

Diversité génétique des variétés traditionnelles de niébé [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] au Sénégal : étude préliminaire

Charles Konan Kouakou,¹ Harold Roy-Macauley,² Mame Coudou Gueye,^{3*} Marie Claire Otto,^{4*} Jean-François Rami,^{5*} Ndiaga Cissé,^{6*} et Rémi S Pasquet^{7*}

^{1,3,4} Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse (CERAAS) BP 3320 Thiès-Escale, Sénégal. Tél : (221) 951 49 93/94, Fax : (+221) 951 49 95.

² Directeur Régional de l'ICRAF, World Agroforestry Centre pour l'Afrique de l'Ouest et du Centre) Tel : (223) 223 50 00, Fax : (223) 223 86 83, Email : harold.roy-macauley@cgiar.org

⁵ CIRAD, TA 40/03 Av Agropolis 34398 Montpellier Cedex 5, France. Tél : +33 4 67 61 55 48. Fax : + 33 4 67 61 56 05 E-mail : rami@cirad.fr

⁶ Institut Sénégalais de la Recherche Agricole (ISRA)/CERAAS Thiès-Escale, Sénégal. Tél : (221) 951 49 93/94, Fax : (+221) 951 49 95. E-mail : ncisse@refer.sn

⁷ International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE), P.O. Box 30772, Nairobi, Kenya. E-mail : rpasquet@icipe.org

*Adresses actuelles

¹ s/c Dr Akanvou René, Cropping Systems Division, Centre National de Recherche Agronomique 07 BP 13 Abidjan 08, Côte d'Ivoire. Cell : (225) 06 21 38 83 E-mail : charles_kokou@yahoo.fr

Résumé

Diversité génétique des variétés traditionnelles de niébé [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] au Sénégal : étude préliminaire

Des missions de collectes ont été organisées dans les principales régions de production du niébé au Sénégal dans le but d'obtenir des informations sur la diversité morphologique et moléculaire au sein des variétés traditionnelles de niébé. Ces missions ont permis de réunir 58 accessions. Deux classifications des accessions collectées basées sur les noms vernaculaires donnés par les paysans et les caractéristiques des graines et des gousses ont révélé respectivement neuf et 18 variétés. Un troisième classement réalisé par rapport aux cultigrupes (cv gr) du niébé a classé une accession dans le cv gr *Unguiculata*, cinq accessions dans le cv gr *Biflora* et 52 accessions dans le cv gr *Melanophthalmus*. L'étude moléculaire réalisée sur huit de ces accessions a montré l'existence d'une diversité génétique faible comparée à d'autres cultures. En moyenne 1,31 allèles par locus avec 22 % de loci polymorphes et une diversité génétique totale, HT = 0,38, ont été obtenus. 62% de cette diversité se trouvent entre les accessions alors que 38% se rencontrent à l'intérieur des accessions. Les flux de gènes entre accessions étudiées ont été faibles : un migrant passe d'une accessions à une autre par génération. La similarité génétique entre individus des huit accessions laisse apparaître six groupes d'individus dont le plus important regroupe cinq accessions identiques. L'étude semble confirmer la localisation du Sénégal dans une zone géographique à forte diversité morphologique du niébé et à faible diversité moléculaire.

Summary

Key words:

Resumen

Introduction

Le niébé [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] est l'une des principales légumineuses mondiales (Pasquet et Baudoin, 1997). La production annuelle mondiale varie entre 3,1 et 3,3 millions de tonnes de graines sèches (FAO, 2001 ; FAOSTAT, 2004) dont plus de 64% sont produits en Afrique (Nkouannessi, 2005). La superficie annuelle cultivée dans le monde s'élève à plus de 12,5 millions d'ha, dont 9,8 millions sont réalisés en Afrique de l'Ouest, qui est la plus grande zone de production et de consommation du niébé dans le monde (Singh et al., 1997 ; CGIAR, 2001 ; FAOSTAT, 2004). Le centième des superficies emblavées en Afrique de l'Ouest revient au Sénégal, faisant de ce pays le cinquième producteur africain après le Nigeria, le Niger, le Mali et le Burkina Faso (Cissé et Hall, 2003 ; DSDIA/DAPS/MAE, 1999 à 2003 ; Nkouannessi, 2005). La culture du niébé occupe une place de choix au Sénégal. Les variétés traditionnelles cultivées au Sénégal enregistrent 93% des superficies totales emblavées et ne laissent que 7% aux variétés améliorées (ISRA, 1998). Ces variétés traditionnelles constituent avec les formes sauvages le réservoir de la variabilité génétique. Les prospections et les collectes organisées entre 1953 et 1960 avaient donné 53 variétés traditionnelles. Le matériel génétique ainsi collecté a été utilisé dans les travaux d'amélioration génétique. Ces travaux, effectués à partir de plusieurs méthodes classiques d'amélioration variétale, ont permis la création de six variétés, Ndiambour, Mougne, Bambey 21, Mouride, Diongama et Melakh, vulgarisées dans le pays entre 1969 et 1990 (Sène, 1966 ; Sène et N'diaye, 1971 et 1974 ; Cissé *et al.*, 1996 ; 2001 ; Cissé et Hall, 2003).

Le temps très long de sélection et la forte variabilité de la réponse d'un génotype, principalement due à l'interaction génotype x environnement, ont été, entre autres, autant d'entraves pour la sélection du niébé au Sénégal. Pour pallier ces limites, les outils moléculaires ont été intégrés aux techniques de sélection empiriques *via* la sélection assistée par marqueurs (SAM). Ainsi, les variétés traditionnelles existantes, adaptées aux différentes conditions agroécologiques, pourraient être améliorées de façon plus efficiente.

Pour ce faire, une bonne connaissance de la diversité génétique des variétés traditionnelles s'avère nécessaire. En effet, les accessions les plus originales ayant une relativement forte variabilité seraient de bons candidats pour l'amélioration variétale.

Des études sur la diversité génétique du niébé ont été réalisées en utilisant les marqueurs biochimiques et moléculaires. Les marqueurs biochimiques ont révélé chez les formes cultivées de niébé un niveau de polymorphisme variant entre 4 et 42%, avec en moyenne 1,04 à 1,61 allèles par locus et un indice de diversité génétique très faible, de 0,018 à 0,061 (Panella et Gepts, 1992 ; Vaillancourt et al., 1993 ; Pasquet, 1996 ; Pasquet, 2000). Les marqueurs moléculaires sont les plus récemment utilisés avec les RAPD qui ont révélé une diversité génétique élevée entre accessions provenant d'Afrique, d'Amérique et d'Asie (Mignouna et al., 1998 ; Ba et al., 2004). Ils ont aussi révélé une diversité génétique élevée au sein d'accessions issues de variétés traditionnelles cultivées

au Malawi (Nkongolo, 2003). Les marqueurs microsatellites ont permis d'étudier le degré de parenté entre des variétés par criblage des lignées de niébé ayant généralement des parents identiques mais présentant des différences morphologiques (Li *et al.*, 2001). Ces derniers types de marqueurs sont caractérisés par un haut niveau de polymorphisme capable de rendre parfaitement compte de la variabilité génétique. Cependant, ils ont été très peu utilisés dans les études sur la diversité génétique des variétés traditionnelles de niébé.

L'objectif de cette étude est d'utiliser, pour la première fois, les marqueurs microsatellites pour étudier la diversité génétique de cultivars traditionnels de niébé dont la diversité morphologique sera aussi déterminée.

Matériel et méthodes

Sites de collecte

Le matériel végétal utilisé est constitué de variétés traditionnelles collectées dans 26 villages représentatifs des principales régions de culture du niébé au Sénégal. Ce sont les régions de Louga, Thiès et Diourbel. La région de Louga se situe dans la zone écologique nord du Sénégal, alors que les régions de Thiès et Diourbel se trouvent au centre. Les sols des régions d'étude sont de type «Dior» sableux comprenant plus de 95% de sables totaux. Leur teneur en matière organique est très faible (0,20% en moyenne), de même que leur teneur en azote total (0,1‰) et en bases échangeables (0,9 meq/100g pour Ca, 0,07 pour K et entre 0,1 et 1 pour Mg), avec une carence accusée en phosphore et des sols bruns et brun-rouge à pH variant entre 6 et 7 (Ba, 1995 ; Badiane *et al.*, 2000 ; Sall, 2000 ; Ba and Reenberg, 2004)

Le climat prévalant dans la zone de collecte est de type sahélien à l'extrême nord correspondant au nord de la région de Louga, tandis qu'à l'extrême sud, notamment au sud de la région de Diourbel, existe le type soudano-sahélien. Le reste de cette zone appartient au climat sahélo-soudanien (Fortin *et al.* 1989).

