



REPUBLIQUE DU BENIN

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (MESRS)



UNIVERSITE NATIONALE D'AGRICULTURE (UNA)

ECOLE DE GESTION ET DE PRODUCTION VEGETALE ET SEMENCIERE
(EGPVS)

BIOTECHNOLOGIE VEGETALE ET PRODUCTION DE SEMENCE (BIOPROS)

MEMOIRE DE FIN DE FORMATION POUR L'OBTENTION DU MASTER
PROFESSIONNEL EN BIOTECHNOLOGIE VEGETALE ET PRODUCTION DE
SEMENCE

THEME

**CARACTERISATION GENETIQUE
MOLECULAIRE DES ACCESSIONS DE NIEBE
(*VIGNA UNGUICULATA* L. WALP) UTILISANT
DES MARQUEURS MICROSATELLITES (SSRs)**

Présenté par :

Pulchérie Jésugnon HOUINDE

Superviseur

Dr Ir Appolinaire ADANDONON

Maître de Conférences des Universités du CAMES
Protection des Cultures

Co-superviseurs

Dr Hubert ADOUKONOU-SAGBADJA

Maître de Conférences des Universités du CAMES
Génétique et Amélioration des Plantes
LaREGAME (FAST/UAC)

Dr Ir Symphorien AGBAHOUNGBA

Enseignant-Chercheur de la FSA/UAC
Laboratoire d'écologie Appliquée (LEA)

Année Académique : 2017-2018

2^{ème} PROMOTION

Caractérisation génétique moléculaire des accessions de niébé (Vigna unguiculata L. Walp.) utilisant des marqueurs microsatellites (SSRs)

CERTIFICATION

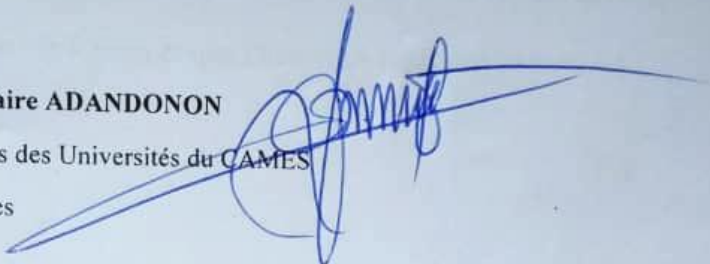
Nous certifions que ce travail a été fait par Mademoiselle **HOUINDE Jésusnon Pulchérie** sous notre supervision à l'Ecole de Gestion et de Production Végétale et Semencière (EGPVS) de l'Université Nationale d'Agriculture (UNA) pour l'obtention du diplôme de Master Professionnel en Biotechnologie végétale et Production de Semences (BIOPROS).

Superviseur :

Dr Ir (MC) Appolinaire ADANDONON

Maître de Conférences des Universités du CAMES

Protection des Cultures



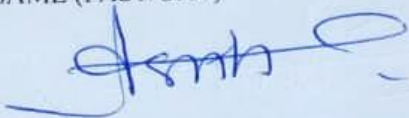
Co-superviseurs :

Dr (MC) Hubert ADOUKONOU-SAGBADJA

Maître de Conférences des Universités du CAMES

Génétique et Amélioration des Plantes

LaREGAME (FAST/UAC)



Dr Ir Symphorien AGBAHOUNGBA

Enseignant-chercheur de la FSA/UAC

Laboratoire d'écologie Appliquée (LEA)



DEDICACE

A mes parents

Rémi HOUINDE et Hélène AGONMA.

Longue vie à vous et que Dieu vous bénisse d'avantage !

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé grâce aux appuis de plusieurs personnes physiques et morales. Ainsi, nous adressons nos sincères remerciements à/au :

- ✚ Dr Ir Symphorien AGBAHOUNGBA, Enseignant-Chercheur de la Faculté des Sciences Agronomiques (FSA) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) et Responsable du projet Niébé sur lequel nous avons conduit le présent travail pour son investissement personnel nécessaire pour la réussite et la réalisation à bonne date de ce travail ;
- ✚ Dr Hubert ADOUKONOU-SAGBADJA, Maître de Conférences des Universités du CAMES, Chef de Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST / UAC), Directeur du Laboratoire des Ressources Génétiques et Amélioration Moléculaire des Espèces (LaREGAME) qui nous a accueillie en stage dans son laboratoire pour conduire les travaux de génotypage de nos accessions ;
- ✚ Dr Ir Appolinaire ADANDONON, Maître de Conférences des Universités du CAMES, Directeur de l'Ecole de Gestion et de Production Végétale et Semencière (EGPVS) de l'Université Nationale d'Agriculture (UNA) pour sa patience à notre égard durant toute cette formation et pour les conseils de père prodigués à notre égard ;
- ✚ Dr David MONTCHO, Enseignant-Chercheur à l'UNA pour le temps accordé à notre promotion pendant les négociations administratives et personnelles.
- ✚ Tous les Enseignants de l'UNA et d'ailleurs qui ont contribué à notre formation par des enseignements ou des connaissances ;
- ✚ Mme Blandine FATONDJI, doctorante et manager de LaREGAME pour sa grande disponibilité et son partage de connaissance lors de la conduite des manipulations de laboratoire ;
- ✚ Mr Fiacre ZAVINON, doctorante de LaREGAME pour sa contribution aux analyses bioinformatiques de nos données moléculaires ;
- ✚ Mr David DJIMENOU et Mme Fabienne ADIGOUN, doctorants de LaREGAME pour la relecture du document ;
- ✚ Mlle Mélaïne GBETO, Mlle Diane TOKPONNON et Mr Charles ZAGADA, mastorants de LaREGAME pour leur franche collaboration tout au long de notre séjour au sein du LaREGAME ;

- ✚ Laboratoire d'Ecologie Appliquée (LEA) de la FSA/UAC qui a mis à notre dispositions des ressources financières nécessaires aux manipulations et à la réalisation de ce travail à travers le Post Doc " *Development of insects resistant high yielding cowpea varieties in Benin* " **research grant (RU/2018/Post Doc/16) financé par Carnegie Cooperation of New York à travers le RUFORUM (Regional Universities Forum for Capacity Building in Agriculture);**
- ✚ Tout le personnel du LaREGAME qui s'est montré très disponible pour l'exécution de nos manipulations de laboratoire;
- ✚ Tous nos camarades de Master-BIOPROS deuxième promotion pour pour le temps passé ensemble pendant tout notre séjour dans la ville de Kétou ;
- ✚ Notre fratrie : Elisabeth, Rosaline, Saturnin et Frédéric pour leur diverses sacrifices et pour m'avoir permis de suivre cette formation ;
- ✚ Mr Jacques EKPINSOU pour tout le soutien, l'attachement, l'amour, l'affection et la joie qu'il nous a apportés pendant la réalisation de ce travail.

SIGLES ET ABBREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
FAO	Food and Agricultural Organization
FAR	Formation Agricole et Rurale
FAST	Faculté des Sciences et Techniques
FSA	Faculté des Sciences Agronomiques
IITA	Institut International d'Agriculture Tropicale
INERA	Institut National de l'Environnement et de Recherche Agricoles
INRAB	Institut National des Recherches Agricoles du Bénin
LaREGAME	Laboratoire des Ressources Génétiques et Améliorations des Espèces
LEA	Laboratoire d'Ecologie Appliquée
MAEP	Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche
PCR	Polymérase Chain Reaction
PCoA	Analyse en Coordonnées Principales
PIB	Produit Intérieur Brut
PIC	Contenu Informatif du Polymorphisme
QTL	(Quantitative Trait Loci)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Taxonomie du niébé	5
Tableau 2 : Transformations alimentaires du niébé	7
Tableau 3 : Noms locaux et origines du matériel végétal.....	15
Tableau 4: Marqueurs microsatellites.....	17
Tableau 5: Etapes des PCR	21
Tableau 6: Diversité génétique des 50 accessions.....	25
Tableau 7: Fréquence allélique.....	26
Tableau 8: Nombre d'allèles effectifs, Hétérozygoties et indice de Fixation.....	28
Tableau 9: Valeurs des axes	29
Tableau 10: Différenciation génétique par paire de populations.....	29
Tableau 11: Liste des accessions par groupe obtenu.....	31

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Photo montrant une tige et quelques graines de niébé	6
Figure 2 : Production béninoise du niébé	8
Figure 3: Plants en pots et en plein champs	19
Figure 4: Prélèvement des feuilles de niébé	19
Figure 5: Quelques étapes de l'extraction de l'ADN	20
Figure 6: Plaque à 96 puits et un thermocycleur	21
Figure 7: Gel d'agarose et Electrophorèse	22
Figure 8 : Photo montrant la diversité des accessions avec le marqueur CP27	26
Figure 9: PCoA montrant les relations génétiques entre les accessions.	29
Figure 10: Classification des accessions.	30

TABLE DES MATIERES

CERTIFICATION.....	Error! Bookmark not defined.
DEDICACE.....	ii
REMERCIEMENTS	iv
SIGLES ET ABBREVIATIONS	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
TABLE DES MATIERES.....	ix
RESUME.....	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCTION	xiii
INTRODUCTION.....	1
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.1. Généralités sur le niébé (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp)	5
1.1.1. Origine et Taxonomie du niébé	5
1.1.2. Morphologie du <i>V. unguiculata</i>	5
1.1.3. Ecologie du <i>V. unguiculata</i>	6
1.1.4. Importance du <i>V. unguiculata</i>	6
1.1.5. Production du niébé au Bénin.....	8
1.1.6. Contraintes de production du niébé au Bénin.....	9
1.2. Caractérisation moléculaire	9
1.2.1. Définition et importance des marqueurs moléculaires	9
1.2.2. Différents types de marqueurs moléculaires	10
1.2.3. Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR)	12
1.2.4. Etat de la diversité génétique au sein des cultivars et variétés de <i>V. unguiculata</i> (L.) Walp dans le monde	12
II. MATERIEL ET METHODES.....	14
2.1. Milieu d'étude	15
2.2. Matériel	15
2.2.1. Matériel végétal	15
2.2.2. Marqueurs moléculaires	16
2.3. Méthodes	18
2.3.1. Semis des accessions et variétés.....	18
2.3.2. Prélèvement des feuilles	19
2.3.3. Extraction d'ADN	19

2.3.4.	Vérification et dosage de l'ADN	20
2.3.5.	Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR) et Electrophorèse.....	21
2.4.	Analyse statistique des données moléculaires	22
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	24
3.1.	Résultats	25
3.1.1.	Polymorphisme génétique et diversité allélique	25
3.1.2.	Diversité et Structuration génétique des accessions	28
3.1.2.1.	Variabilité génétique	28
3.1.2.2.	Analyse en Coordonnées Principale (PCoA).....	28
3.1.2.3.	Différenciation génétique	29
3.1.2.4.	Classification des accessions étudiées	30
3.2.	Discussion	32
3.2.1.	Polymorphisme génétique et diversité allélique	32
3.2.2.	Diversité et structure génétiques de la collection	33
	CONCLUSION ET SUGGESTIONS	34
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34
	ANNEXE	34

RESUME

Le niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp) est une légumineuse produite au Bénin dans les différentes zones de agro-écologiques et présente de nombreux cultivars. La présente étude a pour but de contribuer à la connaissance approfondie de cette ressource phytogénétique, un préalable à l'amélioration de sa productivité pour une auto-suffisance alimentaire au Bénin. Pour ce faire, 50 accessions provenant du Bénin, du Nigéria, du Burkina-Faso, du Ghana et du Niger ont été caractérisées au niveau moléculaire à l'aide de 22 marqueurs microsatellites dont 12 se sont révélées polymorphes. Au total, 28 allèles ont été observés avec une moyenne de 2,33 par locus. Le pouvoir discriminant des marqueurs (PIC) a varié entre 0,11 (CP29) et 0,52 (CP13) avec une moyenne de 0,27. La plus forte diversité génétique a été observée au sein des accessions du Nigéria ($H_e = 0,36$) alors que la plus faible a été détectée au sein des accessions du Burkina-Faso ($H_e=0,03$). L'analyse en coordonnées principales (PCoA) a montré une répartition aléatoire des accessions. Par contre, l'analyse UPGMA a permis de classer les assessions en trois groupes génétiques ne reflétant pas leurs origines géographiques. Les résultats de cette étude montrent l'existence d'une grande diversité génétique au sein de la collection de niébé analysée ; ce qui est un atout pour la mise en place d'un programme d'amélioration génétique indispensable pour la lutte contre l'insécurité alimentaire au Bénin.

Mots clés : niébé, microsatellites (SSR), locus, marqueur, polymorphisme

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) is a legume produced throughout the different agro-ecological zones of Benin. According to these zones, it presents important number of cultivars. The present survey has for goal to contribute to the knowledge deepened of this phylogenetic resource, a previous to the improvement of its productivity for a food self-sufficiency in Benin. For this fact, 50 accessions coming from Benin, Nigeria, Burkina-Faso, Ghana and Niger have been characterized to the molecular level with 22 microsatellites of which 12 appreaded polymorphic. 28 alleles has been observed with an average of 2.33 by locus. The discriminative power of the primers (PIC) varied between 0.11 (CP29) and 0.52 (CP13) with an average of 0.27. The biggest genetic diversity was observed within Nigeria accessions ($H_e = 0.36$) whereas lowest was metted between Burkina-Faso accessions ($H_e=0,03$). The Principal Coordonnates Analysis (PCoA) brought up a uncertain accessions distribution. Thus, UPGMA anlysis has helped to classify acesions into three genetics groups include each of the accessions of various country. The results of this survey show the existence of a genetic diversity within cowpea accessions, what is an asset for the setting up of a genetic improvement program to the profit of the struggle against the food insecurity in Benin.

