



ARTICLE SCIENTIFIQUE



KOURA K, MISSIHOUN AB, SEDAH P, AGBANGLA C, GANGLO JC. 2021. Diversité génétique des populations de *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. ex G. Don des zones agroécologiques Ouest-Atacora et vivrière du Sud-Borgou révélée par les marqueurs SSRs nucléaires. Cahiers du CBRSI, Agriculture environnement et sciences de l'ingénieur N° 19 ; Dépôt légal n° 13378 du 07/10/2021 ; 202-222.

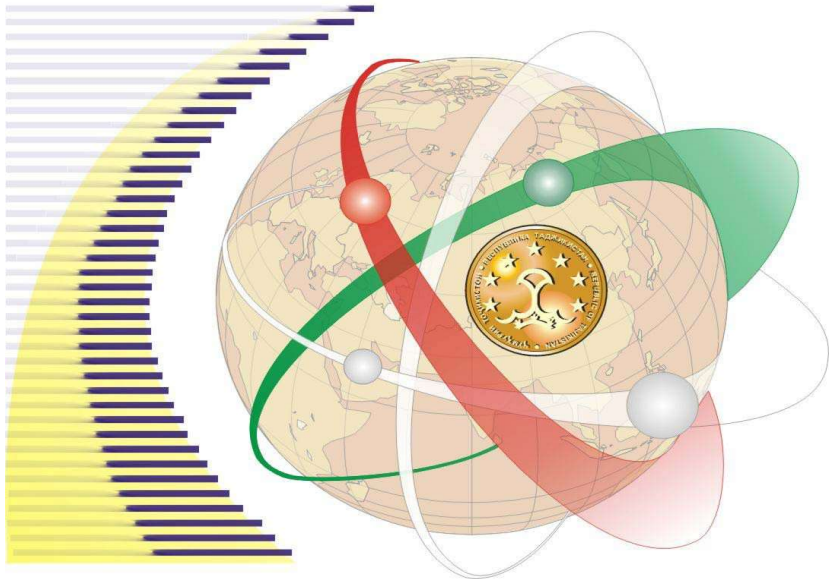


La revue scientifique
**Les Cahiers
du CBRST**

La science au service de la société

DOSSIERS

**Agriculture, Environnement et Sciences
de l'Ingénieur**



03 BP 1665Tél (229) 21 32 12 63 2132 09 77

Fax : (229) 21 32 36 71

Mail : cahiersducbrst@yahoo.fr ;

cahiersducbrst@gmail.com

Site Web : <http://www.cbrst-benin.org>

Directeur de Publication : Professeur Marc T.T. KPODEKON ;

Directeur Général du CBRSI

Rédacteur en Chef : AZONHE Thierry

Conseiller Scientifique : Apollinaire Guy

MENSAH ; Directeur de Recherche

COMITE SCIENTIFIQUE

Pr. DARBOUX Raphael (Bénin)

Pr FAYOMI Benjamin (Bénin)

Pr. BIGOT André (Bénin)

Pr. MAKOUTODE Michel (Bénin) Pr.

Pr. AKPONA Simon (Bénin)

TCHITCHI Toussaint Y. (Bénin)

Pr. LALEYE Anatole (Bénin)

Pr. OYEDE Marc (Bénin)

Pr. HOUNNOU Gervais (Bénin)

Pr. ALINSATO Alastaire (Bénin)

Pr. HOUNGBE Fabien (Bénin)

Pr CLEDJO Placide (Bénin)

Pr. GLIDJA Judith

Pr. DOMINGO Etienne (Bénin)

Pr. KOUMAKPAYI Taofiki (Bénin)

Pr. HOUNDENOU Constant (Bénin)

Pr. SAMBA KIMBATA Joseph (Congo B)

Pr. MENSAH Guy Apollinaire

Pr. GBEASSOR Messanvi (Togo)

Pr. TOSSA Joel (Bénin)

Pr. MASSOUGBODJI Achille (Bénin)

Pr. SINSIN Brice (Bénin)

Pr. AFOUDA Abel (Bénin)

Pr. GBENOU Joachim (Bénin)

Pr. ZOUNGRANA Pierre Tanga (Burkina)

Pr. AZONHE Thierry (Bénin)

Pr. ATTANASO Odile (Bénin)

Pr. TCHAMIE Tiou (Togo)

Pr. JOSSE Roger (Bénin)

Pr. GBAGUIDI Fernand (Bénin)

Pr. LALEYE Anatole (Bénin)

Pr. ANIGNIKIN Sylvain (Bénin)

Pr. Pr. VISSIN Expédit (Bénin)

Pr. AHANHANZO Corneille (Bénin)

Pr. AGBOSSOU K. Euloge (Bénin)

Pr. HONTONFINDE Félix (Bénin)

Pr. SOCLO Henri (Bénin)

Pr. IGUE Charlemagne (Bénin)

Pr. AMOUZOUVI Dodji H. (Bénin)

Pr. HOUNKOU Emmanuel (Bénin)

COMITE DE LECTURE

Prof NOUHOUAYI Albert; Prof AGBOSSOU K. Euloge ; Pr AVLESSI Félicien ; Prof CLEDJO Placide; Prof da CRUZ Maxime ; Prof DIMON Biauou Fidèle ; Prof DOMINGO Etienne ; Prof EDAH Daniel ; Prof KOUNOUHEWA Basile ; Prof MENSAH G. A. ; Prof TOSSOU Okri Pascal ; Prof YAYI Eléonore ; Dr TENTE Brice; Dr YABI Ibourahima ; Dr. Zacharie SOHOU ; Pr. LALEYE Anatole ; Pr. OUMOROU Madjidou ; Prof BOKO Gabriel; Prof MONGBO Roch ; Prof. SOCLO Henri ; Dr ALAMOU Eric ; Dr AZANDO E. V.; Dr DOUGNON Victorien ; Dr FOURN Elisabeth; Prof GBAGUIDI Fernand; Dr GBANGBOCHÉ A. B. ; Prof GLELE KAKAÏ Romain ; Prof TCHIBOZO Eric; Pr HONTONFINDE Félix ; Pr HOUNHOUGAN Joseph ; Pr KPOVIESSI Salomé ; Pr OYEDE Marc ; Pr. Ag. FOLLIGAN Bénédiction ; Pr. Ag. YAO-GNANGOURA Victor ; Pr. AKPONA Simon ; Pr. ALLABI Aurel ; Pr. BIGOT André ; Pr. CHIKOU Antoine ; Pr. DARBOUX Raphael ; Pr. Fulgence AFOUDA; Pr. GBAGUIDI Fernand ; Pr. HOUNGBE Fabien ; Pr. HOUNNOU Gervais ; Prof. Ag. MOUMOUNI Hassane ; Prof AHOHOUNKPANZON Michel; Prof AINA Martin ; Prof ALLABI Aurel; Dr HOUNGNIHIN Roch ; Dr GUENDEHOU Sabin ; Dr JOHNSON Christian; Dr KPOHOUE Ferdinand; Dr GNIMADI Clément, Dr SOHOU Zacharie; Dr GBEWETOUN C. Louis; Dr AGBOKOUNOU Aristide, Dr DEGBEY Georges; Dr VIGNINOUS Toussaint; Dr GIBIGAYE Mohamed; Dr YABI Fidèle; Dr OREKAN Vincent; Dr GBAGUIDI Arnauld; Dr TOKO Ismaël; Dr VISSOH Sylvain; Dr HEDIBLE Sidonie, SOSSOU K. Benoît.

