2001). En effet dans les petites populations la stochasticité démographique peut amener à des événements d'extinction et être un frein à la dynamique adaptative. La colonisation de nouveaux environnements avec une compétition réduite, comme dans le cas des sites miniers dénudés, peut donc être, en permettant l'expansion des populations, favorable à l'adaptation locale.

I.3. Comprendre les mécanismes génétiques de l'adaptation locale

Pour appréhender le processus évolutif de l'adaptation locale, il est important de pouvoir relier les caractères adaptatifs à leur base génétique, pour ensuite comprendre la place de ces bases génétiques dans ce processus. Deux types d'approches complémentaires permettent d'explorer les bases génétiques de l'adaptation : (1) regarder **les traces laissées par la sélection** dans le génome et sur les traits, et (2) identifier **l'architecture des caractères** quantitatifs adaptatifs.

I.3.1 Chercher les traces de sélection disruptive

- Dans le génome

Pour identifier les traces de sélection disruptive dans une partie du génome ou sur un gène il est possible d'utiliser la méthode du **criblage génomique**. Le principe de cette méthode

repose sur le fait que les événements démographiques (goulot d'étranglement, effets de fondation ou migration) affectent de la même manière l'ensemble du génome alors que la sélection a une **action locus-spécifique** (Luikart 2003). Le criblage génomique repose donc sur deux hypothèses fondamentales. D'une part sur le fait que la sélection laisse une signature dans le génome et d'autre part sur le fait qu'une variabilité atypique par rapport au reste du génome est une trace de sélection. La détection des traces de la sélection se base alors sur le phénomène du balayage sélectif : la sélection directionnelles à un locus entraîne l'augmentation en fréquence de l'allèle favorable ainsi que des allèles neutres proches qui lui sont liés (Maynard Smith & Haigh 1974 ; voir Figure 2). L'intensité du balayage sélectif dépendant essentiellement du ratio entre le taux de recombinaison et l'intensité de la sélection. Le criblage génomique est également appelée « génomique des populations » puisqu'il a la particularité de s'intéresser à la variabilité du génome en **population naturelle**. La recherche de la sélection peut se faire sur un échantillon représentatif du génome choisi aléatoirement, on parlera alors de criblage génomique exploratoire. Elle peut aussi se faire sur des gènes dont on connaît la fonction, on parlera alors d'approche gènes candidats.

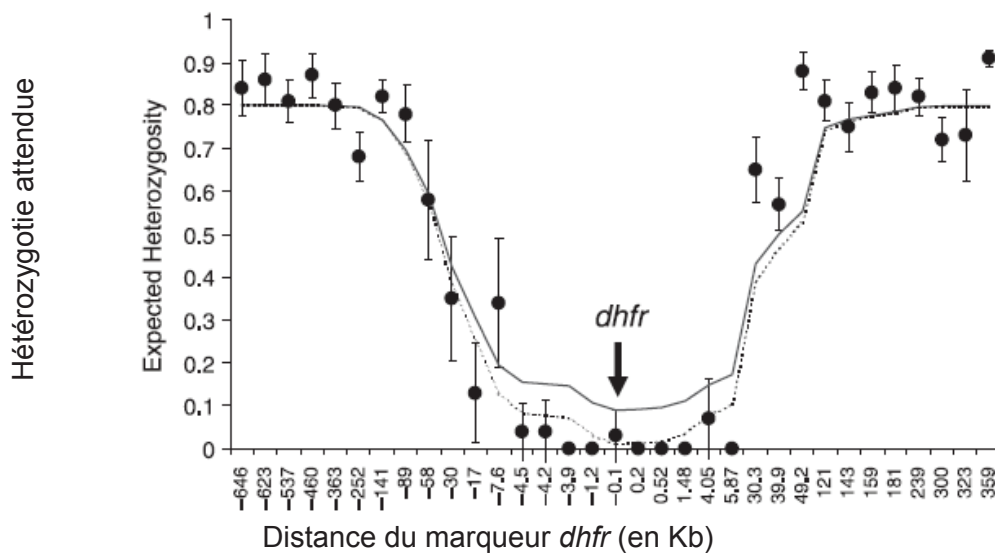


Figure 2 : Exemple de balayage sélectif sur le chromosome 4 de *Plasmodium falciparum* (parasite de la malaria) en Asie du sud-est (D'après Nair *et al.* 2003). Le gène *dhfr* impliqué dans la résistance aux médicaments montre une forte réduction de sa variabilité sous l'effet de la sélection positive. Les locus autour de ce gène ont le même comportement : plus on s'éloigne de *dhfr*, plus l'effet de la recombinaison sera important et moins l'influence de la sélection positive sur *dhfr* se verra.

Les traces de la sélection dans le génome vont apparaître différentes selon le niveau auquel on les regarde :

(i) **A l'intérieur d'une population** la sélection positive va provoquer une diminution de la **diversité** au gène cible ainsi qu'aux variants neutres liés. Schlötterer (2002) a proposé une méthode pour mesurer cette réduction de la variabilité sur des marqueurs microsatellites : le test $\ln RV$ et $\ln RH$, qui regarde la variance de taille des allèles et de l'hétérozygotie attendue dans des paires de populations. Le principe de ce test repose sur le fait qu'en absence de sélection et pour de nombreux scénarios démographiques le ratio des variances entre les deux populations suit une distribution log normal (Schlötterer 2002 ; Kauer *et al.* 2003) La distribution des ratios $\ln RV$ et $\ln RH$ pour tous les locus considérés permet d'identifier les locus qui ont un comportement extrême par rapport à cette distribution et qui ont donc très probablement subi un balayage sélectif dans une des populations.

(ii) La sélection peut également être détectée en regardant la **différentiation entre populations**. Les locus sous sélection disruptive montrent une plus forte différenciation qu'attendue sous neutralité. La première méthode pour mesurer cet écart à la neutralité a été proposée par Lewautin & Krakauer (1973). Le principe est de détecter les locus montrant une variance inter-locus du F_{ST} (un estimateur de la différenciation génétique entre populations) déviant d'une variance théorique. Ce test a été à plusieurs reprises critiqué parce que la variance inter-locus théorique du F_{ST} est sous évaluée sous certains modèles démographiques, par exemple s'il existe une corrélation entre les fréquences alléliques dans les différentes populations (Nei & Maruyana 1975 ; Robertson 1975). Plusieurs modifications successives ont été apportées à ce test pour le rendre plus fiable et cela a abouti à **2 grands types de tests** utilisés aujourd'hui en routine (voir encadré II) qui ont pour principe la comparaison entre une distribution empirique et une distribution simulée. De nombreuses études ont utilisé en parallèle ces deux approches pour minimiser le taux de faux positifs (Vasemägi & Primmer 2005; Bonin *et al.* 2006; Oetjen & Reusch 2007; Tsumura *et al.* 2007). Dans le cas d'un très grand nombre de marqueurs, ont également été utilisées des méthodes libres de modèle démographique. Le grand nombre de marqueurs permet d'estimer une distribution empirique d'une statistique (par exemple le F_{ST}) et d'identifier ceux qui ont un comportement extrême par rapport à cette distribution (Akey *et al.* 2002).

Encadré II : Les 2 grands types de méthodes d'analyse de la différenciation entre population utilisé lors d'un criblage génomique

1

2

Statistique

Distribution des F_{ST} en fonction de l'hétérozygotie

Distribution d'une statistique F_i dans une population 1 en fonction de cette même statistique dans une population 2

Modèle de simulation

Modèle en île avec migration à l'équilibre mutation-dérive génétique

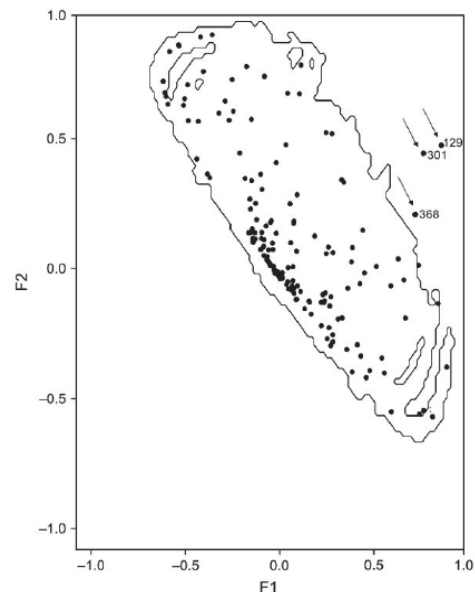
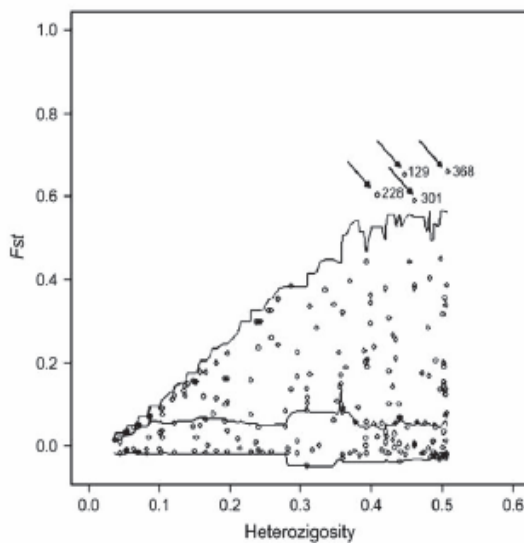
Modèle de pure divergence sans migration

Intérêts

Robuste à un grand nombre de modèle démographique et à un taux de mutation différent entre locus

Analyse par paire de populations. Considère que les populations peuvent être de tailles différentes. Robuste à un écart au modèle

Exemples



D'après Bonin *et al.* 2006, chaque point représente la statistique pour un locus empirique. L'enveloppe représente l'intervalle de confiance à 95% estimé à partir des données simulées. Les locus en dehors de l'enveloppe de neutralité sont considérés comme potentiellement sous sélection.

Développé par

Beaumont & Nichols 1996 ; Beaumont & Balding 2004 ; Antao *et al.* 2008 ; Foll & Gaggiotti 2008 ; Riebler *et al.* 2008

Vitalis *et al.* 2001 ; Vitalis *et al.* 2003

L'**intérêt** d'utiliser le criblage génomique est multiple :

- (1) cette méthode est adaptée aussi bien à des **espèces model** que **non model** puisqu'elle peut être réalisée avec des marqueurs qui ne demandent pas de connaissance approfondie du génome.
- (2) Cette méthode ne requiert pas de mesure phénotypique, ce qui permet de ne pas partir d'un **a priori sur les traits adaptatifs**.
- (3) Cette méthode tire avantage des **nombreuses recombinaisons** historiques dans les populations naturelles. Les parties du génome montrant des traces de sélection sont donc de petite taille ce qui facilite l'identification de gènes candidats dans ces zones.

Le grand nombre de **faux positifs** est la principale limite de cette méthode (Storz 2005). En effet, des locus peuvent montrer un comportement divergent simplement par le fait du **hasard** (erreur de type I) à cause du grand nombre de marqueurs analysés. D'autre part certains **événements démographiques** (effet de fondation, goulot d'étranglement) peuvent laisser les mêmes traces dans le génome que la sélection et amener à une mauvaise interprétation du motif de différenciation. Des tests de robustesse de Dfdist et Detsel ont montré que ces méthodes étaient relativement peu sensibles au non-respect des hypothèses de départ (Beaumont & Nichols 1996 ; Vitalis *et al.* 2001). Cependant un écart trop important au modèle sous-jacent simulé peut tout de même provoquer l'identification de faux positifs (Beaumont & Nichols 1996). Le challenge dans l'utilisation de ces méthodes est donc de : (1) limiter les erreurs de type I, (2) identifier les locus ayant un comportement divergent pour une autre raison que la sélection, (3) relier les traces de sélection à un facteur écologique. Caballero *et al.* (2008) ont montré que ces méthodes pouvaient être très performantes dans le cas d'une **forte pression** de sélection et d'une **faible différenciation** génétique.

- Sur des traits

Pour pouvoir disséquer les bases génétiques des traits quantitatifs il est important tout d'abord de pouvoir estimer leur **valeur adaptative**. Une méthode, de plus en plus couramment utilisée pour identifier le rôle de la sélection dans la divergence entre les phénotypes, est la comparaison entre la **différenciation génétique à des traits quantitatifs** (estimée avec le Q_{ST}) et celle à des **marqueurs moléculaires neutres** (estimée avec le F_{ST}) (voir la synthèse de Whitlock 2008 et la méta-analyse de Leinonen *et al.* 2007). Le principe de cette méthode est qu'un caractère quantitatif à base génétique purement additive, évoluant dans différentes

populations sous le seul effet de la dérive génétique, aura un niveau de différenciation du même ordre que celui observé pour des marqueurs neutres (Whitlock 1999). Un écart à cet état est interprété comme une preuve de sélection et nous indique le type de sélection en jeu. La sélection disruptive amène à une différenciation entre phénotypes dans des environnements différents. Il est donc attendu que la part de variance entre populations dans la variance totale, pour le caractère quantitatif, soit supérieure à celle observée pour les marqueurs supposés neutres, et que par conséquent le Q_{ST} soit supérieur au F_{ST} . La sélection stabilisante quand elle va favoriser le même phénotype dans des environnements différents, ce qui se traduit par un Q_{ST} inférieur au F_{ST} .

Cette méthode a fait l'objet de nombreux débats à cause de **fortes hypothèses sous jacentes** et de possibles **biais dans l'estimation de la différenciation** (voir tableau I) pouvant conduire à une sur estimation de l'effet de la sélection locale.

Tableau I : Les principales hypothèses et sources de biais pouvant affecter la comparaison Q_{ST} vs F_{ST}

	Ecart à une hypothèse forte	Biais méthodologique
Affectant le Q_{ST}	<ul style="list-style-type: none"> • Les bases génétiques ne sont pas purement additives, il peut exister des effets de dominance et d'épistasie (Whitlock 1999 ; López-Fanjul <i>et al.</i> 2003) • Les traits neutres peuvent montrer un important déséquilibre de liaison au sein des populations (Porcher <i>et al.</i> 2004) 	<ul style="list-style-type: none"> • estimation peu précise de la variance inter population quand le nombre de population est faible (O'Hara & Merilä 2005) • Interaction génotype x environnement (Porcher <i>et al.</i> 2004)
Affectant le F_{ST}	<ul style="list-style-type: none"> • Les marqueurs considérés peuvent ne pas être tous véritablement neutres (Palo <i>et al.</i> 2003) • Le taux de mutation aux marqueurs neutres est fort par rapport au traits quantitatifs (Hendry 2002) 	

De plus il est difficile d'obtenir avec un petit nombre de populations des estimations précises pour les Q_{ST} ainsi que pour leur erreur standard (O'Hara & Merilä 2005). Cependant cette méthode a été validée par plusieurs études empiriques (Volis *et al.* 2005 ; Porcher *et al.* 2004 ; Porcher *et al.* 2006 ; Leinonen *et al.* 2007) et théoriques (Le Corre & Kremer 2003 ; Goudet & Buchi 2006 ; Goudet & Martin 2007) et elle a été appliquée avec succès dans de nombreuses études portant, par exemple, sur la sélection dans des environnements hétérogènes (van Weetberg *et al.* 2007), dans des gradients environnementaux (Waldmann *et al.* 2005; Hall *et al.* 2007), entre écotypes (Conde-Padín *et al.* 2007 ; Jiménez-Ambriz *et al.* 2007; Manier *et al.* 2007) et entre sous-espèces (Jorgensen *et al.* 2006). Les comparaisons Q_{ST}/F_{ST} constituer un outil exploratoire très intéressant pour détecter des traits sous sélection parmi un ensemble de trait sur lequel n'existe pas d'*a priori* clair (Whitlock 2008 ; Leinonen *et al.* 2007).

1.3.2 Identifier l'architecture des caractères quantitatifs

Les méthodes permettant d'identifier les bases génétiques des caractères adaptatifs se basent sur l'**association statistique** entre des **variations phénotypiques** et celles à des **marqueurs génétiques** et ce, soit dans des populations naturelles ou des collections aux bases génétiques larges (génétique d'association), soit dans des croisements (cartographie QTL, quantitative trait loci). Ces méthodes demandent un **grand nombre de marqueurs moléculaires** représentatifs du génome.

- Cartographie QTL

Cette approche est la plus classique pour mettre en évidence les bases génétiques des traits quantitatifs. La démarche mise en œuvre consiste tout d'abord à croiser **2 lignées parentales** présentant des **phénotypes contrastés** pour un caractère pour former une population F1. Les individus de cette population sont alors rétro-croisés pour former une **génération F2** qui est phénotypée pour le trait d'intérêt et génotypée pour des marqueurs polymorphes chez les parents. Ces croisements permettent de mixer aléatoirement par recombinaison l'ensemble des gènes parentaux gouvernant le caractère et donc d'avoir de nouvelles combinaisons alléliques avec des effets quantitatifs différents. L'analyse de l'association entre la variation du caractère et les allèles aux différents locus permet **d'identifier les QTL** qui sont ensuite **placés sur une carte génétique**.

La cartographie QTL a été largement utilisée avec succès depuis plus de 80 ans (première étude par Sax en 1923) notamment chez les plantes (voir Holland 2007). Elle permet d'avoir une bonne compréhension du **nombre de QTL** impliqués dans la variation d'un caractère ainsi que de leur **position approximative** et de leur **effet individuel** sur le caractère. Cependant la principale limite de cette méthode est la **taille des QTL**, généralement entre 3 et 10 cM (MacKay 2003), ce qui ne permet pas d'identifier directement les gènes impliqués dans le caractère mais uniquement une **région chromosomique**. Cette taille importante provient du faible nombre de recombinaisons en jeu qui est insuffisant pour réduire les liaisons à de petites régions génomiques. Une autre limite de cette approche est le fait que les QTL identifiés vont dépendre des parents utilisés pour le croisement ainsi que de la manière dont est mesuré le phénotype. Pour avoir une compréhension plus large de l'architecture du caractère il peut être utile d'utiliser plusieurs croisements de parents différents avec des mesures de phénotype dans des environnements différents.

- Génétique d'association

La génétique d'association, appelé également **cartographie par déséquilibre de liaison** (« LD mapping », « genome wide association mapping ») quand les marqueurs sont positionnés sur une carte, regarde l'association entre des marqueurs moléculaires et des phénotypes dans des **populations naturelles**. Les marqueurs en déséquilibre de liaison avec le locus expliquant des phénotypes particuliers ou des marqueurs précisément dans ce locus vont alors montrer une association significative. Cette méthode demande un plus grand nombre de marqueurs que pour la détection des QTL à cause du grand nombre de recombinaisons historiques dans les populations. Ce grand nombre de recombinaisons, qui peut paraître une limite de cette méthode, est en fait un avantage puisqu'il assure une **localisation beaucoup plus fine** des régions génomiques impliquées dans un caractère. Cette méthode est de plus en plus utilisée pour disséquer les traits quantitatifs chez des **espèces modèles** (Farnir *et al.* 2000; International HapMap consortium 2005; Dixon *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2007; Ducrocq *et al.* 2008) mais également chez des **espèces non modèles** (Neale & Savolainen 2004; Skot *et al.* 2005; Gonzalez-Martinez *et al.* 2007). Néanmoins une limite existe à la génétique d'association : l'identification de **faux positifs** due à la **structure des familles et des populations** ou provenant simplement du hasard dans le cas d'un très grand nombre de marqueurs. Pour limiter ce biais plusieurs modèles ont été développés pour inclure comme co-variable la structure des populations lors de l'analyse de l'association génotype-

phénotype (Pritchard *et al.* 2000; Thornsberry *et al.* 2001; Yu *et al.* 2006). Ces modèles peuvent être utilisés dans l'analyse de marqueur SNP (single nucleotide polymorphism) et de microsatellite (Bradbury *et al.* 2007).

1.3.3 Complémentarité de ces différentes méthodes

Les différentes méthodes présentées précédemment, du fait de **leurs limites respectives** et des **informations distinctes** qu'elles apportent, peuvent être considérées comme des approches complémentaires (Vasemägi & Primmer 2005 ; Strinchcombe & Hoekstra 2008). D'un point de vue **méthodologique**, la combinaison entre une approche permettant une localisation précise dans le génome mais présentant des faux positifs (criblage génomique ou génétique d'association) et une approche identifiant de grandes régions chromosomiques de manière très fiable (cartographie QTL) permet une **identification robuste des gènes** impliqués dans une adaptation ou un caractère (Zhao *et al.* 2007 ; Manenti *et al.* 2009). D'un point de vue évolutif, la combinaison entre une approche regardant les parties du génome sous sélection positive (criblage génomique) et une approche identifiant les gènes impliqués dans l'architecture d'un trait quantitatif (cartographie QTL et génétique d'association) permet de **comprendre la place de ces bases génétiques** dans le processus adaptatif (Nosil *et al.* 2009). Il est également important de pouvoir estimer la valeur adaptative d'un trait quantitatif dont on recherche les bases génétiques. Cela est possible en combinant des travaux de génétique quantitative avec une approche Q_{ST}/F_{ST} sur les traits.

II. Le cas de l'adaptation locale aux sites métallifères

II.1 Définition et caractéristiques écologiques des sites métallifères

Les sites métallifères sont des milieux où les sols présentent une **très forte concentration en métaux lourds** (cadmium, chrome, cuivre, plomb, mercure, nickel, zinc pour les plus courants) ou/et en **métalloïdes** (arsenic, sélénium) à un niveau toxique pour la plupart des êtres vivants. Il a été distingué quatre types de sites métallifères en fonction de l'assemblage de métaux présents dans le sol : les sites cupro-colbatifères (cuivre, cobalt), les sites serpentiniques (nickel), les sélénifères (sélénium) et les sites calaminaires (zinc, cadmium,

plomb) (Baker & Brooks 1989). Les sites métallifères sont également classés en fonction de **l'origine et du type de la contamination**. Cette classification est importante parce qu'elle correspond à différentes époques dans l'histoire de la contamination des milieux par l'homme et donc à des histoires évolutives différentes.

Tous les sites métallifères ne sont pas d'origine anthropique. Il existe à la surface de la Terre des **affleurements métallifères naturels** qui sont considérés comme des anomalies géochimiques. Les communautés végétales présentes dans ces milieux ont une histoire évolutive longue à l'échelle de plusieurs milliers d'années et constituent les populations métallophiles les plus diversifiées (Ernst 2006).

L'exploitation des métaux par l'homme a commencé à l'âge de bronze et s'est poursuivie durant **l'antiquité et le moyen âge** en gagnant en intensité sur des zones de plus en plus grandes. Les déblais résultant de ces activités minières ont généralement été déposés à proximité des sites d'excavations, **contaminant ainsi les abords des mines**. Ces sites peuvent être caractérisés par une contamination en métaux lourds au niveau des terrils qui montrent un sol drainant et pauvre en éléments minéraux. Les populations sur ces sites peuvent avoir une histoire évolutive de plusieurs centaines d'années.

A partir du début de **l'ère industrielle au 19^{ème} siècle**, l'activité liée aux métaux a beaucoup gagné en **intensité** amenant à une séparation entre les lieux d'excavation et **les lieux de traitement des métaux**. Les terrils constitués d'amas grossiers de scories et de cendres se trouvent alors dans des sites qui n'ont pas connus précédemment une forte concentration en métaux. Le traitement des métaux amène également une forte **pollution de l'air et de l'eau** provoquant un dépôt de particules métalliques **en dehors des zones de stockage des déchets**. On constate alors généralement un gradient de contamination depuis la source de pollution. Dans la suite de ce travail nous nous intéresserons uniquement aux milieux métallifères d'origine anthropique et particulièrement à ceux résultant de l'activité industrielle. En effet, ces milieux récents (maximum 150 ans) sont le siège de conditions extrêmes pour les organismes vivants.

Les milieux métallifères d'origines industrielles sont généralement des **milieux ouverts avec une végétation en mosaïque**, constitués de petites zones boisées et de pelouses rases peu diversifiées (Ernst 1990). Les espèces constituant ces communautés, généralement des herbacées, sont qualifiées de **métallophytes** (Antonovics *et al.* 1971). Elles peuvent être accompagnées d'espèces arborescentes se maintenant surtout de manière végétative,

l'établissement par des graines étant très rare. Parmi les métalrophytes, il faut distinguer les **métalrophytes absolues** (ou eumétalrophytes ou métalrophytes strictes) qui sont endémiques des sites pollués, et les **pseudométalrophytes** qui se développent à la fois sur des sites pollués (populations métallicoles, M) et sur des sites non pollués (populations non métallicoles, NM). Les pseudométalrophytes, du fait de la colonisation de deux types de milieux, sont des **modèles particulièrement intéressants pour étudier l'adaptation locale** et la dynamique évolutive dans des milieux particulièrement contraignants pour la plupart des organismes vivants.

II.2 Les contraintes présentes dans les sites métallifères

Les milieux métallifères sont des habitats complexes qui peuvent présenter plusieurs sources de stress pour les êtres vivants : la présence de **métaux** à de très fortes concentrations, une **carence en nutriments** dans le sol, une **sécheresse** importante et une forte **hétérogénéité spatiale** des conditions environnementales (Antonovics *et al.* 1971 ; Macnair 1997).

II.2.1 La présence de métaux lourds

La présence des métaux lourds à de fortes concentrations est une pression de sélection très importante puisque leurs **actions au niveau cellulaire** (mutations, dysfonctionnements enzymatiques, peroxydation des lipides, voir la synthèse de Foy 1978 et Briat & Lebrun 1999) entraînent la mort de la plupart des organismes vivants. Par conséquent, seules les espèces ayant développé des **stratégies de tolérances aux métaux** peuvent survivre dans les milieux métallifères. Deux définitions de la tolérance aux métaux lourds sont usuellement utilisées : **les physiologistes** considèrent que la tolérance est « l'ensemble des mécanismes homéostatiques (transport, chélation, séquestration) permettant de maintenir la concentration des métaux essentielles dans les limites physiologiques, minimisant ainsi les effets délétères des métaux non essentiels » (Clemens *et al.* 2001) ; **les biologistes des populations** et écologues replacent la tolérance dans le contexte écologique et la définissent comme « la capacité d'une plante à survivre et à se reproduire sur des sols toxiques ou défavorables à la plupart des autres organismes en raison d'une contamination métallique » (Antonovics *et al.* 1971). La forte concentration en métaux étant la plus évidente contrainte présente dans les milieux métallifères, c'est elle qui a été préférentiellement étudiée. De nombreuses études

documentent la distribution de la tolérance aux métaux lourds dans les espèces, son évolution et ses bases génétiques.

- Mesure de la tolérance aux métaux lourds

Le succès des **tests de survie à court terme**, sur des plantules ou des propagules en **culture hydroponique**, pour classer des espèces, populations ou génotypes en fonction de leur niveau de tolérance en fait une **approche classique** pour estimer la tolérance. Cette approche a été proposée pour la première fois par Wilkins (1957 cité dans Wilkins 1978) et consiste à mesurer **la croissance des racines** de plantules ou propagules en condition contaminée (avec une certaine concentration de métal), et en conditions témoins (sans ajout de métal). Le rapport entre ces deux mesures permet d'estimer un **indice de tolérance (IT)** conduisant ainsi à une mesure quantitative de la tolérance. Macnair (1983) a proposé une variante à ce test pour se détacher du biais dû à la possible dépendance de l'indice de tolérance à la croissance intrinsèque des racines. En effet l'indice de tolérance intègre à la fois le taux intrinsèque de croissance (déterminé par des gènes qui ne sont pas impliqués dans la tolérance) et la croissance liée à la tolérance. Les gènes non impliqués dans la tolérance peuvent ne pas avoir le même effet sur les deux composantes de l'indice de tolérance et donc influencer sa valeur. Le principe de la méthode de Macnair (1983) est d'estimer la tolérance par une mesure qualitative *i.e.* par **la capacité à produire des nouvelles racines ou non**, dans une solution hydroponique avec une dose fixe de métal. Cette méthode étant inadéquate pour mesurer des variations quantitatives de la tolérance et étant dépendante de la concentration choisie, Schat & Ten Bookum (1992) ont proposé un **test séquentiel**, au cours duquel les mêmes individus sont exposés à des concentrations croissantes de métal dans la solution de culture. Le niveau de tolérance d'un génotype est alors défini comme étant **la plus petite concentration stoppant sa croissance racinaire** (=EC100, effective concentration 100%). Ce test permet d'appréhender les variations quantitatives mais il n'est pas réellement une mesure quantitative puisque l'EC 100 est défini en fonction du critère absence/présence de croissance des racines. De plus, dans ce test il y a un effet temporel, l'exposition à une concentration précédente plus faible à un effet sur la réponse à une concentration plus forte, ce qui peut provoquer une sous estimation de la variabilité dans les populations les plus tolérantes (Schat & Ten Bookum 1992). C'est pourquoi durant ses dernières années, selon le type de résultats recherchés, les tests basés sur les IT ou sur l'EC 100 ont été utilisés de manière égale.

Le choix de mesurer la **réponse des racines** pour estimer la tolérance aux métaux se base sur des travaux de Bradshaw (1952) et sur le principe simple que, dans le cadre d'un test à court terme, le premier organe en contact avec le métal est celui où se manifesterait en premier la toxicité des métaux. Cependant ce critère doit être discuté en fonction de l'espèce étudiée. Par exemple chez les espèces hyperaccumulatrices, où le métal est transloqué de manière très efficace vers les feuilles où il est stocké, on pourrait s'attendre à ce que la toxicité des métaux se manifeste prioritairement dans les feuilles. C'est ce qui a été observé chez *Thlaspi caerulescens* où la **chlorose des feuilles** semble être un bon indicateur de la tolérance aux métaux (Assunção *et al.* 2003a). Cependant ce cas n'est pas généralisable à toutes les pseudométallophytes puisque Galardi *et al.* (2007) ont montré que chez *Alyssum bertolonii*, les racines étaient un meilleur indicateur de la tolérance probablement à cause d'une plus grande quantité de métaux libres dans les racines que dans les feuilles.

Les tests de tolérance en hydroponie ont la qualité d'être **très reproductibles** dans le temps et dans l'espace et permettent de **contrôler de manière précise l'origine du stress subi par les plantes** (un, ou une combinaison de métaux, sous une forme et à des concentrations connues). C'est pourquoi ces tests ont été utilisés et sont toujours utilisés de manière classique pour décrire la tolérance des espèces, populations ou génotypes. Cependant il ne faut pas oublier qu'ils ne permettent d'observer qu'une **partie de la variabilité génétique** dans la réponse aux métaux. En effet la présence de métaux peut avoir un effet important sur la phase reproductive (Ernst & Nelissen 2000 ; Ryser & Sauder 2006).

- Stratégie de tolérance aux métaux lourds

Les plantes présentent de nombreux mécanismes qui peuvent potentiellement permettre la tolérance aux métaux lourds. Il s'agit plutôt de **mécanismes préventifs**, qui maintiennent la concentration en métaux à des niveaux non toxiques dans les sites sensibles de la cellule, plutôt qu'une augmentation de la résistance aux métaux de ces sites. Ces mécanismes préventifs permettent d'assurer la tolérance de l'organisme de deux manières différentes : soit par l'**exclusion**, soit par l'**accumulation** (Baker 1981). Les espèces excluantes et accumulatrices sont distinguées par la valeur du rapport « concentration du métal dans les parties aériennes / concentration dans les racines » qui est respectivement dans ces deux cas <1 ou >1.

La stratégie d'exclusion (Figure 3 1-4) est parfois considérée comme un **mécanisme de résistance** (Verkleij & Schat 1990) plutôt que de tolérance puisqu'il s'agit d'empêcher l'absorption des métaux (stratégie d'évitement). Elle est plus communément observée chez les bactéries, les champignons et les algues (Baker & Walker 1990). Chez les végétaux supérieurs, les mécanismes d'exclusion se font principalement au niveau de deux structures : les **champignons mycorrhiziens** qui peuvent réduire le mouvement des métaux vers les racines de la plante hôte par des mécanismes très divers (Hall 2002) et les **cellules racinaires** qui peuvent produire des exsudats et dont les membranes peuvent réduire l'entrée des métaux ou stimuler l'efflux des métaux rentrés dans le cytosol.

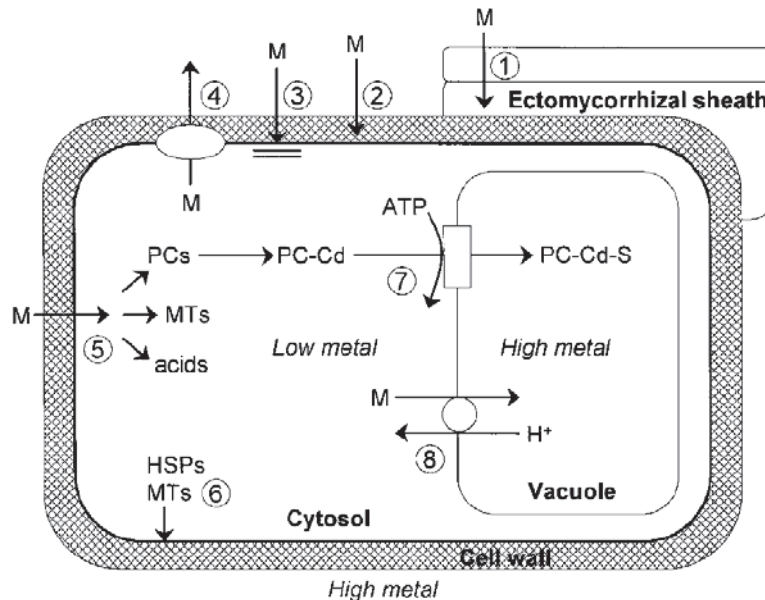


Figure 3 : Résumé des différentes stratégies de tolérance aux métaux lourds chez les plantes (D'après Hall 2002). La lettre M désigne le métal. Les mécanismes possibles permettent une stratégie d'exclusion sont (1) la réduction de l'entrée des métaux dans la racine par les mycorhizes, (2) la fixation aux parois de la racine et la production d'exsudats, (3) la réduction du transport à travers la membrane, (4) l'efflux actif. Les mécanismes qui participent à la stratégie d'accumulation sont : (5) la chélation dans le cytosol par divers liguands, (6) la réparation et la protection de la membrane plasmique, (7) le transport des métaux complexés (PC-Cd) dans la vacuole, (8) le transport et l'accumulation du métal dans la vacuole.

La stratégie d'accumulation (Figure 3 5-8) consiste à **concentrer le métal dans les tissus aériens**, ce qui implique des mécanismes d'absorption des métaux par les racines, de transport actif des racines vers les parties aériennes, et de chélation et séquestration dans ces parties aériennes. Le niveau d'accumulation peut être très différent selon les espèces depuis une concentration à peine supérieure à celle du sol jusqu'à des niveaux représentant un

pourcentage significatif du poids sec de la plante (Baker *et al.* 2000). Parmi les accumulatrices se distinguent les espèces **hyperaccumultrices** dont la concentration en métal dans les organes aériens dépasse un seuil de 0,01% à 1% (selon les métaux) du poids sec des feuilles (Brooks 1998). Le lien entre la tolérance et l'hyperaccumulation reste flou malgré de nombreuses études phénotypiques et génétiques sur ces caractères (Meerts & Van Isacker 1997 ; Macnair *et al.* 1999 ; Escarré *et al.* 2000 ; Bert *et al.* 2002 ; Bert *et al.* 2003 ; Frérot *et al.* 2005). D'autres hypothèses pour expliquer l'apparition de l'hyperaccumulation ont été proposées, comme la défense contre les herbivores ou une plus grande résistance au stress hydrique (voir Boyd & Martens 1992) mais aucune n'a pu être validée expérimentalement.

- Evolution de la tolérance aux métaux lourds

La tolérance aux métaux lourds a été décrite très tôt comme un **caractère héritable, contrôlé génétiquement** (Prat 1934) sur lequel peut donc agir la sélection naturelle. Ce caractère est observé chez un nombre réduit d'espèces mais dans de nombreuses familles différentes (Baker & Proctor 1990) et est donc apparu vraisemblablement de manière **indépendante**. Au sein des familles, l'évolution de la tolérance ne s'est généralement pas déroulée dans toutes les tribus et dans toutes les espèces au sein des tribus (Ernst 2006, exemple chez les Brassicaceae en Figure 4). Pour ce qui est de l'évolution de la tolérance au sein des espèces, elle pourrait également se dérouler de manière indépendante. En effet plusieurs études ont montré d'une part, que certaines populations métallicoles (M) avaient une origine indépendante (Schat *et al.* 1996; Vekemans & Lefèbvre 1997; Koch *et al.* 1998; Mengoni *et al.* 2001; Pauwels *et al.* 2005) et que d'autre part, les niveaux de tolérance entre ces populations M variaient (Meerts & Van Isacker 1997; Smith & Macnair 1998; Schat *et al.* 1993; Pauwels *et al.* 2006; Mengoni *et al.* 2007).

Deux études sont classiquement citées pour montrer la **rapidité de l'évolution** de la tolérance dans les milieux métallifères d'origine anthropique. Ainsi, Wu *et al.* (1975) ont montré que chez *Agrostis stolonifera* des pelouses métallifères âgées seulement de 4 et 14 ans avaient augmenté leur tolérance, alors que les populations NM avaient des capacités de tolérance faibles. Le niveau de tolérance chez cette espèce semble de plus lié à l'âge des populations puisque les populations les plus anciennes (70 ans) ont montré le niveau de tolérance le plus important. Al-Hiyaly *et al.* (1988) ont montré de la même manière chez *Agrostis capillaris* que des populations exposées au zinc (Zn), et ce à la suite de l'installation de pylônes

galvanisés 20 à 30 ans auparavant, montraient des capacités de tolérances proches de celles de populations sur des sites miniers anciens. L'évolution rapide de la tolérance suggère l'existence de **génotypes tolérants au sein des populations NM** de certaines espèces. Cela a en effet été observé chez plusieurs espèces pseudométallophytes (Walley *et al.* 1974 ; Gartside & McNeilly 1974 ; Al-Hiyali *et al.* 1993).

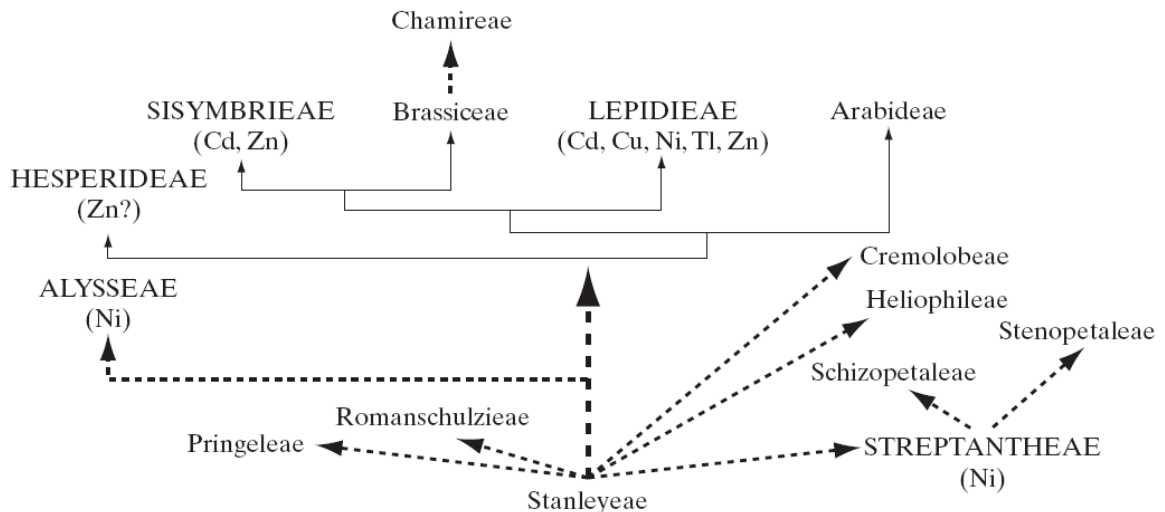


Figure 4 : Evolution de la tolérance aux métaux lourds au sein des Brassicaceae (D'après Ernst 2006). Les flèches représentent les relations phylogénétiques entre les différentes tribus. Les initiales des métaux indiquent les tribus où certaines espèces sont tolérantes à ces métaux.

Macnair (1987 ; 1997) s'est basé sur les travaux en biologie évolutive et en génétique pour proposer un **scénario de la dynamique adaptative possible** dans les milieux métallifères : la colonisation initiale de ces milieux se ferait par un **faible nombre d'individus** et serait suivi par une **expansion rapide** de la population due à la faible compétition. La forte sélection dans ce nouveau milieu amènerait la **fixation rapide** des allèles favorables à des gènes majeurs. La sélection pourrait également agir sur des gènes qui ne sont pas liés à la tolérance mais à d'autres contraintes du milieu. Dans un second temps une adaptation plus fine impliquerait plusieurs gènes modificateurs et pourrait expliquer les **variations de tolérance** entre populations M.

Cependant, il ne faut pas oublier que l'évolution de la tolérance dépend de l'espèce et de la localisation considérée, puisqu'elle va être conditionnée par le rapport entre l'intensité de la pression de **sélection** exercé par la présence des métaux et les **flux de gènes** entre populations M et NM. Elle va également dépendre, du **déterminisme génétique** de la tolérance, et de la

présence ou non d'un **coût à la tolérance**. Le coût à la tolérance est le fait que les individus tolérants aient une fitness moindre par rapport au non tolérant dans un milieu non métallifère. La présence d'un coût a été suggérée par plusieurs études (Lefèbvre & Vernet 1990 ; Escarré *et al.* 2000) mais n'a jamais pu être prouvé (Nicholls & McNeilly 1985 ; Harper *et al.* 1997 ; Dechamps *et al.* 2007a).

Dans le cas des **espèces pseudométallophytes non constitutivement tolérantes**, la tolérance aux métaux lourds des populations M est clairement une **adaptation locale** puisqu'il s'agit d'une réponse à une pression de sélection chez certaines populations d'une espèce. La place de la pression de sélection métallique chez les espèces **pseudométallophytes hyperaccumulatrices**, qui sont généralement constitutivement tolérantes, n'est pas aussi simple. Certaines de ces espèces montrent une tolérance plus importante des populations M par rapport aux NM (Meerts & Van Isacker 1997 ; Bert *et al.* 2000 ; Assunção *et al.* 2003 ; Pauwels *et al.* 2006) qui peut traduire une adaptation locale. Cependant cette tolérance plus importante doit être replacée dans une **histoire évolutive plus complexe** où ce caractère aurait pu préalablement évoluer indépendamment des pressions métalliques (Boyd & Martens 1998). Il a par exemple été proposé que, chez ces espèces la tolérance soit une conséquence de l'augmentation des capacités de séquestration dans les feuilles acquise en milieu non métallifère.

- Les bases génétiques de la tolérance aux métaux

Macnair (1990, 1993), en se basant sur les premières études sur les bases génétiques de la tolérance, a proposé très tôt un **déterminisme simple par un petit nombre de gènes**. Cette hypothèse a été renforcée par la suite par plusieurs études sur *Mimulus guttatus* et *Silene vulgaris*, deux pseudométallophytes. L'analyse de la ségrégation du caractère dans des croisements entre populations M et NM a montré chez ces deux espèces que la tolérance au cuivre (et au Zn pour *S. vulgaris*) serait déterminée par des gènes uniques à effet majeur (Smith & Macnair 1998 ; Schat & Ten Bookum 1992 ; Schat *et al.* 1993 ; Schat *et al.* 1996). Des analyses QTL récentes ont également soutenu cette hypothèse, puisque un seul QTL serait impliqué dans la tolérance à l'aluminium de *Medicago sativa subsp. coerulea* (Sledge *et al.* 2002) et de *Triticum aestivum* (Ma *et al.* 2005) ainsi que dans la tolérance au cuivre du blé (Balint *et al.* 2007).

La plupart des **études récentes en physiologie moléculaire et génétique quantitative** se sont focalisées sur deux Brassicaceae pseudométallophytes, hyperaccumulatrices et constitutivement tolérantes à un certain nombre de métaux: *Thlaspi caerulescens* et *Arabidopsis halleri*. Les résultats chez ces deux espèces relativisent l'hypothèse classique d'un nombre limité de gènes impliqués dans la tolérance aux métaux. Il semble en effet, que pour ces 2 espèces, la tolérance constitutive soit un **trait complexe impliquant plusieurs régions génomiques** (Courbot *et al.* 2007 ; Willems *et al.* 2007) avec la sur expression d'un grand nombre de gènes par de la régulation (Becher *et al.* 2004 ; Rigola *et al.* 2006 ; van de Mortel *et al.* 2006 ; Talke *et al.* 2006 ; Weber *et al.* 2006) ou à la suite d'évènements de duplication (Dräger *et al.* 2004 ; Hanikenne *et al.* 2008). Ces analyses ont permis d'identifier chez *A. halleri*, sept gènes candidats, qui pourraient être impliqué dans la tolérance constitutive au Zn (voir synthèse de Roosens *et al.* 2008a).

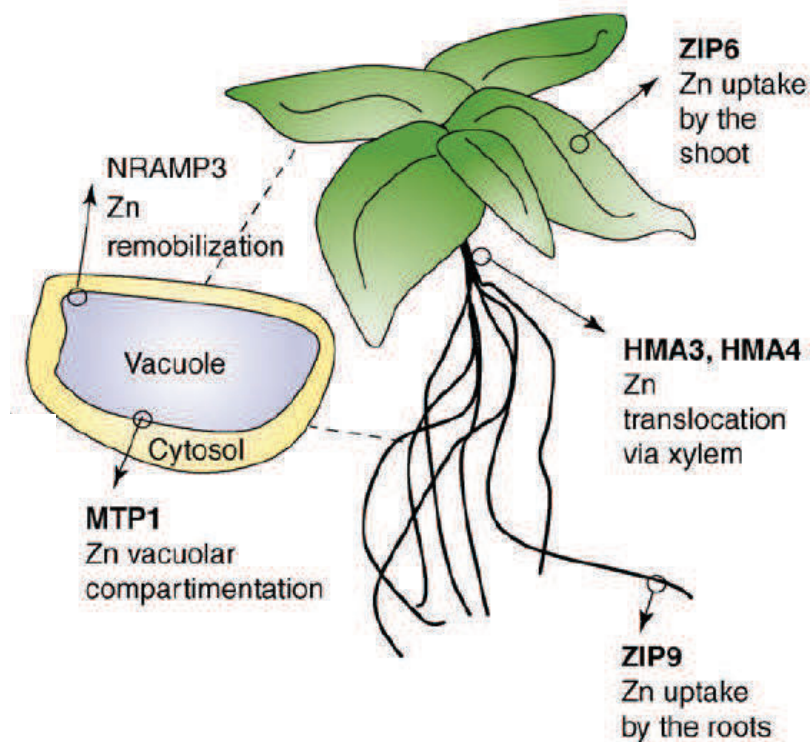


Figure 5 : Gènes candidats pour la tolérance et l'hyperaccumulation du zinc chez *Arabidopsis halleri* (D'après Roosens *et al.* 2008a)

Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans le transport du métal dans les racines (ZIP 9), dans les feuilles (ZIP 6) et des racines vers les parties aériennes (HMA3 et HMA4)

ainsi que dans le transport vers la vacuole (MTP1a et MTP1b) et la remobilisation du métal accumulé dans la vacuole (NRAMP3) (figure 5). De manière intéressante, un de ces gènes (HMA4) a été identifié dans un QTL de la tolérance au cadmium (Cd) chez cette même espèce (Courbot *et al.* 2007) ce qui pourrait indiquer une évolution conjointe de ces deux caractères. Cependant, il ne faut pas oublier que ces résultats concernent la **tolérance constitutive** de ces espèces et ne peuvent donc pas être extrapolés à l'adaptation locale aux sites métallifères.

Quelques études se sont intéressées au **déterminisme génétique de la variabilité de la tolérance** entre individus dits « tolérants » par l'analyse de croisements entre individus de tolérance variable (Macnair 1993 ; Schat *et al.* 1993 ; Schat & Vooijs 1997). Ainsi Smith & Macnair (1998) ont montré que chez *Mimulus guttatus* les variations quantitatives de la tolérance au cuivre seraient expliquées par **plusieurs gènes modificateurs** sous contrôle épistatique.

II.2.2 La sécheresse et la carence en nutriments

Comme cela peut être observé sur les terrils, la contamination par les métaux lourds est souvent accompagnée dans les sites métallifères par une **sécheresse importante et une carence en nutriment** (Macnair 1997). Si une espèce n'a pas connu par ailleurs ces contraintes, elles peuvent constituer une pression de sélection importante. Peu d'études se sont intéressées à ces deux changements environnementaux présents dans les sites métallifères. Chez quelques pseudométallophytes il a pu être montré en conditions contrôlées que les **populations M présentaient une plus petite surface foliaire avec une pilosité importante**, pouvant traduire une adaptation à la sécheresse (Schwanitz & Hahn 1954 cité par Antonovics *et al.* 1971 ; Wierzbicka & Panufnick 1998 ; Wierzbicka & Pielichowska 2004). Bradshaw *et al.* (1960) de son côté, a montré que les populations M d'*Agrostis tenuis* sont plus aptes que les populations NM à se développer dans des solutions de culture pauvre en phosphate. L'importance de ces pressions de sélection dans les milieux métallifères reste **un point encore largement peu étudié**.

II.2.3 L'hétérogénéité de l'environnement

Une des caractéristiques des sites métallifères est leur **hétérogénéité spatiale** surtout en ce qui concerne la contamination métallique, l'ensoleillement, la topographie et les propriétés physiques du sol. Dechamps *et al.* (2007b) ont observé chez *T. caerulescens* une plasticité du cycle de vie des populations M en fonction de la concentration en Zn qui pourrait être expliquée par l'hétérogénéité des sites métallifères. En effet si les flux de gènes au sein des sites sont plus importants qu'entre les sites et si l'hétérogénéité spatiale amène les descendants à avoir une probabilité importante de se développer dans des conditions environnementales relativement différentes de celle des parents, il peut y avoir évolution de **génotypes généralistes** (Kassen 2002). Ces génotypes plastiques montreraient alors une fitness identique dans des zones plus ou moins contaminées en métaux en changeant de cycle de vie (passage d'un cycle annuel à pérenne dans le cas de *T. caerulescence*). Cependant Jiménez *et al.* (2007) ont fait remarquer que l'aptitude des individus M à avoir une fitness indépendante de la concentration en métaux pourrait également provenir de modifications de l'homéostasie des métaux dans ces populations. Les populations M pourraient avoir évolué dans les sites métallifères vers une meilleure régulation du transport des métaux, ce qui conférerait une même fitness dans des environnements présentant une large gamme de concentration en métaux. Jiménez *et al.* (2007) ont également regardé si les populations M montraient des signes d'adaptation à un milieu plus ouvert mais cette hypothèse n'a pas pu être validée.

III. Le modèle *Arabidopsis halleri* et les objectifs de la thèse

III.1 Le taxon

Arabidopsis halleri (L.) (O'Kane & Al-Shehbaz) (syn. *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek) est une **Brassicaceae** diploïde ($2n=16$) et pérenne qui a été récemment placée dans le genre *Arabidopsis* suite à des études morphologiques (O'Kane & Al-Shehbaz 1997) et moléculaires (Koch *et al.* 1999 ; Koch *et al.* 2000 ; O'Kane & Al-Shehbaz 2003). Cette espèce forme de **petites rosettes** qui peuvent assurer une reproduction asexuée grâce à **des stolons** (figure 6). La reproduction sexuée se fait selon un **système d'auto-incompatibilité** (Clauss & Koch 2006) avec une pollinisation surtout assurée par les insectes (van Rossum *et al.* 2004). Trois

sous espèces sont actuellement décrites : *A. halleri* subsp. *halleri*, *A. halleri* subsp. *ovirensis* et *A. halleri* subsp. *gemmifera* (Al-Shehbaz & O’Kane 2002). Elles ont, toute les trois, des distributions géographiques et écologiques différentes. Les critères morphologiques de détermination d’*A. halleri* parmi les *Arabidopsis* ont été donné par Al-Shehbaz & O’Kane (2002) (Figure 7).



Figure 6 : Photographies d’*Arabidopsis halleri*. (a) rosette isolée sur site métallifère, (b) tapis d’individus en fleurs montrant également des stolons

Key to the species of <i>Arabidopsis</i>	
1a. Fruits terete; petals 2-3.5(-4) mm long; seeds 0.3-0.5 mm long, usually plump; cotyledons incumbent	1. <i>A. thaliana</i>
1b. Fruits strongly flattened, rarely subterete (<i>A. suecica</i>); petals (4-)5-10 mm long; seeds longer, usually flattened; cotyledons accumbent, rarely obliquely incumbent (<i>A. suecica</i>).	
2a. Replum constricted between seed; plants stoloniferous perennials; basal leaves orbicular or often with an orbicular terminal lobes	9. <i>A. halleri</i>
2b. Replum not constricted between seeds; plants annuals or almost always non-stoloniferous perennials with or without branched caudices; basal leaves lanceolate, spatulate, oblanceolate, obovate, or rarely suborbicular, without orbicular terminal lobes.	
3a. Lower and middle stem leaves distinctly petiolate, suborbicular to ovate, nearly as long as wide, dentate with few large teeth.	
4a. Petals 7-10 mm long, violet or very rarely white; plants (25-)40-80 cm tall, sparsely pubescent; basal leaves acute at apex, longer than wide	6. <i>A. cebennensis</i>
4b. Petals 6-7 mm long, white; plants 10-30 cm tall, plants usually glabrous; basal leaves obtuse at apex, " as long as wide	7. <i>A. pedemontana</i>
3b. Lower and middle stem leaves subsessile or attenuate to a narrow base, much longer than broad, entire, dentate, lyrate, to pinnatifid.	
5a. Basal and stem leaves similar in shape and size (rarely stem leaves larger than basal)	5. <i>A. croatica</i>
5b. Basal and stem leaves dissimilar in shape and size, basal leaves always larger.	
6a. Stems glabrous or rarely subglabrous; fruits horizontally spreading to slightly reflexed; petals becoming deep lilac; alpine areas in the Carpathian Mountains (Czech Republic, Slovakia, Romania, Poland, and adjacent Ukraine)	4. <i>A. neglecta</i>
6b. Stems sparsely to densely hairy at least below; fruits erect-ascending to subdivaricate; petals white or rarely pale lilac; sea level to various altitudes in Eurasia and North America.	
7a. Fruits weakly compressed to subterete; petals white, 4-5(-6) mm long; cotyledons obliquely incumbent	2. <i>A. suecica</i>
7b. Fruits strongly compressed; petals white to lilac, (5-)6-8 mm long; cotyledons accumbent.	
8a. Petals with two small lateral teeth on the claw; basal leaves pinnatisect to pinnatifid	3. <i>A. arenosa</i>
8b. Petals without lateral teeth on the claw; basal leaves lyrate-pinnatifid, lyrate, dentate, or entire	8. <i>A. lyrata</i>

Figure 7 : Clé de détermination des neuf espèces du genre *Arabidopsis* (D’après Al-Shehbaz & O’Kane 2002)

III.2 Distribution géographique et amplitude écologique

A. halleri a une aire de **distribution disjointe en Europe** (figure 8), où l'on peut retrouver les sous espèces *A. halleri* subsp. *halleri* et *A. halleri* subsp. *ovirensis*, et **en Asie** où l'on ne retrouve que la sous espèces *A. halleri* subsp. *gemmifera* (Al-Shebaz & O'Kane 2002). C'est en Europe que cette espèce nous intéresse puisqu'elle est localisée à la fois dans des sites métallifères (de type calaminaire) et dans des sites non contaminés par les métaux et peut donc être décrite comme **pseudométallophyte**. En Europe, on rencontre *A. halleri* dans des zones de montagne et de plaine sur des sols plutôt acides, humides et oligotrophiques à des altitudes comprises entre 66 et 2400 mètres d'altitude (Clapham & Akeroyd 1993 ; Al-Shebaz & O'Kane 2002). Les **populations M** connues sont localisées en **limite d'aire de distribution** de l'espèce à faible altitude dans **4 régions différentes** : le nord de la France, la Silésie en Pologne, le Harz en Allemagne et la région de Bergamo en Italie (Ernst 1990 ; Pauwels *et al.* 2006). La pollution du Harz est principalement due aux **activités minières** depuis le Moyen Age alors qu'en France, en Pologne et en Italie les populations M sont à proximités ou sur des **sites industriels récents**. Les **populations NM** se retrouvent plutôt à **moyenne et haute altitude** dans les zones montagneuses d'Europe sur les versants des montagnes et en lisières de forêts (Al-Shebaz & O'kane 2002 ; Pauwels *et al.* 2006).

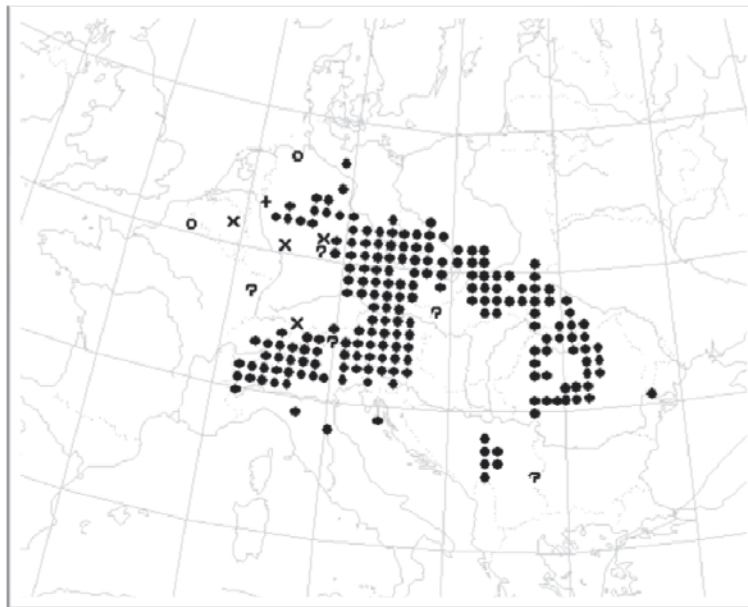


Figure 8 : Distribution d'*Arabidopsis halleri* en Europe (Atlas Flora Europea, 1999, Finnish Museum of Natural History, <http://www.fmnh.helsinki.fi/english/botany/afe/publishing/database.htm>). Les points noirs représentent des colonisations naturelles, les cercles noirs des introductions, les croix des extinctions probables (pas d'observation de l'espèce depuis 1930) et les points d'interrogation des localisations incertaines.

La seule région connue pour posséder des populations **M et NM en proximité** (quelques dizaines de km) est la **Silésie en Pologne** (Pauwels *et al.* 2006). Des prospections très récentes (2008) ont également permis d'identifier en Italie d'autres populations M et NM proches géographiquement (Pierre Saumitou-Laprade, communication personnelle). La grande proximité entre certaines populations M et NM a amené Pauwels *et al.* (2006) à créer une nouvelle catégorie de population en plus des deux types édaphiques : il s'agit de la catégorie des **populations NM dans des régions polluées** (NMp). Ces populations ont la particularité d'être dans des sites non contaminés par les métaux mais à proximité de populations M. Elles sont donc potentiellement connectées par des flux de gènes à des populations qui connaissent un environnement édaphique différent.

III.3 Le statut de modèle

Du fait de ses **caractéristiques phénotypiques** et **phylogénétiques**, *A. halleri* a été récemment proposé comme espèce **modèle** pour étudier la **tolérance et l'hyperaccumulation** des métaux lourds (Mitchell-Olds 2001 ; Becher *et al.* 2004; Pauwels *et al.* 2008; Roosens *et al.* 2008a). De plus, elle possède les caractéristiques demandées à tout bon modèle (Roosens *et al.* 2008a) : (1) une facile propagation par bouturage, (2) un cycle de vie court (floraison après environs 24 semaines), (3) un petit génome diploïde (255 Mb, Johnston *et al.* 2005), et (4) une possible transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. Ainsi durant ces dix dernières années, elle a fait l'objet de nombreuses études dans des domaines très divers tels que la génétique des populations, la biologie évolutive, la génomique, la transcriptomique et la protéomique.

III.3.1 Tolérance et hyperaccumulation du Zn et Cd

L'intérêt porté à *A. halleri* repose sur le fait qu'elle est **constitutivement tolérante et hyperaccumulatrice de Zn et Cd**. La tolérance au Zn des populations M et NM a été montrée tout d'abord sur un petit nombre de populations (Bert *et al.* 2000). Cette étude a ensuite été complétée par la caractérisation de la tolérance au Zn de **31 populations européennes** réparties sur toute l'aire de distribution de l'espèce (Pauwels *et al.* 2006). *A. halleri* montre bien une tolérance constitutive mais présente également des **variations de tolérance** entre populations. Les populations M semblent plus tolérantes et moins polymorphes que les NM. Le caractère quantitatif de ce trait a été également observé au sein des types édaphiques avec des populations NM ayant une tolérance proche de celle des M.

Parallèlement à ces études, l'espèce a été caractérisée pour l'accumulation du Zn. *A. halleri* est capable d'accumuler une **très grande quantité de Zn dans ses feuilles** (de 1806 µg/g à 13168 µg/g Bert *et al.* 2002) avec une réponse relativement homogène au sein des types édaphiques et a, par conséquent, été classé parmi les hyperaccumulatrices. L'accumulation semble se faire à la base des **trichomes des feuilles** (Küpper *et al.* 2000) dans lesquels le Zn est complexé avec des groupes fonctionnels carboxyl et/ou hydroxyl (Sarret *et al.* 2002). Il est intéressant de noter que les populations NM semblent concentrer de manière plus efficace le Zn dans leurs feuilles que les populations M (Bert *et al.* 2002). La tolérance et l'hyperaccumulation du Cd a également été montré chez *A. halleri* (Brooks 1998 ; Küpper *et al.* 2000) mais aucune étude n'a regardé la distribution de ce caractère au sein de l'espèce. Les **bases génétiques** de la tolérance constitutive au Zn et Cd ont été recherchées par plusieurs approches complémentaires (voir II.2.1 § Les bases génétiques de la tolérance aux métaux lourds, p20-21).

III.3.2 Position phylogénétique et connaissance du génome

Un des points déterminants qui fait d'*A. halleri* une espèce modèle est sa proximité génétique avec l'espèce modèle chez les végétaux *A. thaliana*. En effet, *A. halleri* est **l'espèce tolérante et hyperaccumulatrice de métaux lourds la plus proche d'*A. thaliana*** (Figure 9). La divergence entre ces deux espèces est estimée à **5 millions d'années** (Koch *et al.* 2000) et elles montrent une identité des séquences codantes de 94% (Becher *et al.* 2004). Une **carte génétique du génome d'*A. halleri*** a été récemment construite à partir de la descendance (BC₁) d'un croisement entre un individu métallicole d'*A. halleri* et un individu de l'espèce *A. lyrata* subsp *petraea* (Willems *et al.* 2007). Cette carte a été réalisée avec 65 marqueurs ancrés chez *A. thaliana* et 18 marqueurs AFLP anonymes. Ces marqueurs ont permis d'identifier **huit groupes de liaison** et forment une carte de 567 cM (Figure 10). Roosens *et al.* (2008b) ont augmenté la densité de cette carte à l'aide de 20 nouveaux marqueurs ancrés chez *A. thaliana*. En comparant la carte physique d'*A. thaliana* et la carte génétique d'*A. halleri* ils ont pu montrer qu'il existe une **grande colinéarité** entre le génome de ces deux espèces avec apparemment seulement 3 grands réarrangements chromosomiques (Roosens *et al.* 2008b) (Figure 11). Ainsi la majorité des outils moléculaires développés chez *A. thaliana* est facilement transférable chez *A. halleri* (Clauss & Koch 2006) et les régions d'intérêts identifiées chez *A. halleri* peuvent facilement être caractérisées par comparaison avec *A. thaliana* (Roosens *et al.* 2008b).