Key-word : cowpea, microsatellites (SSR), locus, primer, polymorphism

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le Bénin est un pays de l'Afrique de l'Ouest dont la contribution du secteur primaire (agriculture, élevage, pêche et forêts) au Produit Intérieur Brut (PIB) est de 32,6 % en 2005 (Plan Stratégique de Relance du Secteur Agricole, 2011). La production végétale constitue la principale branche avec une contribution d'environ 25% au PIB (CPSA, 2017). En effet, le renforcement de la production agricole béninoise avait constitué l'un des facteurs de croissance de l'activité économique de 2014 à 2015 (RSEF-Bénin, 2016). Ainsi, les plus grandes réformes promises dans ce domaine sont l'augmentation du revenu et du capital de la population rurale, la maintenance de la sécurité alimentaire et nutritionnelle en prenant soin de fortifier le flux des produits béninois d'exportation (Programme d'Action du Gouvernement : volet agriculture, 2016). Plusieurs filières font actuellement l'objet des priorités de l'Etat béninois. Parmi celles-ci se retrouve le niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp), une légumineuse largement consommée sur toute l'étendue du territoire national.

Le niébé (*V. unguiculata* L. Walp) est l'une des légumineuses les plus produites sur le plan mondial (Kareem et Taiwo, 2007). Cette légumineuse est produite dans la majorité des zones agro-écologiques du Bénin (FAO, 1995). C'est une culture dont la production garantit la sécurité alimentaire des pays en développement. Au Bénin, produit pour ses jeunes feuilles, jeunes gousses et graines sèches ou non, les graines de cette légumineuse sont transformées en poudre, beignets et autres produits (Kossou *et al.*, 2001; Zannou *et al.*, 2004). Elles sont riches en protéines (22 %), en carbohydrates et en éléments minéraux (Stoilova et Pereira, 2013). Par ailleurs, sa production présente aussi des avantages sur les plans agronomique (fertilisation naturelle du sol par son apport en Azote), économique (vente des graines et feuilles) et dans la production animale (alimentation du bétail à base des résidus de récolte) (Muleba *et al.*, 1997).

La production de *V. unguiculata* au Bénin connaît plusieurs contraintes biotiques et abiotiques (Kossou *et al.*, 2001). Il s'agit de l'action dévastatrice des insectes ravageurs (Houinsou *et al.*, 2014 ; Barro *et al.*, 2016), de l'indisponibilité des semences certifiées de production (Houindé et Adji Kakpo, 2016), de l'inefficacité des produits de traitements (Adigoun, 2002) et de la sensibilité à la sécheresse extrême (Martins, 2014). En effet, l'ignorance de l'existence du matériel végétal avait déjà été identifiée comme une contrainte de production du niébé et des ressources phytogénétiques du Bénin dans le rapport de la FAO en 1995. Ce facteur a été confirmé par les enquêtes réalisées par Houindé et Adji Kakpo (2016) dans la commune de Savè. Pendant lesdites enquêtes, les producteurs ont une fois encore stipulé que l'une des

contraintes majeures liées à la production du niébé dans leur zone est l'inexistence de semences certifiées.

Dans l'option de résoudre le problème relatif au manque de semences certifiées, le développement (création/amélioration) de nouvelles variétés et la vulgarisation de ces dernières auprès des producteurs constituent une priorité. Il est donc important de disposer des informations sur la morphologie et le génotype des cultivars de niébé existants afin d'installer une banque de semences pour une meilleure sélection sur la base des caractéristiques de chacune d'elles. Ainsi, récemment une caractérisation morphologique a été faite par Gbaguidi *et al.* (2016) sur près d'une centaine de cultivars de niébé au Bénin. Cette étude a révélé l'existence d'une grande diversité phénotypique au sein de ces cultivars. Ils ont également mentionné que cette diversité constatée peut être la résultante entre l'effet du génotype et des facteurs de l'environnement. Cette hypothèse émise ne peut être démontrée que partiellement avec la caractérisation moléculaire génétique qui ne saurait directement montrer l'action du facteur environnement. Par conséquent, la caractérisation moléculaire des cultivars de niébé du Bénin est nécessaire.

Ainsi, dans le but de révéler la diversité existante entre les cultivars du Bénin et de certains pays de l'Afrique de l'Ouest, la présente étude a été initiée « *Caractérisation génétique moléculaire des accessions de niébé (Vigna unguiculata L. Walp) utilisant des marqueurs microsatellites* »

Objectifs et Hypothèse de recherche

L'objectif général de ce travail est de contribuer à la connaissance de la diversité génétique au sein des accessions de niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp) en vue d'une amélioration génétique de leur productivité.

Plus spécifiquement, ce travail vise à :

- Evaluer la variabilité génétique au sein des accessions de niébé aux moyens des marqueurs moléculaires ;
- Déterminer la structuration génétique des accessions de niébé.

Les hypothèses qui sous-tendent les objectifs présentés ci-dessus sont :

- Les accessions étudiées présentent une forte diversité génétique.
- La plupart des accessions évaluées dans cette étude ont montré une classification indépendamment de leurs origines

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Généralités sur le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

1.1.1. Origine et Taxonomie du niébé

Le niébé appartient au genre *Vigna* d'origine asiatique et constitué d'environ 150 espèces herbacées (Verdcourt, 1970 ; Caburet et Hekimian Lethève, 2009). Les variétés de niébé cultivées font partie de l'espèce *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Sa position systématique est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1: Taxonomie du niébé

Règne	Végétal
Embranchement	Phanérogames
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Super ordre	Leguminosae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous famille	Faboideae
Genre	<i>Vigna</i>
Section	Catjang
Tribu	Phaseoleae
Sous tribu	Phaseolinae
Espèce	<i>Vigna unguiculata</i>

Source: Maréchal *et al.*, (1978)

1.1.2. Morphologie du *V. unguiculata*

Le niébé est une plante herbacée annuelle autogame, à port rampant, érigé ou volubile selon les cultivars, les conditions de température et de photopériode (Caburet et Hekimian Lethève 2009). La racine principale est pivotante, bien développée et les racines latérales et adventives sont nombreuses. La tige est anguleuse, ou presque cylindrique (Figure 1). La germination est épigée. Les deux premières feuilles sont opposées, les suivantes sont alternées, pétiolées et trifoliées. Chaque nœud de la tige porte trois bourgeons axillaires et deux stipules prolongées sous l'insertion. L'inflorescence est une fausse grappe axillaire ou terminale atteignant 35 cm de long, à fleurs groupées près du sommet. Le rachis est tuberculé et les fleurs sont bisexuées. Ces dernières sont de couleurs variables : blanches, jaunâtres, bleu pâle, rose,

violet. Le fruit est une gousse cylindrique de 8-30 cm de long, renflées à l'emplacement des grains, de taille et de pigmentations variables, pendantes ou dressées. Les gousses contiennent 8-30 graines. Les grains présentent une grande variété de colorations (unis, à œil, bicolores, tachetés...) et de taille (Figure 1).



Figure 1: Photo montrant une tige et quelques graines de niébé

Source : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Cornille>

1.1.3. Ecologie du *V. unguiculata*

La production de cette culture nécessite une pluviométrie moyenne de 900-1500 mm/an (Adegbola *et al.*, 2012). La répartition bi-modale (deux saisons sèches et deux saisons pluvieuses) offre la possibilité de deux campagnes agricoles par an pour cette culture au Bénin. Il se développe sous une température variant de 25-28 °C et sur un sol sableux-limoneux, limoneux-argileux, bien drainé et profond de pH compris entre 6 et 7 (Dugje, 2009).

1.1.4. Importance du *V. unguiculata*

Le niébé est une importante denrée de base de l'Afrique subsaharienne (Dugje, 2009) et sa culture présente des avantages sur les plans nutritionnel, agronomique et économique.

En effet, le niébé est la principale source de protéines végétales, la plus appropriée aux populations les plus pauvres (Dètongnon *et al.*, 2000). Encore appelé « viande du pauvre » (Diouf et Hilu, 2005), la plante de niébé est très riche en microéléments et procure ainsi aux consommateurs les éléments nutritifs déficitaires dans les céréales, comme l'histidine (Cissé et

Hall, 2003). Certaines transformations alimentaires faites des graines et feuilles du niébé sont listées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Transformations alimentaires du niébé

Organes utilisés	Nom local du produit transformé	Mode de préparation et de consommation
Graines	Abobo	Graines bouillies, assaisonnée et accompagnées d'huile ou de la friture et du gari ou du pain
	Atta	Graines moulues, assaisonnée, pétri et frit en beignets
	Mangnimangni	Graines moulues, assaisonnées et cuit à vapeur humide
	Atassi	Graines cuites directement avec du riz et accompagnées avec de la friture
	Adowè	Graines débarrassées de l'épiderme et cuites en bouillie accompagnées de pain
	Zankpiti	Graines bouillies, assaisonnée et préparées en pâte avec de la farine de maïs
	-	Graines grillées en compagnies du maïs et assaisonnées de sel
	Adalou	graines bouillies avec du maïs, assaisonnées et accompagnées d'huile ou de la friture et du gari
Feuilles	-	Moulues et assaisonnées comme sauces.
	-	Utilisées comme épinard

Source : Adapté de Soule (2002)

N.B : Les noms utilisés dans le Tableau 2 sont en langue « Gun » du Bénin

Sur le plan agronomique, les racines du niébé en symbiose avec les rhizobiums permettent la fixation biologique de l'azote atmosphérique, ce qui contribue à restaurer la fertilité du sol. Les études de Bado (2002) ont montré qu'une culture pure de niébé peut fixer 50 à 115 kg d'azote/ha et ceci participe pour 52 à 56 % à la satisfaction de ses propres besoins. En plus, il

améliore les propriétés physiques et biologiques des sols et assurent la solubilisation des phosphates de calcium et de phosphore grâce aux exsudats racinaires.

Sur le plan économique, les graines, feuilles vertes, et fourrages sont vendues et aident les producteurs à améliorer leurs revenus (Adegbola *et al.*, 2012). C'est une culture dont toutes les parties (feuilles, tiges, gousses) restantes après la récolte sont utilisées dans l'alimentation animale (Diouf et Hilu, 2005).

Les graines sèches du niébé sont vendues chères (500-700 FCFA/kilogramme) en période de soudure (Soule, 2002) ; ceci permet aux femmes et aux hommes producteurs de subvenir à leurs propres besoins et aux besoins de leurs progénitures. Cette culture permet également d'amenuiser les dépenses liées à l'alimentation des animaux d'élevage et de faire ainsi de grand profit.

1.1.5. Production du niébé au Bénin

La superficie emblavée est en moyenne de 11 800 000 ha/an (Ouali-N'goran *et al.*, 2014). Selon Nkouannessi (2005), plus de la moitié de la production mondiale est enregistrée en Afrique de l'Ouest où le Nigéria est le plus grand producteur (Soule, 2002). L'Afrique de l'Ouest constitue la forte zone de consommation de cette légumineuse.

Faisant partie de l'alimentation de base de la population béninoise (FAO, 1995), environ 7% des terres agricoles de Bénin sont consacrées à sa production (MAEP, 2012 ; Soule, 2002). La productivité moyenne au Bénin est de 700 kg à l'hectare (Simon, 2011). La Figure 2 présente les productions annuelles de niébé au Bénin de 2004-2017.

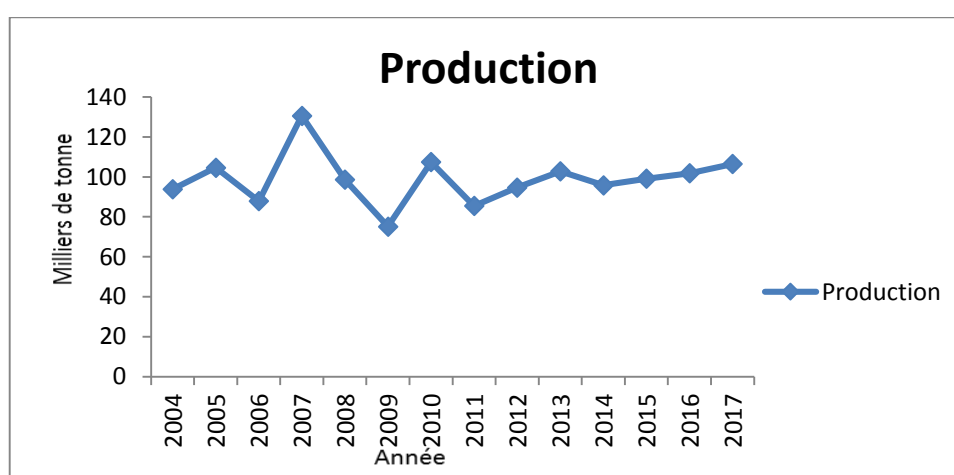


Figure 2 : Production béninoise du niébé

Source : adapté de BCEAO (2017)

1.1.6. Contraintes de production du niébé au Bénin

Malgré son importance, sa production est limitée par l'action dévastatrice des insectes ravageurs lors du développement au champs et en stock (Kossou *et al.*, 2011 ; Adegbola *et al.*, 2012 ; Houinsou *et al.*, 2014), la non disponibilité des semences de qualités (Houindé et Adji Kakpo, 2016) et des contraintes liées au changements climatiques telles que la sécheresse (Martins, 2014).