Toute reproduction, même partielle de cette revue est rigoureusement interdite. Une copie ou reproduction par quelque procédé que ce soit, photographie, microfilm, bande magnétique, disque ou autre, constitue une contrefaçon passible des peines prévues par la loi 84-003 du 15 mars 1984 relative à la protection du droit d'auteur en République du Bénin.



SOMMAIRE

1. **Variabilité morphologique et nutritionnelle des fruits de *Saba Senegalensis* au Mali.....01**
KORBO Adama, SENOU Oumar, SANOGO Traoré Mariam

2. **Effets de l'insecticide coton pyro fte 472 ec à base du chlorpyriphos-ethyl (400 g/l) et du cyperméthrine (72 g/l) sur la croissance et l'utilisation alimentaire chez *Clarias gariepinus*.....25**
AGBOHESSI Prudencio , ELEGBE Hugues, TEKO Alphonsine, YACOUTO Edith, DEGILA Bodelaire, IMOROU TOKO Ibrahim

3. **Première mise en évidence de *Anaplasma phagocytophilum* chez les bovins au Bénin : un pathogène émergent transmis par les tiques.....52**
ADEHAN Saftou Bienvenu, BADAROU Kadidjatoulaï Opeyemi, KANDE Souleymane , KOUNONZO Maurice Landry, MAMA YACOUBOU Traoré, DOSSOU-GBETE Gérard Septime Olivier , MADDER Maxime, FAROUGOU Souaïbou

4. **L'agriculture urbaine à Korhogo : un moyen de survie ou une nouvelle activité prometteuse ?.....66**
FOFANA Lacina

5. **Les schémas d'aménagement foncier (SAF) considérer comme un outil d'aide aux décisions d'aménagement, de sécurisation des ressources et de prévention des conflits entre opérateurs ruraux au Niger.....81**
Mahaman Moussa MAHAMADOU Issa GARBA Daouda Tiémogo SANGARE



6. **Rationalités locales d'utilisation des engrais et pesticides chimiques dans la production du coton conventionnel à Djidja au Bénin.....111**
TOGBE Codjo Timothée
7. **Influence des méthodes de suppression de vie, du mode de séchage et de la durée de stockage sur la composition chimique des larves de mouches domestique (*Musca domestica*).....127**
VIGNONZAN Mahugnon Koffi Morel, POMALEGNI Sètchéme Charles Bertrand, DAKPOGAN Hervé, ACCROMBESSI Darius François
8. **Etude comparée des essais de culture in vivo et in vitro sur le niveau d'éradication du virus Buchy top chez deux cultivars de bananiers et plantains (*musa spp l.*) cultivés au Bénin.....140**
AGBIDINOUKOUN Arnaud, AGBADJE T. A. E. Eustache, ZANDJANAKOU TACHIN Martine, TOHOUN TODEDJI C. Jean-Marie, AHANHANZO Corneille
9. **Portrait des procédés traditionnels de production du olele, une pâte de niébé cuite consommée au Bénin.....160**
TIME G. P. Daniel, AÏSSI M. Vahid, HOUNGBO Y. Victor, CHABII. Bienvenue, KPOCLOU Y. Euloge
10. **Evaluation des paramètres petro-physiques et perspective de mise en valeur des pierres naturelles au Bénin : cas du marbre d'Assiyo dans la commune de Dassa.....181**
FALOLA Emilola, LAIBI Raoul, OUOROU Moussa
11. **Diversité génétique des populations de *Parkia biglobosa* (jacq.) r. br. ex g. don des zones agro-écologiques Ouest-**



- Atacora et vivrière du Sud-Borgou révélée par les marqueurs SSRS nucléaires.....202**
Kourouma KOURA, Antoine Abel MISSIHOUN, Paulin SEDAH, Clément AGBANGLA ; Jean Cossi GANGLO
- 12. Déterminisme de la germination in situ chez *Garcinia kola* en zone Guineo-Congolaise.....223**
AZALOU-TINGBE Nondégnissè Claude, AHANHANZO Corneille, ASSOGBADJO E. Achille, HOUEJISSIN Sètonджи Serge, AFFOSSOGBE Sèdjro Antoine Tranquillin, CACAÏ Habib Todjro Gilles
- 13. Rôle et diversité floristique des ceintures vertes villageoises de la préfecture de l'Avé au Togo.....255**
BIGMA Bayamina, WOEGAN Yao Agbelessessi, DIWEDIGA Badabaté ; WALA Kpèrkouma
- 14. Changements climatiques et dynamique érosive autour du lac « Aheme » au Bénin en Afrique de l'ouest.....273**
Cyr Gervais ETENE
- 15. Protection des ressources naturelles de la réserve de biosphère de la Pendjari (RBP) : l'éducation à l'environnement comme réponse.....293**
SEBO VIFAN Eric Laurent Sèvimi Coffi



DIVERSITE GENETIQUE DES POPULATIONS DE *PARKIA BIGLOBOSA* (JACQ.) R. BR. EX G. DON DES ZONES AGRO-ÉCOLOGIQUES OUEST-ATACORA ET VIVRIERE DU SUD-BORGOU REVELEE PAR LES MARQUEURS SSRs NUCLEAIRES

Kourouma KOURA^{1*}, Antoine Abel MISSIHOUN^{2,3}, Paulin SEDA^{2,3}, Clément AGBANGLA^{2,3} et Jean Cossi GANGLO¹

¹Laboratoire des Sciences Forestières, Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin

²Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies, Université d'Abomey-Calavi

³Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Analyse des Génomes, Université d'Abomey-Calavi