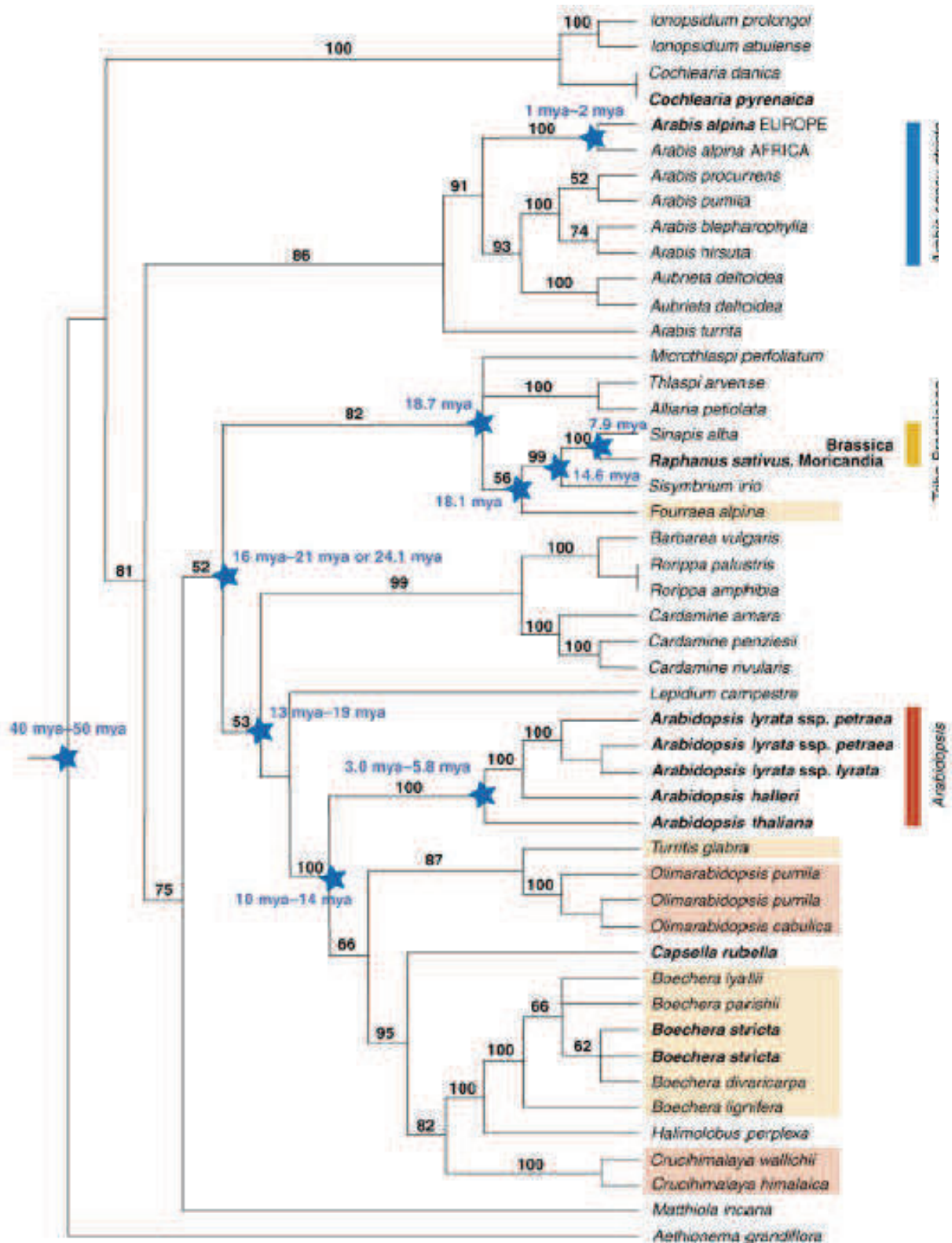


Figure 9 : Arbre phylogénétique de 48 espèces de Brassicaceae (D'après Clauss & Koch 2006). Arbre consensus obtenu à partir de 9 arbres de parsimonie basés sur des séquences de *matK* et *Chs*. Sur chaque branche est indiquée la valeur de bootstrap en pourcentage. Les étoiles indiquent en million d'année (mya) les dates de divergence connues. Le nom des espèces est en gras quand il existe une carte génétique.

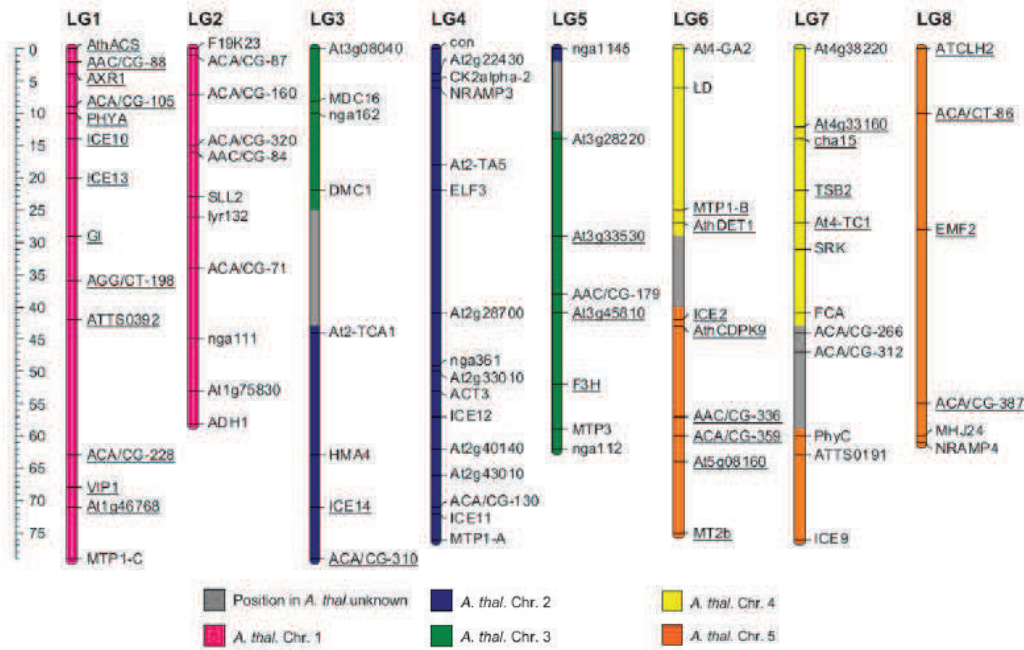


Figure 10 : Carte de liaison génétique *A. halleri* × *A. l. petraea* (BC₁) (D’après Willems et al. 2007). L’homologie avec les chromosomes d’*A. thaliana* est indiquée par les couleurs. Les marqueurs en distorsion de ségrégation sont soulignés.

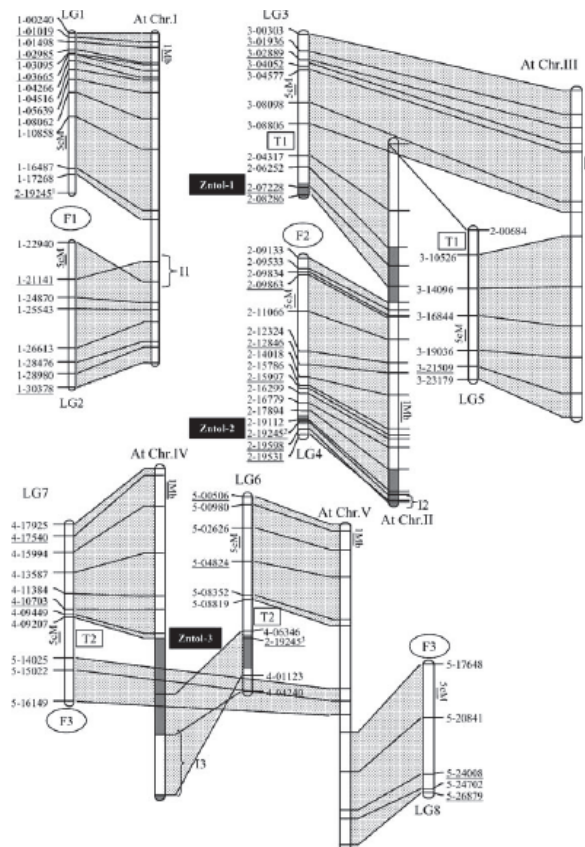


Figure 11 : Synthèse entre la carte génétique d’*Arabidopsis halleri* (8 groupes de liaison, LG1 à 8) et la carte physique d’*A. thaliana* (5 chromosomes, At ChrI à V) (D’après Roosens et al. 2008b). Les marqueurs sont nommés d’après leur position chez *A. thaliana*. Les marqueurs soulignés correspondent à des gènes impliqués dans l’homéostasie des métaux. Les QTL de la tolérance au zinc (Willems et al. 2007) sont indiqués en noir (Zntol).

III.3.3 *A. halleri* et l'adaptation locale aux sites métallifères

Les différences de tolérance et d'accumulation du Zn entre les populations M et NM d'*A. halleri* laisse supposer une évolution de ces traits chez cette espèce dans les milieux métallifères. Ces différences constituent un indice fort pour une **possible adaptation locale** chez les populations M de cette espèce. Dechamps *et al.* (2007a) ont montré que chez l'espèce hyperaccumulatrice *T. caerulescens* il existait bel et bien une adaptation locale des populations M qui montrent une fitness plus grande que les NM sur site métallifère. Pauwels *et al.* (2005) se sont intéressés à l'origine des populations M chez *A. halleri*. Par une approche de phylogéographie basée sur des haplotypes chloroplastiques il a montré que les populations M en Europe n'avaient pas une histoire commune et qu'elles auraient été **fondées de manière indépendante**. Ces résultats laissent envisager des processus évolutifs différents dans les populations M et peut être une adaptation très fine aux nouvelles contraintes présentes.

L'adaptation aux sites métallifères chez une espèce hyperaccumulatrice comme *A. halleri* constitue donc un beau modèle pour **comprendre comment les espèces mobilisent leur variabilité génétique et font face aux pressions de sélections nouvelles**. C'est pourquoi dans ce travail nous avons cherché à appréhender les processus microévolutifs qui se déroulent dans les populations M d'*A. halleri*. Pour cela nous nous sommes placés à une échelle locale (sud de la Pologne et Nord de la Slovaquie) afin de limiter l'influence de la structure des populations sur la variabilité des traits. La thèse se compose de 4 parties complémentaires et connectées entre elles :

1. Dans un premier temps nous avons cherché dans le génome d'*A. halleri* des parties potentiellement sous sélection disruptive entre les populations M et NM afin de confirmer une adaptation locale aux sites métallifères. Pour cela nous avons utilisé la méthode du criblage génomique.
2. La suite logique du criblage génomique est de caractériser les parties du génome potentiellement sous sélection pour définir des gènes candidats. Ce travail a été commencé sur 5 marqueurs.
3. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés plus précisément à la tolérance aux métaux lourds. Est-ce qu'à un niveau local les populations M sont plus tolérantes que les populations NM ? Est-ce que la variabilité de ce phénotype est influencée par la sélection naturelle et traduit une adaptation locale ?

4. Dans un troisième temps nous avons cherché grâce à la génétique d'association des parties du génome d'*A. halleri* associées avec une augmentation de la tolérance au Zn. Nous avons ensuite comparé ces résultats avec ceux du criblage génomique.

IV Références

- Akey JM, Zhang G, Zhang K, Jin L, Shriver MK (2002) Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research*, **12**, 1805-1814.
- Al-Hiyaly SA, McNeilly T, Bradshaw AD (1988) The effect of zinc contamination from electricity pylons - evolution in a replicated situation. *New Phytologist*, **110**, 571-580.
- Al-Hiyaly SA, McNeilly T, Bradshaw AD, Mortimer AM (1993) The effect of zinc contamination from electricity pylons. Genetics constraints on selection for zinc tolerance. *Heredity*, **70**, 22-32.
- Al-Shehbaz IA, O'Kane SL (2002) Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). In: *The Arabidopsis Book* (eds. Somerville CR, Meyerowitz EM). American Society of Plant Biologist, Rockville.
- Ancel Meyers L, Bull JJ (2002) Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 551-557.
- Antonovics J, Bradshaw AD, Turner RG (1971) Heavy metal tolerance in plants, *Advances in ecological research*, **7**, 1-85
- Assunção AGL, Ten Bookum WM, Nelissen HJM, Vooijs R, Schat H, Ernst WHO (2003) Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist*, **159**, 411-419
- Baker AJM (1981) Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, **3**, 643-654.
- Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, **1**, 81-126.
- Baker AJM, Proctor J (1990) The influence of cadmium, copper, lead and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Plant, Systematics and Evolution*, **173**, 91-108.
- Baker AJM, Walker PL (1990) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (ed. Shaw AJ), Boca Raton, Florida.
- Baker AJM, McGrath SP, Reeves DR, Smith J (2000) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: *Phytoremediation of contaminated soils and water* (eds. Terry N, Banuelos G), CRC press, Boca Raton, Florida.
- Bálint AF, Röder SM, Hell R, Galiba G, Börner A (2007) Mapping of QTLs affecting copper tolerance and the Cu, Fe, Mn and Zn contents in the shoots of wheat seedlings. *Biological plantarum*, **51**, 129-134.
- Barrett RDH, Schluter D (2007) Adaptation from standing variation. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 38-34.
- Beaumont MA, Nichols A (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London*, **263**, 1619-1626.
- Beaumont MA, Balding DJ (2004) Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology*, **13**, 969-980.

- Becher M, Talke IN, Krall L, Kramer U (2004) Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Journal*, **37**, 251-268.
- Bert V, Macnair MR, De Laguerie P, Saumitou-Laprade P, Petit D (2000) Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*, **146**, 225-233.
- Bert V, Bonin I, Saumitou-Laprade P, de Laguerie P, Petit D (2002) Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist*, **155**, 47-57.
- Bert V, Meerts P, Saumitou-Laprade P, Salis P, Gruber W, Verbruggen N (2003) Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and Soil*, **249**, 9-18
- Bolnick DI, Nosil P (2007) Natural selection in populations subject to a migration load. *Evolution*, **61**, 2229-2243.
- Bonin A, Taberlet P, Miaud C, Pompanon F (2006) Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 773-783.
- Boyd RS, Martens SN (1992) The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. In: *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils* (eds. Baker AJM, Proctor J, Reeves RD), Andover, UK.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES (2007) TASSEL : software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics applications note*, **23**, 2633-2635.
- Bradshaw AD (1952) Populations of *Agrostis tenuis* resistant to lead and zinc poisoning. *Nature*, **169**, 1098.
- Bradshaw AD, Chadwick MJ, Jowett D, Lodge RW, Snyderon RW (1960) Experimental investigation into the mineral nutrition of several grass species. III. Phosphate level. *Journal of Ecology*, **48**, 631-637.
- Briat JF, Lebrun M (1999) Plant responses to metal toxicity. *Plant Biology and Pathology*, **322**, 43-54.
- Brooks RR (1998) Geobotany and hyperaccumulator. In: *Plants that hyperaccumulate heavy metals* (ed Brooks RR), Wallingford, UK.
- Caballero A, Quesada H, Rolán-Alvarez E (2008) Impact of Amplified Fragment Length Polymorphism Size Homoplasmy on the Estimation of Population Genetic Diversity and the Detection of Selective Loci. *Genetics*, **179**, 539-554
- Claphan AR, Akeroyd JR (1993) *Cardaminopsis*. In: *Flora Europea* (eds. Tutin TG, Heywood VH, Bruges NA *et al.*). Cambridge University Press, Cambridge
- Clauss MJ, Koch MA (2006) Poorly known relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science*, **11**, 449-459.
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, **212**, 475-486.

- Conde-Padín P, Carvajal-Rodríguez A, Carballo M, Caballero A, Rolán-Alvarez E (2007) Genetic variation for shell traits in a direct-developing marine snail involved in a putative sympatric ecological speciation process. *Evolutionary Ecology*, **21**, 635-650.
- Courbot M, Willems G, Motte P *et al.* (2007) A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4*, a gene encoding a heavy metal ATPases. *Plant Physiology*, **144**, 1052-1065.
- Day T (2000) Competition and the effect of spatial resource heterogeneity on evolutionary diversification. *American Naturalist*, **155**, 790–803.
- Dechamps C, Noret N, Mozek R *et al.* (2007a) Cost of adaptation to a metalliferous environment for *Thlaspi caerulescens*: a field reciprocal transplantation approach. *New Phytologist*, **177**, 167-177.
- Dechamps C, Lefèbvre C, Noret N, Meerts P (2007b) Reaction norms of life history traits in response to zinc in *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites. *New Phytologist*, **173**, 191-198.
- Dias PC (1996) Sources and sink in population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 326-330.
- Dixon AL, Liang L, Moffatt MF *et al.* (2007) A genome-wide association study of global gene expression. *Nature Genetics*, **39**, 1202-1207.
- Dräger DB, Desbrosses-Fonrouge A-G, Krach C *et al.* (2004) Two genes encoding *Arabidopsis halleri* *MTP1* metal transporter proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high *MTP1* transcript levels. *The Plant Journal*, **39**, 425-439.
- Ducrocq S, Madur D, Veyrieras J-B *et al.* (2008) Key impact of *Vgt1* on flowering time adaptation in Maize: evidence from association mapping and ecogeographical information. *Genetics*, **178**, 2433-2437.
- Ernst WHO (1990) Mine vegetation in Europe. In: *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects* (ed. Shaw AJ). CRC press, Boca Raton Florida.
- Ernst WHO, Nelissen HJM (2000) Life-cycle phases of a zinc and cadmium resistant ecotype of *Silene vulgaris* in risk assessment of polymetallic mine soils. *Environmental pollution*, **107**, 329-338.
- Ernst WHO (2006) Evolution of metal tolerance in higher plants. *Forest Snow Landscape Research*, **80**: 251-274.
- Escarré J, Lefèbvre C, Gruber W *et al.* (2000) Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implication for phytoremediation. *New Phytologist*, **145**, 429-437.
- Evanno G, Castella E, Goudet J (2006) Evolutionary aspects of population structure for molecular and quantitative traits in the freshwater snail *Radix balthica*. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 1071-1082.
- Farnir F, Coppieters W, Arranz JJ *et al.* (2000) Extensive genome-wide linkage disequilibrium in Cattle. *Genome Research*, **10**, 220-229.
- Foll M, Gaggiotti O (2008) A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a bayesian perspective. *Genetics*, **180**, 977–993.
- Foy CD (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **29**, 511-566.

- Frérot H, Lefèbvre P, Petit C, Collin C, Dos Santos A, Escarré J (2005) Zn tolerance and hyperaccumulation in F1 and F2 offspring from intra and interecotype crosses of *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, **165**, 111-119.
- Galardi F, Corrales I, Mengoni A *et al* (2007) Intra-specific differences in nickel tolerance and accumulation in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *Environmental and Experimental Botany*, **60**, 377-384
- Gartside DW, McNeilly T (1974) The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants II. Copper tolerance in normal populations of different species. *Heredity*, **32**, 355-348.
- Gonzalez-Martinez SC, Wheeler NC, Ersoz E, Nelson CD, Neale DB (2007) Association genetics in *Pinus taeda* L. I. Wood property traits. *Genetics*, **175**, 399-499.
- Goudet J, Buchi L (2006) The effect of dominance, regular inbreeding and sampling design on Q_{ST} , an estimator of population differentiation for quantitative traits. *Genetics*, **172**, 1337-1347.
- Goudet J, Martin G (2007) Under neutrality, $Q_{ST} \leq F_{ST}$ when there is dominance in an island model. *Genetics*, **176**, 1371-1376.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1-11.
- Hall D, Luquez V, Garcia VM, St Onge KR, Jansson S, Ingvarsson PK (2007) Adaptive population differentiation in phenology across a latitudinal gradient in European Aspen (*Populus tremula* L.): a comparison of neutral markers, candidate genes and phenotypic traits. *Evolution*, **61**, 2849-2860.
- Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, *et al.* (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*. *Nature*, **453**, 391-395.
- Harper FA, Smith SE, Macnair MR (1997) Can an increased copper requirement in copper-tolerant *Mimulus guttatus* explain cost of tolerance? I. Vegetative growth. *New Phytologist*, **136**, 455-467.
- Hendry AP, Kinnison MT (2001) An introduction to microevolution: rate, pattern, process. *Genetica*, **112-113**, 1-8.
- Hoekstra HE, Krenz JG, Nachman MW (2005) Local adaptation in the rock pocket mouse (*Chaetodipus intermedius*): natural selection and phylogenetic history of populations. *Heredity*, **94**, 217-228
- Holland JB (2007) Genetic architecture of complex traits in plants. *Current opinion in Plant Biology*, **10**, 156-161.
- International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* **437**, 1299-1320.
- Jiménez-Ambriz G, Petit C, Bourrié I, Dubois S, Olivieri S, Ronce O (2007) Life history variation in the heavy metal tolerant plant *Thlaspi caerulescens* growing in a network of contaminated and noncontaminated sites in southern France: role of gene flow, selection and phenotypic plasticity. *New Phytologist*, **173**, 199-215.
- Johnston JS, Pepper AL, Hall AE, *et al.* (2005) Evolution of Genome size in Brassicaceae. *Annals of Botany*, **95**, 229-235.

- Jorgensen TH, Richardson DS, Andersson S (2006) Comparative analyses of population structure of two sub-species of *Nigella degenii*: evidence for diversifying selection on pollen color dimorphism. *Evolution*, **60**, 518-528.
- Kassen R (2002) The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *Journal of Evolutionary Biology*, **15**, 173-190.
- Kauer M, Zangerl B, Dieringer D, Schlötterer C (2003) Chromosomal patterns of microsatellite variability contrast sharply in African and non-African populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **160**, 247-256.
- Kawecki TJ (1995) Demography of source-sink populations and the evolution of ecological niches. *Evolutionary Ecology*, **9**, 38-44.
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues on local adaptation. *Ecological Letters*, **7**, 1225-1241.
- Kisdi E (2002) Dispersal: risk spreading versus local adaptation. *American Naturalist*, **159**, 579-596.
- Kimura M (1960) Optimum mutation rate and degree of dominance as determined by the principle of minimum genetic load. *Journal of Genetics* **57**, 21-34.
- Kingsolver JG, Pfennig DW (2007) Patterns and Power of Phenotypic Selection in Nature *BioScience*, **57**, 561-572.
- Koch M, Mummenhoff K, Hurka H (1998) Systematics and evolution history of heavy metal tolerant *Thlaspi caerulescens* in Western Europe: evidence from genetic studies based on isozyme analysis. *Biochemical systematic and ecology*, **26**, 823-838.
- Koch M, Bishop J, Mitchell-Olds T (1999) Molecular systematics and evolution of *Arabidopsis* and *Arabis*. *Plant Biology*, **1**, 529-537.
- Koch M, Haubolt B, Mitchell-Olds T (2000) Comparative evolutionary analysis of the chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci among different lineages of *Arabidopsis*, *Arabis* and related genera (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 1483-1498.
- Küpper H, Lombi E, Zhao F-J, McGrath SP (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, **212**, 75-84.
- Le Corre V, Kremer A (2003) Genetic variability at neutral markers, quantitative trait loci and trait in a subdivided population under selection. *Genetics*, **164**, 1205-1219.
- Lefèbvre C, Vernet P (1990) Microevolution processes on contaminated deposits. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (ed. Shaw AJ), Boca Raton, Florida.
- Leinonen T, O'Hara RB, Cano JM, Merilä J (2008) Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**, 1-17.
- Levene H (1953) Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available. *American Naturalist*, **87**, 331-333.
- Lewontin RC, Krakauer J (1973) Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics*, **74**, 175-195.
- Lopez-Fanjul C, Fernandez A, Toro MA (2003) The effect of neutral nonadditive gene action on the quantitative index of population divergence. *Genetics*, **164**, 1627-1633.

- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 981-994.
- Ma H-X, Bai G-H, Carver B, Zhou L-L (2005) Molecular mapping of a quantitative trait locus of aluminium tolerance in wheat cultivar atlas 66. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, 51-57.
- Mackay TF (2003) The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review of Genetics*, **35**, 303-339.
- Macnair MR (1983) The genetic control of copper tolerance in the yellow monkey flower, *Mimulus guttatus*. *Heredity*, **50**, 283-293.
- Macnair MR (1987) Heavy metal tolerance in plants: a model evolutionary system. *Trends in Ecology and Evolution*, **2**, 354.
- Macnair MR (1990) The genetic of metal tolerance in natural populations. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (ed. Shaw AJ), Boca Raton, Florida.
- Macnair MR (1993) The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist*, Transley review **49**, 541-559
- Macnair MR (1997) The evolution of plants in metal contaminated environments. In: *Environmental stress, adaptation and evolution* (eds. Bijlsma R, Loeschcke V), Birkhäuser Verlag Basel.
- Macnair MR, Bert V, Huitson SB, Saumitou-Laprade P, Petit D (1999) Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. *Proceedings of the Royal Society of London*, **266**, 2175-2179.
- Manenti G, Galvan A, Pettinicchio A *et al.* (2009) Mouse genome-wide association mapping needs linkage analysis to avoid false-positive loci. *PLoS Genetics* 5(1): e1000331. doi:10.1371/journal.pgen.1000331
- Manier MK, Seyler CM, Arnold SJ (2007) Adaptive divergence within and between ecotypes of the terrestrial garter snake, *Thamnophis elegans*, assessed with F_{ST} - Q_{ST} comparisons. *Journal of Evolutionary Biology*,
- Maynard Smith J, Haigh J (1974) The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetical Research*, **23**, 23-35.
- Meerts P, Van Isacker N (1997) Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecology*, **133**, 221-231.
- Mengoni A, Barabesi C, Gonelli C, Galardi F, Gabbrielli R, Bazzicalupo M (2001) Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **10**, 1909-1916
- Mitchell-Olds T (2001) *Arabidopsis thaliana* and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 693-700.
- Nair S, Williams JT, Brockman A *et al.* (2003) A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in Southeast Asian malaria parasites. *Molecular Biology Evolution*, **20**, 1526-1536.
- Neale DB, Savolainen O (2004) Association genetics of complex traits in conifers. *Trends in plant science*, **9**, 325-330.

- Nei M, Maruyama T (1975) Lewontin–Krakauer test for neutral genes. *Genetics*, **80**, 395.
- Nicholls MK, McNeilly T (1985) The performance of *Agrostis capillaries* L. genotypes, differing in copper tolerance, in ryegrass swards on normal soils. *New Phytologist*, **101**, 207-217.
- Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, **18**, 375-402.
- Oetjen K, Reusch TBH (2007) Genome scans detect consistent divergent selection among subtidal vs. intertidal populations of the marine angiosperm *Zostera marina*. *Molecular Ecology*, **16**, 5156-5167.
- O’Hara RB, Merilä J (2005) Bias precision in Q_{ST} estimates: problems and some solutions. *Genetics*, **171**, 1331-1339.
- O’Kane SL, Al-Shehbaz IA (1997) A synopsis of *Arabidopsis* (Brassicaceae). *Novon*, **7**, 323-327.
- O’Kane SL, Al-Shehbaz IA (2003) Phylogenetic position and generic limits of *Arabidopsis* (Brassicaceae) based on sequences of nuclear ribosomal DNA. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **90**, 603-612.
- Palo JU, O’Hara RB, Laugen AT, Laurila A, Primmer CR, Merilä J (2003) Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection: evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Molecular Ecology*, **12**, 1963-1978.
- Palumbi SR (2001) *The evolution explosion: how humans cause rapid evolutionary change*. Norton, New York.
- Pauwels M, Saumitou-Laprade P, Holl C, Petit D, Bonin I (2005) Multiple origin of metallicolous populations of the pseudometallophyte *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) in central Europe: the cpDNA testimony. *Molecular Ecology*, **14**, 4403-4414.
- Pauwels M, Frérot H, Bonin I, Saumitou-Laprade P (2006) A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 1838-1850.
- Pfennig DW, Rice AM, Martin RA (2007) Field and experimental evidence for competition’s role in phenotypic divergence. *Evolution*, **61**, 257-271.
- Porcher E, Giraud T, Goldringer I, Lavigne C (2004) Experimental demonstration of a causal relationship between heterogeneity of selection and genetic differentiation in quantitative traits. *Evolution*, **58**, 1434-1445.
- Porcher E, Giraud T, Lavigne C (2006) Genetic differentiation of neutral markers and quantitative traits in predominantly selfing metapopulations: confronting theory and experiments with *Arabidopsis thaliana*. *Genetical Research (Cambridge)*, **87**, 1-12.
- Prat S (1934) Die Erbllichkeit der resistenz gene Kupfer. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **52**, 65-78.
- Pritchard,JK, Stephens M, Rosenberg NA *et al.* (2000) Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics*. **67**, 170–181.

- Reznick DN, Ghalambor CK (2001) The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica*, **112-113**, 183-198.
- Riebler A, Held L, Stephan W (2008) Bayesian variable selection for detecting adaptive genomic differences among populations. *Genetics*, **178**, 1817-1829
- Rigola D, Fiers M, Vurro E, Aarts MGM (2006) The heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* expresses many species-specific genes, as identified by comparative expressed sequence tag analysis. *New Phytologist*, **170**, 753-766.
- Robertson A (1975) Remarks on the Lewontin–Krakauer test. *Genetics*, **80**, 396.
- Roosens NHCJ, Willems G, Saumitou-Laprade P (2008a) Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends in Plant Science*, **13**, 208-215.
- Roosens NCJ, Willems G, Godé C, Courseaux A, Saumitou-Laprade P (2008b) The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*, **306**, 105-116.
- Ryser P, Sauder WR (2006) Effects of heavy metal contaminated soil on growth, phenology and biomass turnover of *Hieracium piloselloides*. *Environmental pollution*, **140**, 52-61.
- Sarret G, Saumitou-Laprade P, Bert V *et al.* (2002) Forms of Zinc Accumulated in the Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, **130**, 1815-1826.
- Savolainen U, Pyhäjärvi T, Knürr T (2007) Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **38**, 595-619.
- Sax K (1923) The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, **8**, 552- 560.
- Schat H, Ten Bookum WM (1992) Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. *Heredity*, **68**, 219-229.
- Schat H, Kuiper E, Ten Bookum WM, Vooijs R (1993) A general model for the genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*: evidence from crosses between plants from different tolerant populations. *Heredity*, **70**, 142-147.
- Schat H, Vooijs R, Kuiper E (1996) Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*. *Evolution*, **50**, 1888-1895.
- Schlötterer C (2002) A microsatellite-based multilocus screen for the identification of local selective sweeps. *Genetics*, **160**, 753-763.
- Schluter D (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 372-380.
- Skøt L, Humphreys MO, Armstead I *et al.* (2005) An association mapping approach to identify flowering time genes in natural populations of *Lolium perenne* L. *Molecular Breeding*, **15**, 233-245.
- Sledge MK, Bouton JH, Dall'Agnoll M, Parrott WA, Kochert G (2002) Identification and confirmation of aluminium tolerance QTL in diploid *Medicago sativa* subsp. *coerulea*. *Crop Science*, **42**, 1121-1128.
- Smith SE, Macnair MR (1998) Hypostatic modifiers cause variation in degree of copper tolerance in *Mimulus guttatus*. *Heredity*, **80**, 760-768.

- Storz JF (2005) Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology*, **14**, 671-688.
- Stincombe JR, Høekstra HE (2007) Combining population genomics and quantitative genetics: finding the gene underlying ecologically important traits. *Heredity*, **100**, 158-170
- Talke IN, Hanikenne M, Krämer U (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, **142**, 148-167.
- Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler ES (2001) Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, **28**, 286-289.
- Tsumura Y, Kado T, Takahashi T, *et al.* (2007) Genome scan to detect genetic structure and adaptive genes of natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Genetics*, **176**, 2393-2403.
- van de Mortel JE, Villanueva LA, Schat H *et al.* (2006) Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis, Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of *Arabidopsis thaliana* and the Related Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, **142**, 1127-1147
- van Rossum F, Bonnin I, Fenart S *et al.* (2004) Spatial genetic structure within a metallicolous population of *Arabidopsis halleri*, a clonal, self-incompatible and heavy-metal-tolerant species. *Molecular Ecology*, **13**, 2959-2967.
- Vasemägi A, Nilsson J, Primmer CR (2005) Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1067-1076.
- Vasemägi A, Primmer CR (2005) Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies. *Molecular Ecology*, **14**, 3623-3642.
- Vekemans X, Lefèbvre C (1997) On the evolution of heavy-metal tolerant populations in *Armeria maritima*: evidence from allozyme variation and reproductive barriers. *Journal of Evolutionary Biology*, **10**, 175-191.
- Verkleij JAC, Schat H (1990) Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (ed. Shaw AJ). CRC press, Boca Raton, Florida.
- Vitalis R, Dawson K, Boursot P (2001) Interpretation of variation across marker loci as evidence of selection. *Genetics*, **158**, 1811-1823.
- Vitalis R, Dawson K, Boursot P, Belkhir K (2003) DETSEL 1.0: A computer program to detect markers responding to selection. *Journal of Heredity*, **94**, 429-431.
- Volis S, Yakusov B, Shulgina I, Ward D, Mendlinger S (2005) Distinguishing adaptive from nonadaptive genetic differentiation: comparison of Q_{ST} and F_{ST} at two spatial scales. *Heredity*, **95**, 466-475.
- von Weetberg EJ, Remington DL, Schmitt J (2008) Partitioning adaptive differentiation across a patchy landscape: shade avoidance traits in *Impatiens capensis*. *Evolution*, **62**, 654-667.

- Waldmann P, Garcia-Gil MR, Sillanpaa MJ (2005) Comparing Bayesian estimates of genetic differentiation of molecular markers and quantitative traits: an application to *Pinus sylvestris*. *Heredity* **94**, 623-629.
- Walley KA, Khan MSI, Bradshaw AD (1974) The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants I. copper and zinc tolerance in *Agrostis tenuis*. *Heredity*, **32**, 309-319.
- Weber M, Trampczynska A, Clemens S (2006) Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺ hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ*, **29**, 950-963.
- Wierzbicka M, Panufnik D (1998) The adaptation of *Silene vulgaris* to growth on a calamine waste heap (S. Poland). *Environmental Pollution*, **101**, 415-426.
- Wierzbicka M, Pielichowska M (2004) Adaptation of *Biscutella laevigata* L, a metal hyperaccumulator, to growth on a zinc-lead waste heap in southern Poland: I: Differences between waste-heap and mountain populations. *Chemosphere*, **54**, 1663-1674.
- Wilkins DA (1978) The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytologist*, **80**, 623-633.
- Willems G, Dräger DB, Courbot M, *et al.* (2007) The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): An analysis of quantitative trait loci. *Genetics*, **176**, 659-674.
- Whitlock MC (1999) Neutral additive genetic variance in a metapopulation. *Genetical Research*, **74**, 215-221.
- Whitlock MC (2008) Evolutionary inference from Q_{ST} . *Molecular Ecology*, **17**, 1885-1896.
- Wu L, Bradshaw AD, Thurman DA (1975) The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera*. *Heredity*, **34**, 165-187.
- Yu JM, Pressoir G, Briggs WH *et al.* (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, **38**, 203-208
- Zhao K, Aranzana MJ, Kim S *et al.* (2007) An *Arabidopsis* Example of Association Mapping in Structured Samples. *Plos Genetics*, **3** (1):e4.doi:10.1371/journal.pgen.0030004.

CHAPITRE II : Recherche de traces de divergence adaptative dans le génome d'*Arabidopsis halleri* chez des populations métallicoles et non métallicoles

I. Présentation de l'étude et principaux résultats

Les différences de tolérance et d'accumulation du Zn (Bert *et al.* 2000, Bert *et al.* 2002, Pauwels *et al.* 2006) entre les populations M et NM d'*Arabidopsis halleri* laissent supposer une possible évolution de ces traits dans les sites métallifères sous l'influence de la sélection directionnelle. Nous avons donc voulu vérifier si dans le génome de cette espèce, il y avait des traces de sélection qui puissent être liées à l'adaptation aux sites pollués par les métaux lourds. Pour cela nous avons utilisé la méthode du criblage génomique, qui consiste à regarder la variabilité à un grand nombre de marqueurs représentatifs du génome. Les marqueurs montrant une différenciation plus importante que sous l'attendu neutre sont considérés comme potentiellement sous sélection. Le choix de la stratégie d'échantillonnage et d'analyse statistique a été fait pour que l'étude soit la plus conservative possible afin d'éviter l'identification de faux positifs. Nous avons donc échantillonnés, en Pologne et en Slovaquie, deux populations M et deux populations NM géographiquement proches (de 10 à 200 km) et montrant une histoire évolutive commune et une faible différenciation génétique (Pauwels *et al.* 2005). Nous avons également utilisé deux méthodes différentes d'analyses (Dfdist et DETSEL, voir page 9) qui se basent sur un scénario évolutif différent (modèle en île avec migration ou modèle de divergence pure).

Nous avons pu identifier des marqueurs qui montrent une divergence plus importante que sous l'attendu neutre. Parmi ces marqueurs, nous avons considéré que ceux identifiés dans plusieurs comparaisons M vs. NM et par les deux méthodes d'analyses étaient les candidats les plus fiables. Parmi les 820 marqueurs AFLP analysés, quatre peuvent être considérés comme de bons candidats pour l'adaptation aux sites métallifères. Neuf marqueurs supplémentaires apparaissent comme des candidats, mais uniquement dans un site métallifère particulier (site 1 ou 2). Ces résultats suggèrent que l'adaptation aux sites pollués par les métaux lourds pourrait impliquer des bases génétiques différentes dans des sites différents.

Ce criblage génomique sur un grand nombre de marqueurs (1 marqueur tous les 0,3 Mb dans le cas d'une distribution aléatoire) nous a également permis de discuter de l'influence sur la puissance d'analyse de la densité des marqueurs, du modèle statistique et du type de variabilité (nouvelle mutation *vs.* standing variation) impliqué dans l'adaptation.

II. Contribution sous forme d'article

ARTICLE 1: GENOMIC PATTERN OF ADAPTIVE DIVERGENCE IN *ARABIDOPSIS HALLERI*, A MODEL SPECIES FOR TOLERANCE TO HEAVY METAL.

Claire-Lise Meyer, Renaud Vitalis, Pierre Saumitou-Laprade, Vincent Castric

Molecular Ecology (2009) **18**: 2050-2062.

Le tableau S1 en matériel supplémentaire de l'article se trouve en Annexe 2 de la thèse

Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal

CLAIRE-LISE MEYER,* RENAUD VITALIS,+ PIERRE SAUMITOU-LAPRADE * and VINCENT CASTRIC*

*Laboratoire de Génétique et Évolution des Populations Végétales, UMR CNRS 8016, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France, †Muséum National d'Histoire Naturelle, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7206, Université Paris 7, Éco-Anthropologie et Ethnobiologie, Musée de l'Homme, 17 place du Trocadéro, 75116 Paris, France

Abstract

Pollution by heavy metals is one of the strongest environmental constraints in human-altered environments that only a handful of species can cope with. Identifying the genes conferring to those species the ability to grow in polluted areas is a first step towards a global understanding of the evolutionary processes involved and will eventually improve phytoremediation practices. We used a genome-scan approach to detect loci under divergent selection among four populations of *Arabidopsis halleri* growing on either polluted or nonpolluted habitats. Based on a high density of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers (820 AFLP markers, i.e. ~1 marker per 0.3 Mb), evidence for selection was found for some markers in every sampled population. Four loci departed from neutrality in both metalcolous populations and thus constitute high-quality candidates for general adaptation to pollution. Interestingly, some candidates differed between the two metalcolous populations, suggesting the possibility that different loci may be involved in adaptation in the different metalcolous populations.

Keywords: adaptive divergence, AFLPs, *Arabidopsis halleri*, genome scan, heavy-metal pollution

Received 4 December 2008; revised: 30 January 2009; accepted: 5 February 2009

Introduction

Human activities have induced evolutionary changes at an unprecedented rate (Palumbi 2001). Understanding these evolutionary processes is an important task for the future, in order to improve conservation practices using the adaptive potential of species. One of the most striking adaptive changes that result directly from human activities concerns the capacity of some plant species to grow on heavy-metal-polluted sites. The strong selection pressures at play can indeed rapidly lead to an increase of tolerance to heavy metals (Wu *et al.* 1975; Al-Hiyaly *et al.* 1988). The few plant species that have acquired the capacity to grow on contaminated soil are called metallophytes. Pauwels *et al.* (2008) showed how metallophytes can be efficiently used to improve phytoremediation, an ecological technology that uses plants for environmental clean-up. They proposed

to develop an integrative approach using '-omics' studies and ecological genetics to identify the genes underlying these genetic variations and their relative effects. Some of these metallophyte (coined pseudometallophyte) have the particularity to grow on contaminated as well as noncontaminated soils. They constitute highly relevant models in order to study local adaptation in plants and to understand evolutionary process in response to human activities at an intraspecific level.

Population genomics aims at identifying loci causing adaptive differences in natural populations. Positive selection is expected to increase genetic differences at the genes causing local adaptation as compared to the genomic background, and therefore, scanning the genome for polymorphism at many loci on many individuals from several populations should in principle make it possible to separate locus-specific effects from genome-wide effects (Luikart *et al.* 2003). Marker loci responding directly to directional selection, or linked to the targets of selection through genetic hitchhiking (Maynard Smith & Haigh 1974)

Correspondence: Vincent Castric, Fax: +33 32043 6979; E-mail: vincent.castric@univ-lille1.fr

are expected to show higher population differentiation than neutral markers evolving exclusively through genetic drift and gene flow. This approach has the great advantage of not requiring knowledge of the traits under selection. The pioneer surveys using this approach suggested that identifying genomic regions potentially under selection was both feasible and powerful, and the technical improvements in genotyping have prompted explorative genome scans on many different species. A wide range of different issues have been addressed by means of genome scans, relating to adaptation to environmental gradients (Bonin *et al.* 2006; Jump *et al.* 2006), adaptation to contrasting habitats (Mealor & Hild 2006; Oetjen & Reusch 2007; Namroud *et al.* 2008), and selection during speciation (Wilding *et al.* 2001; Savolainen *et al.* 2006; Gross *et al.* 2007; Minder & Widmer 2008). All these studies reported evidence for divergent selection on at least some marker loci. The proportion of 'outlier' loci, which exhibit stronger differentiation than expected given the genome-wide differentiation, was generally found between 2% and 15%. To gain new insights into the genetic architecture of adaptation to heavy-metal-polluted sites, we applied a genome-scan approach on a model pseudometallophyte species, *Arabidopsis halleri*, for which both molecular and ecological information is available. Indeed, not only the demographic and evolutionary history of this species in contaminated sites (Pauwels *et al.* 2005), but also the large-scale population differentiation for zinc tolerance (Pauwels *et al.* 2006) have been characterized.

Arabidopsis halleri (L.) (O'Kane & Al-Shehbaz) (syn. *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek) is a clonal, self-incompatible and highly out-crossing perennial weed with a disjunct distribution in central Europe and eastern Asia. It has recently emerged as a model organism for studies on zinc tolerance and hyperaccumulation (Becher *et al.* 2004; Pauwels *et al.* 2008; Roosens *et al.* 2008a). It is indeed the closest metal-tolerant relative of the model species *Arabidopsis thaliana* (Al-Shehbaz & O'Kane 2002), with which it shows high nucleotide sequence identity and good synteny (Roosens *et al.* 2008b). In Europe, *A. halleri* occurs in two sharply contrasted environmental conditions. At low altitude in Northern France, Silesia (Poland), Harz (Germany) and Bergamo province (Italia), the species is restricted to industrial sites that typically show very high levels of pollution by a number of heavy metals. Beside these metalcolous (M) populations, the species also occurs in nonmetalliferous sites (nonmetallicolous populations, NM), typically at moderate to high altitude. Contamination by zinc (Zn) is on average 80 times higher in metalliferous sites than in nonmetalliferous sites (Pauwels *et al.* 2006), and NM populations are believed to represent native populations that later independently founded the nearby M populations during industrial times (Pauwels *et al.* 2005). Pauwels *et al.* (2006) compared Zn tolerance across

31 European populations and showed that individuals from M populations could on average tolerate much higher levels of Zn than individuals from NM populations. Yet, the variation of tolerance observed between M and NM populations was about an order of magnitude lower than that observed between *A. halleri*, and its close, nontolerant relatives *A. lyrata* and *A. thaliana*. Zn hyperaccumulation has also been well documented in *A. halleri*, where individuals accumulate very high levels of Zn in shoots (from 1806 µg/g to 13 168 µg/g in Bert *et al.* 2002). Accumulation response is relatively homogeneous among individuals within edaphic type, but individuals from NM populations seem to concentrate Zn more effectively than individuals from M populations (Bert *et al.* 2002). The different responses of M and NM populations for Zn tolerance and hyperaccumulation suggest a possible adaptive divergence of populations from different edaphic types. Nevertheless, the evolutionary forces involved and the underlying genetic architecture have not yet been investigated.

The aim of the present study is to explore the *A. halleri* genome to detect signatures of directional selection reflecting adaptation to metalliferous sites. In order to detect genomic regions showing evidence of adaptive divergence, we performed a genome-wide scan analysis based on measures of divergence at amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Our study revealed several reliable candidate loci potentially under selection in M populations. Interestingly, some of these candidate loci differed between the two M populations, suggesting the possibility that selection may have targeted different loci in the different M populations.

Materials and methods

Samples collected

In order to maximize the statistical power of the genome scan, we sampled M and NM populations that were geographically and genetically the closest, and that presumably shared a recent common history. Populations were selected in the only region where M and NM populations could be found nearby: south of Poland and north of Slovakia with a maximum distant of about 200 km (Pauwels *et al.* 2006). Using 13 cpDNA restriction fragment length polymorphism markers, Pauwels *et al.* (2005) showed that populations from this region clustered together and shared the same major haplotype. We sampled 124 individuals in this area from two NM populations (NM1 and NM2, the latter being referred to as SK2 in Pauwels *et al.* 2005) and two M populations (M1 and M2). Populations NM1, M1 and M2 are geographically close to each other (10 to 65 km) and are separated from NM2 by approximately 200 km as well as a physical barrier: the Tatras Mountains (see Fig. 1). The M1 population is located near a zinc

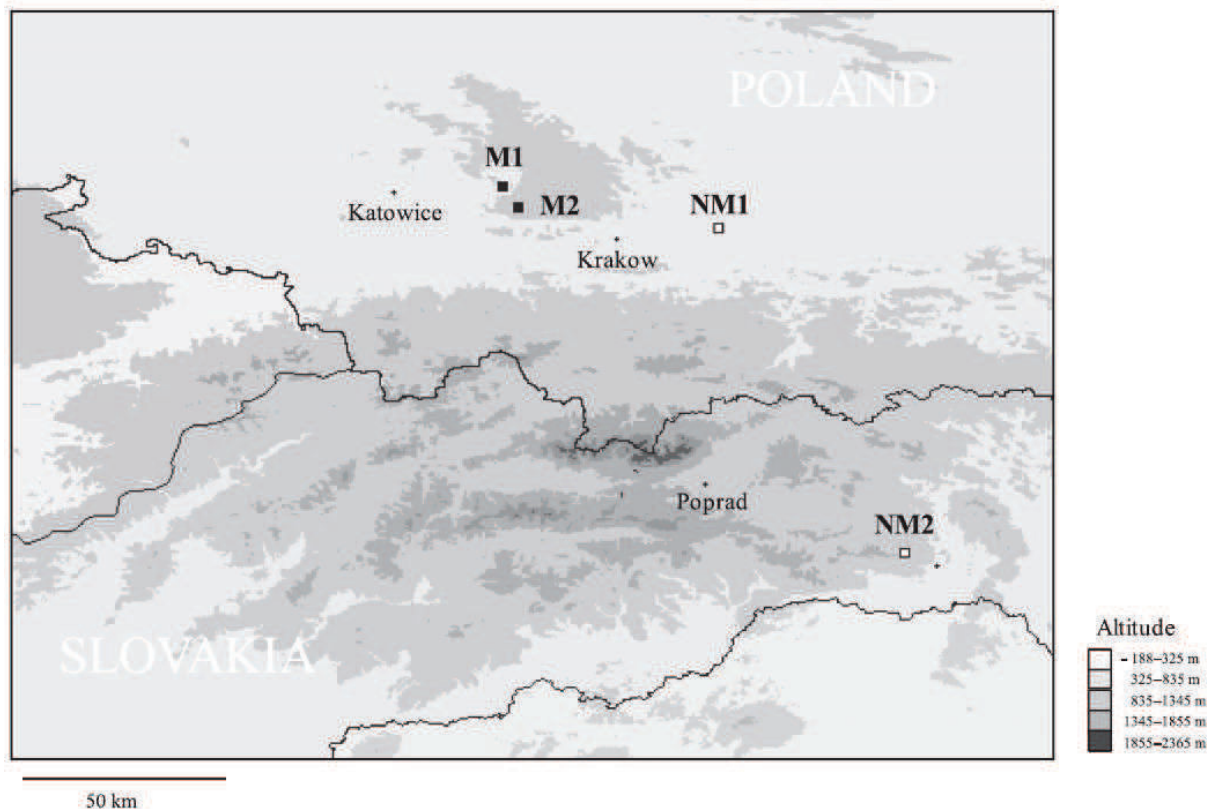


Fig. 1 Geographic location of the nonmetallicolous (NM, white square) and metallicolous (M, black square) populations of *Arabidopsis halleri* surveyed in the present study.

Table 1 Geographic location, ecological and edaphic information on the *Arabidopsis halleri* investigated natural populations

Symbol	Location	Ecological background	Altitude (m above sea level)	Latitude	Longitude	<i>n</i>	Concentration total in soil (µg/g)		
							Zn	Cd	Pb
NM1	Niepolomice Poland	Forest edge close to a river	206	50°6'35.64"N	20°21'40.26"E	34	162	0.5	26
NM2	Kosica Bela Slovakia	Meadow	690	48°46'10.20"N	21°7'48.60"E	28	51*	n.d.	n.d.
M1	Olkusz Poland	Meadow	339	50°16'58.08"N	19°28'43.38"E	33	3969	27	1015
M2	Galman Poland	Forest edge	447	50°11'36.78"N	19°32'15.12"E	29	34 981	149	8760

M, metallicolous; NM, nonmetallicolous; *n*, number of genotyped individuals; n.d., not determined. * in Bert *et al.* 2002.

smelter, and M2 is less than 8 km away from this industrial area. Heavy-metal contamination is extremely dissimilar between M and NM populations with a soil Zn concentration of 3969 and 34 981 µg/g in M populations and a concentration lower than 162 µg/g in NM populations (Table 1). Zn tolerance of the four sampled populations was assessed using leaf chlorosis tests, which showed that individuals from NM1 and NM2 are significantly less tolerant than individuals from M1 and M2 (C.-L. Meyer *et al.* in preparation).

Molecular methods

Genomic DNA was extracted using a Dellaporta method modified according to Saumitou-Laprade *et al.* (1999). AFLP markers were generated as described by Vos *et al.* (1995) using *EcoRI*/*MseI* restriction enzymes. Briefly, preselective PCR was performed using *EcoRI* and *MseI* adaptors having one additional selective nucleotide and selective PCR was performed using *EcoRI* + 3 and *MseI* + 2 nucleotides. For selective amplification, we conducted a preliminary screening

of 50 primer pairs on four NM2 and four M1 individuals. Primer pairs that generated polymorphic profiles and clear repeatable peak patterns were selected for further analysis. The amplified fragments were separated by electrophoresis on an ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems). Electrophoregrams were analysed automatically for fragment presence/absence in each individual in the range of 40 to 500 bp with GeneMapper (version 3.7). To ensure a good quality of the AFLP data set, we visually checked each run and removed loci with only low peaks and loci separated by less than one nucleotide. To reduce bias due to low frequency variants only loci with frequencies ranging from $3/n$ to $(1-3/n)$ (where n is total sample size) were considered as polymorphic and retained for further analysis (Lynch & Milligan 1994). Thirty per cent of the overall sample was genotyped twice independently, in order to evaluate the repeatability of AFLP loci. The genotyping error rate per individual was calculated as the ratio of the observed number of differences between replicates to the total number of comparisons. The error rate per locus was also estimated to identify unreliable loci.

Neutrality test based on genetic differentiation

To identify the signatures of natural selection, we applied two widely used methods: Dfdist, an extension to Fdist (Beaumont & Nichols 1996) and a new version of DetSel (Vitalis *et al.* 2001; Vitalis *et al.* 2003) modified to handle dominant data (available at <http://www.ecoanthropologie.cnrs.fr/spip.php?article359>). Both methods are based on the principle that genetic differentiation among populations is expected to be higher for loci under divergent selection than for the rest of the genome. To minimize the detection of false positives, these methods have been used in combination in several recent studies (Vasemägi *et al.* 2005; Bonin *et al.* 2006; Oetjen & Reusch 2007; Tsumura *et al.* 2007). In these studies, only the markers detected by both methods were considered as good candidates for selection.

To analyse dominant data, both Dfdist and DetSel implement the Bayesian approach developed by Zhivotovsky (1999), in which allelic frequencies are estimated from the proportion of recessive phenotypes in the sample. The rationale of Dfdist is to compute F_{ST} and heterozygosity for each empirical locus and then to compare these values to a neutral distribution of F_{ST} conditional on heterozygosity, generated by means of coalescent simulations in a symmetrical island migration model at migration–drift equilibrium. Using the multilocus F_{ST} estimated from the AFLP data as a target value for the neutral simulations, a total of 1 million independent loci were generated in a model with 100 demes (as an approximation to the infinite island model). Loci with a maximum allele frequency larger than 0.99 were discarded both for the estimation of the empirical multilocus F_{ST} , and for simulations.

The rationale of DetSel is to compute the joint distribution of the population-specific F -statistics parameters F_i for each population in a pair ($i = 1$ or 2) (Weir & Hill 2002) and to compare values of each empirical locus to a neutral distribution generated by coalescent-based simulations in a pure divergence model. This model assumes that an ancestral population of effective size N_e at mutation drifts equilibrium splits up into two daughter subpopulations t generations from present, and that the daughter populations are completely isolated from each other and diverge through random drift only. Under the model assumptions, F_i is a function of the divergence time t and the effective size of the daughter population N_i as: $F_i \approx 1 - e^{-t/N_i}$. This metrics reflects the intensity of genetic drift that occurred since the split. Loci with outstanding F_i estimates (outliers from the null distribution) may have been influenced by forces other than mutation and drift alone and have most likely been the target of selection.

Although the joint distribution of F_i estimates conditional upon the number of alleles in the sample is relatively insensitive to the nuisance parameters when using codominant data (Vitalis *et al.* 2001), this might not hold with dominant data. Therefore, we estimated N_e and t with the software package IMA (Hey & Nielsen 2007), which aims at estimating the demographic parameters of a two-population model with isolation and migration, using a Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithm. The analysis was performed from independent data, using five microsatellite loci genotyped on 30 individuals on average from each population (A. Kostecka, unpublished and M. Pauwels *et al.* in preparation). Three independent runs, using 1 million steps and 100 000 steps for burn-in, were performed for each population pair to assess the convergence of the MCMC. To estimate divergence times in generations and effective population sizes, we chose a generation time of 2 years and an average microsatellite mutation rate of 10^{-5} per generation. Finally, we simulated neutral distributions with DetSel parameters t and N_e as estimated by IMA: N_e was set to 400 000, 600 000 and 800 000 and t to 100 generations for population pairs involving NM1, M1 and M2 and 2000 generations for pairs involving NM2 (see Results). The deviation of simulated data from empirical data was on average for F_{ST} , F_1 and F_2 of $\pm 0.04\%$ with a maximum of $+0.07\%$. To check whether these distributions were close approximations of the real data, simulations with various population sizes and a possible bottleneck were performed. Results from these simulations did not exhibit a closer match with the observed F_{ST} , F_1 and F_2 estimates, except for the M1–M2 pair. For this pair, the time since the bottleneck, the population size during the bottleneck and N_e were set to 200, 4000 and 40 000, respectively. The last step was to calculate an empirical P value for each locus in the data set. To do so, we used the same two-dimensional arrays of 50×50 square cells that were used to draw the high probability regions

(see Appendix in Vitalis *et al.* 2001). For each observation (F_1 , F_2) in the real data set, we computed its associated probability in the simulated data set (i.e. the relative frequency of this observation over the full set of simulated data). Then, we derived the empirical P value for this observation, as one minus the sum of all cell probabilities within the simulated data set that are more probable than the observed data.

Identification of loci under selection in M populations

Neutrality tests provided an estimation of the proportion of loci presumably responding to selection in a pair of populations and a probability for each locus to be an outlier of the neutral distribution. The next step was to identify in the data set the loci with high probability to be under selection in a specific environment, here in M populations. In order to identify these loci, we combined P values from the four NM vs. M comparisons using the Z-transform test (Whitlock 2005). The assumption of independence of the P values is violated, since some of the pairwise comparisons are not independent from each other. The P values were therefore not interpreted literally, but rather used to obtain a ranked list of candidate loci for divergent selection in all M populations. Combining P values has the advantage to take all the P values from the relevant pairwise comparisons into account, instead of considering only the P values above an arbitrary significance threshold. Twenty loci with the lowest combined P values were retained from each of the Dfdist and DetSel analysis. Those loci that were common to both subsets were presumed to be under divergent selection. Because edaphic type is most probably the main ecological difference between M and NM populations, the loci that significantly departed from the neutral expectation were considered to be good candidates for adaptation to metalliferous sites. All the other loci were considered as presumably neutral.

Adaptation to a specific environment can result from selection targeting the same loci in all populations or from selection targeting different loci in different populations (Stinchcombe & Hoekstra 2007). To investigate the latter possibility, we combined P values from the NM1 vs. M1, NM2 vs. M1 and M1 vs. M2 comparisons on the one hand and from the NM1 vs. M2, NM2 vs. M2 and M1 vs. M2 comparisons on the other hand. These combined P values are likely to identify loci under selection in the M1 and the M2 populations, respectively. The same criterion as above was used to discriminate between candidate and presumably neutral loci.

Genetic diversity and population differentiation inferred from divergent vs. neutral loci

We performed an analysis of molecular variance (AMOVA) for both the candidate and the presumably neutral loci,

with populations grouped according to their edaphic types, using Arlequin version 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). We also calculated Nei's genetic distances for each group of loci using AFLP-SURV (Vekemans *et al.* 2002). For each group, we generated 1000 bootstrapped distance matrices, which were then imported into the software package PHYLIP version 3.68 (Felsenstein 2005) in order to construct neighbour-joining (NJ) consensus trees.

Results

Characterization of AFLP markers

We selected the 27 most polymorphic primer pairs, resulting in a total of 820 polymorphic markers. Each primer combination yielded between 15 and 56 polymorphic AFLP markers with an average of 30 markers per primer pair. Marker size ranged from 42 to 400 bp and followed the classical AFLP L-shaped fragments length distribution (Innan *et al.* 1999; Vekemans *et al.* 2002), with 40% of markers between 60 and 120 bp. Assuming random distribution of AFLP markers in the 255 Mb long *Arabidopsis halleri* genome (Johnston *et al.* 2005), we expect one marker every 0.3 Mb.

The genotyping error rate per individual was low (about 4%), and congruent with AFLP error rates previously reported in several plant species (Bonin *et al.* 2004; Minder & Widmer 2008). The genotyping error rate per marker was also estimated to be around 4%. The markers were further classified into size classes, in order to determine whether genotyping errors were randomly distributed across size classes. We found that the error rate was significantly different across classes (Kruskal Wallis exact test: $p = 0.016$) with a higher error rate for the smallest class of fragments (40 to 90 bp), as expected from the technical challenges of scoring small fragments.

Genetic differentiation between populations

The overall genetic differentiation measured from the 820 polymorphic AFLP markers, across the four sampled populations was low ($F_{ST} = 0.066$). The mean pairwise F_{ST} ranged from 0.044 to 0.109 (see Fig. 2), with substantially higher values for the comparisons involving NM2 (average $F_{ST} = 0.088$). Genetic differentiation was lower among the three other populations (NM1, M1 and M2) and was minimum for the M1–M2 pair. For all comparisons, genetic differentiation across the genome followed an L-shaped distribution, with most loci showing low F_{ST} and only few showing high levels of differentiation (Fig. 2). The tail of the distribution differed between comparisons; pairs with NM2 showed longer tails with some F_{ST} values as high as 0.798, and pairs with NM1, M1 and M2 showed smaller tails with a maximum of $F_{ST} = 0.548$.

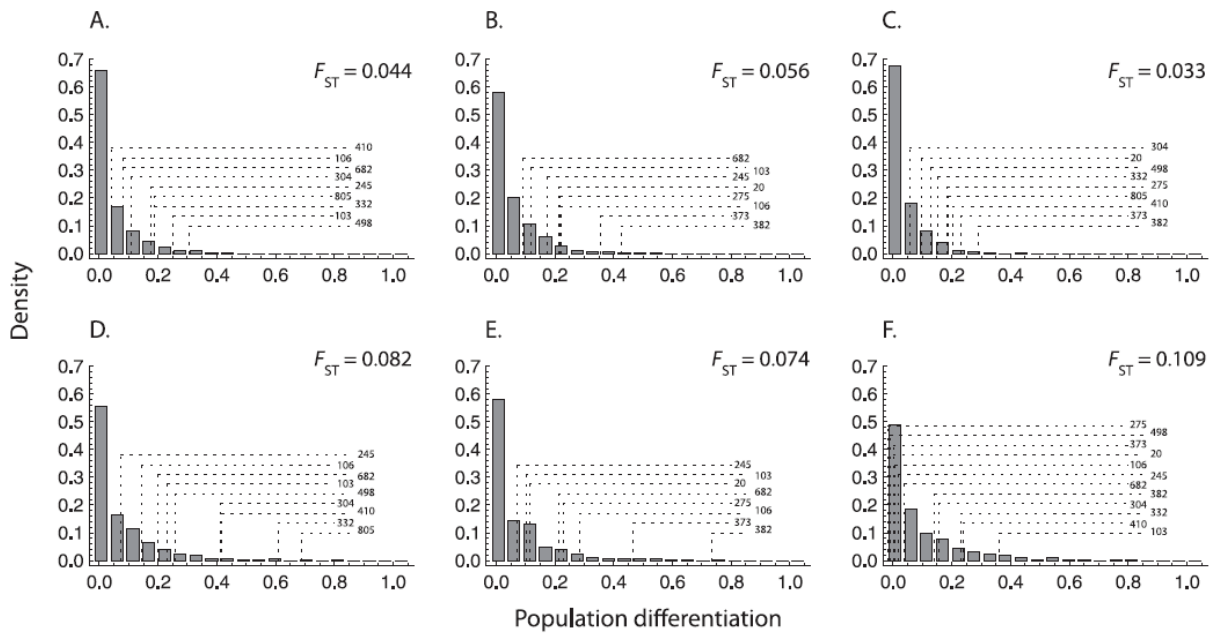


Fig. 2 Distribution of the pairwise F_{ST} values for the 820 AFLP markers in the four inter-edaphic type comparisons (A: NM1–M1; B: NM1–M2; D: NM2–M1; E: NM2–M2) and the two intra-edaphic type comparisons (C: M1–M2; F: NM1–NM2). Candidate loci are mapped onto the distributions. The mean pairwise F_{ST} across the 820 AFLP markers is shown for each comparison.

Table 2 Estimates of demographic parameters from the isolation-by-migration analytic (IMa) model (Hey & Nielsen 2007). Values are given for mutation rates fixed to 10^{-5} and a 2-year generation time. The migration rate, m_1 and m_2 correspond to gene flow from population 2 to population 1 (m_1) and from population 1 to population 2 (m_2), respectively

	Estimation			
	Ancestral N_e	Migration rate per generation		t (in generation)
		m_1	m_2	
NM1-M1	342 250 (129 162–782 125)	23×10^{-3} (6×10^{-3} – 39×10^{-3})	19×10^{-3} (8×10^{-3} – 42×10^{-3})	190 (95–295)
NM1-M2	1 017 993 (329 782–2 569 236)	4×10^{-3} (6×10^{-4} – 9×10^{-3})	6×10^{-3} (8×10^{-4} – 14×10^{-3})	335 (135–490)
NM2-M1	1 121 688 (346 563–2 983 166)	6×10^{-4} (5×10^{-6} – 4×10^{-3})	2×10^{-3} (5×10^{-6} – 4×10^{-3})	1395 (240–2440)
NM2-M2	1 028 036 (462 475–2 048 101)	6×10^{-4} (10^{-5} – 3×10^{-3})	10^{-3} (7×10^{-5} – 3×10^{-3})	900 (175–2250)
M1-M2	827 500 (283 750–1 971 000)	7×10^{-3} (6×10^{-4} – 18×10^{-3})	9×10^{-3} (13×10^{-4} – 26×10^{-3})	235 (75–390)
NM1-NM2	1 487 363 (484 622–366 427)	3×10^{-4} (7×10^{-6} – 10^{-3})	10^{-3} (10^{-4} – 3×10^{-3})	2175 (600–3870)

95% CI are represented in parentheses.

