

Étude de la diversité génétique du maïs en Europe : analyse d'ADN ancien à partir d'échantillons d'herbier et confrontation avec l'analyse moléculaire à grande échelle de collections de populations

Brigitte GOUESNARD^{(1)*}, Monique CHASTANET⁽²⁾,
Christine TOLLON-CORDET⁽¹⁾, Pierre DUBREUIL⁽³⁾,
Armand BOYAT⁽¹⁾, Alain CHARCOSSET⁽³⁾

⁽¹⁾INRA UMR DGPC, domaine de Melgueil, 34130 Mauguio, France

⁽²⁾CNRS UMR 8054, Centre de recherches historiques et juridiques,
Université Paris I, 9 rue Malher, 75181 Paris cedex 04, France

⁽³⁾INRA-CNRS-UPS-INA P-G, Station de génétique végétale, Ferme du Moulon,
91910 Gif-sur-Yvette, France

Abstract: Genetic diversity of maize in Europe : molecular analysis of ancient DNA from herbariums and comparison with molecular analysis of a large collection of populations. European maize was introduced from Central America in the South of Europe at the end of 15th century, and from Northern America in the North of Europe following the expeditions of the early 16th century. In order to better understand its later history in Europe, we compared the genetic diversity of European maize in 19th century and the first half of the 20th century, represented by plants collected in an ancient herbarium, with the diversity of American and European maize populations collected around 50 years ago and maintained as living samples in collections. Samples were obtained from the herbarium of Paris (MNHN). Fractions of leaves or spikelets (from 2 to 37 mg) were collected from 17 plates. Samples are 138 years old in average (from the second half of 18th century to 1949). They originated from all over France, with half in the Paris basin. DNA was successfully extracted from leave or spikelet fragments, using the Kit Qiagen® method. Precautions were taken to avoid contamination with foreign DNA. A total of 80 µl of DNA was obtained per sample. DNA samples were analysed with 14 nuclear microsatellite markers, ten of them displaying a tetra nucleotidic motive. From 4 to 14 markers could be analysed per sample.

* Correspondance et tirés à part : gouesnard@ensam.inra.fr

The success of SSR analysis is not related with the nature of the samples (leaves or spikelets), their age or their weight. Genetic polymorphism was analysed in comparison with that of a total of 273 maize populations originated from America and Europe. Roger's genetic distance among accessions was estimated based on genetic frequencies and cluster analysis yielded three major groups. The first group put together populations from Northern Europe and Northern America (Northern Flint). The second group put together American populations with some European populations. The third group put together European populations (from Central and South Europe) with some Chilean populations. Only one herbarium sample was attributed to the American group (group 2). Only one herbarium sample was attributed to the Northern Flint group (group 1). All other samples were attributed to the European group (group 3). The low number of herbarium plants belonging to Northern Flint group was confirmed by the determination of the populations that displayed the highest similarity with these samples. Based on these results, cultivation of Northern Flint in Europe in 19th century should have been located at the East of Paris basin. The hybridisation between (i) Northern Flint material and (ii) Southern Spanish material introduced from the Caribbean, that yielded most of European germplasm according to former investigations, is therefore likely to be older than the collection of herbarium plants. Following the success of DNA extraction and SSR analysis, further herbarium samples will be collected. The study will also be continued with the analysis of cytoplasmic markers which would provide information on the respective contribution of pollen and kernel dissemination on the diffusion of maize in Europe, and with the comparison between analysis and historical data (archives, ancient agronomic studies, etc).

***Zea mays* L. / herbarium / ancient DNA / genetic diversity / SSR**

Résumé : L'objectif de l'étude est d'analyser la diversité des maïs en Europe en confrontant la diversité analysée à partir d'herbiers anciens avec celle trouvée dans une étude réalisée sur 273 populations de maïs d'origine américaine et européenne, conservées en semences et renouvelées régulièrement depuis cinquante ans environ. L'étude a porté sur 17 planches de l'Herbier du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris datant de 138 ans en moyenne, prélevées en France et majoritairement dans le Bassin parisien. À partir de fragment de feuilles ou d'épilletts, l'ADN a été extrait par la méthode du Kit Qiagen et analysé avec succès pour 4 à 14 marqueurs microsatellites nucléaires. Analysée à l'aide d'une matrice de distance de Roger, la variabilité génétique se structure en trois groupes où sont majoritaires respectivement : les populations nord américaines anciennes (Northern Flint), les autres populations américaines, les populations européennes. Les plantes d'herbier se positionnent essentiellement dans le groupe des populations européennes. Ce résultat est confirmé par l'identification des populations les plus proches de chaque planche d'herbier. L'hybridation entre les Northern Flint et les populations Caraïbes et du sud de l'Espagne, qui est supposée avoir donné naissance à la diversité européenne, apparaît donc antérieure à la collecte des plantes d'herbier.