Un site de collecte est constitué de l'exploitation d'un paysan et il est localisé grâce à un GPS (Global Positioning System) portable, de référence TEC-DC-P-01 (Lamiroux, 1995). Les coordonnées géographiques des sites, incorporées à un logiciel MapInfo, ont permis de les situer sur une carte du Sénégal (Fig. 1).

Collecte du matériel végétal

Des visites de reconnaissance des sites de collecte se sont déroulées le 16/09/03 et le 18/09/03 dans six villages. Le pas minimum d'échantillonnage a été fixé à 10 km. La collecte a été réalisée en octobre et en décembre 2003. Les points de prélèvement étaient éloignés de plus de 1 km de la route.

L'échantillonnage a porté sur 40 plantes par population variétale et une gousse a été collectée par plante. Ces nombres ont été choisis sur la base des études réalisées par plusieurs auteurs qui ont préconisé, chez les espèces autogames à graines, l'échantillonnage de moins de cinquante plantes. En effet, chez ces espèces, la variabilité génétique est plus

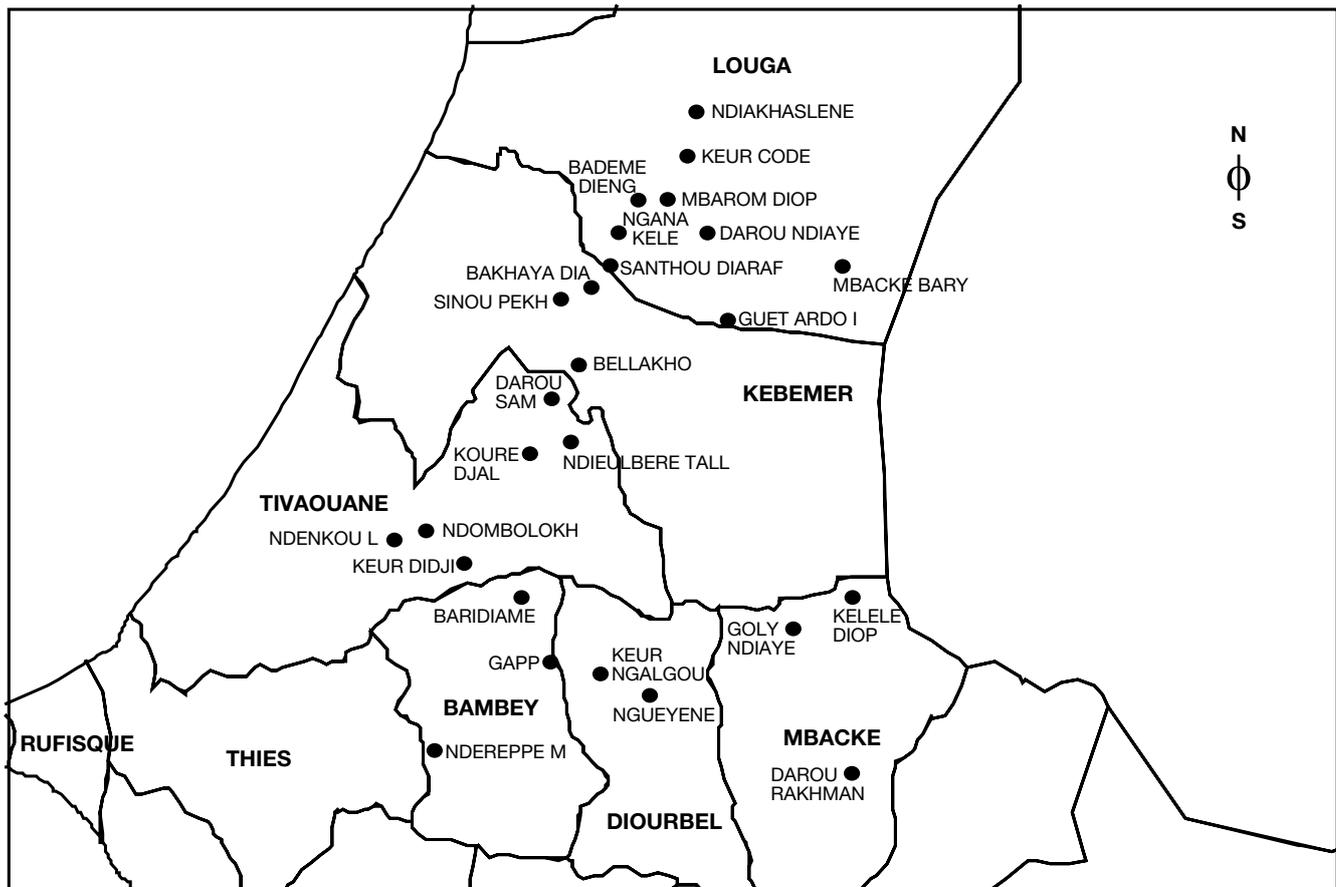


Figure 1. Localisation des sites de collecte.

importante entre les populations et non à l'intérieur des populations (Bezançon et Second, 1984 ; Doebley, 1989 ; Cousin, 1992 ; Singh, 2001). Des études iso-enzymatiques conduites sur les formes cultivées de niébé ont montré une faible richesse allélique (Panella et Gepts, 1992 ; Vaillancourt *et al.*, 1993 ; Pasquet, 1996 et 2000). Ainsi, une collecte de très peu de matériel génétique, une gousse par plante par exemple, évite le ramassage des mêmes individus. En outre, Bezançon et Second (1984) ont recommandé ce mode de prélèvement, qui permet un plus grand nombre d'analyses lorsque l'objectif poursuivi est la comparaison de la variabilité intra- et inter-populations. Le choix d'une gousse par plante est aussi en relation avec le flux génétique qui est à l'origine du polymorphisme qui caractérise le niébé (Padulosi 1993; Pasquet 1999).

Le prélèvement a été réalisé au champ et dans des sacs de stockage. Au champ, du matériel génétique régulièrement distribué a été prospecté. Selon Gallais (1989), l'autogamie entraîne la structuration génotypique des populations. Ainsi, la probabilité d'obtenir tous les allèles d'une population considérée est augmentée en collectant du matériel régulièrement réparti. A intervalle plus ou moins constant, la plante à prospecter est ciblée au hasard et seulement une gousse apparemment saine est collectée. Dans les sacs de stockage, le choix de quarante gousses par échantillon a été

réalisé au hasard. Chaque prélèvement est suivi d'un entretien avec le paysan qui fournit les échantillons. Les informations relatives aux noms du paysan, de la variété, à la localisation du village, à l'origine des semences, aux techniques culturales, aux attaques parasitaires et à la performance agronomique sont recueillies pour chaque échantillon. Ces informations de base ont été confrontées avec notre propre appréciation du matériel végétal visité.

En résumé, l'échantillonnage a été réalisé dans 26 villages. Une gousse a été prélevée par pied de niébé et quarante gousses ont été collectées par site, au champ. En stock, quarante gousses ont été prélevées par échantillon.

Etude morphologique

Des caractères qualitatifs et quantitatifs couramment utilisés pour décrire les cultivars et les cultigrupes de niébé ont été retenus. Ce sont la couleur et la forme des gousses et des graines ainsi que l'aspect des graines et le nombre de loges par gousse ou nombre minimum d'ovules par gousse (Borget, 1989; Pasquet et Baudoin, 1997, Pasquet 1998).

Pour le nombre de loges par gousse, trois lots, suivant la taille des gousses, ont été constitués par échantillon : un lot de longues gousses, un autre de gousses moyennes et le troisième de gousses courtes. Une gousse a été choisie au hasard dans

chaque lot et finalement trois gousses ont été retenues par échantillon. Les valeurs moyennes ont été calculées. Des numéros à quatre chiffres, dont les deux premiers indiquent l'année de collecte et les deux derniers désignent l'ordre dans lequel la collecte a été réalisée, ont été attribués aux accessions. La protection phytosanitaire des échantillons collectés a été assurée par fumigation à base de phostoxine au taux d'un comprimé pour 100 kg de graines (Cissé *et al.*, 1996).