Estimation of demographic parameters for a scenario of divergence

The IMa program was first used to estimate the divergence time between each pair of populations, as well as the

effective size of the ancestral population (Table 2). Divergence between M1, M2 and NM1 was estimated to be around 250 generations which, considering a 2-year generation time gives an estimate of common ancestry approximately 500 years before present (BP). As expected, the estimated

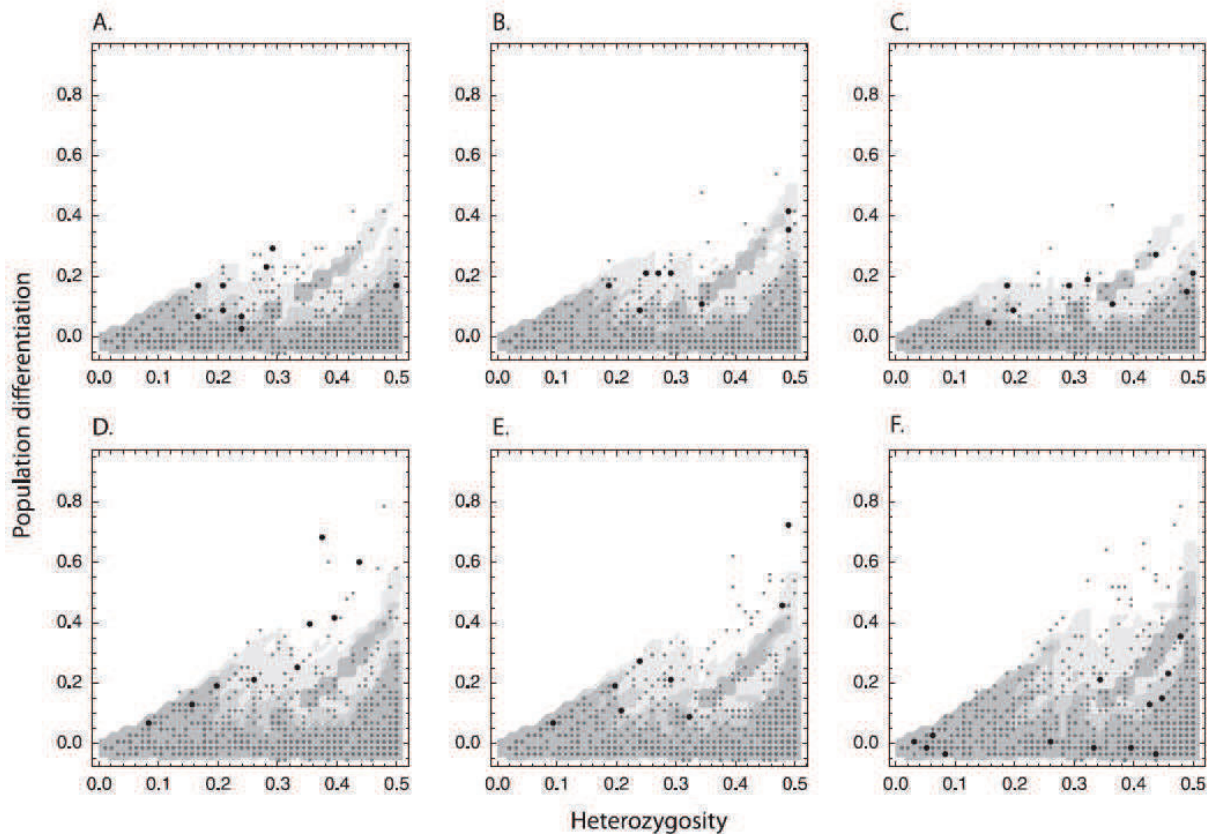
2056 C.-L. MEYER *ET AL.*

Fig. 3 Joint distribution of F_{ST} and H_e for each pairwise comparison, as obtained with Dfdist (A: NM1–M1; B: NM1–M2; C: M1–M2; D: NM2–M1; E: NM2–M2; F: NM1–NM2). The 90%, 95% and 99% confidence regions of the null distribution are shown from darker to lighter grey, respectively. The smoothed density was obtained using the average shifted Histogram (ASH) algorithm (Scott *et al.* 1992) with smoothing parameter $m = 2$. Each dot represents at least one AFLP marker. Larger dots are candidate loci diverging from neutrality in both Dfdist and DetSel.

divergence between NM2 and the other populations was higher (around 1490 generations, i.e. 2980 BP). Estimations of ancestral population size were very large, ranging from 342 250 to 1 487 363. These values are congruent with the population size estimated for the whole species (Castric *et al.* 2008). Consistent with geographical distances and levels of genetic differentiation, migration rates estimates were lower for population pairs including NM2.

Neutrality test for detecting divergent selection

The neutral distributions expected for each population pair, from the Dfdist analysis (adapted from Beaumont & Nichols 1996) and from the DetSel analysis (adapted from Vitalis *et al.* 2001) are shown in Figs 3 and 4, respectively. Consistent with the lower pairwise F_{ST} values observed, neutral distributions were narrower for comparisons including NM1, M1 and M2 (Figs 3A–C and 4A–C) as compared to comparisons including NM2 (Figs 3D–F and

4D–F). The NM1–M1 and NM1–M2 null distributions generated with DetSel (Fig. 4A–B) were remarkable because they were shifted to positive values of F_1 . This pattern suggests that population NM1 is more divergent than M1 or M2 from their common ancestor, e.g. as a consequence of a smaller effective population size in NM1.

Both methods showed at least some markers more differentiated than expected under neutrality for all pairwise comparisons. The proportion of outliers identified with Dfdist at the 1% α -level ranged from 1.73 to 3.34% (13 to 27 loci), with the highest proportion detected for the intra-edaphic type comparison NM1 vs. NM2 (Table 3). For the analysis with DetSel, we identified a slightly higher proportion of outliers at the 1% α -level, which ranged from 4.01 to 5.58% (32 to 45 loci) except for the M1 vs. M2 comparisons with 1.3% of outliers (10 loci). In order to estimate the false-positive rate at any given nominal threshold, we ran DetSel analysis on artificially generated data sets (under selective neutrality) with sample sizes and numbers

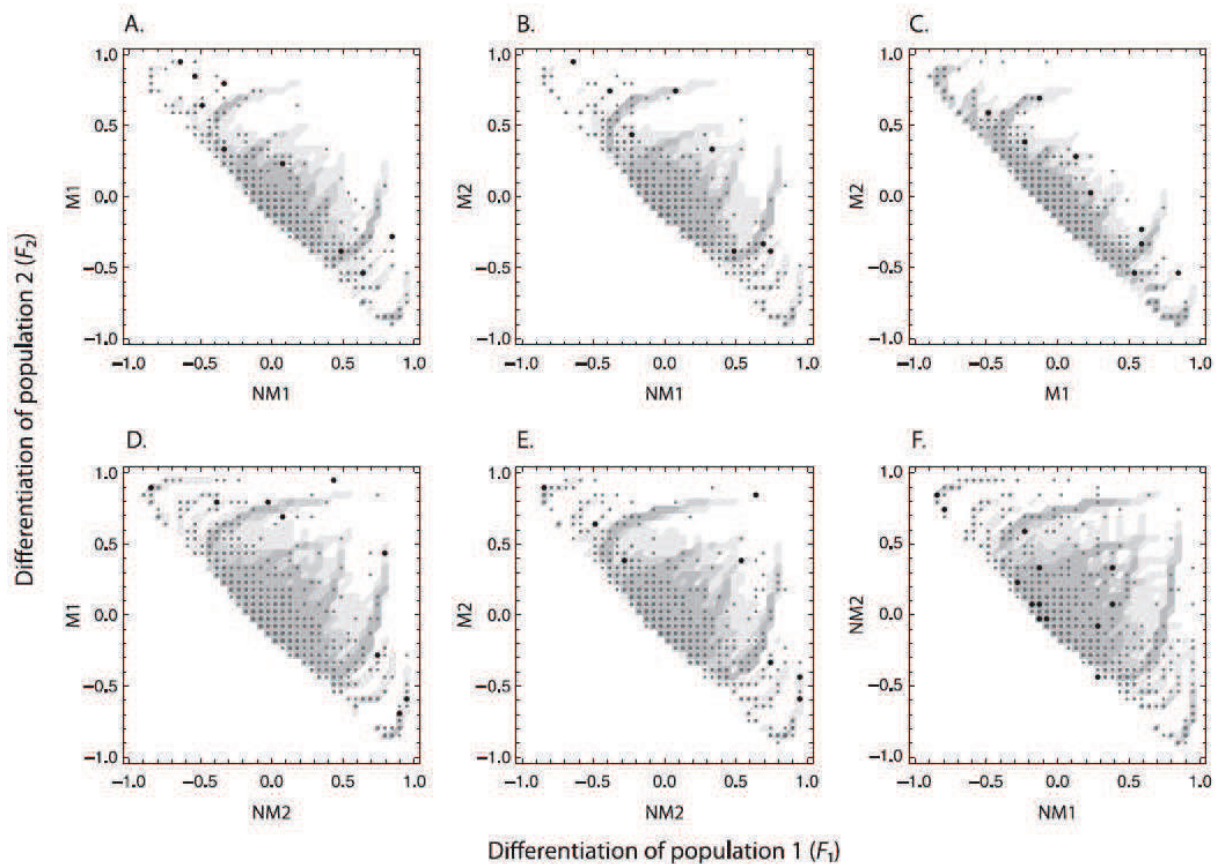


Fig. 4 Joint distribution of F_1 and F_2 estimates for each pairwise comparison, as obtained with DetSel (A: NM1–M1; B: NM1–M2; C: M1–M2; D: NM2–M1; E: NM2–M2; F: NM1–NM2). The 90%, 95% and 99% confidence regions of the null distribution are shown from darker to lighter grey, respectively. Each dot represents at least one AFLP marker. Larger dots are candidate loci diverging from neutrality in both Dfdist and DetSel.

Table 3 Proportion of outliers detected with Dfdist and DetSel from the data set of 820 AFLP markers in six pairwise comparisons at the 1% α -level. For each method and pairwise comparison, the proportion of the outliers that were also detected by the other method is indicated (e.g. for the NM1–M1 comparison, among the 2.88% outlier loci detected with Dfdist, 26% were also detected with DetSel)

Pair	Proportion of outlier loci (%)		Proportion detected by the other method (%)	
	Dfdist	DetSel	Dfdist	DetSel
NM1–M1	2.88	4.01	26	18
NM1–M2	2.76	5.03	10	5
NM2–M1	1.87	3.38	61	29
NM2–M2	1.73	4.57	64	24
M1–M2	2.36	1.36	15	27
NM1–NM2	3.34	5.58	18	11

of markers similar to the *A. halleri* data set. We performed the analysis on two sets of 100 simulated 1000-locus data sets generated with the simulation parameters used for the real data, with (i) a 100-generation divergence time and (ii) a 2000-generation divergence time. For each data set, we ran the DetSel analysis in exactly the same way as we did for real data. In the first case, which mimicked the analysis for pairs involving NM1, M1 and M2, we detected on average 1.13 (SD = 1.09), 10.56 (SD = 2.97) and 51.11 (SD = 6.48) outliers at the 0.1%, 1% and 5% α -level, respectively. The medians were 1, 10 and 51 outliers, which should be compared to the 1, 10 and 50 outliers expected in a 1000-locus data set. In the second case, which mimicked the analysis for pairs involving NM2, we detected on average 1.10 (SD = 1.00), 10.78 (SD = 3.37) and 51.19 (SD = 6.89) outliers at the 0.1%, 1% and 5% α -level, respectively. The medians were 1, 10.5 and 52.5 outliers. The type I error is therefore extremely close to the nominal level, which supports the idea that most of the outliers detected above

Table 4 Candidate loci of adaptive divergence between M and NM populations. Crosses indicate loci in the 'top 20' most likely outliers (lowest combined *P* value in both Dfdist and DetSel analyses). Allele frequencies in each population are also given

Locus	Fragment size (bp)	Detected in:		Allelic frequencies			
		M1	M2	NM1	NM2	M1	M2
103	236	X	X	0.53	0.55	0.20	0.06
106	230	X	X	0.00	0.06	0.52	0.30
245	53	X	X	0.35	0.18	0.00	0.00
682	185	X	X	0.12	0.00	0.39	0.41
304	237	X		0.37	0.75	0.07	0.28
332	50	X		0.63	0.14	0.93	0.66
410	93	X		0.36	0.82	0.15	0.61
498	68	X		0.03	0.08	0.60	0.23
805	185	X		0.42	0.92	0.03	0.43
20	102		X	0.53	0.39	0.36	0.07
275	136		X	0.09	0.07	0.12	0.55
373	150		X	0.44	0.30	0.58	0.93
382	116		X	0.69	0.30	0.80	1.00

the nominal α -level (1%), by Dfdist and DetSel are true positives. The proportion of outliers identified by both methods was variable (Table 3) and ranged from 10% and 5% for NM1–M2 to 61% and 29% for NM2–M1.

To identify loci under selection in M populations, we looked at the loci with the highest combined *P* values in the Dfdist and the DetSel analyses. The global analysis showed that among the 20 loci with the highest probability to be under selection in all M populations, 4 were common to Dfdist and DetSel analyses (Table 4). These loci were considered to be good candidates for adaptive divergence between M and NM populations. The analysis of the population pairs involving M1 revealed five other loci, identified by both methods (Table 4). Four other loci were also identified by both methods in the analysis of the population pairs involving M2. These nine loci were considered to be good candidates for adaptation to a specific M site. The pairwise *P* values of the 13 loci identified overall ranged from 2.5×10^{-5} to 0.22 for the Dfdist analysis, with a majority of values between 0.001 and 0.08 and from 3×10^{-5} to 0.115 for the DetSel analysis with a majority between 0.001 and 0.03 (supplementary table S1). All *P* values were low and confirmed a posteriori the reliability of the 13 candidates; however, none of these loci had very low *P* values for all four NM vs. M comparisons. Indeed, a majority of the 13 loci were located at the edges of the neutral distributions in the NM vs. M comparisons (Figs 3 and 4). Remarkably, these loci fell right within the expected neutral distribution in the NM1 vs. NM2 comparison (Figs 3F and 4F), which supports their status of candidate loci for local adaptation in the M populations. These loci were also found in the tails of the F_{ST} distributions (Fig. 2). The distribution of allele

frequencies measured at these loci across populations was also consistent with the above results: a subset of these loci clearly showed higher allele frequencies in M population(s), as compared to NM populations, (see Table 4) while the other subset of loci clearly showed lower allele frequencies in M population(s). Locus 245 exhibited an extreme pattern with complete fixation in both M1 and M2.

These 13 loci were further pooled into a 'candidate loci to local adaptation' data set, while the other 807 loci were pooled in a 'neutral markers' data set. Genetic diversity of the neutral data set was mainly explained by the variance within population (87.4% of the total variance, see Fig. 5a). The genetic variance among populations within edaphic type explained the remainder 12.6%. This variance partitioning is consistent with population structure inferred from the F_{ST} estimates. The 'candidate loci' data set showed a lower within-population genetic variance (66.2%), while edaphic type explained 18.3% of the overall genetic variance. The genetic variance measured among populations within edaphic types was slightly lower (15.5%) than in the 'neutral data set'. The NJ trees reconstructed from the 'neutral' and 'candidate loci' data sets revealed strikingly contrasting topologies (Fig. 5b). The 'candidate loci' data set separated the four populations into two edaphic groups (M and NM), as opposed to the 'neutral data set' which resulted in a similar topology as for the complete data set (data not shown).

Discussion

In order to identify markers deviating from neutral expectation in *Arabidopsis halleri* metalliferous populations, we adopted a very conservative design: loci were only considered as candidates for local adaptation if they were picked up by two different methods (Dfdist and DetSel) in several M vs. NM comparisons. Our analysis revealed 13 loci that fulfil these requirements and represent good candidates for adaptation to metalliferous sites. Nevertheless, the fact that none of these loci was very divergent in every M vs. NM comparisons could be interpreted as evidence for only weak selection operating on *A. halleri* in metalliferous sites. Indeed it is possible that environmental modifications in metalliferous sites do not correspond to strong selection pressures for a Zn-tolerant and hyperaccumulator species like *A. halleri*. Nevertheless, this absence of strong signatures of selection could also be explained by several factors that impact the statistical power of genome scans studies.

A first factor that could directly affect the power of the analysis is genome coverage. Coverage depends upon both the number of markers and the level of linkage disequilibrium (LD), and determines the probability to genotype the loci targeted by selection, or some tightly linked markers. Kim *et al.* (2007) showed that in the highly selfing model species *Arabidopsis thaliana*, a genome-wide association mapping would require around 150 000 markers, which far exceeds

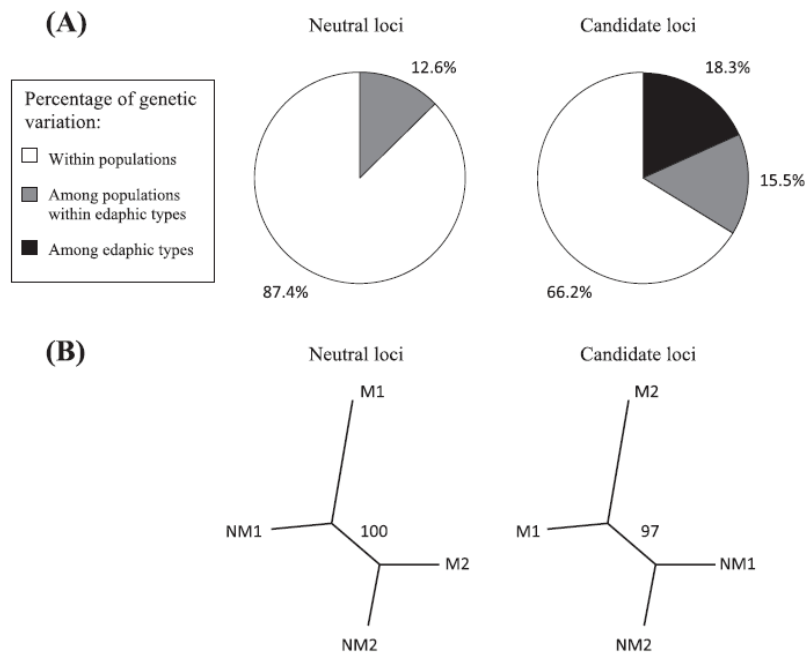


Fig. 5 Genetic variation and genetic distance infer from the 'presumably neutral' and the 'candidate loci' data sets. (A) Distribution of genetic variation as inferred from a hierarchical AMOVA (B) Neighbour-joining trees based on Nei's genetic distance. Bootstrap values are indicated in percentage.

the number of markers in our study. Furthermore, *A. halleri* is an outcrossing species with certainly lower LD than *A. thaliana* for which LD decays within 10 kb (Kim *et al.* 2007). Hence, it may be unsurprising that our non-exhaustive approach with 820 markers only detects weak signatures of selection. The probability to miss major genes with strong signatures of selection may be quite high, especially if the marker loci we typed are far from these genes. If we consider that linkage in *A. halleri* extends up to 10 kb on average (which is an overestimation) and that the 820 markers are separated on average by 0.3 Mb (assuming a random distribution), then our study 'only' represents 3.2% of the *A. halleri* genome. Notwithstanding this poor coverage as compared to model species, our survey actually outcompetes any published genome scans on nonmodel species. We indeed estimated that the density of markers, in the past genome-scan studies where genome size data were available, ranged from one marker every 2.14 Mb (Jump *et al.* 2006) to one marker every 12.2 Mb (Bonin *et al.* 2006).

The power of our analysis could also be reduced by a discrepancy between the genuine evolutionary scenario that resulted in the observed data, and the simulated models we used. The true demographic history of the *A. halleri* populations studied here is certainly intermediate between a pure divergence scenario (as implemented in DetSel) and an equilibrium island model (as implemented in Dfdist), and most likely includes both divergence by pure drift and recurrent migration. We have shown indeed that our sample is made up of two groups: three populations from the plain (NM1, M1 and M2) which have diverged recently

and are most probably connected by gene flow, and one population from the mountain (NM2) which has diverged after the last glaciations and is certainly connected to the first group by lower levels of gene flow. Nevertheless, the statistical methods we used are relatively robust to departures from the model assumptions (Beaumont & Nichols 1996; Vitalis *et al.* 2001). Furthermore, although the expected neutral distributions may be biased when populations have heterogeneous demographic parameters (Beaumont & Nichols 1996), our approach that consisted in analysing pairs of populations should account for such heterogeneity (Tsakas & Krimbas 1976).

The results of a genome scan can also be affected by the mode of selection. When a population colonizes a new environment, selection may proceed on new, rare variants arising by mutations or on pre-existing, standing variation. Adaptation from standing variation can lead to patterns of polymorphism that differ markedly from the signature expected under more standard models of adaptation from new mutations (Przeworski *et al.* 2005). Because the standing variants are older, selective sweeps are weaker on average than those associated with new mutations (Teshima *et al.* 2006). As a result, population differentiation at the selected loci may not be as sharply increased as it would be for new mutations and such loci would hence be harder to pick up. Adaptation from standing variation is definitely a possibility in our study system. Polluted sites are dramatically altered environments that require rapid evolutionary change for individuals to adapt. Adaptation from standing variation is likely to be faster because beneficial alleles are readily available at moderate to high frequencies. Furthermore, it

2060 C-L. MEYER *ET AL.*

is a widely accepted hypothesis that tolerance to heavy metal is determined by few genes with large effects, and several minor modifier genes involved in the phenotypic variation among populations (Macnair *et al.* 2000). Such alleles with small effects are expected to largely contribute to adaptation from standing variation (Barrett & Schluter 2008).

In spite of these limits, our very conservative approach revealed that 13 loci diverged from neutrality and are thus likely to have experienced adaptive divergence between M and NM populations. Among these, four marker loci deviated from neutrality in both M populations, and as such constitute good candidates for general adaptation to pollution by heavy metals. In addition, five loci were candidates for specific adaptation to the M1 population, and four to the M2 population. These loci could be linked to some other selection pressures which are specific to each site, such as soil structure, organic and mineral content or dryness, as is commonly observed in metalliferous sites (Macnair 1987). Williams & Oleksiak (2008) observed the same pattern in the fish *Fundulus heteroclitus*, where some populations have adapted to chemical pollution. They used a similar genome-scan approach and showed that some loci were consistently affected by natural selection across polluted sites, while other loci were more likely to be involved in local adaptation to some polluted sites, e.g. to a particular pollutant or stress. Ecological differences among metalliferous sites have been reported by several studies (as summarized by Ernst 2005), although their consequences on evolutionary processes were not investigated. Understanding the impact of the whole set of ecological variations among metalliferous sites is an important future task to characterize the genetic basis of adaptation to heavy-metal-polluted sites.

It is also possible that the different loci diverging from neutrality in the two M populations reflect convergent evolution in these populations. Indeed, this hypothesis could be supported by two observations. First, in several pseudometallophyte species, the M populations have numerous independent origins (Westerbergh & Saura 1992; Mengoni *et al.* 2001; Baumbach & Hellwig 2007). Thus, the ability to colonize metalliferous sites might have evolved repeatedly in parallel. Pauwels *et al.* (2005) conducted a phylogeographic study of *A. halleri* among 64 populations representative of the European species range, and showed that M populations from one specific geographical group were genetically more related to the geographically closest NM populations than to the M populations from the other groups. Our results at a very local scale are consistent with this pattern, since genetic differentiation among populations reflected geographical distances rather than edaphic types. A second argument for convergent evolution in M populations stems from the observation that, in several species, the level of metal

tolerance varies across M populations (Schat *et al.* 1996). In *A. halleri*, Pauwels *et al.* (2006) documented significant differences in Zn tolerance across individuals as well as across populations. These differences may be partly due to different genetic bases for adaptation across M populations. Convergent adaptation has often been assumed to concern distantly related species rather than closely related species or populations. Nevertheless, empirical studies of the genetics of adaptation have shown that different populations within a species may evolve the same phenotype with different genes (for review, see Arendt & Reznick 2007). This was observed by Protas *et al.* (2006), who found that two unpigmented cavefish populations harboured deletions in *Oca2*, a known pigmentation gene, although not the same deletion in both populations.

More information is necessary to determine if the 13 candidate loci are truly under divergent selection or only false positives, and if the candidate loci spotted in a specific M populations are a sign of convergent evolution. Considering the molecular and phenotypic resources available in *A. halleri*, we are currently (i) mapping these loci in order to search for genes with functions linked to metal homeostasis in these genomic regions, (ii) validating the candidate loci by other approaches including LD and QTL mapping using M and NM individuals, and (iii) analyzing sequence variation of candidate genes. We hope that this combination of approaches will improve our knowledge of the genetic basis of adaptation of *A. halleri* to metalliferous sites.

Acknowledgements

We are grateful to Alicja Kostecka and Maxime Pauwels for help with sampling and for providing the microsatellite data set. We also thank anonymous reviewers for their helpful and constructive comments on the manuscript. This work was supported by funding from the Contrat de Plan Etat/Région Nord-Pas de Calais (PRC), from the Fondation pour la Recherche en Biodiversité (FRB) (contract BRG no. 92), and from the INSU-CNRS program ACI ECCO (contract no. 04 2 9 FNS). Part of this work was carried out by using the resources of the Computational Biology Service Unit from the Museum National d'Histoire Naturelle which was partially funded by Saint Gobain. C.L.M. was funded by the French Ministry of Research and Technology.

References

- Al-Hiyaly SA, McNeilly T, Bradshaw AD (1988) The effect of zinc contamination from electricity pylons — evolution in a replicated situation. *New Phytologist*, **110**, 571–580.
- Al-Shehbaz IA, O’Kane SL (2002) Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). In: *The Arabidopsis Book* (eds Somerville CR, Meyerowitz EM). American Society of Plant Biologist, Rockville, Maryland.
- Arendt J, Reznick D (2007) Convergence and parallelism reconsidered: what have we learned about the genetics of adaptation? *Science*, **23**, 26–32.

- Barrett RDH, Schluter D (2008) Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**, 38–44.
- Baumbach H, Hellwig FH (2007) Genetic differentiation of metallicolous and non-metallicolous *Armeria maritima* (Mill.) Willd. taxa (Plumbaginaceae) in Central Europe. *Plant Systematic and Evolution*, **269**, 245–258.
- Beaumont MA, Nichols A (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **263**, 1619–1626.
- Becher N, Talke IN, Krall L, Kramer U (2004) Cross-species microarrays transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Journal*, **37**, 251–268.
- Bert V, Bonin I, Saumitou-Laprade P, de Laguerie P, Petit D (2002) Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist*, **155**, 47–57.
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen PB *et al.* (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, **13**, 3261–3273.
- Bonin A, Taberlet P, Miaud C, Pompanon F (2006) Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 773–783.
- Castric V, Bechsgaard J, Schierup MH, Vekemans X (2008) Repeated adaptive introgression at a gene under multiallelic balancing selection. *Public Library of Science, Genetics*, **4**(8): e1000168 doi: 10.1371/journal.pgen.1000168.
- Ernst WHO (2005) Phytoextraction of mine wastes — options and impossibilities. *Chemie der Erde Geochemistry*, **65**, 29–42.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6 Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, Washington.
- Gross BL, Turner KG, Rieseberg LH (2007) Selective sweeps in the homoploid hybrid species *Helianthus deserticola*: evolution in concert across populations and across origins. *Molecular Ecology*, **16**, 5246–5258.
- Hey J, Nielsen R (2007) Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **104**, 2785–2790.
- Innan H, Terauchi R, Kahl G, Tajima F (1999) A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. *Genetics*, **151**, 1157–1164.
- Johnston JS, Pepper AL, Hall AE *et al.* (2005) Evolution of genome size in Brassicaceae. *Annals of Botany*, **95**, 229–235.
- Jump AS, Hunt JM, Martinez-Izquierdo JA, Penuelas J (2006) Natural selection and climate change: temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology*, **15**, 3469–3480.
- Kim S, Plagnol V, Hu TT *et al.* (2007) Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, **39**, 1151–1155.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 981–994.
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic-structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**, 91–99.
- Macnair MR (1987) Heavy metal tolerance in plants: a model evolutionary system. *Trends in Ecology & Evolution*, **2**, 354–358.
- Macnair MR, Tilstone GH, Smith SE (2000) The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* (eds Terry N, Banuelos G, Vangronsveld J), pp. 235–250. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Maynard Smith JM, Haigh J (1974) Hitch-hiking effect of a favorable gene. *Genetical Research*, **23**, 23–55.
- Mealor BA, Hild AL (2006) Potential selection in native grass populations by exotic invasion. *Molecular Ecology*, **15**, 2291–2300.
- Mengoni A, Barabesi C, Gonnelli C *et al.* (2001) Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **10**, 1909–1916.
- Minder AM, Widmer A (2008) A population genomic analysis of species boundaries: neutral processes, adaptive divergence and introgression between two hybridizing plant species. *Molecular Ecology*, **17**, 1552–1563.
- Namroud MC, Beaulieu J, Juge N, Laroche J, Bousquet J (2008) Scanning the genome for gene single nucleotide polymorphisms involved in adaptive population differentiation in white spruce. *Molecular Ecology*, **17**, 3599–3613.
- Oetjen K, Reusch TBH (2007) Genome scans detect consistent divergent selection among subtidal vs. intertidal populations of the marine angiosperm *Zostera marina*. *Molecular Ecology*, **16**, 5156–5167.
- Palumbi SR (2001) *The Evolution Explosion: How Humans Cause Rapid Evolutionary Change*. Norton, New York.
- Pauwels M, Saumitou-Laprade P, Holl C, Petit D, Bonin I (2005) Multiple origin of metallicolous populations of the pseudometallophyte *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) in central Europe: the cpDNA testimony. *Molecular Ecology*, **14**, 4403–4414.
- Pauwels M, Frérot H, Bonin I, Saumitou-Laprade P (2006) A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 1838–1850.
- Pauwels M, Willems G, Roosens NCJ, Frérot H, Saumitou-Laprade P (2008) Merging methods in molecular and ecological genetics to study the adaptation of plants to anthropogenic metal-polluted sites: implication for phytoremediation. *Molecular Ecology*, **17**, 108–119.
- Protas ME, Hersey C, Kochanek D *et al.* (2006) Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nature Genetics*, **38**, 107–111.
- Przeworski M, Coop G, Wall JD (2005) The signature of positive selection on standing genetic variation. *Evolution*, **59**, 2312–2323.
- Roosens NCJ, Willems G, Godé C, Courseaux A, Saumitou-Laprade P (2008b) The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*, **306**, 105–116.
- Roosens NHCJ, Willems G, Saumitou-Laprade P (2008a) Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends in Plant Science*, **13**, 208–215.
- Saumitou-Laprade P, Picquot Y, Raspe O, Bernard J (1999) Plant DNA fingerprinting and profiling. In: *DNA Profiling and DNA Fingerprinting* (eds Epplen JT, Lubjuhn T), pp. 17–38. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Savolainen V, Anstett MC, Lexer C *et al.* (2006) Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature*, **441**, 210–213.
- Schat H, Vooijs R, Kuiper E (1996) Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*. *Evolution*, **50**, 1888–1895.

2062 C-L. MEYER ET AL.

- Scott DW (1992) *Multivariate Density Estimation: Theory, Practice, and Visualization* (eds Barnett V, Bradley RA, Fisher NI *et al.*). John Wiley, New York.
- Stinchcombe JR, Hoekstra HE (2007) Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity*, **100**, 158–170.
- Teshima KM, Coop G, Przeworski M (2006) How reliable are empirical genomic scans for selective sweeps? *Genome Research*, **16**, 702–712.
- Tsakas S, Krimbas CB (1976) Testing the heterogeneity of *F* values: a suggestion and a correction. *Genetics*, **84**, 399–401.
- Tsumura Y, Kado T, Takahashi T *et al.* (2007) Genome scan to detect genetic structure and adaptive genes of natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Genetics*, **176**, 2393–2403.
- Vasemägi A, Nilsson J, Primmer CR (2005) Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1067–1076.
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, **11**, 139–151.
- Vitalis R, Dawson K, Boursot P (2001) Interpretation of variation across marker loci as evidence of selection. *Genetics*, **158**, 1811–1823.
- Vitalis R, Dawson K, Boursot P, Belkhir K (2003) DetSel 1.0: a computer program to detect markers responding to selection. *Journal of Heredity*, **94**, 429–431.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407–4414.
- Weir BS, Hill WG (2002) Estimating *F*-statistics. *Annual Review of Genetics*, **36**, 721–750.
- Westerbergh A, Saura A (1992) The effect of serpentine on the population-structure of *Silene dioica* (Caryophyllaceae). *Evolution*, **46**, 1537–1548.
- Whitlock MC (2005) Combining probability from independent tests: the weighted Z-method is superior to Fisher's approach. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 1368–1373.
- Wilding CS, Butlin RK, Grahame J (2001) Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 611–619.
- Williams LM, Oleksiak MF (2008) Signatures of selection in natural populations adapted to chronic pollution. *BMC Evolutionary Biology*, **8**, 282–294.
- Wu L, Bradshaw AD, Thurman DA (1975) The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera*. *Heredity*, **34**, 165–187.
- Zhivotovsky LA (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, **8**, 907–913.

C.L.M. performed this study during her PhD on the adaptation of *Arabidopsis halleri* populations to heavy-metal-polluted sites. She works in the 'genetics and evolution of adaptation to environments polluted by heavy metals' team, headed by P.S.L. This team is involved in plant population genetics and QTL mapping. V.C.'s research focuses on patterns of polymorphism and divergence in plant model systems, including the molecular evolution of genes controlling self-incompatibility. R.V. studies the effects of population subdivision on the evolution of populations, and develops inference methods from genetic polymorphism data.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Table S1 Summary statistics of the 820 AFLP markers. Allelic frequencies were estimated using AFLP-SURV (Vekemans *et al.* 2002; available at <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html>)

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

CHAPITRE III : Caractérisation des parties du génome identifiées comme potentiellement sous sélection dans les populations métallicoles d'*Arabidopsis halleri* – premier résultats sur 5 marqueurs.

I. Contexte de l'étude

L'intérêt du criblage génomique exploratoire, outre le fait d'identifier des traces de divergence adaptative dans le génome entre et au sein des espèces, est d'être une première étape vers la caractérisation des bases génétiques d'une adaptation. Cette possibilité est pour l'instant restée théorique puisque aucune étude n'a pu valider le fait que des locus candidats soient impliqués dans un processus adaptatif. En effet, en l'absence de grandes connaissances sur le génome d'une espèce, il est seulement possible de séquencer les marqueurs candidats et de regarder s'ils présentent des homologies avec des séquences déjà connues. Minder & Widmer (2008) ont par exemple appliqué cette technique pour déterminer si les locus potentiellement sous sélection chez deux espèces de *Silene* se trouvaient dans des ORFs (open reading frames, cadres de lecture ouvert). La grande limite de cette approche vient du fait que les locus identifiés par criblage génomique peuvent ne pas être la cible de la sélection mais seulement être liés physiquement ou en déséquilibre de liaison avec cette cible. Wood *et al.* (2008) ont proposé récemment de poursuivre le criblage génomique chez les espèces non modèles par la construction de banques BAC et le séquençage des BAC contenant les marqueurs AFLP potentiellement sous sélection. Cette approche permet, par l'analyse des séquences en populations, de définir des locus candidats pour une adaptation. Cependant en l'absence d'autres informations sur le génome, elle ne permet pas d'aller jusqu'à l'identification de gènes candidats.

Arabidopsis halleri, du fait des nombreuses connaissances que l'on possède sur son génome (carte génétique et colinéarité avec la carte physique d'*A. thaliana*, nombreux gènes candidats de l'homéostasie des métaux), est un cas d'étude particulièrement intéressant puisqu'il est possible de poursuivre le travail du criblage génomique. Ainsi, nous avons cherché à localiser sur la carte génétique d'*A. halleri* et sur la carte physique d'*A. thaliana*, les marqueurs candidats définis dans le chapitre précédent pour rechercher de potentiels gènes candidats liés à l'adaptation aux sites métallifères. Les résultats présentés ici ne concernent que 5 locus sur les 13 candidats à l'adaptation aux sites métallifères (Meyer *et al.* 2009, chapitre II). Nous

avons choisi dans un premier temps de nous intéresser aux locus candidats pour l'adaptation générale aux sites pollués par les métaux lourds (*i.e.* divergent de la neutralité dans tous les sites M étudiés). Il s'agit des locus 103, 106, 245 et 304. L'objectif est ensuite de faire le même travail sur les locus candidats à l'adaptation dans un site métallifère spécifique. Ce travail à pour l'instant été réalisé uniquement pour le locus 682.

II. Matériels et méthodes

Les marqueurs AFLP 103, 106, 245, 304 et 682 ont été isolés et séquencés selon le protocole suivant :

- Simplification des profils AFLP

Les profils AFLP sont des profils complexes avec de nombreuses bandes (jusqu'à 60 bandes polymorphes par profil dans notre cas) qui peuvent être distantes de seulement une base. L'isolement d'une bande dans un profil AFLP nécessite donc dans un premier temps la simplification du profil. Pour cela nous avons utilisé la méthode de Brugmans *et al.* (2003) qui consiste à rajouter un, puis deux, puis trois nucléotides sélectifs à l'amorce *MseI*+2 pour définir une amorce spécifique *MseI*+5 qui amplifie le fragment d'intérêts dans un profil avec peu de bandes. Pour réaliser ces amplifications sélectives nous avons utilisé un mélange réactionnel de 10 µL par individu contenant : 1X de tampon (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), 2 mM de MgCL₂, 0,2 mM de dNTP, 0,24 mM de chaque amorces (*EcoRI* et *MseI*), 0,025U/µL de AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems) et 3 µL de l'amplification sélective donnant un profil complexe (dilué au 1/100ième). La migration des fragments a été faite sur un séquenceur ABIPrism3100 (Applied Biosystems) et la lecture des profils sur le logiciel Genemapper (version 3.7). Les amorces *MseI* permettant d'avoir des profils simples contenant les fragments 103, 106, 245, 304 et 682 sont reportées dans le tableau 1.

- Isolement des fragments d'intérêts dans les profils simples

Les amorces *MseI* + 5 nucléotides sont ensuite utilisées pour l'amplification sélective suivante : 1X de tampon (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCL₂, 0,2 mM de dNTP, 0,06 pmol/µL d'amorce *EcoRI*+3 nucléotides marqués en IRD-700, 5ng/µL d'amorce *MseI*+5 nucléotides, 0,025U/µL de AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems), 3 µL de l'amplification sélective donnant un profil complexe (dilué au 1/100ième) et de l'eau

distillée pour un QSP de 10 μ L. Pour pouvoir isoler les fragments nous avons fait migrer les produits d'amplification sur un séquenceur automatique LiCor 4200 (Li-Cor-ScienceTec) à l'aide de gels de polyacrylamide dénaturant à 7% (Long ranger, FMC) de 41 cm. Les fragments d'intérêts ont été directement excisés du gel puis placés dans 600 μ L de solution TE (pH 8). Après 12 heures à 4°C nous avons rajouté 500 μ L de TE (pH 8) au mélange qui a été ensuite centrifugé rapidement. Le surnageant contenant le fragment est récupéré et stocké à -20°C. Le fragment est alors ré-amplifié selon la réaction d'amplification sélective décrite dans la partie « simplification des profils AFLP ».

Tableau 1 : Amorces spécifiques utilisées pour la simplification des profils AFLP

Locus	Taille (pb)	Amorces <i>EcoRI</i>		Amorces <i>MseI</i>	
		+3N	+2N	+5N	+5N
103	236	5' GACTGCGTACCAATTCAGG 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAACA	TAT 3'	
106	230	5' GACTGCGTACCAATTCAGG 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAACA	TCA 3'	
245	53	5' GACTGCGTACCAATTCAGG 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAAG	AGT 3'	
304	237	5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAAC	TGA 3'	
682	185	5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAACG	TCA 3'	

- Réaction de séquençage

Les produits de l'amplification sélective sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Extract II de Macherey-Nagel. 250 ng de produit purifié est ensuite utilisé dans la réaction de séquençage suivante : 1,5 μ L de RRMix (Applied Biosystems), 1 μ L de tampon BD (Applied Biosystems), 1,25 μ M d'amorce, le tout ajusté avec de l'eau distillée pour un QSP de 10 μ M. La réaction est réalisée en forward et en reverse (amorces *EcoRI* et *MseI*) pour avoir connaissance de la totalité de la séquence. Nous avons ensuite purifié les produits de séquençage selon le protocole suivant : 5 μ L d'EDTA (125 mM) et 60 μ L d'éthanol absolu sont ajoutés au produit de séquençage. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 15 minutes puis centrifugé à 3000 G pendant 30 minutes. Le culot est alors centrifugé à 185 G pendant 2 minutes puis remis en suspension dans 20 μ L de formamide. Après dénaturation 10 minutes à 90°C les produits sont mis à migrer sur un séquenceur ABIPrism3100 (Applied Biosystems). La lecture des séquences a été faite grâce au logiciel BioEdit 7.0.

- Clonage des fragments

Malgré la simplification des profils, certains produits d'amplification contenaient toujours plusieurs fragments, de taille trop proche pour être séparés par excision directe sur gel. Pour pouvoir isoler le fragment d'intérêt nous avons alors réalisé un clonage de ces produits. Le clonage a été fait grâce au kit TA Cloning® de Invitrogen. L'amplification des fragments clonés est ensuite réalisée en déposant des clones dans le mélange réactionnel suivant : 1X de tampon (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCL₂, 0,2 mM de dNTP, 0,2mg/mL de BSA, 0,2 µM des amorces forward M13 et revers M13, 0,04U/µL d'AmpliTaq® DNA Polymerase et de l'eau pour un QSP de 10 µL. Les produits amplifiés sont ensuite séquencés et les séquences d'intérêts sont reconnues d'après leur taille.

- Analyse des séquences

Dans un premier temps nous avons recherché les homologies entre les marqueurs séquencés et le génome d'*A. thaliana* en utilisant la fonction BlastGen de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Une fois le marqueur replacé sur le génome d'*A. thaliana* nous avons utilisé la synténie entre cette espèce et *A. halleri* (défini par Roosens *et al.* 2008a) pour localiser le marqueur sur le génome d'*A. halleri*. Nous avons alors comparé la position de ces marqueurs avec les QTLs de la tolérance au Zn et au Cd (Courbot *et al.* 2007 ; Willems *et al.* 2007). La colinéarité importante entre le génome d'*A. halleri* et celui d'*A. thaliana* (Roosens *et al.* 2008b) nous a permis de rechercher des gènes candidats autour des locus séquencés. Pour cela nous avons regardé la fonction de tous les gènes à ± 50 Kb des locus outliers. Nous avons également regardé à quelle distance se trouvaient les plus proches gènes candidats de l'homéostasie des métaux.

Très récemment le génome d'*A. lyrata*, la plus proche relative d'*A. halleri* (avec *A. arenosa*), a été séquencé dans sa totalité (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Araly1&advanced=1>). La taille du génome de ces deux espèces est très proche (230 Mb et 255 Mb respectivement, Johnston *et al.* 2005) et elles possèdent le même nombre de chromosomes (2n = 16). Il est donc intéressant de faire le même travail de recherche d'homologie que précédemment mais chez *A. lyrata*. Nous avons tout d'abord contrôlé l'emplacement des gènes séquencés chez *A. lyrata* pour voir s'ils correspondaient à ceux déterminés d'après la synténie. Nous avons ensuite vérifié que la micro-synténie autour des locus séquencés était respectée entre *A. lyrata* et *A. thaliana*, ce qui peut laisser penser qu'elle est également respectée entre *A. halleri* et *A. thaliana*.

III. Résultats

La méthode de Brugmans *et al.* (2003) pour simplifier les fragments AFLP a permis de récupérer quatre des cinq fragments que nous cherchions à séquencer. L'utilisation d'amorce *MseI* + 5 nucléotides n'a pas permis une simplification du profil AFLP pour le fragment 245 (53 pb). Par conséquent il n'a pas été possible de le récupérer, ni de récupérer un profil avec quelques fragments pouvant faire l'objet d'un clonage. Ce problème méthodologique a deux raisons, il provient tout d'abord du fait qu'entre 40 et 60 pb le nombre de fragments AFLP est très important et que par conséquent la simplification avec une amorce + 5 nucléotides n'est pas suffisante. Il peut également être expliqué par le taux d'homoplasie, c'est-à-dire le taux de fragments représentant plus d'un locus, qui est fort pour les petits fragments (Vekemans *et al.* 2002). L'utilisation des fragments AFLP de petite taille lors d'un criblage génomique a été discutée à cause de la présence d'homoplasie qui biaise l'estimation des fréquences alléliques et donc l'identification des locus potentiellement sous sélection (Cabellero *et al.* 2008). Pour limiter ce biais certains auteurs ont proposé de n'utiliser que des fragments de grande taille (Herrera & Bazaga 2008) mais cela réduit fortement la couverture du génome ou demande un effort de génotypage beaucoup plus important. Nous pouvons rajouter une deuxième limite à l'utilisation de ces petits fragments qui est le fait qu'ils sont difficilement séquençables et donc difficilement utilisables pour définir des gènes candidats.

Les quatre autres fragments ont pu être séquencés et ils ont tous montré une forte homologie avec des parties du génome d'*A. thaliana* (tableau 2). Le locus 103 montre une identité de séquence de 94% avec une séquence sur le chromosome I d'*A. thaliana*. Cette séquence se trouve dans l'exon du gène *At1g25570* qui code une protéine impliquée dans la fixation de protéines ou de complexe de protéines. Ce locus est dans une région qui présente une forte colinéarité avec le groupe de liaison (LG) 1 d'*A. halleri* (Fig. 1).

Tableau 2 : Position des locus candidats chez *A. thaliana* et identité des séquences entre *A. halleri* et *A. thaliana*.

Locus	e-value	Identité	Position	Localisé dans :
103	7×10^{-53}	94%	Chr1 8 990 Kb	• <i>At1g25570</i> Leucine-rich repeat protein-related
106	7×10^{-42}	86%	Chr5 19 570 Kb	• <i>At5g48230</i> ACAT2/EMB1276 acetyl-CoA C-acetyltransferase
304	7×10^{-67}	90%	Chr1 25 600 Kb	• <i>ENDO 2</i> Endonuclease 2
682	4×10^{-63}	94%	Chr1 24 100 Kb	• <i>At1g64850</i> Calcium-binding EF hand family protein

Note: la e-value représente la probabilité qu'un autre alignement présente une plus forte similarité

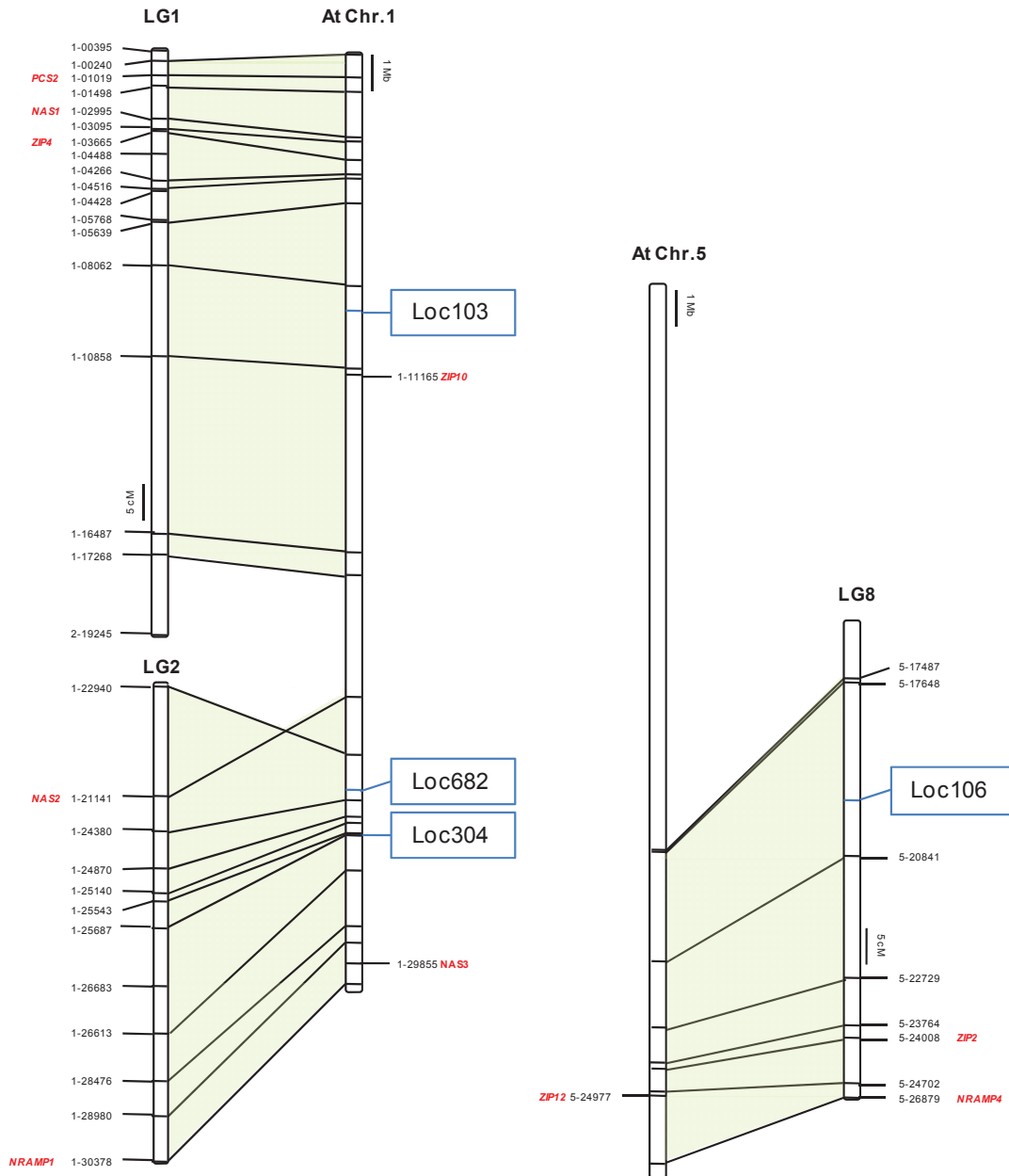


Figure 1 Localisation des loci 103, 106, 304 et 682 sur la carte physique d’*A. thaliana* ainsi que leur place potentiel sur la carte génétique d’*A. halleri*. Les gènes candidats de l’homéostasie des métaux lourds sont représentés en rouge.

Nous pouvons donc considérer que le locus 103 se trouve très certainement entre les marqueurs Chr 1.08062 et Chr 1.10858 positionnées chez *A. halleri* (Roosens *et al.* 2008a) Chez *A. thaliana* autour du gène *Atlg25570* (à une distance maximum de 50 Kb) nous avons pu observer un gène (*Atlg26130*) potentiellement impliqué dans la réponse à un stress (tableau 3). *Atlg26130* code une ATPase impliquée dans le transport des ions. Cependant il faut noter que la distance entre ce gène et *Atlg25570* est relativement grande (46 Kb) et que

dans cette région il existe 8 gènes dont la fonction est inconnue. Chez *A. lyrata*, le locus 103 est positionné sur le chromosome 1 (11518 Kb, identité de 93%) ce qui conforte les résultats précédents. La micro-synténie entre *A. lyrata* et *A. thaliana* est très bonne autour de ce locus. A une distance maximum de 50 Kb, l'ordre des gènes est le même et la seule différence vient de l'insertion de 3 gènes chez *A. lyrata* (sur le chromosome 1 et 4 chez *A. thaliana*, pas de fonction connus dans la réponse à un stress). La distance entre le potentiel gène candidat *At1g26130* et le locus 103 est la même chez *A. thaliana* et chez *A. lyrata* (46 Kb).

Tableau 3 Gènes potentiellement impliqué dans la réponse à un stress se trouvant à moins de 50 Kb des locus candidats chez *A. thaliana*.

Locus	Distance au locus	Nom	Description	Fonction ou processus
103	46 Kb	<i>At1g26130</i>	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	ATPase permettant le transport des ions
106	16 Kb	<i>At5g48290</i>	heavy-metal-associated domain-containing protein	Transport des métaux lourds
304	0,5 Kb	<i>At1g68300</i>	universal stress protein (USP) family protein	Réponse à un stress
682	7 Kb	<i>At1g64820</i>	MATE efflux family protein	Transport de drogues et/ou toxines

Le locus 106 montre une identité de séquence de 86% avec une séquence sur le chromosome V d'*A. thaliana*. Cette séquence se trouve dans un intron et dans une partie non traduite du gène *At5g48220* qui code une acétyl-CoA C-acétyl transférase impliquée dans le développement embryonnaire (tableau 2). Ce locus est dans une région qui présente une forte colinéarité avec le LG8 d'*A. halleri*. Nous pouvons donc considérer qu'il se trouve très certainement entre les marqueurs Chr 5.17648 et Chr 5.20841 positionnées chez *A. halleri* (Fig. 1). Autour du gène *At5g48220*, chez *A. thaliana*, nous avons pu identifier à une distance de 16 Kb un gène codant pour une protéine pouvant être impliqué dans le transport des métaux (tableau 3). Ce gène (*At5g48290*) code pour une protéine similaire aux protéines contenant des domaines associés aux métaux lourds. Ces protéines à travers la fixation des métaux assurent leur transport. Le locus 106 est localisé sur le chromosome 8 de *A. lyrata* (en position 11395 Kb) ce qui est en accord avec les résultats trouvés précédemment. Ce locus

montre une identité plus faible avec *A. lyrata* qu'avec *A. thaliana* puisqu'il correspond à une séquence présentant deux insertions (78 pb et 138 pb) chez *A. lyrata*. Nous avons pu confirmer la micro-synténie entre *A. lyrata* et *A. thaliana* dans cette région, l'ordre des gènes est conservé et il n'y a pas de délétion ce qui donne une bonne confiance dans l'analyse précédente. Nous avons cependant observé chez *A. lyrata* deux insertions dans cette zone (un bloc de 2 gènes du chromosome 2 d'*A. thaliana* et 1 bloc de 5 gènes du chromosome 1,2 et 3 d'*A. thaliana*) mais qui ne concerne pas des gènes impliqués dans la réponse au stress. Cette insertion a pour conséquence d'augmenter, chez *A. lyrata*, la distance entre le locus 106 et le potentiel gène candidat *At5g48290* (88 Kb).

Le locus 304 montre une identité de séquence de 90% avec une séquence sur le chromosome I d'*A. thaliana* mais dans une région différente de celle du locus 103. Cette séquence se trouve dans un intron et un exon du gène *ENDO 2* qui code une endonucléase (tableau 2). Ce locus est dans une région qui présente une forte colinéarité avec le LG2 d'*A. halleri*, nous pouvons donc considérer qu'il se trouve très certainement entre les marqueurs Chr 1.25543 et Chr 1.25687 positionnées chez *A. halleri* (Fig. 1). Chez *A. thaliana*, adjacent à *ENDO 2* (distant d'environ 0,5 Kb), se trouve un gène (*At1g68300*) qui code pour une protéine de la famille des protéines universelles de stress (USP family). Ces protéines ont une fonction de protection lors d'agression cellulaire suite par exemple à l'augmentation de la température, l'exposition à des métaux lourds ou à des agents chimiques. Dans une région de 50 Kb autour d'*ENDO 2*, nous n'avons pas observé d'autres gènes potentiellement impliqués dans une réponse à un stress. Le locus 106 est localisé sur le chromosome 8 d'*A. lyrata* (en position 12972 Kb, identité 98%) ce qui est en accord avec les résultats trouvés précédemment. La micro-synténie autour de ce locus est presque parfaite. L'ordre des gènes est exactement le même et la seule différence vient de l'insertion de 3 gènes (sur le chromosome 1 et 2 chez *A. thaliana*). Le gène *At1g68300* est directement adjacent à *Endo 2* chez *A. lyrata*.

Le locus 682 montre une identité de séquence de 94% avec une séquence sur le chromosome I d'*A. thaliana*. Cette séquence se trouve dans un exon d'un gène (*At1g64850*) qui code une protéine interagissant avec le calcium (tableau 2). Ce locus est localisé dans le LG2 d'*A. halleri*, proche d'une région qui a subi un réarrangement important (Fig. 1). La localisation fine du locus 682 sur le LG2 n'est donc pas possible. Un gène impliqué dans la réponse à un

stress est présent dans une région de 50 Kb autour de *At1g64850* (tableau 3). En effet à 7 Kb de *At1g64850* se trouve *At1g64820* qui code pour une protéine de la famille MATE (Multidrug and toxin extrusion). Cette famille de protéines est impliquée dans l'efflux de petites molécules organiques (Diener *et al.* 2001 ; Li *et al.* 2002). Il a été montré que certaines de ces protéines jouent un rôle dans l'homéostasie des métaux. Par exemple, chez le sorgho commun (*Sorghum bicolor*), une MATE protéine (Alts_{SB}) est impliquée dans la tolérance à l'aluminium de par son rôle dans l'augmentation des exsudats racinaires (Magalhaes *et al.* 2007). Ou encore, une autre protéine de cette famille (frd3) est impliquée dans l'homéostasie du fer chez *A. thaliana* (Rogers & Guerinot 2002). Chez *A. lyrata*, le locus 682 est également localisé sur le chromosome 2 (en position 7520 Kb, identité 98%) ce qui est en accord avec les résultats précédents. La micro-synténie entre cette région et celle d'*A. thaliana* est faible. L'ordre des gènes est globalement respecté mais il y a de nombreux événements de délétion et d'insertion ainsi qu'un événement de duplication. Le potentiel gène candidat *At1g64850* se retrouve chez *A. lyrata* à 40 Kb du locus 682. Parmi les gènes insérés il n'a pas été identifié de gènes impliqués dans la réponse à un stress.

Il est intéressant de noter que tous les locus séquencés sont localisés dans des parties différentes du génome d'*A. thaliana* et que ces régions semblent être au milieu des groupes de liaison chez *A. halleri* donc potentiellement près de centromères. Il a été montré que les marqueurs AFLP ont tendance à se regrouper près de centromères (Alonso-Blanco *et al.* 1998) ce qui pourrait expliquer la position de nos locus. Les QTL de la tolérance constitutive au Zn et au Cd chez *A. halleri* (Courbot *et al.* 2007 ; Willems *et al.* 2007) ne se trouvent pas sur les groupes de liaisons 1-2 et 8. Dans cette étude, nous ne pouvons donc pas faire de lien entre les bases génétiques de la tolérance constitutive et celles ayant évoluées dans les milieux métallifères. Les gènes candidats connus de l'homéostasie des métaux, identifiés par des approches de génomique, de protéomique et de cartographie QTL (voir synthèse de Roosens *et al.* 2008a et Roosens *et al.* 2008b) sont éloignés des locus séquencés. La plus petite distance a été trouvée entre le locus 682 et le gène *NAS2* (*nicotianamine synthase 2*) qui pourrait être distant de 1440 Kb, cependant cette distance n'est pas sur à cause du réarrangement dans cette région.

IV. Discussion et conclusion

La proximité génétique entre *A. halleri* et *A. thaliana* ainsi que la carte génétique d'*A. halleri* avec des marqueurs ancrés chez *A. thaliana* nous ont permis relativement facilement de : (1) placer les locus potentiellement sous sélection sur le génome d'*A. thaliana*, (2) identifier dans quel groupe de liaison ils se trouvent chez *A. halleri* et quelle est leur position approximative, (3) repérer des gènes impliqués dans la réponse au stress à une grande proximité des locus d'intérêt qui peuvent être considérés comme de potentiels gènes candidats. De plus les nouvelles informations sur le génome d'*A. lyrata* nous ont permis de conforter ces résultats. Il est donc maintenant nécessaire de continuer ce travail sur les 8 autres locus qui ont été définis comme potentiellement sous sélection dans les sites métallifères (Meyer *et al.* 2009).

Parmi les quatre gènes identifiés, nous avons vu que trois (*At1g26130*, *At5g48290* et *At1g64820*) étaient impliqués dans le transport d'ions alors que le quatrième (*At1g68300*) était impliqué dans une réponse de protection face au stress. L'identification de potentiels candidats intervenant dans le transport est en accord avec ce qu'on observe au niveau interspécifique pour la tolérance aux métaux. En effet les gènes candidats expliquant la différence de tolérance au Zn entre *A. halleri* et ses relatives non tolérantes *A. thaliana* et *A. lyrata* ont quasiment tous des fonctions de transport et de stockage (voir la synthèse de Roosens *et al.* 2008a). Ces résultats, et le fait qu'aucun de ces gènes ne soit dans les QTL de la tolérance constitutive d'*A. halleri* au Zn et au Cd, suggèrent que l'adaptation aux milieux métallifères passe par des mécanismes faisant intervenir l'homéostasie des métaux, mais des mécanismes différents de ceux impliqués au niveau interspécifique. Cependant nous ne pouvons pas exclure l'existence de mécanismes communs puisque nous n'avons pas séquencé tous les candidats et que l'approche par criblage génomique n'est pas exhaustive (densité maximum= 1 marqueur AFLP tous les 0,3 Mb). L'identification d'un gène impliqué dans la réponse à un stress (*At1g68300*) amène une nouvelle information. Il ne s'agit pas forcément d'une réponse au stress métallique, l'adaptation aux sites métallifères pourrait donc mettre en jeu des pressions de sélection autres que la présence de métaux. D'autre part, contrairement aux autres potentiels candidats ce gène n'est pas impliqué dans un mécanisme préventif mais dans un mécanisme de protection des structures cellulaires. Il est donc tout à fait possible qu'au niveau intra-spécifique l'adaptation aux sites métallifères se fasse à la fois par des mécanismes de prévention et par des mécanismes de protection.

Cette étude n'est qu'une première étape vers la définition de candidats à l'adaptation aux milieux métallifères chez *A. halleri*. En effet il s'agit maintenant de confirmer leur rôle dans cette adaptation et dans le cas contraire d'identifier d'autres candidats proches des locus séquencés. Pour deux raisons ces gènes pourraient n'avoir aucun lien avec l'adaptation aux sites métallifères. Tout d'abord il est connu que la méthode du criblage génomique amène l'identification de faux positifs (Luikart *et al.* 2003) due à des événements démographiques ou à un écart trop grand au modèle sous jacent (Beaumont & Nichols 1996). La méthode utilisée lors du criblage génomique est très conservatrice (utilisation de deux méthodes, rejet des locus n'apparaissant que dans une comparaison). Cependant nous ne pouvons pas exclure le fait qu'il y ait des faux positifs parmi les locus séquencés et que par conséquent l'identification de candidat ne soit que due au hasard. D'autre part le fait que les locus candidats soient chez *A. thaliana* à moins de 50 Kb des locus identifiés par criblage génomique et le fait qu'ils aient une fonction dans le transport des métaux ou dans la réponse à un stress n'est en rien un garant de leur implication dans cette adaptation. Nous ne connaissons pas par exemple la distance maximum à laquelle les locus neutres sont liés par l'auto-stop génétique au gène cible de la sélection. Cette distance dépend de l'intensité de la sélection, du nombre de recombinaisons depuis la sélection et du déséquilibre de liaison propre à l'espèce. Chez *A. thaliana* il a été estimé que le déséquilibre de liaison (LD) diminue au sein de 50Kb ou 10 Kb selon les auteurs (Nordborg *et al.* 2005 ; Kim *et al.* 2007). *A. halleri* étant une espèce auto-incompatible, il est attendu que le LD soit plus faible mais aucune estimation n'est connue actuellement. Deux alternatives sont maintenant possibles pour aller jusqu'à la définition de candidats à l'adaptation aux sites métallifères. Tout d'abord nous pouvons vérifier par une approche d'évolution moléculaire s'il existe effectivement des traces de sélection sur les gènes d'intérêt que nous avons définis. En comparant des séquences il est possible d'identifier la sélection par une diminution de la variabilité au sein des populations (Tajima 1989) ou par un ratio mutations non synonymes/mutations synonymes supérieur à 1 entre populations (Yang 1998). Comme nous n'avons aucune certitude que ces gènes soient ceux qui expliquent la divergence à la neutralité des locus dans le scan génomique il pourrait être également intéressant de faire une recherche plus fine de balayage sélectif dans ces régions. Par exemple en regardant au sein des populations M la variabilité à des marqueurs flaquant les locus séquencés (approche de la figure 2 de l'introduction, p8) pour identifier la région cible de la sélection où la variabilité est la plus réduite.