En effet, jusqu'à nos jours les producteurs de niébé du Bénin n'achètent pas les semences certifiées pour leur production. Ils se rendent généralement au marché chez les bonnes dames pour acheter les grains de consommation et en utiliser comme semences. D'autres conservent une partie de la campagne précédente pour pouvoir les semer dans la campagne suivante. Ce facteur de la chaîne de production affaiblit la productivité malgré toutes les peines des producteurs à obtenir un bon rendement (Houindé et Adji Kakpo, 2016).

Les maladies causées par ces microorganismes les plus fréquentes sont la pourriture de la tige (Sclerotium), la pourriture des racines et du collet, la fonte des semis, la cercosporiose, les taches foliaires (Septoria), le flétrissement fusarien et les gales (Adandonon *et al.*, 2005 ; Adandonon *et al.*, 2006 ; Dugje, 2009).

Plusieurs insectes perturbent également cette culture pendant toutes ses phases de production et post-récolte. Il s'agit des pucerons (*Aphis craccivora*) (Dugje, 2009), les thrips floricoles (*Megalurothrips sjostedti* Trybom) (Reddy et Bankoula, 1988), la foreuse des gousses (*Maruca vitrata* Fabricius) (Sani et Umar, 2016 ; Bal, 1992), la punaise suceuse de gousse (*Clavigralla tomentosicollis* Stål) (Dugje, 2009) et la bruche du niébé (*Callosobruchus maculatus*) (Dugje, 2009).

Par ailleurs, les changements climatiques restent un passage difficile du cycle de développement de tous les êtres vivants. La présente culture est sévit par la sécheresse surtout pendant sa phase de floraison (Martins, 2014 ; Gbaguidi *et al.*, 2013, Mafakheri *et al.*, 2017).

1.2.Caractérisation moléculaire

1.2.1. Définition et importance des marqueurs moléculaires

La caractérisation des ressources phytogénétiques est un sujet d'actualité pour toutes les espèces existantes. De façon classique, elle se fonde sur les caractères morphologiques et ceux moléculaires. En effet, la caractérisation morphologique a souvent des complications dues aux

effets de l'environnement sur le génotype ; ce qui la rend incomplète (Roldán-Ruiz *et al.*, 2005). Celle moléculaire est basée sur l'information génétique (ADN) des espèces caractérisées. Elle est très spécifique et vient confirmer (justifier) les informations retenues sur la morphologie. Les marqueurs moléculaires ont plusieurs applications notamment dans les programmes d'amélioration des espèces végétales. Ils contribuent à l'analyse de la diversité génétique, de la sélection assistée par des marqueurs et de l'établissement de la cartographie. Selon Mohammadi et Prasanna, (2003), c'est un véritable outil dans les programmes d'amélioration et de création variétale.

1.2.2. Différents types de marqueurs moléculaires

Selon de Vienne (1998), plusieurs marqueurs moléculaires ont été identifiés pour la caractérisation moléculaire des espèces végétales dans le monde tels que : RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et SSR (Simple Sequence Repeat). Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe capable de renseigner sur le génotype d'un locus ou des loci voisin(s) (Najimi *et al.*, 2013). Ce sont des fragments d'ADN qui servent de sonde pour l'identification des éventuelles mutations d'une espèce (Gaillardin et Tinsley, 2007). Ainsi, un bon marqueur est polymorphe, robuste, codominant, distribué régulièrement le long du génome, discriminant, non sujet aux influences environnementales.

En effet, la RAPD introduite par Williams *et al.* en 2009 est basée sur l'amplification enzymatique des fragments courts de 10 bp de l'ADN (Chebbil *et al.*, 1995). Fort de la petite longueur de l'amorce et de la faible température d'hybridation (35-40°C), l'hybridation de la séquence cible est très fréquente (Diouf et Hilu, 2005). Sa plus grande faiblesse est la faible reproductibilité de certains produits de l'amplification (Chebbil *et al.*, 1995). Etant un marqueur dominant, ils présentent des problèmes de co-migration et de reproductibilité. La RAPD avec ces différentes composantes ont été pratiquées. Zannou *et al.* (2008) ont fait la caractérisation moléculaire génétique de 70 accessions de niébé du Bénin sur la base des RAPD. Ces accessions ont été groupées en 7 avec une similarité de 71% sur la base de l'UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages).

La RFLP développée par Botstein *et al.* (1980) repose sur la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN après digestion par des enzymes de restriction. Les RFLPs sont identifiés en utilisant les enzymes de restriction qui coupent l'ADN uniquement sur des sites de

restriction déterminés. Une fois amplifié par PCR, un fragment de gène est exposé à une enzyme de restriction spécifique qui coupe seulement l'une des formes alléliques. Les amplicons digérés sont résolus par électrophorèse. Cette technique est lente, laborieuse et nécessite une grande quantité d'ADN. Elle a une faible robustesse, un faible niveau de polymorphisme et co-dominant.

Les polymorphismes de longueur de fragments amplifiés (AFLP) publiée par Vos *et al.* (1995) sont des marqueurs bialléliques. Ils sont basés sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. C'est une technique d'empreinte d'ADN qui détecte les fragments de restriction d'ADN par PCR. Les AFLP génèrent des quantités énormes d'informations qui nécessitent des analyses automatisées, et pour cela des technologies informatiques. Ils sont des marqueurs dominants. Cette technique a été utilisée par Fang *et al.* (2007) pour la caractérisation du niébé.

Les SNPs sont des variations des nucléotides simples qui ne changent pas la longueur globale de la séquence d'ADN dans la région. Ils sont très abondants et se produisent partout dans le génome. Ils sont localisés dans les régions non codantes et ne présentent pas un effet direct sur l'expression de ces régions. Néanmoins, certains introduisent des mutations dans des séquences qui peuvent donner lieu à des changements dans la structure ou la régulation des protéines. Ce sont des marqueurs bialléliques qui révèlent la variation au niveau d'un seul nucléotide. Les SNPs ont été utilisés dans l'étude de la diversité génétique et l'estimation de la structure de 768 accessions de niébé de 56 pays par Xiong *et al.* (2016). L'arbre phylogénétique réalisé a permis d'avoir trois (03) différentes populations

Reposant sur le nombre d'unités (1-6 bp) de répétition, les microsatellites (SSRs) procurent un fort taux de polymorphisme (Asare *et al.*, 2010; Wamalima *et al.*, 2016 ; Mafakheri *et al.*, 2017). Produit pendant l'amplification de l'ADN, les microsatellites sont distribués partout dans les génomes des plantes et animaux. La variation dans cette région est détectée avec la PCR et visualisée sur un gel d'agarose ou d'acrylamide. Les microsatellites (SSR) sont des marqueurs moléculaires hypervariables, codominants, robustes et informatifs pour les analyses dans le génome. En effet sur un locus donné, ils révèlent plusieurs allèles différents l'un de l'autre. Au Ghana, la caractérisation moléculaire de 141 accessions a été conduite sur la base des marqueurs SSRs par Asare *et al.* (2010). Le contenu informatif de polymorphisme (PIC) obtenu était de 0,37 avec une moyenne de 3,8 allèles par locus.

1.2.3. Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR)

La PCR est une technique de biologie moléculaire qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN cible. Les propriétés fondamentales de complémentarité des bases nucléotidiques et de répllication semi-conservative et de répllication semi conservative de la molécule d'ADN sont exploitées pour cette multiplication in vitro. Sa réalisation nécessite des amorces (*primers* en anglais) arbitraires ou spécifiques des séquences à amplifier, une matrice d'ADN, les bases nucléotidiques (dNTPs), l'ADN polymérase (*Taq* polymérase) et un tampon PCR. La PCR se réalise dans un thermocycleur et suit les étapes ci-dessous :

- *Dénaturation de la molécule* par la chaleur c'est-à-dire la séparation des deux brins constituant la molécule d'ADN sous l'effet de la chaleur ou de la hausse de la température.
- *Hybridation d'amorce* : elle consiste à la fixation d'amorce sur chaque brin afin d'identifier la séquence d'intérêt.
- *Elongation* : la séquence d'intérêt est copiée par synthèse du nouveau brin. Cette élongation a lieu grâce à la *Taq* polymérase.

L'ensemble de ces trois étapes constitue un cycle. Cette réaction s'enchaîne en cycles successifs : réaction en chaîne de la polymérase. A la fin d'une réaction de PCR à n cycles, on dénombre 2^n molécules identiques entre elles et identiques à la molécule mère.

1.2.4. Etat de la diversité génétique au sein des cultivars et variétés de *V. unguiculata* (L.) Walp dans le monde

Le niébé est une espèce diploïde ($2n = 22$ chromosomes) dont la taille du génome est d'environ 630 Mb (Muchero *et al.*, 2009; Wamalwa *et al.*, 2016).

Sur le plan international, des études ont été conduites pour déterminer l'origine mère du niébé. Xiong *et al.* (2016) ont prouvé que l'Afrique de l'Ouest et de l'Est sont les premiers milieux de domestication du niébé produit de nos jours grâce à une étude de diversité génétique et de structure de la population . Leur travail a également montré l'évolution des accessions de chaque pays par rapport à celles sauvages. Par ailleurs, des travaux de caractérisation tels que les études de Mafakheri *et al.* (2017) ont été abordé sur des accessions d'origines différentes, Wamalwa *et al.* (2016) sur les accessions du Kenya. Ces derniers ont obtenu 2 groupes d'accessions sur les 19 caractérisés avec 2 marqueurs SSRs. Mafakheri *et al.* (2017) ont obtenu après classification des groupes qui ne se sont pas formés en fonction des origines des accessions. Ces mêmes travaux de caractérisation en 2012 au Nigéria ont révélé la disponibilité

d'une diversité génétique au sein de 20 accessions du pays sur la base de six (06) marqueurs SSR (Adetiloye *et al.*, 2012). En effet, ils ont identifié 05 groupes indépendant des zones de collection et des zones agro-écologiques au coefficient de similitude de 70 %. De plus, Au Ghana, Asare *et al.* (2010) ont caractérisé 142 accessions des différentes zones agroécologiques de ce pays sur la base de 20 marqueurs SSRs polymorphes. Un dendrogramme à cinq (05) branches principales dont chacune n'est pas liée ni à la zone de provenance de ces accessions ni à leur couleur. Au Sénégal, les RAPDs ont permis de révéler le niveau de la diversité génétique entre accessions et variétés de niébé (Diouf et Hilu, 2005). Au Brésil, Spiaggia *et al.* ont généré un arbre phylogénétique sur la base duquel la diversité génétique des niébés du Brésil a été révélée. Cette étude a été faite sur 30 accessions de trois espèces: *V. unguiculata*, *V. umbellata* et *V. angularis*.

Diverses études ont été menées sur cette culture surtout sur la gestion de ces ravageurs principaux et la mise au point de variétés résistantes et tolérantes par les méthodes de biotechnologie classique (croisement) au Bénin (Dannon et Tamò, 2015). Cependant, celles concernant les diversités morphologique et moléculaire des accessions locales sont encore à leur début. Les plus récentes portent sur la caractérisation agro-morphologique (Gbaguidi *et al.*, 2015) et la caractérisation génétique moléculaire basée sur les RAPD (Zannou *et al.* 2008) des différentes accessions de niébé cultivées au Bénin.

Agbahoungba *at al.* (2018) ont identifié parmi 66 marqueurs SSRs spécifiques au niébé deux marqueurs CP37/38 et CP215/216 qui sont liés au QTLs (Quantitative Trait Loci) de la résistance aux thrips floricoles du niébé. Ces marqueurs pourront par la suite être utilisés dans les programmes de sélection d'une variété de niébé tolérante au thrips floricoles.

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Milieu d'étude

La présente étude a été réalisée dans deux (02) différents lieux dans l'enceinte du campus de l'UAC situé dans la commune d'Abomey-Calavi, département de l'Atlantique. Il s'agit du :

- Site de multiplication du Laboratoire d'Ecologie Appliquée de la Faculté des Sciences Agronomiques (LEA/FSA) et,
- Laboratoire des Ressources Génétiques et Améliorations des Espèces (LaREGAME) de la FAST. Il se trouve dans le bâtiment « laboratoire pluridisciplinaire Cyprien GNANVO ».