Etude moléculaire

L'étude moléculaire n'a porté que sur huit accessions morphologiquement différentes collectées dans les départements de Kébémér et de Louga qui appartiennent à la région de Louga. Le choix de cette région se justifie par le fait qu'elle représente 40% de la production de niébé au Sénégal (DISA, 1998) et qu'elle renferme l'essentiel de la diversité morphologique des variétés collectées.

Ainsi, les accessions distinctes ont-elles été retenues d'office. Celles qui sont répétées ont été choisies au hasard afin de compléter le nombre d'accessions à étudier à huit. Le choix raisonné de ces accessions permettra de vérifier l'hypothèse selon laquelle le Sénégal serait dans une zone à forte diversité morphologique du niébé mais avec une faible diversité moléculaire (Pasquet, 2003 comm. pers). De plus, il répond à l'objectif principal de ce travail, qui est l'étude de la variabilité morphologique et moléculaire des variétés traditionnelles de niébé au Sénégal.

Les accessions retenues sont 03-30, 03-31, 03-34, 03-54, collectées dans le département de Kébémér, 03-18, 03-20, 03-23 et 03-24, échantillonnées dans le département de Louga. Au sein de ces accessions représentées par un effectif de 40 gousses chacune, constituant les individus, seulement 24 gousses ou 24 individus par accession ont été retenus pour l'analyse moléculaire. Le choix de ce nombre a été basé sur les résultats d'auteurs qui ont montré que la taille des échantillons nécessaire pour les études réalisées sur les fréquences alléliques au niveau des populations doit être comprise entre 20 et 30 par population (Gibbs *et al.*, 1998; Loughheed *et al.*, 1999).

Le nombre total des individus à analyser issus de ces huit accessions a été de 192.

Extraction et quantification de l'ADN

L'extraction d'ADN a porté sur de jeunes feuilles prélevées à partir des plantes âgées de 15, 21 et 38 jours. Une feuille a été prélevée par plante. L'ADN a été extrait à partir de 100 mg de cette feuille selon la méthode de Qiagen (Dneasy Plant Mini Kit). La concentration en ADN des différents échantillons a été déterminée en comparant l'intensité des bandes obtenues après migration sur gel d'agarose à 1% à celle de l'ADN standard SmartLadder (Eurogentec).

Marqueurs microsatellites utilisés

Cinq marqueurs microsatellites (Genset Oligos) spécifiques au niébé ont été utilisés pour caractériser la diversité moléculaire des 192 individus répartis dans les huit accessions choisies. Ces marqueurs se sont révélés polymorphes sur gel d'agarose pour deux variétés de niébé, Bambe 21 et Mouride (CERAAS ED, comm. pers). Les noms de ces marqueurs, leurs séquences, les motifs de base et leur taille sont présentés dans le Tableau 1.

La technique du primer tailing a été utilisée. L'une des deux amorces microsatellites, notamment l'amorce F, est rallongée par une queue de 19 pb (séquence M13 : CAC GAC GTT GTA AAA CGA C) et la PCR est réalisée en présence de trois amorces, l'amorce rallongée forward (MF), l'amorce reverse (R) et l'amorce M13 marquée par un fluorochrome [FAM (bleu), JOE (vert) et TAMRA (jaune)]. Ainsi, la taille des marqueurs indiqués dans le Tableau 1 est majorée de 19 pb.

Réaction d'amplification en chaîne (PCR) de l'ADN microsatellite

Les concentrations d'ADN extrait ont été homogénéisées par dilution et ramenées à 5 ng/ μ l. La PCR a été réalisée à partir du Kit Ready-To-Go™ Beads (Amersham Pharmacia Biotech) en microplaque 96 puits. Chaque tube du Kit contient 1,5 U de Taq polymérase lyophilisée, 200 μ M de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, auxquels sont additionnés 5 μ l de solution d'ADN, respectivement 0,25 μ l d'amorces MF et M13 à 10 μ M chacune et 1,25 μ l d'amorce R à 2 μ M. Pour atteindre le volume réactionnel fixé à 25 μ l, 18,25 μ l d'eau pure ont été ajoutés. La microplaque a été placée dans un thermocycleur

Tableau 1. Caractéristiques des marqueurs microsatellites du niébé utilisés dans cette étude.

Nom des marqueurs	Séquences des amorces (5'>3')	Motifs de base	Taille (pb)
VM 8	TGG GAT GCT GCA AAG ACA GAA AAC CGA TGC CAA ATA G	(AG) 16	285
VM 9	ACC GCA CCC GAT TTA TTT CAT ATC AGC AGA CAG GCA AGA CCA	(CT) 21	271
VM 17	GGC CTA TAA ATT AAC CCA GTC T TGT GTC TTT GAG TTT TTG TTC TAC	(CT) 12	152
VM 35	GGT CAA TAG AAT AAT GGA AAG TGT ATG GCT GAA ATA GGT GTC TGA	(AG) 11. (T) 9	127
VM 39	GAT GGT TGT AAT GGG AGA GTC AAA AGG ATG AAA TTA GGA GAG CA	(AC) 13. (AT) 5. (TACA) 4	212

Primus 96 Plus, programmé à 94° C pendant 4 min pour une dénaturation totale de l'ADN. Cette dénaturation est suivie de 40 cycles, composés chacun d'une dénaturation à 94° C pendant 30 s, d'une hybridation à 55° C pendant 1 min et d'une élongation à 72° C pendant 1 min. Une élongation finale à 72° C pendant 8 min met fin au programme.

Un contrôle sur gel d'agarose à 2 % des produits de PCR est réalisé afin de vérifier la qualité de l'amplification. La plaque est mise à l'abri de la lumière à l'aide d'une feuille aluminium pour éviter la dégradation du fluorochrome.

Migration sur séquenceur

Un séquenceur modèle ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) a été utilisé. Ce séquenceur est couplé à un ordinateur équipé du logiciel GeneScan. Un gel polyacrylamide à 6,4% et de 0,2 mm d'épaisseur avec un peigne de 36 dents a été préparé et incorporé au séquenceur après 2 h de polymérisation. Le gel est composé de 36 g d'urée, 11,2 ml d'Acrylamide Bis 29:1, 5 g de résine, 250 µl de persulfate d'ammonium à 10%, 25 µl de TEMED et d'eau distillée pour un volume final de 80 ml. Un pré-run de 30 min a été réalisé afin d'élever la température du gel à 52° C.

3 µl d'un mélange en multiplex (2 ou 3 fluorochromes par puits), dont le rapport de dilution est 5 µl FAM + 2,5 µl JOE + 5 µl TAMRA, sont déposés dans un puits contenant 2,5 µl de bleu de charge et 1 µl de marqueur de poids moléculaire Genescan ROX 500. Le mélange ainsi préparé est dénaturé à 95° C pendant 5 min. 1,5 µl de ce mélange sont finalement déposés sur le séquenceur. Le dépôt se fait d'abord dans les puits portant les chiffres impairs. Il est suivi d'un pré-run de 5 min. Un second dépôt, suivi également d'un pré-run de 5 min, est fait dans les autres puits. Le temps de migration est fixé à 3 h.

Analyse des données

L'analyse des données morphologiques a porté uniquement sur les méthodes des statistiques descriptives. Les données relatives aux caractères quantitatifs ont été saisies à l'aide d'un tableur Excel. Des tableaux statistiques ont été établis, suivis des représentations graphiques et du calcul des paramètres tels que la moyenne et l'écart type.

Concernant l'analyse des données moléculaires, les noms des accessions ont été enregistrés dans le logiciel GeneScan incorporé au séquenceur ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) en prenant soin d'indiquer la nature du multiplex utilisé. Au niveau de chaque accession, les individus ont été numérotés de un à vingt-quatre. Les images obtenues se présentent sous

la forme d'électrophorégrammes où chaque pic représente un allèle dont la couleur indique le marqueur utilisé. Chaque allèle correspond à un nombre particulier de répétitions du motif de base du microsatellite. La variation du nombre de séquences simples répétées est ainsi mise en évidence.

Le logiciel STRand version 2.2.259 (Locke *et al.*, 2000) a été utilisé pour analyser les images du séquenceur.

Les paramètres de la diversité génétique ont été estimés avec le logiciel Genetix version 4.03 (Belkhir *et al.*, 1996–2002) Cette application propose deux sortes d'estimateurs : des estimateurs sans correction de biais et des estimateurs non biaisés (nc) selon Nei et Chesser (1983).