V. Références:

- Alonso-Blanco C, Anton J M, Peeters M *et al.* (1998) Development of an AFLP based linkage map of *Ler*, *Col* and *Cvi* *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a *Ler/Cvi* recombinant inbred line population. *The Plant Journal*, **14**, 259-271.
- Beaumont MA, Nichols A (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London*, **263**, 1619-1626.
- Brugmans B, van der Hulst RGM, Visser RGF, Lindhout P, van Eck EJ (2003) A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Research*, **31**, e55 DOI: 10.1093/nar/gng055
- Caballero A, Quesada H, Rolan-Alvarez E (2008) Impact of amplified fragment length polymorphism size homoplasy on the estimation of population genetic diversity and the detection of selective loci. *Genetics*, **179**, 539-554.
- Courbot M, Willems G, Motte P *et al.* (2007) A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4*, a gene encoding a heavy metal ATPases. *Plant Physiol*, **144**, 1052-1065.
- Diener AC, Gaxiola RA, Fink GR (2001) *Arabidopsis ALF5*, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *The Plant Cell*, **13**, 1625-1638.
- Herrera CM, Bazaga P (2008) Population-genomic approach reveals adaptive floral divergence in discrete populations of a hawk moth-pollinated violet. *Molecular Ecology*, **17**, 5378-5390.
- Johnston JS, Pepper AL, Hall AE, *et al.* (2005) Evolution of Genome size in Brassicaceae. *Annals of Botany*, **95**, 229-235.
- Kim S, Plagnol V, Hu TT, *et al.* (2007) Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, **39**, 1151-1155.
- Li L, He Z, Pandey GK, Tsuchiya T, Luan S (2002) Functional Cloning and Characterization of a Plant Efflux Carrier for Multidrug and Heavy Metal Detoxification. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 5360-5368.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 981-994.
- Magalhaes JV, Liu J, Guimarães CT *et al.* (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*, **39**, 1156-1161.
- Meyer C-L, Vitalis R, Saumitou-Laprade P, Castric V (2009) Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal. *Molecular Ecology*, **18**, 2050-2062.
- Minder AM, Widmer A (2008) A population genomic analysis of species boundaries: neutral processes, adaptive divergence and introgression between two hybridizing plant species. *Molecular Ecology*, **17**, 1552-1563.
- Nordborg M, Hu TT, Ishino Y, *et al.* (2005) The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Biology*, **3**, 1289-1299.

- Rogers EE, Guerinot ML (2002) FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **14**, 1787-1799.
- Roosens NHCJ, Willems G, Saumitou-Laprade P (2008a) Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends in Plant Science*, **13**, 208-215.
- Roosens NCJ, Willems G, Godé C, Courseaux A, Saumitou-Laprade P (2008b) The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*, **306**, 105-116.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-95.
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, **11**, 139-151.
- Willems G, Dräger DB, Courbot M, *et al.* (2007) The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): An analysis of quantitative trait loci. *Genetics*, **176**, 659-674.
- Wood HM, Grahame JW, Humphray S, Rogers J, Butlin RK (2008) Sequence differentiation in regions identified by a genome scan for local adaptation. *Molecular Ecology*, **17**, 3123-3135.
- Yang ZH (1998) Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 568-73.

CHAPITRE IV : Variabilité de la tolérance au zinc entre et au sein des populations d'*Arabidopsis halleri* à une échelle locale et rôle possible de la sélection divergente

I. Présentation de l'étude et principaux résultats

Bien que la tolérance au zinc soit chez *A. halleri* un trait constitutif (Bert *et al.* 2000, Pauwels *et al.* 2006), il a été montré à l'aide de test en hydroponie, qu'à l'échelle de l'Europe les populations M étaient en moyenne plus tolérantes que les NM (Pauwels *et al.* 2006). Ces résultats ont suggéré une évolution de ce trait sous l'influence de la sélection naturelle et appellent donc plusieurs questions. D'une part, nous pouvons nous demander si cette différenciation existe également entre des populations proches géographiquement pouvant échanger des flux de gènes et d'autre part, qu'elle est le rôle de la sélection et de la migration dans la distribution de ce caractère.

Pour amener des éléments de réponse à ces deux questions, nous avons estimé la tolérance au Zn de 122 individus échantillonnées dans 12 populations slovaques et polonaises proches géographiquement (de 1 à 250 km). Nous nous sommes intéressés à la différenciation entre type édaphique mais également au degré de polymorphisme au sein des types édaphiques et des populations. Nous avons ensuite comparé la différenciation génétique de ce trait à celle à des marqueurs moléculaires neutres (10 microsatellites). L'attendu théorique est qu'un trait quantitatif sous sélection disruptive montre une différenciation plus importante que celle aux marqueurs neutres.

Les populations M de notre échantillon montrent bien une tolérance au Zn supérieure en moyenne à celle des populations NM ce qui laisse penser que les flux de gènes ne sont pas une force assez grande pour s'opposer à cette évolution chez *A. halleri*. Nous avons pu montrer également, que ce trait semble bien être sous sélection dans les populations M puisque la différenciation génétique pour la tolérance au Zn est supérieure à celle aux marqueurs neutres. Nous avons également pu noter de manière intéressante une grande variabilité au sein des types édaphiques et au sein des populations avec des individus M et NM montrant des phénotypes proches. La variabilité importante dans les populations M peut être expliquée par des flux de gènes importants depuis les populations NM par rapport à la pression de sélection, et par une faible sélection contre les phénotypes intermédiaires. La

variabilité dans les populations NM peut avoir deux origines. Elle peut d'une part, provenir de flux de gènes depuis les populations M ou d'autre part, être déjà présente dans ces populations (« standing variation ») sous l'effet de migrations récurrentes, de la dérive et de flux de gènes. La sélection dans les milieux métallifères pourrait alors s'exercer sur cette variabilité.

II. Contribution sous forme d'article

ARTICLE 2: ZINC TOLERANCE WITHIN AND AMONG POPULATIONS OF THE PSEUDOMETALLOPHYTE PLANT *ARABIDOPSIS HALLERI* AND POSSIBLE ROLE OF DIVERGENT SELECTION.

Claire-Lise Meyer, Alicja A. Kostecka, Pierre Saumitou-Laprade, Anne Créach, Vincent Castric, Maxime Pauwels, Hélène Frérot

Soumis à *New Phytologist*.

Zinc tolerance within and among populations of the pseudometallophyte plant *Arabidopsis halleri* and possible role of divergent selection

Claire-Lise Meyer, Alicja A. Kostecka, Pierre Saumitou-Laprade, Anne Créach, Vincent Castric, Maxime Pauwels, Hélène Frérot

(Submitted)

Summary

- We estimated the level of quantitative polymorphism for zinc tolerance in neighboring metallicolous and non metallicolous populations of *Arabidopsis halleri* and tested the hypothesis that divergent selection has shaped this polymorphism.
- We used a short-term hydroponic test to capture the quantitative polymorphism present between edaphic types, among and within populations. We measured six morphological and physiological traits on shoots and roots to estimate the response of *A. halleri* to zinc. In order to assess the adaptive value of zinc tolerance polymorphism, we compared differentiation of quantitative traits with that of molecular markers.
- Zinc tolerance of metallicolous populations was on average higher than that of nonmetallicolous populations according to the morphological and physiological traits measured. Phenotypic variability within edaphic types was very high and mainly explained by polymorphism among individuals within populations. Genetic differentiation for photosystem II yield of leaves (a measure of photosynthetic efficiency) was higher than the differentiation for microsatellite and thus, probably shaped by divergent selection.
- Overall, these results suggest that, in the sampled populations, zinc tolerance has been increased in metallicolous populations through selection on standing genetic variation within local non-metallicolous ancestral populations.

Key words : *Arabidopsis halleri*, zinc tolerance, quantitative trait, F_{ST}/Q_{ST} , divergent selection, local adaptation

Introduction

Interaction between selection, gene flow and genetic drift is a key phenomenon because in the case of spatially heterogeneous selection it may result in local adaptation, a mechanism promoting speciation and maintaining adaptive variation. Therefore, a challenging goal of evolutionary biology is to evaluate the relative contribution of selection versus other forces in shaping phenotypic differentiation among populations. Among the plants, attractive models to study phenotypic differentiation driven by natural selection are pseudometallophyte species, which have the ability to grow on soils contaminated by heavy metals as well as on non-contaminated soils. In highly contaminated sites, extreme environmental conditions may promote rapid differentiation between metallicolous (M) and non metallicolous (NM) populations (Reznick & Ghalambor 2001; Dechamps *et al.*, 2007; Jiménez-Ambriz *et al.*, 2007). In this context, the trait typically chosen to investigate population differentiation is metal tolerance *i.e.* the capacity to survive on soil with levels of metals toxic for most organisms (Antonovics *et al.*, 1971, Macnair & Baker 1994). Previous investigations focused on this trait because it has been found to evolve rapidly following exposure to heavy metal stress (Wu *et al.*, 1975; Al-Hiyaly *et al.*, 1988) and because it showed intra-specific quantitative variation in several instances (Meerts & Van Isacker 1997; Smith & Macnair 1998; Schat *et al.*, 1993; Pauwels *et al.*, 2006; Mengoni *et al.*, 2007). In addition, evolutionary studies have shown that metal tolerance could have evolved independently in geographically distant conspecific populations (Schat *et al.*, 1996; Vekemans & Lefèbvre 1997; Koch *et al.*, 1998; Mengoni *et al.*, 2001; Pauwels *et al.*, 2005).

Among the pseudometallophyte species, *Arabidopsis halleri* (L.) (O’Kane & Al-Shehbaz) (*syn. Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek) has recently emerged as a model species to study tolerance to heavy metals. This species, constitutively tolerant and hyperaccumulator of zinc (Zn) and cadmium (Cd) (Bert *et al.*, 2000, Bert *et al.*, 2002, Pauwels *et al.*, 2006), is indeed the closest metal-tolerant relative of the model species *A. thaliana* (Al-Shehbaz & O’Kane 2002), with which it shows high nucleotide sequence identity and good synteny (Roosens *et al.*, 2008a). Differentiation for Zn tolerance was investigated at a broad scale by Pauwels *et al.* (2006) in 31 European populations using a hydroponic sequential test (Schat & Ten Bookum 1992). They showed that despite its constitutive nature, Zn tolerance is a quantitative trait in this species, with significant differences in average tolerance among populations. In particular, a tendency towards higher tolerance and less polymorphism in M populations compared to NM ones was shown, suggesting that Zn tolerance could have

evolved secondarily in M populations. Nevertheless, the possible role of directional selection in shaping the variability of Zn tolerance among *A. halleri* populations has not been established. These results and those of Pauwels *et al.* (2005), which showed that the M populations have probably been founded independently by the nearby NM populations, may imply distinct genetic bases for increased Zn tolerance in unrelated M populations (Pauwels *et al.*, 2006). Therefore, the role of gene flow, drift and selection in shaping variation of tolerance between edaphic types and among *A. halleri* populations should be investigated on a homogeneous genetic background, *i.e.* at a local scale in a network of populations with possible gene flow.

To investigate the variability of heavy metal tolerance among and within populations, most studies used tests of tolerance on short periods in hydroponic culture (Humphreys & Nicholls 1984; Von Frenckell-Insam & Hutchinson 1993; Schat & Vooijs 1997; Assunção *et al.*, 2003; Pauwels *et al.*, 2006; Galardi *et al.*, 2007). These tests typically estimate only part of the phenotypic variability responding to heavy metals (*i.e.* vegetative growth), but are still very useful because they show high repeatability in space and time (Schat & Ten Bookum 1992) and allow to control the source of stress acting on the plants (one or a combination of different metals). In addition, when combined with genetic studies such as QTL or LD mapping on large numbers of individuals, these tests open up the opportunity to identify the genetic bases of complex quantitative traits (Courbot *et al.*, 2007; Willems *et al.*, 2007). Short term hydroponic tests were initially based on either qualitative measures (ability of individuals to produce new roots) at a certain fixed concentration (Macnair 1983) or quantitative measures (root growth in solutions with and without metal to estimate a tolerance index, Wilkins 1978). Possible bias due to both innate root growth variation and choice of metal concentration, have lead Schat & Ten Bookum (1992) to develop a sequential exposure test which uses the *EC*100 (lowest concentration for 100% growth inhibition) for root growth as an end point. This test has been successfully applied in several studies to estimate quantitative differences of tolerance between populations (Schat *et al.*, 1996; Schat & Vooijs 1997; Bert *et al.*, 2000; Pauwels *et al.*, 2006). However, tolerance is then regarded as a binary trait (presence or absence of root growth at a sequence of fixed concentrations), when tolerance may actually show quantitative variation. In addition, the history of exposure during such a sequential test may actually underestimate the variability in the more tolerant populations (Schat & Ten Bookum 1992).

Root growth was classically used to estimate heavy metal tolerance because on one hand early studies of metal tolerance showed that this trait was particularly sensitive to metals (Bradshaw 1952). On the other hand, it was considered that the first organ in contact with metals (*i.e.* roots) is likely to be the one in which metal toxicity will first manifest. Nevertheless, shoot performance could be a more relevant trait according to the species under study. For example, for hyperaccumulator species in which metals are translocated very efficiently towards the leaves where they are stored, we might expect the most striking manifestation of metal toxicity to be found in the leaves. This was observed for *Thlaspi caerulescens*, in which the threshold metal exposure level for leaf chlorosis seems to be a good measure of metal tolerance (Assunção *et al.*, 2003) but not for the nickel hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. In this species the root was more sensitive to metal than the shoot (Galardi *et al.*, 2007), possibly due to a higher fraction of cytosolic metal in root cells. Overall, these results suggest that measuring tolerance is not necessarily a trivial task, such that using a number of different end points is needed to analyze the response of hyperaccumulator to toxic metal concentrations.

In the present study, we investigated the genetic variability of Zn tolerance in *A. halleri* at a local scale in a network of genetically and geographically close M and NM populations. We captured quantitative variation using tolerance indices based on shoot and root morphological and physiological traits. In order to assess the adaptive value of Zn tolerance, we compared population differentiation for each quantitative trait (estimated with Q_{ST}) to that for neutral molecular markers (estimated with F_{ST}). Departure from neutral expectations ($F_{ST} \neq Q_{ST}$) can be used to distinguish between a history dominated by divergent selection ($F_{ST} < Q_{ST}$) as opposed to stabilizing selection ($F_{ST} > Q_{ST}$) (see Whitlock 2008 for a review).

Using the tolerance test and the analysis of molecular markers we addressed specifically the following three questions:

- Is Zn tolerance in metalicolous and non-metalicolous populations different, on average?
- What is the degree of polymorphism within and among populations?
- Have differences of Zn tolerance among *A. halleri* populations been shaped by natural selection, thus reflecting local adaptation?

Materials and methods

Populations studied

In June 2005, a total of 12 *A. halleri* populations were sampled in the south of Poland and in Slovakia (Fig.1 and table 1). A previous survey based on cpDNA variation has shown that populations in this region are genetically very similar (Pauwels *et al.*, 2005). Sampled populations were categorized as metallicolous (M) and non metallicolous (NM) according to the total concentration of Zn in soil (Bert *et al.*, 2002). M populations were located in a small region of southern Poland on still active metallurgic sites (PL19, PL30, PL22, PL24) as well as in ancient spoil heaps of Zn smelters (PL15, PL17) or mines (PL27). The distance among M populations ranged from 1 to 70 km. The NM populations were located either at low altitude in southern Poland (PL13, PL14) or at moderate altitude in the Tatra mountains (PL32), as well as in Slovakia (SK2). One NM population (PL21) was sampled in a polluted area, in close proximity to the sampled M populations (around 7 km). This population will be referred to as “non metallicolous in a polluted area” (NMP) according to Pauwels *et al.* (2006).



Figure 1 Geographic locations of *A. halleri* populations surveyed in the present study. White squares represent non metallicolous (NM) populations, black squares - metallicolous (M), circles - non metallicolous from polluted area (NMP).

Table 1 Geographic location and ecological information on the *Arabidopsis halleri* investigated natural populations. Populations are located in Poland (PL) except one (SK2 located in Slovakia).

Type	Name	Location	Ecological background	Altitude (m)	Latitude	Longitude	Zn total concentration in soil ($\mu\text{g/g}$)	<i>ni</i>
M	PL22	Bukowno	Woody area near Zn smelter	339	50°16'58.08"N	19°28'43.38"E	3 969	6
M	PL24	Bolesław	Meadow near Zn smelter	334	50°17'00.18"N	19°29'05.64"E	14 964	4
M	PL27	Galman	Forest in ancient mining area	447	50°11'36.78"N	19°32'15.12"E	35 942	22
M	PL15	Wetnowiec	Waste heap from Zn smelter	302	50°17'12.96"N	19°01'32.04"E	10 163	5
M	PL17	Wetnowiec	Woody area on waste heap from Zn smelter	297	50°16'57.12"N	19°01'46.98"E	10 642	8
M	PL19	Miasteczko Śląskie	Degraded woody area near Zn smelter	308	50°30'12.84"N	18°56'08.34"E	1 167	7
M	PL30	Miasteczko Śląskie	Woody area near Zn smelter	325	50°30'10.03"N	18°56'20.02"E	1 481	4
NMp	PL21	Bibiela	Ditch along a roadside	300	50°29'45.66"N	18°59'00.12"E	327	4
NM	PL13	Niepolomice	Wet forest edge	206	50°06'35.64"N	20°21'40.26"E	160	25
NM	PL14	Puszcza Niepołomicka	Wet forest edge	188	50°06'31.80"N	20°22'02.88"E	169	9
NM	PL32	Western Tatra mountain	Forest edge and meadow	970	49°16'26.94"N	19°52'41.76"E	125	11
NM	SK2	Kosicka Bela	Meadow	690	48°46'10.20"N	21° 7'48.60"E	51*	17

M, metallicolous; *NM*, non metallicolous; *NMp*, non metallicolous in polluted area; *ni*, number of phenotyped individuals. * in Bert et al., 2002

Heavy metal contamination was extremely dissimilar between M and NM sites with total Zn concentrations in soil ranging from 1,167 to 35,942 $\mu\text{g/g}$ for M populations and a concentration lower than 169 $\mu\text{g/g}$ for NM populations (table 1). Mature individuals collected in each population (table 1) were grown on non-polluted compost in a greenhouse. In order to minimize the carry-over effects of the native population environment, each individual was propagated several times *via* cuttings.

Zinc tolerance experiments

The experiment was performed in a controlled growth chamber under 13-h light per day, 80 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ irradiance, 20°C day / 18°C night and 80% humidity during the two first weeks and 65% for the rest of the experiment. Six cuttings from each genotype were transferred directly into hydroponic conditions for rooting. Each cutting was grown in a 1L polyethylene pot filled with standard nutrient solution (20 μM FeEDDHA, 500 μM MgSO_4 , 1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CuSO_4 , 25 μM H_3BO_3 , 2 μM MnSO_4 , 1 μM KCl, 0.1 μM NaCl, 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3 mM KNO_3 , and 10 μM Zn added as ZnSO_4). To ensure metal bioavailability, pH of the solution was buffered using 2 mM of MES (2-morpholinoethanesulphonic acid) adjusted at 5.5 with KOH. The nutrient solution was changed once a week. Pots were randomly distributed in the chamber and moved around during each change of nutrient solution. After a two-weeks period allowing plants to initiate roots and acclimate to hydroponic conditions, the zinc tolerance experiment started. Three clones per genotype were treated with the standard hydroponic solution added with 2000 μM of Zn (contaminated condition, C), whereas three others were grown in the control solution with 10 μM of Zn (non contaminated condition, NC, according to Macnair *et al.*, 1999). The metal concentration in C condition was chosen on the basis of preliminary experiments (Henk Schat, personal communication). The 2000 μM Zn concentration in solution allowed all individuals to survive and revealed variability among individuals.

Quantitative variation of Zn tolerance was investigated measuring several morphological and physiological traits (table 2) expected to reflect Zn toxicity (Broadley *et al.*, 2007): length and biomass of roots as a measure of inhibition of cell division and elongation, shoot biomass and width of leaves as a measure of inhibition of growth by metal, photosystem II yield (Φ_{PSII}) as a measure of the decrease of photosynthetic efficiency, and the

content of chlorophyll as a measure of chlorosis. Measurements were performed after 6 weeks of Zn treatment for each plant in NC and C conditions.

Table 2 Morphological and physiological measures to test zinc tolerance of *A. halleri* populations

Organ	Type of measures	Trait
Shoot	Morphological	<ul style="list-style-type: none"> • dry biomass • leaf width
	Physiological	<ul style="list-style-type: none"> • leaf photosystem II yield • leaf chlorophyll content
Root	Morphological	<ul style="list-style-type: none"> • dry biomass • length

The width of leaves was measured as the maximum width of the blades of the three largest leaves. Physiological traits were measured on the three youngest leaves that were large enough to be measured. Chlorophyll fluorescence was measured under ambient light with a PAM-2100 modulated fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). The effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}) was calculated according to Genty *et al.* (1989) as: $(F_m' - F_t)/F_m'$ where F_t is the fluorescence steady-state level under ambient light and F_m' the maximum level of fluorescence measured during a saturating pulse (0.8s). Chlorophyll content was measured using the CL-01 Chlorophyll Content Meter (Hansatech Instruments, Norfolk, UK), which determines the relative content using dual wavelength optical absorbance (620 and 940 nm). For traits measured on 3 leaves (leaves width, photosystem II yield and content of chlorophyll), the median was used to evaluate the value per clone. To estimate dry biomass, shoots and roots were separated and dried at 60°C during 72 h after all measurements.

To eliminate most of the variation in plant responses unrelated to metal treatment, we calculated a tolerance index (TI) for each trait as:

$$TI = \frac{\text{Value for a clone in C condition}}{\text{median of the trait for the 3 clones in NC condition}}$$

Finally, we obtained for each genotype 3 TIs (one for each clone) for each of the 6 monitored traits.

Analysis of phenotypic differentiation

Because of the small and unbalanced sample (from 4 to 25 individuals/population), we performed non-parametric exact tests (StatXact v.7 Cytel Studio 2005) to analyze phenotypic differentiation among edaphic types, among populations within edaphic type and within population. Wilcoxon-Mann-Whitney exact tests for two independent groups were used to analyze: (1) phenotypic differences between NM and M groups of populations in NC and C conditions, (2) differences between NM and M groups of populations for tolerance indices. Differences within each edaphic type were investigated with Kruskal-Wallis exact test for k independent groups. Monte Carlo approximations for p -values were obtained using 10,000 permutation tests. In order to test differences between pairs of population within edaphic type we used a non-parametric post-hoc test for multiple comparisons, according to Siegel & Castellan (1988). Within edaphic type, we also estimated the partial variances explained by differences among populations and within population using the VARCOMP procedure (method TYPE 1 which do not assume normality of data) of the SAS program v 9.1 (SAS Institute, 2002). Correlations between tolerance indices were examined using the Spearman coefficient estimated with the CORR procedure (SAS Institute, 2002).

The variability observed for tolerance indices was summarized using a canonical discriminant analysis on tolerance indices and populations using the CANDISC procedure (SAS Institute, 2002). This linear combination maximizes differentiation between populations and allows to test if populations group according to their edaphic type. All data were square-rooted before the canonical analysis to fit a normal distribution.

We estimated the broad sense heritability or clonal repeatability of the tolerance indices as: $H^2 = V_G / V_P$. V_G is total genetic variance, which includes additive genetic variance (V_A) and other sources of genetic variance (dominance and epistasis). V_P is the total phenotypic variance. These two parameters were estimated using the TYPE 1 method of the VARCOMP procedure (SAS Institute, 2002). The model considered the edaphic type (NM or M) as fixed factor and the population within the edaphic type and the genotype within the population as random factors.

Comparisons of genetic differentiation for quantitative traits and molecular markers

Due to imbalance in our data (table 1), measures of differentiation for quantitative traits (Q_{ST}) were computed with a Bayesian analysis (O'Hara & Merilä 2005) following the procedure described by Waldmann *et al.* (2005). The Q_{ST} statistics was estimated as $V_b / (V_b + 2V_w)$ where V_b is the component of genetic variance between population and V_w the component within populations. The model considers edaphic type as a fixed factor and population and genotype as random factors. We used a Gamma distribution (0.001, 0.001) as priors for the inverse of the variance. To calculate confidence intervals we ran two chains for 1,000,000 iterations, with a 500,000 burn-in. Four populations (PL15, PL24, PL30 and PL21) of our data set had small sample sizes (< 5 individuals/population). Consequently, to avoid bias in the estimation of genetic differentiation we excluded these populations from the comparison of Q_{ST}/F_{ST} .

To estimate population differentiation at neutral molecular markers, 10 nuclear microsatellite loci were scored for a total of 203 individuals representing the 8 studied populations. These samples partially overlapped with those used for phenotypic traits, around 50% of the individuals genotyped were also phenotyped. We used five microsatellite (*ATH*, *GC16*, *LYR132*, *LYR133*, *LYR104*) previously described in Van Rossum *et al.*, (2004) and five others (*GC22*, *NGA112*, *ICE 13*, *MDC16*, *NGA361*) recently transferred from *A. thaliana* and combined in a multiplex (Llaurens *et al.*, 2008). For each microsatellite, we estimated the level of polymorphism (number of alleles and total gene diversity H_T), and the inbreeding coefficient (F_{IS}) using FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995). Measures of differentiation for molecular markers was calculated based on F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) with the software FSTAT. The 95% confidence interval for the F_{ST} was estimated using 1000 bootstrap re-sampling of individuals.

Results

Morphological and physiological response to zinc of M and NM populations

Under non-contaminated condition (NC), morphological and physiological trait values of NM populations did not differ from those of M populations (Fig.2). In contrast, in the contaminated solution (C), trait values in M populations were all significantly higher than those in NM populations. NM plants had less dry biomass, shorter roots, narrower leaves, lower photosystem II yields and chlorophyll contents. Variances of traits were relatively similar between NC and C conditions except for the photosystem II yield that showed higher variance in C than in NC condition.

Tolerance indices further showed that Zn had a negative effect on most of the morphological traits measured and on all physiological traits, regardless of the edaphic type of the populations (Fig. 2). However, toxicity of Zn was on average significantly more severe for NM individuals than for M individuals. NM plants showed smaller tolerance indices for dry biomass (0.50 ± 0.38 vs. 0.78 ± 0.48 for shoot and 0.70 ± 0.64 vs. 1.05 ± 0.72 for root), root length (0.71 ± 0.23 vs. 0.83 ± 0.24), leaf width (0.73 ± 0.20 vs. 0.89 ± 0.35), photosystem II yield (0.87 ± 0.16 vs. 0.97 ± 0.06) and content of chlorophyll (0.54 ± 0.35 vs. 0.74 ± 0.23). Broad sense heritabilities of the tolerance indices were high for all the traits (higher than 0.50, see table 3). The highest heritabilities were found for the content of chlorophyll (0.78) and the width of leaves (0.69). All the morphological indices were significantly correlated among each other, with r values ranging from 0.28 to 0.68 (table 3). The highest correlation was observed for shoot and root dry biomass. Photosystem II yield was correlated with each index, except the one for leaf width. Chlorophyll content was correlated only with photosystem II yield and shoot biomass. Metal contamination is variable between metalliferous sites (table 1), but we found no correlation between tolerance indices and Zn soil concentration (p -value from 0.071 for leaf width to 0.759 for root length).

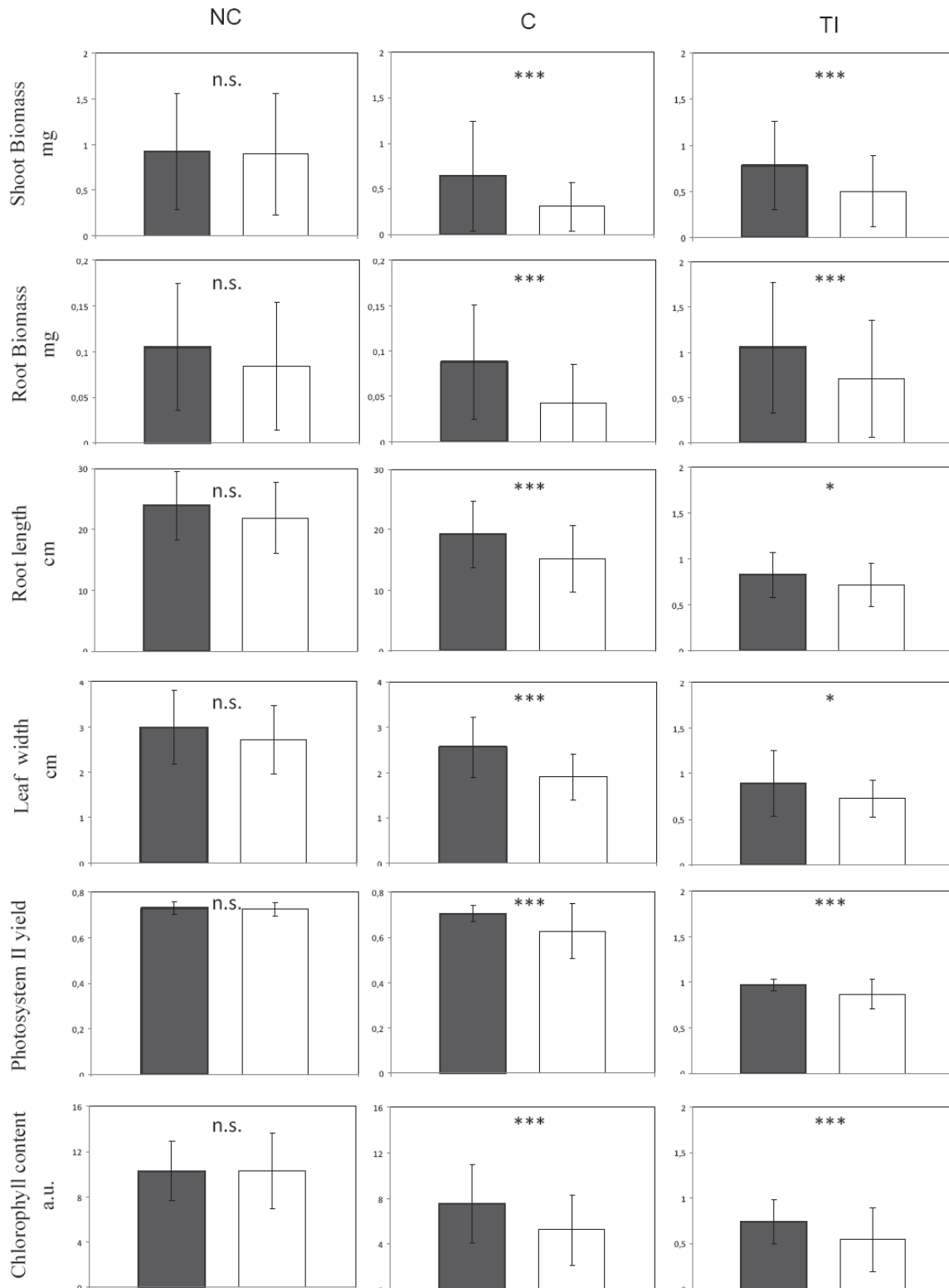


Figure 2 Mean \pm SD from measures of morphological and physiological traits in metallicolous (grey bars) and non metallicolous populations (white bars) on zinc contaminated (C) and non contaminated conditions (NC). Tolerance indices (TI) are shown on the right side of the figure. Results from exact permutation tests are indicated as follows: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, not significant.

Table 3 Broad-sense heritability (H^2) of six Zn tolerance indices measured on 12 *A. halleri* populations and correlation between these indices.

TI	H^2	Correlation				
		Leaf width	Root biomass	Root length	Photosystem II yield	Chlorophyll content
Shoot biomass	0.56	0.50 ***	0.68 ***	0.30 ***	0.27 **	0.21 *
Leaf width	0.69		0.38 ***	0.28 **	0.09 n.s.	0.06 n.s.
Root biomass	0.57			0.40 ***	0.18 *	0.02 n.s.
Root length	0.50				0.26 *	0.06 n.s.
Photosystem II yield	0.63					0.33 ***
Chlorophyll content	0.78					

Note: *p*-values are represented as follow ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$, n.s., non significant

Canonical discriminant analysis showed that populations were differentiated for all tolerance indices ($p < 0.0001$). Variations among populations were significantly explained by the first three axes, representing 47%, 21% and 15% of the variance. The first axis was mainly explained by the photosystem II yield and the root length, the second by the width of leaves and the third by the chlorophyll content (table 4). The first axis, upon which populations are continuously distributed, separated populations according to their edaphic type (Fig.3). NM populations had smaller values on this axis than M populations with extreme values for populations SK2 and PL17. The second axis identified two M populations with a different behavior, PL30 and PL19, which showed high values for the width of leaves. Interestingly, the NMp population (PL21) was less associated with the NM group than with the major M group.

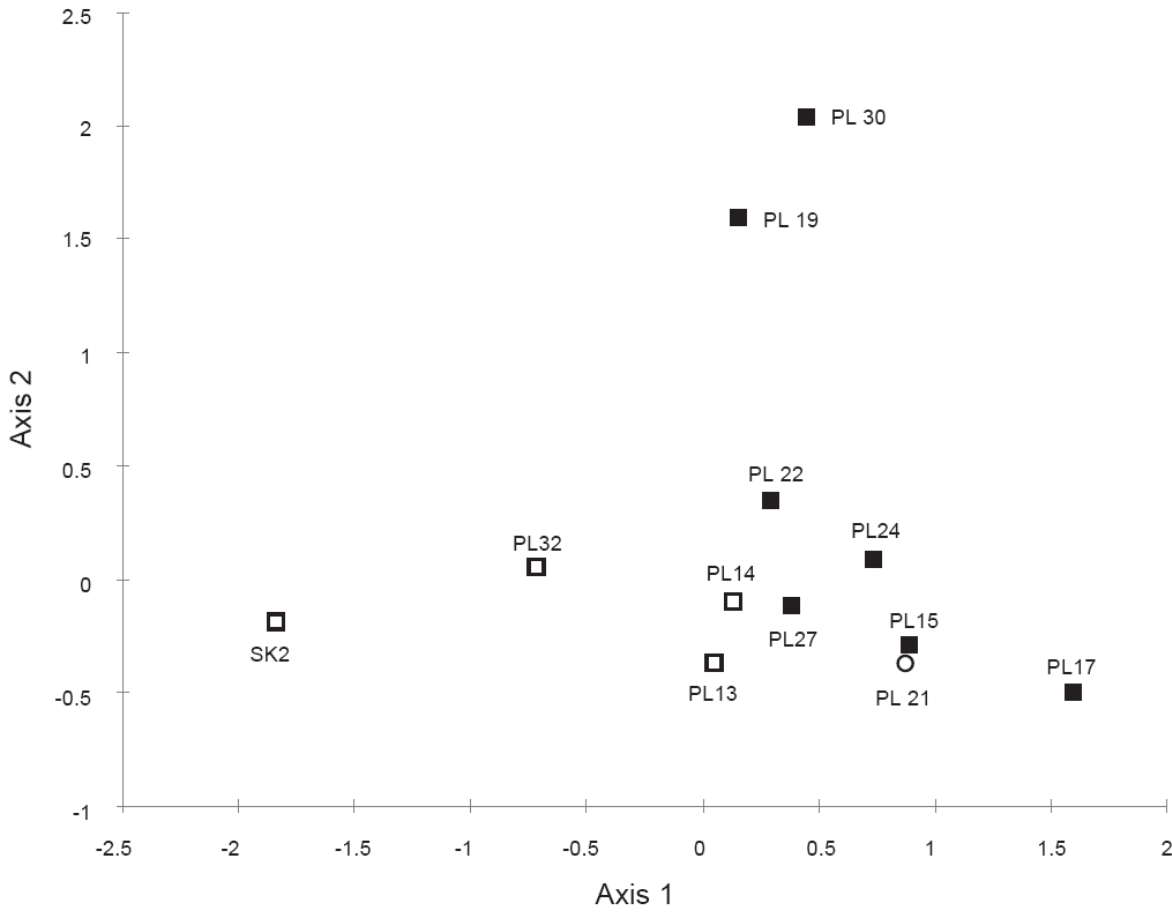


Figure 3 Canonical discriminant analysis on six Zn tolerance indices in M (black square) and NM (white square) populations of *A. halleri*. Axes 1 and 2 represent 47% and 21% of the variation between populations, respectively. The white circle corresponds with the NMp population.

Table 4 Canonical loadings and proportion of variance from discriminate analysis of population differentiation for Zn tolerance indices.

TI	Axis 1	Axis 2	Axis 3
Shoot biomass	0.401	0.185	-0.493
Leaf width	0.129	0.896	-0.475
Root biomass	0.273	0.056	-0.053
Root lenght	0.538	-0.086	-0.166
Photosystem II yield	0.934	0.060	0.005
Chlorophyll content	0.309	0.055	0.802
Proportion of variance explained	47 %	21 %	15 %

Variability within edaphic type and populations in response to Zn

Apart from photosystem II yield, tolerance indices for all traits showed high variance within edaphic types (see Fig. 2). Due to these high variances, we observed a large overlap of values between the two edaphic groups. Indeed, for all tolerance indices some M and NM individuals showed comparable values (Fig. 2). The high variances within edaphic type were mainly explained by variation within populations. For all tolerance indices, the part of variance explained by difference among populations was weak compared to that explained by polymorphism within populations (table 5). This demonstrates that a high variability is present within populations, irrespective of edaphic type. Variance within M populations was significantly smaller than within the NM populations for two traits, the chlorophyll content and the photosystem II yield (p -value = 0.001 and 0.003, respectively).

Table 5 Part of variance explained by variability among and within populations for Zn tolerance indices

TI	Variance components					
	within M type			within NM type		
	among populations	within populations	total	among populations	within populations	total
Shoot biomass	0.0087	0.1376	0.3660	0.0001	0.0362	0.0831
Leaf width	0.0044	0.0582	0.1171	0.0068	0.1582	0.2482
Root biomass	0.0273	0.2572	0.9251	0.0037	0.0371	0.0683
Root length	0.0081	0.0436	0.0713	0.0009	0.0229	0.0619
Photosystem II yield	0.0005	0.0021	0.0045	0.0100	0.0229	0.0328
Chlorophyll content	0.0169	0.0444	0.0920	0.0042	0.0526	0.1174

We also found significant differences among populations within edaphic types. Namely, M populations showed different tolerance indices for photosystem II yield and chlorophyll content ($p = 0.03$ and 0.012 , respectively, Fig. 4), whereas NM populations differed significantly from each other only for photosystem II yield ($p < 10^{-4}$, Fig. 4). The difference in photosystem II yield between NM and M populations was mainly explained by the populations PL32 and SK2.

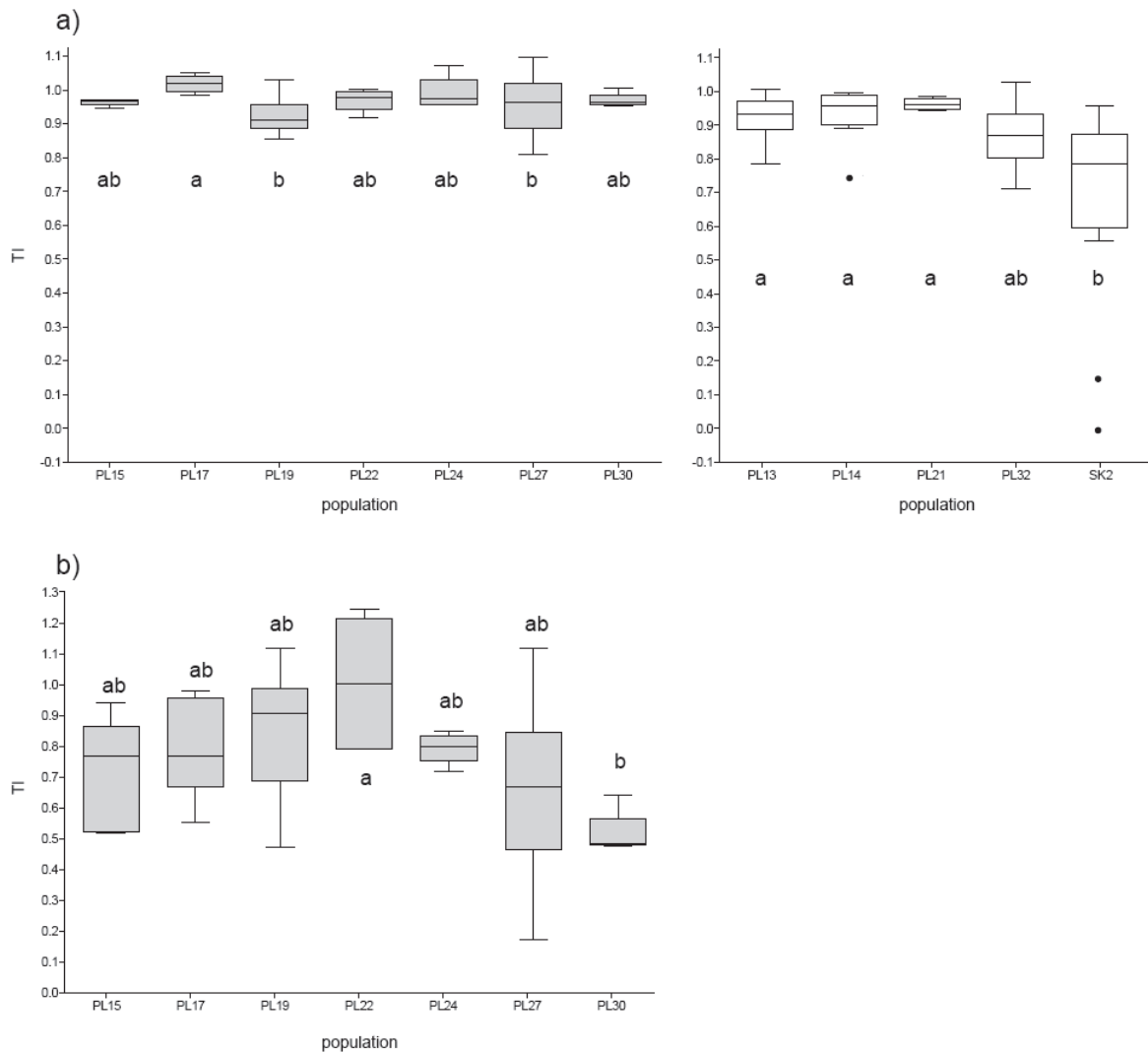


Figure 4 Zn tolerance indices showing significant differences among M (grey bars) or NM (white bars) populations. (a) Index based on photosystem II yield, (b) Index based on chlorophyll content. The box represents the 25th and 75th percentiles of the data and the mean is indicated by the horizontal line. Vertical lines and bullets show the highest and lowest data and the outlier values, respectively. Different letters indicate significant differences at the 5% level.

Comparison of phenotypic and molecular differentiation

The ten microsatellites showed 5 to 15 alleles (average = 8.5), and were polymorphic in all the populations. Statistics of population genetic diversity (H_T and F_{IS}) are presented in table S1 (supplementary material) for each of these loci. Total gene diversity was relatively high for all loci (mean $H_T = 0.599$) and inbreeding coefficient ranged from -0.122 to 0.269. Across all 8 populations, the differentiation at microsatellite loci (F_{ST}) was on average 0.146 with a 95% confidence interval (CI) from 0.116 to 0.171. This estimate of genetic

differentiation at molecular markers was higher than those obtained in the same area in a previous survey using AFLPs (average F_{ST} of 0.066 in Meyer *et al.*, 2009).

The highest Q_{ST} was observed for photosystem II yield (average = 0.33) with a 95% CI from 0.13 to 0.67 (Fig. 5). Overlap between this CI and that of molecular markers was very weak. Hence, these results suggest that photosystem II yield has probably experienced divergent selection. Shoot biomass, root length and chlorophyll content showed also a Q_{ST} higher than the F_{ST} , nevertheless their wide CI overlapped largely with the CI of the F_{ST} . Consequently, we could not make a conclusion about the role of selection in shaping variability at these traits. On average, the differentiation levels for root biomass and leaf width were all smaller than the molecular differentiation suggesting neutral evolution or stabilizing selection.

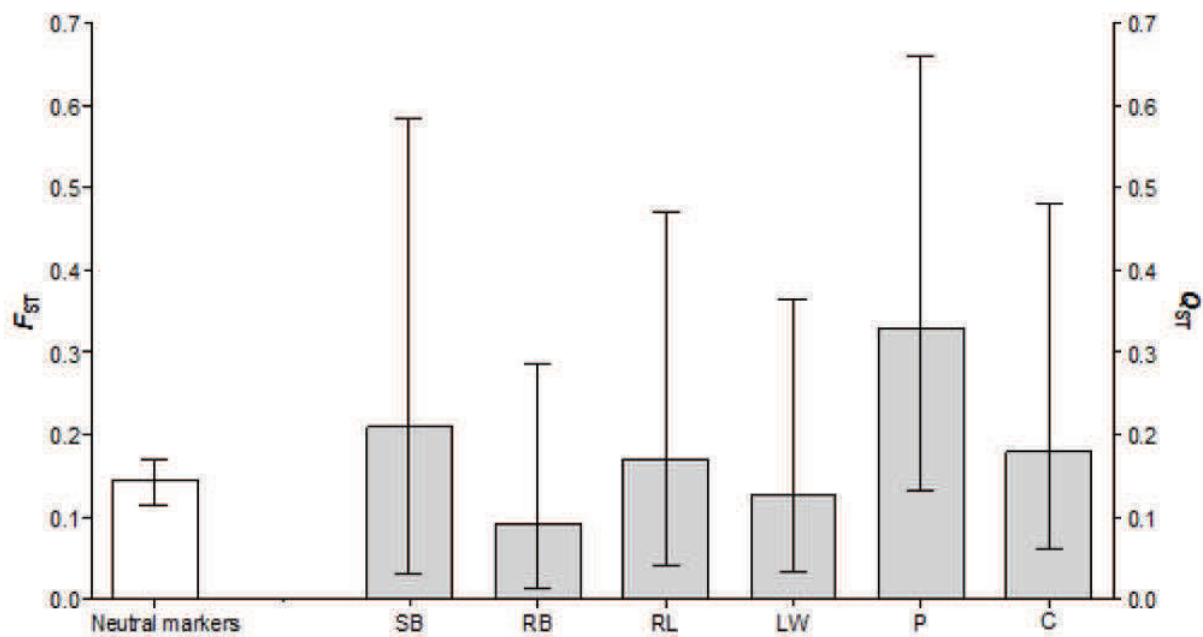


Figure 5 Comparison of genetic differentiation for molecular markers (F_{ST}) and quantitative traits (Q_{ST}). Grey bars correspond to estimates for different characters: SB, shoot biomass; RB, root biomass; RL, root length; LW, leaf width; P, photosystem II yield; C, content of chlorophyll. The 95% CI for genetic differentiation is represented by the vertical lines.

Discussion

Evaluating variability of Zn tolerance with root and shoot measurements

Overall, our results demonstrated and quantified variability of Zn tolerance at a local scale in the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri*. In the twelve sampled populations, the morphological (shoot and root dry biomass, root length and leaf width) and physiological (leaf photosystem II yield and chlorophyll content) traits used to estimate Zn tolerance showed congruent trends towards higher mean values for M populations. Nevertheless, it is the response of shoot, mainly through photosystem II yield, that seemed to capture most variability of tolerance, in particular among populations. These results are congruent with those reported by Assunção *et al.* (2003) on *Thlaspi caerulescens* and support the hypothesis that the shoot is more sensitive than the root in hyperaccumulator species due to a preferential accumulation of metal in the leaves (Assunção *et al.*, 2001; Assunção *et al.*, 2003). Among all the measures we performed, the most informative trait to evaluate tolerance in our study species seems to be the photosystem II yield of leaves. This trait showed high heritability, weaker variability within M than NM populations and clear differences among populations. The photosystem II yield, an indicator of functional photosynthesis and vitality of the photosynthetic tissue, has been used to investigate the mechanisms of heavy metal toxicity in previous studies (Baryla *et al.*, 2001; Küpper *et al.*, 2007), as well as to estimate the difference of metal tolerance between hyperaccumulator and non hyperaccumulator species using incubation of leaf slices (Cho *et al.*, 2003). We showed that this physiological measure was also reliable to estimate polymorphism of Zn tolerance in a pseudometallophyte hyperaccumulator species. Macnair (1983) and Schat & Ten Bookum (1992) suggested that integration of possible innate variation may bias tolerance indices. However, in our study on quantitative polymorphism of Zn tolerance, such bias seems to be limited because M and NM plants showed very similar trait values under NC control conditions.

Variability of Zn tolerance at a local scale and evolutionary inference

A. halleri is a species constitutively tolerant to Zn (Bert *et al.*, 2000) that shows at a broad-scale continuous variation from NM to M populations (Pauwels *et al.*, 2006). Our results revealed that this pattern of variation is also present at a local scale, among populations which are likely to exchange genes. Hence, these results suggest that gene flow, in the network of populations considered in our survey, is probably not intense enough to prevent

increasing tolerance in response to the high concentrations of metals at metalliferous sites. We also found important variability of tolerance within edaphic types, which was mostly explained by variability among individuals within populations. Such a high level of variability could be interpreted in two different ways. First, it is consistent with gene flow between NM and M populations, whereby NM individuals with tolerance close to that of M individuals would have acquired enhanced tolerance from M populations through gene flow of metal tolerance genes. This observation and the fact that the less tolerant populations (PL32 and SK2) were the most distant from the M populations may indicate that gene flow plays an important role in the distribution of this quantitative trait. Secondly, the large variation of Zn tolerance observed within NM populations could suggest that these *A. halleri* populations have the genetic potential to evolve towards a higher tolerance. Thus, the enhanced tolerance in recently founded M populations may result from selection on standing variation existing in NM populations rather than on newly arisen mutations. Indeed, recurrent mutations, genetic drift and, particularly in our case, gene flow could preserve a relatively high amount of neutral or deleterious variation upon which selection may proceed (Barrett & Schluter 2007). The fact that polluted sites that are dramatically altered environments become rapidly colonized is suggestive of pre-existent suitable genetic variants in surrounding NM populations from standing variation. In addition, alleles with small effects, proposed to be involved in variability of heavy metal tolerance among populations (Macnair *et al.*, 2000), are expected to largely contribute to adaptation from standing variation.

It is interesting to note that populations PL19 and PL30, that are geographically very close to one another (< 1 km) and are both at less Zn-contaminated metalliferous sites, clearly differed from other M populations and from NM populations in the canonical analysis of the quantitative variables. These results suggest possible different mechanisms of adaptation among M populations in our system study. Convergent evolution has often been assumed to concern distantly related species rather than closely related species or populations. Nevertheless, empirical studies of the genetics of adaptation have shown that different populations within a species may use different genetic solutions to solve similar ecological problems (see review of Arendt & Reznick 2007). This was observed by Hoekstra *et al.*, (2006) in Atlantic and Gulf coast populations of mice, for an extreme pigmentation phenotype. They showed that the mutation *Mclr* implicated in the light coloration of the Gulf coast mice was not present in the pale Atlantic coast mice. In the context of heavy metal tolerance, Smith & Macnair (1998) using crosses between two lines that differed in copper

tolerance and a single non-tolerant plant showed that several modifier genes explain different levels of tolerance in the metallophyte plant *Mimulus guttatus*. Genetic architecture of heavy metal tolerance in *A. halleri* was investigated in a cross between one M individual from *A. halleri* and one from the non-tolerant species *A. lyrata* (Courbot *et al.*, 2007; Willems *et al.*, 2007). They identified several QTLs for Zn and cadmium tolerance, probably implicated in different pathways (Roosens *et al.*, 2008b), meaning that genetic change at either of them can, in itself, enhance metal tolerance. Evolution of Zn tolerance by population specific mechanisms is thus a possibility *A. halleri*. Moreover, based on a genome scan approach, Meyer *et al.*, (2009) showed that different loci may be involved in adaptation in two M populations present in our survey (PL22 and PL27), consistent with a scenario of convergent evolution towards increased tolerance in these two populations.

Our results on the NMp population are congruent with those obtain by Pauwels *et al.*, (2006). Indeed, they showed that at the scale of Europe Zn tolerance in these populations was intermediate between M and NM populations. They proposed two hypotheses to explain the features of the NMp populations. These populations could be founded from neighboring M populations, followed by selection for lower tolerance due a possible cost for excessive tolerance. Conversely, the phenotype of NMp populations could also be explained by intense gene flow of metal tolerance genes. In these two hypotheses the NMp populations could be in a situation of maladaptation. Therefore, to have a better knowledge of the role of gene flow, selection and drift in shaping Zn tolerance in *A. halleri*, it would be interesting to investigate the genetic structure and the variability of tolerance on larger samples of NMp populations.

Adaptive value of Zn tolerance variability

To assess the role of natural selection in shaping the variability of Zn tolerance among *A. halleri* populations, we compared differentiation of this quantitative trait to differentiation of neutral molecular markers. The higher value of Q_{ST} for tolerance indices compared to F_{ST} , particularly for leaf photosystem II yield, gives strong support to the hypothesis that divergent selection at metalliferous and non-metalliferous sites has played a role in phenotypic differentiation. Another observation supporting this hypothesis, and congruent with the results of Pauwels *et al.* (2006), is the higher variance observed within NM populations compared to M populations. Indeed, reduction of genetic diversity is typically considered as one of the most striking signatures of directional selection (Nielsen 2005). Hence, our survey support the view that tolerance to Zn, the usual trait used to explore adaptation to metal-polluted sites and

the genetic basis underlying such adaptation, has probably been shaped by divergent selection within the species. However, the conclusion of our Q_{ST} - F_{ST} approach has to be confirmed because of (1) the large confidence interval of Q_{ST} , and (2) the possible genetic x environment effect. In *Thlaspi caerulescens*, a pseudo-metallophyte that tolerates and hyperaccumulates Zn and Cd, Jiménez-Ambriz *et al.*, (2007) and Dechamps *et al.*, (2006) have shown that several life history traits differed between edaphic types probably through divergent selection. Similarly, in *A. halleri*, life history traits and particularly reproductive ones, could be involved in adaptation to metalliferous sites and thus have to be investigated in parallel with Zn tolerance.

Acknowledgments:

We are grateful to Angélique Bourceaux and Anna Szczerbinska for technical support. We also thank Henk Schat for advice on the experimental design and helpful comments on the manuscript and Patrick Waldmann for providing the script for Bayesian estimates and further assistance on its application. This work was supported by funding from the Contrat de Plan Etat/Région Nord-Pas de Calais (PRC), from the Fondation pour la Recherche en Biodiversité (FRB) (contract BRG N°92), from the INSU-CNRS program ACI ECCO (contract No. 04 2 9 FNS) and from the POLONIUM program (contract No 6209.I/2005). Claire-Lise Meyer was funded by the French Ministry of Research and Technology. Alicja A. Kostecka was funded by the French Ministry of Foreign and European Affairs by “Eiffel excellence Doctorate Scholarship” (contract No 494706A/P490826L) and by Scholarship for Ph. D. students founded by the President of the Polish Academy of Sciences (contract No 13/S/2004).

References

- Al-Hiyaly SA, McNeilly T, Bradshaw AD. 1988. The effect of zinc contamination from electricity pylons - evolution in a replicated situation. *New Phytologist* **110**: 571-580.
- Al-Shehbaz IA, O’Kane SLJ. 2002. Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). In: Somerville CR, Meyerowitz EM eds *The Arabidopsis Book*. Rockville, USA, American Society of Plant Biologist.
- Antonovics J, Bradshaw AD, Turner RG. 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* **7**:1-85.

- Arendt J, Reznick D (2007) Convergence and parallelism reconsidered: what have we learned about the genetics of adaptation? *Science* **23**: 26-32
- Assunção AGL, Da Costa Martins P, De Folter S, Vooijs R, Schat H, Aarts MGM. 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment* **24**: 217-226.
- Assunção AGL, Ten Bookum WM, Nelissen HJM, Vooijs R, Schat H, Ernst WHO. 2003. Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist* **159**: 411-419
- Barrett RDH, Schluter D (2007) Adaptation from standing variation. *Trends in Ecology and Evolution* **23**: 38-34.
- Baryla A, Carrier P, Franck F, Coulomb C, Sahut C, Havaux M. 2001. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis growth. *Planta* **212**: 696-709.
- Bert V, Macnair MR, De Laguerie P, Saumitou-Laprade P, Petit D. 2000 Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*, **146**: 225-233.
- Bert V, Bonin I, Saumitou-Laprade P, de Laguerie P, Petit D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist* **155**: 47-57.
- Bradshaw AD. 1952. Populations of *Agrostis tenuis* resistant to lead and zinc poisoning. *Nature* **169**: 1098.
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. 2007. Zinc in Plants. *New Phytologist* **173**: 677-702.
- Cho M, Chardonnens AN, Dietz K-J. 2003. Differential heavy metal tolerance of *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*: a leaf slice test. *New Phytologist* **158**: 287-293.
- Courbot M, Willems G, Motte P et al. 2007. A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPases. *Plant Physiology* **144**: 1052-1065.
- Dechamps C, Lefèbvre C, Noret N, Meerts P. 2006. Reaction norms of life history traits in response to zinc in *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites. *New Phytologist* **173**: 191-198.
- Galardi F, Corrales I, Mengoni A et al. 2007. Intra-specific differences in nickel tolerance and accumulation in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 377-384
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica and Biophysica Acta* **990**: 87-92.
- Goudet J. 1995. Fstat version 1.2: a computer program to calculate *F* statistics. *Journal of Heredity* **86**: 485-486.
- Hoekstra HE, Hirschmann RJ, Bunday RA, Insel PA, Crossland JP .2006. A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. *Science* **313**: 101-104.

- Humphreys MO, Nicholls MK. 1984. Relationships between tolerance to heavy metals in *Agrostis capillaris* L. (*A. tenuis* Sibth.). *New Phytologist* **98**: 177-190.
- Jiménez-Ambriz G, Petit C, Bourrié I, Dubois S, Olivieri S, Ronce O. 2006. Life history variation in the heavy metal tolerant plant *Thlaspi caerulescens* growing in a network of contaminated and noncontaminated sites in southern France: role of gene flow, selection and phenotypic plasticity. *New Phytologist* **173**: 199-215.
- Koch M, Mummenhoff K, Hurka H. 1998. Systematics and evolution history of heavy metal tolerant *Thlaspi caerulescens* in Western Europe: evidence from genetic studies based on isozyme analysis. *Biochemical systematic and ecology* **26**: 823-838.
- Küpper H, Parameswaran A, Leitenmaier B, Trtílek M, Šetlík I. 2007. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **175**: 655-674.
- Llaurens V, Castric V, Austerlitz F, Vekemans X. 2008. High paternal diversity in the self-incompatible herb *Arabidopsis halleri* despite clonal reproduction and spatially restricted pollen dispersal. *Molecular Ecology* **17**: 1577-1588.
- Macnair MR. 1983. The genetic control of copper tolerance in the yellow monkey flower, *Mimulus guttatus*. *Heredity* **50**: 283-293.
- Macnair MR, Baker JM. 1994. Metal-Tolerant plant: An evolutionary perspective. In: Farago ME ed. *Plants and the chemical elements, biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*. New York, USA, VCH, 68-83.
- Macnair MR, Bert V, Huitson SB, Saumitou-Laprade P, Petit D. 1999. Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. *Proceedings of the Royal Society of London* **266**: 2175-2179.
- Macnair MR, Tilstone GH, Smith SE. 2000. The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In: Terry N, Banuelos G, Vangronsveld J eds *Phytoremediation of contaminated soil and water*, Boca Raton, USA, CRC Press, p 235-250
- Mengoni A, Barabesi C, Gonelli C, Galardi F, Gabbriellini R, Bazzicalupo M. 2001. Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology* **10**:1909-1916.
- Meerts P, Van Isaker I. 1997. Heavy metal tolerance and hyperaccumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecology* **133**: 221-231.
- Meyer CL, Vitalis R, Saumitou-Laprade P, Castric V. 2009. Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal. *Molecular Ecology* **18**: 2050-2062.
- Nielsen (2005) Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics* **39**:197-218.
- O'Hara RB, Merilä J (2005) Bias precision in Q_{ST} estimates: problems and some solutions. *Genetics*, **171**, 1331-1339.
- O'Kane SL, Al-Shehbaz IA. 2003. Phylogenetic position and generic limits of *Arabidopsis* (Brassicaceae) based on sequences of nuclear ribosomal DNA. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **90**: 603-612.

- Pauwels M, Saumitou-Laprade P, Holl C, Petit D, Bonin I. 2005. Multiple origins of metalicolous populations of the pseudometallophyte *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) in central Europe: the cpDNA testimony. *Molecular Ecology* **14**: 4403-4414.
- Pauwels M, Frérot H, Bonin I, Saumitou-Laprade P. 2006. A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 1838-1850.
- Reznick DN, Ghalambor CK. 2001 The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica* **112-113**: 183-198.
- Roosens NCJ, Willems G, Saumitou-Laprade P. 2008a Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends in Plant Science* **13**: 208-215.
- Roosens NCJ, Willems G, Godé C, Courseaux A, Saumitou-Laprade P (2008b) The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* **306**: 105-116.
- Schat H, Ten Bookum WM. 1992. Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. *Heredity* **68**: 219-229.
- Schat H, Kuiper E, Ten Bookum WM, Vooijs R. 1993. A general model for the genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*: evidence from crosses between plants from different tolerant populations. *Heredity* **70**: 142-147.
- Schat H, Vooijs R, Kuiper E. 1996. Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*. *Evolution* **50**: 1888-1895.
- Schat H, Vooijs R. 1997. Multiple tolerance and co-tolerance to heavy metals in *Silene vulgaris*: a co-segregation analysis. *New Phytologist*, **136**: 489-496.
- Siegel S. & Castellan N.J. 1988. *Non parametric statistics for the behavioural sciences*. MacGraw-Hill, New York.
- Smith SE, Macnair MR. 1998. Hypostatic modifiers cause variation in degree of copper tolerance in *Mimulus guttatus*. *Heredity* **80**: 760-768.
- Von Frenckell-Insam BAK, Hutchinson TC. 1993. Occurrence of heavy metal tolerance and co-tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. From European and Canadian populations. *New Phytologist* **125**: 555-564.
- Van Rossum F, Bonnin I, Fénart S, Pauwels M, Petit D, Saumitou-Laprade P. 2004. Spatial genetic structure within a metalicolous population of *Arabidopsis halleri*, a clonal, self-incompatible, and heavy metal tolerant species. *Molecular Ecology* **13**: 2959-2967.
- Vekemans X, Lefèbvre C. 1997. On the evolution of heavy-metal tolerant populations in *Armeria maritima*: evidence from allozyme variation and reproductive barriers. *Journal of Evolutionary Biology* **10**:175-191.
- Waldmann P, Garcia-Gil MR, Sillanpaa MJ. 2005. Comparing Bayesian estimates of genetic differentiation of molecular markers and quantitative traits: an application to *Pinus sylvestris*. *Heredity* **94**: 623-629.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.

- Whitlock MC. 2008. Evolutionary inference from Q_{ST} . *Molecular Ecology* **17**: 1885-1896.
- Wilkins DA. 1978. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytologist* **80**: 623-633.
- Willems G, Dräger DB, Courbot M, *et al.* 2007. The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): An analysis of quantitative trait loci. *Genetics* **176**: 659-674.
- Wu L, Bradshaw AD, Thurman DA. 1975. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera*. *Heredity* **34**: 165-187.

Table S1: Summary statistics of the 10 microsatellite

Locus	N_a	H_T	F_{IS}
<i>GC16</i>	6	0.492	0.048
<i>LYR132</i>	5	0.691	0.269
<i>LYR133</i>	10	0.691	0.145
<i>ATH</i>	9	0.529	0.117
<i>LYR104</i>	8	0.716	0.081
<i>GC22</i>	8	0.774	0.207
<i>ICE 13</i>	9	0.281	0.142
<i>NAG112</i>	15	0.800	-0.044
<i>MDC16</i>	5	0.458	0.121
<i>NGA361</i>	10	0.562	-0.122

N_a , number of alleles per locus; H_T , total expected diversity; F_{IS} , inbreeding coefficient.