2.2. Matériel

2.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour cette étude est une collection de cinquante (50) variétés et cultivars de niébé. Les semences des variétés ont été recueillies à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA), à l'Université de Makurdi (Nigéria), à l'Institut National de l'Environnement et de Recherche Agricoles (INERA) (Burkina-Faso), au SARI (Ghana) tandis que celles des différents cultivars ont été collectées chez les producteurs du Bénin, du Nigéria, du Ghana et du Niger. Les informations sur ces variétés et cultivars sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Noms locaux/Codes et origines du matériel végétal

N°	Nom local/Code	origines
A01	Tola	Bénin
A02	Awonliyikun	Nigéria
A03	IT00K-1263	Nigéria
A04	Agbloto	Bénin
A05	Kpojigùguè	Benin
A06	Vita-7	Nigéria
A07	Elisabeth	Bénin
A08	Apagbala	Nigéria
A09	IT97K-556-6	Nigéria
A10	IT97K-499-35	Nigéria
A11	KVX771-106	Burkina-Faso
A12	UAMO91055-6 FUAMPEA1	Nigéria
A13	TVU 415	Bénin
A14	MAWUNA	Benin
A15	Mawunan gbadonou	Benin
A16	TVU 15445	Nigéria
A17	SEWE	Bénin

A18	UAMO91051-FUAMPEA2	Nigéria
A19	KVX442-2-2554	Burkina-Faso
A20	SARC 1-91-1	Ghana
A21	TAWA	Bénin
A22	ANONSI	Bénin
A23	Glessissafodo	Bénin
A24	Kplobè	Bénin
A26	IT86D-888	Nigéria
A27	IT89KD-288	Nigéria
A28	Padituya	Nigéria
A29	Kpegbikoun	Bénin
A30	Kpodobobo	Bénin
A31	Kumassi	Ghana
A32	Nontchewagbèhami	Bénin
A33	TVU 946	Nigéria
A34	IT84S2246-4	Nigéria
A35	Komcallé	Burkina-Faso
A36	Adjayikoun	Bénin
A37	TVU-8461	Nigéria
A38	Tiligré	Niger
A39	Kaki gros grain	Bénin
A40	IT93K-452-1	Nigéria
A41	Tonton	Bénin
A42	Akounado	Bénin
A43	TVU 4557	Nigéria
A44	Toumpipeaké	Nigéria
A45	Toumkalam	Niger
A46	Kaki petit grain	Bénin
A47	Djetoko	Bénin
A48	Atchawékun	Bénin
A49	Sanzibanili	Ghana
A50	Vidéyikun (True)	Bénin

2.2.2. Marqueurs moléculaires

Au laboratoire, vingt-deux marqueurs ont été utilisés pour les PCR. Le Tableau 4 présente les informations concernant ces marqueurs. Ils sont sélectionnées dans la base de données du niébé (<http://cowpeagenomics.med.virginia.edu/CGKB/>).

Tableau 4: Marqueurs microsatellites

Noms des marqueurs		Longueur (bp)	Séquence des amorces
[SSR-6169] CP1	CP1F	20	ACCCAAGGACTTCAAGAGCA
	CP1R	20	CGAGTGCAAGAAATGGTTCA
[SSR-6170] CP2	CP2F	20	ACCTGCATTGCCTCATATCC
	CP2R	20	GCTGATTCGGCTTGTCTTC
[SSR-6171] CP3	CP3F	20	ATTCGATCCAACCCAATGAC
	CP3R	20	AGCGAAGGCATGTTCGTAAG
[SSR-6172] CP4	CP4F	20	GGAAGACACGCGTTATGGTT
	CP4R	23	TTTTTCCACTAAAAGGTTTGTC
[SSR-6173] CP5	CP5F	20	AGATCCCACGCTGATTATGG
	CP5R	20	ACTTGACGCAGAGCCATCTT
[SSR-6174] CP6	CP6F	20	TCCTTAGAGGTCCAGCCAGA
	CP6R	20	GGAGGAAGAGAGCACACACA
[SSR-6175] CP7	CP7F	20	GCAAGCTTTTGGAAGTTGGA
	CP7R	20	GGCCAGAAGCATGAATCACT
[SSR-6176] CP8	CP8F	20	GCCACAAGTGCTTGAAGTGA
	CP8R	20	CCACGTAACGAGGATCAACA
[SSR-6179] CP11	CP11F	27	GGATTCAAGAATATTGGTGTTTTCTCC
	CP11R	26	TGCCATCTCTTATCAAGACACTTTAG
[SSR-6181] CP13	CP13F	20	AATGACCCACAAAGCAAAGT
	CP13R	20	TTGGCCCCAAAATATCACACA
[SSR-6185] CP17	CP17F	20	CGGAAAAGTAGAGGGCACAG
	CP17R	20	AGAGGTTTGATACGCGCACT
[SSR-6187] CP19	CP19F	20	ACCGCCTAACCCAAGAGTTT
	CP19R	20	TGGGACCACTTCCTTTTCAG
[SSR-6189] CP21	CP21F	20	CTCAATGTCCAACCAGGTCA
	CP21R	20	CAACTCACCAAAGGGAAGGA
[SSR-6190] CP22	CP22F	20	CGAGTTGCGATATCTCCCTG
	CP22R	20	CGAAGACGACAACACAGTGG
[SSR-6191] CP23	CP23F	24	AAACTGCTAACCAGAAACAGAAAA
	CP23R	20	TGTCAATTTTGTGTCCTCA
[SSR-6192] CP24F	CP24F	20	AACGGGTCCTAAACGAATGA

CP24	CP24R	20	ATCCTTGAACCTCCGTGTTGC
[SSR-6193]	CP25F	20	ACCAAAGCAACACCAACACA
CP25	CP25R	20	GATGTGGGAAGAAGCTGAGG
[SSR-6195]	CP27F	20	GATGCTGGTGCTTGTATGGA
CP27	CP27R	23	TAATTTCTACGCAAGGGAGAGAG
[SSR-6196]	CP28F	20	TGAAAGAATCCTCGTCATCG
CP28	CP28R	20	TCAGGTCCAAAGAGCCAAAC
[SSR-6197]	CP29F	20	CATGGCTATCATGGGTCCTT
CP29	CP29R	22	TGATGTACGGAGTGAAGGAAGA
[SSR-6198]	CP30F	20	TGAAGCAAAGGGAGTTGTGA
CP30	CP30R	20	GAAAGCCCCAAAAGGGAAAAA
[SSR-6200]	CP32F	20	CCAGACAGTGCATCCCATAG
CP32	CP32R	22	GCGTTGATTTATGGACATTCAA

2.3.Méthodes

2.3.1. Semis des accessions et varieties

Le semis a été fait le 18 Août 2018 dans la serre et sur le site expérimental du Laboratoire d'Ecologie Appliquée de la Faculté des Sciences Agronomiques (LEA/FSA). Dans la serre, de petits seaux ont été préalablement remplis de sable au 2/3. Ainsi, une fois bien arrosée, le semis a eu lieu à raison de trois (03) graines par poquet répétés. Pour le terrain, un nettoyage du site a été fait, suivi par le piquetage dans le but de délimiter la parcelle de chaque accession. L'écartement observé est de 0,75 m entre lignes et 0,25 m entre plants (Figure 3).



Figure 3: Plants en pots et en plein champs

2.3.2. Prélèvement des feuilles

Pour cette étape, nous avons fait le prélèvement des feuilles un (01) mois après semis. Cette opération a consisté à couper à l'aide d'une paire de ciseaux les plus jeunes feuilles de plusieurs plants de chaque accession dans un tube préalablement désinfecté et étiqueté (méthode de bulking) (Figure 4). Ces tubes sont ensuite conditionnés dans un récipient contenant de la glace afin d'éviter le dessèchement des feuilles lors du déplacement vers le laboratoire.



Figure 4: Prélèvement des feuilles de niébé

2.3.3. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN a été faite à partir de 0,25 g de feuilles de chaque accession suivant le protocole décrit par Rogers et Bendich (1985) et récemment utilisé sur le niébé par Zannou *et al.* (2008) (Figure 5a). En effet, les feuilles ont été broyées dans du tampon CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) préalablement chauffé à 65 °C dans des mortiers à 2 x 500 µL de capacité (Figure 5b). Le broyat obtenu a été directement incubé à 65 °C pendant 40 minutes. Après refroidissement, le broyat a été centrifugé pendant 10 minutes à 12 000 tours/minute dans du Phenol Chloroforme-Isoamyl 25:24:1 (500 µL). (Figure 5c). Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube éppendorf de 2 mL. Une deuxième centrifugation a été conduite en présence de Chloroforme Isoamyl (24:1). On retire à l'aide d'une micropipette le surnageant obtenu dans un tube de 1,5 mL. De l'isopropanol frais (500 µL) a été ajouté et laissé au congélateur pendant 20 minutes pour précipiter l'ADN. Une troisième centrifugation a été faite afin de permettre à la pelotte d'ADN de se stabiliser dans le fond du tube. De l'éthanol 70 °C frais a été ajouté au culot formé et centrifugé pour le lavage. Le culot est séché pendant quelques minutes à

température ambiante (Figure 5d). Enfin, l'ADN est dissout dans de l'eau distillée stérilisée (150 mL) et conservé à -20 °C.

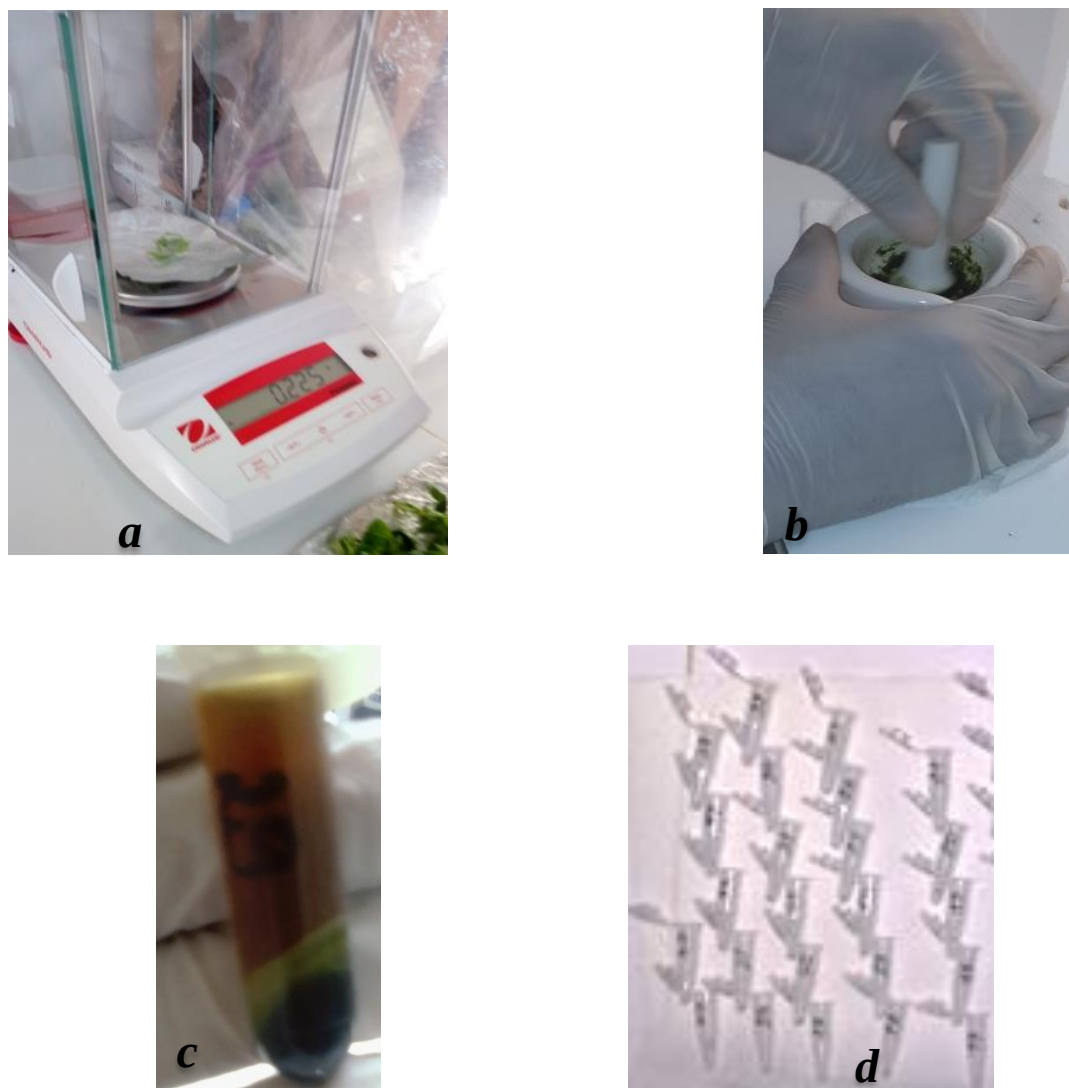


Figure 5: Quelques étapes de l'extraction de l'ADN
(a:Pesage, b:Broyage, c:Produit de centrifugation et d:Séchage)

2.3.4. Vérification et dosage de l'ADN

L'ADN dissout a été vortexé pendant quelques secondes afin d'homogénéiser la solution. Un tampon (5 μ L d'eau distillée + 3 μ L de Bleu de charge) a été ajouté à 2 μ L d'ADN de chaque échantillon puis déposée sur gel d'agarose à 1 %. Après une migration pendant 30 minutes à 140 V, les gels ont été observés au trans-illuminateur pour tester la qualité de l'ADN extrait. L'ADN de chaque échantillon a été par la suite dosé au spectrophotomètre et des dilutions au 1/100 ou au 2/100 ont été réalisées selon le cas pour constituer les solutions de travail.