***Zea mays* L. / herbier / ADN ancien / diversité génétique / SSR**

1. INTRODUCTION

Le maïs a été introduit en Europe par Christophe Colomb qui l'a rapporté des Caraïbes dans le sud de l'Espagne. Des introductions ultérieures ont été documentées par Brandolini [2]. Jusqu'à récemment, on connaissait mal la contribution relative de ces introductions à la diversité génétique du maïs en Europe, ainsi que la période où elles ont eu lieu. L'emploi des marqueurs moléculaires a donné la possibilité d'analyser à grande échelle les populations de maïs. Rebourg *et al.*, [8] ont analysé conjointement 131 populations européennes et 89 populations américaines de maïs par un ensemble de 29 loci RFLP. Dubreuil *et al.*, [4] ont repris l'analyse de ces 131 populations européennes avec un effectif de populations américaines étendu à 174, avec 24 loci microsatellites nucléaires. La diversité des maïs en Europe est en partie liée à leur origine géographique. Les populations de l'est et du nord de l'Europe forment un groupe bien séparé tant au niveau moléculaire que morphologique. Les populations du sud-ouest de l'Europe se séparent des populations du sud-est de l'Europe. Cette structuration apparaît nettement dans l'étude de Gauthier *et al.*, [5] réalisée sur 488 populations européennes. Concernant les relations entre la diversité américaine et la diversité européenne, Rebourg *et al.*, [8] et Dubreuil *et al.*, [4] ont observé de fortes similarités entre certaines origines. Les populations de l'est et du nord de l'Europe se regroupent avec les maïs Northern Flint de l'est de l'Amérique du Nord et une similarité morphologique (épi à 8 rangs, présence fréquente de spathes foliacées) est également observée entre ces deux origines. Certaines populations du sud de l'Espagne se regroupent avec les populations des Caraïbes. Les populations cornées des Pyrénées et de Galice se positionnent en situation intermédiaire entre les maïs des Caraïbes et des Northern Flint, ce qui suppose l'existence d'un phénomène d'hybridation.

Les données historiques nous renseignent sur les dates de l'introduction des maïs en Europe. Ainsi, d'après le récit des explorateurs de l'Amérique du Nord, G. Verrazano et J. Cartier en particulier, les Northern Flint ont pu être introduits en Europe dès la première moitié du XVI^e siècle [8]. L'objectif de l'étude est de préciser les modalités et les dates d'introduction et de diffusion de différents types variétaux en Europe en analysant des échantillons conservés dans des herbiers. Pour cette première étude, nous avons prélevé des échantillons sur l'ensemble des planches accessibles au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (MNHN) de Paris, échantillons prélevés majoritairement dans le Bassin parisien.

Tableau I : Description des prélèvements analysés.

n°	Nom	Date	Département	Type de matériel collecté	Poids	Nb loci amplifiés
P1	P00265980	1914	Ille-et-Vilaine	Feuille	27 mg	13
P2	P00265981	1900	Aisne	Panicule	12 mg	9
P3	P00265982	1834	Saône-et-Loire	Panicule	2 mg	12
P4	P00265983	1837	haut Anjou	Feuille	6 mg	14
P5	P00265984	1907	Allier	Panicule	7 mg	13
P6	P00265985	1949	Dordogne	Panicule	20 mg	14
P7	P00265986	1858	Seine-et-Marne	Feuille	9 mg	12
P8	P00265987	1830	Paris	Feuille	8 mg	7
P9	P00265988	1830	Paris	Feuille + Panicule	20 mg	9
P10	P00265989	2 nd 18s ?	Paris	Panicule	18 mg	14
P11	P00265990	1841	Val de Marne	Feuille	7 mg	13
P12	P00265991	1855	Yvelines	Feuille	11 mg	11
P13	P00265992	1836	Val-de-Marne	Panicule	27 mg	13
P14	P00265993	1828	Paris	Feuille	12 mg	11
P15	P00265994	1842	Yvelines	Panicule	6 mg	11
P16	P00265995	1911	Var	Feuille	37 mg	11
P17	P00265996	1860	Yvelines	Panicule	16 mg	4

