### **UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE

#### L'ENVIRONNEMENT

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2013

 $N^{\circ}$  d'ordre : 33



### THESE DE DOCTORAT

Mention : Biologie, Productions et Pathologies Animales

Spécialité : Génétique des Populations

présentée par :

### **Khadim KEBE**

Diversité génétique, histoire évolutive et bioécologie de Callosobruchus maculatus F. (Coleoptera, Bruchinae) ravageur de graines de niébé (Vigna unguiculata Walp)

Soutenue publiquement le 29 Janvier 2013

#### JURY

M. Bhen Sikina TOGUEBAYE Professeur U.C.A.D. Dakar **Président M. Laurent GRANJON** Directeur de Recherche, I.R.D **Rapporteur** Mme. Anahí ESPINDOLA SNSF Researcher U.Idaho.USA **Rapporteur** M. Karamoko DIARRA Professeur U.C.A.D. Dakar Examinateur Mme. Mame Ourève SY Maître de Conférences U.C.A.D. Dakar **Examinateur** M. Mbacké SEMBENE Professeur U.C.A.D. Dakar Directeur de thèse **M. Nadir ALVAREZ** Professeur Assistant UniL. Suisse Co-directeur de thèse

## **NOTE AUX LECTEURS**

Ce document a été numérisé et mis en ligne par la Bibliothèque Centrale de l'Université Cheikh Anta DIOP de DAKAR





**Bibliothèque Centrale UCAD** 

<u>Site Web</u>: www.bu.ucad.sn <u>Mail</u>: bu@ucad.edu.sn <u>Tél</u>: +221 33 824 69 81 BP 2006, Dakar Fann - Sénégal

#### Nom et prénom du Candidat : KEBE Khadim

Titre de la thèse : Diversité génétique, histoire évolutive et bioécologie de *Callosobruchus maculatus*F (Coleoptera Bruchinae) ravageur de graine de niébé (*Vigna unguiculata* Walp)Date et lieu de soutenance : 29 Janvier 2013 à l'UCAD de Dakar

Jury : Président : Bhen Sikina TOGUEBAYE Membres : Laurent GRANJON Anahí ESPINDOLA Karamoko DIARRA Mame Ourèye SY Mbacké SEMBENE

Nadir

#### **Résumé** :

Si plusieurs actions de lutte ont été déployées contre les insectes ravageurs, peu d'entre elles ont donné des résultats satisfaisants, probablement en raison d'une connaissance insuffisante de la biologie évolutive des espèces et de leur environnement. En combinant des approches écologique et génétique, il est aujourd'hui possible de mieux comprendre la biologie de ces ravageurs, ce qui *in fine* permettra d'optimiser leur gestion et de préserver les denrées alimentaires.

**ALVAREZ** 

*Callosobruchus maculatus* est une espèce cosmopolite de bruche (Coleoptera : Bruchinae) qui s'est adaptée à plusieurs plantes-hôtes d'importance économique, notamment les légumineuses. Comme la plupart des bruches, elle comporte un stade larvaire obligatoire à l'intérieur des graines, ce qui fait de cette espèce un ravageur d'importance mondiale dans les greniers à graine. Bien que plusieurs études aient été consacrées à *C. maculatus*, peu d'entre elles ont pris en compte la dimension génétique.

Le présent travail examine deux facettes majeures de la biologie de cette espèce à savoir sa structuration génétique spatiale et ses aspects bioécologiques. Dans un premier temps, la structuration génétique de ses populations ouest-africaines a été étudiée, *via* les informations obtenues au séquençage de deux marqueurs moléculaires, CytB et 28S. Les résultats montrent que les populations ouest-africaines de *C. maculatus* forment une unité génétique homogène à l'exception de quelques populations provenant du Togo. Ce fort flux de gènes en Afrique de l'ouest est probablement expliqué par une dispersion associée à l'action humaine, suite aux échanges importants de graines de niébé entre les localités, notamment entre pays du *Comité permanent Inter-Etats de Lutte contre la Sécheresse dans le Sahel*. Les populations différenciées du Togo pourraient s'expliquer par le fait que le Togo ne participe pas à ce comité. Les approches de la phylogénie classique associées aux théories de la coalescence ont ensuite été appliquées sur quatre gènes, CytB, COI, COII et ITS1, pour inférer l'histoire évolutive de *C. maculatus* dans le monde. Cette étude a permis d'identifier une forte différenciation génétique au sein des populations africaines et américaines, alors qu'en Asie cette différenciation est moins prononcée. L'ancêtre commun le plus récent de *Callosobruchus maculatus* a

été retrouvé en Afrique et sa répartition mondiale est expliquée par cinq évènements de dispersion dont quatre se sont déroulés de l'Afrique vers les autres continents, indiquant que l'Afrique représente probablement son centre de dispersion. L'analyse de l'histoire démographique montre une expansion, aussi bien dans la population mondiale considérée comme un tout, que dans le sous-échantillon composé des populations africaines. En revanche, cette expansion est modérée en Asie. L'expansion démographique mise en évidence ici semble être intervenue au cours de l'Holocène, après la domestication des légumineuses et est probablement liée à l'expansion de sa principale plante-hôte, le niébé, suggérant une co-expansion entre ces deux espèces.

Une approche bioécologique (field test) a permis afin d'apporter des informations supplémentaires sur la connaissance des mécanismes d'infestation du niébé par *C. maculatus*. Ces résultats montrent que *C. maculatus* interagissait avec une autre espèce de bruche dans le nord du bassin arachidier sénégalais et que leur taux d'infestation des graines de niébé au champ est fonction des lieux de stockage mais aussi des variétés de niébé.

**Mots clés** : *Callosobruchus maculatus*, Bruchinae, insecte ravageur, structuration génétique, flux de gènes, histoire évolutive, différentiation génétique, expansion démographique, bioécologie.

#### Last and first name of the Candidate: KEBE Khadim

**Title of the thesis**: Genetic diversity, evolutionary history and bioecology of *Callosobruchus maculatus* F (Coleoptera Bruchinae) pest of cowpea (*Vigna unguiculata* Walp) seeds.

Date and place of defense: January 29, 2013, UCAD-Dakar

Jury:	President:	Bhen Sikina	TOGUEBAYE
	Members:	Laurent	GRANJON
		Anahí	ESPINDOLA
		Karamoko	DIARRA
		Mame Ourèye	SY
		Mbacké	SEMBENE
		Nadir	ALVAREZ

#### Abstract:

If many strategies were used to fight against insects pest, few of them have provided satisfactory results, probably due to insufficient knowledge of the evolutionary biology of the species and their interaction with the environment. By combining ecological and genetic approaches, it is now possible to better understand the biology of these pests, which ultimately will optimize management, and to preserve food.

*Callosobruchus maculatus* is a cosmopolitan species of beetle (Coleoptera: Bruchinae) that is adapted to several host plants of economic importance, especially legumes. As most bruchids, it has an obligatory larval state within the seeds of legumes, which makes this species a worldwide well-known devastating pest in seed storage. Although several studies have been devoted to *C. maculatus*, few of them took into account the genetic aspect.