Au niveau intra-accession, les paramètres d'évaluation de la diversité génétique qui ont été estimés sont les suivants :

- Les fréquences alléliques, le pourcentage de loci polymorphes (P), le nombre d'allèles par locus ou richesse allélique (A), la proportion d'individus hétérozygotes observés (Hobs.) et la proportion d'individus hétérozygotes attendus sans biais (H n.b.) (Nei, 1973 ; Nei, 1978 ; Pernès et Lourd, 1984 ; Vienne, 1998)

Au niveau inter-accessions, les indices de diversité de Nei ont été estimés. Ce sont la diversité génétique totale (Ht), la diversité génétique intra-population (Hs), la diversité génétique inter-population (D_{ST}), la différenciation génique (G_{ST}) et le flux de gènes (Nm) (de Vienne, 1998).

Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a également été réalisée avec le logiciel Genetix afin de déterminer la similarité entre les individus. Le nombre des individus à analyser a été réduit de 192 à 155 après élimination des individus ayant au moins une donnée manquante.

Résultats et discussion

Les collectes ont été réalisées dans 26 villages. Au total, 58 accessions ont été collectées dont 40 aux champs et 18 dans des sacs de stockage. Parmi ces 58 accessions, seulement huit provenant de la même région, la région de Louga, ont été utilisées pour conduire le travail moléculaire (voir Annexe 1)

Classification basée sur les noms vernaculaires

Les 58 accessions collectées ont été regroupées en neuf variétés sur la base des noms vernaculaires donnés par les paysans (Tableau 2). Les variétés Ndiaga Aw et Baye Ngagne ont été collectées dans chacune des trois régions. Ndiaga Aw a constitué la plus importante des accessions, avec 41,4%. Sur l'ensemble des trois régions, la région de Louga a fourni

Tableau 2. Composition variétale en pourcentage des accessions collectées.

Régions prospectées	Noms vernaculaires								
	Bn	Ma	Mf	MI	Na	Nd	Tt	Vk	V v
Louga	3,5		6,9	1,7	19,0	5,2	1,7		
Thiès	3,5				10,3	3,4		3,4	
Diourbel	19,0	1,7			12,1			1,7	6,9
Total	26,0	1,7	6,9	1,7	41,4	8,6	1,7	5,1	6,9

19% de la variété Ndiaga Aw, faisant de cette région la plus importante région de culture de Ndiaga Aw. Baye Ngagne a été la seconde variété rencontrée. Elle a constitué 26% de la collecte dont la plus grande partie, soit 19%, a également été prélevée dans la région de Diourbel. La distribution de ces variétés au niveau des régions est généralement dictée par leur adaptabilité aux contraintes environnementales. Ainsi, les variétés à cycle long telles que Baye Ngagne sont plus cultivées au centre, dans la région de Diourbel où la pluviométrie est sensiblement plus importante.

Classification basée sur les critères morphologiques des gousses et des graines

Cette description à partir des neuf variétés nommées par les paysans, sans aucune autre information *a priori*, et, en se basant sur la couleur et la forme des gousses et des graines (Annexe 2) a révélé 18 variantes correspondant à 18 variétés collectées (Annexe 3). Les noms des variantes dérivent de ceux donnés par les paysans, suivis du caractère qualitatif les distinguant.

Cette description met en exergue l'hétérogénéité qui existe au sein des variétés détenues par les paysans et, par conséquent, la diversité morphologique de ces variétés populations.

Une autre classification, sur la base des cultigrupes de niébé existants (Pasquet, 1998) a été réalisée avec les 18 variétés déterminées. Les caractères qui ont servi dans cette classification sont la nature du tégument et le nombre d'ovules par gousses. Ainsi, trois classes représentant respectivement les cultigrupes *Unguiculata*, *Biflora* et *Melanophthalmus* ont été obtenues. Ces classes sont les suivantes :

- la première classe regroupe les variétés à téguments épais et lisses, et à nombre d'ovules supérieur à 17. Cette classe renferme la seule variété Volète bou vèkh à gousses jaunes et œil noir, représentée par la seule accession 03-04, cv gr *Unguiculata*. Cette variété serait une variété locale mais non traditionnelle. En effet, *Unguiculata* est originaire d'Asie. Son introduction en Afrique de l'Ouest serait récente (Pasquet, 2004 comm pers.).
- la seconde classe concerne les variétés à téguments épais et lisses et à nombre d'ovules inférieur à 17. Il s'agit du cv gr *Biflora*. Elle renferme trois variétés représentées par cinq accessions (voir Annexe 2 et 3).
- la dernière classe, celle du cv gr *Melanophthalmus*, regroupe les variétés à téguments minces et ridés, et à nombre d'ovules inférieur à 17. Cette classe constitue l'essentiel de la collection. Elle compte 14 variétés représentées par 52 accessions.

Toutes les autres variétés collectées appartenant aux deux derniers groupes sont effectivement des variétés traditionnelles.

Ainsi, les caractères morphologiques ont révélé que les paysans des régions prospectées cultivent minoritairement les cultivars du groupe *Biflora* et majoritairement ceux du groupe *Melanophthalmus*. Du point de vue la diversité morphologique, nous avons découvert que les variétés du groupe *Melanophthalmus* sont plus diversifiées que celles du

groupe *Biflora*. Ces observations seraient en accord avec celles de Pasquet (2000). Selon lui, les cultivars du groupe *Biflora* s'opposent du point de vue de la diversité génétique à ceux du groupe *Melanophthalmus*. *Biflora* est morphologiquement peu variable, à l'inverse de *Melanophthalmus* qui est très variable au niveau phénotypique. La diversité des caractères phénotypiques entre cultivars appartenant au cv gr *Melanophthalmus* résulterait du choix opéré par les premiers paysans au cours de la sélection des semences avant chaque saison culturale. C'est ce que Chauvet (2001) a appelé «l'œil du paysan», où, le cultivateur, lorsqu'il voit apparaître dans sa récolte un changement caractéristique dans le phénotype qui l'intéresse, isole les graines et les resème.

Le grand nombre de variétés du groupe *Melanophthalmus* que nous avons collectées serait également lié au comportement social des paysans dicté par la situation géographique du pays. Le Sénégal, et particulièrement les régions prospectées, sont dominées par les plaines. Or, selon Pasquet (2004, comm. pers.), les cultivars du groupe *Melanophthalmus* sont détenus par les paysans vivant dans les plaines, plus ouverts aux influences extérieures. Cela les aurait poussés à abandonner *Biflora* depuis longtemps au profit de *Melanophthalmus*, tandis que ceux des régions de montagnes, plus conservateurs, cultivent majoritairement les variétés du groupe *Biflora*.

Diversité moléculaire

Les accessions 03-18, 03-20, 03-23, 03-24, 03-30, 03-31, 03-34, 03-54 qui ont servi de base dans l'étude moléculaire correspondent respectivement aux variétés Téguil sa tank, Mame lakhou, Mame Fama à gousses brunes à violettes, Mame Fama à gousses jaunes, Baye Ngagne à gousses violettes, Ndiaga Aw, Mame Fama à gousses violettes sur un fond jaune et Ndiassive à gousses jaunes et graines bleu-marines à brunes. Dans cette étude, deux des cinq marqueurs utilisés, VM35 et VM39, ont révélé un polymorphisme pour les accessions 03-18, 03-23, 03-24, 03-31 et 03-54. Le marqueur VM39 a montré quatre allèles au sein des huit accessions, les allèles 223, 229, 231 et 249 (Tableau 3). Les accessions 03-24 et 03-18 ont présenté respectivement quatre et trois allèles avec une dominance de l'allèle 231, qui se retrouve à une fréquence de 74% des allèles distribués dans la première accession, alors que l'allèle 249, avec une fréquence de 89%, est le plus commun des allèles dans la seconde accession.

Les marqueurs VM9 et VM17 se sont montrés monomorphes. Ils ont montré chacun un seul allèle dans les différentes accessions.

Variabilité génétique intra et inter-accessions

L'analyse du Tableau 4 a montré que 22% des loci sont polymorphes. Cependant, le taux de polymorphisme au niveau des accessions 03-24 et 03-54 est de 50%.

Le taux de polymorphisme obtenu, $P = 22\%$, est plus élevé que celui trouvé par Panella et Gepts (1992), $P = 4\%$. Il est légèrement moins élevé que celui de Vaillancourt *et al.* (1993), $P = 23\%$, et presque la moitié de celui trouvé par Pasquet

Tableau 3. Fréquences alléliques pour quatre loci.