2.3.5. Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR) et Electrophorèse

La PCR a été préparée dans une plaque PCR de 96 puits (Figure 6) pour un volume réactionnel de 25 μ L. Le mélange contenait 0,1 μ L de *Taq* polymérase, 3 μ L de la matrice d'ADN, 16,65 μ L d'eau (H₂O) distillée stérilisée, 2 μ L d'amorces (Forward et Reverse) (Tableau 3), 0,75 μ L de dNTP et 2,5 μ L de tampon. La réaction de PCR a été faite à l'aide d'un Thermocycleur de marque PTC-100 MJ Research Inc. (Programmable Thermal Controller) (Figure 6). Le Tableau 5 présente ainsi les différentes étapes de la PCR et leurs différentes températures.

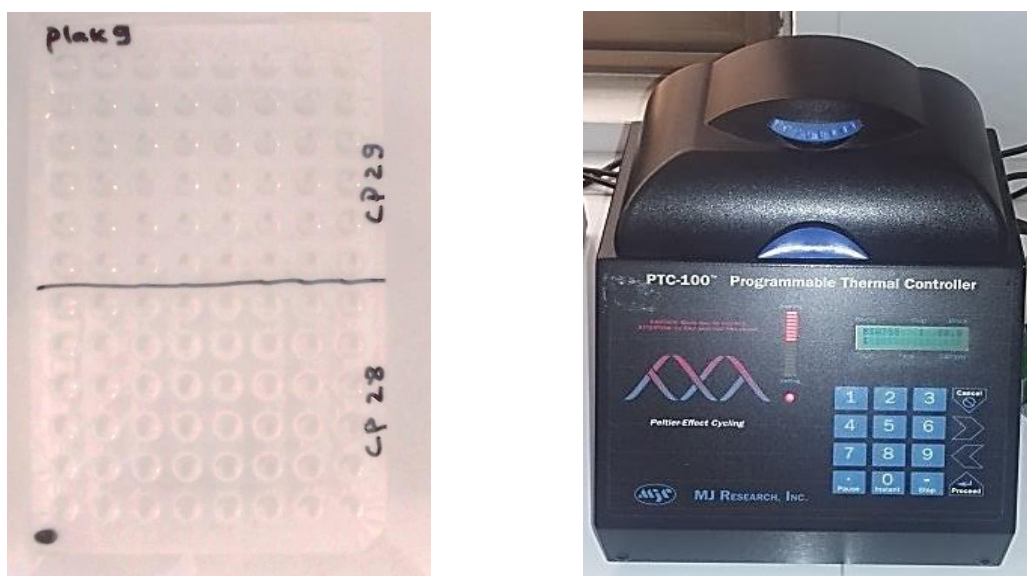


Figure 6: Plaque à 96 puits et un thermocycleur

Tableau 5: Etapes des PCR

Etapes	Température (°C)	Durée	Cycle
Dénaturation initiale	94	4 minutes	31
Denaturation finale	94	30 secondes	
Hybridation	55	30 secondes	
Elongation initiale	72	45 secondes	
Élongation finale	72	-	
Conservation	10	5 minutes	

Après l'obtention des produits PCR, on est passé à l'électrophorèse. Après avoir préparé un gel agarose de 3,5 % (Figure 7a), nous avons ajouté 10 μ L de bleu de charge à chaque produit PCR. S'en est suivi le dépôt de 12 μ L de chaque échantillon (produits PCR + bleu de charge)

dans les puits d'électrophorèse avec au préalable un dépôt de marqueur de taille (100 bp) au début et à la fin de chaque ligne (Figure 7b). La migration est lancée à 150 V pendant 2 heures (Figure 7c).

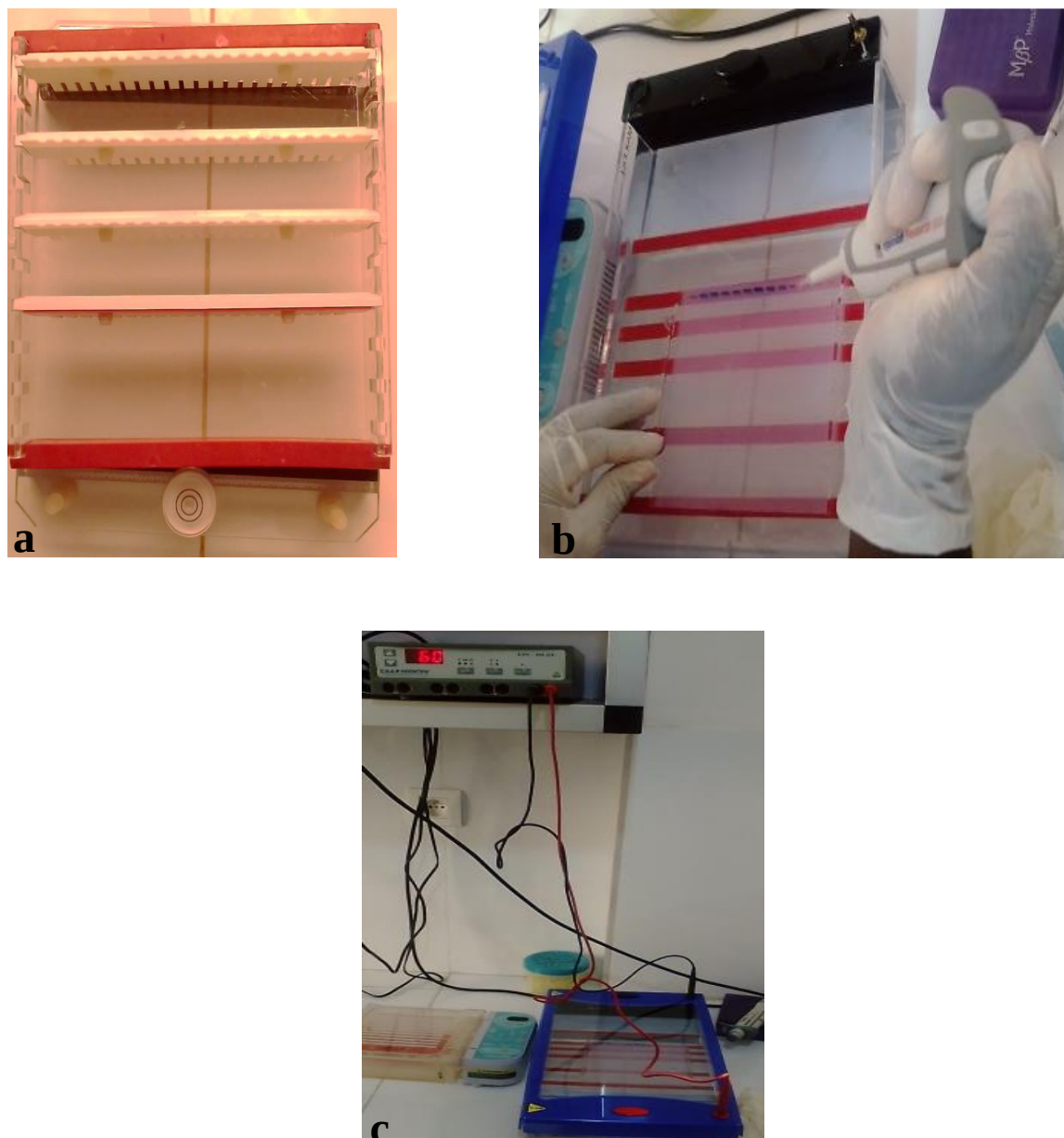


Figure 7: Gel d'agarose et Electrophorèse
(a:Gel coulé, b:Dépôt et c:Dispositif de migration)

2.4.Analyse statistique des données moléculaires

Une matrice des données a été conçue après visualisation des bandes produites après électrophorèse. Etant donné que le présent travail est basé sur des marqueurs SSRs (codominants), les différents allèles d'un locus ont été scorés (1, 2, 3...). Les paramètres de diversité génétique estimés sont entre autres :

- le taux de polymorphisme (**P**),
- la diversité allélique (**N**) (nombre d'allèles par locus)
- Hétérozygotie moyenne attendue (**H_e**) ou indice de Néi
- la valeur PIC (Polymorphism Information Content)
- la distance génétique entre les accessions

$$d_{ij} = 1 - 1/L \left(\sum_{i=1}^L m_i / \pi \right)$$

avec **d** : distance de dissimilarité entre i et j (individus) ; **L** : nombre de loci ; **π** : ploïdie ; **m** : nombre d'allèle par locus à base du logiciel GenAlex 6.503.

Ainsi, la matrice de distances obtenues a permis la construction d'un dendrogramme par la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) à travers le logiciel DARWIN 6.0.14. Par ailleurs, une analyse en Coordonnées Principales (PCoA) utilisant le logiciel Power Marker 3.25.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats

3.1.1. Polymorphisme génétique et diversité allélique

Les paramètres de diversité (Tableau 6) ont été calculés après visualisation sur le Trans-illuminateur des bandes obtenues après migration (Figure 8). Douze (12) marqueurs se sont révélés polymorphes sur les 22 marqueurs. Le nombre total d'allèles observés pour les 12 marqueurs est de 28 pour une moyenne de 2,33 par locus. Pour toute la population, l'hétérozygotie observée est de 10% alors que celle attendue est de 33%. Le Contenu en Information du Polymorphisme (PIC) a varié entre 0,11 et 0,52 avec une moyenne de 0,27. Le marqueur CP13 s'est révélé le plus informatif (PIC=0,52) sur la diversité des 50 accessions.

Tableau 6: Diversité génétique des 50 accessions

Marqueur	Nombre d'allèles	He	Ho	PIC	Fis	Fst
CP 13	3	0,59	0,82	0,52	0,27	0,28
CP 19	2	0,19	0,18	0,17	0,02	0,08
CP 24	2	0,13	0,14	0,12	-0,09	0,05
CP 27	3	0,38	0,12	0,33	0,83	0,14
CP 29	3	0,11	0,02	0,11	0,80	0,10
CP 21	2	0,49	0	0,37	1	0,19
CP 1	2	0,21	0	0,18	1	0,80
CP 2	3	0,18	0	0,17	1	0,30
CP 5	2	0,24	0	0,21	1	0,15
CP 7	2	0,47	0	0,36	1	0,72
CP 11	2	0,49	0	0,37	1	0,31
CP 23	2	0,47	0	0,36	1	0,27
Moyenne	2,33	0,33	0,10	0,27	0,73	0,28

Par ailleurs, une absence d'hétérozygote ($H_o = 0$) a été observée pour sept (07) marqueurs (CP21, CP1, CP2, CP5, CP7, CP11 et CP23) tandis que le marqueur CP13 a présenté le taux le plus élevé en hétérozygotes ($H_o = 0,82$). La valeur de la différenciation génétique F_{st} a varié de 8% à 80% avec une moyenne de 28% pour l'ensemble des accessions.

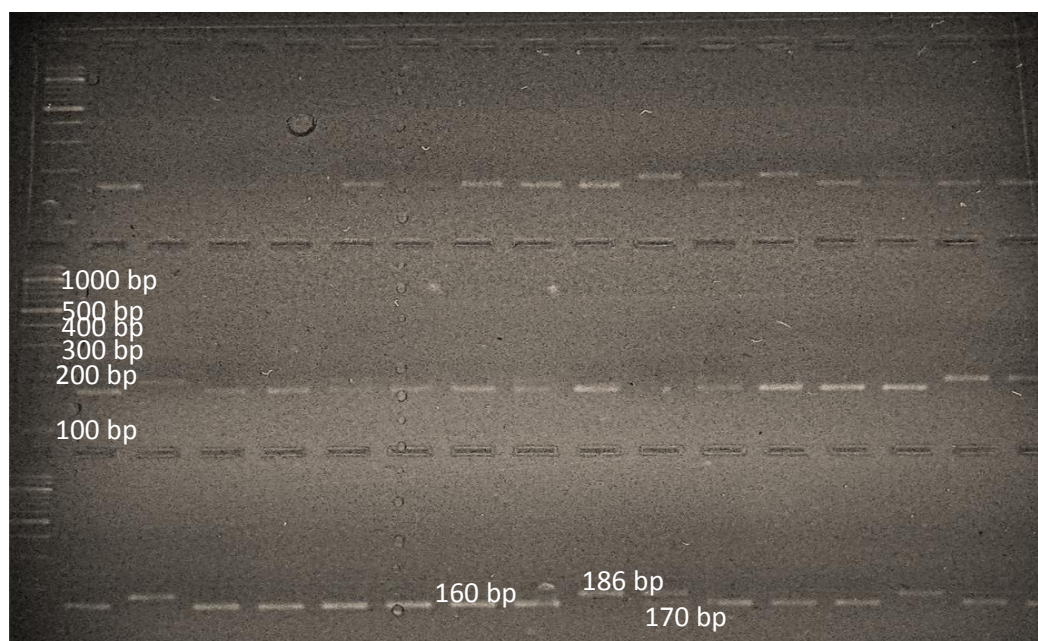


Figure 8 : Photo montrant la diversité des accessions avec le marqueur CP27

Le Tableau 7 permet d'apprécier la répartition des allèles sur les 05 pays de provenance étudiés. Les allèles présentés par chacun des loci se retrouvent dans au moins deux pays à l'exception de CP29 dont un seul allèle (A) est reparti dans les 05 pays pendant que seules les accessions du Nigéria contiennent les trois allèles (A, B et C) de ce locus. Les deux allèles (B et C) sont rares dans la collection. Il faut également noter qu'excepté le CP 21 qui présente deux formes au Burkina-Faso, tous les autres loci se sont montrés monomorphes dans ce pays. Six (06) loci (CP19, CP24, CP29, CP1, CP5 et CP7) se sont révélés simultanément monomorphes aux Burkina- Faso, Ghana et Niger.