This work examines two major aspects of the biology of this species, *i.e.* its spatial genetic structure and bioecology. The genetic structure of its West-African populations was studied, *via* informations obtained from sequencing of two molecular markers, CytB and 28S. The results show that the West-African populations of *C. maculatus* form a homogeneous genetic unit except some populations from Togo. This high gene flow in West Africa is probably explained by dispersal associated with human activity, after the important exchanges of cowpea seeds between localities, especially among countries of the *Permanent Interstate Committee for drought control in the Sahel*. The differentiated populations from Togo might be explained by the fact that Togo is not a member of this committee. Approach of classical phylogeny associated to the theory of coalescence were then applied to four genes, CytB, COI, COII and ITS1, in order to infer the evolutionary history of *C. maculatus* around the world. This study identified a strong genetic differentiation within the African and American populations, whereas in Asia this differentiation was less important. The most recent common ancestor of *Callosobruchus maculatus* was found to be established in Africa and its global distribution is explained by five inter-continental dispersal events with four dispersions occurring from

Africa to other continents, pointing out that Africa is also the center of dispersal. The analysis of the demographic history shows an expansion, in the world population considered as a whole, as well as in the sub-sample which is composed of the African populations. In contrast, expansion is moderate in Asia. Population expansion highlighted here seems to have occurred during the Holocene, after the domestication of legumes and is probably related to the expansion of its principal host, cowpea, suggesting a co-expansion between these two species.

Finally, a bioecological approach (field test) provided additional information on the understanding of the mechanisms of cowpea infestation by *C. maculatus*. These results show that *C. maculatus* is interacting with another cowpea beetle species, *i.e.*, *Bruchidius atrolineatus* in the north Senegalese groundnut basin and that their rate of infesting seeds of cowpea in the fields depend not only on the stocking places but also on the cowpea varieties.

**Keywords**: *Callosobruchus maculatus*, Bruchinae, insect pest, genetic structure, gene flow, evolutionary history, genetic differentiation, demographic expansion, bioecology.

Avec l'aide de Dieu, le tout puissant, j'ai pu achever ce travail Que je dédie :

> A mon père Amar KEBE, quí nous a quíttés très tôt. Que la terre luí soít légère.

> A ma mère Soda KEBE, à ma tante Ndíaya KEBE, à mon oncle Mbacké KEBE.

A toute ma famílle.

Sant Serigne Touba rék, Begue Serigne Touba rék, fonkou Serigne Touba rék, wolou Serigne Touba rék, yakar Serigne Touba rék

#### Remerciements

La thèse c'est presque une vie en soit, c'est en tout cas une tranche de vie. Il y a des moments où le temps semble s'écouler au ralenti et d'autres où tout bouge, tout change, tout se chamboule ou même s'écroule. Cette tranche de vie fut de ceux-ci. Elle fut marquée d'évènements majeurs dans ma vie. Qu'ils furent heureux ou malheureux chacun d'entre vous y a assisté ou participé. Au cours de mes années de recherche doctorale, j'ai pu expérimenter différentes gammes de sentiments. Si le désespoir, le découragement et des doutes ont parfois eu raison de moi, cette partie de ma vie a surtout été dominée par de l'espoir et de l'enthousiasme. Cependant, s'il y a un sentiment qui domine tout au long de mon parcours doctoral, c'est le bonheur. Le bonheur d'avoir partagé cette tranche de ma vie avec vous.

Les remerciements, c'est le chapitre le plus personnel, donc le plus difficile, non n'exagérons pas, disons plutôt le plus délicat. En effet, mon souci majeur est de n'oublier personne. C'est un devoir pour moi de remercier tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de cette thèse. Malgré la longue liste et les forts sentiments, je ferai de mon mieux, cependant, l'exhaustivité est impossible.

Mes plus vifs et sincères remerciements vont à mes deux directeurs de thèse, les Professeurs Mbacké Sembène et Nadir Alvarez, à qui je dois, c'est certain, beaucoup plus qu'il n'est commun de devoir à ses directeurs de thèse. Tant du point de vue scientifique, qu'humain, j'ai vraiment apprécié de travailler avec vous durant ces années. Votre dévouement pour le travail bien fait, votre rigueur scientifique, votre esprit d'organisation m'ont été très précieux dans la réalisation de cette thèse. Merci également pour votre générosité et votre disponibilité. Je remercie le Pr Mbacké Sembène en particulier pour sa patience, pour m'avoir laissé partir autant de temps d'abord en France puis en Suisse, mais aussi d'avoir été le déclencheur de mon entrée dans la recherche. C'est avec un grand plaisir que je lui exprime ici ma profonde gratitude. Je remercie le Pr Nadir Alvarez spécialement pour m'avoir toujours poussé vers l'avant au jour le jour et pour avoir facilité mon séjour à Lausanne et de s'être toujours préoccupé de me mettre dans de bonne conditions de travail. Son soutien amical a par ailleurs participé au bon déroulement de mon séjour lausannois. Il m'est très agréable de pouvoir lui exprimer mes remerciements les plus sincères.

J'ai eu la chance de côtoyer une personne dont l'expérience m'a permis d'élargir mes connaissances et d'améliorer mon travail. Sa gentillesse et son intérêt m'ont été d'un grand secours pour ce parcours initiatique à la recherche. Merci Anahí Espíndola pour avoir illuminé mon chemin en analyse de données génétiques. Merci pour ta patience, surtout quand je débarquais toutes les 15 min dans ton bureau pour une question. Je te remercie aussi pour avoir accepté d'endosser l'important rôle de rapporteur.

Ce manuscrit comporte trois chapitres expérimentaux. Le premier a été réalisé à l'Institut des Sciences de l'Evolution de l'Université de Montpellier II (ISEM). Je tiens à remercier du fond du cœur à Isabelle Olivieri de m'y avoir accueilli et donné les moyens afin de mener mon travail dans des conditions optimales. Merci beaucoup pour tes nombreuses relectures et commentaires fructueux. Un grand merci à Fabienne Justy pour sa collaboration au laboratoire de biologie moléculaire et aussi pour

sa bonne humeur. Merci à Agnès Mignot, Jeanne Tonnabel et Lucie, mes collègues de bureau, à Eric Imbert pour m'avoir initié au logiciel R, et aussi les parties de football. Je remercie tous les membres de l'ISEM sans oublier personne.