Accessions	Marqueur							
	VM9	VM17	VM35		VM39			
	Allèles							
	292	172	147	149	223	229	231	249
03-18*	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,05	0,06	0,89
03-20	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
03-23*	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,96	0,04
03-24*	1,00	1,00	0,95	0,05	0,05	0,16	0,74	0,05
03-30	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
03-31*	1,00	1,00	0,41	0,59	1,00	0,00	0,00	0,00
03-34	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
03-54*	1,00	1,00	0,90	0,10	0,00	0,96	0,04	0,00

Chaque marqueur représente un locus.

* Accessions polymorphes.

Tableau 4. Indices de diversité génétique intra-population estimés pour huit accessions.

Accessions	Hétérozygotie moyenne sur les loci			
	P (0,99)	A	H obs.	H n.b.
03-18	0,25	1,50	0,00	0,05 ± 0,10
03-20	0,00	1,00	0,00	0,00 ± 0,00
03-23	0,25	1,25	0,00	0,02 ± 0,04
03-24***	0,50	2,00	0,00	0,13 ± 0,20
03-30	0,00	1,00	0,00	0,00 ± 0,00
03-31	0,25	1,25	0,00	0,12 ± 0,24
03-34	0,00	1,00	0,00	0,00 ± 0,00
03-54**	0,50	1,50	0,00	0,07 ± 0,09
Moyenne	0,22	1,31	0,00	0,05 ± 0,08

** Accessions ayant un taux de polymorphisme significatif (≥ 0.50)

*** Accessions ayant un taux de polymorphisme et une richesse allélique significatifs ($A \geq 2$)

P (0,99): Polymorphisme au seuil 99%

(2000), $P = 42\%$. Les différents auteurs cités ont utilisé des marqueurs iso-enzymatiques. Pasquet (2000) a lié le taux de polymorphisme relativement élevé au nombre important d'accessions qu'il a étudiées, qui représentent les cinq groupes de cultivars de niébé. Cependant, le taux de polymorphisme étant fonction du seuil de polymorphisme retenu, de la technique de marquage utilisée et du taux de mutations dans la région considérée (Pernès et Lourd, 1984 ; de Vienne, 1998), nous nous attendions à avoir un taux dépassant les 50%. En effet, les microsatellites sont réputés pour être les marqueurs les plus polymorphes (Santoni, 1996 ; Grivet et Noyer, 1999 ; Santoni *et al.*, 2000). Morgante *et al.* (1994) ont trouvé un taux de polymorphisme de 100% chez le soja. Ainsi, le faible taux de polymorphes que nous avons trouvé signifierait que, dans l'ensemble, les marqueurs utilisés ne permettent pas d'avoir une estimation fiable des paramètres de la diversité génétique. En effet, seulement deux marqueurs sur les quatre ayant servi dans l'analyse étaient polymorphes. Le temps qui nous était imparti n'a pas permis de faire un criblage préalable

sur l'ensemble des accessions étudiées pour ne retenir que les marqueurs polymorphes. Aujourd'hui, le criblage de tous les marqueurs microsatellites disponibles au CERAAS est entrain d'être effectué sur les accessions, dans le but de choisir ceux qui sont polymorphes et qui rendront parfaitement compte de la diversité génétique des variétés traditionnelles de niébé au Sénégal. C'est ce qui fait de cette étude, dont les résultats sont présentés ici, une étude préliminaire.

La richesse allélique, 1,31 allèles en moyenne par locus dans l'ensemble des accessions étudiées, est faible (voir Tableau 4). Les études iso-enzymatiques sur le niébé ci-dessus mentionnées indiquent une richesse allélique variant de 1,04 à 1,67. Ici également, cette faible richesse allélique serait due au nombre limité de marqueurs polymorphes utilisés.

Aucun hétérozygote n'a été observé dans les accessions analysées, $H. obs. = 0$ (voir Tableau 4), alors que nous nous attendions à trouver de 5 à 8 % d'hétérozygotes dans les conditions de panmixie. Cet écart entre hétérozygotes observés et hétérozygotes attendus est certainement du au système de

reproduction qui est caractérisé par une forte autogamie ou à une force évolutive, notamment une sélection favorisant certains génotypes. Cette analyse a été approfondie en testant le coefficient de consanguinité F (Tableau 5) qui a indiqué la part de loci fixés parmi les loci polymorphes. Le test a montré que tous les loci polymorphes sont fixés. L'hypothèse d'une consanguinité due au système de reproduction a été retenue. En effet, le niébé est une plante autogame stricte (Charrier *et al.*, 1997 ; Ehlers et Hall, 1997). Or, l'autogamie empêche une union aléatoire des gamètes et des individus, entraînant selon Petit et Zuckerkandl (1976) une élimination des hétérozygotes et par conséquent, un excès d'homozygotes.

Cependant, Pernès et Lourd (1984) ont déclaré : «L'autogamie se traduit par des niveaux d'hétérozygotie plus élevés qu'il n'est attendu». Ils expliquent cette hétérozygotie non négligeable par le fait que certaines pressions de sélection tendent à renforcer les génotypes hétérozygotes issus de quelques hybridations dues aux légers taux d'allogamie. Ce taux d'allogamie provient, selon Baudoin et ses collaborateurs (2002), des possibilités d'hybridation accidentelle qui subsistent toujours chez les espèces très autogames.

Le taux d'hétérozygote nul trouvé pourrait être également du aux conditions expérimentales, car certains profils obtenus étaient difficiles à lire et des corrections manuelles ont du être apportées.

La variabilité totale dans l'ensemble des accessions (HT) est sensiblement égale à 38% (Tableau 6). La variabilité génétique intra-accession, HS = 10%, est moins élevée que la variabilité inter-accessions, $D_{ST} = 28\%$. La variabilité génétique intra-accession plus faible que la variabilité inter-accessions

serait le propre des espèces autogames selon Bezançon et Second (1984), Doebley, (1989), Cousin (1992), Hamrick et Godt (1997) et Zaharieva *et al.* (1999).

Le coefficient de différenciation génique G_{ST} (nc), sensiblement égal à 0,62, révèle que 62% de la diversité génétique totale se trouve au niveau inter-accessions, contre 38% au niveau intra-accession.

La faible diversité moléculaire observée, HT= 0,38, serait également liée à l'appartenance des variétés analysées aux cultigrupes indiqués. Ceci à deux niveaux, premièrement le cv gr *Biflora* est une forme primitive de niébé plus proche des formes sauvages (Pasquet *et al.*, 1997 ; Pasquet, 2000) et le cv gr *Melanophthalmus* est une forme évoluée. Or, selon Baudoin *et al.* (2002), les formes primitives dérivent de leurs ancêtres, les formes sauvages, qui constituent le réservoir de la diversité génétique des plantes cultivées. Les cultivars du groupe *Melanophthalmus*, plus évolués seraient génétiquement éloignés des formes sauvages, donc moins variables génétiquement.

Il existerait donc une opposition pour la diversité morphologique et moléculaire entre *Biflora* et *Melanophthalmus*. En effet, sur huit accessions morphologiquement distinctes, dont sept sont du cv gr *Melanophthalmus* et une du cv gr *Biflora*, cinq ont montré une similarité génétique contre deux qui sont nettement distinguées. Quoique la seule représentante du cv gr *Biflora* ne nous permette pas de trancher, signalons qu'elle s'est distinguée en deux groupes d'individus génétiquement différents. Pasquet (2000) a effectivement montré l'opposition pour la diversité morphologique et moléculaire entre *Biflora* et *Melanophthalmus*.

Tableau 5. Coefficient de consanguinité et test de signification

Accessions	Loci polymorphes						
	VM35			VM39			
	N	F	χ^2	N	F	χ^2	
03-18	22			18	1*	54	
03-20	23			22			
03-23	24			24	1*	72	
03-24	22	1*	22	19	1*	57	
03-30	23			21			
03-31	17	1*	17	16			
03-34	24			23			
03-54	20	1*	20	23	1*	69	

$\chi^2 = F^2 N (a - 1)$ avec F = 1 - H obs./ H n.b. et ddl (degré de liberté) = a (a-1) / 2

N: nombre d'individus analysés au locus considéré, a: nombre d'allèles au locus considéré, χ^2 : test de Chi-deux

Pour le locus VM35, a = 2 et ddl = 1. Chi-deux lu = 3,81

Pour le locus VM39, a = 4 et ddl = 6. Chi-deux lu = 12,59

*: F statistiquement différent de zéro

Tableau 6. Indices de diversité de Nei estimés et paramètre de flux génique pour les huit accessions.