Tableau 7: Fréquence allélique

Locus	Population	N	Fréquence allélique		
			A	B	C
CP 13	Bénin	25	0,44	0,34	0,22
	Nigéria	17	0,52	0,29	0,17
	Burkina-Faso	3	1	0	0
	Ghana	3	0,33	0,5	0,16
	Niger	2	0	0,75	0,25
CP 19	Bénin	25	0,14	0,86	-
	Nigéria	17	0,11	0,88	-
	Burkina-Faso	3	0	1	-
	Ghana	3	0	1	-
	Niger	2	0	1	-

CP 24	Bénin	25	092	0,08	-
	Nigéria	17	0,91	0,08	-
	Burkina-Faso	3	1	0	-
	Ghana	3	1	0	-
	Niger	2	1	0	-
CP 27	Bénin	25	0,8	0,08	0,12
	Nigéria	17	0,7	0,02	0,26
	Burkina-Faso	3	1	0	0
	Ghana	3	0,66	0	0,33
	Niger	2	0,5	0	0,5
CP 29	Bénin	25	1	0	0
	Nigéria	17	0,82	0,08	0,08
	Burkina-Faso	3	1	0	0
	Ghana	3	1	0	0
	Niger	2	1	0	0
CP 21	Bénin	25	0,6	0,4	-
	Nigéria	17	0,35	0,64	-
	Burkina-Faso	3	0,66	0,33	-
	Ghana	3	0,66	0,33	-
	Niger	2	1	0	-
CP 1	Bénin	25	0,96	0,04	-
	Nigéria	17	0,82	0,17	-
	Burkina-Faso	3	1	0	-
	Ghana	3	1	0	-
	Niger	2	0	1	-
CP 2	Bénin	25	0,04	0,96	0
	Nigéria	17	0,11	0,82	0,05
	Burkina-Faso	3	0	1	0
	Ghana	3	0	1	0
	Niger	2	0	0,5	0,5
CP 5	Bénin	25	0,76	0,24	-
	Nigéria	17	0,94	0,05	-
	Burkina-Faso	3	1	0	-
	Ghana	3	1	0	-
	Niger	2	1	0	-
CP 7	Bénin	25	0,88	0,12	-
	Nigéria	17	0,41	0,58	-
	Burkina-Faso	3	0	1	-
	Ghana	3	0	1	-
	Niger	2	1	0	-
CP 11	Bénin	25	0,56	0,44	-
	Nigéria	17	0,52	0,47	-
	Burkina-Faso	3	0	1	-
	Ghana	3	0	1	-
	Niger	2	0,5	0,5	-

CP 23	Bénin	25	0,64	0,36	-
	Nigéria	17	0,47	0,52	-
	Burkina-Faso	3	1	0	-
	Ghana	3	1	0	-
	Niger	2	0,5	0,5	-

3.1.2. Diversité et Structuration génétique des accessions

3.1.2.1. Variabilité génétique

Le taux d'hétérozygotie (H_e) des pays a varié de 0,03 pour les accessions du Burkina-Faso à 0,36 pour les accessions du Nigéria avec une moyenne de 0,19 et des déficits très élevés en hétérozygotes eu sein de chaque pays (Tableau 8).

Quant à l'indice de fixation (F_{st}), les valeurs sont situées entre 0,72 (accessions du Bénin et du Nigéria) et 1 (accessions du Burkina-Faso). Par ailleurs, le nombre effectif d'allèles varie de 1,06 (Burkina-Faso) à 1,65 (Nigéria)

Tableau 8: Nombre d'allèles effectifs, Hétérozygoties et indice de Fixation

Population	N	Na	N.Allèle Effectif (N_e)	H_o	H_e	F_{st}
Bénin	25	2,08	1,54	0,08	0,29	0,72
Nigéria	17	2,33	1,65	0,07	0,36	0,72
Burkina-Faso	3	1,08	1,06	0	0,03	1
Ghana	3	1,33	1,26	0,02	0,12	0,81
Niger	2	1,41	1,38	0,04	0,19	0,73

3.1.2.2. Analyse en Coordonnées Principale (PCoA)

La Figure 9 illustre la répartition des accessions grâce à l'analyse en Coordonnées Principale.. Les résultats de ce test ont montré que les trois axes expliquent 51,59 % (Tableau 9) des variations moléculaires totales révélées. Le plan factoriel est représenté par les deux premiers axes qui représentent chacun 19,29 % et 17,87% de la variation totale (Tableau 9). Toutes les accessions sont proches l'une de l'autre à l'exception de celles dont les informations génétiques sont les mêmes sur la base des marqueurs utilisés. Ces accessions occupent les mêmes positions (mêmes coordonnées) sur le diagramme.

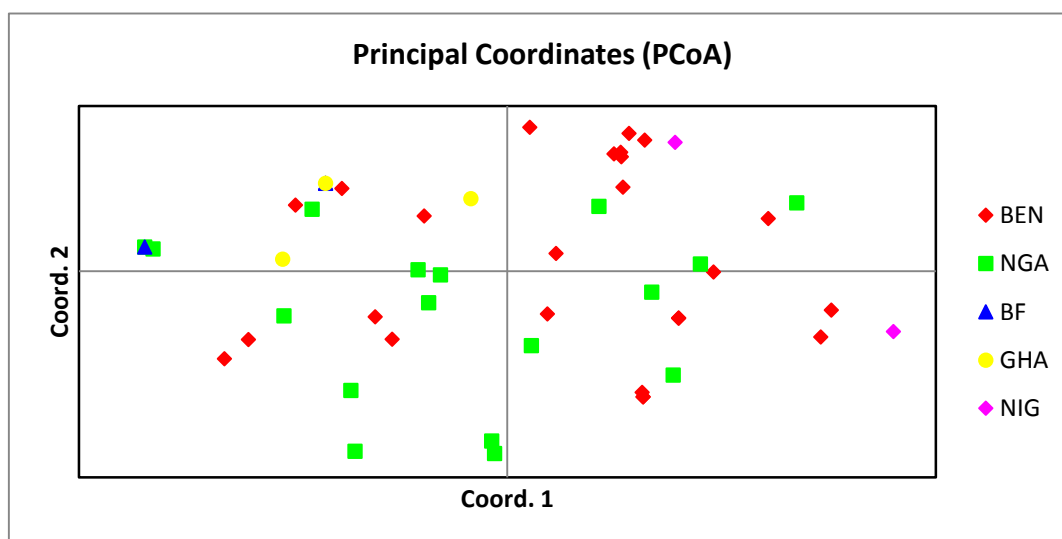


Figure 9: PCoA

montrant les relations génétiques entre les accessions.

Tableau 9: Valeurs des axes

Axes	1	2	3
Variation (%)	19,29	17,87	14,43
Valeur Commulé (%)	19,29	37,16	51,59

3.1.2.3. Différenciation génétique

Le Tableau 10 présente la différenciation génétique entre les pays qui est évaluée par la valeur de l'indice Fst. Cette valeur varie de 0,048 (Bénin-Nigéria) à 0,52 (Burkina-Faso-Niger). Sur la base de ces valeurs, l'ensemble des accessions d'un pays n'est pas identique à un autre c'est-à-dire qu'il n'existe pas de Fst = 0.

Tableau 10: Différenciation génétique par paire de populations

Bénin	Nigéria	Burkina-Faso	Ghana	Niger	
0,000					Bénin
0,048	0,000				Nigéria
0,186	0,153	0,000			Burkina-Faso
0,159	0,125	0,190	0,000		Ghana
0,189	0,185	0,527	0,414	0,000	Niger

3.1.2.4. Classification des accessions étudiées

La plus grande dissimilarité génétique ($d=33\%$) se trouve entre le couple d'accessions (A09; A32), tandis que la plus faible ($d=1\%$) se trouve entre les 2 couples d'accessions (A43; A42) et (A42 ; A33) (Annexe 1). A part les couples formés par les accessions elles-mêmes, six (06) paires dont (A16 ; A11), (A48 ; A44), (A48 ; A45), (A43 ; A33), (A45 ; A44) et (A10 ; A12) ne présentent aucune dissimilarité ($D=0\%$) entre elles.

La Figure 10 et le Tableau 11 présentent respectivement les trois groupes obtenus ainsi que les accessions assignées dans chaque groupe. Les accessions du Bénin et du Nigéria se retrouvent dans les trois différents groupes alors que celles du Burkina-Faso et du Ghana appartiennent à deux groupes et les accessions du Niger se rencontrent exclusivement dans un seul groupe

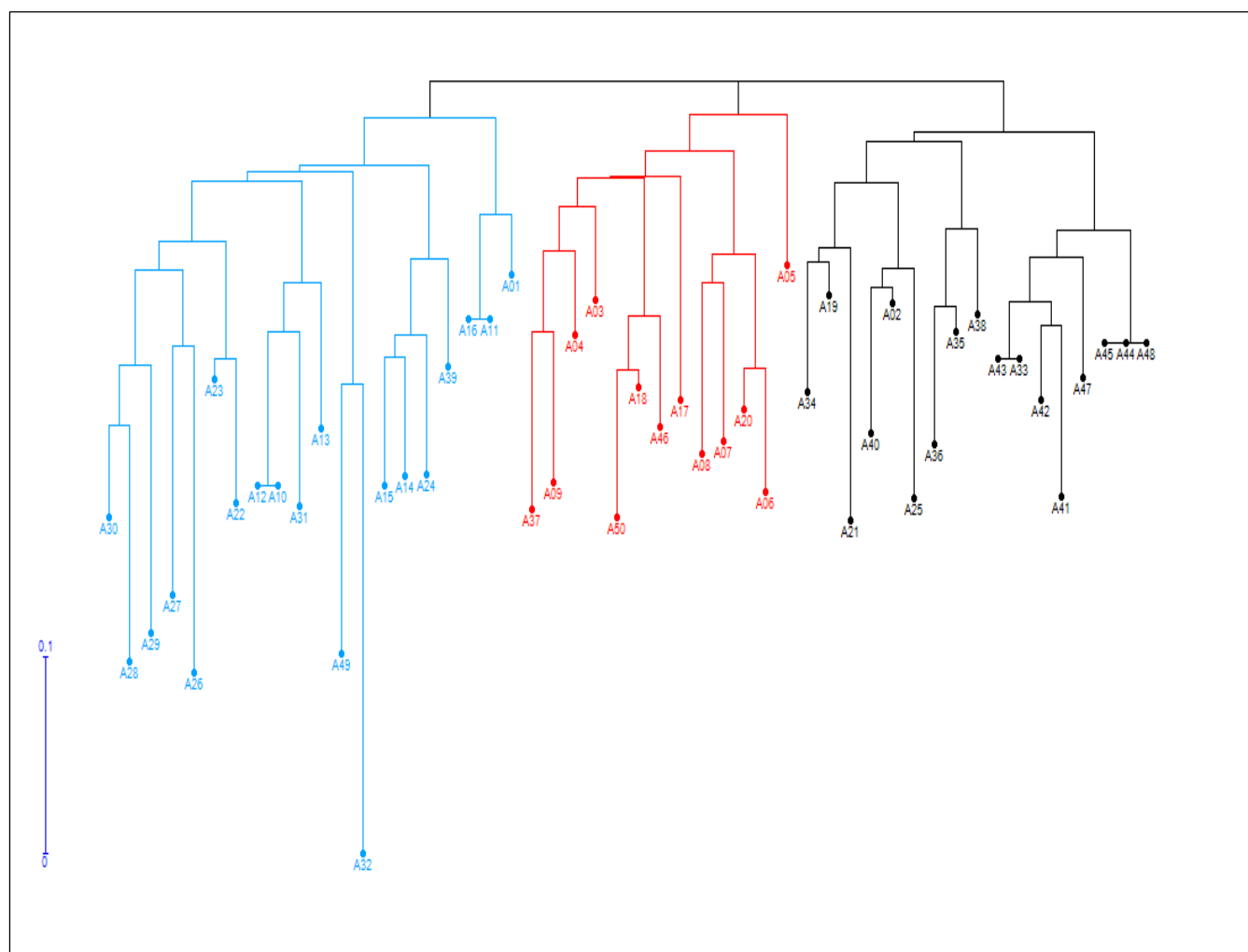


Figure 10: Classification des accessions.

Tableau 11: Liste des accessions par groupe obtenu

Population	Groupe 1(Bleu)	Groupe 2 (Rouge)	Groupe 3 (Noir)
Bénin	A01, A13, A14, A15, A22, A23, A24,A29, A30, A32, A39	A04, A05, A07, A17, A37, A46, A50	A21,A25, A36, A41, A42, A47, A48
Nigéria	A10, A12, A16,A26,A27,A28	A02, A06, A08, A09, A18	A03, A33, A34, A40, A43, A44
Burkina-Faso	A11		A19, A35
Ghana	A31, A49	A20	
Niger			A38, A45

3.2. Discussion

Pour mieux exploiter les cultivars et variétés existants dans une région, il est important de connaître la diversité génétique et les potentialités agronomiques de ces derniers afin de développer et de vulgariser ceux qui répondent aux besoins des producteurs (Adoukonou-Sagbadja *et al.*, 2014).