CHAPITRE V : Explorer les bases génétiques de la variabilité de la tolérance au zinc d'*Arabidopsis halleri* par l'approche de la génétique d'association

I. Présentation de l'étude et principaux résultats

La génétique d'association, appelée également cartographie par déséquilibre de liaison, est une méthode de plus en plus utilisée chez les espèces modèles (Zhao *et al.* 2007) et non modèles (Gonzalez-Martinez *et al.* 2007), pour rechercher les bases génétiques d'un trait quantitatif. Son principe simple repose sur l'identification de marqueurs moléculaires présentant une association statistique entre la fréquence de ses allèles et la valeur d'un trait. Le principal avantage de cette méthode est qu'elle permet une localisation précise dans le génome puisque les génotypes observés sont le résultat d'un grand nombre de recombinaisons.

Cette méthode pouvant présenter des faux positifs à cause de la structure des populations, il a été proposé de l'utiliser de manière complémentaire avec la cartographie QTL. Certains auteurs ont également suggéré que l'utilisation conjointe de la génétique d'association et du criblage génomique permettrait d'une part de confirmer le statut de certains locus candidats mais aussi d'avoir une meilleure compréhension des liens entre les traits quantitatifs, les mécanismes moléculaires et les processus évolutifs (Stinchcombe & Hoekstra 2007).

Notre système d'étude, les populations M et NM d'*A. halleri* en Pologne et Slovaquie, est un modèle particulièrement adapté à cette démarche. En effet, nous avons d'une part une bonne connaissance du polymorphisme à un trait quantitatif, la tolérance au zinc (voir chapitre 4) et d'autre part nous connaissons la variabilité à un nombre relativement élevé de marqueurs moléculaires (voir chapitre 2). De plus ces populations ayant fait l'objet d'un criblage génomique nous pouvons croiser les informations issues du criblage avec ceux d'une analyse d'association. Nous avons donc dans un premier temps analysé l'association entre les marqueurs AFLP défini au chapitre 2 et la tolérance au zinc de 50 individus de deux populations polonaises et de deux populations slovaques. Nous avons ensuite comparé les résultats de cette analyse avec ceux du criblage génomique pour vérifier si les marqueurs divergents de la neutralité étaient impliqués dans la variabilité de la tolérance.

Nous avons pu identifier cinq locus associés à la variabilité de la tolérance au Zn. Ces locus sont de bon candidats, parce qu'ils ont montré une association significative dans l'analyse sur tout le jeu de données, mais également dans l'analyse au sein des populations qui n'est pas influencée par la structure des populations. Ces candidats ont été identifiés à l'aide d'indices de tolérance basés sur la longueur des racines ou le rendement photosynthétique des feuilles, ce qui laisse penser que plusieurs mécanismes sont impliqués dans la variabilité de la tolérance au Zn. De manière intéressante nous avons pu identifier un locus commun à cette approche et à celle du criblage génomique (locus 106). Ces résultats suggèrent, comme l'étude précédente (chapitre 4), que la tolérance au Zn est un trait impliqué dans l'évolution des populations M d'*A. halleri*. Au vu de ces résultats il semble également intéressant de poursuivre l'étude du locus 106.

Contribution sous forme d'article

ARTICLE 3: ASSOCIATION GENETICS TO EXPLORE THE GENETIC BASIS OF QUANTITATIVE ZINC TOLERANCE IN NATURAL POPULATIONS OF *ARABIDOPSIS HALLERI*

Claire-Lise Meyer, Alicja A. Kostecka, Pierre Saumitou-Laprade, Vincent Castric

En préparation

Association genetics to explore the genetic basis of quantitative zinc tolerance in natural populations of *Arabidopsis halleri*

Claire-Lise Meyer, Alicja A. Kostecka, Pierre Saumitou-Laprade, Vincent Castric

(in preparation)

Abstract

To explore the genetic basis involved in variability of zinc tolerance in *Arabidopsis halleri* we performed an association genetics analysis using four natural populations of this species. Among 787 AFLP markers, we found seven loci associated to variability of Zn tolerance in the Polish and Slovak sampled populations. Four of these loci are strong candidates because they were also significantly associated to zinc tolerance within populations and thus were not false positives due to population structure. The fact that these loci were identified using measurements of root length or leaf photosystem II yield suggest that different mechanisms are involved in variability of Zn tolerance in *A. halleri*. We compared these results to those of a genome scan approach that investigated adaptive divergence between *A. halleri* metallicolous and non metallicolous populations with the same set of AFLP markers. One locus was identified by both methods and thus constitutes a strong candidate for the study of adaptation to contamination by heavy metals. The weak overlap between our association study and the genome scan approach could be explained by the fact that we focused on Zn tolerance. Indeed, other traits could be involved in adaptation to metalliferous sites.

Keywords: association genetics, AFLPs, *Arabidopsis halleri*, natural populations, zinc tolerance

Introduction

A central goal of evolutionary biology is to identify the genetic basis of natural variation of adaptive traits. And this, in order to understand both the evolutionary process of adaptation to local environments and to identify the potential of species to response to new constraints. Tolerance to heavy metals, which is defined as the ability to survive on soil with levels of metals toxic for most living things (Antonovics *et al.* 1971; Macnair & Baker 1994), is a very relevant trait to investigate these questions. Indeed this trait has been found to evolve rapidly in response to high concentrations of heavy metals in soil (Wu *et al.* 1975; Al-Hiyaly *et al.* 1988) and in several species it showed significant variation between populations (Schat & Ten Bookum 1992; Smith & Macnair 1998; van Hoof *et al.* 2001; Assunção *et al.* 2003; Pauwels *et al.* 2006; Galardi *et al.* 2007). In addition, evolutionary studies have showed that metal tolerance probably evolved independently in geographically distant conspecific populations (Schat *et al.* 1996; Vekemans & Lefèbvre 1997; Koch *et al.* 1998; Mengoni *et al.* 2001; Pauwels *et al.* 2005).

Many studies have investigated the genetic basis of metal tolerance in *Arabidopsis halleri*, a pseudometallophyte species which is able to grow on contaminated as well as non contaminated soils. This species is regarded as a model in the context of heavy metal pollution because of its constitutive ability to tolerate and hyperaccumulate zinc (Zn) and cadmium (Cd) (Bert *et al.* 2000; Bert *et al.* 2003; Pauwels *et al.* 2006) and also because it is the closest metal-tolerant relative of the model species *A. thaliana* (Al-Shehbaz *et al.* 2002). It shows high nucleotide sequence identity and good synteny with this pre-eminent model species (Roosens *et al.* 2008). Genomic, transcriptomic and genetic surveys performed on some M individuals have suggested that Zn tolerance of *A. halleri* is a complex trait involving several genomic regions (Willems *et al.* 2007) with other expression of a large set of genes (Becher *et al.* 2004; Talke *et al.* 2006; Hanikenne *et al.* 2008). Nevertheless, Zn tolerance in this species showed a quantitative polymorphism, with significant difference in average tolerance among populations. At a broad and local scale, M populations seemed to be more tolerant than NM populations with a continuum range of variation between the two edaphic types (Pauwels *et al.* 2006; Meyer *et al.* submitted). The genetic bases of these more subtle differences, which represent an important task to evaluate evolutionary processes induced by heavy metal contamination, have never been investigated.

A powerful method to investigate the genetic basis of quantitative polymorphisms is the association between phenotypic traits and molecular markers in natural populations (association genetics, aka. LD mapping, aka. genome-wide association [GWA] mapping). Indeed, this method takes advantage of historical recombination, of nonspecific markers and of the possibility to investigate several phenotypic traits from the same set of populations. Molecular markers are then identified whose frequency correlates with the phenotype. Association genetics has become the favored method to dissect the genetic architecture of quantitative traits in model species (Farnir *et al.* 2000; International HapMap consortium 2005; Dixon *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2007; Ducrocq *et al.* 2008) and has been also used in non model species (Neale & Savolainen 2004; Sköt *et al.* 2005; Gonzalez-Martinez *et al.* 2007). The main bias when using this method is the identification of false positives. These false positives are principally due to population structure and demographic events but could also arise in large studies merely by chance. It is possible to limit this bias through careful selection of the samples (Sackville Hamilton *et al.* 2002) and/or by taking into population structure explicitly into account (Bradbury *et al.* 2007). This high rate of false positives calls for the need to confirm the results using independent approaches.

Some surveys have proposed to combine association genetics with classical QTL mapping (Kraakman *et al.* 2004; Breseguello & Sorrels 2006; Gonzalez-Martinez *et al.* 2007). Stinchcombe & Hoekstra (2007) proposed on the other hand to concurrently use association genetics and explorative genome scans. This last approach was developed to identify genetic markers showing signature of directional selection in contrasted populations or environments. The straightforward principle is that loci responding directly to positive selection, or linked to the targets of selection through genetic hitchhiking are expected to show higher population differentiation than neutral markers evolving exclusively through genetic drift and gene flow (Luikart *et al.* 2003). Combination of association genetics and genome scans is a promising approach to assess that the candidate loci are true positives and also to uncover the link between quantitative traits, molecular mechanisms and evolutionary process. Explorative genome scans have been applied on many non-model species to investigate adaptation to local environmental conditions (for review see Nosil *et al.* 2009). Nevertheless, to our knowledge, no survey has completed these results with association genetics.

In this survey, we analyzed the association between AFLP markers and Zn tolerance in metallicolous (M) and nonmetallicolous (NM) *A. halleri* populations. We estimated Zn tolerance using morphological and physiological traits that have been previously found to be

differentiated among these populations (Meyer *et al.* submitted). One of these traits (photosystem II yield of leaves) is probably shaped by disruptive selection because it showed greater phenotypic (Q_{ST}) than genetic (F_{ST}) differentiation (Meyer *et al.* submitted). The AFLP data set was previously used in a genome scan analysis that investigated adaptive divergence between the M and NM sampled populations. Thus, the second goal of this survey is to compare the results from association genetics and genome scan approaches to assess if markers diverging from neutral expectations in the genome scan are associated with differentiation for Zn tolerance.

Materials and methods

Samples collected

We sampled 50 *A. halleri* individuals in a small geographic region between Poland and Slovakia. The samples came from four distinct populations referred to as NM1, NM2, M1 and M2 in Meyer *et al.* (2009) and as PL13, SK2, PL22 and PL27 in Meyer *et al.* (submitted). The populations PL13, PL22 and PL27 are located in an industrial region of the south of Poland (Silesia) whereas SK2 is located in the Slovakian part of the Tatra mountains (Fig. 1).

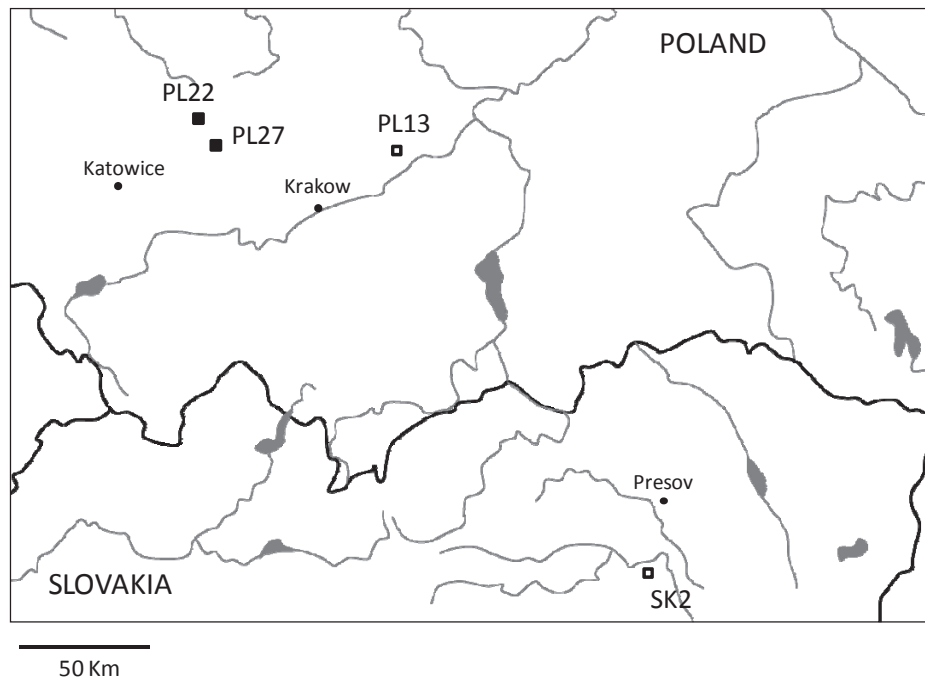


Figure 1 Geographic location of the sampled non metallicolous (NM, white square) and metallicolous (M, black square) populations of *A. halleri*. The grey lines represent the rivers.

Heavy metal contamination is extremely dissimilar between M and NM populations, with a Zn soil concentration of 3,969 and 34,981 µg/g in PL22 and PL27 respectively and a concentration lower than 162 µg/g in NM populations. The sampled M populations are located near a Zn smelter in an ancient mining area: PL22 is found on a metallurgic plant and PL27 is located in a forest 8 km away from this industrial site. The NM population PL13, found at a forest edge, is geographically close from the M populations (< 65 km). The second NM population is separated from the other populations by approximately 200 km.

Phenotypic data and AFLP genotyping

Tolerance to Zn of each individual was estimated using morphological and physiological traits according to Meyer *et al.* (in prep). The experiment was performed in a controlled growth chamber (photoperiod of 13-h day / 11-h night, temperature of 20°C day / 18°C night, and a relative humidity of 65%) in hydroponic culture. Three clones per genotype were treated with the standard hydroponic solution enriched with 2000 µM of Zn (contaminated condition), whereas three others were grown in the standard solution with 10 µM of Zn (non contaminated solution). At the end of the 6th week of Zn treatment, four morphological traits were measured (leaf width, root length, dry shoot and root biomass). Two physiological traits were also measured: chlorophyll content with the CL-01 Chlorophyll Content Meter (Hansatech Instruments, Norfolk, UK) and photosystem II yield of leaves using a PAM-2100 modulated fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). To estimate the effect of Zn on each trait we calculated a tolerance index (TI). Using TIs allow us to minimize the variation in tested plant responses unrelated to metal treatment. Tolerance index was defined as:

$$TI = \frac{\text{Value for a clone in C condition}}{\text{median of the trait for the 3 clones in NC condition}}$$

The 50 individuals of our study are a subsample of a larger dataset (124 individuals) previously genotyped for 820 AFLP markers according to Vos *et al.* (1995) using 27 *EcoRI/MseI* primer pairs (Meyer *et al.* 2009). Among the 820 AFLP markers, we retained for the association analysis only the polymorphic loci in our sample, resulting in a total data set of

787 AFLP markers. Using the 820 AFLP markers and the total dataset, Meyer *et al.* (2009) showed that the mean pairwise F_{ST} between the four populations studied was low (0.066) and ranged from 0.044 to 0.109. Higher values of F_{ST} were found for the comparisons involving SK2 (average F_{ST} = 0.088) than for the three other comparisons.

Data analysis

To analyze phenotypic differentiation between edaphic types we used Wilcoxon-Mann-Whitney exact tests for two independent groups (StatXact v.7 Cytel Studio 2005). Monte Carlo approximations for p -values were obtained using 10,000 samples. In order to test differences between pairs of population we used a non parametric post-hoc test for multiple comparisons, according to Siegel & Castellan (1988).

To estimate the relative importance of drift and gene flow in determining genetic structuring, we examined the relationship between population pairwise F_{ST} against geographical distance on the four populations studied plus four populations located in the same area genotyped for 10 microsatellite (Meyer *et al.* submitted) . Pairwise population differentiations (F_{ST}) were estimated according to Weir & Cockerham (1984) using the FSTAT software (Goudet 2001). Statistical significance of the F_{ST} – distance relationship was assessed using the Mantel test as implemented in the FSTAT program. We performed 10 000 permutations of the genetic ($F_{ST} / (1-F_{ST})$) and geographic (ln (geographical distance)) matrices.

In order to test for associations between AFLP genotypes and tolerance for each of the six traits, we carried out a Wilcoxon-Man-Whitney exact test for each AFLP marker using the NPARWAY procedure of the SAS program v 9.1 (SAS Institute, 2002). We considered that tolerance indexes were the dependant variates and AFLP markers the independent variates (presence vs. absence of the band). To account for multiple testing, adjusted p -values were computed first using the stepdown Bonferroni method of Holm (Holm 1969) implemented in the MULTTEST procedure (SAS Institute, 2002). Bonferroni methods are recognized to be overly conservative (Verhoeven *et al.* 2005), consequently we determined significance of association using a second statistic: the q -value developed by Storey & Tibshirani (2003) which is based on the false discovery rate (FDR). The q -value estimated for a given locus is the expected proportion of false positives incurred for the whole dataset when that particular

locus is considered to be significant. AFLP markers significantly associated ($\alpha = 0.05$) with quantitative traits were used in multiple linear regression analyses to assess the proportion of phenotypic variation associated with the significant loci and to estimate the contribution of each locus to this variability. The stepwise regression was performed with the REG procedure (SAS institute, 2002). Despite the weak genetic differentiation among the studied populations (Meyer *et al.* 2009), false positives could be present among the significant loci because we did not take into account population structure. One program may deal with population structure (TASSEL, Bradbury *et al.* 2007); however it was not adapted for dominant data. Consequently, to assess the significance of the loci, we analyzed their associations with tolerance indexes within populations. This analysis allowed testing associations without bias produced by population structure. Estimation of association was not performed for all loci in all populations because within populations some loci were monomorphic.

Results

Responses of M and NM individuals were on average significantly different for two traits: the photosystem II yield and the chlorophyll content (Fig. 2). Indexes of tolerance of the M group for these traits were significantly higher than the ones in NM group (p -values = 0.003 and p -value < 0.0001, respectively). The four other traits (dry biomass of shoots and roots, root length and width leaves) showed equivalent indexes of tolerance for the M and NM populations. Absence of congruence between our results on these four traits and those of Meyer *et al.* (submitted) which showed a significant difference between edaphic type, is probably due to our small sample size resulting in a smaller power of analyze. However, all traits showed variability in the sample (see large variances on Fig. 2) supporting the idea that association between markers and phenotypic values could be identified. The difference observed between M and NM groups for photosystem II yield was mainly explained by the response of SK2. This population showed a smaller index of tolerance compared to the other populations and a high intra population variability (coefficient of variation of 35% for SK2 and around 5% for PL22, PL27 and PL13).

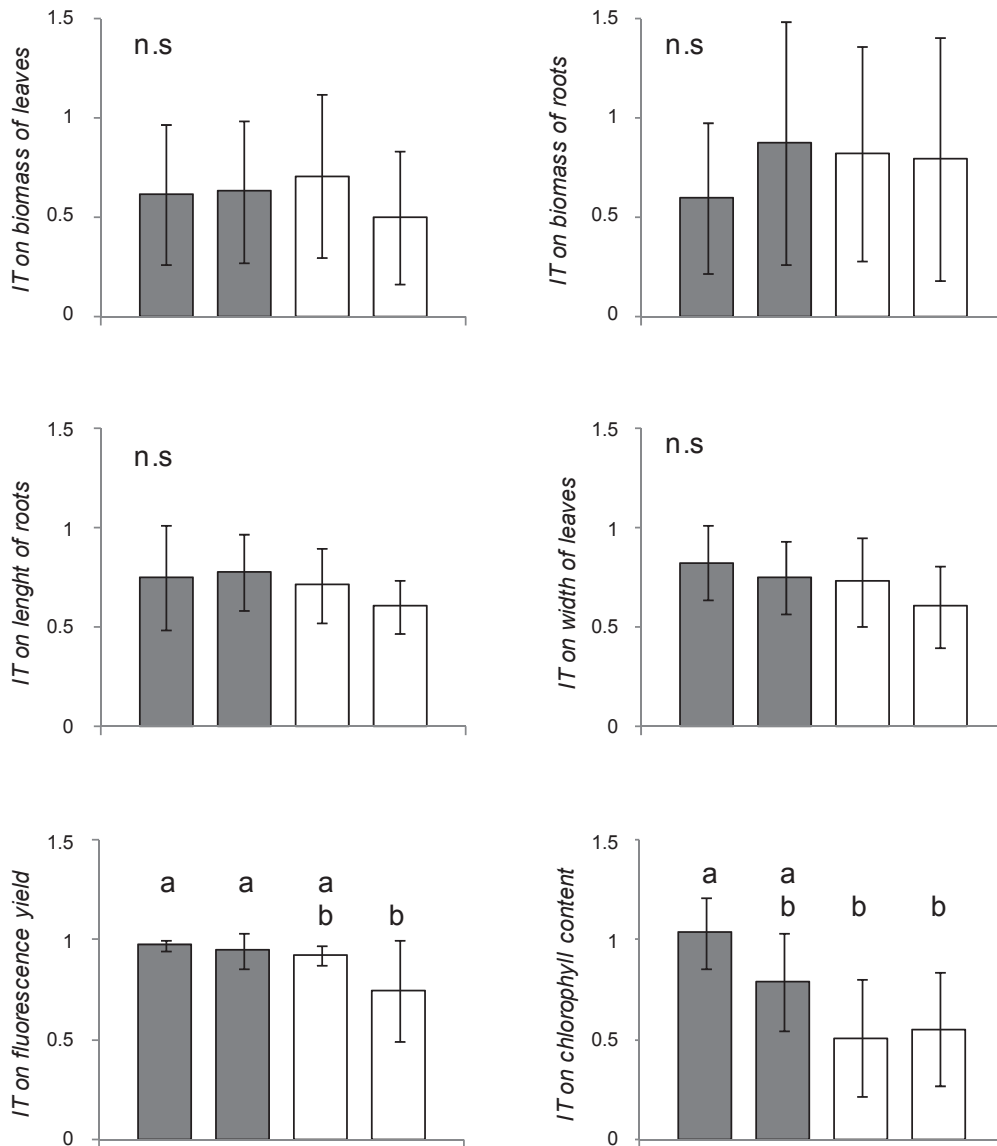


Figure 2 Mean \pm SD of indexes of zinc tolerance based on morphological and physiological traits of two M populations (grey bars, PL22 and PL27 respectively) and two NM populations (white bars, PL13 and SK2 respectively). Significant pairwise comparisons are represented by letters, ns = not significant.

No statistically significant relationship was found at the spatial scale of this study between population pairwise F_{ST} based on 10 microsatellite and geographical distance (p -value = 0.401, see Fig. 3). The Mantel test gave the following least-squares regression: $F_{ST}/(1-F_{ST}) = 0.01081 + 0.0151 \ln(\text{geographical distance})$ ($R^2 = 0.0273$). The mean pairwise F_{ST} on all populations was estimated to 0.146.

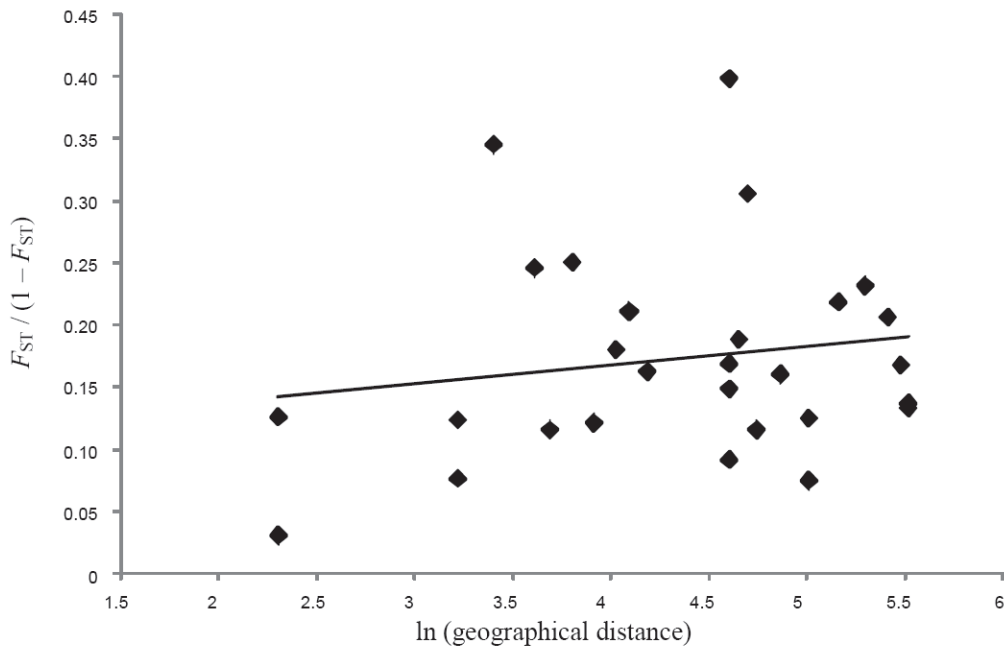


Figure 3 Relationship between pairwise F_{ST} estimated on 10 microsatellite and geographical distance for 8 *A. halleri* populations of the studied area. The line shown is the least-squares regression.

Among the 787 AFLP markers, there were 3% that were significantly associated positively or negatively with the biomass of shoot, 2.5% with the biomass of roots, 6% with the length of roots, 3% with the width of leaves, 9% with the photosystem II yield and 8.5% with the chlorophyll content. Hence, for these last two traits, the number of AFLP markers associated with phenotypic variation was higher than the nominal level of the test. After correction for multiple testing, one marker (557) was significantly associated with TI based on root length and 6 markers (106, 305, 317, 627, 646 and 649) were associated with TI based on photosystem II yield (Table 1). Presence of the band 106 shows a clear trend of increasing tolerance from NM to M group (average TI 0.85 ± 0.17 vs. 0.99 ± 0.06 , respectively). Presence of the band 305 and 627 clearly decreased tolerance of the NM population SK2 compared to the other populations sampled. Variability of tolerance among populations, particularly with SK2, seems to be linked to frequencies of bands 317, 557, 646 and 649 (table 1).

Table 1 Significant associations between TIs and AFLP genotypes after correction for multiple testing. Allelic frequencies were estimated using AFLP-SURV (Vekemans *et al.* 2002)

TI	Locus	<i>p</i> -value after Bonferroni correction	<i>q</i> -value	Allelic frequencies			
				M		NM	
				PL22	PL27	PL13	SK2
Root length	557	< 0.0001	0.008	0.60	0.54	0.50	0.23
Photosystem II yield	106	< 0.0001	0.025	0.50	0.50	0.00	0.00
	305	0.0002	0.035	0.00	0.09	0.01	0.57
	317	0.0003	0.035	1.00	0.36	0.60	0.15
	627	0.0001	0.025	0.00	0.00	0.00	0.44
	646	0.0002	0.035	0.83	0.50	0.72	0.00
	649	0.0003	0.025	1.00	0.87	0.63	0.00

Only the 6 markers significantly associated with the photosystem II yield were used for multiple linear regression analysis. The overall regression explained 63% of the phenotypic variation for TI. Marker 317 was associated with 47% of the variation in our sample while locus 627, 106, 646 and 649 explained respectively 9%, 3%, 2% and 2% of the total variation. Two of them (317 and 627) had significant *P*-value (respectively, < 0.0001 and 0.0279) in this multiple linear regression. Among the seven markers significantly associated after Bonferroni correction, four (106, 317, 646 and 557) were also significantly associated to TIs within at least one populations (table 2). For all of these markers, presence of the band clearly increased tolerance of individuals within some populations (Fig. 4). These results are congruent with the pattern previously described on all populations. Because these four loci were significant within population, we could consider that they are true positives whose association with phenotypic variation is not due to population structure.

Table 2 Significance of correlations found within populations between tolerance indexes and allelic frequencies for locus 557, 106, 305, 317, 627, 646 and 649.

Locus	Correlation within population:			
	PL22	PL27	PL13	SK2
557	0.787	0.537	0.002	0.003
106	0.143	0.025	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
305	<i>n.d.</i>	0.290	0.473	0.305
317	<i>n.d.</i>	0.186	0.002	0.923
627	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.150
646	0.294	0.889	0.048	<i>n.d.</i>
649	<i>n.d.</i>	1	0.172	<i>n.d.</i>

Note: significant correlation are in bold; *n.d.*, not determined because locus was monomorphic in this population (see table 1)

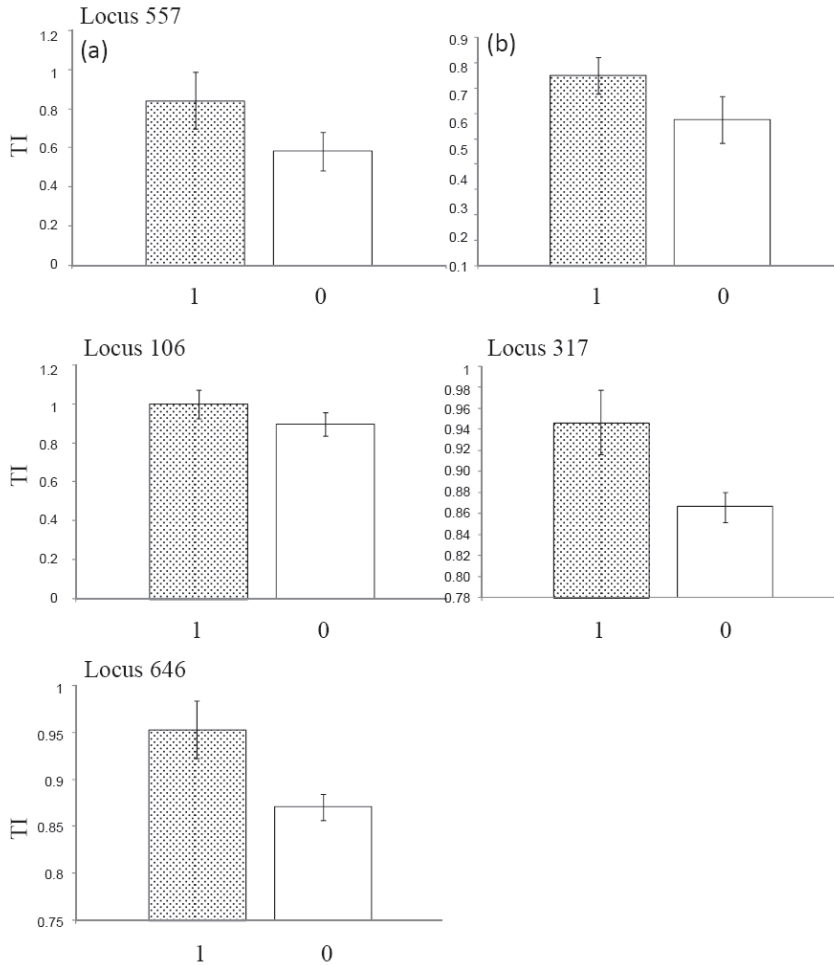


Figure 4 Influence of genotype (band present = 1, absence = 0) on phenotype for all loci significantly associated to TIs within populations. Locus 557 (a) within PL13, (b) within SK2. Locus 106 within PL27; locus 317 within PL13; locus 646 within PL13

Several markers, departing from neutral expectation in the survey of Meyer *et al.* (2009), showed tendency to association with variability of Zn tolerance: markers 106, 245, 304, 332, 382, 682, 805 were associated with photosystem II yield, whereas markers 275, 410 and 498 were associated with chlorophyll content, length of roots and width of leaves as well as chlorophyll content, respectively. Nevertheless, after Bonferroni correction, this association was still significant only for the marker 106.

Discussion

Our survey illustrates the relevance of association genetics, using small samples from natural populations and AFLP markers, to identify loci involved in complex quantitative trait. We identified, among 787 AFLP markers, four loci associated with variability of Zn tolerance in four Polish and Slovak *A. halleri* populations which are probably true positive. A well known bias of association genetics is the spurious association caused by population structure. To reduce the risk of identification of false positives, several models have been developed to integrate population and family structure in the association analysis (Pritchard *et al.* 2000; Thornsberry *et al.* 2001; Yu *et al.* 2006). Bradbury *et al.* (2007) have implemented these models in a statistical analysis software, but this package is not able to handle dominant data and thus not appropriate for AFLP markers. We used another strategy proposed by Sackeville Hamilton *et al.* (2002) to reduce possible bias due to population structure. They showed that sampling populations with contrasting phenotypes from the same geographic origin and repeating this from a number of different locations allows to minimize population structure and prevent presence of correlated selection pressures (the environments of such populations will be very close in most respect other than the selection pressure concerned). Hence, in our survey we have sampled M and NM populations that were geographically and genetically the closest and that presumably shared a recent common history based on cpDNA inferences (Pauwels *et al.* 2006). This pattern was confirmed by the low genetic differentiation observed and the absence of isolation by distance. It was not possible to replicate a similar sampling scheme in different regions because Poland and the North of Slovakia is the single location where M and NM populations are currently known to occur in such close proximity. Our sampling strategy gives us reasons to believe that the five significant markers are indeed associated with Zn tolerance. In addition, another central evidence that these loci are true positives come from the analysis of association within populations which showed that presence of markers 106, 305, 537 and 646 were significantly associated to higher TIs.

Three of these four loci were associated with higher index of tolerance based on photosystem II yield. This trait has been previously described as being potentially adaptive as well as possibly relevant to investigate variation of Zn tolerance in these *A. halleri* populations (Meyer *et al.* submitted). The last candidate is associated with an index of tolerance based on root length, the classical trait measured to estimate tolerance to heavy

metals (Wilkins 1978; Macnair 1983; Schat & Ten Bookum 1992). These results suggest that a wide range of physiological mechanisms may underlie variability of Zn tolerance in *A. halleri*. Consequently, the genetic bases of Zn tolerance should not be investigated by focusing on a single trait. The fact that the four other traits measured (shoot dry biomass, root dry biomass, leaf width and chlorophyll content) were not informative in our survey could be explained by a lack of variability for these traits in our sample. In a larger study of polymorphism of Zn tolerance in Polish and Slovak *A. halleri* populations, these traits showed differentiation between edaphic types (Meyer *et al.* submitted). Thus, to investigate these variations it could be interesting to screen a larger sample in order to enhance analysis power and to increase the probability of observing extreme phenotypes.

Among the 7 loci associated to Zn tolerance in our survey, one was also identified using a genome scan approach (locus 106, Meyer *et al.* 2009, *see also Chapter II*). This overlap between the two methods is a relevant argument to believe that this locus is linked to an adaptive process in M populations. Therefore, this locus is a strong candidate for further survey on local adaptation in *A. halleri* M populations of central Europe. Interestingly, the locus 106 was identified in the association study using measurements based on photosystem II yield. This result reinforces previous observations which suggested that this trait was under disruptive selection. To our knowledge this survey is the first to confirm that an outlier locus identified using the genome scan approach is correlated with variation of an adaptive trait in natural populations. Some studies have investigated the co-localization of outlier loci and QTLs (Rogers & Bernatchez 2007; Via & West 2008). They showed that the degree of overlap is generally weak with many QTL loci without signature of selection. Two hypotheses could explain this situation: the identification of false positives due to demographic, spatial or local effects (Beaumont & Nichols 1996) and the co-variance among QTL that could result in phenotypic change despite small effects on each individual locus (Le Corre & Kremer 2003). Indeed, when the covariance is positive the changes in the allele frequencies at each of the underlying loci could be relatively weak while the trait divergence is high (Latta 2003). These two situations are also possible in our survey and could explain the absence of congruence for the last four candidates between our association genetics approach and the previous genome scan. Nevertheless, it is also possible that the loci identified using genome scan are linked to other adaptive traits. Indeed, Dechamps *et al.* (2006) and Jiménez-Ambriz *et al.* (2007) showed that in the pseudometallophyte species

Thlaspi caerulescens several life history traits differed between edaphic types, beside those strictly linked to heavy-metal tolerance. In particular, they showed that M populations seemed to have higher life cycle plasticity than NM populations.

In summary, our results confirmed the relevance of association genetics on non model species to explore the genetic basis of quantitative traits. In addition, we showed that combining association genetics and genome scan is a good strategy to define strong candidate loci and to explore the link between adaptation and differentiation of quantitative traits. In central Europe, we identified several loci that may underlie variability of Zn tolerance among individuals. Among these loci, one was also identified to be potentially under selection in M populations and thus represent a strong candidate for further analysis on the genetic basis of differentiation between M and NM *A. halleri* populations.

References

- Al-Hiyaly SA, McNeilly T, and Bradshaw AD (1988). The effect of zinc contamination from electricity pylons - evolution in a replicated situation. *New Phytologist*, **110**: 571-580.
- Al-Shehbaz IA, O'Kane SLJ (2002) Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). In: *The Arabidopsis Book* (eds. Somerville CR, Meyerowitz EM). American Society of Plant Biologist, Rockville.
- Antonovics J, Bradshaw AD, Turner RG (1971) Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research*, **7**:1-85
- Assunção AGL, Ten Bookum WM, Nelissen HJM, Vooijs R, Schat H, Ernst WHO (2003) Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist*, **159**: 411-419
- Beaumont MA, Nichols A (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London*, **263**, 1619-1626.
- Becher M, Talke IN, Krall L, Kramer U (2004) Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Journal*, **37**: 251-268.
- Bert V, Macnair MR, de Laguerie P, Saumitou-Laprade P (2000) Zn tolerance and hyperaccumulation in metallicolous and non metallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist*, **146**: 225-233.
- Bert V, Meerts P, Saumitou-Laprade P, Salis P, Gruber W, Verbruggen N (2003) Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and Soil*, **249**: 9-18
- Bohonak AJ (2002) IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, **93**: 153-154.

- Breseguello F, Sorrells ME (2006) Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*, **172**: 1165-1177.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES (2007) TASSEL : software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics applications note*, **23**: 2633-2635.
- Courbot M, Willems G, Motte P *et al.* (2007) A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4*, a gene encoding a heavy metal ATPases. *Plant Physiol*, **144**: 1052-1065.
- Dechamps C, Lefèbvre C, Noret N, Meerts P. 2006. Reaction norms of life history traits in response to zinc in *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites. *New Phytologist*, **173**: 191-198.
- Dixon AL, Liang L, Moffatt MF *et al.* (2007) A genome-wide association study of global gene expression. *Nature Genetics*, **39**: 1202-1207.
- Ducrocq S, Madur D, Veyrieras J-B *et al.* (2008) Key impact of Vgt1 on flowering time adaptation in Maize: Evidence from association mapping and ecogeographical information. *Genetics*, **178**: 2433-2437.
- Farnir F, Arranz WCJJ, Berzi P *et al.* (2000) Extensive genome wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Research*, **10**: 220-227.
- Galardi F, Corrales I, Mengoni A *et al.* (2007) Intra-specific differences in nickel tolerance and accumulation in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *Environmental and Experimental Botany*, **60**: 377-384
- Gonzalez-Martinez SC, Wheeler NC, Ersoz E, Nelson CD, Neale DB. (2007) Association genetics in *Pinus taeda* L. I. Wood property traits. *Genetics*, **175**: 399-499.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, *et al.* (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*. *Nature*, **453**: 391-395.
- Holm S (1979) A Simple Sequentially Rejective Bonferroni Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, **6**: 65 -70.
- International Hapmap consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature*, **437**: 1299-1320.
- Jiménez-Ambriz G, Petit C, Bourrié I, Dubois S, Olivieri S, Ronce O (2006) Life history variation in the heavy metal tolerant plant *Thlaspi caerulescens* growing in a network of contaminated and noncontaminated sites in southern France: role of gene flow, selection and phenotypic plasticity. *New Phytologist*, **173**: 199-215.
- Koch M, Mummenhoff K, Hurka H (1998) Systematics and evolution history of heavy metal tolerant *Thlaspi caerulescens* in Western Europe: evidence from genetic studies based on isozyme analysis. *Biochemical systematic and ecology*, **26**:823-838.
- Kraakman ATW, Nicks RE, Van den Berg P, Stam P, Van Eeuwijk FA (2004) Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics*, **168**: 435-446.
- Latta RG (2003) Gene flow, adaptive population divergence and comparative population structure across loci. *New Phytologist*, **161**: 51-58.

- Le Corre V, Kremer A (2003) Genetic variability at neutral markers, quantitative trait loci and traits in a subdivided population under selection. *Genetics*, **164**: 1205-1219.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, **4**: 981-994.
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic-structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**: 91-99.
- Macnair MR (1983) The genetic control of copper tolerance in the yellow monkey flower, *Mimulus guttatus*. *Heredity*, **50**, 283-293.
- Macnair MR, Baker JM (1994) Metal-Tolerant plant: An evolutionary perspectives. In: *Plants and the chemical elements, biochemistry, uptake, tolerance and toxicity* (ed. ME Farago), pp 68-83. VCH, New York.
- Mengoni A, Barabesi C, Gonelli C, Galardi F, Gabbrielli R, Bazzicalupo M (2001) Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **10**:1909-1916
- Meyer C-L, Vitalis R, Saumitou-Laprade P, Castric V (2009) Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal. Accepted in *Molecular Ecology*.
- Meyer C-L, Kostecka A A., Saumitou-Laprade P *et al.* Zn tolerance within and among populations of the pseudometallophyte plant *Arabidopsis halleri* and possible role of disruptive selection (submitted)
- Neale DB and Savolainen O (2004). Association genetics of complex traits in conifers. *Trends in plant science*, **9**: 325-330.
- Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D (2008) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, **18**: 375-402.
- Pauwels M, Saumitou-Laprade P, Holl C, Petit D, Bonin I (2005) Multiple origin of metallicolous populations of the pseudometallophyte *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) in central Europe: the cpDNA testimony. *Molecular Ecology*, **14**: 4403-4414.
- Pauwels M, Frérot H, Bonin I, Saumitou-Laprade P (2006) A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, **19**: 1838-1850.
- Pauwels M, Willems G, Roosens NCJ, Frérot H, Saumitou-Laprade P (2008) Merging methods in molecular and ecological genetics to study the adaptation of plants to anthropogenic metal-polluted sites : implication for phytoremediation. *Molecular Ecology*, **17**: 108-119.
- Pritchard,JK, Stephens M, Rosenberg NA *et al.* (2000) Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics*. **67**, 170–181.
- Rogers SM and Bernatchez L (2007) The genetic architecture of ecological speciation and the association with signature of selection in natural lake whitefish (*Coregonus* sp. Salmonidae) species pairs. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1423-1438.
- Roosens NCJ, Willems G, Godé C, Courseaux A, Saumitou-Laprade P (2008) The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position

- of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*, **306**: 105-116.
- Sackville Hamilton NR, Skot L, Chorlton KH, Thomas ID, Mizen S (2002) Molecular genecology of temperature response in *Lolium perenne*: 1. Preliminary analysis to reduce false positives. *Molecular Ecology*, **11**: 1855-1863.
- Schat H, Ten Bookum WM (1992) Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. *Heredity*, **68**, 219-229.
- Schat H, Vooijs R, Kuiper E (1996) Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*. *Evolution*, **50**: 1888-1895.
- Siegel S, Castellan NJ (1988) *Non parametric statistics for the behavioural sciences*. MacGraw-Hill, New York.
- Skøt L, Humphreys MO, Armstead I *et al.* (2005) An association mapping approach to identify flowering time genes in natural populations of *Lolium perenne* L. *Molecular Breeding*, **15**: 233-245.
- Smith SE, Macnair MR (1998) Hypostatic modifiers cause variation in degree of copper tolerance in *Mimulus guttatus*. *Heredity*, **80**: 760-768.
- Stincombe JR, Høekstra HE (2007) Combining population genomics and quantitative genetics: finding the gene underlying ecologically important traits. *Heredity*, **100**, 158-170
- Storey JD, Tibshirani R (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, **100**: 9440-9445.
- Talke IN, Hanikenne M, Krämer U (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, **142**, 148-167.
- Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler ES (2001) Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, **28**, 286-289.
- van Hoof NALM, Hassinen VH, Hakvoort HWJ *et al.* (2001) Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-Type Metallothionein gene. *Plant Physiology*, **126**:1519-1526.
- Vekemans X, Lefèbvre C (1997) On the evolution of heavy-metal tolerant populations in *Armeria maritima*: evidence from allozyme variation and reproductive barriers. *Journal of Evolutionary Biology*, **10**:175-191.
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, **11**: 139-151.
- Verhoeven KJF, Simonsen KL, McIntyre LM (2005) Implementing false discovery rate control: increasing our power. *Oikos*, **108**: 643-647.
- Via S, West J (2008) The genetic mosaic suggests a new role for hitchhiking in ecological speciation. *Molecular Ecology*, **17**: 4334-4345.

- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**: 4407-4414.
- Weber M, Trampczynska A, Clemens S (2006) Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺ hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ*, **29**: 950-963.
- Wilkins DA (1978) The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytologist*, **80**, 623-633.
- Willems G, Dräger DB, Courbot M, et al. (2007) The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): An analysis of quantitative trait loci. *Genetics*, **176**: 659-674.
- Wu L, Bradshaw AD, Thurman DA (1975) The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera*. *Heredity*, **34**: 165-187.
- Zhao K, Aranzana MJ, Kim S et al. (2007) An *Arabidopsis* example of association mapping in structured samples. *PLoS Genetics* 3(1): e4. doi:10.1371/journal.pgen.0030004
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH et al. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, **38**: 203-208.

CHAPITRE VI : Discussion générale et perspectives

Arabidopsis halleri est depuis quelques années une espèce modèle pour étudier la tolérance et l'hyperaccumulation des métaux lourds du fait de ses caractéristiques physiologiques et de sa proximité avec l'espèce modèle *A. thaliana*. La plupart des études sur cette espèce se sont placées à un niveau inter-spécifique et ont cherché les bases génétiques qui expliquent les grandes capacités de tolérance et d'accumulation de cette espèce (Becher *et al.* 2004; Weber 2006 ; Courbot *et al.* 2007 ; Willens *et al.* 2007 ; Hanikenne 2008). Parallèlement deux études se sont intéressées à **l'histoire évolutive des populations métalliques (M) et non métalliques (NM) d'*A. halleri*** (Pauwels *et al.* 2005 ; Pauwels *et al.* 2006). Ces études, qui ont montré une variabilité de la tolérance au Zn entre type édaphique et une origine indépendante des populations M, ainsi que celle de Bert *et al.* (2001) sur la variabilité de l'hyperaccumulation, ont suggéré que les populations M pourraient être le siège de **processus micro-évolutifs**. Dans cette thèse notre objectif a donc été d'essayer d'appréhender les processus évolutifs qui se déroulent dans les populations M d'*A. halleri* ainsi que leurs bases génétiques. Pour cela nous nous sommes placés à une échelle locale (sud de la Pologne et nord de la Slovaquie) et nous avons utilisé trois approches complémentaires : **la génomique des populations, l'expérimentation en milieu contrôlé et la génétique d'association**.

I. Processus micro-évolutifs dans les populations métalliques d'*Arabidopsis halleri*

I.1. Evolution de la tolérance au zinc

Dans ce travail nous avons voulu vérifier si à une échelle locale la différenciation entre type édaphique pour la tolérance au Zn était une réalité et quel était le degré de polymorphisme entre et au sein des populations. Par des tests à court terme en hydroponie, nous avons confirmé qu'en Pologne et en Slovaquie **les populations M montraient en moyenne une plus grande tolérance au Zn que les NM**. Ces résultats comme les précédents de Bert *et al.* (2000) et Pauwels *et al.* (2006) vont dans le sens d'une évolution de ce trait dû à la présence en grande quantité de Zn et suggèrent que les flux de gènes ne constituent pas une assez forte force d'opposition pour empêcher cette différenciation. L'évolution de la tolérance dans les

milieux métallifères chez une espèce constitutivement tolérante peut paraître remarquable parce qu'elle indique que, malgré un niveau élevé de tolérance de tous les individus, la présence de métaux lourds à de fortes concentrations peut constituer une force de sélection. Ce caractère n'est cependant pas propre à *A. halleri* puisqu'il a également été observé chez l'espèce pseudométallophyte *T. caerulescens* (Meerts & Van Isacker 1997) et chez la métallophyte stricte *A. bertolonii* (Galardi *et al.* 2007).

Deux observations dans notre travail vont dans le sens d'une **évolution de ce trait sous l'action de la sélection naturelle**. Tout d'abord, les populations M montrent un polymorphisme pour la tolérance au Zn plus faible que les populations NM. Ceci est un attendu théorique pour un trait adaptatif. En effet dans un environnement donné sous l'effet de la sélection directionnelle la variance du trait diminue (voir encadré 1 de l'introduction, p4). D'autre part, la différenciation génétique à ce trait est plus grande que celle à des marqueurs moléculaire neutres, ce qui est considéré comme une trace de sélection disruptive. La tolérance au Zn semble donc être dans les populations M échantillonnées un trait sous sélection.

Nous avons également montré que la tolérance au Zn est un caractère polymorphe au sein des types édaphiques et au sein des populations avec certains individus M et NM présentant le même degré de tolérance. Cette variabilité importante peut être expliquée par deux scénarios évolutifs différents qui ont en commun une **faible sélection contre les phénotypes intermédiaires** (suggéré par la grande variabilité au sein des populations M) et **un coût à une «sur» tolérance faible ou inexistant** (suggéré par la présence d'individus plus tolérants au sein des populations NM). La faible sélection contre les phénotypes intermédiaires, qui implique qu'un certain nombre de génotypes puissent coloniser les sites métallifères, pourrait expliquer l'absence d'effet de fondation observée dans les populations M par Pauwels *et al.* (2005) à l'aide de marqueurs chloroplastiques. Le premier scénario possible explique la tolérance plus importante des populations M par la **sélection sur la variabilité présente dans les populations NM**. Cette variabilité peut être maintenue dans les populations NM par l'effet de mutations récurrentes, de la dérive génétique et des flux de gènes (Barett & Schluter 2007). Le niveau de polymorphisme dans les populations M est alors expliqué par l'interaction entre la sélection et les flux de gènes. La sélection par rapport au flux de gènes n'est pas assez importante pour amener à une forte réduction de la variabilité. Dans le deuxième scénario

évolutif la colonisation des sites M se fait grâce à de nouveaux variants apparus dans les populations NM. Les **flux de gènes des populations M vers les populations NM** expliquant la variabilité de la tolérance au Zn pour ces dernières. La variabilité des populations M serait expliquée comme dans le scénario 1 par l'interaction entre la sélection et les flux de gènes. Les **flux de gènes** ont une place importante dans ces deux scénarios ce qui est en accord avec le fait que dans notre étude les populations NM les moins tolérantes sont les plus distantes des populations M, et que d'autre part la population NMp (NM dans une région industrielle très proche de population M) montre pour la tolérance au Zn un comportement proche des populations M.

Le fait que la **population NMp** échantillonnée dans notre étude ait un niveau de **tolérance au Zn proche de celle des populations M** est en accord avec les résultats de Pauwels *et al.* (2006). En effet, ils ont montré qu'à l'échelle de l'Europe ces populations avaient un niveau de tolérance intermédiaire entre les populations NM et M. Deux histoires évolutives peuvent expliquer les phénotypes observés dans ces populations. D'une part les populations NMp pourraient avoir été fondées par les populations M proches géographiquement. Le possible coût à une « sur » tolérance n'étant pas assez fort, le niveau de tolérance resterait important dans ces populations. D'autre part il est également possible que le phénotype de ces populations soit expliqué par des flux de gènes très importants des populations M vers les populations NMp proches. Le cas des populations NMp est intéressant parce qu'il pourrait s'agir d'un cas de **mal adaptation dû à la migration**. L'étude de l'histoire, de la structure génétique et de la distribution des traits dans un réseau de population avec plusieurs NMp nous permettrait de mieux comprendre le comportement de ces populations.

I.2. L'adaptation locale aux sites métallifères

L'adaptation locale peut prendre place, dans un milieu hétérogène, quand il y a une interaction génotype x environnement pour la fitness et elle est favorisée principalement par une pression de sélection importante et des flux de gènes limités (Kawecki & Ebert 2004). Dans notre système d'étude nous n'avons pas pu montrer de sélection forte (ni dans le génome, ni sur le trait de la tolérance au Zn) et nous ne pouvons pas exclure que les flux de gènes soient importants entre les populations. Cependant nous avons pu montrer plusieurs observations qui vont dans le sens d'une **adaptation locale des populations M à leur environnement**.

D'une part nous avons montré comme cela a été présenté précédemment, que l'augmentation de la **tolérance au Zn** dans les populations M était probablement un **trait adaptatif** puisque la différenciation génétique à ce trait est plus importante que la différenciation neutre. De plus ce trait présente apparemment une faible sélection contre les génotypes intermédiaires ce qui peut être favorable à l'adaptation locale. En effet, si la sélection est faible contre les génotypes intermédiaires, un plus grand nombre de génotypes peut se développer dans les sites métallifères et l'augmentation en fréquence des allèles adaptatifs est donc plus probable (Kawecki 1995 ; Day 2000 ; Kisdi 2002). Un deuxième argument vient du fait que nous avons pu identifier par criblage génomique des **parties du génome potentiellement sous sélection** dans les populations M. Si ces locus ne sont pas des faux positifs (dus à des événements démographiques ou à une mauvaise adéquation avec le modèle d'analyse voir Beaumont & Nichols 1996) il existe alors effectivement une adaptation locale dans les populations sur site métallifère.

Enfin un dernier point qui est en faveur de l'adaptation locale dans les populations M étudiées est le fait que toutes ces populations se trouvent dans des milieux à faible compétitivité où elles forment de grandes populations (la diversité spécifique étant très faible à cause de la contamination par les métaux). L'expansion rapide des populations dans ces milieux peut assurer une diversité importante et donc un potentiel pour l'évolution des populations.

Il semble donc que les populations métallicoles d'*A. halleri* soient bien le siège de processus adaptatifs. Cependant **ces processus apparaissent de bien moindre ampleur** que chez *T. caerulescens*, l'autre espèce pseudométallophyte modèle pour étudier la tolérance et l'hyperaccumulation des métaux. En effet Meerts & Van Isacker (1997) ont montré, à l'aide d'indices de tolérance estimés sur sol, que les populations NM pouvaient être jusqu'à trois fois moins tolérantes que les M tandis que Assunção *et al.* (2001) par un test séquentiel en hydroponie ont montré une tolérance jusqu'à 20 fois moins importante chez certaines populations NM. La différence entre *A. halleri* et *T. caerulescens* peut provenir du fait que chez cette dernière les flux de gènes semblent réduits (Koch *et al.* 1998 ; Dubois *et al.* 2003 ; Jiménez-Ambriz *et al.* 2007).

II. Les bases génétiques impliquées dans l'évolution des populations métallicoles.

Les bases génétiques impliquées dans l'évolution des populations métallicoles ont été recherchées par une approche de génomique des populations ainsi que par une approche de génétique d'association en populations naturelles. L'intérêt d'utiliser ces deux méthodes de manière complémentaire vient du fait que la première est de type ouverte, c'est-à-dire sans *a priori* sur le trait adaptatif, alors que le deuxième est de type fermée puisqu'elle focalise sur un trait en particulier. Nous avons pu identifier d'une part **13 locus candidats pour l'adaptation aux sites métallifères** et d'autre part **4 locus potentiellement impliqués dans la variabilité de la tolérance au Zn**. Si les locus AFLP candidats ne co-localisent pas au même endroit, ce que laisse supposer le séquençage de quatre d'entre eux, le processus évolutif dans les populations M impliquerait alors **plusieurs gènes** et pourrait donc être qualifié de complexe. Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents qui ont proposé un déterminisme de la variabilité de la tolérance aux métaux entre individus dit « tolérants » par plusieurs gènes modificateurs (Macnair 1993 ; Schat *et al.*1993 ; Smith & Macnair 1998). Nous avons pu observer que parmi les locus candidats un était commun aux deux approches. Ce résultat suggère que l'adaptation aux sites métallifères passe par des mécanismes impliqués dans l'augmentation de la tolérance au Zn ce qui est en accord avec le fait que ce trait apparaisse sous sélection disruptive.

Le séquençage de quatre des locus candidats pour l'adaptation aux sites métallifères a permis de définir quatre potentiels gènes candidats qui sont localisés sur les groupes de liaison 1, 2 et 8 d'*A. halleri*. Aucun de ces candidats ne co-localise avec les QTL de la tolérance constitutive au Zn ou au Cd. Cependant comme notre analyse n'est pas exhaustive nous ne pouvons pas faire de conclusion sur le lien entre la tolérance constitutive et la variabilité observée au sein de l'espèce. Trois des quatre potentiels gènes candidats ont une fonction dans le transport d'ions ce qui peut laisser penser que **l'homéostasie des métaux a une grande place dans l'adaptation aux sites métallifères**. Le quatrième potentiel gène candidat pour l'adaptation aux sites métallifères apporte plusieurs hypothèses intéressantes sur l'évolution des populations métallicoles. Il fait partie de la famille des protéines de stress universelle (USP family) ce qui laisse penser que d'une part **d'autres mécanismes que la tolérance aux métaux** peuvent être impliqués dans l'adaptation aux sites métallifères. Cela a été proposé par de nombreux auteurs au vue de la complexité des sites métallifères et du nombre important de

changements environnementaux observés dans ces milieux (voir synthèse de Ernst 2005). Il a par exemple été suggéré que la carence en nutriment. (Bradshaw *et al.* 1960), la sécheresse (Wierzbicka & Panufnick 1998 ; Wierzbicka & Pielichowska 2004), l'hétérogénéité de l'habitat (Dechamps *et al.* 2007) et l'ouverture du milieu (Jiménez-Ambriz *et al.* 2007) peuvent être des pressions de sélection dans ces milieux. D'autre part l'identification d'une protéine de stress universelle suggère que cette adaptation ne fait pas intervenir que des mécanismes de prévention, comme cela a souvent été décrit par exemple pour la tolérance aux métaux (Hall 2002), mais également des **mécanismes de protection** des structures cellulaires.

Enfin le fait que les parties du génome potentiellement sous sélection ne soient pas les mêmes dans toutes les populations M pose la question de **l'échelle de l'adaptation**. Est-ce que la réponse adaptative mobilise les mêmes mécanismes dans toutes les populations ou est ce qu'il s'agit de mécanisme différents (évolution parallèle *vs.* évolution convergente) ? Est ce que la réponse adaptative est conduite par une même pression de sélection dans toutes les populations M ou par des pressions de sélection différentes ? Nos résultats ne permettent pas pour l'instant de répondre à ces questions mais suggèrent une **évolution complexe dans les milieux métallifères impliquant des locus différents soit du fait d'une évolution convergente soit du fait de pressions de sélections différentes.**

III. Vers une meilleure compréhension des processus évolutifs dans les populations métallicoles

Les résultats de ce travail suggèrent que les populations métallicoles polonaises et slovaques d'*A. halleri* sont le siège de processus micro-évolutifs amenant à une augmentation de la tolérance au Zn des individus et influençant probablement également d'autres traits. Il est maintenant important de **confirmer que les locus et les gènes candidats définis sont bien impliqués dans l'adaptation** aux habitats métallifères. Cette confirmation est nécessaire à cause des limites des méthodes statistiques utilisées.

Le criblage génomique a pour principale limite le nombre de faux positifs dû à des événements non-sélectifs comme les erreurs de type I ou la dérive (Luikart *et al.* 2003). Pour limiter ce biais nous avons utilisé des **réplicats** (deux populations métallicoles et deux

populations non métalliques), en se basant sur le principe qu'un vrai positif est identifié dans plusieurs comparaisons; les événements non sélectifs ayant une très faible probabilité d'être observé plusieurs fois indépendamment (Bonin *et al.* 2006 ; Nosil *et al.* 2009). Nous avons également utilisé **plusieurs méthodes statistiques** assumant des scénarios évolutifs différents pour éliminer les locus montrant un comportement divergent à cause de données simulées peu réalistes (Bonin *et al.* 2006). Cette approche conservative nous a donné une **bonne confiance** dans le fait que les locus candidats soient sous sélection dans les habitats métallifères mais elle ne permet pas totalement d'exclure le fait qu'il **existe des faux positifs** parmi ces locus. Nous devons également confirmer que les locus identifiés par génétique d'association sont impliqués dans la variabilité de la tolérance au Zn. En effet, malgré l'analyse au sein des populations, ces locus pourraient être liés à la structuration ou simplement montrer une association par le fait du hasard. Dans un premier temps il serait intéressant d'augmenter la taille de l'échantillon pour avoir une meilleure puissance statistique dans l'analyse au sein des populations. Nous pourrions ainsi regarder si ces locus sont bien significatifs dans plusieurs populations.

Pour confirmer que les locus candidats sont liés à l'adaptation aux sites métallifères plusieurs approches sont maintenant possibles : (1) analyser la variabilité de leurs séquences en population pour confirmer la sélection sur ces locus, (2) développer une approche QTL avec des parents présentant des niveaux de tolérance différents pour voir s'il y a co-localisation avec les locus candidats, (3) réaliser une validation fonctionnelle de ces gènes.

D'autre part, plusieurs questions ont été soulevées dans ce travail qui semblent maintenant incontournables pour avoir une meilleure compréhension des processus évolutifs dans les populations métalliques :

- Quelles sont les pressions de sélection dans les milieux métalliques ?

L'identification de locus sous sélection spécifique à des populations M a suggéré l'existence de **pressions de sélection différentes** dans ces populations. Même si les milieux métalliques ont souvent été décrits par leur concentration en métaux lourds, ils sont reconnus comme étant des milieux complexes, pouvant différer les uns des autres (Ernst 2005). Les populations M connues d'*A. halleri* se trouvent sur ou à côté de sites métallurgiques, sur ou à côté de terrils

ou dans d'anciennes zones minières (Pauwels *et al.* 2005 ; Pauwels *et al.* 2006 ; Chapitre II et IV). Ces sites peuvent donc entre autre différer pour leurs teneurs en eau, en nutriments ou par la forme de pollution présente. Il serait donc très intéressant de caractériser d'un point de vue écologique les sites de notre étude pour regarder si d'autres contraintes environnementales peuvent être potentiellement des pressions de sélection. La réponse des populations M et NM à ces changements environnementaux pourrait être testée en conditions contrôlées pour rechercher si d'autres traits que la tolérance au Zn sont différenciés entre types édaphiques.

- Quelle est l'échelle de l'adaptation ?

La mise en évidence de locus sous sélection spécifique à certaines populations et l'hypothèse de pression de sélection différente dans les milieux métallifères posent la question du grain de l'environnement : **Est-ce que l'adaptation se fait à l'échelle d'une population, d'un ensemble de populations ou d'une région géographique ?** Pour apporter des éléments de réponse à cette question il serait intéressant d'utiliser le même type d'approche que celles de cette étude mais sur des populations d'autres régions géographiques. Le nord de l'Italie, où des populations M et NM sont proches géographiquement, constituent une région intéressante pour répondre à cette problématique. Une hypothèse alternative à l'existence de pressions de sélections différentes entre sites M, est l'évolution convergente des populations M. Classiquement il est considéré que l'évolution d'un trait au sein d'une espèce implique des bases génétiques identiques puisque cette évolution se fait à partir d'un background génétique proche (Simpson 1952 dans Arendt & Reznick 2007). Cependant plusieurs résultats récents ont montrés que des populations pouvaient mobiliser des ressources génétiques différentes en réponse à une même contrainte écologique (Calboli *et al.* 2003 ; Høekstra *et al.* 2006 ; Protas *et al.* 2006). Ce type d'évolution peut prendre place dans le cas de traits pouvant être influencés par un grand nombre de gène. L'adaptation aux sites métallifère s'inscrit dans ce cas, puisque un grand nombre de gènes peuvent interagir et influencer l'homéostasie des métaux. Le travail sur les locus candidats (validation, identification de leur fonction) pourra nous apporter une réponse sur l'évolution convergente ou parallèle dans les populations M échantillonnées.

- Est-ce qu'il est possible de confirmer l'adaptation locale dans les populations métallocoles?

Le moyen le plus direct pour démontrer l'adaptation locale est l'utilisation de **transplantations réciproques** qui ont l'avantage d'intégrer l'influence de tous les facteurs environnementaux. Ainsi si une population a une meilleure fitness dans son propre environnement par rapport aux autres sites où elle a été transplantée, on considère qu'il y a adaptation locale pour cette population (Kawecki & Ebert 2004). Cependant il s'agit d'un protocole lourd (choix et réplification des sites, estimation de la fitness) dont les résultats ne sont pas toujours interprétables à cause d'effets non génétiques (Kawecki & Ebert 2004). L'environnement maternel ou la présence de parasites dans certains sites peuvent par exemple influencer la réponse des plantes. Dans le cas d'*A. halleri* des problèmes d'herbivorie sur terrain dégagé empêchant le développement des plantes ont été observés dans une expérience préliminaire de transplantation réciproque (Alicja Kostecka, communication personnelle). Cependant pour confirmer l'adaptation locale des populations métallocoles d'*A. halleri* cette étape semble incontournable.