* Auteur correspondant : E-mail : kourakourouma@gmail.com; Tél : +229 96716130

RÉSUMÉ

Parkia biglobosa est l'une des ressources phytogénétiques qui occupe une place capitale dans la vie des populations des zones sahéliennes et soudanaises d'Afrique. La présente étude a eu pour objectif général d'évaluer la diversité génétique des populations de cette espèce, situées dans les zones agro-écologiques Ouest-Atacora et vivrière du Sud-Borgou, ceci par utilisation de 3 marqueurs SSRs ciblés suite à l'étude en 2014, de la transférabilité de 9 marqueurs microsatellites développés pour *Parkia panurensis* sur *P. biglobosa*. Ces 3 marqueurs utilisés sont les marqueurs Parpan 4, Parpan 9 et Parpan 13. Trente-six (36) échantillons d'arbres correspondant à 28 parcelles agroforestières, ont été collectés dans les deux zones. Un contrôle sur gel d'agarose à 2 % des produits PCR a été réalisé afin de vérifier la qualité de l'amplification. D'après les résultats, les 3 marqueurs testés sont polymorphes et ont révélé 12 allèles sur l'ensemble des individus considérés. Le taux de polymorphisme est évalué à 100 %. Le nombre d'allèles varie de 3 à 5 selon les loci avec un nombre moyen de 4 allèles par locus. Le locus Parpan 13 est le moins polymorphe avec 3 allèles tandis que le locus Parpan 4 est le plus polymorphe avec 5 allèles. Dans les 2 zones, le locus Parpan 4 est le plus discriminant tandis



que les loci Parpan 9 et Parpan 13 sont moins discriminants respectivement dans la zone Ouest-Atacora (0,48) et vivrière du Sud-Borgou (0,50). L'hétérozygotie moyenne attendue par locus est de 0,66 tandis que l'hétérozygotie moyenne observée par locus est de 0,49. Par ailleurs, le dendrogramme réalisé révèle que les 36 accessions de *Parkia biglobosa*, sont organisées en trois (3) groupes comportant 5 ; 6 et 25 individus. Il existe une diversité intra et inter populations des individus de *P. biglobosa* des zones agro-écologiques. Une étude basée sur l'utilisation d'un nombre plus élevé de SSRs spécifiques de l'espèce s'avère nécessaire dans ces zones pour mieux appréhender la diversité des ressources de l'espèce.

Mots clés : *Parkia biglobosa*, Diversité génétique, SSR, Zone agro-écologique, Bénin.

ABSTRACT

Parkia biglobosa is one of the plant genetic resources, which occupies a capital place in the life of the populations of the Sahelian and Sudanian zones of Africa. The general objective of this study was to assess the genetic diversity of the populations of this species, located in the West-Atacora and South-Borgou agro-ecological zones, by using three (3) SSR markers targeted following the study, in 2014, the transferability of nine (9) microsatellites markers developed for *Parkia panurensis* on *P. biglobosa*. These three (3) markers used are the Parpan 4, Parpan 9 and Parpan 13 markers. Thirty-six (36) tree samples corresponding to twenty-eight (28) agroforestry plots were collected in the two areas. A 2 % agarose gel control of the PCR products was carried out in order to check the quality of the amplification. According to the results, the three (3) markers tested are polymorphic and revealed 12 alleles on all the individuals considered. The polymorphism rate is evaluated at 100 %. The number of alleles varies from 3 to 5 depending on the loci with an average number of 4 alleles per locus. The Parpan 13 locus is the least polymorphic with 3 alleles while the Parpan 4 locus is the most polymorphic with 5 alleles. In the 2 zones, the Parpan 4 locus is the most discriminating while the Parpan 9 and Parpan 13 loci are less discriminating respectively in the West-Atacora (0.48) and South-Borgou zone (0.50). The average expected heterozygosity per locus is 0.66 while the average observed heterozygosity per locus is 0.49. Furthermore, the dendrogram produced reveals that the 36 accessions of



Parkia biglobosa are organized into three (3) groups comprising 5; 6 and 25 individuals. There is intra- and inter-population diversity of *P. biglobosa* individuals in agro-ecological zones. A study based on the use of a higher number of species-specific SSRs is necessary in these areas to better understand the diversity of the species' resources.

Keywords: *Parkia biglobosa*, genetic diversity, SSR, agro-ecological zone, Benin.

INTRODUCTION

Les ressources phylogénétiques constituent la base de la sécurité alimentaire, du soutien aux moyens d'existence et du développement économique, et représentent une des composantes prioritaires de la biodiversité. Le Deuxième Rapport sur l'état des ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde démontre le rôle central que la diversité phylogénétique continue de jouer en façonnant la croissance agricole face au changement climatique et aux autres défis liés à l'environnement (FAO, 2010). *Parkia biglobosa* est l'une de ces ressources phylogénétiques qui occupe une place capitale dans la vie des populations des zones sahéliennes et soudaniennes d'Afrique. C'est une espèce alimentaire dont l'importance est bien reconnue tant au niveau régional qu'international (Ouédraogo, 1995). Les fruits de *P. biglobosa*, en forme de gousse, sont consommés non seulement pour leur pulpe farineuse et sucrée, mais surtout pour leurs graines qui, après une longue préparation, fournissent un condiment utilisé dans la cuisine africaine.

En dépit des multiples avantages (alimentaire, médicinal, social, culturel, artisanal, économique, etc.) que procure *Parkia biglobosa* aux communautés locales, elle subit à l'instar des autres ressources phylogénétiques de sérieuses menaces liées aux pressions anthropiques et aux aléas climatiques. Ceci se manifeste par le vieillissement de nombreux parcs à *Parkia biglobosa*, caractérisés par une absence de régénération et la dégradation de certains autres (Ouédraogo 1995, Hall *et al.*, 1997).

Cette situation préoccupante commande que des mesures visant à préserver l'espèce, soient prises. La conservation et l'utilisation efficaces des ressources génétiques de *Parkia biglobosa* requièrent une évaluation précise de la variation génétique qu'elles comportent. La diversité génétique des plantes peut être mesurée par l'intermédiaire des marqueurs



morphologiques, biochimiques et génétiques moléculaires. Les marqueurs morphologiques sont des descripteurs quantitatifs comme la couleur, la forme, la taille, etc. de différents organes tandis que les marqueurs biochimiques sont les isozymes, les protéines, les métabolites secondaires comme les terpènes, etc. Les marqueurs moléculaires quant à eux se retrouvent au niveau de l'ADN.

Quatre sous-populations de *Parkia biglobosa* ont été identifiées au Nord-Bénin, ceci en se basant sur huit descripteurs quantitatifs de l'espèce (nombre de rachis par feuille, nombre de gousses par infrutescence, longueur du pédoncule, épaisseur du pédoncule, longueur du pédicelle de la gousse, longueur de la gousse, poids de la gousse, nombre de graines par gousse (Koura *et al.*, 2013).

Une étude du polymorphisme isoenzymatique de populations naturelles de *Parkia biglobosa* au moyen de l'électrophorèse sur gels d'amidon et d'acrylamide, a permis de déterminer la diversité intra- et inter-population, la structure et les distances génétiques entre 64 populations naturelles de *Parkia biglobosa* réparties à travers 11 pays d'Afrique de l'Ouest et du Centre (Sina, 2006). L'analyse de graines issues de fécondation libre, récoltées sur 1658 arbres provenant de ces populations, a élucidé le déterminisme génétique de cinq systèmes enzymatiques codés par 8 loci polymorphes comportant 33 allèles (Sina, 2006). Cependant, une limite importante des isozymes réside dans le fait que ces types de marqueurs sont basés sur des produits de gène. De ce fait, ces marqueurs peuvent être influencés par des facteurs environnementaux, des différences d'expression pouvant apporter de la confusion dans l'interprétation des résultats. Les gènes peuvent être exprimés différemment au cours des différents stades de développement ou dans différents tissus.