Le deuxième chapitre de cette thèse s'est déroulé dans le Département d'Ecologie et d'Evolution (DEE) de l'Université de Lausanne. Je remercie Patrice Pfauti, Tomasz Suchan, Nils Arrigo, Marylaure de la Harpe, Alexis Reding, mes autres collègues du groupe Alvarez. Merci John Pannell et Anne-Marie Labouche pour m'avoir fait connaitre et aimer *Silene latifolia* et *Mercurialis annua*, ainsi que nos fructueux échanges scientifiques. J'adresse mes sincères remerciements à Jérôme Goudet pour son appui lors de ma demande de prolongation de bourse de la Confédération Suisse, à Philippe Christe pour m'avoir donné l'occasion de faire des activités complémentaires d'enseignement et de recherche en 1<sup>ère</sup> année de Bachelor de la Faculté de Biologie et de Médecine, une expérience enrichissante, à Nicolas Salamin et l'ensemble de son groupe, Kana Yamada, Glenn Litsios, Martha Serrano, Charlotte Ndiribe.... Un grand merci à mes collègues mais aussi coéquipiers au sein de l'équipe de football du DEE, Alex, Auré, Roberto, Romain ainsi que tous les autres joueurs de l'équipe, championne du tournoi de biologie et de médecine 2012. Un grand merci à Nicolas Alcala, à Aurélie Babin, à Marie Voillemot, à Ivan Mateus Gonzales, à tous ceux que j'ai croisés à la *Cafet* soit pour le déjeuner ou un petit café pour se rafraichir la mémoire, ainsi qu'à tous les membres du DEE.

Le troisième chapitre s'est déroulé dans le Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP) de l'IRD de Bel Air. Je remercie cordialement son directeur Laurent Granjon, pour sa disponibilité, son aide, ses commentaires fructueux sur ce manuscrit et surtout d'accepter d'en être rapporteur. Je remercie tout le personnel du Labo: Mamadou Kane, Nathalie Sarr, Alioune Sow, Khalilou Ba, Mamoudou Diallo, ainsi que les stagiaires Assane Ndong, Toffène Diome, Arame Ndiaye, Fatima Mbaye. Les qualités de votre collaboration ont sans nul doute des effets bénéfiques sur le manuscrit.

Ma reconnaissance et ma gratitude vont au Professeur Bhen Sikina Toguebaye qui a accepté non seulement de siéger dans mon jury mais aussi de le présider, au Professeur Karamoko Diarra et au Docteur Mame Ourèye Sy pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à mes collègues et amis Cheikh Thiaw, Rokhaya Sall Dramé, Massamba Thiam, Sabelle Guèye, Pape Mactar Dramé, Abdoulaye Badiane. Vous avez fait preuve de bonne collaboration.

Merci à l'ensemble des personnes qui ont contribué à l'obtention des indispensables échantillons biologiques : Abdellah Kellouche, Goran Arnqvist, Antoine Sanon, Carlos Peres, Katia Fernades, Midori Tuda, Charles Fox, Guillaume Ketoh. Un grand merci aux populations des villages de Gadafé, Gade Kébé, Kandala Mbengue et Mérina.

Merci au Département Soutien et Formation (DSF) de l'IRD à travers la Jeune Equipe Associée à l'IRD «BRAS», au Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'ambassade de France et à la Confédération Suisse pour leur participation financière à la réalisation de cette thèse.

Je ne saurai terminer sans remercier les sénégalais de Lausanne grâce à qui, je n'ai jamais eu le temps de m'ennuyer, surtout lors de nos entrainements les samedis ou dimanches, au parc de Milan et les tournois de foot, soit au centre sportif de Dorigny ou au terrain de Blecherette. Une mention spéciale est décernée à toute la famille Kane et à Fallou Gningue.

Eh oui, je n'oublie pas bien sûr mes collègues de l'Université avec qui j'ai interagis de 2006 à 2010 dans les travaux pratiques de Physiologie Animale.

Ce travail n'aurai jamais vu le jour sans les sacrifices continus, l'apport moral et matériel, ainsi que l'amour éternel de ma famille. J'exprime ma gratitude à tous, et leur remercie du fond du cœur. Si je suis là c'est parce que vous m'avez toujours épaulé. Que nous restions indivis et que la paix, la complicité et surtout l'entente règnent toujours entre nous. Mes remerciements vont aussi à Serigne Moustapha Mbacké et à Serigne Cheikh Wade.

Un grand merci à Vanessa et je fais un grand *COUCOU* à la petite Adélie. Je termine en adressant mes remerciements à tous mes camarades de promotion, à mes amis, à tous ceux qui, à un titre ou à un autre, m'ont un jour aidé dans la vie, à toutes les personnes qui prendront le temps de lire cette thèse.