Sur la totalité des loci polymorphes	HT (nc)	HS (nc)	DST (nc)	GST (nc)	Nm (nc)
Moyenne	0,377	0,101	0,276	0,617	0,894

Ensuite, le second niveau, qui reste attaché au premier, est que, généralement, *Melanophthalmus* est cultivé dans des zones où les formes sauvages sont peu présentes. Cela a pour conséquence la diminution des flux de gènes et l'apparition de phénotypes récessifs par l'expression de nombreux gènes cachés. Cette hypothèse pourrait être à l'origine de la forte variabilité morphologique observée dans le groupe *Melanophthalmus* (Pasquet, 2003, comm. pers.). *Biflora* est principalement cultivé dans les zones où les flux de gènes restent relativement importants, ce qui produit une forte diversité moléculaire mais les phénotypes dominants uniformisent toute diversité morphologique.

Ces explications sont en accord avec la théorie de Vavilov (1920). Vavilov prétend que les centres d'origine des plantes occupent des zones géographiques restreintes, c'est-à-dire les zones de montagnes et que la composition génétique se modifie graduellement avec l'éloignement (Vavilov, 1926, 1992). Ainsi, la diversité génétique pour une plante donnée est inégalement distribuée, avec certaines zones ayant une diversité génétique élevée comparées à d'autres (Gepts, 2005). Ainsi, les gènes dominants seraient dans les centres d'origine et les gènes récessifs dans les périphéries.

Ces explications confortent celles de Dao *et al.* (1997) qui indiquent que les régions montagneuses du Nord Laos, Nord Vietnam, Nord Thaïlande et des hauts plateaux du Sud Vietnam ont des indices de diversité supérieurs à ceux des plaines. Ces auteurs lient cette variation de diversité à la complexité écologique plus grande dans les régions montagneuses par rapport aux plaines. Ceux-ci sont d'accord avec Gallais (1989), qui dit que selon le milieu, l'ensemble des gènes d'un génotype ne s'exprime pas de la même façon. Certains génotypes sont plus stables que d'autres, leurs performances varient moins selon le milieu.

Baudoin et ses collaborateurs (2002) rejoignent tous ces auteurs quand ils affirment que la diversité n'est pas présente uniformément dans l'aire de distribution d'une espèce. Elle est concentrée dans certaines zones caractérisées par une très grande variabilité écologique, climatique, édaphique. Selon eux et Chauvet (2001), elle est également conditionnée par des différences culturelles et ethniques ainsi que par les pratiques culturelles des paysans.

Cependant, la diversité génétique que nous avons observée avec les marqueurs microsatellites utilisés est plus élevée que celle révélée par les isozymes puisqu'elle varie de 0,018 à 0,061 (Panella et Gepts, 1992 ; Vaillancourt *et al.*, 1993 ; Pasquet, 2000). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les isozymes permettent de détecter un polymorphisme dû à des mutations ponctuelles qui induisent le remplacement d'un acide aminé par un autre, lequel est difficilement repérable à cause de la dégénérescence du code génétique (Grivet et Noyer, 1999). Par contre, avec les microsatellites, on a directement accès au génome et les motifs microsatellites sont caractérisés par un nombre de mutations très élevé. Néanmoins, cette diversité génétique est moins élevée que celle trouvée chez le soja par Morgante *et al.* (1994), HT = 0,52, où quatre marqueurs microsatellites polymorphes ont été utilisés.

Flux de gènes

Le flux de gène entre les huit accessions a été indirectement estimé (Guillot, 2004) en se basant sur l'analyse des fréquences alléliques. Il est de 0,89 (voir Tableau 6), ce qui est inférieur à 1 et montre que moins d'un migrant passe d'une accession à une autre au cours d'une génération.

La diversité morphologique des variétés traditionnelles de niébé est gérée de façon dynamique par les cultivateurs. En effet, non seulement un même paysan peut disposer de quatre variétés, mais il existe des échanges actifs de semences dominés par l'achat, contrairement au peuple Makushi en Amazonie tropicale où la majorité des échanges de boutures de manioc se fait par dons (Mckey *et al.*, 2001). Ainsi, un cultivateur sénégalais peut acheter des semences dans deux ou plusieurs marchés plus ou moins éloignés les uns des autres. Par exemple, certains paysans de la région de Diourbel, département de Bambey, parcourent environ 120 km pour acheter des semences de niébé au marché de Grand Yoff (région de Dakar). De telles pratiques ont certainement une influence sur les flux de gènes, et par conséquent modifieraient la diversité intra et inter-zones. Aussi, selon Nkongolo (2003), la forte diversité intra-accession observée chez les variétés traditionnelles de niébé au Malawi serait due au flux de gènes entretenus par les échanges et les achats de semences dans différents marchés du pays effectués par les paysans.

Cependant, dans notre cas, les données moléculaires ont révélé un flux de gènes faible au sein des accessions dans la région de Louga échantillonnées. Ceci pourrait être dû à une dynamique des achats concentrée exclusivement dans cette région. Mais également, si nous excluons la possibilité d'une forte dérive qui se manifeste dès lors que nous sommes en présence de populations à effectif réduit (Petit et Zuckerkandl, 1976 ; Hill et Robertson, 1968), cette faiblesse du flux de gènes serait liée à une différenciation des accessions (Martínez-Castillo *et al.*, 2006) imposée par l'autogamie quasi-stricte chez le niébé (Kimura et Maruyama, 1971).

Similarité génétique entre individus des différentes accessions

Six groupes d'individus distincts ont été révélés chez les accessions étudiées (Fig. 2).

Le premier groupe se présente de la façon suivante : trois accessions, 03-20, 03-30 et 03-34, sont homogènes et parfaitement identiques. Deux accessions, 03-23 et 03-24, possèdent une majorité d'individus identiques aux accessions précédentes.

Les trois autres accessions (03-18, 03-31 et 03-54) constituent les cinq autres groupes d'individus.

La grande homogénéité entre les accessions 03-20, 03-30 et 03-34 signifierait que ces accessions possèdent une base génétique commune. La subdivision de l'accession 03-54 serait due à son appartenance au cv gr *Biflora*, comme nous l'avons expliqué. Par contre, celle des autres accessions mérite l'attention. En effet, 03-31 est bien divisée en deux groupes. Au niveau des fréquences alléliques, c'est la seule accession où les individus ont des allèles en proportion relativement voisine.