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les échantillons proviennent de l'Herbier France-Europe du MNHN. Les planches sont répertoriées avec le nom du collecteur, le numéro de récolte, le nom de l'herbier, le nom botanique de la plante, le lieu et la date de collecte (tabl. I). Certaines de ces informations sont parfois manquantes, mais nous avons privilégié les échantillons bien situés dans l'espace et dans le temps. Dans certains cas, on dispose en outre de précisions sur le nom local ou les conditions de culture (en champ, en jardin botanique...). Dix-sept planches ont été échantillonnées. Les échantillons ont été prélevés sur tout le territoire national (tabl. I) et majoritairement dans le Bassin parisien. Cette région apparaît mieux représentée dans les échantillons d'herbier que dans la collection de référence, dont les populations ont été prélevées il y a cinquante ans environ et dont les semences sont renouvelées régulièrement jusqu'à présent. Les échantillons sont âgés de 138 ans en moyenne (de 1828 à 1949), sans parler de celui qui remonte probablement à la seconde moitié du XVIII^e siècle et que nous avons retenu pour son originalité (c'est la seule planche à présenter des grains, fig. 1). Les planches contiennent toutes une panicule ou une fraction de panicule avec au moins une feuille. L'épi, quand il est présent, est à un stade jeune. Une planche (P00265983) présente des spathes foliacées bien visibles (fig. 2). Les organes prélevés sont des

morceaux de feuille (1 cm x 0,5 cm) ou deux épislets, en fonction du matériel disponible et avec le souci d'endommager le moins possible les échantillons (tabl. I).



Figure 1: P00265989, Herbarium MNHN, herbarium France-Europe, Poiret, Sans numéro, herbarium Moquin-Tandon, in herbarium E. Cosson, in herbarium Durand, *Zea mays, monoeci triandri*, h.r.p. [= *hortus royal parisiensis*] sans date [seconde moitié du XVIII^e ?].

La méthode d'extraction de l'ADN est la suivante. Les feuilles ou les épislets sont broyées dans des tubes de 2 ml à l'aide d'un broyeur à billes. Deux billes de tungstène stériles sont rajoutées dans chaque tube. Les feuilles sont broyées en 2 fois 2 mn à 30 vibrations par seconde. L'extraction s'effectue avec un Kit Qiagen, Dneasy Plant Mini Kit n° 69103. Compte tenu des faibles quantités d'ADN attendues, l'ADN est utilisé tel quel sans dosage et sans dilution. Nous n'avons donc pas d'estimation du rendement en masse de l'ADN. Les éventuelles pollutions sont contrôlées par la présence d'un tube témoin négatif (sans ADN).



Figure 2: P00265983,Herbier MNHN, herbier France-Europe, Bastard, 71, herbier Bastard, *Zea mays*, haut Anjou, 1837 [ou 1839], cultivé en grand.

À partir de cet ADN, des PCRs fluorescentes en multiplexage sont effectuées dans un volume total de 20 μ l contenant 1X de tampon de Taq (10 mM de Tris-HCl, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, pH 8,3), 200 μ M de dNTPs, x pmol de chaque amorce marquée par fluorescence, 4 pmol de l'amorce reverse, 0,5 U de Taq polymérase (Qiagen) et 4 μ l d'ADN ; x pmol de chaque amorce étant déterminé pour le bon fonctionnement des amorces à l'intérieur des multiplexes (données non fournies). Les amplifications sont effectuées sur un thermocycleur MJ recherche PTC 100 en utilisant les paramètres suivants : (a) dénaturation initiale à 94 °C pendant 4 mn; (b) il y a 35 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 1 mn, d'hybridation à 60 °C pendant 1 mn et d'élongation à 72 °C pendant 1 mn; (c) une extension finale à 72 °C pendant 6 mn. Une deuxième PCR est effectuée car les faibles quantités d'ADN nécessitent deux PCR en cascade. Pour la deuxième PCR, l'ADN est remplacé par 2 μ l de la première PCR.