## Table des matières

Résumé	1
Abstract:	iii
Remerciements	vi
Table des matières	ix
Introduction Générale	1
Chapitre I: Présentation du modèle d'étude: Callosobruchus maculatus	6
I. 1. Position systématique	7
I. 2. Description morphologique	7
I. 3. Biologie de la reproduction	8
I. 3. 1. L'œuf	9
I. 3. 2. La larve	9
I. 3. 3. La nymphe	10
I. 3. 4. L'imago ou adulte	10
I. 4. Distribution, écologie et importance économique	11
I. 5. Ennemis naturels de Callosobruchus maculatus	14
I. 6. Apport de la génétique sur la connaissance des insectes d'intérêt économique	15
Chapitre II : Structuration génétique des populations ouest africaines de Callosobruc	chus
maculatus	
<i>maculatus</i> II. 1. Matériels et méthodes	<b>18</b>
<i>maculatus</i> II. 1. Matériels et méthodes II. 1. 1. Echantillonnage	<b>18</b> 20 20
<i>maculatus</i> II. 1. Matériels et méthodes II. 1. 1. Echantillonnage II. 1. 2. Analyse de l'ADN	
<ul> <li><i>maculatus</i></li> <li>II. 1. Matériels et méthodes</li> <li>II. 1. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique</li> </ul>	
<ul> <li><i>maculatus</i>.</li> <li>II. 1. Matériels et méthodes.</li> <li>II. 1. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique</li> <li>II. 2. Résultats</li> </ul>	<b>18</b> 20 20 21 24 24
<ul> <li><i>maculatus</i>.</li> <li>II. 1. Matériels et méthodes.</li> <li>II. 1. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. 1. Diversité génétique.</li> </ul>	<b>18</b> 20 20 21 24 26 26
<ul> <li><i>maculatus</i>.</li> <li>II. 1. Matériels et méthodes.</li> <li>II. 1. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. 1. Diversité génétique</li> <li>II. 2. 2. Structure génétique des populations.</li> </ul>	<b>18</b> 20 20 21 24 26 26 29
<ul> <li><i>maculatus</i></li> <li>II. 1. Matériels et méthodes.</li> <li>II. 1. 1. Echantillonnage .</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN .</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique .</li> <li>II. 2. Résultats .</li> <li>II. 2. 1. Diversité génétique .</li> <li>II. 2. 2. Structure génétique des populations .</li> <li>II. 2. 3. Analyses phylogénétiques .</li> </ul>	<b>18</b> 20 20 21 24 24 26 26 26 29 31
<ul> <li><i>maculatus</i>.</li> <li>II. 1. Matériels et méthodes.</li> <li>II. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. 1. Diversité génétique</li> <li>II. 2. 2. Structure génétique des populations</li> <li>II. 2. 3. Analyses phylogénétiques</li> <li>II. 2. 4. Expansion démographique</li> </ul>	18
<ul> <li><i>maculatus</i></li> <li>II. 1. Matériels et méthodes</li> <li>II. 1. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. 1. Diversité génétique</li> <li>II. 2. 2. Structure génétique des populations</li> <li>II. 2. 3. Analyses phylogénétiques</li> <li>II. 2. 4. Expansion démographique</li> <li>II. 3. Discussion</li> </ul>	18
<ul> <li><i>maculatus</i>.</li> <li>II. 1. Matériels et méthodes.</li> <li>II. 1. 1. Echantillonnage .</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN.</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique .</li> <li>II. 2. Résultats .</li> <li>II. 2. Résultats .</li> <li>II. 2. 1. Diversité génétique des populations .</li> <li>II. 2. 3. Analyses phylogénétiques .</li> <li>II. 2. 4. Expansion démographique .</li> <li>II. 3. Discussion .</li> </ul>	18
<ul> <li><i>maculatus</i></li> <li>II. 1. Matériels et méthodes.</li> <li>II. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. 1. Diversité génétique</li> <li>II. 2. 2. Structure génétique des populations</li> <li>II. 2. 3. Analyses phylogénétiques</li> <li>II. 2. 4. Expansion démographique</li> <li>II. 3. Discussion</li> <li>Chapitre III : Phylogéographie mondiale des populations de <i>Callosobruchus maculat</i></li> <li>III. 1. Matériel et méthodes</li> </ul>	18
<ul> <li><i>maculatus</i></li> <li>II. 1. Matériels et méthodes</li> <li>II. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. 1. Diversité génétique des populations</li> <li>II. 2. 2. Structure génétique des populations</li> <li>II. 2. 3. Analyses phylogénétiques</li> <li>II. 2. 4. Expansion démographique</li> <li>II. 3. Discussion</li> <li>Chapitre III : Phylogéographie mondiale des populations de <i>Callosobruchus maculat</i></li> <li>III. 1. Matériel et méthodes</li> <li>III. 1.1. Echantillonnage</li> </ul>	18
<ul> <li><i>maculatus</i></li> <li>II. 1. Matériels et méthodes</li> <li>II. 1. Echantillonnage</li> <li>II. 1. 2. Analyse de l'ADN</li> <li>II. 1. 3. Analyse génétique</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. Résultats</li> <li>II. 2. 1. Diversité génétique des populations</li> <li>II. 2. 2. Structure génétique des populations</li> <li>II. 2. 3. Analyses phylogénétiques</li> <li>II. 2. 4. Expansion démographique</li> <li>II. 3. Discussion</li> <li>Chapitre III : Phylogéographie mondiale des populations de <i>Callosobruchus maculat</i>.</li> <li>III. 1. Matériel et méthodes</li> <li>III. 1. 2. Extraction d'ADN, amplification et séquençage</li></ul>	18

III. 1. 4. Analyses phylogénétiques	42
III. 1. 5. Analyses biogéographiques	43
III. 1. 6. Histoire démographique	43
III. 1. 7. Effet de la structure des populations et de l'écart à la panmixie sur les résultats	de
l'EBSP	44
III. 2. Résultats	45
III. 2. 1. Variation des séquences d'ADN et structure génétique des populations	45
III. 2. 2. Analyses phylogénétiques	46
III. 2. 3. Analyses biogéographiques	49
III. 2. 4. Histoire démographique	50
III. 2. 5. Effet de la structure des populations et de l'écart à la panmixie sur les résultats	de
l'EBSP	52
III. 3. Discussion	54
III. 3. 1. Tendance globale de la structure géographique	54
III. 3. 2. Origine africaine de <i>C. maculatus</i>	55
III. 3. 3. Histoire démographiques de C. maculatus	56
Chapitre IV : Etude bioécologique	58
I : Infestation du niébé au champ par les bruches	61
I. 1. Matériel et Méthodes	62
I. 1. 1. Zones d'étude	62
I. 1. 2. Les variétés de niébé	62
I. 1. 3. Les parcelles	63
I. 1. 4. Méthode d'échantillonnage	63
I. 1. 5. Paramètres analysés et tests statistiques	64
I. 2. Résultats	64
I. 2. 1. Variation des œufs pondus en fonction des lieux de stockage	64
I. 2. 2. Choix de ponte et taux d'émergence en fonction des variétés	65
I. 2. 3. Ponte et taux d'émergence en fonction des périodes d'échantillonnage	66
I. 2. 4. Espèces de bruches trouvées	67
I. 3. Discussion	69
II : Comportement de <i>Callosobruchus maculatus</i> sur trois variétés de niébé	73
II. 1. Matériel et méthodes	74
II. 1. 1. Matériel végétal	74
<ul><li>II. 1. 1. Matériel végétal</li><li>II. 1. 2. Elevage des bruches</li></ul>	74 74

II. 1. 4. Essai à choix multiples	75
II. 1. 5. Analyse statistique des données	76
II. 2. Résultats	76
II. 2. 1. Situation de non choix	76
II. 2. 2. Choix multiples	79
II. 2. 3. Durée de développement de C. maculatus sur les trois variétés	81
II. 3. Discussion	81
Conclusion générale et perspectives	87
Références bibliographiques	93
Glossaire	111
Annexes	116

# Introduction Générale

Avec le passage du mode de vie chasseur-cueilleur à la production alimentaire, l'espèce humaine a connu une expansion démographique importante avec des conséquences néfastes sur les écosystèmes. Certains écologistes ont déjà observé des changements importants sur la biodiversité (Thuiller et al., 2005). A cela s'ajoute les changements climatiques, en particulier les oscillations de température qui peuvent influer directement sur la survie, la reproduction et la distribution géographique des êtres vivants (Bale et al., 2002). Ainsi, aujourd'hui des espèces qui étaient jusque-là sans impacts négatifs sont devenues des menaces ou d'autres qui étaient cantonnées dans un milieu restreint ont vu leur aire de distribution augmenter de manière importante. Ces accroissements d'aires peuvent accélérer les temps de divergence génétique entre les populations d'une espèce, ce qui peut à la longue conduire à la spéciation (Ridley, 1993). Dans la plupart des cas, les augmentations d'aires de distribution des espèces sont intervenues suite à une médiation humaine, notamment les échanges commerciaux mondiaux (Everett, 2000 ; Mooney & Cleland, 2001), qui permettent une dispersion rapide et sur de longues distances contrairement aux processus naturels de colonisation (Cassey et al., 2005 ; Lockwood et al., 2007). Parmi ces espèces, beaucoup d'entre elles deviennent invasives et les dégâts qu'elles occasionnent dans les nouvelles aires colonisées peuvent être considérables (Sax et al., 2005; Pimentel et al., 2005).