IV. Références

- Assunção AGL, Ten Bookum WM, Nelissen HJM, Vooijs R, Schat H, Ernst WHO (2003) Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist*, **159**, 411-419
- Arendt J, Reznick D (2007) Convergence and parallelism reconsidered: what have we learned about the genetics of adaptation? *Science* **23**: 26-32
- Barrett RDH, Schluter D (2007) Adaptation from standing variation. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 38-34.
- Beaumont MA, Nichols A (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London*, **263**, 1619-1626.
- Becher M, Talke IN, Krall L, Kramer U (2004) Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Journal*, **37**, 251-268.
- Bert V, Macnair MR, De Laguerie P, Saumitou-Laprade P, Petit D (2000) Zinc tolerance and accumulation in metalicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*, **146**, 225-233.

- Bert V, Bonin I, Saumitou-Laprade P, de Laguerie P, Petit D (2002) Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist*, **155**, 47-57.
- Calboli FCF, Gilchrist GW, Partridge L (2003) Different cell size and cell number contribution in two newly established and one ancient body size cline of *Drosophila subobscura*. *Evolution*, **57**, 566-573.
- Courbot M, Willems G, Motte P *et al.* (2007) A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4*, a gene encoding a heavy metal ATPases. *Plant Physiol*, **144**, 1052-1065.
- Day T (2000) Competition and the effect of spatial resource heterogeneity on evolutionary diversification. *American Naturalist*, **155**, 790–803.
- Dechamps C, Lefèbvre C, Noret N, Meerts P (2007) Reaction norms of life history traits in response to zinc in *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites. *New Phytologist*, **173**, 191-198.
- Dubois S, Cheptou PO, Petit C, Meerts P, Poncelet M, Vekemans X, Lefebvre C, Escarré J (2003) Genetic structure and mating systems of metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, **157**, 633–641.
- Ernst WHO (2005) Phytoextraction of mine wastes – Options and impossibilities. *Chemie der Erde Geochemistry*, **65**, 29-42
- Galardi F, Corrales I, Mengoni A *et al* (2007) Intra-specific differences in nickel tolerance and accumulation in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *Environmental and Experimental Botany*, **60**, 377-384
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1-11.
- Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, *et al.* (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*. *Nature*, **453**, 391-395.
- Hoekstra HE, Hirschmann RJ, Bunday RA, Insel PA, Crossland JP .2006. A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. *Science* **313**: 101-104.
- Jiménez-Ambriz G, Petit C, Bourrié I, Dubois S, Olivieri S, Ronce O (2007) Life history variation in the heavy metal tolerant plant *Thlaspi caerulescens* growing in a network of contaminated and noncontaminated sites in southern France: role of gene flow, selection and phenotypic plasticity. *New Phytologist*, **173**, 199-215.
- Kawecki TJ (1995) Demography of source-sink populations and the evolution of ecological niches. *Evolutionary Ecology*, **9**, 38–44.
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues on local adaptation. *Ecological Letters*, **7**, 1225-1241.
- Kisdi E (2002) Dispersal: risk spreading versus local adaptation. *American Naturalist*, **159**, 579–596.
- Koch M, Mummenhoff K, Hurka H (1998) Systematics and evolutionary history of heavy metal tolerant *Thlaspi caerulescens*. Western Europe:evidence from genetic studies based on isozyme analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**, 823–838.
- Macnair MR (1993) The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist*, Transley review **49**, 541-559

- Meerts P, Van Isacker N (1997) Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecology*, **133**, 221-231.
- Pauwels M, Saumitou-Laprade P, Holl C, Petit D, Bonin I (2005) Multiple origin of metallicolous populations of the pseudometallophyte *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) in central Europe: the cpDNA testimony. *Molecular Ecology*, **14**, 4403-4414.
- Pauwels M, Frérot H, Bonin I, Saumitou-Laprade P (2006) A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 1838-1850.
- Protas ME, Hersey C, Kochanek D *et al.* (2006) Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nature Genetics*, **38**, 107-111.
- Schat H, Kuiper E, Ten Bookum WM, Vooijs R (1993) A general model for the genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*: evidence from crosses between plants from different tolerant populations. *Heredity*, **70**, 142-147.
- Smith SE, Macnair MR (1998) Hypostatic modifiers cause variation in degree of copper tolerance in *Mimulus guttatus*. *Heredity*, **80**, 760-768.
- Weber M, Trampczynska A, Clemens S (2006) Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺ hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ*, **29**, 950-963.
- Wierzbicka M, Panufnik D (1998) The adaptation of *Silene vulgaris* to growth on a calamine waste heap (S. Poland). *Environmental Pollution*, **101**, 415-426.
- Wierzbicka M, Pielichowska M (2004) Adaptation of *Biscutella laevigata* L., a metal hyperaccumulator, to growth on a zinc-lead waste heap in southern Poland: I: Differences between waste-heap and mountain populations. *Chemosphere*, **54**, 1663-1674.
- Willems G, Dräger DB, Courbot M, *et al.* (2007) The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): An analysis of quantitative trait loci. *Genetics*, **176**, 659-674.

ANNEXES

ANNEXE 1

CONTRIBUTION DES AUTEURS A CHAQUE ARTICLE DU MANUSCRIT

Article 1 : Genomic pattern of adaptive divergence in <i>Arabidopsis halleri</i> , a model species for tolerance to heavy metal (2009) <u>C-L Meyer</u> , R Vitalis, P Saumitou-Laprade, V Castric	
Design expérimental	<u>CLM</u> , PSL, VC
Expérimentation	<u>CLM</u>
Outils d'analyse	RV
Analyse	<u>CLM</u>
Ecriture	<u>CLM</u>
Contribution de : VC, RV, PSL	

Article 2 : Zinc tolerance within and among populations of the pseudometallophyte plant <i>Arabidopsis halleri</i> and possible role of divergent selection (submitted) <u>C-L Meyer</u> , A.A Kostecka, P Saumitou-Laprade, A Créach, V Castric, M Pauwels, H Frérot	
Design expérimental	<u>CLM</u> , AK, HF, AC, PSL
Expérimentation	<u>CLM</u> , AK
Analyse	<u>CLM</u>
Ecriture	<u>CLM</u>
Contribution de : HF, AK, AC, PSL, MP, VC	

Article 3 : Association genetics to explore the genetic basis of quantitative zinc tolerance in natural populations of <i>Arabidopsis halleri</i> (in prep) <u>C-L Meyer</u> , A.A Kostecka, P Saumitou-Laprade, V Castric	
Design expérimental	<u>CLM</u>
Expérimentation	<u>CLM</u> , AK
Analyse	<u>CLM</u>
Ecriture	<u>CLM</u>
Contribution de : VC	

Chapitre 3: Caractérisation des parties du génome identifiées comme potentiellement sous sélection dans les populations métallicoles d' <i>Arabidopsis halleri</i> – premier résultats sur 5 marqueurs <u>C-L Meyer</u> , P Saumitou-Laprade, V Castric	
Design expérimental	<u>CLM</u> , PSL
Expérimentation	<u>CLM</u> avec l'aide technique de Cécile Godé
Analyse	<u>CLM</u>
Ecriture	<u>CLM</u>
Contribution de : VC	

ANNEXE 2 : Matériel supplémentaire de l'article 1 (Chapitre II) pX

Table S1 Summary statistics of the 820 AFLP markers. Allelic frequencies were estimated using AFLP-SURV (Vekemans *et al.* 2002; available at <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html>). *n.e* indicates that the statistic was not calculated by Dfdist or DETSEL (when allelic frequency > 0.99).

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
0	0.343	0.782	0.160	0.444	0.3698	0.6813	0.02	0.2709	0.1873	0.2751	0.0756	0.5964	0.0198	0.1305	0.0865	0.1634							
1	0.625	0.782	0.480	0.481	0.5627	0.5689	0.3184	0.2813	0.7804	0.6611	0.5552	0.5632	0.3239	0.3532	0.9181	0.7269							
2	0.031	0.000	0.160	0.111	0.5089	0.6367	0.4946	0.2958	0.7923	0.9223	0.0362	0.0126	0.1459	0.0276	0.1805	0.019							
3	0.406	0.000	0.320	0.592	0.6616	0.5403	0.2039	0.0274	0.2329	0.0983	0.5116	0.4835	0.0887	0.0112	0.3395	0.0028							
4	0.531	0.565	0.400	0.333	0.6298	0.4562	0.6984	0.4825	0.765	0.918	0.5116	0.3744	0.595	0.4783	0.566	0.8165							
5	0.343	0.478	0.240	0.407	0.6619	0.8357	0.5757	0.832	0.5155	0.6959	0.3809	0.4568	0.1721	0.5276	0.3964	0.4347							
6	0.250	0.391	0.240	0.222	> 0.9999	0.9688	0.6518	0.6341	> 0.9999	0.7478	0.5905	0.7115	0.3041	0.1072	0.7406	0.3093							
7	0.000	0.217	0.000	0.000	<i>n.e</i>	<i>n.e</i>	0.197	0.1867	<i>n.e</i>	<10 ⁻⁴	<i>n.e</i>	<i>n.e</i>	0.1113	0.0386	<i>n.e</i>	0.1605							
8	0.406	0.304	0.440	0.333	0.9251	0.7508	0.7231	0.9316	0.6187	0.8306	0.7696	0.5784	0.4342	0.782	0.3258	0.0848							
9	0.968	0.956	0.840	0.925	0.1952	0.6718	0.5161	0.9453	0.5678	0.8832	0.3182	0.5151	0.2982	0.6896	0.4847	0.5189							
10	0.500	0.695	0.440	0.444	0.7035	0.759	0.4679	0.4484	0.8763	0.5774	0.7218	0.7115	0.3528	0.4494	0.9181	0.5808							
11	0.312	0.434	0.240	0.407	0.7893	0.7567	0.6594	0.8656	0.5155	0.7658	0.0736	0.1673	0.2091	0.8348	0.3964	0.4347							
12	0.250	0.000	0.480	0.296	0.3568	0.8528	0.0785	0.2286	0.4208	0.3668	0.1372	0.5964	0.03	0.0768	0.3007	0.0713							
13	0.531	0.739	0.600	0.407	0.7738	0.6818	0.6333	0.3159	0.4509	0.5572	0.7696	0.5784	0.8008	0.1726	0.2621	0.5808							
14	0.062	0.217	0.160	0.074	0.6653	0.9264	0.9595	0.6565	0.6087	0.6211	0.0378	0.5964	0.5396	0.0348	0.2081	0.032							
15	0.968	1.000	0.960	0.925	> 0.9999	0.6718	0.6499	0.4094	0.9786	0.8066	0.7696	0.5151	0.6299	0.4856	0.6598	0.1835							
16	0.968	1.000	0.960	0.962	> 0.9999	0.8464	0.6499	0.6284	> 0.9999	0.8066	0.7696	0.8057	0.6299	0.5566	0.7406	0.1835							
17	1.000	0.826	0.960	0.888	0.2866	0.0622	0.4874	0.8633	0.5794	0.0779	0.1569	0.2782	0.2266	0.7109	0.5025	0.0978							
18	0.093	0.347	0.240	0.148	0.4967	0.8223	0.8062	0.2742	0.6734	0.484	0.0604	0.1402	0.0656	0.193	0.4321	0.179							
19	0.593	0.217	0.560	0.629	0.8924	0.8452	0.3531	0.2366	0.7439	0.38	0.5905	0.7512	0.084	0.0599	0.8601	0.0983							
20	0.531	0.391	0.360	0.074	0.465	0.0646	0.9854	0.2211	0.1361	0.776	0.2984	0.0035	0.8463	0.018	0.0695	0.6813							
21	0.437	0.260	0.520	0.444	0.6664	0.9065	0.4864	0.5955	0.7095	0.6727	0.255	0.8638	0.1759	0.2342	0.566	0.2075							
22	0.218	0.260	0.440	0.185	0.5314	0.9472	0.6122	0.8983	0.2468	0.977	0.1372	0.2486	0.2548	0.0872	0.0936	0.667							
23	0.281	0.173	0.160	0.259	0.6922	0.9488	> 0.9999	0.8161	0.6741	0.9086	0.0948	0.6816	0.8463	0.2236	0.3442	0.2161							
24	0.875	0.826	0.880	0.888	> 0.9999	> 0.9999	0.9915	0.8633	> 0.9999	0.9157	0.8206	0.6816	0.8008	0.7109	0.7406	0.8535							
25	0.812	0.521	0.840	0.777	> 0.9999	0.9631	0.2933	0.3681	0.7715	0.394	0.8206	0.8638	0.317	0.4215	0.8601	0.2708							

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD			
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	M1-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2
26	0.031	0.130	0.120	0.148	0.6127	0.5403	> 0.9999	> 0.9999	> 0.9999	> 0.9999	0.7257	0.0087	0.8008	0.4934	0.6598	0.0031
27	0.187	0.608	0.160	0.185	> 0.9999	0.1545	0.8857	0.9786	0.1653	> 0.9999	0.2262	0.8638	0.0448	0.0451	0.6188	0.0542
28	0.125	0.391	0.400	0.370	0.1184	0.1627	0.5354	0.5581	0.9786	0.8356	0.2555	0.4402	0.7346	0.8348	0.7406	0.3571
29	0.125	0.304	0.520	0.481	0.0588	0.1783	0.4862	0.4683	0.5581	0.8399	0.6383	0.0244	0.2548	0.5767	0.7406	0.0848
30	0.875	0.739	0.520	0.518	0.0898	0.1253	0.8883	0.7774	0.4683	0.8897	0.6145	0.1315	0.5165	0.4423	0.9181	0.6559
31	0.970	0.925	0.878	0.862	0.2821	0.3046	0.8883	0.7774	0.933	0.933	0.7735	0.4036	0.3949	0.6896	0.8601	0.6146
32	0.588	0.037	0.303	0.448	0.2741	0.5411	0.3412	0.1238	0.1238	0.5036	0.0718	0.2178	0.0672	0.0211	0.5025	0.0087
33	0.058	0.037	0.000	0.034	0.3942	0.9017	0.415	> 0.9999	<10 ⁻⁴	0.9229	0.9229	0.0323	0.1	0.0948	0.4935	0.2161
34	0.970	0.629	0.848	0.862	0.1952	0.3046	0.3979	0.3456	0.9801	0.9801	0.1307	0.3182	0.408	0.3977	0.9181	0.2367
35	1.000	0.851	0.696	0.758	0.0116	0.0082	0.5275	0.6875	0.7806	0.7806	0.1521	0.063	0.5848	0.6524	0.9181	0.4537
36	0.323	0.037	0.060	0.206	0.2002	0.6631	0.9376	0.5464	0.3723	0.3723	0.3828	0.0038	0.2847	0.0332	0.1054	0.037
37	0.029	0.481	0.030	0.034	0.8942	0.9035	0.0656	0.0844	0.8846	0.8846	0.137	0.6643	0.0118	0.0132	0.6188	0.0235
38	0.588	0.444	0.303	0.413	0.2741	0.5345	0.6526	0.8656	0.6051	0.6051	0.6678	0.2178	0.5476	0.8348	0.6032	0.6813
39	0.529	0.629	0.121	0.379	0.0357	0.6835	0.0745	0.4	0.1076	0.1076	0.723	0.0471	0.3857	0.2716	0.6374	0.8535
40	0.941	0.962	0.757	0.827	0.1683	0.4126	0.2596	0.4218	0.6385	0.6385	> 0.9999	0.2589	0.3105	0.3924	0.9181	0.6813
41	0.500	0.851	0.696	0.551	0.4222	0.8299	0.5275	0.2397	0.4373	0.4373	0.2958	0.4309	0.5848	0.2859	0.5427	0.3507
42	0.764	0.296	0.848	0.827	0.6335	0.7655	0.1048	0.1377	0.9486	0.9486	0.2685	0.6387	0.0257	0.0214	0.9181	0.1083
43	0.764	0.185	0.606	0.586	0.4239	0.4375	0.1634	0.2932	0.7924	0.7924	0.0711	0.6387	0.0754	0.0577	0.9181	0.0162
44	0.941	0.925	0.969	0.965	> 0.9999	> 0.9999	0.7211	0.7764	0.9051	0.9051	0.9564	0.3809	0.5784	0.5666	0.8601	0.8535
45	0.088	0.111	0.181	0.344	0.5931	0.3104	0.7781	0.3737	0.3447	0.3447	0.9563	0.1183	0.0551	0.372	0.1969	0.1957
46	0.588	0.555	0.636	0.724	0.7931	0.6058	0.7969	0.5687	0.6346	0.6346	0.8257	0.6643	0.8057	0.6082	0.5543	0.7628
47	0.352	0.407	0.515	0.275	0.4418	0.7328	0.7308	0.7206	0.3352	0.3352	0.9004	0.3472	0.5784	0.3821	0.2035	0.5189
48	0.382	0.407	0.575	0.344	0.4848	0.8066	0.6006	0.8569	0.3712	0.3712	0.8701	0.4405	0.7115	0.5276	0.4259	0.8165
49	0.441	0.000	0.000	0.241	0.0094	0.5642	n.e	0.1585	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.0613	0.0009	n.e	0.0867	0.0945	0.0283
50	0.382	0.296	0.060	0.275	0.1008	0.6857	0.3912	> 0.9999	0.2338	0.2338	0.8046	0.0108	0.0442	0.8348	0.0891	0.6813
51	0.264	0.185	0.090	0.137	0.4135	0.6198	0.7652	0.8525	0.7629	0.7629	0.8518	0.0306	0.066	0.5666	0.4602	0.474
52	0.147	0.814	0.606	0.379	0.0358	0.3082	0.4327	0.145	0.4254	0.4254	0.0439	0.0206	0.0733	0.4695	0.2104	0.0084
53	0.352	0.037	0.515	0.172	0.4418	0.4898	0.1189	0.6263	0.0812	0.0812	0.3375	0.3472	0.0709	0.0337	0.0354	0.0349
54	0.882	0.111	0.575	0.655	0.097	0.2768	0.1257	0.0449	0.7103	0.7103	0.0114	0.1445	0.2907	0.413	0.8149	0.1625
55	0.794	0.185	0.848	0.862	0.8043	0.6821	n.e	0.0083	0.9801	0.9801	0.0606	0.8206	n.e	0.0071	0.9181	0.0229
56	0.529	0.629	0.636	0.620	0.6037	0.6545	0.8944	0.8933	0.8401	0.8401	0.723	0.7696	0.8962	0.8947	0.9181	0.8535
57	0.294	0.333	0.121	0.103	0.433	0.4417	0.3984	0.4519	0.9174	0.9174	0.9023	0.0966	0.4656	0.0217	0.566	0.5189
58	0.411	0.222	0.333	0.103	0.6616	0.2227	0.727	0.6695	0.2139	0.2139	0.6857	0.5116	0.2703	0.0634	0.282	0.1417
59	0.176	0.259	0.424	0.137	0.3911	0.8282	0.6489	0.6876	0.1774	0.1774	0.8218	0.0796	0.0703	0.1064	0.0626	0.2301
60	0.823	0.962	0.939	0.896	0.4024	0.6702	> 0.9999	0.6858	0.74	0.74	0.4379	0.2711	0.7115	0.5767	0.6598	0.4091

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
59	0.176	0.259	0.424	0.137	0.3911	0.8282	0.6489	0.6876	0.1774	0.8218	0.0796	0.0703	0.2548	0.1064	0.0626	0.2301	0.2711	0.7115	0.7136	0.5767	0.6598	0.4091	0.4091
60	0.823	0.962	0.939	0.896	0.4024	0.6702	>0.9999	0.6858	0.74	0.4379	0.2711	0.7115	0.7136	0.5767	0.6598	0.4091	0.2711	0.7115	0.7136	0.5767	0.6598	0.4091	0.4091
61	0.176	0.259	0.121	0.034	0.8189	0.4538	0.6413	0.3768	0.5581	0.8218	0.1743	0.0075	0.0977	0.0343	0.0733	0.2301	0.1743	0.0075	0.0977	0.0343	0.0733	0.2301	0.2301
62	0.794	0.814	0.606	0.448	0.334	0.1756	0.4327	0.2117	0.4587	0.9713	0.3955	0.1299	0.4695	0.253	0.4847	0.8977	0.3955	0.1299	0.4695	0.253	0.4847	0.8977	0.8977
63	0.000	0.037	0.242	0.068	0.1062	<10 ⁻⁴	0.4371	0.9364	0.3056	<10 ⁻⁴	0.073	0.0897	0.0617	0.0316	0.0927	0.0815	0.073	0.0897	0.0617	0.0316	0.0927	0.0815	0.0815
64	0.000	0.555	0.000	0.103	n.e	<10 ⁻⁴	0.0119	0.1013	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	n.e	0.1487	0.011	0.0093	0.0419	0.0419	n.e	0.1487	0.011	0.0093	0.0419	0.0419	
65	0.500	0.444	0.636	0.689	0.5627	0.4654	0.5269	0.3908	0.7736	0.8336	0.614	0.4935	0.5318	0.4636	0.8601	0.7858	0.614	0.4935	0.5318	0.4636	0.8601	0.7858	
66	0.676	0.444	0.333	0.551	0.1637	0.6666	0.6915	0.7075	0.3292	0.5085	0.1618	0.7115	0.5396	0.6896	0.3907	0.4488	0.1618	0.7115	0.5396	0.6896	0.3907	0.4488	
67	0.147	0.185	0.636	0.344	0.0193	0.2414	0.2264	0.6284	0.185	0.8819	0.0103	0.0757	0.0701	0.1405	0.2856	0.1957	0.0103	0.0757	0.0701	0.1405	0.2856	0.1957	
68	0.411	0.296	0.666	0.482	0.3387	0.7622	0.2853	0.5651	0.362	0.7658	0.2377	0.4568	0.1141	0.2342	0.364	0.474	0.2377	0.4568	0.1141	0.2342	0.364	0.474	
69	1.000	1.000	0.939	0.965	0.1017	0.2414	0.562	0.7092	>0.9999	n.e	0.3669	0.4402	0.4634	0.5566	0.6837	n.e	0.3669	0.4402	0.4634	0.5566	0.6837	n.e	
70	0.911	0.962	0.818	1.000	0.4854	0.2501	0.4062	0.4369	0.0437	0.8385	0.614	0.1794	0.4031	0.5467	0.0527	0.474	0.614	0.1794	0.4031	0.5467	0.0527	0.474	
71	0.294	0.148	0.363	0.137	0.7174	0.4466	0.5076	>0.9999	0.2111	0.7403	0.5711	0.0543	0.16	0.8348	0.0831	0.09	0.5711	0.0543	0.16	0.8348	0.0831	0.09	
72	0.470	0.481	0.363	0.379	0.6561	0.6993	0.6817	0.7416	0.8998	0.8624	0.5116	0.5784	0.595	0.6226	0.8601	0.8165	0.5116	0.5784	0.595	0.6226	0.8601	0.8165	
73	0.088	0.037	0.212	0.000	0.5084	0.3294	0.5026	0.4111	0.0969	0.8128	0.0604	0.0174	0.0532	0.0442	0.1331	0.0328	0.0604	0.0174	0.0532	0.0442	0.1331	0.0328	
74	0.911	0.962	0.818	1.000	0.4854	0.2501	0.4062	0.4369	0.0437	0.8385	0.614	0.1794	0.4031	0.5467	0.0527	0.474	0.614	0.1794	0.4031	0.5467	0.0527	0.474	
75	0.406	0.269	0.333	0.310	0.6619	0.7567	0.9625	0.9581	0.9051	0.742	0.2105	0.5784	0.1672	0.4934	0.7406	0.513	0.2105	0.5784	0.1672	0.4934	0.7406	0.513	
76	0.000	0.307	0.095	0.206	0.3199	<10 ⁻⁴	0.4791	0.8385	0.5187	0.0177	0.0066	0.1221	0.0332	0.2176	0.2202	0.0578	0.0066	0.1221	0.0332	0.2176	0.2202	0.0578	
77	0.156	0.615	0.047	0.241	0.5587	0.7418	0.0531	0.3138	0.3056	0.1848	0.0118	0.2316	0.006	0.0549	0.0891	0.0632	0.0118	0.2316	0.006	0.0549	0.0891	0.0632	
78	0.343	0.192	0.714	0.482	0.1623	0.5412	0.0684	0.549	0.345	0.7081	0.1343	0.4094	0.0202	0.108	0.364	0.1417	0.1343	0.4094	0.0202	0.108	0.364	0.1417	
79	0.906	0.923	0.904	0.965	>0.9999	0.6849	>0.9999	0.8656	0.6133	>0.9999	0.6643	0.3744	0.7346	0.5666	0.5322	0.7628	0.6643	0.3744	0.7346	0.5666	0.5322	0.7628	
80	0.906	0.307	0.857	0.793	0.8294	0.4729	0.0881	0.1648	0.8317	0.0804	0.7696	0.4935	0.0318	0.8601	0.0862	0.0862	0.7696	0.4935	0.0318	0.8601	0.0862	0.0862	
81	0.187	0.692	0.761	0.482	0.0096	0.3854	0.8523	0.4906	0.1692	0.0886	0.0096	0.086	0.7346	0.1695	0.0601	0.0601	0.0096	0.086	0.7346	0.1695	0.0601	0.0601	
82	0.125	0.461	0.190	0.344	0.8189	0.3106	0.562	0.635	0.4751	0.3877	0.0254	0.0505	0.0925	0.2382	0.0353	0.0353	0.0254	0.0505	0.0925	0.2382	0.0353	0.0353	
83	0.000	0.115	0.047	0.000	0.3942	n.e	0.8378	0.2958	0.3846	0.3259	0.0134	n.e	0.0684	0.0532	0.2968	0.1513	0.0134	n.e	0.0684	0.0532	0.2968	0.1513	
84	0.031	0.115	0.285	0.103	0.1997	0.6068	0.6217	>0.9999	0.3498	0.7257	0.0615	0.0434	0.0777	0.5276	0.0909	0.032	0.0615	0.0434	0.0777	0.5276	0.0909	0.032	
85	0.125	0.038	0.095	0.000	>0.9999	0.2752	0.7887	0.4111	0.298	0.7622	0.0736	0.0045	0.0013	0.0084	0.0078	0.0078	0.0736	0.0045	0.0013	0.0084	0.0078	0.0078	
86	0.218	0.115	0.238	0.310	>0.9999	0.8138	0.6989	0.4476	0.8126	0.7591	0.255	0.4094	0.0644	0.5566	0.0662	0.0662	0.255	0.4094	0.0644	0.5566	0.0662	0.0662	
87	0.031	0.230	0.047	0.068	>0.9999	0.7311	0.5144	0.5627	>0.9999	0.5175	0.0254	0.0582	0.0442	0.0267	0.0293	0.0293	0.0254	0.0582	0.0442	0.0267	0.0293	0.0293	
88	0.218	0.076	0.666	0.517	0.0387	0.3828	0.0282	0.1257	0.5248	0.6571	0.0335	0.1034	0.0153	0.0409	0.0287	0.0287	0.0335	0.1034	0.0153	0.0409	0.0287	0.0287	
89	0.125	0.076	0.238	0.137	0.6282	0.9439	0.6025	0.8404	0.6569	0.8692	0.1183	0.8057	0.0209	0.0316	0.0074	0.0074	0.1183	0.8057	0.0209	0.0316	0.0074	0.0074	
90	0.718	0.192	0.904	0.758	0.2591	0.8218	0.008	0.0285	0.3493	0.0779	0.3738	0.8638	0.0053	0.022	0.2684	0.0407	0.3738	0.8638	0.0053	0.022	0.2684	0.0407	
91	0.343	0.538	0.142	0.206	0.2866	0.5718	0.1745	0.226	0.7955	0.6288	0.0966	0.1516	0.0266	0.05	0.1948	0.6146	0.0966	0.1516	0.0266	0.05	0.1948	0.6146	

Locus	Allelic Frequencies						p-values from Dfdist						p-values from DetselD					
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	M1-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-M2	NM1-NM2	
92	0.187	0.038	0.047	0.034	0.4681	0.4538	>0.9999	>0.9999	>0.9999	0.6211	0.0301	0.0075	0.1672	0.5276	0.1805	0.0187		
93	0.906	0.346	0.809	0.551	0.5714	0.1094	0.1966	0.4599	0.2152	0.1277	0.614	0.1311	0.2526	0.5767	0.2057	0.1684		
94	0.281	0.000	0.095	0.137	0.433	0.5526	0.3533	0.2525	0.9271	0.3121	0.2035	0.0709	0.0113	0.098	0.1948	0.0629		
95	0.000	0.076	0.000	0.000	n.e	n.e	0.767	0.3475	n.e	0.368	n.e	n.e	0.002	0.0235	n.e	0.0994		
96	0.093	0.269	0.095	0.103	>0.9999	0.9372	0.6	0.592	>0.9999	0.612	0.6643	0.8057	0.0772	0.2434	0.8601	0.0384		
97	0.843	0.730	0.619	0.655	0.2916	0.3986	0.7451	0.7933	0.842	0.6975	0.2844	0.4323	0.8463	0.8947	0.8601	0.7269		
98	1.000	0.884	1.000	1.000	n.e	n.e	0.2841	0.1461	n.e	0.1241	n.e	n.e	0.0796	0.3406	n.e	0.4638		
99	0.468	0.538	0.285	0.241	0.4763	0.5073	0.4784	0.3806	>0.9999	0.8549	0.1762	0.0751	0.2075	0.093	0.6837	0.8535		
100	0.125	0.115	0.142	0.000	>0.9999	0.2752	>0.9999	0.2958	<10 ⁻⁴	>0.9999	0.255	0.0045	0.1672	0.0532	0.1767	0.7628		
101	0.281	0.230	0.619	0.241	0.2133	0.869	0.4024	>0.9999	0.2454	0.9136	0.1004	0.2486	0.1134	0.782	0.0232	0.6813		
102	0.176	0.428	0.212	0.344	0.8324	0.3845	0.5128	0.7173	0.5356	0.5263	0.5711	0.1231	0.1721	0.6226	0.3964	0.091		
103	0.558	0.535	0.060	0.206	0.0138	0.273	0.1219	0.317	0.3723	0.9016	0.0009	0.0335	0.0162	0.05	0.1054	0.8977		
104	0.147	0.321	0.030	0.241	0.5089	0.7161	0.2826	0.7877	0.1703	0.525	0.0162	0.1402	0.0191	0.5666	0.1141	0.0956		
105	0.411	0.000	0.303	0.137	0.6423	0.285	0.1211	0.2525	0.3603	0.137	0.3809	0.0226	0.0909	0.0622	0.2277	0.0157		
106	0.058	0.000	0.303	0.517	0.2505	0.0659	0.1211	0.0286	0.375	0.4223	0.0429	0.0168	0.0909	0.0156	0.3964	0.0336		
107	0.500	0.071	0.060	0.206	0.0379	0.4075	0.9376	0.6565	0.3723	0.2544	0.0005	0.0458	0.6598	0.0552	0.1054	0.0117		
108	1.000	0.785	0.787	0.862	0.0385	0.0468	0.9714	0.716	0.6228	0.0711	0.126	0.3139	0.8962	0.7109	0.7771	0.325		
109	0.970	0.750	0.818	0.965	0.1468	0.9237	0.7496	0.1962	0.1744	0.2488	0.2668	0.8057	0.8962	0.2157	0.2227	0.333		
110	0.000	0.500	0.000	0.000	n.e	n.e	n.e	<10 ⁻⁴	n.e	<10 ⁻⁴	n.e	n.e	n.e	0.0075	n.e	0.0488		
111	0.264	0.071	0.303	0.551	0.8378	0.3457	0.4503	0.0953	0.3008	0.5813	0.7696	0.1276	0.0522	0.0409	0.3395	0.0192		
112	0.000	0.000	0.000	0.068	n.e	<10 ⁻⁴	n.e	0.3475	<10 ⁻⁴	n.e	n.e	0.0897	n.e	0.0778	0.3744	n.e		
113	0.147	0.071	0.333	0.137	0.2182	0.9387	0.3912	0.8404	0.1865	0.7746	0.0743	0.6816	0.0718	0.123	0.4762	0.0414		
114	0.117	0.071	0.515	0.344	0.043	0.3106	0.1513	0.3158	0.3637	0.8558	0.1138	0.4402	0.0399	0.0475	0.5322	0.1147		
115	0.852	0.857	0.848	1.000	0.9532	0.1534	0.9915	0.0687	0.0993	0.9948	0.8206	0.1624	0.8962	0.266	0.1575	0.8977		
116	0.264	0.000	0.090	0.206	0.4135	0.9305	0.3533	0.1867	0.5178	0.3668	0.0306	0.5784	0.1148	0.056	0.3349	0.0629		
117	0.323	0.035	0.363	0.275	0.7966	0.8549	0.2605	0.322	0.6706	0.3828	0.7696	0.2486	0.0617	0.0073	0.5906	0.037		
118	0.764	0.642	0.787	0.689	0.9349	0.7026	0.5608	0.8312	0.5925	0.6975	0.8206	0.8638	0.6773	0.8947	0.9181	0.7448		
119	0.617	0.285	0.424	0.310	0.4106	0.2821	0.6828	>0.9999	0.5929	0.4425	0.2711	0.0777	0.5748	0.7443	0.5906	0.1224		
120	0.000	0.321	0.030	0.000	<10 ⁻⁴	n.e	0.2826	0.108	>0.9999	0.0177	0.1881	n.e	0.0191	0.0242	0.4386	0.0654		
121	0.970	0.892	0.636	0.689	0.0295	0.0615	0.2954	0.3809	0.7736	0.6009	0.0681	0.092	0.317	0.4088	0.8601	0.5588		
122	0.058	0.642	0.000	0.068	0.3942	0.9263	<10 ⁻⁴	0.0331	<10 ⁻⁴	0.0768	0.0323	0.5964	0.0056	0.0057	0.3744	0.0133		
123	1.000	1.000	0.939	1.000	0.1017	n.e	0.4681	n.e	0.2958	n.e	0.3669	n.e	0.4634	n.e	0.4526	n.e		
124	0.294	0.142	0.272	0.137	0.8893	0.4466	0.6893	>0.9999	0.4469	0.5728	0.7218	0.0543	0.0815	0.8348	0.241	0.09		

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
125	0.382	0.142	0.151	0.000	0.3101	0.0703	0.9488	0.2525	0.1744	0.5256	0.0966	0.0011	0.7346	0.0532	0.2559	0.0591							
126	0.500	0.642	0.484	0.517	0.7901	0.8251	0.6361	0.6641	0.6837	0.6858	0.8206	0.7512	0.6165	0.6375	0.8601	0.7102							
127	0.352	0.035	0.121	0.068	0.1418	0.1976	0.6908	0.9364	0.7488	0.3375	0.4121	0.0105	0.0209	0.123	0.4321	0.0349							
128	0.000	0.035	0.151	0.137	0.209	<10 ⁻⁴	0.6102	0.7141	0.9191	<10 ⁻⁴	0.093	0.1487	0.013	0.0339	0.7771	0.0815							
129	0.382	0.035	0.424	0.310	0.7334	0.7301	0.0979	0.2718	0.5929	0.2537	0.7696	0.5784	0.0235	0.0506	0.5906	0.0349							
130	0.647	0.892	0.818	0.862	0.3775	0.318	0.7512	0.9609	0.8148	0.4057	0.4612	0.3345	0.7653	0.782	0.7406	0.3145							
131	1.000	0.892	0.969	0.965	0.2709	0.2414	0.5338	0.5252	0.9051	0.2098	0.5402	0.4402	0.4399	0.4783	0.8601	0.4638							
132	0.088	0.857	0.575	0.172	0.0176	0.7084	0.2829	0.0088	0.0367	0.0147	0.0084	0.0582	0.2157	0.0038	0.0139	0.1239							
133	0.529	0.071	0.575	0.137	0.7666	0.0746	0.0496	0.8404	0.0313	0.1856	0.6643	0.1254	0.0018	0.123	0.0814	0.0229							
134	0.000	0.357	0.000	0.034	n.e	<10 ⁻⁴	0.0175	0.2286	<10 ⁻⁴	0.0257	n.e	0.092	0.0348	0.0184	0.4935	0.075							
135	0.117	0.035	0.060	0.068	0.784	0.8014	0.9137	0.9364	0.9076	0.7257	0.0985	0.1	0.0308	0.123	0.6188	0.0088							
136	0.970	1.000	0.939	0.965	0.7319	0.9237	0.4681	0.7092	>0.9999	0.8852	0.4735	0.8057	0.4634	0.372	0.6837	0.6054							
137	0.529	0.392	0.727	0.551	0.3576	0.8214	0.383	0.5748	0.3973	0.7466	0.3536	0.7512	0.257	0.5012	0.354	0.5014							
138	0.441	0.107	0.000	0.034	0.0094	0.0767	<10 ⁻⁴	0.6779	<10 ⁻⁴	0.385	0.0009	0.002	0.1308	0.0137	0.4935	0.0121							
139	0.294	0.178	0.090	0.206	0.3384	0.8138	0.7649	0.9583	0.5178	0.8852	0.0248	0.3188	0.066	0.4934	0.3349	0.1147							
140	1.000	0.857	0.878	1.000	0.1323	n.e	0.949	0.0687	0.1005	0.1521	0.2891	n.e	0.8463	0.266	0.259	0.4537							
141	0.911	0.642	0.848	0.827	0.6353	0.612	0.4435	0.4637	0.9486	0.3347	0.614	0.6153	0.4695	0.5968	0.9181	0.3357							
142	0.558	0.428	0.484	0.206	0.7576	0.273	0.8308	0.4872	0.3195	0.7413	0.7218	0.0335	0.7653	0.1344	0.0659	0.6813							
143	0.000	0.642	0.303	0.275	0.0623	0.0016	0.3601	0.3387	0.8789	<10 ⁻⁴	0.0121	0.0399	0.1234	0.0729	0.7771	0.0271							
144	0.264	0.250	0.060	0.172	0.3164	0.7856	0.5026	0.7782	0.4709	0.9801	0.0132	0.1473	0.0196	0.2176	0.1558	0.7628							
145	0.705	0.357	0.606	0.862	0.6275	0.4443	0.3869	0.1088	0.1852	0.3419	0.6387	0.5042	0.2982	0.1697	0.0848	0.3538							
146	1.000	0.892	0.696	0.931	0.0116	0.1832	0.4327	0.8856	0.1333	0.2098	0.063	0.2864	0.4457	0.5276	0.0486	0.4638							
147	0.909	0.769	0.615	0.666	0.097	0.2089	0.6142	0.7423	0.8148	0.5531	0.1521	0.1502	0.6953	0.8947	0.8601	0.5808							
148	0.090	0.538	0.192	0.259	0.5931	0.4619	0.219	0.4122	0.851	0.2238	0.0743	0.0318	0.0573	0.102	0.6032	0.0398							
149	0.757	0.653	0.615	0.444	0.5315	0.2255	0.8944	0.4936	0.4587	0.7484	0.6387	0.2627	0.8463	0.5094	0.4847	0.8977							
150	0.515	0.384	0.423	0.259	0.6664	0.428	0.7825	0.7228	0.5751	0.806	0.2105	0.0912	0.7653	0.2176	0.3007	0.6813							
151	0.454	0.338	0.500	0.703	0.7427	0.3555	0.9327	0.5339	0.3929	0.7745	0.7696	0.2822	0.8463	0.6082	0.3691	0.5189							
152	0.909	1.000	0.923	1.000	>0.9999	0.3239	0.246	n.e	0.1036	0.4717	0.5905	0.143	0.3943	n.e	0.1152	0.3971							
153	0.909	0.692	0.730	0.629	0.2725	0.1621	0.9721	0.8357	0.6346	0.403	0.308	0.2046	0.8962	0.8348	0.7771	0.4302							
154	0.909	0.730	0.692	0.555	0.2234	0.1094	0.9721	0.5358	0.5939	0.4718	0.2628	0.1311	0.8962	0.6375	0.7771	0.4957							
155	0.878	0.730	0.653	0.629	0.2243	0.2499	0.8511	0.7341	0.842	0.5807	0.3352	0.2907	0.8962	0.7109	0.7406	0.6559							
156	0.696	0.346	0.500	0.518	0.3893	0.4729	0.6487	0.5817	0.8399	0.3419	0.3292	0.5632	0.4342	0.5767	0.8601	0.3538							
157	0.060	0.192	0.269	0.296	0.3182	0.2958	0.905	0.8846	>0.9999	0.6211	0.0329	0.0472	0.0397	0.2236	0.8149	0.0362							

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD									
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2
158	0.393	0.769	0.576	0.555	0.5156	0.5253	0.5157	0.45	0.8196	0.3059	0.4405	0.5502	0.6057	0.5183	0.7406	0.1736	0.4405	0.5502	0.6057	0.5183	0.7406	0.1736
159	0.424	0.461	0.500	0.518	0.6998	0.719	0.8513	0.7898	0.8399	0.9271	0.255	0.5964	0.7346	0.7443	0.8601	0.8535	0.255	0.5964	0.7346	0.7443	0.8601	0.8535
160	0.181	0.153	0.192	0.074	>0.9999	0.6126	0.9536	0.7312	0.4915	0.9617	0.6643	0.0306	0.1672	0.0834	0.2012	0.3197	0.6643	0.0306	0.1672	0.0834	0.2012	0.3197
161	0.484	0.730	0.692	0.703	0.4024	0.4451	0.9721	>0.9999	0.9568	0.4733	0.4309	0.4935	0.8962	0.8947	0.9181	0.3745	0.4309	0.4935	0.8962	0.8947	0.9181	0.3745
162	0.545	0.538	0.346	0.259	0.4342	0.3684	0.5338	0.4122	0.7006	0.918	0.2984	0.0659	0.5476	0.102	0.5906	0.8977	0.2984	0.0659	0.5476	0.102	0.5906	0.8977
163	0.969	0.807	0.846	0.629	0.2824	0.0329	0.9591	0.5047	0.2273	0.3419	0.3182	0.0975	0.8463	0.5968	0.1825	0.4587	0.3182	0.0975	0.8463	0.5968	0.1825	0.4587
164	0.939	1.000	0.923	1.000	0.9264	0.4964	0.246	ne	0.1036	0.6246	0.7696	0.2703	0.3943	ne	0.1152	0.2648	0.7696	0.2703	0.3943	ne	0.1152	0.2648
165	0.090	0.500	0.269	0.407	0.4061	0.1	0.5189	0.7893	0.6205	0.2879	0.0571	0.0556	0.2075	0.6226	0.4602	0.0218	0.0571	0.0556	0.2075	0.6226	0.4602	0.0218
166	1.000	0.961	0.884	0.962	0.052	0.2378	0.5933	>0.9999	0.4434	0.3163	0.035	0.4745	0.5748	0.8348	0.4259	0.5889	0.035	0.4745	0.5748	0.8348	0.4259	0.5889
167	0.939	1.000	0.807	0.962	0.2946	>0.9999	0.1417	0.7092	0.1744	0.6246	0.2377	0.5784	0.3309	0.5566	0.2227	0.2648	0.2377	0.5784	0.3309	0.5566	0.2227	0.2648
168	0.303	0.307	0.538	0.666	0.3469	0.262	0.5354	0.2948	0.558	>0.9999	0.2129	0.3512	0.2422	0.1395	0.8149	0.8165	0.2129	0.3512	0.2422	0.1395	0.8149	0.8165
169	1.000	0.961	0.923	0.925	0.1125	0.0968	0.9908	0.9878	>0.9999	0.3163	0.1138	0.3456	0.4342	0.6896	0.7406	0.5889	0.1138	0.3456	0.4342	0.6896	0.7406	0.5889
170	1.000	1.000	0.961	1.000	0.2322	ne	0.5343	ne	0.3447	ne	0.1569	ne	0.214	ne	0.282	ne	0.1569	ne	0.214	ne	0.282	ne
171	0.323	0.000	0.000	0.206	0.0457	0.6631	ne	0.1867	<10 ⁻⁴	0.2616	0.0026	0.1473	ne	0.056	0.2128	0.0395	0.0026	0.1473	ne	0.056	0.2128	0.0395
172	0.323	0.000	0.093	0.068	0.2742	0.2892	0.6549	0.7573	0.9087	0.2616	0.0248	0.0145	0.1148	0.0778	0.5906	0.0395	0.0248	0.0145	0.1148	0.0778	0.5906	0.0395
173	0.264	0.037	0.000	0.172	0.0809	0.7856	0.415	0.6263	<10 ⁻⁴	0.4903	0.0072	0.1473	0.0948	0.0337	0.2128	0.0424	0.0072	0.1473	0.0948	0.0337	0.2128	0.0424
174	0.735	0.666	0.718	0.344	0.8763	0.1534	0.8455	0.3028	0.0935	0.8288	0.8206	0.1892	0.8962	0.3365	0.1265	0.8977	0.8206	0.1892	0.8962	0.3365	0.1265	0.8977
175	0.705	0.814	0.718	0.724	0.8679	0.869	0.706	0.7452	0.9316	0.7103	0.8206	0.8638	0.8962	0.8947	0.9181	0.8977	0.8206	0.8638	0.8962	0.8947	0.9181	0.8977
176	0.294	0.888	0.187	0.551	0.8246	0.4268	0.0102	0.2036	0.0812	0.0316	0.1762	0.1458	0.0095	0.2505	0.0319	0.0569	0.1762	0.1458	0.0095	0.2505	0.0319	0.0569
177	0.000	0.592	0.000	0.034	ne	<10 ⁻⁴	ne	0.0477	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	ne	0.092	ne	0.002	0.4935	0.0298	ne	0.092	ne	0.002	0.4935	0.0298
178	0.235	0.259	0.343	0.620	0.6412	0.3239	0.8034	0.3225	0.2133	0.977	0.2287	0.0721	0.4342	0.0906	0.3395	0.8535	0.2287	0.0721	0.4342	0.0906	0.3395	0.8535
179	0.441	0.185	0.406	0.172	0.8267	0.3854	0.5128	>0.9999	0.2728	0.5942	0.7218	0.034	0.1469	0.8348	0.0936	0.0733	0.7218	0.034	0.1469	0.8348	0.0936	0.0733
180	0.176	0.185	0.468	0.172	0.4377	0.9416	0.562	>0.9999	0.2958	0.9617	0.0705	0.8638	0.1026	0.8348	0.0496	0.8165	0.0705	0.8638	0.1026	0.8348	0.0496	0.8165
181	0.882	0.888	0.937	0.965	0.7564	0.5403	0.8529	0.5405	>0.9999	0.9615	0.5116	0.3239	0.6598	0.4783	0.6837	0.8977	0.5116	0.3239	0.6598	0.4783	0.6837	0.8977
182	0.558	0.074	0.281	0.172	0.2851	0.163	0.4692	0.7476	0.6513	0.106	0.084	0.0106	0.0522	0.0379	0.4321	0.0196	0.084	0.0106	0.0522	0.0379	0.4321	0.0196
183	0.029	0.074	0.000	0.206	>0.9999	0.344	0.3533	0.6565	<10 ⁻⁴	0.7909	0.0069	0.0455	0.0806	0.0552	0.2128	0.028	0.0069	0.0455	0.0806	0.0552	0.2128	0.028
184	0.764	1.000	0.687	0.586	0.6889	0.4375	0.0691	0.0254	0.5703	0.2051	0.8206	0.5042	0.166	0.0783	0.2879	0.2879	0.8206	0.5042	0.166	0.0783	0.2879	0.2879
185	0.852	0.185	0.968	0.931	0.3228	0.6046	ne	0.0006	0.8356	0.0237	0.2178	0.4168	ne	0.0008	0.0123	0.0123	0.2178	0.4168	ne	0.0008	0.0123	0.0123
186	0.029	0.407	0.093	0.034	0.5779	0.9035	0.1544	0.1527	0.7053	0.2258	0.0529	0.5964	0.0506	0.2012	0.0515	0.0515	0.0529	0.5964	0.0506	0.2012	0.0515	0.0515
187	0.823	1.000	0.656	0.931	0.3834	0.4654	0.0533	0.5198	0.0666	0.2058	0.4612	0.4245	0.1544	0.4856	0.2835	0.2835	0.4612	0.4245	0.1544	0.4856	0.2835	0.2835
188	0.205	0.148	0.187	0.310	0.9396	0.7181	0.8711	0.502	0.7904	0.8905	0.7218	0.2316	0.7136	0.1143	0.474	0.474	0.7218	0.2316	0.7136	0.1143	0.474	0.474
189	0.088	0.296	0.281	0.068	0.3544	0.9264	>0.9999	0.4258	0.2361	0.5813	0.0571	0.5784	0.8463	0.0434	0.0918	0.5889	0.0571	0.5784	0.8463	0.0434	0.0918	0.5889
190	0.529	0.518	0.531	0.413	0.8478	0.6818	0.9327	0.7893	0.6192	0.9331	0.8206	0.5784	0.8962	0.6226	0.6837	0.8977	0.8206	0.5784	0.8962	0.6226	0.6837	0.8977

Locus	Allelic Frequencies						p-values from Dfdist						p-values from DetsellD					
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	M1-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	M1-M2	NM1-NM2		
191	0.470	0.666	0.562	0.448	0.682	0.7966	0.6862	0.4757	0.5709	0.5892	0.7696	0.6816	0.8008	0.3108	0.6837	0.5808		
192	0.000	0.000	0.093	0.000	<10 ⁻⁴	n.e	0.6549	n.e	0.298	n.e	0.1553	n.e	0.1148	n.e	0.1886	n.e		
193	0.529	0.148	0.656	0.655	0.5545	0.612	0.0684	0.0431	0.8259	0.248	0.614	0.6153	0.0763	0.0316	0.9181	0.1283		
194	0.000	0.666	0.218	0.137	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.1303	0.0636	0.6569	<10 ⁻⁴	0.1301	0.1487	0.0423	0.0469	0.4321	0.0271		
195	0.911	0.851	0.500	0.586	0.0385	0.1119	0.2192	0.3387	0.7239	0.8165	0.0825	0.1051	0.2304	0.321	0.8149	0.7102		
196	0.970	0.925	0.781	0.896	0.0897	0.4562	0.4862	0.9883	0.4378	0.7735	0.2346	0.4482	0.4574	0.7443	0.5427	0.6146		
197	0.264	0.703	0.500	0.551	0.4024	0.3457	0.525	0.5539	0.7951	0.3837	0.1116	0.1276	0.5165	0.6375	0.8149	0.0967		
198	0.294	0.370	0.187	0.517	0.8246	0.441	0.5792	0.6914	0.0718	0.8171	0.1762	0.1775	0.1448	0.5012	0.0319	0.667		
199	0.558	0.148	0.468	0.275	0.7564	0.3684	0.2552	0.6952	0.4187	0.2854	0.7218	0.0912	0.1901	0.123	0.3007	0.0431		
200	0.617	0.703	0.531	0.482	0.6353	0.5689	0.5508	0.5033	0.7453	0.7672	0.7218	0.5632	0.6165	0.4423	0.7771	0.8535		
201	0.058	0.074	0.156	0.137	0.5424	0.6776	0.7649	0.8404	0.9191	0.9449	0.044	0.0508	0.0644	0.123	0.7771	0.1957		
202	0.088	0.185	0.187	0.344	0.5931	0.3104	>0.9999	0.6284	0.5907	0.7893	0.0743	0.0551	0.8962	0.1405	0.2382	0.0956		
203	0.617	0.000	0.250	0.068	0.2296	0.0254	0.3083	0.7573	0.3056	0.044	0.023	0.0015	0.1164	0.0778	0.0927	0.0091		
204	0.441	0.555	0.125	0.241	0.1479	0.5642	0.14	0.3826	0.5412	0.7468	0.0372	0.1131	0.0212	0.0845	0.2498	0.667		
205	0.617	0.111	0.562	0.758	0.8069	0.5402	0.1162	0.0164	0.3362	0.1349	0.5905	0.6582	0.1335	0.212	0.4081	0.3639		
206	0.029	0.296	0.093	0.206	0.5779	0.344	0.4868	0.8385	0.5178	0.3668	0.0529	0.0455	0.0332	0.2176	0.1927	0.0444		
207	0.117	0.851	0.593	0.379	0.0324	0.1627	0.3244	0.1088	0.4238	0.0243	0.0168	0.115	0.3647	0.0918	0.2621	0.1253		
208	0.941	0.925	0.875	0.724	0.571	0.196	0.854	0.3357	0.3486	0.9564	0.5258	0.309	0.6447	0.349	0.4081	0.8535		
209	0.029	0.148	0.187	0.310	0.3021	0.1871	0.8711	0.502	0.7904	0.6129	0.05	0.0381	0.7136	0.1143	0.3442	0.0238		
210	0.088	0.148	0.218	0.241	0.5084	0.5201	0.8081	0.7799	0.9369	0.8692	0.0604	0.0318	0.2847	0.1642	0.8149	0.1705		
211	0.823	0.962	0.750	0.724	0.6911	0.5919	0.2447	0.2084	0.9134	0.4379	0.8206	0.6582	0.3105	0.283	0.9181	0.4091		
212	0.058	0.148	0.218	0.103	0.3811	0.7907	0.8081	0.8452	0.5187	0.7622	0.0557	0.0817	0.2847	0.0872	0.2081	0.028		
213	0.117	0.111	0.250	0.448	0.5109	0.2	0.6217	0.2702	0.4872	0.9562	0.0743	0.0387	0.2029	0.0619	0.1677	0.7628		
214	0.764	0.851	0.343	0.344	0.0817	0.1155	0.1612	0.128	0.7945	0.741	0.1221	0.119	0.0676	0.1566	0.9181	0.7448		
215	0.529	0.777	0.562	0.655	0.7655	0.612	0.4739	0.6412	0.604	0.5089	0.6643	0.6153	0.6057	0.6708	0.8149	0.5248		
216	0.117	0.148	0.250	0.206	0.5109	0.7287	0.7363	0.8655	0.851	0.9622	0.0743	0.0817	0.1771	0.4283	0.6837	0.1957		
217	0.117	0.185	0.242	0.000	0.5376	0.2752	0.905	0.2201	0.0705	0.8743	0.1183	0.0045	0.1672	0.0386	0.1331	0.1705		
218	0.382	0.333	0.272	0.321	0.6636	0.8002	0.8842	0.9316	0.8132	0.8634	0.3809	0.2486	0.6598	0.8348	0.6598	0.7858		
219	0.558	0.444	0.515	0.285	0.7655	0.337	0.7289	0.6651	0.375	0.7487	0.5905	0.0912	0.7653	0.2176	0.2035	0.6813		
220	0.058	0.555	0.151	0.357	0.5424	0.211	0.096	0.491	0.1343	0.1667	0.0378	0.0235	0.0266	0.3821	0.2468	0.032		
221	0.852	0.740	0.787	0.571	0.6847	0.2082	0.8523	0.5834	0.3101	0.6905	0.6912	0.164	0.8962	0.5183	0.2717	0.7269		
222	0.323	0.592	0.484	0.250	0.4763	0.7596	0.6352	0.3541	0.279	0.4931	0.3472	0.5784	0.6165	0.0845	0.1033	0.5588		
223	0.352	0.370	0.454	0.285	0.6004	0.7328	0.7501	0.7642	0.4187	0.928	0.5711	0.5784	0.7136	0.2458	0.3007	0.8165		

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetsellD									
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
224	0.088	0.592	0.000	0.107	0.3199	0.9372	0.0094	0.0546	<10 ⁻⁴	0.1939	0.0226	0.5964	0.0074	0.0129	0.4199	0.0226	0.5964	0.0074	0.0129	0.4199	0.0226	0.5964
225	0.411	0.148	0.575	0.107	0.4976	0.2227	0.1411	0.9494	0.0172	0.4931	0.5258	0.2703	0.0503	0.0872	0.0032	0.5258	0.2703	0.0503	0.0872	0.0032	0.5258	0.2703
226	0.323	0.000	0.181	0.142	0.6375	0.2414	0.425	0.2525	0.7812	0.2616	0.1044	0.0406	0.1459	0.0622	0.3258	0.1044	0.0406	0.1459	0.0622	0.3258	0.1044	0.0406
227	0.411	0.037	0.212	0.035	0.5314	0.0543	0.5026	>0.9999	0.2599	0.1362	0.0749	0.0014	0.0532	0.8348	0.068	0.0749	0.0014	0.0532	0.8348	0.068	0.0749	0.0014
228	0.970	0.925	0.818	0.964	0.1468	0.9237	0.564	0.8656	0.1744	0.7735	0.2668	0.8057	0.5563	0.5666	0.2227	0.2668	0.8057	0.5563	0.5666	0.2227	0.2668	0.8057
229	0.117	0.148	0.454	0.392	0.1479	0.1217	0.2552	0.4151	0.6889	0.9622	0.1329	0.115	0.1733	0.0539	0.7771	0.1329	0.115	0.1733	0.0539	0.7771	0.1329	0.115
230	0.735	0.666	0.878	0.714	0.4184	0.8736	0.3709	0.8773	0.3459	0.8288	0.4502	0.8638	0.3688	0.8947	0.4081	0.4502	0.8638	0.3688	0.8947	0.4081	0.4502	0.8638
231	0.264	0.407	0.575	0.357	0.2519	0.759	0.6006	0.8979	0.3712	0.7195	0.1106	0.4094	0.5318	0.7109	0.4259	0.1106	0.4094	0.5318	0.7109	0.4259	0.1106	0.4094
232	0.529	0.296	0.272	0.392	0.3333	0.6459	0.9625	0.7616	0.6142	0.5474	0.084	0.4168	0.8008	0.4283	0.5025	0.084	0.4168	0.8008	0.4283	0.5025	0.084	0.4168
233	0.529	0.555	0.545	0.642	0.7655	0.6177	0.8582	0.7861	0.5842	0.9016	0.8206	0.8057	0.8962	0.7443	0.8149	0.8206	0.8057	0.8962	0.7443	0.8149	0.8206	0.8057
234	0.176	0.074	0.515	0.357	0.1298	0.3845	0.1193	0.2647	0.4405	0.7893	0.0459	0.1231	0.0399	0.0475	0.5906	0.0459	0.1231	0.0399	0.0475	0.5906	0.0459	0.1231
235	0.441	0.481	0.181	0.178	0.4636	0.4146	0.4681	0.4399	0.9255	0.8636	0.0422	0.0361	0.0876	0.0607	0.9181	0.0422	0.0361	0.0876	0.0607	0.9181	0.0422	0.0361
236	0.882	0.666	0.939	0.857	0.7564	0.9414	0.1922	0.4637	0.4587	0.4298	0.5116	0.7512	0.2483	0.4283	0.5118	0.5116	0.7512	0.2483	0.4283	0.5118	0.5116	0.7512
237	0.676	0.555	0.636	0.714	0.7991	0.8132	0.7969	0.5687	0.6223	0.7638	0.8206	0.8638	0.7653	0.6082	0.8601	0.8206	0.8638	0.7653	0.6082	0.8601	0.8206	0.8638
238	0.558	0.814	0.727	0.678	0.4761	0.6318	0.7497	0.6029	0.779	0.4625	0.4987	0.8057	0.8962	0.6524	0.9181	0.4987	0.8057	0.8962	0.6524	0.9181	0.4987	0.8057
239	0.470	0.740	0.636	0.464	0.535	0.8	0.7045	0.3157	0.4542	0.4616	0.4309	0.8638	0.6953	0.3324	0.364	0.4309	0.8638	0.6953	0.3324	0.364	0.4309	0.8638
240	0.558	0.074	0.060	0.214	0.0138	0.347	0.9353	0.6565	0.3723	0.106	0.0009	0.0248	0.2044	0.0552	0.1054	0.0009	0.0248	0.2044	0.0552	0.1054	0.0009	0.0248
241	0.117	0.555	0.121	0.214	0.9392	0.7108	0.14	0.2689	0.6586	0.2544	0.6643	0.0817	0.3344	0.05	0.3046	0.6643	0.0817	0.3344	0.05	0.3046	0.6643	0.0817
242	0.058	0.000	0.090	0.142	0.7753	0.6776	0.6549	0.2525	0.7629	0.4223	0.2287	0.0654	0.1148	0.0622	0.3442	0.2287	0.0654	0.1148	0.0622	0.3442	0.2287	0.0654
243	0.117	0.370	0.303	0.250	0.3818	0.6134	0.8113	0.7132	0.8126	0.4157	0.1967	0.0797	0.6598	0.2176	0.6837	0.1967	0.0797	0.6598	0.2176	0.6837	0.1967	0.0797
244	0.617	0.407	0.757	0.785	0.5286	0.4346	0.293	0.1962	0.9316	0.5842	0.6912	0.6582	0.1784	0.1542	0.9181	0.6912	0.6582	0.1784	0.1542	0.9181	0.6912	0.6582
245	0.352	0.185	0.000	0.000	0.034	0.0941	0.2276	0.2201	n.e	0.6734	0.003	0.0019	0.1113	0.0386	n.e	0.003	0.0019	0.1113	0.0386	n.e	0.003	0.0019
246	0.205	0.000	0.250	0.222	0.8616	0.9472	0.3083	0.1867	0.9595	0.4269	0.5711	0.8057	0.1164	0.0867	0.7771	0.5711	0.8057	0.1164	0.0867	0.7771	0.5711	0.8057
247	0.441	0.730	0.562	0.518	0.5968	0.719	0.5965	0.4683	0.7842	0.4706	0.5711	0.4568	0.6165	0.4423	0.7406	0.5711	0.4568	0.6165	0.4423	0.7406	0.5711	0.4568
248	0.794	0.000	0.312	0.148	0.0659	0.0081	0.2039	0.2525	0.223	0.0117	0.0803	0.0003	0.0887	0.098	0.241	0.0803	0.0003	0.0887	0.098	0.241	0.0803	0.0003
249	0.000	0.192	0.062	0.037	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.6615	0.5102	0.9076	0.2575	0.1781	0.092	0.0465	0.02	0.1238	0.1781	0.092	0.0465	0.02	0.1238	0.1781	0.092
250	0.088	0.423	0.093	0.185	0.9294	0.7065	0.1544	0.4527	0.6376	0.1939	0.7696	0.0797	0.0506	0.0851	0.2202	0.7696	0.0797	0.0506	0.0851	0.2202	0.7696	0.0797
251	0.588	0.269	0.625	0.370	0.7817	0.5075	0.3601	0.7642	0.2521	0.4634	0.6643	0.2591	0.1085	0.4283	0.2104	0.6643	0.2591	0.1085	0.4283	0.2104	0.6643	0.2591
252	0.617	0.769	0.656	0.703	0.7878	0.6821	0.6514	0.8495	0.7744	0.6611	0.8206	0.8057	0.6953	0.8947	0.8601	0.8206	0.8057	0.6953	0.8947	0.8601	0.8206	0.8057
253	0.147	0.115	0.062	0.481	0.6653	0.2276	0.8378	0.2249	0.0277	0.9578	0.025	0.0421	0.112	0.295	0.016	0.025	0.0421	0.112	0.295	0.016	0.025	0.0421
254	0.676	0.576	0.531	0.592	0.4854	0.6851	0.8239	0.8624	0.7404	0.7775	0.5552	0.7115	0.8463	0.782	0.8149	0.5552	0.7115	0.8463	0.782	0.8149	0.5552	0.7115
255	0.882	0.692	0.781	0.592	0.5145	0.1589	0.7497	0.7158	0.3486	0.5059	0.614	0.1978	0.8962	0.7109	0.354	0.614	0.1978	0.8962	0.7109	0.354	0.614	0.1978
256	0.823	0.384	0.750	0.555	0.6911	0.2713	0.2871	0.5748	0.3362	0.192	0.8206	0.2455	0.1389	0.5012	0.354	0.8206	0.2455	0.1389	0.5012	0.354	0.8206	0.2455