Après une dilution au 1/20, on prend 3 μ l de la dilution mélangée à 7 μ l de formamide et 0,15 μ l de marqueur de taille gescan500-Liz. Ce mélange est passé dans un séquenceur ABI3100 (Applied Biosystem).

Les marqueurs génétiques ont été choisis parmi les marqueurs utilisés dans l'étude de la diversité des populations américaines et européennes [4]. Quatorze marqueurs ont été retenus sur les 24 marqueurs microsatellites nucléaires. Ces marqueurs sont à motif essentiellement tri et tétra nucléotidique (tabl. II), connus pour présenter des fréquences de mutations faibles.

Tableau II : Liste des loci analysés, motif de base et localisation chromosomique.

Locus	Chromosome	Motif	Locus	Chromosome	Motif
phi056	1	CCG	nc130	5	AGC
phi083	2	AGCT	phi085	5	AACGC
phi127	2	AGAC	phi 031	6	GTAC
phi96100	2	ACCT	phi 112	7	AG
phi 029	3	AG/AGCG	phi 108411	9	AGCT
phi046	3	ACGC	phi 041	10	AGGC
phi072	4	AAAC	phi084	10	GAA

À partir des fréquences alléliques des populations et des individus issus d'herbier, la distance modifiée de Rogers (1972) a été calculée. Entre deux populations X et Y, la distance de Rogers s'établit ainsi :

$$MRD_{XY}^2 = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \sum_{a=1}^A \frac{1}{2} (p_{la}^X - p_{la}^Y)^2$$

p_{la} est la fréquence de l'allèle a au locus l.

À partir de la matrice de distances issue de ce calcul, une classification hiérarchique ascendante de Ward a été réalisée [11]. La méthode de Ward, ou méthode de l'inertie minimale intra-classe, tend à minimiser la variance intra-classe. Tous les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel SAS [10].

L'assignation des plantes issues d'herbiers aux populations de référence a été étudiée grâce au logiciel GeneClass [3]. Pour utiliser le logiciel, nous avons tiré au hasard, sur la base des fréquences alléliques aux différents loci et en faisant l'hypothèse d'équilibre de liaison intra-population, 5 individus par population dans la collection de référence à 239 populations. Les méthodes génétiques d'assignation permettent d'assigner des individus à des populations sur la base des génotypes de ces individus d'une part, et d'individus représentatifs de ces populations d'autre part. Différentes approches ont été expérimentées parmi lesquelles on trouve des méthodes fondées sur les distances génétiques et des méthodes fondées sur la probabilité d'occurrence des génotypes. Dans la deuxième catégorie, l'approche bayésienne se caractérise par le fait que les fréquences alléliques dans les populations sont supposées suivre des lois de distribution qui traduisent l'incertitude résultant de l'échantillonnage nécessairement limité sur chacune des populations de référence [7], [1]. Cette approche permet alors d'en déduire la probabilité qu'un génotype donné soit trouvé dans une population donnée, et d'en tirer une règle simple d'assignation. Nous avons utilisé deux approches pour assigner les plantes : la distance de Nei et la méthode bayésienne.

3. RÉSULTATS

3.1. Extraction et amplification de l'ADN

Afin d'éviter les pollutions, l'extraction de l'ADN a été effectuée avec des instruments n'ayant jamais servi à l'analyse génétique du maïs. Quarante-vingt microlitres d'ADN ont pu être obtenus par plante. L'amplification PCR a bien réussi dans l'ensemble (tabl. I), même si l'ADN de la plante 17 a été amplifié pour seulement 4 amorces. Le succès de l'amplification n'est pas en relation avec le type de matériel (feuille ou épillet), ni avec son âge ou la quantité prélevée.

3.2. Structuration de la variabilité

Trois grands groupes structurent l'ensemble des populations. Un premier groupe comporte les populations du nord de l'Europe et des populations du nord de l'Amérique (Northern Flint), un second groupe rassemble les populations américaines avec quelques populations européennes, le troisième groupe contient des populations européennes (Centre et Sud) et quelques populations du Chili. L'indice de différenciation, G_{st} , entre ces trois groupes est de 0,065. Ces résultats sont cohérents, dans les grandes lignes, avec ceux des études antérieures (cf. introduction).