Les insectes en tant qu'indicateurs de biodiversité constituent un des groupes d'organismes les plus importants et les plus diversifiés parmi tous les êtres vivants (Borror et al., 1989; Régnière, 2009) et s'adaptant le mieux à des changements aussi bien climatiques qu'alimentaires. Certains ont des aires de répartition limitées, d'autres par contre grâce à leur forte capacité de dispersion ou à la médiation humaine sont devenus cosmopolites. Certaines espèces ont un rôle positif comme par exemple les pollinisateurs de plantes ou les agents de lutte biologique. Cependant, la majorité d'entre eux constituent des nuisances aussi bien pour la santé humaine et animale ainsi que pour l'agriculture comme les vecteurs de maladie ou les insectes phytophages qui sont parmi les principaux responsables des pertes agricoles dans le monde. Le contrôle des populations de ces ravageurs est une nécessité, puisque les crises alimentaires mondiales de ces dernières années montrent qu'un nombre important de populations humaines éprouve des difficultés à se nourrir. Cependant, peu d'actions de lutte contre ces ravageurs ont donné des résultats satisfaisants. Ces échecs sont souvent liés à une connaissance insuffisante des ravageurs et de leur environnement. Il est donc évident que des recherches sur la caractérisation écologique, génétique et biogéographique sont essentielles pour renforcer les stratégies et les méthodes de lutte contre ces ravageurs. En effet, l'écologie et la génétique des populations sont des disciplines étroitement liées, dont l'étude conjointe permet de mieux comprendre les mécanismes ayant conduit à l'invasion biologique d'une espèce, en reliant des données écologiques aux informations sur la structuration génétique des populations d'une espèce.

Parmi les insectes phytophages, les Coléoptères Bruchinae représentent un groupe dont les représentants se sont adaptés à plusieurs plantes-hôtes du groupe des légumineuses, en devenant du coup les plus grands ravageurs des graines. Les Bruchinae forment une sous-famille dont on trouve des membres sur tous les continents (hormis l'Antarctique) et en particulier dans les régions chaudes du globe, où l'on observe la plus grande diversité spécifique. Les bruches ont été reconnues depuis des siècles pour la capacité de certaines espèces à détruire les graines de légumineuses comestibles dans les stocks. Environ 30 espèces de bruches dans le monde sont de sérieux ravageurs de graines, et au moins 9 sont cosmopolites (Kingsolver, 2004). Selon Delobel & Tran (1993), les bruches sont divisées en deux groupes selon les lieux de développement et le nombre de génération par an. Le premier renferme les bruches se développant dans les champs, dans les graines encore vertes et ayant une seule génération annuelle (espèces univoltines) comme la bruche du pois (Bruchus pisorum L), la bruche de la fève (Bruchus rufimanus Boheman) ou la bruche des lentilles (Bruchus lentis Frölich). Le deuxième groupe renferme les bruches qui se multiplient à l'intérieur des entrepôts, dans les graines sèches. Elles ont plusieurs générations annuelles (espèces multivoltines) et c'est le cas de la bruche du haricot (Acanthoscelides obtectus Say), de la bruche africaine du niébé (Bruchidus atrolineatus Pic), de la bruche chinoise (Callosobruchus chinensis L), de la bruche du niébé (Callosobruchus maculatus F) ou de la bruche de l'arachide (Caryedon serratus Olivier).

Actuellement, la gestion de ces ravageurs repose dans la plupart des cas sur l'utilisation de produits chimiques, méthode qui est aujourd'hui contestée du fait de ses conséquences néfastes aussi bien sur la santé humaine que sur l'environnement. Une méthode de lutte raisonnée et reposant sur des outils autres que les substances chimiques nécessite une connaissance précise de l'écologie de ces Bruchinae ravageurs ainsi que de leur aspect génétique. Ces espèces ravageuses de graines de légumineuses ne semblent pas présenter les mêmes comportements en fonction des plantes mais aussi de leur région d'origine, ce qui peut suggérer une différenciation entre les populations d'origine différentes. Sezonlin et al. (2006) en étudiant la phylogéographie des populations africaines de Busseola fusca (Fuller) ravageur du maïs ont montré un niveau élevé de différenciation génétique entre les populations ouest africaine et celles du centre et de l'est. Une forte différenciation génétique interpopulation a été notée chez l'insecte phytophage Goniectena pallida (Linnaeus), favorisée par sa dispersion limitée couplée avec une fragmentation de la distribution de sa plante-hôte (Mardulyn, 2001). Sembène et al. (2010) ont montré une forte différenciation des populations de Caryedon serratus provenant de plantes-hôtes différentes. Ainsi, il est important de caractériser et comparer les populations sur leur aire de distribution originelle mais aussi dans les milieux néo-fondés. Alvarez el al. (2005) ont montré qu'Acanthocelides obtectus a connu une seule introduction dans le vieux monde, en Europe avant de se propager par la suite en Afrique, alors que pour Nardi et al. (2005) les populations de Bactrocera oleae (Gmelin) qui ont récemment colonisées la région américaine sont probablement originaires des régions méditerranéennes. Les interactions entre les insectes phytophages et leurs milieux naturels d'une part et avec les plantes-hôtes d'autre part, peuvent conditionner largement le fonctionnement et la dynamique de leurs populations. Il est de plus en plus évident que les modifications des aires de distribution de beaucoup de ces insectes phytophages se sont produites suite à la domestication de leurs plantes hôtes naturelles (Alvarez *et al.*, 2005 ; Sézonlin *et al.*, 2006).

*Callosobruchus maculatus* (Coleoptera, Bruchinae), espèce cosmopolite qui est adaptée à plusieurs plantes hôtes du groupe des légumineuses, constitue un intéressant modèle d'étude au sein des Bruchinae ravageurs de graines dans le monde. Les interactions entre *C. maculatus* et son environnement peuvent influer sur sa distribution et son abondance dans le temps et dans l'espace avec plusieurs facteurs pouvant affecter et réguler ses populations. Les premières études réalisées sur cette espèce avaient pour but dans la majorité des cas le contrôle de ses populations ravageuses, cependant certains scientifiques se sont intéressés à l'écologie et à la biologie de ses populations (Credland *et al.*, 1986 ; Messina & Mitchell, 1989 ; Mitchell, 1990). *Callosobruchus maculatus* est donc un ravageur sur lequel on possède de nombreuses données ; cependant peu d'études ont été consacrées à la génétique et à la phylogéographie de ses populations malgré sa diversité et son importance économique. Une telle étude sur cette espèce à répartition mondiale peut nous renseigner sur son histoire évolutive.