Il est donc important d'initier des études basées sur l'utilisation des marqueurs moléculaires sur l'espèce dans cette zone. Au Nigéria, la diversité génétique de différentes accessions de *Parkia biglobosa* provenant de diverses zones agro-écologiques du Nigéria a été évaluée en utilisant les marqueurs RAPD (Amusa *et al.*, 2014). Parmi les marqueurs moléculaires (RFLP, microsatellites, RAPD et AFLP), les microsatellites sont parmi les marqueurs les plus puissants pour révéler du polymorphisme (Santoni *et al.*, 2000). Aussi, au Bénin, le potentiel de transfert de neuf loci microsatellites nucléaires révélés polymorphes chez l'espèce *Parkia panurensis* (Luettmann *et al.*, 2010) a été testé chez l'espèce *Parkia biglobosa* (Koura,



2019). Cinq (5) loci (Parpan 3, Parpan 4, Parpan 9, Parpan 13 et Parpan 15) sur neuf (9) ont montré une bonne amplification chez *Parkia biglobosa*.

En vue d'une amélioration des ressources génétiques de *Parkia biglobosa*, le présent travail a permis de déterminer la diversité et la structure génétiques des populations de *Parkia biglobosa*, situées dans les zones agro-écologiques Ouest-Atacora et vivrière du Sud-Borgou, ceci en se basant sur les trois (03) loci microsatellites les plus polymorphes Parpan 4, Parpan 9 et Parpan 13.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Milieu d'étude

Pour générer plus de correspondance entre unités administratives et les zones de végétation pour l'extension agricole et les objectifs de décision politique, huit zones agro-écologiques ont été définies au Bénin (MDR, 1998). Ces zones regroupent, chacune, les communes subissant les mêmes contraintes physiques, biologiques et sociales et dans lesquelles les populations développent des stratégies adaptatives spécifiques (MEPN, 2007). Au Nord-Bénin, il y a deux zones avec des conditions moins favorables pour la production agricole (zone extrême Nord et zone Ouest Atacora) et deux zones avec des conditions favorables à la production (zone cotonnière du Nord-Bénin et zone vivrière du Sud Borgou) (van der Akker, 1998). Le Nord-Bénin étant la zone de prédilection de *Parkia biglobosa*, la présente étude a été effectuée dans la zone agro-écologique Ouest-Atacora (zone à conditions moins favorables pour la production agricole) et dans la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou (zone à conditions favorables à la production agricole).

La zone Ouest-Atacora est constituée des communes de Coby, Ouaké, Boukoubé, Tanguiéta, Matéri, Natitingou, Djougou, Toucountouna, Copargo. Cette zone bénéficie de la présence de la chaîne de l'Atacora qui lui confère un climat particulier où les températures sont plus fraîches et les orages plus fréquents que dans les autres zones. Les hauteurs de pluies varient de 800 à 1350 mm suivant l'année. Le principal cours d'eau est la Pendjari avec ses affluents.

La zone vivrière du Sud-Borgou est constituée des communes de N'Dali, Nikki, Kalalé, Sinendé, Péhunco, Bembèrèkè, Pèrèrè et Kouandé. Cette zone se caractérise essentiellement par une très grande disponibilité des terres agricoles, ce qui est un atout majeur pour la sécurité alimentaire.



C'est le domaine du climat soudanien humide marqué par une saison pluvieuse allant du mois d'Avril à Septembre et une saison sèche qui dure près de cinq mois.

La figure 1 présente les types de sols retrouvés dans les zones agro-écologiques Ouest-Atacora et vivrière du Sud-Borgou.

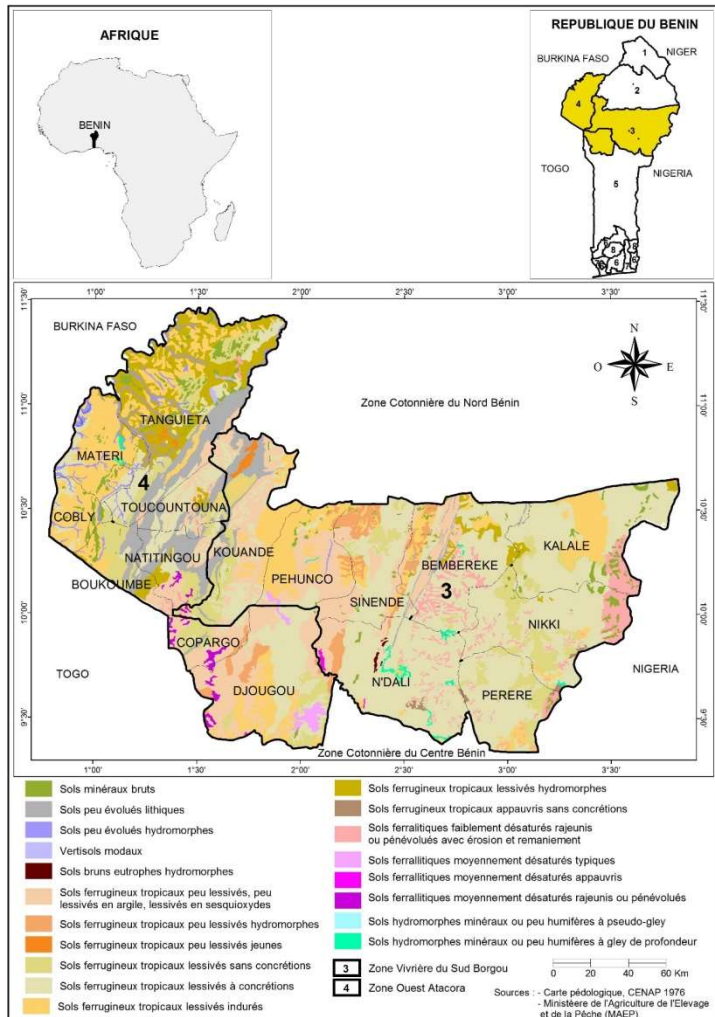


Figure 1 : Types de sols retrouvés dans les zones agro-écologiques Ouest-Atacora et vivrière du Sud-Borgou



1.2. Collecte des échantillons

La méthode utilisée pour identifier les sous-populations de *Parkia biglobosa* de la zone d'étude, a consisté en un premier temps au choix d'un certain nombre de peuplements de *Parkia biglobosa* les plus représentatifs de la zone d'étude, ceci en se basant sur les critères suivants : effectif assez élevé en pieds de néré [au moins 10 pieds de néré de diamètre à hauteur de poitrine (1,30 m du sol) supérieur ou égal à 10 cm] (Duplat et Perrote, 1981) et station accessible en toutes saisons (Frankie *et al.*, 1974 ; Ouédraogo, 1995). Dans les deux zones agro-écologiques Ouest-Atacora et vivrière du Sud-Borgou, des échantillons de jeunes feuilles ont été prélevés sur trente-six (36) arbres correspondant à 28 parcelles agroforestières. Ces parcelles agroforestières sont de formes et de superficies variables (entre 0,11 ha et 4 ha). Les coordonnées GPS de chaque arbre de *Parkia biglobosa* échantillonné ont été relevées.