3.3. Positionnement des plantes d'herbier dans la collection de référence

Le positionnement des plantes d'herbier dans ces trois groupes issus de classification hiérarchique est indiqué au tableau III. Une seule plante (P7) se positionne dans le groupe des Northern Flint. Une seule plante (P1) se positionne dans le groupe des populations majoritairement américaines. Les autres plantes se positionnent toutes dans le groupe majoritairement européen.

Tableau III : Positionnement des 17 plantes dans les groupes formés par Ward et liste des populations les plus proches, par la distance de Rogers (1^{re} population et 2^e population), par le logiciel GeneClass (par la distance de Nei, par méthode bayésienne).

Plantes n°	Groupe	Distance de Rogers		GeneClass	
		1 ^{re} pop.	2 ^e pop.	Nei	Bayésien
P1	2	P675_Windies	P674_Windies	P66_SpnS	P66_SpnS
P2	3	P45_SpnPyr	P37_SpnPyr	P37_SpnPyr	P45_SpnPyr
P3	3	P140_Rom	P126_Ita	P140_Rom	P126_Ita
P4	3	P45_SpnPyr	P35_SpnPyr	P4_Bul	P126_Ita
P5	3	P126_Ita	P84_Fra	P126_Ita	P126_Ita
P6	3	P82_Fra	P104_Fra	P88_FraPyr	P427_NF
P7	1	P404_NF	P90_Fra	P404_NF	P404_NF
P8	3	P87_FraPyr	P88_FraPyr	P87_FraPyr	P87_FraPyr
P9	3	P85_Fra	P84_Fra	P169_Chli	P169_Chli
P10	3	P179_Arg	P57_SpnGal	P179_Arg	P179_Arg
P11	3	P50_SpnGal	P10_Cze	P10_Cze	P37_SpnPyr
P12	3	P120_Ita	P166_Chli	P120_Ita	P73_SpnS
P13	3	P98_FraPyr	P427_NF	P430_NF	P105_Fra
P14	3	P637_Peru	P689_WIndies	P689_WIndies	P75_FraAls
P15	3	P87_FraPyr	P103_FraPyr	P91_FraPyr	P91_FraPyr
P16	3	P37_SpnPyr	P143_Rom	P37_SpnPyr	P126_Ita
P17	3	P451_SD	P449_SD	P449_SD	P449_SD

Groupe 1 : Northern Flint majoritaire, Groupe 2 : Amérique majoritaire, Groupe 3 : Europe (sauf Est). Windies : Caraïbes ; SpnS : Sud Espagne, SpnPyr : Pyrénées espagnoles ; Rom : Roumanie, Fra : France ; Mex : Mexique ; Ita : Italie, NF : Northern Flint, SpnGal : Galice (Espagne) ; Cze : Tchécoslovaquie ; Chli : Chili ; FraAls : France Alsace ; FraPyr : Pyrénées françaises ; Arg : Argentine ; Peru : Pérou ; SD : South Dent.

3.4. Proximité des plantes d'herbier par rapport aux populations de la collection de référence

Le tableau III donne les populations les plus proches des plantes d'herbiers pour différentes méthodes. La plante P7 appartenant au groupe des Northern Flint est proche de la population P404_NF, quelle que soit la méthode utilisée. Cela confirme le positionnement observé dans ce groupe. La plante P1 appartenant au groupe majoritairement américain est proche de la population des Caraïbes (P674_Windies) et d'une population du sud de l'Espagne. La plante P17 qui a été analysée sur peu de loci apparaît proche d'une population du sud des USA (P449_SD). La plante P10 apparaît proche d'une population argentine (P179_Arg). La plante 4 est proche d'une population chilienne (P169_Chli). La plante P14 est proche à la fois d'une population d'Alsace et d'une population tropicale. Les autres plantes apparaissent proches de populations européennes et parfois en second lieu d'une population Northern Flint (plantes P6 et P13).

Les différentes méthodes utilisées pour étudier la proximité entre des plantes d'herbier et les populations de référence donnent des résultats convergents. Les plantes proches des Northern Flint sont peu fréquentes. La majorité des plantes sont proches de populations collectées dans le sud et le centre de l'Europe.