Dans le cadre de cette thèse deux lignes majeures ont été développées :

- Nous nous sommes intéressés en premier lieu aux aspects génétiques de *C. maculatus*, selon deux axes. Premièrement, nous nous sommes intéressés à la structuration génétique des populations ouest africaines de *C. maculatus* associées au niébé. Cette étude s'est basée sur deux marqueurs moléculaires avec des populations provenant de cinq pays qui sont parmi les plus grands producteurs de niébé dans le monde. Les hypothèses suivantes ont été testées: *existe-t-il une différenciation génétique entre les populations de ces régions ou bien les échanges commerciaux ont-ils a priori contribué à une homogénéisation génétique.* Dans le deuxième axe, on a cherché à retracer l'histoire évolutive de *C. maculatus* grâce à l'utilisation de quatre marqueurs moléculaires sur des populations provenant des différentes zones de la distribution mondiale de l'espèce. Dans cette étude nous avons cherché à identifier *l'origine géographique de ce ravageur ainsi que ses principales voies de dispersion. L'histoire démographique* a aussi été abordée pour tester l'influence éventuelle sur la taille de population de l'espèce des oscillations climatiques du quaternaire et de la domestication des légumineuses notamment celle de *V. unguiculata* considérée comme sa principale plante-hôte.
- La deuxième ligne de recherche a porté sur une étude bioécologique dans le but d'apporter des informations supplémentaires par rapport à celles déjà existant (surtout en Afrique), avec pour objectif la maitrise des populations de ce ravageur. Cette étude s'est déroulée dans le nord du

bassin arachidier sénégalais, une région où C. maculatus constitue le ravageur majeur des graines de niébé, une légumineuse constituant une source de nourriture très importante. Premièrement, nous avons cherché si l'infestation du niébé au champ est fonction de la position des lieux de stockage et des variétés utilisées. Nous avons aussi cherché à savoir si C. maculatus est la seule espèce de Bruchinae attaquant le niébé au Sénégal ou s'il *interagissait avec d'autres espèces* comme l'ont montré des études réalisées dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest (Améovi et al., 2006 ; Doumma et al., 2006). Enfin, plusieurs variétés de niébé étant utilisées au Sénégal, nous avons testé en dernier lieu si leur sensibilité vis-à-vis de

#### C. maculatus variait ou non.

Ce manuscrit est structuré en quatre chapitres. Dans le premier chapitre une synthèse bibliographique décrit le modèle biologique en s'intéressant entre autre à sa biologie, son écologie et les différentes espèces parasitoïdes qui peuvent lui être associées. Dans ce chapitre, l'apport de la génétique à l'étude des insectes d'intérêt économique est aussi abordé. La structure et la diversité génétique des populations ouest africaines de C. maculatus associées au niébé ont été étudiées dans le chapitre deux. Dans le troisième chapitre, nous avons abordé l'histoire évolutive de C. maculatus grâce à un échantillonnage mondial. Dans le quatrième chapitre divisé en deux parties, nous avons étudié dans la première partie, l'infestation du niébé au champ en relation avec certains facteurs écologiques et dans la deuxième partie le comportement des populations de C. maculatus sur trois variétés de niébé. Ce manuscrit se termine par une conclusion générale et des perspectives tirées de cette étude.

# Chapitre I : Présentation du modèle d'étude, *Callosobruchus maculatus*

#### I. 1. Position systématique

*Callosobruchus maculatus* fut décrite pour la première fois en 1775 par Fabricius et les synonymies suivantes ont pu être établies : *Bruchus maculatus* Fabricius (1775), *Bruchus quadrimaculatus* Fabricius (1801), *Mylabris quadrimaculatus* Fabricius (1887), *Laria quadrimaculatus* Bedel (1901), *Pachymerus quadrimaculatus* Schisky (1905).

*Callosobruchus maculatus* est aujourd'hui placée dans l'ordre des Coléoptères, la famille des Chrysomeloidae, la sous-famille des Bruchinae et la tribu des Bruchini (Kergoat *et al.*, 2007). Selon Tuda *et al.* (2006), *C maculatus* forme un groupe monophylétique avec *C. analis* Fabricius, *C. rhodesianus* (Pic) et *C. subinnotatus* (Pic).

#### I. 2. Description morphologique

*Callosobruchus maculatus* est le plus grand ravageur du niébé stocké. Ses hôtes de préférence appartiennent à la sous-famille des Papilionoideae (Messina & Jones, 2009). A l'intérieur de cette sous-famille, beaucoup de ses espèces hôtes appartiennent à la tribu des Phaseoleae, et en particulier au genre *Vigna* (Tuda *et al.*, 2005).

L'adulte est un petit coléoptère court et trapu, généralement d'une couleur brun-roux, mesurant environ 3 mm de long. A l'instar des autres coléoptères, seuls les trois premiers articles et le dernier des tarses sont apparents. Sa tête est allongée en museau et bien dégagée du prothorax (Daly *et al.*, 1998). En vue dorsale, la tête, opisthognathe, est cachée par la partie dorsale du prothorax. Les deux élytres recouvrent le prothorax, à l'exception d'un petit écusson de forme rectangulaire ou triangulaire. Les élytres recouvrent également tous les tergites abdominaux à l'exception du dernier, le pygidium. Un dimorphisme sexuel existe chez *C. maculatus* (Figure I-1). Il se manifeste notamment par une coloration différente des élytres et du pygidium permettant de distinguer aisément le mâle de la femelle.



Figure I-1 : Adultes de Callosobruchus maculatus (Beck & Blumer, 2011). A : mâle. B : femelle

Un polymorphisme imaginal est noté chez *C. maculatus*. Deux formes d'adultes (morphes), différant par des caractères morphologiques, physiologiques et comportementaux ont été décrites par Utida (1954) puis étudiées par Ouédraogo (1991) : Une forme de dispersion (voilière) qui présente des

adultes généralement brun noir à gris noir et une forme sédentaire (non voilière) qui est caractérisée par des adultes dont leur corps est généralement brun rougeâtre avec des antennes plus longues que celles des individus de la forme voilière.

Selon Ouédraogo (1991), l'apparition de l'une ou l'autre forme imaginale est liée aux conditions climatiques prévalant lors du développement post-embryonnaire. La forme non voilière avec un potentiel reproducteur très élevé est adaptée à la vie sur les stocks et peut produire plusieurs générations d'adultes (Sanon & Ouédraogo, 1998). Les individus de la forme volière émergent quant à eux à la fin de la saison sèche, lorsque les graines sont fortement dégradées et que l'humidité de l'air s'accroît ; les adultes, en diapause reproductrice et aptes au vol, auraient tendance à quitter les systèmes de stockage et seraient à l'origine de l'infestation des cultures (Ouédraogo, 1991).

Ces deux formes ont des caractéristiques très différentes telles qu'une durée de vie plus longue chez la forme voilière, soit environ un mois à 30°C, contre 6-8 jours dans les mêmes conditions pour la forme non voilière (Delobel & Tran, 1993). La fécondité moyenne est plus importante chez la forme non voilière, avec des valeurs rapportées de 100 œufs (Glitho *et al.*, 1988), 60-90 œufs (Delobel & Tran, 1993) et 91,2 œufs par femelle (Akpovi, 1993), alors que les individus de la forme voilière sont caractérisés par une faible fécondité (deux œufs en moyenne par femelle), avec une descendance constituée d'individus non voiliers (Glitho *et al.*, 1988).