1.3. Analyse génétique moléculaire au moyen des microsatellites nucléaires (SSRs)

1.3.1. Extraction et dosage d'ADN

L'analyse génétique moléculaire des accessions de *Parkia biglobosa* s'est déroulée au Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Analyse des Génomes (LGMAG) de l'Université d'Abomey – Calavi (UAC). L'extraction de l'ADN des échantillons de jeunes feuilles prélevées a été faite selon le protocole décrit par Gawel et Jarret (1991), modifié par Agbangla *et al.* (2002) et utilisant le MATAB (*Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide*) comme tampon de lyse.

En résumé, 0,2 g de feuilles de chaque échantillon a été prélevé et broyé dans un mortier en porcelaine avec 2 ml de tampon d'extraction Tris-EDTA-Sorbitol. Le broyat est recueilli dans un tube Eppendorf de 2 ml puis centrifugé à 10.000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est éliminé après centrifugation. Au culot sont ajoutés 750 µL du tampon de lyse MATAB (*Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide*) à 4 % préchauffé à 65 °C. L'ensemble est correctement homogénéisé puis mis au



bain-marie à 65 °C pendant 1 heure 30 minutes avec agitation douce par retournement inversion-réversion toutes les 10 minutes. Les échantillons sont après refroidis à la température ambiante et additionné chacun de 750 µL de Chloroforme Iso-Amyle Alcool (CIAA) 24:1. Le mélange est agité délicatement par retournement inversion-réversion pendant 2 minutes puis centrifugé à 10.000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C. Cette centrifugation a permis de séparer le mélange contenu dans chaque tube en trois phases. La phase supérieure aqueuse contenant l'ADN est récupérée et transvasée dans de nouveaux tubes Eppendorf. Un volume égal d'isopropanol très froid est ajouté au contenu de chaque nouveau tube. Le tout est mélangé délicatement afin de permettre la précipitation de l'ADN sous forme de pelote d'ADN. Après centrifugation, le surnageant est éliminé de façon délicate. 750 µL d'éthanol à 70° est ajouté à la pelote contenue dans chaque tube. Chaque tube est retourné afin de faire décoller la pelote du fond du tube. L'ensemble est ensuite centrifugé à 10.000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C. A la fin de la centrifugation, le surnageant est jeté et la pelote d'ADN purifié est séchée à l'air libre. La pelote sèche est reprise dans la Tris EDTA (TE).

Pour s'assurer du succès des opérations d'extraction d'ADN, des prélèvements de 2 µL d'ADN génomique extrait sont visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %. Cette électrophorèse permet d'évaluer la qualité et la concentration en ADN des extraits obtenus. Après cette vérification, les échantillons d'ADN extraits sont par la suite conservés au froid à -20 °C pour la suite des analyses.

1.3.2. Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Trois (03) marqueurs SSRs ciblés suite à l'étude en 2014, de la transférabilité de neuf (09) marqueurs microsatellites développés pour *Parkia panurensis* sur *P. biglobosa* ont été utilisés dans la présente étude (Koura *et al.*, 2019). Ces 3 marqueurs utilisés sont les marqueurs Parpan 4, Parpan 9 et Parpan 13. Le tableau 1 présente les caractéristiques (nom, séquences, motifs de base, taille, numéro d'identification) des trois (03) loci microsatellites nucléaires utilisés dans la présente étude.

**Tableau 1** : Caractéristiques des trois (03) microsattellites nucléaires utilisés dans la présente étude

Locus	Primer sequence (5' - 3')	Motifs de base	Taille (bp)	GenBank ID
Parpan 4	F : TAMRA-TTGATGGGAGTGGGAAAAAG R : CAGGAGGTGGTCTCTTCAGG	(GT) ₁₃ (GA) ₁₅	148-210	GU735074
Parpan 9	F : FAM-GGGGCTTGTGTCTCTCACTG R : ACTTTGAAGGCACGAGATGG	(AC) ₁₂	204-262	GU735076
Parpan 13	F : TAMRA-CCTCCCTCGCTTCACAATC R : CACATGCAAATGAAAATGGTG	(GT) ₁₇ TT(GT) ₈	86-194	GU735078



Dans un second temps, des dilutions des extraits d'ADN conservés ont été effectuées. Pour la réalisation des amplifications, le milieu réactionnel de 25 μL contenait 10 à 30 ng d'ADN, 1 X du tampon PCR (10 X), 0,2 μM de chaque marqueur (R et F), 0,2 mM de chaque dNTP, 2,0 mM de MgCl_2 , 1 Unité/ μL de Taq polymérase et 0,5 % de BSA (20 mg/ml) et de l'eau ultra pure. La PCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycler (PTC – 100™ Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc). Les conditions d'amplification sont celles proposées par Luettmann *et al.*, (2010). La PCR a démarré par une initiation à 95 °C pendant 5 minutes. Cette initiation a été suivie de 33 cycles composés chacun d'une dénaturation à 95 °C pendant 45 secondes, d'une hybridation des amorces suivant la température d'hybridation T^m de chaque couple d'amorces (T^m variant de 54 °C à 58,5 °C) pendant 45 secondes, d'une élongation à 72 °C pendant 40 secondes. Une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes met fin au programme. Un contrôle sur gel d'agarose à 2 % des produits PCR a été réalisé afin de vérifier la qualité de l'amplification.

1.4. Analyse statistique des données

Les bandes obtenues à chaque locus ont été enregistrées sous forme de compositions alléliques. L'absence ou la présence de bande est codée respectivement 0 et 1. Les données obtenues sont enregistrées dans une feuille Excel et constituent une matrice d'analyse, par utilisation du logiciel NTSYS version 2.11a (Rohlf, 2000).

Les paramètres de diversité intra-population et les paramètres de diversité inter-population ont été calculés.

1.4.1. Paramètres de diversité intra-populations

1.4.1.1. Taux de polymorphisme (P)

Il indique la proportion de loci polymorphes par rapport au nombre total de loci étudié. Il se calcule par la formule qui suit :

$$\text{Taux de polymorphisme} = \frac{\text{Marqueur polymorphe}}{\text{Nombre total de marqueurs}}$$

1.4.1.2. Nombre d'allèles par locus (A)



Ce nombre s'obtient, à partir du rapport du nombre total d'allèles sur le nombre de loci étudiés. Par ailleurs, le taux d'allèles rares, a été estimé sachant qu'un allèle est rare lorsque sa fréquence est inférieure à 0,05 soit 5 %.