4. DISCUSSION

L'étude des sites de collectes des échantillons de l'herbier du MNHN de Paris confirme la régression de l'aire de culture du maïs entre le XIX^e et le début du XX^e siècle [6]. L'extraction de l'ADN sur les échantillons d'herbier a été un succès. Les fragments prélevés sont de faible dimension et de faible poids, mais l'ADN a pu être amplifié avec des amorces de motifs tétranucléotidiques et dont la taille des allèles peut dépasser 150 à 200 pb. La structuration de la collection de référence à partir de la distance de Rogers a permis de retrouver une structuration en trois grands groupes, qui est cohérente avec la structuration trouvée par Dubreuil *et al.*, [4] sur 24 loci. Pour les plantes d'herbier, les distances de Rogers ont été estimées à partir d'un nombre variable de loci, quatre plantes d'herbier ayant moins de 10 loci. Nous avons une moins grande précision pour ces plantes. Les études d'assignation des plantes d'herbier aux populations de la collection de référence ou les études de proximité par la matrice de distance ont montré que la plupart des plantes d'herbier étaient proches du groupe 'Europe', collecté dans le sud et le centre de l'Europe et que la présence des plantes proches des Northern Flint, collectées dans le nord de l'Europe, est peu fréquente. Les plantes d'herbier sont ainsi majoritairement issues de populations européennes qui dériveraient d'une hybridation entre les Northern Flint et les populations du sud de l'Espagne originaires des Caraïbes. Cette hybridation apparaît donc antérieure au XIX^e siècle. Suite à ces travaux démontrant la faisabilité de l'approche, il apparaît intéressant de poursuivre l'étude par l'analyse d'échantillons plus anciens et/ou représentatifs d'autres régions, afin de préciser la dynamique d'évolution des variétés en France. Ces travaux devraient aussi permettre de préciser la représentativité des collections actuelles, par rapport aux variétés anciennes cultivées à différentes époques et dans différentes régions. L'étude se poursuivra également par l'analyse de marqueurs cytoplasmiques qui apportera une information sur la contribution relative de la dissémination par le pollen ou les grains dans la diffusion des variétés de maïs en Europe et par la confrontation avec des sources historiques (archives, traités agronomiques anciens, etc.).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Ph. MORAT, ancien directeur du laboratoire de Phanérogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris), et M. PIGNAL, conservateur de l'Herbier du MNHN, qui nous ont permis d'effectuer ces analyses, ainsi que G. AYMOUNIN, professeur honoraire au MNHN, pour ses conseils. Les auteurs remercient également le Bureau des Ressources Génétiques pour avoir financé ce travail. Les données concernant les collections actuelles ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec M. WARBURTON et D. HOISINGTON, du Cimmyt.

RÉFÉRENCES

- [1] Baudoin L., Piry S., Cornuet J.M., Analytical bayesian approach assigning individuals to populations, *Journal of Heredity* 95 (2004) 217-224.
- [2] Brandolini A., Razze Europee di Mais, *Maydica* 15 (1970) 5-27.
- [3] Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M., New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals, *Genetics* 153 (1999) 1989-2000.
- [4] Dubreuil P., Rebourg C., Warburton M., Chastanet M., Gouesnard B., Hoisington D., Charcosset A., Use of DNA pooling to assess diversity within and among maize populations. Application to the investigation of maize introduction into Europe, *Maize Genetic Conference Abstracts* 45 (2003) 129.
- [5] Gauthier P., Gouesnard B., Dallard J., Redaelli R., Rebourg C., Charcosset A., Boyat A., RFLP diversity and relationships among traditional European maize populations, *Theor. Appl. Genet.* 105 (2002) 91-99.
- [6] Gay J.P., *Fabuleux maïs*, 1^e éd., AGPM, 1984, 295 p.
- [7] Rannala B., Mountain J.L., Detecting immigration by using multilocus genotypes, *PNAS* 94 (1997) 9197-9201
- [8] Rebourg C., Chastanet M., Gouesnard B., Welcker C., Dubreuil P., Charcosset A., Maize introduction into Europe: the history reviewed in the light of molecular data, *Theor. Appl. Genet.* 106 (2003) 895-903.
- [9] Rogers J.S., Measures of similarities and genetic distances, *Studies in genetics*, vol. 7213 (1972) Univ. Tex. Publ. 145-153.
- [10] SAS Institute, *SAS/IML user's guide*. Release 6.03. SAS Institute, Cary, N.C., 1990.
- [11] Ward J., Hierarchical grouping to optimize an objective function, *Am. Stat. Assoc. J.* 56 (1963) 236-244.