Cependant, il a été observé au Congo-Brazzaville dans des stocks de variétés locales de *Cajanus cajan* (L) Millsp et de *Vigna unguiculata* (variété rouge) un morphe de *C. maculatus* différent de celui rencontré fréquemment en Afrique de l'Ouest (Mikolo *et al.*, 2007). Ce morphe est caractérisé par un corps noir (tête, thorax et abdomen) avec des élytres portant des taches noires identiques chez les mâles et les femelles. Les voiliers et non voiliers sont morphologiquement identiques contrairement aux spécimens d'Afrique de l'Ouest.

#### I. 3. Biologie de la reproduction

La plupart des Bruchinae ont des cycles de vie similaires. Différents travaux (Ouedraogo, 1978 ; Messina, 1984) ont montré que chez la plupart des espèces, la présence de graines ou de gousses de la plante hôte à différents stades de maturité stimule l'ovogénèse et induit la ponte. Chez *C. maculatus*, très peu de temps s'écoule entre l'émergence d'une femelle et sa première ponte ; l'accouplement s'effectue en quelques minutes. Son cycle de développement comporte quatre stades : œuf, larve, nymphe et adulte (figure I-2). Il dure en tout environ 5 semaines.

#### I. 3. 1. L'œuf

Une fois fécondée, les femelles de C. maculatus fixent leurs œufs sur la surface externe des graines ou des gousses (Beck & Blummer, 2011) grâce à une substance gélatineuse (Alzouma, 1981; Huignard et al., 1985 ; Delobel & Tran, 1993). Généralement bien répartis sur les différents substrats de ponte disponibles, les œufs sont ovales ou en forme de fuseau clair, brillant, mesurant de 0,4 à 0,7 mm de long sur 0,3 à 0,4 mm de large. Huignard et al. (1985) ont remarqué au Niger dans une culture de Vigna unguiculata que 60 à 70% des gousses étaient infestées par Callosobruchus maculatus, mais qu'il n'y avait toujours que 1 ou 2 œufs par graine. Selon Messina & Renwick (1985) des substances dissuadantes émises avec les œufs seraient à l'origine de ce comportement d'évitement de la compétition. Les dimensions des œufs sont variables en fonction du milieu et influent sur la survie de la descendance. Ainsi, Fox (1994) estime que les gros œufs donnent un meilleur rendement avec des éclosions plus rapides et plus fréquentes, un taux de survie larvaire élevé, un développement en nymphe plus rapide avec des adultes grands et plus tolérants à la pénurie alimentaire et à la dessiccation. Pour Kawecki (1995), les femelles de C. maculatus peuvent anticiper la compétition larvaire future due aux conditions de croissance en produisant de gros œufs pour améliorer les chances de survie de leur descendance (van Huis & de Rooy, 1998). Une phéromone de marquage est émise lors de la ponte par les femelles (Delobel & Tran, 1993), ce qui permet d'éviter les graines fortement infestées, et de réduire ainsi la compétition inter-larvaire.

#### I. 3. 2. La larve

Après l'éclosion qui survient 5 à 7 jours après la ponte dans les conditions les plus favorables (Djossou, 2007), la larve néonée de type chrysomelien et pas encore munie de pattes motrices, fore la paroi externe de l'enveloppe de la gousse ou du tégument de la graine et rentre à l'intérieur (Lenting, 2000). A ce stade, le taux de survie est beaucoup plus important chez les larves issues des œufs pondus sur les graines avec une accessibilité directe aux ressources nutritives. Au niveau des œufs pondus sur les gousses, la jeune larve peut échouer dans le vide (espace inter-graines) ou déboucher, au cours de son transit trophique, sur une petite graine à faible réserve ne pouvant lui permettre d'atteindre le stade final de développement. Dans ce dernier cas, la mort de la larve est inévitable.

La larve néonée de type chrysomelien doit donc creuser à travers la cloison de la gousse ou de la graine pour chercher sa nourriture. Elle est pourvue, à cet effet, d'une plaque de chitine sclérotinisée en forme de H. Beaucoup de larves néonates creusent à travers l'enveloppe de la gousse et entrent dans la première graine disponible. Un équipement enzymatique permet à la larve de premier stade de *C. maculatus*, comme pour la plupart des Bruchinae, de détruire les composés secondaires (inhibiteurs de protéases, phytohémagglutines, acides aminés non protéiques) présents dans les graines de ses hôtes (Alzouma *et al.*, 1996) ce qui lui permettra d'utiliser sans mortalité importante les graines des

légumineuses riches en composés secondaires, toxiques pour les autres consommateurs potentiels. Néanmoins, le tégument externe est la principale barrière qui contribue significativement à la mortalité de la larve néonée durant la phase de perforation en raison de la présence de composés secondaires de nature chimique variée (Gatehouse *et al.*, 1984), de sa dureté et de son épaisseur (Podoler & Applebaum, 1968).

Au cours de son développement post embryonnaire, *C. maculatus* passe successivement par quatre stades larvaires, dénommés L1, L2, L3 et L4 (Ouédraogo, 1978) :

#### La larve de stade 1 (larve néonate ou L1)

De type chrysomélien à corps blanchâtre, elle est localisée à l'endroit du dépôt de l'œuf. Elle possède trois fines paires de pattes non fonctionnelles et une plaque prothoracique. Après 24 à 48 heures dans le chorion, elle traverse le tégument de la graine et entre dans le cotylédon où elle mue automatiquement.

#### La larve de stade 2 (ou L2)

De type rynchophorien à corps blanchâtre, la L2 à tête sclérifiée portant une paire d'antennes articulées se trouve toujours dans l'endroit de pénétration de la L1. Elle ne possède ni pattes, ni plaque prothoracique. En grossissant, elle continue à creuser la galerie et l'élargit en une première logette où intervient la mue suivante.

#### La larve de stade 3 (ou L3)

De même type que la L2, elle continue à agrandir la galerie en une deuxième logette dans laquelle elle grossit considérablement et mue.

#### La larve de stade 4 (ou L4)

Ne différant des larves L2 et L3 que par la taille, la L4 aménage une logette arquée et tapissée d'acide urique où va se dérouler la nymphose.

#### I. 3. 3. La nymphe

D'une durée variant entre 7 et 28 jours, la nymphose se déroule dans une seule graine et avec les organes qui se sclérifient progressivement aboutissant à l'imago qui reste dans la logette 24 à 48 heures avant d'émerger.

#### I. 3. 4. L'imago ou adulte

Les adultes qui résultent de cette nymphose émergent de la graine après avoir traversé la fenêtre de sortie préparée par la larve et sont entièrement matures 24 à 36 heures après l'émergence (Beck & Blummer, 2011). Les conditions climatiques influencent la durée de développement de l'œuf à l'adulte qui varie aussi dans des limites assez larges en fonction des caractéristiques de la graine hôte (Kossou & Aho, 1993).