1.4.1.3. Contenu en Information du polymorphisme (PIC)

Les valeurs du PIC sont calculées selon la formule : $PIC = 1 - \sum f_i^2$ avec f_i , la fréquence de chaque allèle. Les valeurs du PIC varient de 0 (locus monomorphe et non discriminant) à 1 (locus hautement discriminant, avec plusieurs allèles chacun en faible et égale fréquence).

1.4.1.4. Hétérozygotie

a- Taux d'hétérozygotie attendue (H_e)

L'hétérozygotie attendue pour chaque locus selon Nei (1987), se calcule grâce à la formule :

$$H_e = \frac{n}{n-1} (1 - \sum f_i^2)$$

avec f_i représentant, la fréquence de chaque allèle i au locus considéré et n le nombre d'accessions.

La diversité génétique moyenne par locus a été, ensuite déterminée par la formule :

$$\frac{1}{N} \sum H_e \text{ avec } N, \text{ le nombre de loci.}$$

b- Hétérozygotie observée (H_o)

L'hétérozygotie observée (H_o), indiquant la proportion des individus hétérozygotes observés à un locus dans l'ensemble de la population, sera calculée. Ainsi, pour chaque locus on aura :

$$H_o = \frac{\text{Nombre d'individus hétérozygotes}}{\text{Nombre total d'individus}}$$

En outre, la somme des H_o par locus sur le nombre total de loci, correspondant à l'hétérozygotie moyenne observée par locus, a été estimée.

1.4.1.5. Ecart à la panmixie (F)

L'écart entre la proportion d'individus trouvés à l'état hétérozygote (H_o) et le taux d'hétérozygotie attendue (H_e) est mesuré par le paramètre (F) appelé indice de fixation.

$$\text{On a : } F = (1 - H_o)/H_e.$$



L'indice de fixation est une mesure de l'écart à la structure de Hardy-Weinberg. Il varie de -1 à +1 et permet de connaître le déficit en hétérozygotes par population, par locus et pour l'ensemble des locus. F est positif quand la population présente un déficit en hétérozygotes par rapport à l'équilibre panmictique et négatif dans le cas contraire. Un certain nombre de facteurs contribuent à cet écart : consanguinité, homogamie, dérive, sélection, différenciation génétique locale, etc.

1.4.2. Paramètres de diversité inter-populations

1.4.2.1. Distances génétiques

Le degré de ressemblance ou de dissemblance génétique des populations est estimé par des distances génétiques. Elles sont une estimation des temps de séparation de différentes populations (Slatkin 1975).

1.4.2.2. Dendrogramme

Les distances sont calculées pour chaque couple de sous-populations. La matrice de distances ainsi obtenue peut être représentée sous forme de dendrogramme. Les sous-populations sont agrégées de telle sorte que les plus proches génétiquement soient aussi les plus proches sur le dendrogramme.

Ainsi, pour accéder à la structure au sein de la collection, un dendrogramme a été construit selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using the Arithmetic average) en suivant la procédure SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchical Nested method) du logiciel NTSYS version 2.11a (Rohlf, 2000). En plus, pour confirmer les possibles regroupements des accessions analysées, les procédures DCENTER et EIGEN de ce logiciel sont aussi utilisées pour réaliser une Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) en se basant sur la matrice de coordonnées génétiques afin de mieux apprécier la différenciation génétique entre les groupes obtenus.

2. RESULTATS



2.1. Diversité intra-populations

Le tableau 2 présente les paramètres de diversité intra-populations. Les trois (03) marqueurs microsatellites utilisés dans la présente étude ont tous amplifié et sont tous polymorphes donnant ainsi un taux de polymorphisme estimé à 100 %. Ces marqueurs polymorphes, ont permis de détecter douze (12) allèles avec un nombre moyen de 4 allèles par locus. Le nombre d'allèles varie de 3 à 5 allèles selon les loci.

Il ressort de l'analyse du tableau 2, que le marqueur le plus polymorphe est le marqueur Parpan 4 avec 5 allèles et le marqueur le moins polymorphe est le marqueur Parpan 13 avec 3 allèles.

Lorsqu'on considère l'ensemble des deux (2) zones d'étude, les allèles rares (fréquence < 5 %) représentent 16,67 % de l'ensemble, soit 2 allèles rares sur les 12. Lorsqu'on considère les deux (2) séparément, dans la zone agro-écologique Ouest-Atacora, il n'y a pas d'allèles rares alors qu'il y a un seul allèle rare dans la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou.

Dans chacune des deux zones agro-écologiques en étude, le marqueur Parpan 4 est le marqueur le plus discriminant avec un PIC de 0,67 dans la zone agro-écologique Ouest-Atacora et un PIC de 0,75 dans la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou. Le marqueur Parpan 9 est le moins discriminant (PIC = 0,48) dans la zone agro-écologique Ouest-Atacora tandis que le marqueur Parpan 13 (PIC = 0,50) est le moins discriminant dans la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou. Quand on considère l'ensemble des deux zones, le marqueur Parpan 4 est le plus discriminant (PIC = 0,73) tandis que le marqueur Parpan 13 est le moins discriminant (PIC = 0,62).

La diversité génétique de Nei (ou hétérozygotie attendue H_e) de l'ensemble de la collection, est de 0,66 et varie de 0,64 (pour le locus Parpan 13) à 0,67 (pour le locus Parpan 4). Elle est supérieure à 0,50 pour chacun des trois (3) loci aussi bien pour l'ensemble des deux zones d'étude que pour chacune des zones prises séparément.

Dans la zone agro-écologique Ouest-Atacora, le taux d'hétérozygotie observée (H_o) par locus, varie de 0,25 (pour le marqueur Parpan 9) à 0,68 (pour le marqueur Parpan 13). Dans la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou, le taux d'hétérozygotie observée (H_o) par locus, varie de 0,63 (pour le marqueur Parpan 4) à 0,87 (pour le marqueur Parpan 9). En considérant la valeur moyenne du taux



d'hétérozygotie observée (H_o), elle est plus élevée dans la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou (0,71) que dans la zone agro-écologique Ouest-Atacora.

Par ailleurs, par rapport à l'écart à la panmixie (F), F est supérieur à 0 (F positif) pour tous les trois (3) loci que ce soit pour l'ensemble des deux (2) zones ou que chaque zone soit prise séparément. Par déduction, les populations présentant de tels indices, connaissent un déficit en hétérozygotes par rapport à l'équilibre panmixique.