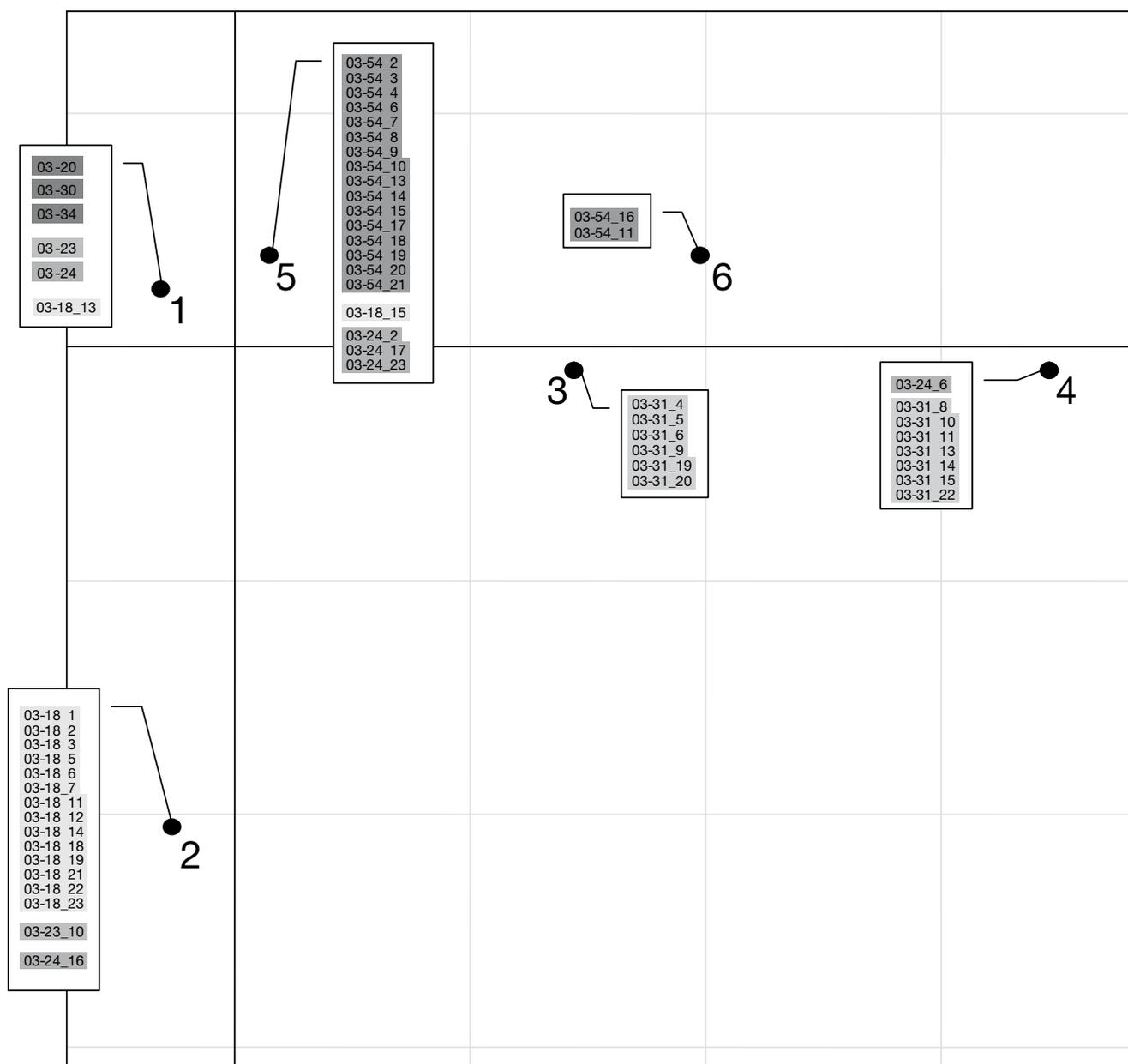


Figure 2. Projection sur le plan 1-2 de l'AFC des individus des huit accessions.

Ceci serait-il en rapport avec les nombreuses caractéristiques de la variété Ndiaga Aw dont elle est une représentante? Ou cela traduirait-il la présence quasi permanente de cette variété dans les trois régions visitées, alors que les autres variétés se rencontrent majoritairement dans certaines régions et non dans d'autres ?

L'hétérogénéité des accessions 03-24 qui a au moins un individu dans quatre groupes différents et 03-18 qui a un individu dans deux groupes distincts, hormis le groupe qu'elle constitue, implique également que ces accessions fassent l'objet d'une étude plus poussée. En effet, l'hétérogénéité mentionnée dans les quatre accessions indiquerait pour 03-54 qu'elle aurait une variabilité moléculaire liée à sa nature primitive. Concernant les trois autres accessions, cette variabilité se

traduirait par une accumulation importante de mutations dans leur évolution. Ces accessions ainsi repérées pourraient constituer un matériel de choix pour la sélection puisque «la matière première» du sélectionneur est la variabilité selon de Vienne (1998).

Conclusion

Cette étude aborde pour la première fois la classification des variétés traditionnelles de niébé cultivées au Sénégal et les rattache aux grands groupes décrits des formes cultivées. Elle explore également pour la première fois au niveau moléculaire la diversité de ces variétés et révèle à cet effet, dans l'ensemble, une faible diversité génétique des cultivars traditionnels avec

une variabilité intra-accession moins élevée que la composante inter-accessions. Elle indique une richesse allélique faible au sein des accessions et une base génétique certainement étroite du matériel collecté (trois accessions sur les huit analysées étant génétiquement identiques et voisines à deux autres de la liste). Toutefois, l'étude signale une hétérogénéité de la variabilité génétique dans les accessions 03-18, 03-24, 03-31 et 03-54. Ces accessions représentent respectivement les variétés Téguil sa tank, Mame Fama à gousses jaunes, Ndiaga Aw et Ndiassive à gousses jaunes, graines bleu-marines à brunes. Ces quatre accessions ainsi repérées pourraient constituer un matériel de choix pour la sélection. L'étude indique également un faible flux de gènes entre les populations étudiées.

Cette étude semble confirmer l'hypothèse de la situation du Sénégal dans une zone à faible diversité moléculaire et à forte diversité morphologique. Cependant, nous avons montré un taux de polymorphisme très faible, indiquant une exploration partielle du patrimoine génétique du matériel analysé par les marqueurs microsatellites utilisés.

Ces différents résultats seront complétés et affinés dans des études ultérieures.

Remerciements

Nous remercions le Dr Mbène Dièye FAYE (CNRA de Bambey) pour avoir facilité les missions de collecte et le Dr Ronan JAMBOU (Institut Pasteur de Dakar) qui a permis la réalisation d'une partie des travaux sur le séquenceur.

La Fondation Internationale pour la Science (FIS) a financé une partie des prospections et une partie du matériel de biologie moléculaire utilisé. Le Service Allemand des Echanges Universitaires (DAAD) a octroyé la bourse qui a permis de mener à bien les travaux.

Références

- Ba FS, Pasquet RS, Gepts P. 2004. Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51 (5): 539-550.
- Ba M, Reenberg A. 2004. Mapping land use dynamics in Senegal. Case studies from Bambey and Diourbel Departments. SE-REIN Working Paper 44, 32pp
- Ba MM. 1995. Principaux sols du Sénégal (Caractérisation - facteurs de fertilité - contraintes et localisation). Cours de Sciences du sol. ENCR de Bambey. 15 p.
- Badiane AN, Khouma M., Sène M. 2000. Région de Diourbel : gestion des sols. Atelier sur les rapports entre politiques gouvernementales et investissements paysans dans les régions semi-arides, tenu à Bambey et Dakar (Sénégal) du 12 au 14 janvier 2000. Drylands Research Working Paper 15, Press-tige Print, Crewkerne, Royaume-Uni, 33pp.
- Baudoin JP, Demol J, Louant BP, Maréchal R, Otoul E. 2002. Amélioration des plantes. Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Les presses agronomiques de Gembloux. 581 p.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 1996-2002. *GENETIX 4.03, Logiciel Sous Window TM Pour la Génétique Des Populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNR SUMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bezançon G. et Second G. 1984. Les riz. In: *Gestion des ressources génétiques des plantes*. Tome 2, Manuel ACCT. LAVOISIER, Paris, pp 107-156.
- Borget M. 1989. Les légumineuses vivrières tropicales. Le technicien d'agriculture tropicale. Maisonneuve et Larose, Paris. 161 p.
- CGIAR. 2001. Cowpea (*Vigna unguiculata*). CGIAR on line/ CGIAR Research: Areas of Research, <http://www.cgiar.org/research/res_cowpea.html>, Washington, D.C.
- Charrier A, Jacquot M, Hamon S, Nicolas D. 1997. L'amélioration des plantes tropicales. CIRAD/ORSTOM. 624 p.
- Chauvet C. 2001. Du voyage des plantes à la mondialisation des espèces cultivées. Mission Agrobiosciences. Cahier N° 22, 14 p. www.agrobiosciences.org
- Cissé N, Hall AE. 2003. Traditional Cowpea in Senegal, a case study. 27 p. www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/publicat/cowpea_Cisse/cowpea_cisse_e.htm.
- Cissé N, Thiaw S, Ndiye M, Hall AE. 1996. Fiche technique : Guide de la production du niébé. ISRA, Dakar, Sénégal. 6 (2): 12 p.
- Cissé N, Sène A, Sall B. 2001. Amélioration du niébé. Rapport annuel-2000. ISRA/CNRA, Sénégal. 17 p.
- Cousin R. 1992. Les protéagineux - Le pois. In: Amélioration des espèces végétales cultivées. INRA, Paris, pp 171-188.
- Dao TT, Luu NT, Le TCD. 1997. La diversité génétique du riz cultivé dans le Sud-Est asiatique. In : Spécial Vietnam. Agriculture et développement, pp. 213-216
- DISA, 1998. Résultats définitifs de la campagne agricole 1997/1998. Ministère de l'agriculture du Sénégal - Direction de l'agriculture, Division des statistiques agricoles. 19 p.
- Doebley J. 1989. Isozymic evidence and the evolution of crop plants. pp 165-191. In: Isoenzyme in plant biology. D.E. Soltis and P.S. Soltis (ed). Dioscorides Press, Portland, OR.
- DSDIA/DAPS/MAE. 2003. Résultats définitifs des récoltes des campagnes agricoles 1998/1999 à 2002/2003. Récapitulatif des cultures industrielles et autres cultures. Sénégal, 3^{ème} version du 24/03/2003.
- Ehlers JD, Hall AE. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops research*, 53: 187-204.
- FAO. 2001. FAOSTAT Agricultural Data. <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture>. Hamdy, M. 1989. Cowpea processing project 685-0281. USAID. Dakar, Sénégal. 140 pp.
- FAOSTAT. 2004. Agricultural production, crop primary database. Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome. <http://faostat.fao.org/faostat/>
- Fortin D, Lô M, Maynard G. 1989. Plantes médicinales du sahel. CECI, ENDA. 280 p.
- Gallais A. 1989. Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Masson, Paris. 588 p.
- Gallais A. 1994. La sélection assistée par marqueurs. In: Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp 387-397.
- Gepts P. 2005. Introduction of Transgenic Crops in Centers of Origin and Domestication. In: Controversies in science and technology: from maize to menopause. Ed. Daniel Lee Kleinman, Abby J. Kinchy, and Jo Handelsman. The University of Wisconsin Press. pp 199 - 134.
- Gibbs JP, Ahmad R, Crump KS, Houck DP, Leveille TS, Findley JE, Francis M. 1998. Evaluation of population with occupational exposure to airborne ammonium perchlorate for possible acute or chronic effects on thyroid function. *J. Occup. Environ. Med.*, 40: 1072-1082.
- Grivet L, Noyer JL. 1999. Les méthodes de marquage biochimique et moléculaire. pp 13-41. Dans: Diversité génétique des plantes tropicales cultivées, CIRAD, 387 p.
- Hamrick JL, Godt M. 1997. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Sci*, 3: 26-30.
- Hill WG, Robertson A. 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 38: 226-231.
- ISRA. 1998. Rapport annuel 1997. ISRA, Dakar (Sénégal). 91 p.
- Kimura O, Maruyama T. 1971. Patterns of neutral polymorphism in a geographically structure population. *Genet Res*, 18: 125-131.
- Laminaux C, 1995. VALSAT P navigateur GPS portable. MLR électronique S.D. Vallet (France).
- Li C-D, Fatokum CA, Ubi B, Singh BB, Scoles GJ. 2001. Determining Genetic Similarities and Relationships among Cowpea Breeding Lines and Cultivars by Microsatellite Markers. *Crop Science*, Vol. 41. 189-197.
- Locke M, Baack E, Toonen R. 2000. Veterinary Genetics Lab STRand. Version 2.2.259. University of California, 15p.
- Lougheed LW, Breault A, Lank DB. 1999. Estimating Statistical power to evaluate ongoing waterfowl population monitoring. *Journal Wildlife Management*, 63: 1359-1369.