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD									
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2
257	0.117	0.038	0.312	0.185	0.3818	0.8244	0.3248	0.5102	0.6512	0.7622	0.1967	0.1402	0.0672	0.0214	0.4321	0.0287	0.1967	0.1402	0.0672	0.0214	0.4321	0.0287
258	0.500	0.269	0.312	0.222	0.4059	0.3174	0.8835	0.9715	0.6919	0.6033	0.3236	0.0605	0.3137	0.6226	0.5906	0.1983	0.3236	0.0605	0.3137	0.6226	0.5906	0.1983
259	0.088	0.346	0.437	0.592	0.085	0.0546	0.7321	0.3878	0.4886	0.484	0.0418	0.0157	0.7136	0.3575	0.5118	0.179	0.0418	0.0157	0.7136	0.3575	0.5118	0.179
260	0.294	0.615	0.375	0.444	0.741	0.6242	0.4107	0.5937	0.5673	0.446	0.5711	0.5151	0.2823	0.5094	0.6188	0.1477	0.5711	0.5151	0.2823	0.5094	0.6188	0.1477
261	0.058	0.538	0.531	0.814	0.0311	0.0004	0.9263	0.3017	0.1911	0.1667	0.0098	0.0003	0.8962	0.4088	0.173	0.032	0.0098	0.0003	0.8962	0.4088	0.173	0.032
262	0.294	1.000	0.687	0.555	0.1494	0.4268	n.e	0.0207	0.5784	0.0031	0.0705	0.1458	n.e	0.0516	0.7771	0.0507	0.0705	0.1458	n.e	0.0516	0.7771	0.0507
263	0.235	0.384	0.781	0.703	0.0103	0.0468	0.2173	0.2806	0.6501	0.7115	0.0098	0.0356	0.1589	0.2138	0.9181	0.3093	0.0098	0.0356	0.1589	0.2138	0.9181	0.3093
264	0.411	0.346	0.406	0.407	0.8875	0.7255	0.8723	0.8569	0.7075	0.8386	0.8206	0.8638	0.3137	0.4934	0.9181	0.3197	0.8206	0.8638	0.3137	0.4934	0.9181	0.3197
265	0.058	0.000	0.125	0.074	0.6517	0.9263	0.5709	0.3475	0.7629	0.7909	0.1183	0.1673	0.1148	0.0778	0.4321	0.0336	0.1183	0.1673	0.1148	0.0778	0.4321	0.0336
266	0.088	0.230	0.437	0.185	0.085	0.7065	0.6242	0.9545	0.3544	0.6672	0.0418	0.0797	0.2108	0.2458	0.0936	0.0384	0.0418	0.0797	0.2108	0.2458	0.0936	0.0384
267	0.205	0.307	0.125	0.444	0.7085	0.3844	0.5555	0.7054	0.1232	0.8486	0.0948	0.1068	0.0914	0.4283	0.024	0.2301	0.0948	0.1068	0.0914	0.4283	0.024	0.2301
268	0.000	0.461	0.156	0.074	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.3625	0.1493	0.6321	0.0274	0.093	0.0897	0.0652	0.0235	0.2081	0.0461	0.093	0.0897	0.0652	0.0235	0.2081	0.0461
269	0.882	0.846	0.687	0.629	0.2591	0.2372	0.5275	0.3802	0.7736	0.9552	0.3352	0.2907	0.5848	0.3977	0.9181	0.8535	0.3352	0.2907	0.5848	0.3977	0.9181	0.8535
270	0.176	0.269	0.437	0.555	0.3591	0.0746	0.6489	0.4619	0.5787	0.8518	0.0796	0.0591	0.2548	0.1591	0.6598	0.2301	0.0796	0.0591	0.2548	0.1591	0.6598	0.2301
271	0.882	0.538	0.812	0.592	0.6602	0.1589	0.3461	0.8459	0.2614	0.2815	0.7696	0.1978	0.4457	0.782	0.2717	0.2103	0.7696	0.1978	0.4457	0.782	0.2717	0.2103
272	0.058	0.692	0.093	0.370	0.7753	0.211	0.0429	0.2897	0.1315	0.0372	0.146	0.0235	0.0076	0.2607	0.059	0.0216	0.146	0.0235	0.0076	0.2607	0.059	0.0216
273	0.970	0.576	0.968	0.777	0.836	0.1534	0.0499	0.5006	0.1064	0.0976	0.8206	0.2665	0.0539	0.5868	0.1129	0.2035	0.8206	0.2665	0.0539	0.5868	0.1129	0.2035
274	0.235	0.730	0.437	0.222	0.4826	0.9525	0.4062	0.1268	0.4872	0.104	0.1689	0.6816	0.3814	0.0164	0.166	0.0566	0.1689	0.6816	0.3814	0.0164	0.166	0.0566
275	0.088	0.076	0.125	0.555	0.7977	0.072	0.8525	0.0716	0.0304	0.9563	0.0136	0.0204	0.0308	0.0409	0.0407	0.7858	0.0136	0.0204	0.0308	0.0409	0.0407	0.7858
276	0.323	0.884	0.750	0.962	0.1136	0.0009	0.5119	0.5748	0.095	0.0462	0.1839	0.0025	0.5652	0.4783	0.0673	0.2035	0.1839	0.0025	0.5652	0.4783	0.0673	0.2035
277	0.911	0.961	0.968	0.962	0.6239	0.7622	0.8665	>0.9999	0.8217	0.8338	0.2984	0.3188	0.8008	0.8348	0.8149	0.474	0.2984	0.3188	0.8008	0.8348	0.8149	0.474
278	1.000	0.961	1.000	1.000	n.e	n.e	0.4596	0.4836	n.e	0.3163	n.e	n.e	0.349	0.5467	n.e	0.5889	n.e	n.e	0.349	0.5467	n.e	0.5889
279	0.500	0.846	0.437	0.555	0.6664	0.8299	0.1417	0.258	0.5787	0.3081	0.7218	0.8057	0.2342	0.2555	0.6598	0.3507	0.7218	0.8057	0.2342	0.2555	0.6598	0.3507
280	0.617	0.615	0.843	0.888	0.257	0.2173	0.3979	0.2764	0.8325	0.9157	0.2844	0.2264	0.408	0.2859	0.7771	0.8977	0.2844	0.2264	0.408	0.2859	0.7771	0.8977
281	0.794	0.923	1.000	0.925	0.0503	0.4163	0.1418	>0.9999	0.0529	0.5531	0.0803	0.3291	0.5022	0.8348	0.414	0.5971	0.0803	0.3291	0.5022	0.8348	0.414	0.5971
282	0.882	0.500	0.687	0.629	0.2591	0.2372	0.5508	0.6841	0.7736	0.2403	0.3352	0.2907	0.6447	0.6082	0.9181	0.1495	0.3352	0.2907	0.6447	0.6082	0.9181	0.1495
283	0.852	0.307	0.187	0.444	0.0017	0.1265	0.8666	0.7054	0.2468	0.1408	0.0003	0.0951	0.1648	0.4283	0.0964	0.0941	0.0003	0.0951	0.1648	0.4283	0.0964	0.0941
284	0.058	0.346	0.156	0.407	0.5424	0.1685	0.289	0.8569	0.2294	0.3985	0.044	0.0186	0.0977	0.4934	0.0865	0.0207	0.044	0.0186	0.0977	0.4934	0.0865	0.0207
285	0.941	0.923	0.875	0.888	0.571	0.7205	0.9079	0.9527	>0.9999	0.9211	0.5258	0.5964	0.7653	0.7443	0.7406	0.8535	0.5258	0.5964	0.7653	0.7443	0.7406	0.8535
286	0.323	0.384	0.218	0.333	0.6427	0.8986	0.6532	0.9079	0.582	0.8634	0.1743	0.7512	0.2091	0.5276	0.4602	0.667	0.1743	0.7512	0.2091	0.5276	0.4602	0.667
287	0.617	0.230	0.468	0.629	0.5449	0.867	0.5135	0.2822	0.4549	0.4156	0.5552	0.8638	0.1636	0.0884	0.5118	0.0767	0.5552	0.8638	0.1636	0.0884	0.5118	0.0767
288	0.588	0.038	0.281	0.185	0.2731	0.0622	0.3765	0.5102	0.8331	0.1131	0.0521	0.0165	0.0617	0.0214	0.4455	0.0087	0.0521	0.0165	0.0617	0.0214	0.4455	0.0087
289	0.352	0.384	0.156	0.148	0.2866	0.339	0.4169	0.3675	>0.9999	0.9628	0.0756	0.2396	0.096	0.0585	0.7406	0.8535	0.0756	0.2396	0.096	0.0585	0.7406	0.8535

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
290	0.558	0.000	0.031	0.037	0.0101	0.0316	0.915	0.9111	>0.9999	0.0768	0.0003	0.0005	0.0937	0.0519	0.6598	0.0133							
291	0.323	0.653	0.593	0.444	0.2766	0.6656	0.8333	0.4936	0.4587	0.4425	0.4036	0.4094	0.8463	0.5094	0.6837	0.2472							
292	0.970	0.846	0.906	0.740	0.4418	0.111	0.8	0.6345	0.2432	0.4368	0.4214	0.1416	0.8008	0.6524	0.2684	0.5072							
293	0.705	0.692	0.812	0.666	0.5819	0.8132	0.658	0.9667	0.4076	0.9756	0.8206	0.8638	0.6953	0.8947	0.4023	0.8977							
294	0.735	0.769	0.812	0.629	0.6889	0.6498	0.8906	0.6345	0.3529	0.9545	0.8206	0.6363	0.8962	0.6708	0.4023	0.8977							
295	0.617	0.192	0.937	0.851	0.0589	0.2773	0.0037	0.0119	0.4549	0.3385	0.1054	0.3345	0.0037	0.0097	0.5118	0.0681							
296	0.411	0.038	0.125	0.074	0.1926	0.1411	0.7319	0.9364	0.7629	0.2406	0.0079	0.006	0.0221	0.123	0.4321	0.0206							
297	0.558	0.807	0.375	0.777	0.5156	0.3933	0.1767	>0.9999	0.0774	0.4625	0.2711	0.3811	0.1226	0.8947	0.0157	0.4689							
298	1.000	0.576	0.937	0.851	0.1017	0.0468	0.1192	0.298	0.4549	0.009	0.3669	0.3139	0.1861	0.3448	0.5118	0.1847							
299	0.176	0.076	0.281	0.296	0.6922	0.7212	0.4868	0.444	>0.9999	0.7286	0.2317	0.1402	0.0539	0.0437	0.8601	0.1558							
300	0.000	0.000	0.031	0.037	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.915	0.9111	>0.9999	n.e	0.1881	0.092	0.0937	0.0519	0.6598	n.e							
301	0.970	0.653	0.906	0.851	0.4418	0.2795	0.2829	0.4239	0.723	0.1548	0.4214	0.3949	0.2442	0.4283	0.8149	0.297							
302	0.033	0.142	0.034	0.047	>0.9999	>0.9999	0.6102	0.7312	>0.9999	0.6492	0.6643	0.0367	0.0114	0.0348	0.1948	0.0031							
303	0.666	0.464	0.310	0.285	0.1623	0.184	0.6211	0.5689	0.9961	0.5693	0.1818	0.0287	0.5476	0.2176	0.7406	0.5971							
304	0.366	0.750	0.068	0.285	0.1285	0.7734	0.0122	0.1761	0.2338	0.3059	0.0122	0.5784	0.0025	0.0357	0.0955	0.1945							
305	0.166	0.500	0.034	0.047	0.4151	0.5897	0.1003	0.1257	>0.9999	0.3292	0.0162	0.0094	0.006	0.0031	0.1948	0.0594							
306	0.433	0.892	0.758	0.380	0.1867	0.7468	0.576	0.0575	0.1345	0.1548	0.2589	0.7115	0.5652	0.0588	0.0527	0.1521							
307	0.033	0.178	0.241	0.238	0.2726	0.3747	0.8771	0.9545	>0.9999	0.583	0.0508	0.0455	0.4342	0.4283	0.8601	0.0238							
308	0.133	0.714	0.241	0.380	0.6065	0.1903	0.1495	0.3559	0.5901	0.0601	0.0985	0.4402	0.0284	0.1726	0.3964	0.0066							
309	0.566	0.428	0.551	0.476	0.8398	0.7508	0.6954	0.9028	0.7951	0.6901	0.8206	0.7115	0.7136	0.7443	0.7771	0.6813							
310	0.833	0.535	0.724	0.476	0.5764	0.1719	0.5322	0.8856	0.2659	0.394	0.6912	0.1444	0.6447	0.8348	0.364	0.3145							
311	0.666	0.321	0.482	0.619	0.4317	0.9341	0.6125	0.3913	0.5072	0.365	0.3292	0.6816	0.5748	0.1517	0.6598	0.1154							
312	0.233	0.464	0.103	0.190	0.5809	>0.9999	0.2692	0.549	0.6376	0.6808	0.0538	0.2486	0.2247	0.0743	0.3046	0.1779							
313	0.166	0.428	0.275	0.238	0.6922	0.841	0.6828	0.6451	>0.9999	0.5263	0.1146	0.2316	0.2751	0.1072	0.566	0.1095							
314	0.900	0.821	0.827	0.714	0.6451	0.3312	>0.9999	0.7452	0.5326	0.7327	0.614	0.3811	0.8962	0.8947	0.5543	0.7102							
315	0.666	0.464	0.689	0.714	0.8822	0.8862	0.5123	0.3908	>0.9999	0.5693	0.8206	0.7512	0.4574	0.4636	0.8601	0.5971							
316	0.600	0.392	0.379	0.238	0.468	0.2774	0.8857	0.6456	0.6142	0.6066	0.2711	0.0539	0.8463	0.2084	0.4455	0.3782							
317	0.566	0.214	0.620	0.333	0.7817	0.4584	0.1634	0.7557	0.2035	0.4366	0.6643	0.3239	0.0479	0.2236	0.2252	0.0983							
318	0.100	0.357	0.034	0.285	0.7753	0.4619	0.2523	0.8464	0.13	0.4157	0.0432	0.0318	0.0399	0.6226	0.1141	0.5889							
319	0.166	0.535	0.172	0.476	>0.9999	0.2585	0.219	0.8856	0.1873	0.1658	0.6643	0.0727	0.0532	0.8348	0.0466	0.0585							
320	0.600	0.571	0.586	0.619	0.8434	0.9528	0.8415	0.8624	0.8325	0.8813	0.8206	0.7512	0.8962	0.782	0.8601	0.7628							
321	0.366	0.714	0.275	0.523	0.7047	0.5841	0.2609	0.5358	0.279	0.3484	0.3809	0.4094	0.0545	0.6375	0.0993	0.1644							
322	0.066	0.035	0.000	0.000	0.3199	0.7311	0.415	0.9111	n.e	0.9449	0.0323	0.002	0.0035	0.0045	n.e	0.0011							

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD							
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	M1-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	M1-M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	M1-M2
323	0.900	1.000	0.862	0.714	0.8294	0.3312	0.0764	0.0073	0.3972	0.4717	0.7696	0.3811	0.3274	0.0592	0.4081	0.0876				
324	0.733	0.821	0.862	0.666	0.47	0.8167	0.8944	0.5507	0.268	0.7855	0.6387	0.8638	0.8463	0.6524	0.2652	0.8977				
325	0.933	0.964	0.965	0.857	>0.9999	0.6123	>0.9999	0.5604	0.2174	>0.9999	0.4861	0.5502	0.8962	0.415	0.3395	0.6813				
326	0.100	0.000	0.172	0.095	0.6887	>0.9999	0.2276	0.3475	0.774	0.6937	0.146	0.8638	0.1459	0.0758	0.0543	<10 ⁻⁴				
327	0.966	0.714	0.965	0.761	>0.9999	0.177	0.167	>0.9999	0.1064	0.236	0.8206	0.2665	0.1274	0.782	0.0702	0.2902				
328	0.033	0.107	0.103	0.142	0.6127	0.4992	>0.9999	>0.9999	>0.9999	0.7257	0.0529	0.0129	0.8463	0.0895	0.1948	0.0362				
329	0.233	0.321	0.275	0.285	0.9457	0.9707	0.8835	>0.9999	>0.9999	0.8353	0.255	0.1673	0.4287	0.7109	0.8601	0.4347				
330	0.133	0.214	0.482	0.333	0.0897	0.4684	0.4829	0.7557	0.5077	0.8133	0.1329	0.0654	0.1195	0.2236	0.5906	0.1705				
331	0.833	0.357	0.965	0.714	0.3182	0.5919	0.0034	0.2603	0.0418	0.1839	0.1618	0.6582	0.0294	0.2801	0.0197	0.1268				
332	0.633	0.142	0.931	0.666	0.0898	0.9341	0.0016	0.0798	0.0879	0.1514	0.1054	0.7512	0.008	0.0316	0.0276	0.1384				
333	0.852	0.925	0.787	0.896	0.6847	0.8279	0.4862	0.9883	0.4378	0.7152	0.6912	0.7115	0.4574	0.7443	0.5427	0.6955				
334	0.941	0.925	0.848	0.827	0.4168	0.4126	0.6795	0.6326	0.9486	0.9564	0.4405	0.4835	0.6447	0.5371	0.9181	0.8535				
335	0.147	0.666	0.484	0.310	0.0789	0.4466	0.5109	0.3168	0.4094	0.1737	0.0495	0.1068	0.5165	0.1186	0.5322	0.0493				
336	0.205	0.481	0.181	0.310	0.8673	0.7181	0.4681	0.5689	0.7904	0.539	0.7218	0.2316	0.0876	0.3821	0.3442	0.1384				
337	0.941	0.703	0.848	0.758	0.4168	0.26	0.5719	0.8495	0.5831	0.3289	0.4405	0.309	0.6953	0.8947	0.5543	0.275				
338	0.558	0.111	0.212	0.448	0.2989	0.6381	0.714	0.2702	0.3544	0.1848	0.0222	0.5784	0.0815	0.0619	0.1013	0.0876				
339	0.470	0.740	0.818	0.586	0.1121	0.6123	0.7593	0.5834	0.26	0.4616	0.1127	0.5964	0.8962	0.6708	0.2717	0.4957				
340	0.823	0.629	0.696	0.586	0.4924	0.3159	0.8389	0.8633	0.5703	0.5513	0.6912	0.4021	0.8962	0.8348	0.7771	0.6342				
341	0.382	0.518	0.272	0.172	0.6636	0.4164	0.4864	0.1311	0.6513	0.7503	0.3809	0.0543	0.1555	0.0369	0.3007	0.6243				
342	0.029	0.000	0.090	0.172	0.5779	0.4172	0.6549	0.2201	0.6321	>0.9999	0.0529	0.0409	0.1148	0.098	0.3046	0.019				
343	0.352	0.185	0.181	0.517	0.4626	0.5568	>0.9999	0.2235	0.0529	0.6734	0.0749	0.5151	0.8463	0.0671	0.0394	0.1417				
344	0.764	0.148	0.757	0.586	0.9557	0.4375	0.02	0.132	0.3507	0.0417	0.8206	0.5042	0.0613	0.0693	0.354	0.0482				
345	0.676	0.481	0.393	0.620	0.3182	0.8076	0.8027	0.6152	0.4254	0.6007	0.167	0.8638	0.6598	0.6082	0.3798	0.5971				
346	0.470	0.259	0.454	0.724	0.7761	0.3244	0.582	0.1948	0.2228	0.5919	0.8206	0.2822	0.2422	0.0472	0.2329	0.1983				
347	0.705	0.703	0.787	0.620	0.685	0.6821	0.7497	0.716	0.3947	0.9756	0.8206	0.8638	0.8962	0.8348	0.578	0.8977				
348	0.088	0.851	0.181	0.551	0.5931	0.0665	0.01	0.2397	0.0528	0.0147	0.1183	0.0204	0.0073	0.2859	0.0319	0.1239				
349	0.617	0.666	0.787	0.793	0.4184	0.4451	0.6581	0.6483	0.9568	0.864	0.6912	0.5377	0.8962	0.8947	0.9181	0.8165				
350	0.941	0.888	0.878	0.793	0.571	0.3244	>0.9999	0.675	0.5703	0.8043	0.5258	0.3878	0.8962	0.6082	0.8149	0.667				
351	0.911	0.962	0.818	0.758	0.4854	0.3884	0.4062	0.2452	0.779	0.8385	0.614	0.3811	0.4031	0.314	0.9181	0.474				
352	0.117	0.259	0.363	0.379	0.1418	0.1627	0.7372	0.7228	0.8998	0.6663	0.5402	0.115	0.4342	0.5767	0.8601	0.0956				
353	0.647	0.629	0.242	0.758	0.2265	0.5919	0.3354	0.6395	0.0061	0.8983	0.023	0.6582	0.0648	0.6524	0.0055	0.8977				
354	0.764	0.703	0.727	0.379	0.8177	0.12	0.8946	0.2806	0.0977	0.8743	0.8206	0.1288	0.8962	0.1726	0.1023	0.8977				
355	0.029	0.111	0.181	0.000	0.4151	>0.9999	0.7781	0.2958	0.1315	0.6937	0.05	0.0113	0.1771	0.0532	0.1118	0.032				

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetsellD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
356	0.764	0.888	0.636	0.724	0.5315	0.8218	0.2954	0.464	0.6346	0.6537	0.6387	0.8638	0.317	0.4215	0.5543	0.645							
357	0.647	0.555	0.939	0.758	0.0761	0.5919	0.1082	0.4846	0.1596	0.7668	0.1054	0.6582	0.1861	0.5868	0.1389	0.7858							
358	0.764	0.185	0.666	0.827	0.6349	0.7655	n.e	0.0151	0.3635	0.0711	0.8206	0.8638	n.e	0.0142	0.4023	0.0162							
359	0.264	0.518	0.515	0.448	0.3752	0.5986	0.9142	0.7879	0.6223	0.536	0.1116	0.2951	0.8962	0.7109	0.7771	0.197							
360	0.176	0.148	0.090	0.068	0.6887	0.5897	0.8527	0.7312	0.9087	0.965	0.0818	0.0306	0.1648	0.0834	0.3258	0.3197							
361	0.500	0.666	0.848	0.758	0.0914	0.3649	0.4834	0.7423	0.5831	0.685	0.1521	0.3685	0.4695	0.8947	0.5543	0.7102							
362	0.676	0.555	0.666	0.862	0.856	0.3596	0.7149	0.2036	0.268	0.7638	0.8206	0.4021	0.7653	0.3174	0.2717	0.7858							
363	0.176	0.222	0.363	0.172	0.4216	0.9416	0.6518	0.8647	0.3824	0.8878	0.1195	0.8638	0.2548	0.2458	0.1374	0.1957							
364	1.000	0.962	0.969	0.965	0.2709	0.2414	0.8665	>0.9999	0.9051	0.3199	0.5402	0.4402	0.8008	0.8348	0.8601	0.5889							
365	0.088	0.148	0.090	0.241	0.9294	0.5201	0.8527	0.7799	0.4151	0.8692	0.6643	0.0318	0.1648	0.1642	0.3087	0.1705							
366	0.794	0.592	0.666	0.551	0.5226	0.3135	0.7984	0.8303	0.558	0.5367	0.6387	0.34	0.7346	0.8348	0.7771	0.5378							
367	0.750	0.923	0.967	0.964	0.1268	0.1698	0.7211	0.8656	>0.9999	0.4718	0.1221	0.1892	0.5476	0.5666	0.8601	0.4793							
368	0.000	0.269	0.129	0.035	0.209	0.4035	0.6413	0.3768	0.5953	0.0118	0.1536	0.092	0.0977	0.0343	0.0733	0.0935							
369	0.000	0.038	0.000	0.035	n.e	0.4035	0.415	>0.9999	0.3846	0.4223	n.e	0.092	0.0948	0.7109	0.4935	0.0815							
370	0.062	0.500	0.096	0.357	0.784	0.2407	0.2032	0.6354	0.1674	0.1932	0.0254	0.0402	0.0606	0.5666	0.059	0.0332							
371	0.593	0.346	0.322	0.428	0.2766	0.5411	0.8705	0.7173	0.5929	0.4916	0.2937	0.4168	0.8463	0.6896	0.6032	0.5313							
372	0.031	0.153	0.129	0.107	0.5089	0.6367	0.9488	0.8452	0.9271	0.6492	0.0483	0.0126	0.6598	0.0872	0.6837	0.0238							
373	0.437	0.307	0.580	0.928	0.5357	0.0389	0.4066	0.0078	0.0335	0.7727	0.5711	0.056	0.2401	0.0119	0.0223	0.474							
374	0.312	0.307	0.516	0.428	0.4059	0.6656	0.5354	0.7054	0.6628	>0.9999	0.4214	0.4094	0.5239	0.4283	0.566	0.8977							
375	0.125	0.423	0.290	0.214	0.433	0.7303	0.7217	0.4872	0.7676	0.3852	0.0913	0.1402	0.5476	0.1344	0.5906	0.2568							
376	0.156	0.653	0.387	0.285	0.3101	0.7212	0.4266	0.3387	0.6205	0.2073	0.0913	0.0817	0.2823	0.0729	0.5906	0.0343							
377	0.000	0.692	0.064	0.392	0.3199	0.0456	0.0343	0.3044	0.0831	<10 ⁻⁴	0.1781	0.0296	0.006	0.1726	0.0443	0.0114							
378	0.531	0.346	0.548	0.357	0.8243	0.4273	0.5115	0.9308	0.3535	0.6009	0.8206	0.3744	0.5748	0.782	0.5322	0.513							
379	0.218	0.230	0.129	0.321	0.6869	0.7023	0.7792	0.7877	0.2961	>0.9999	0.0948	0.2316	0.112	0.4283	0.2468	0.8165							
380	0.875	0.038	0.709	0.642	0.332	0.2499	n.e	0.0255	0.7744	0.0087	0.4987	0.2907	n.e	0.0056	0.9181	0.001							
381	0.343	0.500	0.451	0.285	0.6004	0.8256	0.7976	0.501	0.5036	0.6663	0.5258	0.5784	0.8008	0.1554	0.4455	0.6146							
382	0.687	0.307	0.806	1.000	0.5819	0.0323	0.1724	<10 ⁻⁴	0.0663	0.3292	0.8206	0.0412	0.0381	0.0025	0.0527	0.1154							
383	0.031	0.192	0.193	0.250	0.3355	0.3064	>0.9999	0.8983	0.851	0.583	0.05	0.0483	0.8962	0.1981	0.3491	0.033							
384	0.250	0.615	0.354	0.250	0.6619	0.9707	0.4107	0.3541	0.5901	0.4968	0.4735	0.8638	0.4399	0.0845	0.5906	0.1035							
385	0.156	0.000	0.161	0.107	>0.9999	0.8357	0.4946	0.2958	0.7887	0.544	0.6643	0.1473	0.1459	0.0758	0.4455	0.0806							
386	0.062	0.384	0.129	0.071	0.6653	0.9264	0.2169	0.2211	0.7629	0.3558	0.1183	0.4568	0.5094	0.018	0.2528	0.049							
387	0.906	0.807	0.645	0.428	0.1355	0.0371	0.5608	0.1962	0.3433	0.7018	0.2012	0.0181	0.5848	0.1579	0.2621	0.7102							
388	0.468	0.846	0.612	0.392	0.5449	0.7622	0.3551	0.1204	0.3844	0.3067	0.5711	0.2486	0.408	0.1177	0.2621	0.192							

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
389	0.875	0.653	0.483	0.535	0.0635	0.1495	0.603	0.6514	0.7453	0.4348	0.0455	0.1546	0.5165	0.7109	0.8149	0.4689	0.3411	0.3685	0.3873	0.9181	0.1029	0.6813	0.667
390	0.468	0.923	0.709	0.750	0.2908	0.26	0.3198	0.3681	0.7806	0.1307	0.2105	0.3685	0.3607	0.3873	0.9181	0.1029	0.2105	0.086	0.7346	0.0529	0.0283	0.6813	0.667
391	0.187	0.153	0.161	0.500	0.946	0.464	>0.9999	0.1267	0.0879	0.9617	0.2105	0.086	0.7346	0.0529	0.0283	0.6813	0.255	0.0703	0.8463	0.2084	0.4455	0.667	0.474
392	0.281	0.346	0.322	0.214	0.8096	0.8138	0.8705	0.709	0.582	0.9023	0.5905	0.4568	0.7136	0.2236	0.6598	0.1095	0.5905	0.4568	0.7136	0.2236	0.6598	0.1095	0.474
393	0.312	0.230	0.290	0.357	0.8612	0.7734	0.8959	0.711	0.7836	0.8353	0.0796	0.6816	0.8008	0.0369	0.0936	0.1095	0.0796	0.6816	0.8008	0.0369	0.0936	0.1095	0.474
394	0.187	0.500	0.451	0.178	0.4636	0.963	0.7976	0.1538	0.2958	0.5107	0.0796	0.6816	0.8008	0.0369	0.0936	0.1095	0.0796	0.6816	0.8008	0.0369	0.0936	0.1095	0.474
395	0.696	0.785	0.812	0.423	0.5819	0.3152	0.9684	0.2709	0.0914	0.7839	0.6387	0.1723	0.8962	0.1914	0.0118	0.8977	0.6387	0.1723	0.8962	0.1914	0.0118	0.8977	0.474
396	0.303	0.142	0.250	0.500	0.8417	0.5086	0.7143	0.2505	0.353	0.5728	0.5116	0.2951	0.2108	0.0463	0.1969	0.1127	0.5116	0.2951	0.2108	0.0463	0.1969	0.1127	0.474
397	0.454	0.571	0.625	0.500	0.5137	0.759	0.8346	0.8441	0.5469	0.7487	0.5258	0.8057	0.7346	0.7109	0.5427	0.667	0.5258	0.8057	0.7346	0.7109	0.5427	0.667	0.474
398	0.787	0.642	0.812	0.576	0.959	0.3994	0.5257	0.824	0.26	0.6225	0.8206	0.4021	0.5848	0.8348	0.2717	0.7448	0.8206	0.4021	0.5848	0.8348	0.2717	0.7448	0.474
399	0.666	0.607	0.718	0.615	0.8134	0.8076	0.7024	0.8824	0.6223	0.864	0.8206	0.8638	0.6773	0.8947	0.578	0.7628	0.8206	0.8638	0.6773	0.8947	0.578	0.7628	0.474
400	0.666	0.214	0.562	0.423	0.6241	0.3834	0.425	0.4872	0.4886	0.3837	0.7218	0.2591	0.1134	0.1374	0.6837	0.0604	0.7218	0.2591	0.1134	0.1374	0.6837	0.0604	0.474
401	0.090	0.214	0.250	0.423	0.4254	0.1	0.9461	0.4872	0.471	0.7226	0.1967	0.0556	0.3137	0.1374	0.3964	0.0848	0.1967	0.0556	0.3137	0.1374	0.3964	0.0848	0.474
402	0.272	0.357	0.687	0.346	0.178	0.759	0.296	0.9308	0.1102	0.8373	0.0566	0.1673	0.4031	0.8348	0.2227	0.4347	0.0566	0.1673	0.4031	0.8348	0.2227	0.4347	0.474
403	0.666	0.642	0.750	0.461	0.6911	0.4301	0.7075	0.5055	0.1596	0.894	0.8206	0.4245	0.6773	0.5094	0.1608	0.8977	0.8206	0.4245	0.6773	0.5094	0.1608	0.8977	0.474
404	0.727	0.821	0.843	0.653	0.5229	0.6931	0.9591	0.5103	0.3055	0.7479	0.6387	0.8638	0.8463	0.5968	0.2652	0.8977	0.6387	0.8638	0.8463	0.5968	0.2652	0.8977	0.474
405	0.454	0.928	0.531	0.538	0.7136	0.6806	0.1192	0.0963	0.9037	0.1307	0.7696	0.4568	0.1928	0.1277	0.9181	0.1268	0.7696	0.4568	0.1928	0.1277	0.9181	0.1268	0.474
406	0.333	0.214	0.468	0.346	0.5452	0.8464	0.5135	0.709	0.5049	0.7743	0.4735	0.7512	0.1195	0.2342	0.4847	0.2161	0.4735	0.7512	0.1195	0.2342	0.4847	0.2161	0.474
407	0.333	0.392	0.593	0.423	0.2766	0.7508	0.5722	0.7764	0.421	0.8634	0.4036	0.5964	0.3453	0.782	0.4847	0.5189	0.4036	0.5964	0.3453	0.782	0.4847	0.5189	0.474
408	0.545	0.500	0.562	0.692	0.8054	0.5174	0.8645	0.5201	0.5939	0.8892	0.8206	0.6153	0.7653	0.5371	0.8149	0.7628	0.8206	0.6153	0.7653	0.5371	0.8149	0.7628	0.474
409	0.666	0.821	0.687	0.538	0.8488	0.6318	0.6138	0.2939	0.4203	0.6235	0.8206	0.7115	0.6773	0.2773	0.6342	0.6342	0.8206	0.7115	0.6773	0.2773	0.6342	0.6342	0.474
410	0.363	0.821	0.156	0.615	0.2866	0.3294	0.01	0.4551	0.0239	0.2366	0.0422	0.3042	0.0073	0.4283	0.0048	0.1305	0.0422	0.3042	0.0073	0.4283	0.0048	0.1305	0.474
411	0.545	0.928	0.531	0.730	0.8043	0.461	0.1192	0.3397	0.3507	0.187	0.8206	0.6153	0.1928	0.349	0.3691	0.2792	0.8206	0.6153	0.1928	0.349	0.3691	0.2792	0.474
412	0.727	0.928	0.718	0.576	0.9349	0.5343	0.3274	0.116	0.4505	0.4336	0.8206	0.6363	0.3607	0.1493	0.7771	0.3894	0.8206	0.6363	0.3607	0.1493	0.7771	0.3894	0.474
413	0.333	0.500	0.531	0.230	0.3777	0.6638	0.8961	0.4091	0.2531	0.6331	0.4214	0.3188	0.7346	0.093	0.0659	0.6146	0.4214	0.3188	0.7346	0.093	0.0659	0.6146	0.474
414	0.333	0.285	0.468	0.115	0.5452	0.1903	0.584	0.5555	0.0942	0.9023	0.4735	0.4656	0.2548	0.0494	0.2751	0.3197	0.4735	0.4656	0.2548	0.0494	0.2751	0.3197	0.474
415	0.181	0.321	0.156	0.384	0.9385	0.4562	0.3152	0.827	0.2417	0.8422	0.2105	0.1068	0.1448	0.4934	0.2468	0.1932	0.2105	0.1068	0.1448	0.4934	0.2468	0.1932	0.474
416	0.787	0.535	0.843	0.807	0.8036	0.9631	0.2829	0.3357	0.9472	0.4625	0.8206	0.8638	0.317	0.4088	0.8601	0.5446	0.8206	0.8638	0.317	0.4088	0.8601	0.5446	0.474
417	0.233	0.000	0.343	0.240	0.6412	>0.9999	0.2143	0.3451	0.6449	0.3896	0.2287	0.7512	0.0294	0.0867	0.5906	0.0032	0.2287	0.7512	0.0294	0.0867	0.5906	0.0032	0.474
418	0.066	0.285	0.125	0.000	0.7977	0.7311	0.6217	0.0041	0.402	0.514	0.0985	0.0056	0.0914	0.0288	0.2153	0.0469	0.0985	0.0056	0.0914	0.0288	0.2153	0.0469	0.474
419	0.666	0.523	0.531	0.400	0.5714	0.402	0.9327	0.7552	0.6192	0.7327	0.5552	0.229	0.8463	0.6226	0.6837	0.7858	0.5552	0.229	0.8463	0.6226	0.6837	0.7858	0.474
420	0.266	0.142	0.218	0.360	0.9241	0.759	0.8694	0.3946	0.4751	0.7553	0.5116	0.4094	0.2847	0.0955	0.3442	0.0662	0.5116	0.4094	0.2847	0.0955	0.3442	0.0662	0.474
421	0.533	0.857	0.375	0.880	0.415	0.1192	0.1558	>0.9999	0.0436	0.3127	0.4861	0.0935	0.0494	0.8348	0.0014	0.3017	0.4861	0.0935	0.0494	0.8348	0.0014	0.3017	0.474
818	0.060	0.000	0.090	0.130	0.7753	0.8014	0.6549	0.2958	0.9174	0.7909	0.2287	0.0508	0.1148	0.0622	0.4602	0.0336	0.2287	0.0508	0.1148	0.0622	0.4602	0.0336	0.474
819	0.424	0.037	0.030	0.086	0.0459	0.1783	0.9137	0.7816	0.7053	0.2117	0.0023	0.0022	0.2044	0.0379	0.0873	0.0206	0.0023	0.0022	0.2044	0.0379	0.0873	0.0206	0.474

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NMI-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NMI-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NMI-NM2	
422	0.733	0.619	0.500	0.480	0.3322	0.3649	0.6352	0.6185	0.74	0.741	0.3738	0.3291	0.6598	0.6226	0.7406	0.8977	0.0152	0.1221	0.0012	0.098	0.1003	n.e	0.8977
423	0.000	0.000	0.437	0.200	0.022	0.1903	0.1003	0.4057	0.4404	n.e	0.0152	0.1221	0.0012	0.098	0.1003	n.e	0.0152	0.1221	0.0012	0.098	0.1003	n.e	0.8977
424	0.533	0.000	0.125	0.160	0.043	0.1092	0.5709	0.4708	0.9191	0.1206	0.0471	0.0158	0.1148	0.098	0.3491	0.015	0.0471	0.0158	0.1148	0.098	0.3491	0.015	0.0569
425	0.066	0.333	0.031	0.000	0.7393	0.7311	0.2826	0.108	0.8846	0.4488	0.0286	0.0056	0.0191	0.0242	0.1479	0.0569	0.0286	0.0056	0.0191	0.0242	0.1479	0.0569	0.0569
426	0.900	0.333	0.562	0.480	0.0898	0.0706	0.5304	0.635	0.7049	0.1203	0.1034	0.0675	0.5239	0.4283	0.7771	0.1684	0.1034	0.0675	0.5239	0.4283	0.7771	0.1684	0.1684
427	0.666	0.476	0.125	0.560	0.0081	0.705	0.2222	0.8545	0.0423	0.6007	0.0411	0.7115	0.0283	0.7443	0.3171	0.5971	0.0411	0.7115	0.0283	0.7443	0.3171	0.5971	0.5971
428	0.633	0.285	0.312	0.160	0.2375	0.0468	>0.9999	0.7577	0.723	0.3977	0.2178	0.0061	0.7346	0.1064	0.241	0.1224	0.2178	0.0061	0.7346	0.1064	0.241	0.1224	0.1224
429	0.266	0.095	0.312	0.280	0.8378	>0.9999	0.3984	0.5174	0.9681	0.6604	0.255	0.7512	0.0522	0.0552	0.7771	0.6054	0.255	0.7512	0.0522	0.0552	0.7771	0.6054	0.6054
430	0.166	0.476	0.218	0.480	0.8324	0.2334	0.5261	0.8432	0.4404	0.448	0.4735	0.0639	0.13	0.8348	0.1013	0.0824	0.4735	0.0639	0.13	0.8348	0.1013	0.0824	0.0824
431	0.733	0.809	0.875	0.800	0.4184	0.8218	0.82	>0.9999	0.6185	0.8743	0.4502	0.8638	0.8008	0.8348	0.8149	0.8977	0.4502	0.8638	0.8008	0.8348	0.8149	0.8977	0.8977
432	0.400	0.476	0.531	0.400	0.63	0.7468	0.8529	0.9037	0.6192	0.8164	0.5711	0.8638	0.7346	0.5276	0.6837	0.5189	0.5711	0.8638	0.7346	0.5276	0.6837	0.5189	0.5189
433	0.800	0.904	1.000	0.920	0.021	0.4729	0.1745	>0.9999	0.0529	0.7113	0.0803	0.4245	0.0606	0.8348	0.414	0.6955	0.0803	0.4245	0.0606	0.8348	0.414	0.6955	0.6955
434	0.600	0.809	0.718	0.720	0.639	0.6473	0.7497	0.7452	>0.9999	0.5449	0.6912	0.8057	0.8962	0.8947	0.9181	0.5517	0.6912	0.8057	0.8962	0.8947	0.9181	0.5517	0.5517
435	0.500	0.666	0.812	0.960	0.1928	0.0212	0.6138	0.1227	0.2228	0.7144	0.1602	0.0158	0.6953	0.1239	0.2856	0.667	0.1602	0.0158	0.6953	0.1239	0.2856	0.667	0.667
436	0.000	0.000	0.281	0.222	0.0085	<10 ⁻⁴	0.2512	0.1867	0.8356	n.e	0.0483	0.1221	0.0909	0.056	0.6837	n.e	0.0483	0.1221	0.0909	0.056	0.6837	n.e	n.e
437	0.058	0.107	0.343	0.222	0.1657	0.4846	0.2169	0.6695	0.5842	0.8445	0.0103	0.0376	0.214	0.0448	0.4455	0.092	0.0103	0.0376	0.214	0.0448	0.4455	0.092	0.092
438	0.705	0.642	0.437	0.592	0.2718	0.6473	0.5213	0.8206	0.4886	0.859	0.2409	0.7115	0.4755	0.8348	0.5118	0.8977	0.2409	0.7115	0.4755	0.8348	0.5118	0.8977	0.8977
439	0.764	0.750	0.843	0.777	0.6864	0.9702	0.7093	>0.9999	0.7692	0.9545	0.6387	0.8638	0.6953	0.8947	0.8149	0.8977	0.6387	0.8638	0.6953	0.8947	0.8149	0.8977	0.8977
440	0.029	0.250	0.187	0.444	0.3021	0.0703	0.905	0.6451	0.2468	0.4322	0.05	0.0233	0.5396	0.1802	0.0964	0.0544	0.05	0.0233	0.5396	0.1802	0.0964	0.0544	0.0544
441	0.235	0.535	0.187	0.074	0.8316	0.5042	0.219	0.1257	0.5178	0.4571	0.5116	0.0164	0.0573	0.0092	0.1526	0.1384	0.5116	0.0164	0.0573	0.0092	0.1526	0.1384	0.1384
442	0.735	0.464	0.437	0.666	0.2055	0.7655	0.8859	0.5055	0.3433	0.4158	0.2258	0.8638	0.8463	0.5371	0.3798	0.4793	0.2258	0.8638	0.8463	0.5371	0.3798	0.4793	0.4793
443	0.176	0.392	0.312	0.333	0.771	0.7736	0.7956	0.827	0.8756	0.5845	0.1689	0.1231	0.6598	0.5276	0.8601	0.112	0.1689	0.1231	0.6598	0.5276	0.8601	0.112	0.112
444	0.911	0.892	0.656	0.888	0.1313	0.9455	0.327	>0.9999	0.1648	0.9634	0.2012	0.8057	0.317	0.8947	0.1278	0.8165	0.2012	0.8057	0.317	0.8947	0.1278	0.8165	0.8165
445	0.794	0.071	0.781	0.592	0.9673	0.3866	n.e	0.0583	0.3486	0.0193	0.8206	0.4021	n.e	0.0112	0.354	0.0106	0.8206	0.4021	n.e	0.0112	0.354	0.0106	0.0106
446	0.294	0.535	0.375	0.333	0.741	0.8549	0.5476	0.5143	0.765	0.5738	0.5711	0.4568	0.5396	0.4783	0.7771	0.2089	0.5711	0.4568	0.5396	0.4783	0.7771	0.2089	0.2089
447	0.794	0.357	0.750	0.703	0.8122	0.704	0.2188	0.2472	0.7806	0.2311	0.8206	0.8638	0.3105	0.2801	0.9181	0.3042	0.8206	0.8638	0.3105	0.2801	0.9181	0.3042	0.3042
448	0.941	0.928	1.000	1.000	0.4377	0.3854	0.1661	0.1554	n.e	0.9564	0.3031	0.2703	0.2247	0.2256	n.e	0.8535	0.3031	0.2703	0.2247	0.2256	n.e	0.8535	0.8535
449	0.029	0.500	0.062	0.037	0.7148	0.9035	0.1535	0.1012	0.9076	0.0613	0.1183	0.1673	0.0097	0.0132	0.1238	0.0235	0.1183	0.1673	0.0097	0.0132	0.1238	0.0235	0.0235
450	0.941	0.928	0.812	0.925	0.2946	0.9384	0.564	>0.9999	0.3929	0.9564	0.3601	0.8057	0.5563	0.8947	0.364	0.8535	0.3601	0.8057	0.5563	0.8947	0.364	0.8535	0.8535
451	0.029	0.142	0.062	0.370	0.7148	0.1252	0.7463	0.3946	0.1068	0.6129	0.1183	0.027	0.0684	0.0539	0.0443	0.0238	0.1183	0.027	0.0684	0.0539	0.0443	0.0238	0.0238
452	0.941	0.500	1.000	0.888	0.4377	0.7205	0.0093	0.1463	0.0279	0.1309	0.3031	0.5964	0.0437	0.1203	0.3171	0.1017	0.3031	0.5964	0.0437	0.1203	0.3171	0.1017	0.1017
453	0.352	0.714	0.312	0.444	0.7966	0.6813	0.2483	0.3805	0.5929	0.365	0.7218	0.5964	0.2924	0.4494	0.6032	0.2191	0.7218	0.5964	0.2924	0.4494	0.6032	0.2191	0.2191
454	0.794	0.142	0.406	0.407	0.1091	0.1579	0.4131	0.3884	0.7075	0.0324	0.0561	0.0681	0.1733	0.0824	0.9181	0.0196	0.0561	0.0681	0.1733	0.0824	0.9181	0.0196	0.0196

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetsellD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
455	0.000	0.250	0.000	0.038	n.e	0.4035	<10 ⁻⁴	0.3768	0.3846	<10 ⁻⁴	n.e	0.0141	0.0628	0.0343	0.4935	0.0935							
456	0.500	0.208	0.300	0.192	0.4292	0.3551	0.8497	>0.9999	0.6512	0.5564	0.1762	0.034	0.4342	0.8348	0.4455	0.0972							
457	0.035	0.416	0.033	0.000	>0.9999	0.9035	0.177	0.0577	0.8846	0.2489	0.7218	0.0022	0.0306	0.0121	0.4386	0.0515							
458	0.071	0.250	0.133	0.346	0.7977	0.2407	0.6999	0.7909	0.2439	0.5768	0.0985	0.0094	0.112	0.4283	0.0865	0.0069							
459	0.857	0.541	0.700	0.423	0.3775	0.0697	0.59	0.7186	0.2228	0.3034	0.4987	0.0206	0.6447	0.6226	0.1213	0.3604							
460	0.892	0.583	0.866	0.538	>0.9999	0.1022	0.2954	0.8682	0.0842	0.3119	0.6643	0.0882	0.2157	0.8348	0.0765	0.3017							
461	0.107	0.333	0.066	0.346	0.784	0.3106	0.3906	0.8643	0.1412	0.5484	0.0948	0.4745	0.0381	0.782	0.0082	0.0255							
462	0.642	0.458	0.566	0.269	0.7444	0.2636	0.7933	0.5955	0.2747	0.5892	0.7218	0.037	0.3137	0.2084	0.0773	0.5014							
463	0.178	0.625	0.233	0.384	0.8316	0.4562	0.4024	0.5263	0.4895	0.1895	0.1149	0.1068	0.0892	0.2716	0.3964	0.0621							
464	0.642	0.583	0.566	0.461	0.7444	0.4451	0.8415	0.661	0.7049	0.8581	0.7218	0.4168	0.8463	0.6226	0.7771	0.7628							
465	0.071	0.375	0.500	0.153	0.0564	0.6929	0.7343	0.3946	0.0529	0.4179	0.0077	0.0582	0.7136	0.193	0.0173	0.0044							
466	0.035	0.208	0.100	0.153	0.7753	0.5403	0.6858	0.9519	0.7685	0.583	0.0378	0.0129	0.066	0.5666	0.1748	0.033							
467	0.928	0.583	0.900	0.692	0.9377	0.2192	0.2036	0.7158	0.1783	0.1987	0.7696	0.1813	0.2323	0.7443	0.173	0.1409							
468	0.892	0.541	0.866	0.576	>0.9999	0.1327	0.2242	0.8682	0.1342	0.2517	0.6643	0.1656	0.2592	0.782	0.0848	0.1895							
469	0.000	0.166	0.066	0.153	0.7148	0.2267	0.7463	>0.9999	0.6087	0.2871	0.1781	0.1487	0.0114	0.8348	0.3349	0.1513							
470	0.178	0.041	0.100	0.192	0.6887	>0.9999	0.8226	0.5491	0.6376	0.6874	0.0985	0.7512	0.0485	0.0337	0.2498	0.0042							
471	0.785	0.833	0.966	0.807	0.1526	>0.9999	0.4198	>0.9999	0.1744	0.9713	0.1085	0.8638	0.4232	0.782	0.2303	0.7628							
472	0.142	0.000	0.100	0.115	0.8022	>0.9999	0.6549	0.2958	>0.9999	0.2871	0.0236	0.5784	0.1148	0.0276	0.6188	0.0806							
473	0.107	0.000	0.266	0.076	0.4553	0.9372	0.3083	0.3475	0.3294	0.3259	0.0604	0.3188	0.0909	0.0778	0.0927	0.0717							
474	0.892	0.583	0.866	0.576	>0.9999	0.1327	0.2954	0.8365	0.1342	0.3119	0.6643	0.1656	0.2157	0.8348	0.0848	0.3017							
475	0.107	0.041	0.033	0.076	0.6127	0.9372	>0.9999	0.9364	0.7053	0.8445	0.0127	0.3188	0.2044	0.0316	0.3349	0.0328							
476	0.821	0.583	0.900	0.461	0.607	0.1563	0.2036	0.661	0.0283	0.4698	0.5552	0.2069	0.2323	0.6226	0.0124	0.5378							
477	0.357	0.583	0.333	0.538	0.9469	0.4562	0.4463	0.8682	0.3595	0.5521	0.5905	0.5151	0.4399	0.8348	0.3907	0.3475							
478	0.107	0.333	0.100	0.346	>0.9999	0.3106	0.4791	0.8643	0.216	0.5484	0.7218	0.4745	0.338	0.782	0.4682	0.0255							
479	0.714	0.375	0.733	0.500	0.9673	0.4497	0.2746	0.7265	0.2949	0.4149	0.8206	0.4245	0.2682	0.6896	0.2893	0.3538							
480	0.107	0.333	0.166	0.346	0.8195	0.3106	0.3152	0.8643	0.2886	0.5484	0.2287	0.4745	0.1448	0.782	0.2498	0.0255							
481	0.071	0.250	0.133	0.153	0.7977	0.6929	0.6999	0.7782	>0.9999	0.5768	0.0985	0.0582	0.112	0.1384	0.6188	0.0069							
482	0.107	0.125	0.033	0.230	0.6127	0.6352	0.6908	0.7703	0.2599	>0.9999	0.0127	0.0797	0.0465	0.123	0.1176	0.5189							
483	0.178	0.333	0.466	0.423	0.3345	0.3443	0.6456	0.7819	0.851	0.7673	0.0705	0.0739	0.4342	0.6896	0.7406	0.092							
484	0.857	0.625	0.900	0.576	0.8294	0.2082	0.2513	0.8824	0.0717	0.4425	0.7218	0.164	0.2381	0.8348	0.0273	0.4847							
485	0.107	0.250	0.100	0.307	>0.9999	0.4417	0.6078	0.9566	0.2758	0.6663	0.7218	0.0505	0.0914	0.6896	0.1107	0.0336							
486	0.892	0.625	0.900	0.576	>0.9999	0.1327	0.2513	0.8824	0.0717	0.3716	0.5905	0.1656	0.2381	0.8348	0.0273	0.3068							
487	0.071	0.125	0.100	0.153	0.9294	0.6929	>0.9999	>0.9999	0.7685	0.8558	0.4735	0.0582	0.2044	0.6896	0.1748	0.0049							

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
488	0.571	0.333	0.800	0.538	0.2913	0.846	0.1684	0.5143	0.1813	0.5521	0.3882	0.6816	0.2526	0.3575	0.2057	0.5313							
489	0.821	0.583	0.833	0.576	>0.9999	0.3159	0.3551	0.8365	0.1864	0.4698	0.8206	0.34	0.408	0.8348	0.1278	0.5378							
490	0.142	0.333	0.233	0.346	0.7162	0.2414	0.8022	0.8643	0.5842	0.525	0.146	0.0757	0.2751	0.782	0.4602	0.0611							
491	0.428	0.541	0.433	0.538	0.9251	0.6818	0.7642	0.8999	0.6628	0.776	0.8206	0.5964	0.6598	0.8348	0.6598	0.667							
492	0.500	0.208	0.766	0.653	0.2496	0.6011	0.1228	0.2052	0.5813	0.5564	0.308	0.6153	0.0174	0.0267	0.9181	0.0972							
493	0.857	0.625	0.866	0.576	>0.9999	0.2082	0.327	0.8824	0.1342	0.4425	0.8206	0.164	0.3647	0.8348	0.0848	0.4847							
494	0.107	0.291	0.133	0.346	>0.9999	0.3106	0.6308	0.8903	0.2439	0.6061	0.5711	0.4745	0.0977	0.4934	0.0865	0.0456							
495	0.107	0.333	0.133	0.346	>0.9999	0.3106	0.4692	0.8643	0.2439	0.5484	0.5711	0.4745	0.0914	0.782	0.0865	0.0255							
496	0.142	0.416	0.400	0.653	0.2778	0.0355	0.7825	0.4936	0.2931	0.501	0.0717	0.0217	0.8463	0.2919	0.151	0.0824							
497	0.178	0.166	0.200	0.115	>0.9999	0.8357	>0.9999	0.9475	0.6586	>0.9999	0.7696	0.1473	0.3137	0.0872	0.4321	0.7628							
498	0.035	0.083	0.600	0.230	0.0071	0.3747	0.0998	0.5955	0.1886	0.8128	0.0038	0.0455	0.006	0.0552	0.0232	0.0336							
499	0.250	0.375	0.500	0.192	0.4024	0.8805	0.7343	0.554	0.276	0.7756	0.1116	0.0703	0.7136	0.0967	0.0316	0.2301							
500	0.035	0.333	0.033	0.230	>0.9999	0.3747	0.2962	0.7877	0.2599	0.3685	0.7218	0.0455	0.0399	0.0872	0.1176	0.0372							
501	0.000	0.333	0.066	0.346	0.7148	0.0607	0.3906	0.8643	0.1412	0.1517	0.1781	0.0035	0.0381	0.782	0.0082	0.0071							
502	0.821	0.625	0.900	0.576	0.607	0.3159	0.2513	0.8824	0.0717	0.5513	0.5552	0.34	0.2381	0.8348	0.0273	0.6342							
503	0.821	0.541	0.866	0.576	0.9173	0.3159	0.2242	0.8682	0.1342	0.4022	0.5905	0.34	0.2592	0.782	0.0848	0.5446							
504	0.821	0.541	0.766	0.500	0.8101	0.2048	0.4765	0.9263	0.2041	0.4022	0.8206	0.1444	0.4179	0.8348	0.1695	0.5446							
505	0.714	0.458	0.833	0.384	0.5764	0.2531	0.2142	0.776	0.0314	0.4733	0.6387	0.1592	0.2897	0.5276	0.013	0.4488							
506	0.000	0.222	0.000	0.040	n.e	0.4035	0.197	0.4793	0.3846	0.2269	n.e	0.092	0.1113	0.0103	0.4935	0.1605							
507	0.562	0.666	0.781	0.680	0.3181	0.6318	0.6514	0.9667	0.6501	0.7327	0.3536	0.8057	0.8962	0.8947	0.9181	0.8535							
508	0.531	0.518	0.312	0.280	0.3777	0.3959	0.543	0.4893	0.9681	0.9482	0.3236	0.1131	0.3986	0.1554	0.7771	0.8977							
509	0.093	0.185	0.125	0.320	0.8022	0.3747	0.8607	0.7557	0.3525	0.798	0.4735	0.4745	0.2751	0.1642	0.3087	0.053							
510	0.968	0.518	0.781	0.840	0.1624	0.288	0.3988	0.2276	0.7715	0.0849	0.2346	0.3949	0.4179	0.2581	0.9181	0.1715							
511	0.062	0.370	0.093	0.320	0.784	0.2804	0.3098	0.844	0.2537	0.376	0.2287	0.0535	0.1999	0.5276	0.4682	0.049							
512	0.468	0.333	0.312	0.080	0.5112	0.1357	0.9164	0.3821	0.216	0.6663	0.2984	0.0054	0.8463	0.0197	0.0918	0.474							
513	0.125	0.037	0.125	0.400	0.9312	0.1627	0.7319	0.1898	0.1076	0.7622	0.8206	0.115	0.0209	0.0466	0.3215	0.0088							
514	0.562	0.555	0.343	0.560	0.4342	0.846	0.5033	0.8682	0.3292	0.8933	0.3236	0.8638	0.3986	0.8947	0.3907	0.8977							
515	0.687	0.370	0.562	0.400	0.5858	0.3571	0.5613	0.8769	0.496	0.3784	0.7218	0.1723	0.5748	0.782	0.4847	0.2334							
516	0.062	0.074	0.000	0.040	0.7148	0.9263	0.3533	0.9364	0.3846	0.9446	0.0323	0.0123	0.0806	0.0167	0.4935	0.667							
517	0.875	0.703	0.843	0.640	0.8475	0.2507	0.5608	0.8308	0.268	0.5013	0.6643	0.2907	0.6953	0.8348	0.2652	0.6559							
518	0.437	0.037	0.406	0.320	0.8442	0.6323	0.1173	0.2718	0.6916	0.2117	0.5905	0.3188	0.0617	0.0506	0.6837	0.0118							
519	0.531	0.481	0.312	0.200	0.3777	0.3168	0.5872	0.549	0.6512	0.8549	0.3236	0.0335	0.5476	0.0743	0.4455	0.7628							
520	0.156	0.000	0.125	0.080	0.8189	0.7084	0.5709	0.3475	0.7629	0.544	0.5116	0.0531	0.1459	0.0022	0.4455	0.0806							

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD									
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2
521	0.406	0.703	0.500	0.760	0.6632	0.1685	0.525	0.8495	0.2515	0.4013	0.5711	0.1068	0.5165	0.8947	0.1906	0.235	0.5711	0.1068	0.5165	0.8947	0.1906	0.235
522	0.468	0.481	0.375	0.720	0.7142	0.3269	0.6817	0.3808	0.1118	0.8778	0.5116	0.2822	0.6598	0.4636	0.0373	0.8165	0.5116	0.2822	0.6598	0.4636	0.0373	0.8165
523	0.968	0.666	0.750	0.480	0.1268	0.0127	0.7496	0.503	0.1913	0.1548	0.1839	0.0183	0.8962	0.4423	0.1695	0.297	0.1839	0.0183	0.8962	0.4423	0.1695	0.297
524	0.375	0.148	0.187	0.520	0.4332	0.647	0.8711	0.1858	0.0685	0.5845	0.0818	0.4094	0.7136	0.1364	0.0394	0.1835	0.0818	0.4094	0.7136	0.1364	0.0394	0.1835
525	0.906	0.851	0.812	0.800	0.5871	0.5174	0.8962	0.8897	>0.9999	0.8257	0.614	0.6153	0.7346	0.782	0.9181	0.8535	0.614	0.6153	0.7346	0.782	0.9181	0.8535
526	0.812	0.666	0.906	0.640	0.5871	0.4509	0.2829	0.9573	0.1246	0.6235	0.5552	0.5261	0.3899	0.8348	0.062	0.6342	0.5552	0.5261	0.3899	0.8348	0.062	0.6342
527	0.181	0.346	0.250	0.360	0.7235	0.3845	0.8062	0.9308	0.5842	0.5852	0.4735	0.1231	0.5396	0.782	0.4602	0.1154	0.4735	0.1231	0.5396	0.782	0.4602	0.1154
528	0.121	0.115	0.156	0.520	0.8195	0.1357	0.8625	0.1832	0.0942	>0.9999	0.1149	0.3456	0.4342	0.295	0.0283	0.7628	0.1149	0.3456	0.4342	0.295	0.0283	0.7628
529	0.424	0.346	0.187	0.320	0.4212	0.7082	0.7244	0.8634	0.7904	0.7735	0.0756	0.5784	0.2091	0.8348	0.3442	0.6813	0.0756	0.5784	0.2091	0.8348	0.3442	0.6813
530	0.303	0.076	0.062	0.480	0.2505	0.5089	>0.9999	0.1766	0.0095	0.503	0.0132	0.2951	0.2044	0.0248	0.016	0.0306	0.0132	0.2951	0.2044	0.0248	0.016	0.0306
531	0.636	0.615	0.718	0.560	0.6823	0.7601	0.7356	0.8516	0.4509	0.9007	0.8206	0.7115	0.6773	0.8348	0.5427	0.8977	0.8206	0.7115	0.6773	0.8348	0.5427	0.8977
532	0.060	0.115	0.343	0.080	0.1657	0.9264	0.2412	0.9448	0.1315	0.8558	0.0429	0.4094	0.214	0.0872	0.0179	0.0041	0.0429	0.4094	0.214	0.0872	0.0179	0.0041
533	0.696	0.038	0.687	0.600	0.8672	0.6821	n.e	0.0477	0.6137	0.0388	0.8206	0.7115	n.e	0.0077	0.7406	0.0094	0.8206	0.7115	n.e	0.0077	0.7406	0.0094
534	0.969	0.884	0.843	0.880	0.1898	0.4061	0.8897	>0.9999	0.9422	0.5521	0.3182	0.4482	0.7346	0.782	0.7406	0.5588	0.3182	0.4482	0.7346	0.782	0.7406	0.5588
535	1.000	0.884	0.968	1.000	0.2709	n.e	0.4807	0.1461	0.6512	0.1241	0.5402	n.e	0.4399	0.3406	0.7099	0.4638	0.5402	n.e	0.4399	0.3406	0.7099	0.4638
536	0.545	0.038	0.125	0.360	0.0514	0.4389	0.7319	0.2286	0.2139	0.1267	0.0471	0.3744	0.0221	0.019	0.6374	0.0069	0.0471	0.3744	0.0221	0.019	0.6374	0.0069
537	0.181	0.500	0.312	0.480	0.771	0.2885	0.584	0.809	0.4708	0.3292	0.1689	0.086	0.3986	0.8348	0.5025	0.1095	0.1689	0.086	0.3986	0.8348	0.5025	0.1095
538	0.515	0.923	0.375	0.680	0.6664	0.589	0.065	0.2397	0.1579	0.1604	0.4861	0.6153	0.0257	0.3284	0.0882	0.2176	0.4861	0.6153	0.0257	0.3284	0.0882	0.2176
539	0.818	0.153	0.468	0.440	0.1121	0.1319	0.2552	0.3568	0.82	0.0437	0.0879	0.2069	0.0513	0.0824	0.7406	0.0084	0.0879	0.2069	0.0513	0.0824	0.7406	0.0084
540	0.424	0.423	0.437	0.400	0.8845	0.7468	0.8733	0.7764	0.7869	0.8919	0.8206	0.6816	0.8962	0.8348	0.7406	0.8977	0.8206	0.6816	0.8962	0.8348	0.7406	0.8977
541	0.424	0.192	0.125	0.480	0.1926	0.8035	0.8607	0.5435	0.0839	0.6277	0.0975	0.8057	0.0602	0.108	0.1318	0.1127	0.0975	0.8057	0.0602	0.108	0.1318	0.1127
542	0.151	0.961	0.468	0.320	0.1331	0.4466	0.0552	0.0059	0.4633	0.0032	0.0776	0.0797	0.031	0.0186	0.5906	0.0047	0.0776	0.0797	0.031	0.0186	0.5906	0.0047
543	0.060	0.000	0.062	0.160	0.9208	0.6929	0.767	0.2525	0.6087	0.7909	0.6643	0.0318	0.0407	0.098	0.1096	0.0336	0.6643	0.0318	0.0407	0.098	0.1096	0.0336
544	0.878	0.730	0.812	0.640	0.6602	0.2768	0.7497	0.7283	0.3635	0.5807	0.7696	0.2907	0.8962	0.8348	0.4023	0.6559	0.7696	0.2907	0.8962	0.8348	0.4023	0.6559
545	1.000	1.000	0.750	0.840	0.0039	0.0406	0.1048	0.2051	0.6385	n.e	0.0609	0.1706	0.2211	0.2889	0.578	n.e	0.0609	0.1706	0.2211	0.2889	0.578	n.e
546	0.666	0.923	0.875	0.880	0.257	0.2842	0.9079	0.9527	>0.9999	0.3034	0.2755	0.34	0.7653	0.4934	0.9181	0.2729	0.2755	0.34	0.7653	0.4934	0.9181	0.2729
547	0.151	0.192	0.312	0.160	>0.9999	0.375	0.7717	>0.9999	0.723	0.8905	0.1195	0.8057	0.2548	0.5276	0.241	0.1957	0.1195	0.8057	0.2548	0.5276	0.241	0.1957
548	0.878	0.346	0.687	0.760	0.2591	0.5343	0.2683	0.1899	0.7806	0.1439	0.3352	0.6153	0.4031	0.314	0.9181	0.1434	0.3352	0.6153	0.4031	0.314	0.9181	0.1434
549	0.969	0.961	0.937	0.960	0.7319	0.8464	>0.9999	>0.9999	>0.9999	0.8832	0.4735	0.4568	0.7136	0.782	0.566	0.8535	0.4735	0.4568	0.7136	0.782	0.566	0.8535
550	0.393	0.346	0.218	0.240	0.5321	0.5992	0.7285	0.792	>0.9999	0.9004	0.1044	0.1516	0.3041	0.0872	0.8149	0.7858	0.1044	0.1516	0.3041	0.0872	0.8149	0.7858
551	0.878	0.807	0.750	0.680	0.417	0.3497	0.8496	0.6483	0.7806	0.8053	0.4987	0.3626	0.8962	0.8947	0.9181	0.8535	0.4987	0.3626	0.8962	0.8947	0.9181	0.8535
552	0.878	0.730	0.812	0.440	0.6602	0.0669	0.7497	0.3662	0.0864	0.5807	0.7696	0.1017	0.8962	0.1947	0.0666	0.6559	0.7696	0.1017	0.8962	0.1947	0.0666	0.6559
553	0.363	0.692	0.593	0.720	0.2821	0.1926	0.7324	0.9678	0.5655	0.4095	0.4214	0.1095	0.8008	0.8947	0.8149	0.2472	0.4214	0.1095	0.8008	0.8947	0.8149	0.2472