Tableau 2 : Synthèse des paramètres de diversité intra-populations

		Parpan 4	Parpan 9	Parpan 13	Moyenne
Nombre d'allèles		5,00	4,00	3,00	4,00
PIC	ZAEOA + ZAEVSB	0,73	0,64	0,62	0,66
	ZAEOA	0,67	0,48	0,62	0,59
	ZAEVSB	0,75	0,68	0,50	0,65
He	ZAEOA + ZAEVSB	0,67	0,66	0,64	0,66
	ZAEOA	0,71	0,51	0,65	0,62
	ZAEVSB	0,80	0,73	0,53	0,69
Ho	ZAEOA + ZAEVSB	0,43	0,46	0,59	0,49
	ZAEOA	0,35	0,25	0,68	0,43
	ZAEVSB	0,63	0,87	0,64	0,71
F	ZAEOA + ZAEVSB	0,85	0,81	0,64	0,77
	ZAEOA	0,91	1,47	0,49	0,96
	ZAEVSB	0,47	0,18	0,67	0,44

ZAEOA : Zone Agro-écologique Ouest-Atacora

ZAEVSB : Zone Agro-écologique Vivrière du Sud-Borgou

2.2. Diversité inter-populations

Le dendrogramme (figure 2) obtenu par l'analyse UPGMA, méthode de SAHN a permis de montrer le niveau de diversité génétique des accessions collectées. Les distances génétiques ont permis de construire ce dendrogramme. La distance génétique la plus faible est 0 tandis que la



distance génétique la plus élevée est 1,61. La plus grande distance génétique (1,61) est observée entre trois accessions (SINP1A10, SINP2A3, SANKP1A4) provenant de la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou et une accession (MP3A1) provenant de la zone agro-écologique Ouest-Atacora. Cette grande distance génétique (1,61) est également notée entre deux accessions (SANKP2A1 et SINP1A10) provenant de la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou. Le dendrogramme construit à partir des 12 allèles générés par les trois (3) loci polymorphes, a permis de classer les trente-six (36) accessions, en trois groupes nommés groupe 1, groupe 2 et groupe 3.

Le groupe 1 renferme vingt-cinq (25) individus au total. Soixante-quatre pour cent (64 %) des individus du groupe 1, sont de la zone agro-écologique Ouest-Atacora (zone à conditions moins favorables pour la production agricole) alors que 34 % de ces individus sont de la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou (zone à conditions favorables à la production agricole).

Le groupe 2, quant à lui, est constitué des cinq (5) individus avec 20 % appartenant à la zone agro-écologique Ouest-Atacora et 80 % à la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou.

Enfin, le groupe 3 comporte six (6) individus. Ce groupe dispose de 50 % d'individus de la zone agro-écologique Ouest-Atacora et 50 % de la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou.

Cette classification des trente-six (36) accessions en trois groupes est globalement confirmée par l'Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) (figure 3) avec l'accession GUESP2A1 du groupe 2, mal classée et les accessions KOUAP1A10 et KOUAP2A9 du groupe 3 également mal classées. Les deux premiers axes expriment 86,68 % de la diversité génétique avec 56,41 % pour l'axe 1 et 30,27 % pour l'axe 2.

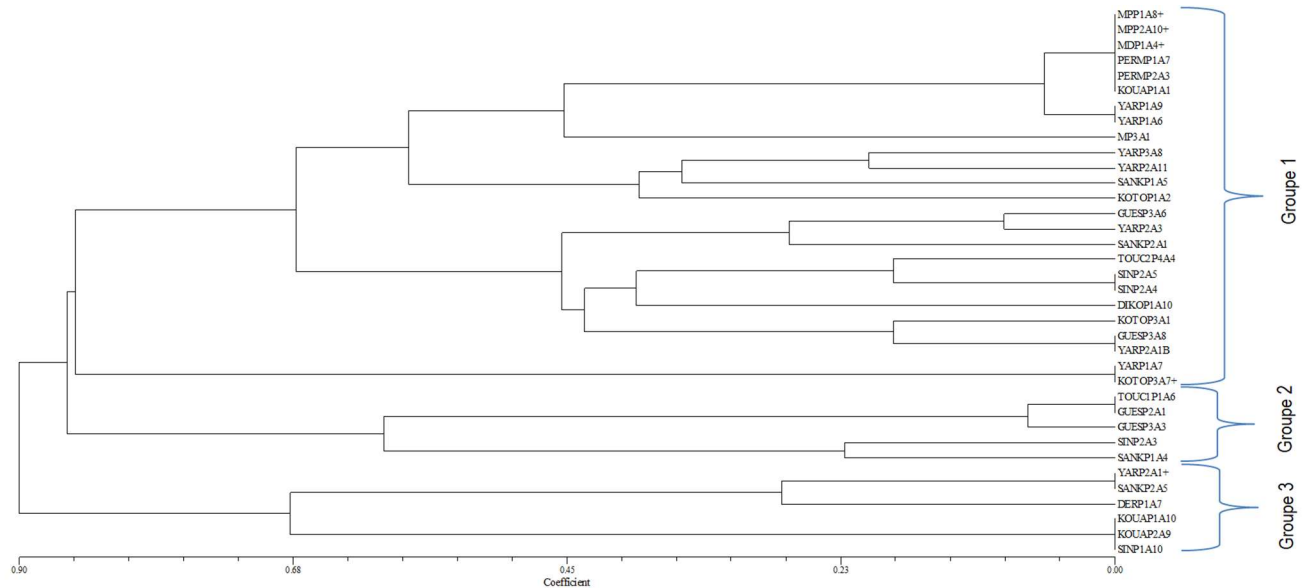


Figure 2 : Dendrogramme montrant les relations génétiques entre les accessions de *Parkia biglobosa* de la zone agro-écologique Ouest-Atacora et de la zone agro-écologique vivrière du Sud-Borgou par analyse UPGMA, méthode SAHN utilisant le coefficient de Nei (1972)

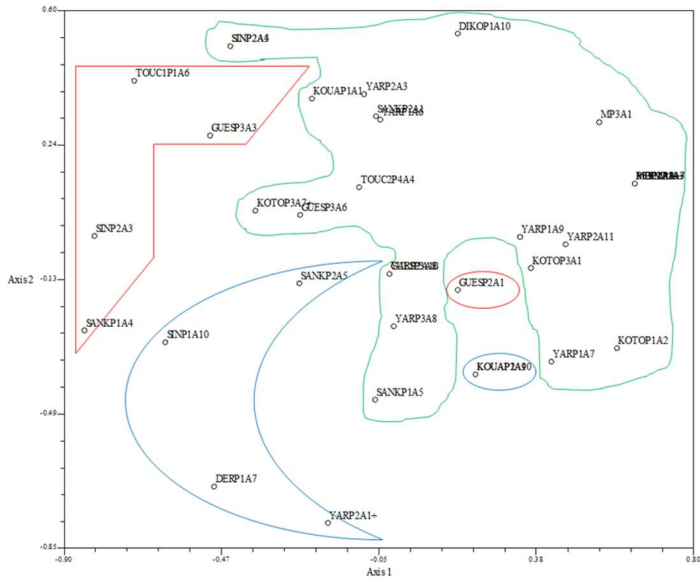


Figure 3 : Diagramme d'Analyse en Coordonnées Principales (PCoA)

3. DISCUSSION

Les trois (3) marqueurs SSRs utilisés dans la présente étude ont été ciblés suite à l'étude de la transférabilité de 9 marqueurs microsatellites développés pour *Parkia panurensis* sur *Parkia biglobosa* (Koura, 2019). En effet, le potentiel de transfert de neuf loci microsatellites nucléaires révélés polymorphes chez l'espèce *Parkia panurensis* (Luettmann *et al.*, 2010) a été testé chez l'espèce *Parkia biglobosa* (Koura, 2019). Les trois (03) loci microsatellites les plus polymorphes étaient Parpan 4, Parpan 9 et Parpan 13. Ils ont été utilisés dans la présente étude pour caractériser la diversité génétique de *Parkia biglobosa*.