3.2.1. Polymorphisme génétique et diversité allélique

Les marqueurs SSRs utilisés dans le présent travail sont spécifiques aux accessions du niébé. 54, 54 % de ces marqueurs sont polymorphes. Ils font partie de ceux utilisés par Agbahoungba *et al.* (2018). D'après ces auteurs, seuls CP21 (SSR-6189) et CP2 (SSR-6170) se sont révélés polymorphes avec respectivement deux allèles de (600 bp et 580 bp) et de (200 bp et 180 bp). Dans la présente étude, le CP2 a révélé 3 allèles de 530 bp (A), de 510 bp (B) et de 500 bp (C). Ce fort taux de polymorphisme observé pour le CP2 serait dû aux différentes origines des accessions étudiées. En dehors de ces deux marqueurs, aucune autre étude de diversité génétique sur le niébé n'a encore utilisé les neufs (09) marqueurs restant. Le PIC obtenu est de 27 % qui fait environ la moitié de celui obtenu (45%) par Mafakheri *et al.* (2017) malgré que seulement 44,59 % de ces marqueurs soient polymorphes. Notons donc que le taux de polymorphisme ne varie pas seulement en fonction du nombre de marqueurs polymorphes utilisés mais également en fonction du nombre d'allèles présentés par chaque locus (Kouakou *et al.*, 2007). Ce taux est supérieur à celui Kouakou *et al.* (2007) qui a obtenu un taux de 22%. En effet, Xiong *et al.* (2016) sur la base des marqueurs SNP a également obtenu un PIC=27% pour 122 accessions de l'Afrique de l'Ouest (Burkina Faso, Burundi, Cameroon, Ghana, Niger, Nigéria, Senegal). Malgré le type du marquage, le PIC n'a donc pas changé entre les accessions de l'Afrique de l'Ouest représenté dans notre étude par le Bénin, le Nigéria, le Burkina-faso, le Ghana et le Niger.

Le nombre moyen d'allèle est de 2,33 par locus dans l'ensemble des accessions étudiées. Ce taux est supérieur à celui de Wamalwa *et al.* (2010) qui ayant utilisé deux (02) marqueurs SSRs sur 20 accessions du Kenya ont observé en moyenne 2 allèles par locus. Il est également supérieur à ceux de Kouakou *et al.* (2007) et de Mafakheri *et al.* (2017) qui ont respectivement obtenu une moyenne de 1,31 et de 2 allèles par locus. Ceci serait dû au nombre d'accessions et de marqueurs polymorphes utilisés. Par contre, ce taux de 2,33 observé dans la présente étude est faible par rapport à Asare *et al.* (2010) qui ont obtenu une moyenne de 3,8 allèles par locus pour 141 accessions de niébé du Ghana sur 20 marqueurs SSRs.

3.2.2. Diversité et structure génétiques de la collection

L'hétérozygotie observée ($H_o=10\%$) est largement en dessous de celle attendue (H_e) qui est de 33%. Cet écart serait dû au système de reproduction du niébé qui est défini par une forte autogamie (Pasquet et Baudoin, Agbahoungba *et al.*, 2018). En effet l'autogamie est un mode de reproduction selon laquelle une même fleur contient les deux organes reproducteurs mâles et femelles : ce qui ne favorise pas la pollinisation des ovules par des pollens d'autres plants. Elle empêche toute sorte d'union aléatoire des gamètes et des individus et entraîne à la longue une diminution des hétérozygotes et une augmentation des homozygotes. Cette hétérozygotie non négligeable s'explique par le fait que certaines pressions de sélection tendent à renforcer les génotypes hétérozygotes issus de quelques hybridations (Pernès et Lourd, 1984 ; Baudoin, 2002). Ces taux sont supérieurs à ceux ($H_e=22\%$ et $H_o=6\%$) obtenus par Xiong *et al.* (2016) sur les accessions de l'Afrique de l'Ouest. La différence entre ces deux études pourrait s'expliquer par la différence du nombre d'accessions, de leurs origines et du type de marquage utilisé. Ces taux sont également supérieurs à ceux de Kouakou *et al.* (2007) dont les taux d'hétérozygotie observé et attendue étaient respectivement de 0 % et 6,5 %. Par contre, il est inférieur à celui de Asare *et al.* (2010) qui a observé une hétérozygotie de 19 %.

La plus petite différenciation génétique (F_{st}) se trouve entre les accessions du Bénin et du Nigéria et la plus faible distance génétique (d) se retrouve entre deux couples d'accessions de ces deux pays. Ceci pourrait être expliqué par la proximité des deux pays et par le fait que les échanges de matériel végétal sont fréquents entre les producteurs frontaliers (Kodombo, 2010). Les accessions ne présentant aucune différence sur la base des marqueurs utilisés sont pour la plupart d'origines différentes. Ceci peut s'expliquer d'une part par le fait que les accessions concernées pourraient posséder les mêmes bases génétique (Kouakou *et al.*, 2007) et d'autre part le fait qu'ils auraient différentes dénominations en fonction de leurs pays d'origine malgré qu'elles soient les mêmes (Asare *et al.*, 2010). Néanmoins deux couples de variétés de Nigéria (TVU 946; TVU 4556) et (IT97K-49935; UAMO91055-6 FUAMPEA1) n'ont aucune différence génétique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces variétés développées auraient les mêmes parents croisés même étant dans différents pays. Ces accessions et variétés ne pourront donc pas être conseillés dans un programme de sélection pour être croiser entre elles.

Les accessions du Bénin ($H_e=29\%$, $F_{st}=72\%$) et du Nigéria ($H_e=36\%$, $F_{st}=72\%$) se sont montrés plus diverifiés que ceux des autres pays. Ce qui est conforme à l'existence de la grande

différenciation génétique ($F_{st}=73,73\%$) entre les accessions du Bénin révélée par Zannou *et al.* (2008) qui avaient étudié 70 cultivars béninois. Huit (8) des 23 cultivars du Bénin utilisés dans ce travail s'étaient retrouvés dans 4 groupes différents. Elle vient confirmer également l'hypothèse de Gbaguidi *et al.* (2015) qui avaient assimilé la grande diversité morphologique obtenue entre les cultivars du Bénin à l'existence d'une vaste base génétique. Il faut également noter que 85,71 % des allèles observés dans cette étude sont présents au Bénin tandis que tous les allèles sont présents au Nigéria. Concernant les accessions du Nigéria, une forte variabilité était observée par Adetiloye *et al.* (2012). Les trois autres pays (Niger, Burkina-Faso et Ghana) présentent une très faible diversité. Ceci aurait pour cause le nombre d'accessions minime de ces pays utilisé pour cette étude.

La variabilité entre les accessions selon leurs pays est en moyenne de 19 % alors que celle entre les 50 accessions est de 33%. Ce qui explique que les accessions sont plus variées dans l'ensemble qu'entre pays. Ces résultats sont inférieurs à ceux reportés par Zannou *et al.* (2008) qui ont trouvé que les cultivars étudiés sont différents entre eux de 73,73 % alors qu'entre groupes, cette valeur est de 26,27%. Ceci s'explique par le fait que Zannou *et al.* (2008) ont travaillé avec des marqueurs RAPD qui ne sont pas spécifiques alors que le présent travail a utilisé des SSRs qui sont des marqueurs très spécifiques.

La très grande différenciation obtenue ($F_{st} = 25\%$) est conforme à celle obtenue par Zannou *et al.* (2008). Ce résultat pourrait s'expliquer d'une part par la sensibilité à la photopériode de la culture du niébé car les cinq pays d'origine de ces accessions ont des niveaux de photopériodisme différents. En effet, ce facteur est important dans la diversité des cultures selon Pasquet et Baudoin. Selon ces auteurs, il existe 03 groupes. Le premier groupe, photo-indépendant tardif, comprend des génotypes indifférents à la photopériode qui sont tardifs et présente une floraison échelonnée au cours de la saison culturale. Le deuxième groupe, photo-indépendant précoce, est constitué de génotypes également indifférents à la photopériode, qui fleurissent précocement à partir des premiers noeuds de la tige principale et donnent une production groupée, souvent récoltable au bout de deux mois. Le troisième groupe, photosensible, regroupe des génotypes sensibles à la photopériode qui fleurissent quand la longueur du jour décroît au-dessous d'un certain seuil. D'autre part, on pourrait simuler cette différenciation aux différents usages faits qui sont plus variés au niveau de chaque pays qu'entre pays (Xiong *et al.*, 2016)

Le dendrogramme a permis d'observer une répartition des accessions en trois groupes génétiques ne reflétant pas leurs origines géographique et indépendamment de la couleur des grains. Il est conforme aux résultats de Xiong *et al.* (2016) et de Mafakheri *et al.* (2017) qui ont également obtenu 03 différents groupes pour respectivement 768 accessions étudiées en utilisant les SNPs et 32 accessions caractérisées à base de 22 SSRs. Le nombre de groupe génétique obtenu est inférieur a ceux de Asare *et al.* (2010) et Kouakou *et al.* (2007) qui ont respectivement obtenu 5 et 6 groupes d'accessions indépendamment de leur origine.

CONCLUSION ET SUGGESTIONS

La caractérisation génétique moléculaire des 50 accessions de cinq différentes origines a été réalisée sur la base de 22 marqueurs microsatellites dont 12 se sont révélés polymorphes avec

une moyenne de 2,33 allèles par locus. L'analyse en Coordonnées Principales (PCoA) et la classification par la méthode de UPGMA a permis d'observer une répartition des accessions indépendamment de leur origine et d'obtenir 3 groupes réunissant chacun des individus de plusieurs origines. Les accessions du Bénin et du Nigéria ont montré une diversité plus forte que celles du Niger, du Burkina-Faso et du Niger. De plus la diversité dans l'ensemble de la population (33%) est plus forte que celle entre pays (19%) tandis qu'une forte différenciation génétique a été observée entre les accessions.

Nous suggérons au terme de cette étude que soient réalisées:

- une caractérisation agro-morphologique de ces accessions permettrait de déterminer si possible les traits liés aux accessions de chaque groupe
- une détection des QTLs de rendement, de résistance aux stress biotiques, de tolérance aux stress abiotiques et de la couleur du péricarpe chez le niébé afin de réduire les peines des cultivateurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adandonon A., Aveling T.A.S., Labuschagne N. & Tamo M. (2006). Biocontrol agents in combination with Moringa oleifera extract for integrated control of Sclerotium-caused cowpea damping-off and stem rot. *European Journal of Plant Pathology* 115 (4): 409-418.

- Adandonon A., Aveling T.A.S., van der Merwe N.A. & Sanders G. (2005). Genetic variation among Sclerotium isolates from Benin and South Africa, determined using mycelial compatibility and ITS rDNA sequence data. *Australasian Plant Pathology* 34: 1-7.
- Adegbola P.Y., Dannon E.A., Mutungi C. & Affognon H. (2012). Postharvest losses in Africa—Analytical review and synthesis: the case of Benin. *African Insect Science for Food and Health*. 124p
- Adetiloye I.S., Ariyo O.J., Alake C.O., Oduwaye O.O. & Osewa S.O. (2013). Genetic diversity of some selected Nigeria cowpea sing simple sequence repeats (SSR) marker. *African Journal of Agricultural Research* 8(7): 586-590.
- Adigoun F., A. (2002). *Impact des traitements phytosanitaires du niébé sur l'environnement et la santé des populations : cas de Klouékanmé et de la basse vallée de l'Ouémé (Bénin)*. Master II, Facultés des Lettres Arts et Science Humaine (FLASH), Université d'Abomey-Calavi (UAC), Bénin. 81p.
- Adoukonou-Sagbadja H., Missihoun A.A., Sedah P., Dagba R.A., Kinhogbe G., Ahanhanzo C. & Agbangla C. (2014). Variabilité génétique des accessions d'igname *Dioscorea alata* L. introduites au Bénin à partir des Îles du Sud-Pacifique. *Journal of Applied Biosciences* 73:5966– 5978
- Agbahoungba S., Karungi J., Sadik K., Gibson P., Edema R., Assogbadjo A.E. & Rubaihayo P.R. (2018). Microsatellites markers associated with resistance to flower bud thrips in a cowpea F 2 population derived from genotypes TVU-123 and WC36. *African Journals of Biotechnology*, 17(25): 767-778.
- Arumuganathan K & Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9:208–218
- Asare A.T., Gowdea S.B., Galyon I.K.A. & Aboagye L.L. (2010). Assessment of the genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) germplasm from Ghana using simple sequence repeat markers. *Plant genetics ressources : Characterization and Utilization* 10:1-9.
- Bado B.V. (2002). Les contributions en azote des légumineuses et des amendements organiques: une évaluation quantitative par le 15N. 67p.
- Bal B.A. (1992). Les principaux insectes du niébé dans le Sahel et leur contrôle. In : Lutte intégrée contre les ennemis des cultures vivrières dans le Sahel, INSAH, pp. 287-294

- Barro A., Tignegre J.D.L.S., Kiebre Z., Drabo I. & Sawadogo M. (2016). Identification of Polymorphic Microsatellite Markers Linked to Cowpea Resistance to Cowpea Aphid Borne Mosaic Virus (CABMV) in Burkina Faso. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5 : 6 (399-405).
- Banque Centrale des Etats de l'Afrique de l'Ouest (BCEAO). 2017. Annuaire statistique. 189 p.
- Boer D., L., (1989). Entomologie appliquée Tome 3 (arachide + niébé), CILSS/CENTRE AGRYMET, 75 p.
- Boukar O., Fatokun C.A., LamHuynh B., Roberts P.A. & Close T.J. (2016). Genomic tools in cowpea breeding programs: Status and perspectives. *Frontiers in plant science*. 7:757
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. & Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 32 (3) : 314-331
- Chebbil H., Pascual-Villalobos M.J., Cenis J.L. & Correal E. (1995). Caractérisation morphologique et moléculaire des espèces ligneuses du genre Medicago. *Fourrages* 142 :191-206
- Cissé N., & Hall A.E. (2000). Registration of “Melakh” Cowpea. *Crop Science* 37: 1978.
- CPSA (Cadre Programmatique du Secteur Agricole), 2017. 154p
- Dannon E. & Tamò M. (2015). Biological control, a pillar of sustainable agriculture in Africa. Gestion agro-écologique des Bioagresseurs en Afrique de l’Ouest, Séminaire DIVECOSYS UCAD, Dakar, 2-4 juin. 22p
- Dice L.R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302
- Diouf D. & Hilu K.W. (2005). Microsatellites and RAPD markers to study genetic relationships among cowpea breeding lines and local varieties in Senegal. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 1057–1067.
- Dugje I.Y., Omoigui L.O., Ekeleme F., Kamara A.Y. & Ajeigbe H. (2009). *Production du niébé en Afrique de l’Ouest: Guide du paysan*. IITA, Ibadan, Nigeria. 20 p.