- Martínez-Castillo J, Zizumbo-Villarreal D, Gepts P, Delgado-Valerio P, Colunga-García-Marín P. 2006. Structure and Genetic Diversity of Wild Populations of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Crop Sci.* 46:1071–1080.
- Mckey D, Emperaire L, Elias M, Pinton F, Robert T, Desmoulière S, Rival L. 2001. Gestions locales et dynamiques régionales de la diversité variétale du manioc en Amazonie. *Genet. Sel. Evol.* 33 (suppl.1).
- Mignouna HD Ng N.Q, Ikea J, Thottappilly G. 1998. Genetic diversity in cowpea as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Journal of Genetics and Breeding*, 52 (2): 151-159.
- Morgante M, Rafalski JA, Biddle P, Tingey S, Olivieri AM. 1994. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome*, 37: 763-769.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 70: 3321-3323.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei M, Chesser RK. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet.*, 47: 253-259.
- Nkongolo KK. 2003. Genetic characterization of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) landrace: diversity and gene flow among accessions. *Euphyca*, 129: 219-228.
- Nkouannessi M. 2005. The genetic, morphological and physiological evaluation of African cowpea genotypes. Thesis, University of the Free State Bloemfontein, South Africa, 131 p.
- Padulosi S. 1993. Genetic diversity, taxonomy and ecogeographic survey of the wild relatives of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Thèse de doctorat*, UCL, Louvain-la-Neuve (Belgique), 477 p.
- Panella L, Gepts P. 1992. Genetic relationships within *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Based on isozyme analyses. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 39: 71-88.
- Pasquet RS. 1996. Cultivated cowpea (*Vigna unguiculata*) evolution. In: *Advances in Legume Systematics. 8. Legumes of Economic Importance*, B. Pickersgill and J.M. Lock (eds). Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 101-108.
- Pasquet RS, 1998. Morphological study of cultivated cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Importance of ovule number and definition of cv gr Melanophthamus. *Agronomie*, 18, 61-70.
- Pasquet RS. 1999. Genetic relationships among subspecies of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on allozyme variation. *Theor Appl Genet* 98:1104–1119.
- Pasquet RS. 2000. Allozyme diversity of cultivated cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Base on allozyme variation. *Theor Appl Genet*, 101, 211-219.
- Pasquet RS, Baudoin JP. 1997. Cowpea.. In: *Tropical Plant Breeding*. CIRAD, Paris. pp 177-198.
- Pasquet RS, Echikh N, Gepts P, Baudoin JP. 1997. La domestication du niébé. In: *Actes du Colloque Gestion des ressources génétiques des plantes en Afrique des savanes*. Bamako, Mali, 26-28 février 1997, Institut d'Economie Rurale (Mali), Bureau des Ressources Génétiques (France) et Solagral (France), 261-270.
- Pernès J, Lourd M.1984. Organisation des complexes d'espèces. In: *Gestion des ressources génétiques des plantes*. Tome 2, Manuel ACCT. LAVOISIER, Paris, pp 7-106
- Petit C, Zuckerkandl E. 1976. Evolution. Génétique des populations. Evolution moléculaire. Hermann, Paris, 278 p.
- Sall M M. 2000. Relief et sols. In: *Atlas du Sénégal*. Les éditions J.A., 5^e ed. Paris, pp 8-11
- Santoni S. 1996. Les marqueurs moléculaires utilisables en amélioration des plantes. *Le Sélectionneur Français*, 46: 3-18.
- Santoni S, Faivre-Rampant P, Prado E, Prat D. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures*, 9: 311-327.
- Sène D. 1966. Inventaire des principales variétés de niébé (*Vigna unguiculata* Walpers) cultivées au Sénégal. *L'Agronomie Tropicale*, 8: 927-933.
- Sène D, N'diaye SM.1971. L'amélioration du niébé *Vigna unguiculata* au CNRA de Bambey de 1959 à 1969. *L'Agronomie Tropicale*, 26: 1013-1065.
- Sène D, N'diaye SM. 1974. L'amélioration du niébé *Vigna unguiculata* au CNRA de Bambey de 1959 à 1973: résultats obtenus entre 1970 et 1973. *L'Agronomie tropicale*, 29: 772-802.
- Singh AK. 2001. La gestion d'une banque de données. Manuel de cours théoriques de gestion des semences. CIRAD, Paris. 133 P.
- Singh BB, Chambliss OL, and Sharma B. 1997. Recent advances in cowpea breeding. pp 30–49 in *Advances in cowpea research*, edited by B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell, and L.E.N. Jackai. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan. Nigeria.
- Vaillancourt RE, Weeden NF, Barnard J. 1993. Isozyme Diversity in the Cowpea Species Complex. *Crop Sci.* 33: 606-613.
- Vavilov, N.I. 1920. The Law of Homologous Series in Hereditary Variation. Pp. 3-20 in *Proceedings of the III All-Russian Plant Breeding Congress*, Saratov, Russia.
- Vavilov, N.I. 1926. Centres of origin of cultivated plants. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed.* 16(2). 248pp.
- Vavilov NI. 1992. *Origin and geography of cultivated plants*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 497 p.
- Vienne D (de). 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA, 200 p.
- Zaharieva M, David J, This D, Monneveux P. 1999. Analyse de la diversité génétique d'*Aegilops geniculata* Roth en Bulgarie. *Cahiers Agricultures*, Vol 8, 3: 181-188.

Annex 1.