La diversité allélique (nombre moyen de 4 allèles par locus) obtenue dans la présente étude est pratiquement semblable à celle (4,13) obtenue par Sina en 2006 lorsqu'il analysait des graines issues de fécondation libre, récoltées sur 1658 arbres provenant de 64 populations naturelles réparties à travers 11 pays d'Afrique de l'Ouest et du Centre,



élucidant ainsi le déterminisme génétique de cinq systèmes enzymatiques codés par 8 locus polymorphes comportant 33 allèles. Cette similitude est dû au nombre faible de marqueurs utilisés ici car l'utilisation des marqueurs SSRs (marqueurs génétiques moléculaires) devrait révéler une plus grande diversité intra et inter populations par rapport à l'utilisation par Sina (2006) des marqueurs biochimiques. De plus, ici, la migration des amplifiats a été faite par une électrophorèse sur gel d'agarose, parce que le gel de polyacrylamide dénaturant à 5 % commandé n'étant pas encore livré par le fournisseur.

La diversité génétique de Nei (ou hétérozygotie attendue H_e) de l'ensemble de la collection est supérieure à 0,50, ce qui témoigne d'une variabilité non négligeable entre les accessions. Ouédraogo (1995) a signalé une grande variation de *Parkia biglobosa* entre les provenances ouest africaines en termes d'adaptabilité et de morphologie, variation attribuée à plusieurs facteurs, parmi lesquels sont la génétique et les facteurs environnementaux qui influencent les différentes zones agro-écologiques. L'étendue de l'aire de répartition et la densité des populations peuvent aussi expliquer le niveau élevé de diversité génétique (Rivera - Ocasio *et al.*, 2002).

CONCLUSION

Il existe une diversité intra et inter populations des individus de *P. biglobosa* des zones agro-écologiques Ouest-Atacora et vivrière du Sud-Borgou. Une étude basée sur l'utilisation d'un nombre plus élevé de SSRs spécifiques de l'espèce s'avère nécessaire dans ces zones pour mieux appréhender la diversité des ressources de l'espèce. Il faudra alors veiller à réaliser la migration des produits d'amplification par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant à 5 %.

CONFLITS D'INTERETS

Les auteurs déclarent unanimement l'originalité de ce travail.

REMERCIEMENTS

Sincères remerciements à la Fondation Internationale pour la Science (FIS) pour le financement de ce travail. Merci aussi à toute l'équipe du Laboratoire des Sciences Forestières (LSF) et du Laboratoire de Génétique



Moléculaire et d'Analyse des Génomes (LGMAG) pour tous les apports qui ont permis la concrétisation de ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Agbangla C, Ahanhanzo C, Tostain S, Dansi A, Daïnou O. 2002. Evaluation de la diversité génétique par RAPD d'un échantillon de *Dioscorea alata* d'une région du Bénin, la sous-préfecture de Savè. *J. Rech. Sci. Uni. Lomé (Togo)* 6 :197-202.
2. Amusa O, Adenubi A, Adeboyo O, Ojobo O, Olumayowa O, Solomon O, Taiwo O. 2014. Caractérisation moléculaire de *P. biglobosa* dans différentes zones agro-économiques du Nigéria au moyen des RAPD (Research article)
3. Duplat P, Perrote G. 1981. Inventaire et estimation de l'accroissement des peuplements forestiers. Office National des Forêts. Section technique, 432 p.
4. FAO 2010. Le deuxième rapport sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde. Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Rome, 403 p.
5. Frankie GW, Baker HG, Opler PA. 1974. Tropical Plant Phenology: Applications for study in community ecology. In: Lieth H, ed. Phenology and seasonality modeling. Springer-Verlag, Berlin: 287-296.
6. Gawel NJ, Jarret RL. 1991. A modified CTAB in MATAB: DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. *Plant. Mol. Rep.* 9: 262-266.
7. Hall JB, Thomlinson HF, Oni PI, Buchy M & Aebischer DP. 1997. A monograph of *Parkia biglobosa*. School of Agricultural and Forest Sciences Publication N°9, Bangor, University of Wales, 107 p.
8. Koura K, Mbaidé Y, Ganglo JC. 2013. Caractéristiques phénotypique et structurale de la population de *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. du Nord-Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7(6), 2317-2327.
9. Koura K, Missihoun AA, Sedah P, Adoukonou-Sagbadja H, Agbangla C, Ahanhanzo C, Ganglo JC. 2019. Transferability of some nuclear microsatellite (SSRs) markers from related species in *Parkia biglobosa*. *Journal of Plant Sciences* 7(5): 125-130



10. Luettmann K, Michalczyk IM, Mengel C, Ziegenhagen B, Heymann EW, Saboya PPP, Bialozyt R. 2010. Characterization of nuclear microsatellite loci in the neotropical tree *Parkia panurensis* (Fabaceae). American Journal of Botany, 34-36.
11. MDR. 1998. Annuaire Statistique. Campagne 1997-1998. Tome 1 : Production végétale. Cotonou, Bénin.
12. MEPN. 2007. Programme d'Action Nationale d'Adaptation aux changements climatiques (PANA-BENIN). Draft, 81 p.
13. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292.
14. Ouédraogo AS. 1995. *Parkia biglobosa* (Leguminosae) en Afrique de l'Ouest : biosystématique et amélioration. Thèse de Doctorat. Université Agronomique de Wageningen, Institute for Forestry and Nature Research, IBNDLO, Wageningen, Netherlands, 205 p.
15. Rivera-Ocasio E, Aide MT, McMillan WO. 2002. Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. Molecular Ecology 11: 675-683.
16. Rohlf, FJ. 2000: NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, vs 2.11a. Exeter Publication, New York, USA.
17. Santoni S, Faivre-Rampant P, Prado E, Prat D. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cah Agric.* 9: 311-327.
18. Sina S. 2006. Reproduction et diversité génétique chez *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. PhD thesis Wageningen University, 102 p.
19. Slatkin M. 1975. The influence of Gene flow on Genetic Distance. The American Naturalist 109: 597-601.
20. Van der Akker E. 1998. Les cultures principales et leur distribution régionale au Bénin. Department of agricultural Economics in the Tropics and Subtropics (490B), University of Hohenheim, Germany. https://projekte.uni-hohenheim.de/atlas308/c_benin/projects/c3_2/html/french/bfra_tex_fr_c3_2.htm