- Fang J., Chao C.-C.T., Roberts O.A. & Ehlers J.D. (2007). Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:1197–1209.
- Gaillardin C. & Tinsley C.R. (2007). *1ère année de Biologie : Génétique moléculaire*. AgroParisTech. Paris, France. 181p
- Gbaguidi A.A., Assogba P., Dansi M., Yedomonhan H. & Dansi A. (2015). Caractérisation agro morphologique des variétés de niébé cultivées au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 9(2): 1050-1066
- Gbaguidi A.A., Dansi A., Loko L.Y., Dansi M. & Sanni A. (2013). Diversity and agronomic performances of the cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.) landraces in Southern Benin. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*. 3(4): 121-133.
- Houindé J.P. & Adjikakpo O.G. F. (2016). *Utilisation innovante intégrée de biopesticides et de parasitoïdes pour la lutte contre les principaux ravageurs de la culture du niébé (Vigna unguiculata L. Walp.)*. Licence professionnelle, EGPVS, UNA, Kétou. 56 p
- Houinsou F.R.L., Adjou S.E., Ahoussi E.D., Sohounhloué C.K.D. & Soumanou M.M. (2014). Bioactivity of essential oil from fresh leaves of *Lantana camara* against fungi isolated from stored cowpea in southern Benin. *International Journal of Biosciences*. 5(1): 365-372.
- Houssou P.A., Ahohuendo C.A., Fandohan P., Kpodo K., Hounhouigan D.J. & Jacob M. (2008). Natural infection of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) by toxigenic fungi and mycotoxin contamination in Bénin, West Africa. *Journal of Stored Product Research*. 45.1
- Johnson J.-M., Houngnandan P., Kaneb A., Sanon K.B. & Nayrad M. (2013). Diversity patterns of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi associated with rhizosphere of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in Benin, West Africa. *Pedobiologia-international Journal of Biology*. 56(3)
- Kareem K.T. & Taiwo M.A. (2007). Interactions of viruses in cowpea: effects on growth and yield parameters. *Virology Journal*. (4) 15–21.
- Kondombo C.P. (2010). *Diversités agro-morphologique et génétique de variétés locales de sorgho (Sorghum bicolor [L.] Moench) du Burkina Faso. Eléments pour la valorisation*

- des ressources génétiques locales*. Thèse de Doctorat. Université de Ouagadougou, Burkina-Faso. 137 p.
- Kongjaimum A., Kaga A., Tomooka N., Somta P., Shimizu T., Shu Y., Isemura T., Vaughan D.A. & Srinives P. (2012). An SSR-based map of yardlong bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *Unguiculata sesquipedalis* Group) and QTL analysis of pod length. *Genome* 55:81-92.
- Kossou D.K., Gbéhounou G., Ahanchédé A., Ahohuendo B. & Bouraima Y. (2001). Indigenous Cowpea Production and Protection Practices in Benin. *Insect Sci. Appl.* 21(2): 39-46
- Kossou D.K., Gbéhounou G., Ahanchédé A., Ahohuendo B., Bouraïma Y. & van Huis A. (2011). Indigenous cowpea production and protection practices in Benin. <https://doi.org/10.1017/S1742758400020178>.
- Kouakou K.C., Ry-Macauley H., Gueye M.C., Otto M.C., Rami J.-F., Cissé N. & Pasquet R.S. (2007). Diversité génétique des variétés traditionnelles de niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp.) au Sénégal : étude primaire. *Plant Genetic Ressources Newsletter* 152 : 33-34
- Li C.D., Fatokun C.A., Ubi B., Singh B.B., & Scoles G.J. (2001). Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Science* (41) 189–197.
- Mafakheri K., Bihamta R.M. & Abbasi A.R. (2017). Assessment of genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) germplasm using morphological and molecular characterization. *Cogent Food & Agriculture*. 3: 1327092
- Martins C.M. (2014). *Characterizing four cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp.) Mozambican landraces deposited in a seed bank for drought tolerance*. PhD, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria. 159p.
- Muchero W., Diop N.N., Bhat P.R., Fenton R.D., Wanamaker S., Pottorff M., Hearne S., Cisse N., Fatokun C., Ehlers J.D., Roberts P.A. & Close T.J. (2009). A consensus genetic map of cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) and syntenic based on EST-derived SNPs. *PNAS*. 106 (43): 18159–18164.
- Muleba N., Dabiré C., Suh J.B., Drabo I. & Ouedraogo J.T. (1997). Technologies for cowpea production based on genetic and environmental manipulations in the Semi-Arid Tropics. *Technology options for sustainable agriculture in Sub-Saharan Africa, OAU/STRC-SAFGRA*. pp: 195 -206.

- Mohammadi S.A. & Prasanna B.M. (2003). Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations. *Crop Sci.* 43:1235–1248
- Najimi B., El Jaafari S., Jlibène M. & Jacquemin J.-M. (2013). Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 7(1): 17–35
- Nkouannessi M. (2005). *The genetic morphological and physiological evaluation of African cowpea genotypes*. Thesis, University of the Free State Bloemfontein, South Africa, 131p.
- Pasquet R.S. & Baudoin J.-P. Le niébé. L'amélioration des plantes tropicales. pp : 483-505
- Plan Stratégique de Relance du Secteur Agricole (PSRSA) (2011). 115p
- Programme d'Actions du Gouvernement (PAG). Volet Agriculture. Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche (MAEP). (2017). 17p
- Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO sur les ressources phytogénétiques (1995)
- Rapport sur la Situation Economique et Financière du Bénin (RSEF) au premier trimestre (2016).
- Rogers O.S. & Bendich A.J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76
- Sani I. & Umar K.M. (2016). Biology and Management of Legume Flower Thrips (Megalurothrips sjostedti) (Thysanoptera: Thripidae), a major insect pest of cowpea: A Review. *Annals of Experimental Biology* 5 (1):14-17.
- Simon D. (2011). Ouvrage Collectif AFD - CIRAD – FIDA.
- Soule B.G. (2002). *Le marché du niébé dans les pays du Golfe de Guinée (Côte-d'Ivoire, Ghana, Togo, Bénin et Nigeria)*. LARES Laboratoire d'Analyse Régionale et d'Expertise Sociale. 31 p
- Stoilova T. & Pereira G. (2013). Assessment of the genetic diversity in a germplasm Collection of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) using morphological traits. *African Journal of Agricultural Research.* 8(2): 208-215.

- Vienne (de) D. (1998). ed. *Les marqueurs moléculaires en génétiques et biotechnologies végétales*. Paris : INRA Editions
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M. & Miranda T.L. (1995). AFLP : A new technique of DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23(21) :4407-4417
- Wamalwa E.N., Muoma J. & Wekesa C. (2016). Genetic Diversity of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Accession in Kenya Gene Bank Based on Simple Sequence Repeat Markers. *International Journal of Genomics*. Article ID 8956412, 5 pages.
- Xiong H., Shi A., Mou B., Qin J., Motes D., Lu W., Ma J., Weng Y., Yang W. & Wu D. (2016). Genetic Diversity and Population Structure of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *PLoS ONE* 11(8): e0160941. doi:10.1371/journal.pone.0160941
- Xu P., Wu X., Wang B., Liu Y., Qin D., Ehlers J.D. & Close T.J. Hu T., Lu Z. & Li G. (2010). Development and polymorphism of *Vigna unguiculata ssp.unguiculata* microsatellite markers used for phylogenetic analysis in asparagus bean (*Vigna unguiculata ssp.sesquipedialis* (L.) Verdc.). *Mol Breeding* 25:675–684.
- Williams C.B., Nancy M.DT., Gary J.P. & James R.N. (2009). Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in aphids (Homoptera:aphididae). *Get access*. 88:2
- Zannou A., Ahanchédé A., Struik P.C., Richards P., Zoundjihékpon J., Tossou R. & Vodouhè S. (2004). Yam and cowpea diversity management by farmers in the Guinea-Sudan transition zone of Benin. *NJAS – Wageningen J. Life Sci*. 52 (3-4): 393-420
- Zannou A., Kossou D.K., Ahanchede A., Zoundjihekpon J., Agbicodo E., Struik P.C. & Sanni A. (2008). Genetic variability of cultivated cowpea in Benin assessed by random amplified polymorphic DNA. *African Journal of Biotechnology* 7: 4407–4414.

ANNEXE

A0	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	A33	A34	A35	A36	A37	A38	A39	A40	A41	A42	A43	A44	A45	A46	A47	A48	A49	A50																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
0																																																	A01																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
4	0																																																A02																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
8	12	0																																															A03																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
8	12	2	0																																														A04																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
11	7	5	5	0																																												A05																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
13	17	5	7	10	0																																												A06																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
12	16	12	12	15	9	0																																											A07																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
11	15	13	13	16	10	7	0																																									A08																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
16	20	8	6	13	13	12	13	0																																										A09																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
15	11	17	17	12	22	19	12	17	0																																										A10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
4	8	12	12	15	17	8	7	12	11	0																																									A11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
15	11	17	17	12	22	19	12	17	0	11	0																																							A12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
12	8	14	12	9	19	16	9	10	5	8	5	0																																						A13																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
9	13	11	11	14	14	13	6	11	8	5	8	7	0																																						A14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
6	10	8	6	11	11	18	11	12	13	10	13	10	5	0																																							A15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	8	12	12	15	17	8	7	12	11	0	11	8	5	10	0																																				A16																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
8	12	8	8	11	13	12	19	16	23	12	23	20	17	14	12	0																																						A17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
11	15	5	5	8	10	15	16	13	12	15	12	17	12	9	15	11	0																																					A18																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
8	4	8	8	3	13	12	19	16	15	12	15	12	17	14	12	8	11	0																																			A19																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
11	15	5	5	8	2	7	8	13	20	15	20	17	14	11	15	11	8	11	0																																			A20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
14	10	14	12	9	11	10	17	18	19	18	19	16	21	16	18	14	15	6	9	0																																	A21																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
12	8	20	20	15	17	16	15	28	19	16	19	16	21	18	16	20	23	12	15	10	0																																	A22																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
8	4	16	16	11	21	20	19	24	15	12	15	12	17	14	12	16	19	8	19	14	4	0																																A23																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
9	13	11	11	14	14	21	14	19	16	13	16	15	8	5	13	17	12	17	14	21	13	9	0																														A24																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
9	5	17	15	12	22	21	20	21	16	13	16	11	18	13	13	17	20	9	20	13	13	9	18	0																															A25																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
15	19	17	17	20	22	27	20	25	24	19	24	21	18	15	19	23	20	23	20	29	19	15	10	16	0																													A26																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
16	12	18	18	13	23	28	21	26	15	20	15	14	17	14	20	24	19	16	21	20	12	8	9	17	13	0																												A27																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
20	16	20	20	17	25	24	17	16	13	16	13	8	15	18	16	28	25	20	25	24	16	12	15	19	15	8	0																											A28																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
17	13	25	25	20	28	21	20	25	16	13	16	13	16	21	13	25	28	17	28	23	13	9	16	10	16	17	13	0																										A29																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
17	13	17	19	14	20	21	14	17	10	13	10	7	10	15	13	25	22	17	22	23	13	9	10	18	18	11	5	8	0																									A30																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
15	19	17	17	20	22	19	12	17	8	11	8	13	11	23	12	23	20	27	19	15	8	24	16	15	13	16	10	0																										A31																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
23	27	25	25	28	22	27	20	33	24	27	24	29	24	21	27	23	20	31	20	27	19	23	16	28	20	23	29	28	26	16	0																									A32																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
12	8	12	12	7	17	16	23	20	19	16	16	19	16	21	18	16	12	15	4	15	10	8	4	13	13	19	12	16	13	13	19	27	0																									A33																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
12	8	12	12	7	17	16	23	20	11	16	11	16	19	16	16	12	7	4	15	8	16	12	19	13	27	18	24	21	21	19	27	8	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														</