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD			
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2
554	0.303	0.384	0.343	0.520	0.7574	0.441	0.876	0.7604	0.394	0.8046	0.7696	0.1775	0.8008	0.5012	0.5025	0.667
555	0.000	0.035	0.062	0.214	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.9376	0.442	0.3854	<10 ⁻⁴	0.1781	0.1221	0.1771	0.0093	0.1054	0.0815
556	0.852	0.500	0.687	0.642	0.3775	0.318	0.5508	0.6508	0.7702	0.2597	0.3882	0.4323	0.5563	0.6082	0.9181	0.2237
557	0.382	0.250	0.406	0.571	0.7723	0.4912	0.6946	0.4302	0.496	0.7481	0.6643	0.5151	0.2548	0.0936	0.5118	0.2161
558	0.147	0.000	0.250	0.214	0.6153	0.7303	0.3083	0.1867	0.9108	0.2871	0.146	0.2316	0.1164	0.056	0.566	0.0806
559	1.000	0.821	0.968	1.000	0.2182	n.e	0.3014	0.0718	0.7375	0.0637	0.5402	n.e	0.3567	0.1629	0.7099	0.3932
560	0.794	0.964	0.968	0.964	0.1526	0.2868	0.8665	>0.9999	0.8217	0.439	0.1085	0.1608	0.8463	0.8947	0.8601	0.2588
561	0.823	0.392	0.750	0.750	0.6911	0.6965	0.2871	0.2478	0.9644	0.2132	0.8206	0.8638	0.1389	0.1334	0.9181	0.1359
562	0.029	0.071	0.125	0.285	0.4661	0.2303	0.8525	0.4258	0.4469	0.7909	0.0483	0.0381	0.1771	0.0437	0.1927	0.0336
563	0.000	0.892	0.062	0.035	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.001	0.0004	0.9076	0.0002	0.1781	0.092	0.0005	<10 ⁻⁴	0.4321	0.0025
564	0.029	0.035	0.125	0.250	0.4661	0.2782	0.7319	0.3768	0.5449	0.9223	0.0483	0.0483	0.0209	0.0302	0.2498	0.667
565	0.147	0.428	0.375	0.321	0.2479	0.3879	0.7249	0.7054	0.765	0.4664	0.0717	0.0797	0.8008	0.5666	0.566	0.0824
566	0.588	0.464	0.312	0.535	0.2766	0.7861	0.6211	0.8137	0.3595	0.7263	0.2178	0.6816	0.5476	0.7443	0.3907	0.6955
567	0.470	0.892	0.750	0.535	0.2237	0.6754	0.5157	0.1492	0.2707	0.1935	0.308	0.8057	0.5652	0.1726	0.2893	0.1883
568	0.029	0.000	0.000	0.142	>0.9999	0.4992	n.e	0.2525	0.1744	>0.9999	0.0069	0.0201	n.e	0.0622	0.4199	0.0252
569	0.029	0.071	0.062	0.178	0.7148	0.4172	0.9353	0.6429	0.4915	0.7909	0.1183	0.0409	0.4287	0.0638	0.1558	0.0336
570	0.323	0.071	0.062	0.250	0.2002	0.7596	0.9353	0.4906	0.3056	0.484	0.0122	0.5784	0.4287	0.0396	0.0955	0.0364
571	0.411	0.464	0.312	0.571	0.6078	0.5744	0.6211	0.7482	0.2705	0.8665	0.4861	0.5502	0.5476	0.6896	0.3395	0.8535
572	0.617	0.750	0.468	0.607	0.5449	0.8452	0.3397	0.5922	0.4464	0.6608	0.5552	0.8638	0.3771	0.6708	0.6598	0.7269
573	0.058	0.214	0.031	0.000	0.895	0.4035	0.4629	0.1867	0.8846	0.6211	0.0985	0.0066	0.0357	0.0386	0.4386	0.032
574	0.823	0.607	0.750	0.785	0.6911	0.8612	0.6081	0.5067	0.9134	0.5074	0.8206	0.8638	0.6773	0.5868	0.9181	0.5378
575	0.323	0.000	0.218	0.250	0.6427	0.7596	0.3679	0.1585	0.9595	0.2616	0.1743	0.5784	0.1164	0.0867	0.6188	0.0395
576	0.529	0.607	0.656	0.642	0.5545	0.6177	0.8366	0.879	0.8899	0.8165	0.614	0.8057	0.7346	0.782	0.9181	0.8535
577	0.794	0.928	0.968	1.000	0.1526	0.0579	0.7643	0.1554	0.7375	0.5572	0.1085	0.118	0.5396	0.2256	0.7099	0.4488
578	0.558	0.464	0.625	0.750	0.7697	0.4241	0.6361	0.3157	0.5007	0.7926	0.7696	0.5377	0.7136	0.349	0.5543	0.7858
579	0.529	0.107	0.093	0.107	0.0304	0.0585	0.9496	>0.9999	0.9174	0.1454	0.0027	0.0824	0.4287	0.8947	0.6188	0.0876
580	0.294	0.035	0.125	0.178	0.433	0.8319	0.7319	0.5102	0.7812	0.4333	0.0966	0.1	0.0209	0.0214	0.4602	0.037
581	0.676	0.500	0.406	0.607	0.3387	0.765	0.8094	0.7417	0.417	0.6007	0.2409	0.6816	0.6598	0.7443	0.3798	0.6955
582	0.090	0.296	0.225	0.269	0.4967	0.4619	0.8497	>0.9999	0.9595	0.5554	0.0604	0.0438	0.5396	0.7109	0.6598	0.5889
583	0.363	0.370	0.354	0.423	0.8246	0.7663	0.9333	0.8361	0.7192	0.9797	0.8206	0.4568	0.8463	0.4934	0.6598	0.8165
584	0.727	0.518	0.645	0.461	0.6864	0.3466	0.6692	0.7898	0.3582	0.5379	0.8206	0.3291	0.7653	0.7109	0.4847	0.4259
585	0.363	0.148	0.064	0.153	0.1285	0.4107	0.7463	>0.9999	0.6087	0.5845	0.0122	0.2396	0.0684	0.782	0.1403	0.1835
586	0.090	0.333	0.258	0.461	0.4135	0.1232	0.8062	0.6757	0.42	0.503	0.044	0.0356	0.2044	0.4283	0.1677	0.179

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-MI	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
587	0.060	0.111	0.193	0.000	0.4681	0.7311	0.7781	0.2958	0.2282	0.8558	0.0475	0.0066	0.1771	0.0332	0.1118	0.092							
588	0.181	0.222	0.129	0.230	0.8312	0.8469	0.7792	>0.9999	0.6569	0.8928	0.0236	0.1673	0.2091	0.782	0.3046	0.667							
589	0.363	0.185	0.129	0.076	0.2479	0.1217	0.8607	0.7476	0.7629	0.6471	0.027	0.0145	0.2751	0.0164	0.4321	0.1154							
590	0.212	0.222	0.290	0.153	0.7867	0.841	0.8959	0.8647	0.5839	0.977	0.4735	0.3188	0.1672	0.0872	0.2528	0.8165							
591	0.060	0.185	0.258	0.230	0.3164	0.4138	0.8252	0.9545	>0.9999	0.7013	0.0381	0.0376	0.4342	0.1981	0.7771	0.0362							
592	0.484	0.370	0.322	0.346	0.47	0.5841	0.8072	0.9308	0.8185	0.7799	0.2984	0.3188	0.4287	0.8348	0.8601	0.6813							
593	0.575	0.296	0.483	0.384	0.7272	0.5403	0.584	0.7616	0.7047	0.4903	0.7218	0.2591	0.2548	0.1981	0.6837	0.1586							
594	0.454	0.296	0.451	0.384	0.7761	0.6993	0.6526	0.7616	0.6889	0.6789	0.8206	0.7115	0.5748	0.1981	0.566	0.513							
595	0.333	0.481	0.354	0.192	0.9029	0.5718	0.6456	0.549	0.4751	0.6619	0.6643	0.1	0.5396	0.0743	0.2785	0.6146							
596	0.121	0.407	0.225	0.192	0.6065	0.7407	0.5813	0.4872	0.9319	0.3852	0.0985	0.1402	0.2091	0.0851	0.566	0.2568							
597	0.333	0.407	0.225	0.461	0.6412	0.6323	0.5813	0.9037	0.4765	0.8353	0.1743	0.4094	0.2091	0.7443	0.1969	0.667							
598	0.424	0.222	0.290	0.038	0.532	0.0976	0.8959	0.442	0.1567	0.6828	0.2984	0.0014	0.1672	0.0103	0.0496	0.1154							
599	0.181	0.222	0.290	0.307	0.8099	0.8319	0.8959	0.8385	>0.9999	0.8928	0.2317	0.1402	0.1672	0.4283	0.8601	0.667							
600	0.575	0.481	0.451	0.692	0.557	0.658	0.8662	0.5033	0.2981	0.8444	0.5116	0.8057	0.8463	0.5371	0.2329	0.7858							
601	0.727	0.407	0.645	0.576	0.6864	0.5343	0.4926	0.6258	0.7571	0.439	0.8206	0.6363	0.3453	0.5012	0.7406	0.2334							
602	0.393	0.370	0.161	0.115	0.321	0.2776	0.4169	0.2001	0.7887	0.8701	0.0422	0.0183	0.096	0.5467	0.5906	0.7628							
603	0.030	0.111	0.096	0.269	0.6127	0.2303	>0.9999	0.606	0.3498	0.7257	0.0529	0.0483	0.4287	0.0638	0.1558	0.032							
604	0.212	0.259	0.451	0.153	0.4181	0.841	0.6122	0.7782	0.1873	0.9532	0.1358	0.3188	0.2422	0.1384	0.0626	0.667							
605	0.151	0.037	0.096	0.000	0.8195	0.4172	0.8226	0.9111	0.5272	0.6874	0.1743	0.0209	0.0141	0.0442	0.2153	0.0183							
606	0.151	0.407	0.290	0.384	0.634	0.3082	0.7309	0.8769	0.669	0.5256	0.1195	0.0733	0.5396	0.8348	0.6032	0.0754							
607	0.060	0.259	0.387	0.153	0.1008	0.6929	0.7372	0.7782	0.2592	0.514	0.0425	0.0243	0.5748	0.1384	0.4762	0.0469							
608	0.757	0.666	0.612	0.653	0.5233	0.6488	0.8366	0.9573	0.8401	0.7855	0.6387	0.8638	0.8463	0.8947	0.8601	0.8977							
609	0.060	0.518	0.322	0.346	0.2002	0.2459	0.5735	0.5817	0.8185	0.2108	0.0429	0.0235	0.3986	0.3821	0.8601	0.0332							
610	0.121	0.444	0.322	0.538	0.2897	0.1062	0.7231	0.7184	0.3595	0.4094	0.1967	0.0168	0.5396	0.4934	0.3907	0.0496							
611	0.363	0.222	0.290	0.192	0.741	0.4917	0.8959	>0.9999	0.8331	0.7115	0.5116	0.0889	0.1672	0.5276	0.4455	0.2075							
612	0.090	0.370	0.419	0.615	0.1041	0.0316	0.8073	0.3657	0.4509	0.3544	0.0552	0.0157	0.7653	0.3575	0.3798	0.179							
613	0.181	0.259	0.354	0.461	0.4626	0.2885	0.8034	0.5955	0.5049	0.8518	0.1195	0.086	0.4342	0.1802	0.6598	0.2301							
614	0.484	0.703	0.516	0.615	0.8329	0.5757	0.5508	0.716	0.6933	0.5865	0.6643	0.5964	0.5165	0.8348	0.8149	0.5808							
615	0.121	0.222	0.290	0.192	0.433	0.7407	0.8959	>0.9999	0.8331	0.7591	0.0913	0.1402	0.1672	0.5276	0.4455	0.092							
616	0.212	0.222	0.193	0.230	0.944	0.9688	0.9572	1	0.9319	0.977	0.7218	0.8057	0.4287	0.782	0.6598	0.8165							
617	0.300	0.421	0.433	0.350	0.532	0.9237	0.8733	0.8769	0.6156	0.7717	0.3472	0.4568	0.8463	0.5276	0.566	0.0513							
618	0.400	0.315	0.600	0.250	0.4421	0.6424	0.3611	>0.9999	0.1981	0.9004	0.4405	0.1473	0.2401	0.458	0.0429	0.6813							
619	0.000	0.000	0.300	0.000	0.0623	n.e	0.2523	n.e	0.0744	n.e	0.0483	n.e	0.0887	n.e	0.0403	n.e							

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD							
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M1	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M1	MI-M2	NM1-NM2		
620	0.333	0.052	0.200	0.050	0.5496	0.1976	0.5833	>0.9999	0.3854	0.3544	0.0948	0.0027	0.0539	0.8348	0.0725	0.0026	0.0026			
621	0.166	0.210	0.100	0.000	0.8043	0.344	0.7652	0.4057	0.5272	>0.9999	0.0948	0.0209	0.0684	0.028	0.2354	0.1957	0.1957			
622	0.166	0.263	0.066	0.150	0.5587	>0.9999	0.5073	0.7782	0.6087	0.8218	0.0444	0.6816	0.0196	0.0167	0.3349	0.1705	0.1705			
623	0.000	0.105	0.000	0.050	n.e	0.4035	0.3533	0.9358	0.3846	0.368	n.e	0.0327	0.0019	0.0032	0.199	0.0028	0.0028			
624	0.900	0.684	0.733	0.850	0.3181	0.9524	>0.9999	0.5507	0.5175	0.4252	0.3536	0.8057	0.8962	0.6708	0.578	0.4302	0.4302			
625	0.633	0.000	0.133	0.050	0.0193	0.0126	0.5709	0.9111	0.6087	0.0548	0.0119	0.0001	0.1148	0.0428	0.1845	0.0091	0.0091			
626	0.933	0.157	0.766	0.800	0.2397	0.4301	n.e	0.0148	>0.9999	0.0064	0.3601	0.4835	n.e	0.0127	0.9181	0.0133	0.0133			
627	0.000	0.368	0.000	0.000	n.e	n.e	<10 ⁻⁴	0.0875	n.e	<10 ⁻⁴	n.e	0.0659	0.03	0.0242	n.e	0.0654	0.0654			
628	0.566	0.631	0.433	0.250	0.5357	0.2873	0.6006	0.2822	0.4645	0.8882	0.5116	0.4568	0.595	0.0845	0.3007	0.8535	0.8535			
629	0.933	0.842	1.000	0.900	0.1497	0.9819	0.093	>0.9999	0.0528	0.6529	0.3031	0.0817	0.3857	0.5276	0.1845	0.6243	0.6243			
630	0.166	0.000	0.166	0.300	>0.9999	0.7212	0.425	0.2286	0.6513	0.4842	0.8206	0.0409	0.1148	0.0768	0.3046	0.0717	0.0717			
631	0.000	0.052	0.200	0.000	0.1332	n.e	0.5833	0.9111	0.1703	0.4223	0.1301	0.0483	0.0539	0.0089	0.0279	0.0034	0.0034			
632	0.033	0.157	0.133	0.200	0.5089	0.4538	>0.9999	>0.9999	0.7812	0.6129	0.0198	0.0472	0.2044	0.1981	0.1748	0.0238	0.0238			
633	0.033	0.631	0.166	0.300	0.4151	0.2303	0.0778	0.3598	0.6513	<10 ⁻⁴	0.0152	0.0406	0.0273	0.1203	0.3046	0.0187	0.0187			
634	0.066	0.052	0.200	0.300	0.4681	0.3393	0.5833	0.3689	0.8331	>0.9999	0.0571	0.0135	0.0539	0.0332	0.4602	0.3197	0.3197			
635	0.233	0.421	0.333	0.100	0.6412	0.6352	0.8723	0.2296	0.1343	0.6519	0.4735	0.1473	0.2044	0.0129	0.1054	0.1932	0.1932			
636	0.000	0.157	0.133	0.500	0.209	<10 ⁻⁴	>0.9999	0.1554	0.0839	<10 ⁻⁴	0.1536	0.1673	0.2044	0.0824	0.1318	0.1513	0.1513			
637	0.233	0.421	0.100	0.150	0.4967	0.7412	0.2877	0.4173	0.9271	0.6519	0.025	0.5261	0.0506	0.0585	0.1748	0.1932	0.1932			
638	0.200	0.000	0.166	0.250	0.946	>0.9999	0.425	0.3451	0.7632	0.4322	0.5116	0.4168	0.1148	0.0032	0.1748	0.0032	0.0032			
639	0.833	0.578	0.900	0.650	0.7444	0.4032	0.2036	0.9898	0.126	0.4425	0.7218	0.0233	0.2304	0.782	0.0806	0.4847	0.4847			
640	0.866	0.789	0.866	0.950	>0.9999	0.5323	0.8706	0.3808	0.4549	0.8933	0.8206	0.0367	0.8008	0.2607	0.4847	0.8535	0.8535			
641	0.033	0.210	0.300	0.450	0.1666	0.0703	0.8497	0.6115	0.5494	0.4842	0.005	0.049	0.4342	0.1143	0.4602	0.0022	0.0022			
642	0.033	0.105	0.033	0.050	>0.9999	>0.9999	0.7887	0.9358	>0.9999	0.8128	0.8206	n.e	0.0184	0.0032	0.1748	0.0061	0.0061			
643	0.200	0.052	0.633	0.550	0.0935	0.0968	0.0309	0.0953	0.7571	0.6336	0.0335	n.e	0.0006	0.0016	0.7406	0.0192	0.0192			
644	0.000	0.315	0.100	0.000	0.2594	n.e	0.4868	0.2286	0.5272	<10 ⁻⁴	0.1553	n.e	0.0332	0.0288	0.2354	0.0578	0.0578			
645	0.333	0.631	0.633	0.200	0.2185	0.6631	0.9654	0.0899	0.1768	0.4903	0.3182	0.1516	0.8463	0.0451	0.0098	0.5072	0.5072			
646	0.766	0.000	0.700	0.550	0.8177	0.4346	n.e	0.0383	0.525	0.014	0.8206	0.5042	n.e	0.0127	0.7771	0.0028	0.0028			
647	0.900	0.894	0.866	0.750	0.9431	0.4241	>0.9999	0.5327	0.5051	>0.9999	0.7696	0.4935	0.7346	0.6082	0.8149	0.8165	0.8165			
648	0.266	0.000	0.166	0.550	0.617	0.3174	0.425	0.0383	0.0518	0.3495	0.0948	0.1276	0.1148	0.0127	0.0283	0.0629	0.0629			
649	0.700	0.105	0.833	0.700	0.4671	>0.9999	n.e	0.0251	0.5175	0.0526	0.6387	0.7512	n.e	0.0798	0.5543	0.0391	0.0391			
650	0.900	0.894	0.766	0.600	0.4017	0.1588	0.6081	0.2135	0.4602	>0.9999	0.4309	0.2165	0.6447	0.3174	0.578	0.8165	0.8165			
651	0.533	0.368	0.366	0.750	0.415	0.4163	0.9854	0.2478	0.0984	0.7466	0.2984	0.4935	0.8463	0.2801	0.0702	0.474	0.474			
652	0.333	0.578	0.266	0.300	0.8096	0.9237	0.4053	0.4235	>0.9999	0.5474	0.5116	0.6816	0.1258	0.1554	0.6188	0.5588	0.5588			

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
653	0.233	0.315	0.400	0.650	0.5697	0.0622	0.8723	0.3158	0.2521	0.9136	0.2317	0.0547	0.7136	0.1517	0.151	0.0513							
654	0.100	0.052	0.600	0.500	0.0273	0.0976	0.0576	0.1212	0.6933	0.9446	0.2891	0.0356	0.0006	0.0038	0.7771	0.0011							
655	0.758	0.791	0.965	0.888	0.1207	0.5306	0.2497	0.675	0.4055	>0.9999	0.1221	0.5042	0.2059	0.6375	0.3907	0.8977							
656	0.793	0.625	0.862	0.777	0.6847	>0.9999	0.3642	0.594	0.6223	0.6225	0.7218	0.8638	0.408	0.6524	0.8149	0.7448							
657	0.655	0.708	0.862	0.703	0.2916	0.8095	0.5186	>0.9999	0.3575	0.8963	0.3955	0.7512	0.6057	0.8947	0.4081	0.8165							
658	0.413	0.416	0.586	0.814	0.4718	0.1316	0.6319	0.2034	0.2635	0.808	0.5258	0.1872	0.5318	0.0763	0.2652	0.8165							
659	0.793	1.000	0.965	0.962	0.1672	0.2868	0.7717	0.6284	>0.9999	0.2394	0.1085	0.174	0.6299	0.5566	0.8601	0.1							
660	0.034	0.166	0.000	0.074	0.8942	0.7579	0.2674	0.7504	0.298	0.6492	0.0289	0.0582	0.1308	0.0164	0.12	0.0028							
661	0.034	0.083	0.137	0.111	0.5089	0.6367	0.8525	>0.9999	0.9271	0.8128	0.0198	0.0434	0.1771	0.1981	0.6837	0.0336							
662	0.448	0.291	0.620	0.148	0.5137	0.2595	0.3617	0.6707	0.0161	0.7101	0.5258	0.0226	0.1242	0.0967	0.0046	0.513							
663	0.206	0.041	0.103	0.074	0.5927	0.6019	0.8226	0.9364	0.9184	0.6161	0.0286	0.0187	0.0485	0.1642	0.5906	0.0187							
664	0.724	0.625	0.793	0.592	0.8177	0.5764	0.5608	0.8824	0.3035	0.7832	0.8206	0.7115	0.6773	0.8348	0.354	0.8977							
665	0.689	0.583	0.758	0.592	0.8122	0.6851	0.5157	0.8624	0.4553	0.7775	0.8206	0.7115	0.5652	0.8947	0.578	0.7858							
666	0.862	0.583	0.931	0.888	0.692	0.9414	0.1299	0.2135	0.8399	0.3716	0.5116	0.6816	0.1051	0.2859	0.6598	0.2814							
667	0.482	0.000	0.448	0.407	0.7963	0.7622	0.0393	0.0577	0.7869	0.1324	0.5905	0.2486	0.0456	0.025	0.7771	0.0158							
668	0.551	0.625	0.586	0.518	0.8294	0.8647	0.8897	0.6997	0.7404	0.8493	0.6643	0.6816	0.8463	0.7109	0.7771	0.8535							
669	0.827	0.958	0.896	0.888	0.7444	0.8039	0.7308	0.6843	>0.9999	0.5346	0.7218	0.7115	0.4342	0.5767	0.8601	0.4902							
670	0.517	0.500	0.655	0.814	0.5545	0.2054	0.6501	0.2859	0.4076	0.9139	0.614	0.2995	0.6447	0.232	0.4023	0.7628							
671	0.931	0.750	0.896	0.888	0.9377	0.865	0.5068	0.5503	>0.9999	0.4068	0.7696	0.5964	0.4819	0.5183	0.8601	0.3386							
672	0.482	0.583	0.724	0.592	0.3138	0.7345	0.6401	0.8624	0.4966	0.8268	0.3411	0.6153	0.7653	0.8947	0.7771	0.5189							
673	0.241	0.291	0.620	0.481	0.1657	0.4423	0.3617	0.5651	0.4911	0.9801	0.0615	0.1375	0.1242	0.2342	0.5427	0.667							
674	0.896	1.000	0.931	0.814	0.9377	0.6666	0.4571	0.1247	0.3767	0.4079	0.7218	0.6153	0.3943	0.2196	0.2329	0.3971							
675	0.931	0.958	0.965	0.925	0.9731	>0.9999	>0.9999	0.9878	0.7075	0.9937	0.3809	0.7512	0.8008	0.6896	0.6032	0.6813							
676	0.965	0.833	0.965	0.925	>0.9999	0.7468	0.4198	0.6508	0.7075	0.491	0.8206	0.4094	0.197	0.5094	0.6032	0.2472							
677	0.448	0.833	0.620	0.703	0.5137	0.3269	0.434	0.6483	0.6228	0.3112	0.5258	0.2822	0.4695	0.6524	0.8601	0.2418							
678	0.965	0.958	1.000	1.000	0.3698	0.6657	0.4596	0.554	n.e	>0.9999	0.4121	0.4656	0.349	0.5467	n.e	0.8535							
679	0.931	0.875	0.931	0.925	>0.9999	>0.9999	0.8615	0.9263	>0.9999	0.8892	0.8206	0.7512	0.6598	0.6226	0.8601	0.667							
680	0.862	0.958	0.896	0.925	0.9431	0.7463	0.7308	0.9878	0.9788	0.6392	0.7218	0.5784	0.4342	0.6896	0.7771	0.5313							
681	0.242	0.074	0.272	0.206	0.8903	0.8805	0.4868	0.6565	0.8331	0.612	0.7696	0.2486	0.0539	0.0552	0.5906	0.0242							
682	0.121	0.000	0.393	0.413	0.182	0.2273	0.1173	0.0577	0.6645	0.6129	0.0547	0.115	0.0391	0.025	0.8601	0.0806							
683	0.151	0.407	0.515	0.413	0.0933	0.3135	0.7308	0.7764	0.6192	0.5256	0.0495	0.0733	0.7136	0.8947	0.6837	0.0754							
684	0.424	0.777	0.333	0.689	0.6062	0.3974	0.2079	0.7452	0.1418	0.361	0.5116	0.3878	0.1274	0.8947	0.2303	0.4392							
685	0.272	0.555	0.484	0.655	0.4331	0.2545	0.7933	0.7065	0.4542	0.5484	0.2129	0.0959	0.8008	0.7443	0.3691	0.197							

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD									
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2
686	0.727	0.518	0.454	0.689	0.242	0.8167	0.7623	0.5655	0.2981	0.5379	0.2409	0.8638	0.8008	0.6082	0.2329	0.4259	0.3031	0.3878	0.2704	0.6082	0.0527	0.667
687	0.939	0.888	1.000	0.793	0.4377	0.3244	0.1007	0.675	0.0044	0.8088	0.3031	0.3878	0.2704	0.6082	0.0527	0.667	0.8206	0.8057	0.8008	0.8947	0.8149	0.8535
688	0.030	0.000	0.303	0.034	0.1666	0.9035	0.2183	0.9111	0.11	0.9223	0.0318	0.4568	0.0909	0.0428	0.0572	0.0252	0.8206	0.8057	0.8008	0.8947	0.8149	0.8535
689	0.878	0.814	0.878	0.793	0.9431	0.6453	0.7817	>0.9999	0.5703	0.8142	0.8206	0.8057	0.8008	0.8947	0.8149	0.8535	0.2317	0.2316	0.0672	0.0506	0.7406	0.0345
690	0.212	0.037	0.333	0.310	0.6427	0.7744	0.2983	0.2718	0.8448	0.5593	0.2317	0.2316	0.0672	0.0506	0.7406	0.0345	0.0913	0.0007	0.0909	0.0428	0.0572	0.0806
691	0.121	0.000	0.303	0.034	0.433	0.6367	0.2183	0.9111	0.11	0.6129	0.0913	0.0007	0.0909	0.0428	0.0572	0.0806	0.2058	0.4402	0.4951	0.5566	0.5322	n.e
692	1.000	1.000	0.909	0.965	0.2806	0.2736	0.4024	0.7092	0.6133	n.e	0.2058	0.4402	0.4951	0.5566	0.5322	n.e	0.5711	0.1516	0.8008	0.0845	0.166	0.6243
693	0.393	0.555	0.484	0.241	0.7497	0.5992	0.7933	0.3826	0.279	0.6561	0.5711	0.1516	0.8008	0.0845	0.166	0.6243	0.5258	0.5784	0.413	0.5566	0.4259	0.4216
694	0.939	1.000	0.878	0.965	0.571	>0.9999	0.3065	0.7092	0.4238	0.6246	0.5258	0.5784	0.413	0.5566	0.4259	0.4216	0.0236	0.0079	0.0491	0.0288	n.e	0.1705
695	0.181	0.296	0.000	0.000	0.1693	0.1903	0.144	0.1305	n.e	0.8852	0.0236	0.0079	0.0491	0.0288	n.e	0.1705	0.0422	0.8638	0.1459	0.0187	0.0964	0.0283
696	0.454	0.000	0.181	0.448	0.4636	0.8679	0.425	0.0327	0.2187	0.1324	0.0422	0.8638	0.1459	0.0187	0.0964	0.0283	0.1743	0.0703	0.0407	0.0778	0.6188	0.0717
697	0.090	0.000	0.060	0.068	0.7753	0.9264	0.767	0.7573	0.9076	0.6937	0.1743	0.0703	0.0407	0.0778	0.6188	0.0717	0.0329	0.0047	0.0617	0.0475	0.7099	0.2161
698	0.060	0.037	0.272	0.103	0.3164	0.7907	0.3912	0.8169	0.3368	0.9449	0.0329	0.0047	0.0617	0.0475	0.7099	0.2161	0.1689	0.8638	0.595	0.05	0.166	0.1047
699	0.212	0.555	0.393	0.206	0.5321	0.9472	0.5933	0.2689	0.3992	0.3833	0.1689	0.8638	0.595	0.05	0.166	0.1047	0.5258	0.7512	0.0369	0.0267	0.6837	0.0364
700	0.363	0.074	0.484	0.379	0.6968	0.925	0.1895	0.2647	0.6133	0.2149	0.5258	0.7512	0.0369	0.0267	0.6837	0.0364	0.0985	0.0483	0.0442	0.782	0.0891	0.0544
701	0.030	0.259	0.060	0.275	0.7148	0.2303	0.4477	>0.9999	0.2338	0.4656	0.0985	0.0483	0.0442	0.782	0.0891	0.0544	0.7696	0.4935	0.2174	0.3284	0.8149	0.2176
702	0.909	0.481	0.878	0.793	0.8369	0.4729	0.1432	0.249	0.5703	0.187	0.7696	0.4935	0.2174	0.3284	0.8149	0.2176	0.0985	0.1	0.0399	0.0184	0.6188	0.0569
703	0.060	0.333	0.030	0.034	0.7148	0.9017	0.2422	0.2718	0.8846	0.4173	0.0985	0.1	0.0399	0.0184	0.6188	0.0569	0.1004	0.3512	0.5848	0.5968	0.9181	0.1757
704	0.303	0.814	0.636	0.655	0.219	0.262	0.5213	0.5507	0.8148	0.2525	0.1004	0.3512	0.5848	0.5968	0.9181	0.1757	0.0286	0.1	0.0937	0.0428	0.6188	0.0064
705	0.062	0.000	0.030	0.034	0.7148	0.9017	0.915	0.9111	0.8846	0.7909	0.0286	0.1	0.0937	0.0428	0.6188	0.0064	0.0092	0.0209	0.0407	n.e	0.2968	0.0806
706	0.156	0.000	0.060	0.000	0.5424	0.2267	0.767	n.e	0.3846	0.544	0.0092	0.0209	0.0407	n.e	0.2968	0.0806	0.8206	0.6363	0.1784	0.2919	0.578	0.1375
707	0.781	0.407	0.757	0.620	0.9349	0.4823	0.293	0.5016	0.4532	0.3111	0.8206	0.6363	0.1784	0.2919	0.578	0.1375	0.0023	0.0209	0.0937	n.e	0.4386	0.0806
708	0.156	0.000	0.030	0.000	0.3812	0.2267	0.915	n.e	>0.9999	0.544	0.0023	0.0209	0.0937	n.e	0.4386	0.0806	0.8206	0.3568	0.3607	0.7443	0.2057	0.4051
709	0.718	0.925	0.696	0.896	0.8679	0.342	0.2623	0.9883	0.2283	0.403	0.8206	0.3568	0.3607	0.7443	0.2057	0.4051	0.0226	0.3188	0.0948	0.0316	0.3744	0.0328
710	0.093	0.037	0.000	0.068	<10 ⁻⁴	0.9264	0.415	0.9364	<10 ⁻⁴	0.8445	0.0226	0.3188	0.0948	0.0316	0.3744	0.0328	n.e	n.e	0.1113	0.0386	n.e	0.1605
711	0.000	0.185	0.000	0.000	n.e	n.e	0.2276	0.2201	n.e	0.2575	n.e	n.e	0.1113	0.0386	n.e	0.1605	0.2287	0.0757	0.6598	0.6896	0.3964	0.1154
712	0.156	0.296	0.242	0.379	0.7162	0.339	0.8831	0.7616	0.4895	0.7403	0.2287	0.0757	0.6598	0.6896	0.3964	0.1154	0.0463	0.3188	0.6598	0.4934	0.4602	0.2075
713	0.437	0.259	0.212	0.310	0.4965	0.6656	0.9461	0.8747	0.7187	0.6727	0.0463	0.3188	0.6598	0.4934	0.4602	0.2075	n.e	0.2864	0.0008	0.0038	0.3304	0.0109
714	1.000	0.222	1.000	0.931	n.e	0.1832	<10 ⁻⁴	0.0011	0.1061	<10 ⁻⁴	n.e	0.2864	0.0008	0.0038	0.3304	0.0109	0.7696	0.7512	n.e	0.0084	0.7406	0.0042
715	0.906	0.185	0.878	0.896	0.9758	0.9455	n.e	0.0031	0.9332	0.0113	0.7696	0.7512	n.e	0.0084	0.7406	0.0042	0.8206	0.4245	0.8962	0.7109	0.5427	0.8977
716	0.718	0.629	0.666	0.517	0.8134	0.4419	0.8706	0.6641	0.5103	0.7832	0.8206	0.4245	0.8962	0.7109	0.5427	0.8977	0.3411	0.2703	0.5563	0.4033	0.0527	0.8165
717	0.937	0.925	0.818	1.000	0.4133	0.3854	0.564	0.1554	0.0437	0.9211	0.3411	0.2703	0.5563	0.4033	0.0527	0.8165	0.5711	0.2486	0.0294	0.0867	0.4455	0.0629
718	0.281	0.000	0.363	0.241	0.7047	0.869	0.177	0.1585	0.5901	0.3121	0.5711	0.2486	0.0294	0.0867	0.4455	0.0629						

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD									
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2
719	0.781	0.481	0.454	0.448	0.1521	0.2066	0.833	0.8798	0.8391	0.4269	0.0863	0.1299	0.8463	0.8348	0.9181	0.4051	0.5402	0.3456	0.5396	0.8348	0.6032	0.5734
720	1.000	0.923	0.965	0.925	0.2322	0.0968	0.8733	>0.9999	0.7075	0.1908	0.7218	0.0458	0.5748	0.5666	0.1003	0.5313	0.146	0.0508	0.1999	0.0585	0.1948	0.049
721	0.531	0.307	0.482	0.222	0.7929	0.3168	0.5735	0.8385	0.353	0.6005	0.7218	0.0458	0.5748	0.5666	0.1003	0.5313	0.146	0.0508	0.1999	0.0585	0.1948	0.049
722	0.062	0.384	0.103	0.148	0.784	0.6929	0.1759	0.3675	0.7685	0.3558	0.146	0.0508	0.1999	0.0585	0.1948	0.049	0.1116	0.4094	0.023	0.0506	0.5906	0.0424
723	0.250	0.038	0.482	0.333	0.3769	0.7596	0.1363	0.2821	0.4633	0.504	0.1116	0.4094	0.023	0.0506	0.5906	0.0424	0.8206	0.1723	0.4884	0.1177	0.2104	0.6342
724	0.687	0.846	0.655	0.407	0.8488	0.3571	0.4834	0.1134	0.3149	0.5942	0.8206	0.1723	0.4884	0.1177	0.2104	0.6342	0.4309	0.6153	0.257	0.3245	0.9181	0.6813
725	0.500	0.384	0.724	0.629	0.3138	0.6046	0.3182	0.4	0.6346	0.7799	0.4309	0.6153	0.257	0.3245	0.9181	0.6813	0.0062	0.0113	n.e	n.e	0.0007	0.0252
726	0.031	0.000	0.551	0.000	0.0113	0.9035	n.e	n.e	0.0038	0.9223	0.0062	0.0113	n.e	n.e	0.0007	0.0252	0.0226	0.0274	0.0491	0.0208	0.1418	0.5889
727	0.093	0.307	0.000	0.037	0.5779	0.7907	0.0139	0.3379	0.3846	0.5554	0.0226	0.0274	0.0491	0.0208	0.1418	0.5889	n.e	0.2782	0.3344	0.8947	0.3171	0.4638
728	1.000	0.884	1.000	0.888	n.e	0.0622	0.1634	>0.9999	0.0279	0.1241	n.e	0.2782	0.3344	0.8947	0.3171	0.4638	0.7696	0.3744	0.2982	0.8348	0.2856	0.5014
729	0.562	0.384	0.655	0.370	0.6451	0.4912	0.4471	0.9786	0.2445	0.6271	0.7696	0.3744	0.2982	0.8348	0.2856	0.5014	0.5258	0.1934	0.125	0.3075	0.4081	0.1017
730	0.406	0.961	0.586	0.777	0.4976	0.177	0.0907	0.2744	0.3493	0.0543	0.5258	0.1934	0.125	0.3075	0.4081	0.1017	0.8206	0.4021	0.1835	0.7443	0.2717	0.2708
731	0.812	0.500	0.827	0.592	>0.9999	0.3497	0.2382	0.8028	0.2209	0.3646	0.8206	0.4021	0.1835	0.7443	0.2717	0.2708	n.e	0.2782	n.e	0.3621	0.3171	n.e
732	1.000	1.000	1.000	0.888	n.e	0.0622	n.e	0.1461	0.0279	n.e	n.e	0.2782	n.e	0.3621	0.3171	n.e	0.4612	0.6582	0.0954	0.1542	0.8601	0.2947
733	0.656	0.384	0.827	0.777	0.3834	0.5864	0.1266	0.1687	0.8288	0.5289	0.4612	0.6582	0.0954	0.1542	0.8601	0.2947	0.5552	0.5261	0.0275	0.2919	0.173	0.1469
734	0.812	0.423	0.896	0.666	0.6241	0.494	0.0815	0.4663	0.1852	0.3067	0.5552	0.5261	0.0275	0.2919	0.173	0.1469	0.1536	0.1221	0.0977	0.2458	0.3046	0.1605
735	0.000	0.230	0.103	0.185	0.2594	<10 ⁻⁴	0.6848	0.9545	0.6376	0.2269	0.1536	0.1221	0.0977	0.2458	0.3046	0.1605	0.0002	0.0045	0.0491	0.2434	0.4199	0.0569
736	0.058	0.307	0.000	0.111	0.7148	0.7907	0.0139	0.5315	0.2295	0.4649	0.0002	0.0045	0.0491	0.2434	0.4199	0.0569	0.0401	n.e	0.0184	0.0332	0.0984	0.1513
737	0.000	0.115	0.034	0.000	0.3942	n.e	0.6908	0.2958	0.8846	0.3259	0.0401	n.e	0.0184	0.0332	0.0984	0.1513	0.3955	0.8638	0.1797	0.1249	0.1825	0.2061
738	0.676	1.000	0.862	0.629	0.3116	0.8148	0.2847	0.0408	0.1956	0.0943	0.3955	0.8638	0.1797	0.1249	0.1825	0.2061	0.8206	0.2907	0.5239	0.1697	0.1712	0.5313
739	0.588	0.346	0.586	0.851	0.8984	0.2422	0.4107	0.1088	0.1852	0.4701	0.8206	0.2907	0.5239	0.1697	0.1712	0.5313	0.1044	0.1516	0.0497	0.0332	0.8601	0.0349
740	0.382	0.038	0.206	0.222	0.5321	0.5788	0.5696	0.442	>0.9999	0.155	0.1044	0.1516	0.0497	0.0332	0.8601	0.0349	0.5402	n.e	0.4399	0.266	0.7099	0.1321
741	1.000	0.846	0.965	1.000	0.2322	n.e	0.4266	0.1373	0.5907	0.0978	0.5402	n.e	0.4399	0.266	0.7099	0.1321	0.7696	0.7115	0.8962	0.3012	0.364	0.5517
742	0.588	0.807	0.689	0.481	0.6228	0.5757	0.658	0.249	0.3527	0.4981	0.7696	0.7115	0.8962	0.3012	0.364	0.5517	0.7696	0.7512	0.8962	0.7109	0.9181	0.8535
743	0.588	0.730	0.655	0.629	0.7487	0.8024	0.8072	0.7341	0.842	0.6716	0.7696	0.7512	0.8962	0.7109	0.9181	0.8535	0.4987	0.7512	n.e	0.0011	0.578	0.0036
744	0.882	0.076	0.758	0.851	0.419	0.9414	n.e	0.0031	0.5831	0.008	0.4987	0.7512	n.e	0.0011	0.578	0.0036	0.0736	0.1473	n.e	0.1786	0.6837	0.0366
745	0.176	0.730	0.137	0.111	0.8312	0.8244	n.e	0.0186	0.9271	0.1058	0.0736	0.1473	n.e	0.1786	0.6837	0.0366	0.0217	0.0164	0.0121	0.0092	0.2202	0.1384
746	0.235	0.538	0.034	0.074	0.3047	0.5042	0.0824	0.1118	0.7053	0.4571	0.0217	0.0164	0.0121	0.0092	0.2202	0.1384	0.3031	0.7115	0.0606	0.3821	0.1107	0.667
747	0.382	0.500	0.103	0.333	0.1527	0.8066	0.2259	0.5999	0.2625	0.7799	0.3031	0.7115	0.0606	0.3821	0.1107	0.667	0.5905	0.6816	0.16	0.1726	0.9181	0.4438
748	0.441	0.730	0.413	0.407	0.8845	0.7406	0.3401	0.3409	0.7075	0.4706	0.5905	0.6816	0.16	0.1726	0.9181	0.4438	n.e	0.0715	0.1308	0.0739	0.0945	0.1513
749	0.000	0.115	0.000	0.259	n.e	<10 ⁻⁴	0.3038	0.6268	0.0705	0.3259	n.e	0.0715	0.1308	0.0739	0.0945	0.1513	0.3031	0.5784	0.5022	0.5666	0.6374	0.8535
750	0.941	0.923	1.000	0.962	0.3345	>0.9999	0.1418	0.8656	0.2886	0.9211	0.3031	0.5784	0.5022	0.5666	0.6374	0.8535	n.e	n.e	0.1308	0.0332	n.e	0.1513
751	0.000	0.115	0.000	0.000	n.e	n.e	0.3038	0.2958	n.e	0.3259	n.e	n.e	0.1308	0.0332	n.e	0.1513	n.e	n.e	0.1308	0.0332	n.e	0.1513

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetsellD									
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-MI	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2
752	0.647	0.576	0.827	0.888	0.3775	0.2499	0.3542	0.2135	0.7634	0.8083	0.4612	0.2455	0.4457	0.2505	0.7771	0.7628	0.4612	0.2455	0.4457	0.2505	0.7771	0.7628
753	0.205	0.000	0.482	0.259	0.3831	0.8805	0.0785	0.1585	0.3459	0.4269	0.0921	0.1673	0.03	0.0867	0.2035	0.0713	0.0921	0.1673	0.03	0.0867	0.2035	0.0713
754	0.852	0.769	0.896	0.925	0.8984	0.6046	0.5628	0.4398	0.9788	0.7832	0.7218	0.5632	0.6165	0.4494	0.7771	0.8535	0.7218	0.5632	0.6165	0.4494	0.7771	0.8535
755	1.000	0.961	1.000	0.888	n.e	0.0827	0.4596	0.6858	0.0279	0.3163	n.e	0.2023	0.5094	0.5767	0.3171	0.5889	n.e	0.2023	0.5094	0.5767	0.3171	0.5889
756	0.911	1.000	0.862	0.851	0.7842	0.7463	0.2847	0.1373	>0.9999	0.4717	0.7696	0.6153	0.1797	0.2889	0.9181	0.3971	0.7696	0.6153	0.1797	0.2889	0.9181	0.3971
757	0.636	0.785	0.812	0.727	0.3775	0.6865	0.9684	0.9473	0.6448	0.6616	0.4612	0.8057	0.8962	0.8947	0.9181	0.7269	0.4612	0.8057	0.8962	0.8947	0.9181	0.7269
758	0.666	0.714	0.468	0.681	0.4024	0.9592	0.4047	0.9678	0.3265	0.8663	0.3292	0.7512	0.3528	0.8947	0.5118	0.8977	0.3292	0.7512	0.3528	0.8947	0.5118	0.8977
759	0.787	0.964	1.000	0.954	0.0503	0.2486	0.282	>0.9999	0.2417	0.361	0.0803	0.1592	0.5094	0.4934	0.4682	0.2588	0.0803	0.1592	0.5094	0.4934	0.4682	0.2588
760	0.848	0.428	0.718	0.954	0.47	0.4126	0.3901	0.0551	0.0879	0.2607	0.6912	0.229	0.2774	0.002	0.0323	0.1695	0.6912	0.229	0.2774	0.002	0.0323	0.1695
761	0.000	0.392	0.093	0.090	<10-4	0.3294	0.1759	0.263	>0.9999	0.0287	0.1553	0.0141	0.0506	0.0038	0.8601	0.075	0.1553	0.0141	0.0506	0.0038	0.8601	0.075
762	0.666	0.107	0.406	0.500	0.3387	0.5174	0.3476	0.1944	0.7047	0.0746	0.167	0.5632	0.4634	0.0312	0.6598	0.0088	0.167	0.5632	0.4634	0.0312	0.6598	0.0088
763	0.333	0.178	0.375	0.090	0.8142	0.1627	0.5431	0.7529	0.1383	0.7673	0.7696	0.0084	0.1469	0.1064	0.0179	0.1417	0.7696	0.0084	0.1469	0.1064	0.0179	0.1417
764	0.515	0.857	0.562	0.727	0.7655	0.4497	0.2829	0.594	0.4373	0.2886	0.7696	0.4935	0.2285	0.6524	0.3507	0.3507	0.7696	0.4935	0.2285	0.6524	0.3507	0.3507
765	0.818	0.250	0.656	0.590	0.4275	0.3596	0.3009	0.4078	0.7433	0.1287	0.4612	0.4021	0.0791	0.0936	0.7406	0.0451	0.4612	0.4021	0.0791	0.0936	0.7406	0.0451
766	0.090	0.071	0.125	0.045	0.7977	0.7907	0.8525	>0.9999	0.5953	0.9446	0.4735	0.0531	0.1771	0.0872	0.2012	0.6813	0.4735	0.0531	0.1771	0.0872	0.2012	0.6813
767	0.636	0.464	0.687	0.772	0.8043	0.5803	0.525	0.2923	0.6448	0.6574	0.8206	0.6582	0.5563	0.349	0.9181	0.5971	0.8206	0.6582	0.5563	0.349	0.9181	0.5971
768	0.060	0.107	0.218	0.045	0.3811	>0.9999	0.6989	0.8169	0.2962	0.8445	0.0557	0.5784	0.0644	0.0061	0.0839	0.092	0.0557	0.5784	0.0644	0.0061	0.0839	0.092
769	0.909	0.750	0.875	0.954	0.8369	0.8199	0.6081	0.249	0.4587	0.5379	0.7696	0.5784	0.6057	0.1964	0.5248	0.5248	0.7696	0.5784	0.6057	0.1964	0.5248	0.5248
770	0.909	0.785	0.968	0.863	0.6239	0.846	0.2746	0.7957	0.2365	0.6054	0.3236	0.8057	0.2924	0.7109	0.5808	0.5808	0.3236	0.8057	0.2924	0.7109	0.3395	0.5808
771	0.818	0.750	0.875	0.954	0.7878	0.3244	0.6081	0.249	0.4587	0.7808	0.7218	0.2556	0.6057	0.1964	0.2621	0.8977	0.7218	0.2556	0.6057	0.1964	0.2621	0.8977
772	0.939	0.392	0.468	0.590	0.0107	0.0762	0.8027	0.5405	0.541	0.0959	0.0127	0.117	0.3137	0.5767	0.6598	0.0701	0.0127	0.117	0.3137	0.5767	0.6598	0.0701
773	0.424	0.785	0.500	0.454	0.6998	0.9065	0.3534	0.249	0.7804	0.3409	0.7696	0.7512	0.3899	0.3012	0.7406	0.3197	0.7696	0.7512	0.3899	0.3012	0.7406	0.3197
774	0.000	0.071	0.062	0.000	<10-4	n.e	0.9353	0.7573	0.681	<10-4	0.1781	n.e	0.4287	0.0047	0.0994	0.0994	0.1781	n.e	0.4287	0.0047	0.1304	0.0994
775	0.727	0.928	0.625	0.772	0.6414	0.9418	0.1783	0.4003	0.4532	0.4336	0.6387	0.8638	0.2659	0.4636	0.3894	0.3894	0.6387	0.8638	0.2659	0.4636	0.5543	0.3894
776	0.939	0.928	0.937	0.954	0.9251	>0.9999	0.9049	>0.9999	>0.9999	0.9564	0.8206	0.7115	0.8463	0.5276	0.7771	0.8165	0.8206	0.7115	0.8463	0.5276	0.7771	0.8165
777	1.000	0.964	0.968	1.000	0.2709	n.e	0.8665	0.709	0.7676	0.3199	0.5402	n.e	0.8463	0.193	0.3571	0.3571	0.5402	n.e	0.8463	0.193	0.4762	0.3571
778	0.272	0.464	0.593	0.409	0.2146	0.6857	0.6352	0.9215	0.421	0.6727	0.1004	0.2316	0.7136	0.7109	0.3093	0.3093	0.1004	0.2316	0.7136	0.7109	0.4847	0.3093
779	0.121	0.142	0.281	0.136	0.4553	>0.9999	0.694	>0.9999	0.5471	0.9622	0.0913	0.4568	0.121	0.8348	0.667	0.667	0.0913	0.4568	0.121	0.8348	0.241	0.667
780	1.000	1.000	0.937	1.000	0.1017	n.e	0.562	n.e	0.3195	n.e	0.3669	n.e	0.4634	n.e	n.e	n.e	0.3669	n.e	0.4634	n.e	0.3589	n.e
781	0.000	0.107	0.156	0.000	<10-4	n.e	0.8625	0.641	0.3062	<10-4	0.093	n.e	0.2847	0.0369	0.1513	0.1513	0.093	n.e	0.2847	0.0369	0.2559	0.1513
782	0.000	0.035	0.093	0.045	<10-4	0.4035	0.8226	>0.9999	0.7392	<10-4	0.1553	0.0327	0.0141	0.1981	0.0815	0.0815	0.1553	0.0327	0.0141	0.1981	0.2528	0.0815
783	0.848	0.964	0.937	1.000	0.535	0.1361	>0.9999	0.709	0.3195	0.5428	0.4861	0.077	0.7136	0.193	0.4902	0.4902	0.4861	0.077	0.7136	0.193	0.3589	0.4902
784	0.545	0.607	0.812	0.636	0.2142	0.7458	0.4739	0.8933	0.3635	0.8257	0.3352	0.8057	0.4884	0.782	0.4023	0.4023	0.3352	0.8057	0.4884	0.782	0.4023	0.4023

Locus	Allelic Frequencies				p-values from Dfdist								p-values from DetselD										
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	MI-M2	NM1-NM2	
785	0.545	0.785	0.406	0.727	0.5966	0.4729	0.1943	0.9473	0.1465	0.4718	0.4861	0.6153	0.1283	0.8947	0.0646	0.5248							
786	0.636	0.571	0.750	0.590	0.5723	0.867	0.5669	0.8365	0.4532	0.8612	0.6912	0.6816	0.5652	0.782	0.578	0.7628							
787	0.151	0.357	0.718	0.000	0.0079	0.4172	0.2497	0.1527	0.0001	0.2767	0.0044	0.0209	0.2682	0.0071	<10 ⁻⁴	0.0611							
788	0.030	0.107	0.437	0.000	0.0321	0.9035	0.2989	0.641	0.0135	0.6937	0.0186	0.0018	0.4634	0.0369	0.0011	0.0061							
789	0.969	0.607	0.875	0.909	0.2821	0.6221	0.2954	0.1842	0.9332	0.1228	0.4036	0.2951	0.2157	0.1683	0.7771	0.1127							
790	0.030	0.178	0.000	0.000	>0.9999	0.9035	0.2276	0.4057	n.e	0.544	0.0289	0.0018	0.1113	0.028	n.e	0.033							
791	0.909	0.464	0.718	0.363	0.2398	0.0252	0.4239	0.7416	0.1182	0.1573	0.308	0.0396	0.4574	0.6226	0.1023	0.1567							
792	0.818	0.785	0.718	0.681	0.5764	0.549	0.8042	0.7452	0.9568	0.9191	0.6912	0.6882	0.8962	0.8947	0.9181	0.8977							
793	0.393	0.535	0.500	0.590	0.6996	0.4912	0.8615	0.8682	0.7239	0.7766	0.5711	0.5151	0.8463	0.782	0.6188	0.6243							
794	0.757	0.750	0.718	0.590	0.8177	0.5382	0.9458	0.591	0.5714	0.9758	0.8206	0.6363	0.8962	0.6708	0.578	0.8977							
795	0.363	0.000	0.606	0.217	0.3067	0.5788	0.0161	0.1867	0.1583	0.2489	0.2377	0.1516	0.0114	0.056	0.0216	0.0291							
796	0.757	0.481	0.393	0.521	0.1526	0.3352	0.8027	0.8856	0.6133	0.4269	0.0625	0.3568	0.6598	0.782	0.5118	0.4793							
797	0.272	0.666	0.515	0.434	0.3703	0.6424	0.6501	0.4757	0.6628	0.4156	0.1116	0.2951	0.6165	0.3108	0.7771	0.1182							
798	0.393	0.037	0.393	0.304	0.8126	0.7567	0.1173	0.322	0.7038	0.155	0.8206	0.5784	0.0617	0.0506	0.6837	0.0349							
799	0.969	1.000	0.939	0.869	0.7319	0.3294	0.562	0.2052	0.5709	0.8807	0.4735	0.4482	0.4634	0.1194	0.5118	0.6054							
800	0.393	0.740	0.212	0.434	0.5321	0.7255	0.0416	0.3157	0.3173	0.3265	0.1044	0.8057	0.0206	0.3532	0.136	0.1736							
801	0.636	0.518	0.606	0.652	0.7876	0.8748	0.7688	0.6641	0.8132	0.7143	0.8206	0.7512	0.7653	0.6082	0.8601	0.7858							
802	0.000	0.814	0.000	0.086	n.e	0.3294	n.e	0.005	0.298	<10 ⁻⁴	n.e	0.0897	n.e	0.0005	0.3744	0.004							
803	0.636	0.851	0.575	0.521	0.7444	0.612	0.2829	0.2325	0.7404	0.4711	0.7218	0.7115	0.3647	0.2859	0.7406	0.4847							
804	0.878	0.888	0.696	0.608	0.332	0.2173	0.4065	0.2764	0.6228	>0.9999	0.3352	0.2907	0.4457	0.3174	0.7406	0.8977							
805	0.424	0.925	0.030	0.434	0.0459	0.8436	<10 ⁻⁴	0.0411	0.0167	0.1166	0.0023	0.7512	<10 ⁻⁴	0.0359	0.0157	0.2146							
806	0.848	0.703	0.757	0.739	0.6335	0.6498	0.8523	>0.9999	>0.9999	0.6324	0.6912	0.6882	0.8962	0.782	0.9181	0.7269							
807	0.121	0.518	0.060	0.130	0.6517	>0.9999	0.1363	0.1065	0.7488	0.3258	0.0286	0.8057	0.0114	0.108	0.3349	0.5734							
808	0.424	0.703	0.484	0.478	0.6998	0.8444	0.525	0.5009	0.7804	0.5097	0.7696	0.8057	0.5165	0.4423	0.9181	0.4438							
809	0.878	0.962	0.848	0.826	0.8434	0.8834	0.4874	0.4366	>0.9999	0.6765	0.6643	0.8057	0.4515	0.3924	0.8601	0.5313							
810	0.363	0.259	0.151	0.304	0.2866	0.7736	0.7143	>0.9999	0.4469	0.7814	0.0966	0.2486	0.2091	0.4934	0.2498	0.474							
811	0.878	0.703	0.575	0.913	0.1355	0.946	0.6966	0.3324	0.052	0.5059	0.1445	0.7115	0.8008	0.2773	0.0227	0.6559							
812	0.878	0.851	0.696	0.695	0.332	0.3994	0.5275	0.5508	0.9568	0.9552	0.3352	0.3811	0.5848	0.6524	0.9181	0.8165							
813	0.333	0.629	0.060	0.260	0.2002	0.8549	0.0465	0.3387	0.2935	0.4667	0.0038	0.5784	0.006	0.0729	0.0891	0.5072							
814	0.848	0.666	0.727	0.739	0.5229	0.6498	0.8491	0.8396	>0.9999	0.5513	0.6912	0.6882	0.8962	0.782	0.8601	0.5517							
815	0.000	0.296	0.030	0.043	<10 ⁻⁴	0.4035	0.2826	0.3541	>0.9999	0.178	0.1881	0.0327	0.0191	0.0097	0.4602	0.0578							
816	0.121	0.000	0.030	0.000	0.6127	0.4992	0.915	n.e	0.8846	0.6129	0.0301	0.0174	0.0937	n.e	0.1625	0.0806							
817	0.969	0.925	0.939	0.739	0.7319	0.111	0.9049	0.3241	0.1404	0.7575	0.4735	0.1416	0.8008	0.349	0.1389	0.6146							
818	0.060	0.000	0.090	0.130	0.7753	0.8014	0.6549	0.2958	0.9174	0.7909	0.2287	0.0508	0.1148	0.0622	0.4602	0.0336							
819	0.424	0.037	0.030	0.086	0.0459	0.1783	0.9137	0.7816	0.7053	0.2117	0.0023	0.0022	0.2044	0.0379	0.0873	0.0206							

Locus	Allelic Frequencies			p-values from Dfdist						p-values from DetselD						
	NM1	NM2	MI	M2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	M1-M2	NM1-NM2	NM1-M1	NM1-M2	NM2-M1	NM2-M2	M1-M2	NM1-NM2
818	0.060	0.000	0.090	0.130	0.7753	0.8014	0.6549	0.2958	0.9174	0.7909	0.2287	0.0508	0.1148	0.0622	0.4602	0.0336
819	0.424	0.037	0.030	0.086	0.0459	0.1783	0.9137	0.7816	0.7053	0.2117	0.0023	0.0022	0.2044	0.0379	0.0873	0.0206

Titre : Evolution des populations métallicoles d'*Arabidopsis halleri* (Brassicaceae), étude sur les traits et sur le génome en populations naturelles

Résumé : Les milieux métallifères d'origine anthropique sont des habitats particulièrement stressants pour les êtres vivants du fait des fortes concentrations en métaux lourds et des changements environnementaux profonds qui y sont présents. Certaines espèces, dites métalphytes, sont capables de se développer dans ces milieux extrêmes. Parmi ces espèces, les pseudométallophytes (qui peuvent se développer à la fois dans des sites pollués et dans des sites non pollués) constitue des modèles particulièrement intéressants pour étudier l'adaptation locale et l'influence des différences forces évolutives dans la différenciation phénotypique entre populations.

Arabidopsis halleri est une espèce pseudométallophyte modèle pour l'étude de la tolérance et de l'hyperaccumulation des métaux du fait de sa proximité avec l'espèce prééminente *A. thaliana*. Des études préalables sur la tolérance et l'hyperaccumulation du zinc chez cette espèce ont suggéré une possible évolution des populations métallicoles sous l'effet des fortes concentrations en métaux. Notre objectif a donc été de mieux comprendre les mécanismes évolutifs prenant place dans ces populations. Pour cela nous avons proposé d'utiliser la génomique des populations ainsi que l'expérimentation en milieu contrôlé et ce à une échelle locale. Nous avons tout d'abord cherché des traces de sélection dans le génome de cette espèce par une approche de criblage génomique sur 820 marqueurs AFLP. Nous avons pu identifier des locus potentiellement sous sélection dans les populations métallicoles qui constituent de bons candidats pour l'adaptation aux sites métallifères. De manière intéressante, certains candidats sont spécifiques à des populations ce qui suggère une évolution convergente ou des pressions de sélection différentes entre les sites. Une partie de ces candidats a été cartographiée chez *A. thaliana* dans le but de définir des gènes candidats. Nous avons dans un deuxième temps cherché à comprendre l'influence des différentes forces évolutives dans la distribution de la tolérance au zinc chez *A. halleri*. La tolérance au zinc de populations a été caractérisée par des mesures morphologiques et physiologiques et l'influence de la sélection par une approche Q_{ST}/F_{ST} . Nos résultats suggèrent que, pour les populations échantillonnées, la tolérance au zinc augmente dans les populations métallicoles sous l'effet de la sélection. Cette sélection s'exerçant potentiellement sur la variabilité présente dans les populations non métallicoles ancestrales. Enfin, la dernière partie de cette étude s'intéresse à l'association entre les génotypes et les phénotypes de la tolérance au zinc.

Mots-clés : *Arabidopsis halleri*, pseudométallophyte, adaptation locale, microévolution, génomique des populations, tolérance au zinc, population naturelle

Title: Evolution of metalcolous populations in a heavy metal tolerant plant *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae), survey on genome and traits in natural populations

Abstract: Due to the high concentration of heavy metals and the important environmental modifications, ecological conditions of metalliferous sites are very stressing for most organisms. A few plant species, coined "metalphyte", have acquired the capacity to grow on heavy metal contaminated soils. Among this group, the pseudometallophyte species (able to grow on contaminated as well as on non contaminated soils) constitute highly relevant models to study local adaptation and relative influence of evolutionary forces in shaping phenotypic differentiation among populations

The pseudometallophyte plant *Arabidopsis halleri* is a model species for tolerance and hyperaccumulation of heavy metal because it is a close relative of the pre-eminent species *A. thaliana*. Previous studies on heavy metal tolerance and hyperaccumulation of *A. halleri* suggested evolution of metalcolous populations in response to high level of metal exposure. In order to investigate the evolutionary processes in neighboring metalcolous and non-metallicous *A. halleri* populations, we adopted population genomics and phenotyping approaches. First we explored the *A. halleri* genome to detect signatures of directional selection. We performed a genome-wide scan analysis using 820 AFLP markers. We identified some loci potentially under selection in metalcolous populations that constitute high-quality candidates for general adaptation to metalliferous sites. Interestingly, some candidates were population specifics, suggesting the possibility of convergent evolution or existence of different selection pressure in the different sites. Some of these candidates were mapped on *A. thaliana* genome to identify candidate genes. Our second objective was to evaluate the contribution of selection versus other forces in shaping distribution of zinc tolerance in *A. halleri*. We measured morphological and physiological traits to estimate zinc tolerance and role of selection was inferred using Q_{ST}/F_{ST} approach. Our results suggest that, in the sampled populations, zinc tolerance has been increased in metalcolous populations through selection on standing variation within local non-metallicous ancestral populations. The last part of this study focuses on looking for a link between genotype and phenotype of zinc tolerance.

Key words: *Arabidopsis halleri*, pseudometallophyte, local adaptation, microevolution, population genomics, zinc tolerance, natural population.