Figure I-2 : Cycle de développement de C. maculatus avec durées moyennes pour chaque phase

#### I. 4. Distribution, écologie et importance économique

*Callosobruchus maculatus* est une espèce cosmopolite qui est largement représentée dans les zones tropicales et subtropicales. Elle est présente en Afrique, en Australie, en Amérique centrale et du Sud, sur le pourtour méditerranéen, le sud et le sud-est de l'Asie et une petite des USA. Selon Beck & Blumer (2011), *C. maculatus* est absente dans une grande partie de l'Amérique du nord à cause du froid qui y règne mais aussi du fait de l'absence de ses plantes hôtes. *Callosobruchus maculatus* infeste principalement les légumineuses cultivées et sauvages du genre *Vigna (V. radiata L, V. unguiculata L. et V. angularis* Willd ; Alzouma *et al.*, 1996). Elle peut également se développer sur *Vouandzeia subterranea* (L) Thou, *Cajanus cajan* (L) Millsp, *Cicer arietum* (L), *Lablab purperus* (L) Sweet, *Cassia occidentalis* (L) Link, *Lathyrus aphaca* (L), *L. clymenum* (L), *L. sativus* (L), *Lens culinaris* Medik, *Phaseolus acutifolius* Gray, *P. lunatus* (L), *P. vulgaris* (L), *Pisum sativum arvense* (L), *Vicia faba* (L), *V. lutea* (L), *V. sativa sativa* (L) (Decelle, 1981 ; Kingsolver, 2004).

L'infestation primaire des légumineuses par les femelles de *C. maculatus* se déroule dans les cultures pendant la période de fructification. Cependant, le développement le plus important des larves se déroule dans les graines au cours du stockage où plusieurs générations d'adultes peuvent ainsi se succéder. Dans la région de Ouagadougou (Burkina Faso), le développement de neuf générations de *C. maculatus* a pu être observé pendant la période de stockage du niébé (Sanon, 1997).

En culture, les signes qui indiquent la présence de *C. maculatus* sont difficiles à déceler sur les gousses. En revanche après la récolte et le décorticage, on peut facilement distinguer les graines qui sont atteintes de celles qui sont saines, surtout lorsque l'infestation est ancienne. Au cours du développement larvaire, bien que le tégument de la graine infestée paraisse intact, une fenêtre de 1 à 2

mm (Beck & Blummer, 2011) et de couleur variant suivant la teinte des graines est apparente à l'endroit où le ravageur se nymphose. Cette fenêtre sera par la suite brisée par l'adulte qui résulte de ce développement avant de sortir et de commencer un nouveau cycle. Ainsi, plusieurs mois après l'infestation primaire si aucune mesure n'est prise, on se retrouve avec un lot comprenant des graines perforées, des adultes de *C. maculatus* et des graines à l'intérieur desquelles les larves continuent leur développement (Goix, 1986).

Le niveau d'infestation des graines par C. maculatus est difficile à déceler à cause des formes cachées, bien que la présence d'adultes vivants puisse être révélatrice. Les larves de Callosobruchus maculatus, comme celles de tout Bruchinae, consomment les réserves contenues dans les cotylédons pour leur développement, en y rejetant en même temps leurs excréments riches en acide urique (Habibi, 1998), ce qui avec les fragments de chitine rendent les lots contaminés impropres à la consommation. Callosobruchus maculatus, grâce à sa grande capacité d'adaptation sur de nouvelles plantes et à des régions climatiques variées (Utida, 1954) exerce une pression permanente sur les légumineuses. L'adulte de C. maculatus ne cause pas directement de dégâts sur les légumineuses. Dans les stocks les individus mâles et femelles ne s'alimentent pas du fait de l'absence de nourriture liquide et leur longévité est faible (10 à 14 jours ; Beck & Blumer, 2011). Cependant, cette longévité est d'environ de 30 jours s'ils sont élevés en présence d'eau sucrée (Larson & Fischer, 1924). Au champ, les insectes se nourrissent de grains de pollen et de nectar (Paddock & Renard, 1919 ; Alzouma, 1981 ; Messina, 1984). Ce sont donc les stades juvéniles qui causent les ravages sur stock en consommant une partie importante des réserves nutritives des cotylédons de la graine. L'activité de consommation des réserves des graines par les larves génère de la chaleur et de l'humidité qui engendrent le développement de champignons comme Aspergillus Micheli, Fusarium Link, Botrytis Micheli, conduisant à des pertes substantielles. En zone rurale où les techniques de conservation des denrées agricoles sont peu élaborées, ce ravageur entraîne des pertes post-récoltes pouvant atteindre 100% en quelques mois (Lienard & Seck, 1994). Callosobruchus maculatus entraîne non seulement une réduction de poids sec, mais également une diminution de la qualité des graines et de la viabilité des semences compromettant leur consommation et leur semis (Singh & Singh, 1992 ; Odah, 1995). Selon Murdock et al. (1997) lorsque les dégâts excèdent un trou d'émergence par graine, la valeur marchande du niébé se trouve substantiellement réduite. Tchamou (1995) a montré qu'il existe une relation entre le nombre de trous d'émergence des bruches sur les graines et leur perte de poids. Les figures I-3, I-4 et I-5 montrent quelques dégâts causés par l'activité de C. maculatus sur différentes graines de légumineuses.



**Figure I-3** : Adulte de *C. maculatus* avec leurs trous d'émergence sur graines de soja (source Clemson University–USDA Cooperative Extension Slide Series, USA)



**Figure I-4** : Trous d'émergence (A) et œufs (B) des adultes de *C. maculatus* sur graine de haricot mungo (photo L. Blumer)



Figure I-5 : Dégâts de C. maculatus (en flèches) sur graines de niébé

#### I. 5. Ennemis naturels de Callosobruchus maculatus

Un cortège d'espèces parasitoïdes peut être associé à *C. maculatus* dans les champs comme dans les stocks de légumineuses (tableau I-1).

Uscania lariophaga Steff est un minuscule hyménoptère chalcidien qui est surtout attiré par les œufs fraîchement pondus (0-2 jours après oviposition; van Huis *et al.*, 1994). Selon Alzouma (1987), le taux de parasitisme des œufs de *C. maculatus* dans les cultures de niébé par cette espèce varie entre 25% et 60% en fonction des zones écologiques ou des conditions expérimentales. Lammers & van Huis (1989) puis Monge *et al.* (1990) ont montré que dans les greniers expérimentaux de niébé, 33% à 60% des œufs de *C. maculatus* sont parasités par *U. lariophaga*.

Les parasitoïdes larvophages Anisopteromalus calandrae Howard, Dinarmus basalis Rond, Eupelmus vuilleti Crawford et Eupelmus orientalis Crawford sont des ectoparasites solitaires. Alors que les larves de D. basalis, E. vuilleti et E. orientalis ne se développent qu'aux dépens des derniers stades larvaires (larves L4) et des nymphes de C. maculatus (Tchanssanti, 1995 ; Tchamou, 1995), A. calandrae attaque de préférence les larves âgées et les pupes. Cependant, seules deux espèces, E. vuilleti et D. basalis, se développent dans les greniers et leur taux de parasitisme varie entre 7% et 60% (Monge & Huignard, 1991). Une compétition entre les femelles de ces deux espèces est notée lors de la ponte sur les larves de C. maculatus. Alors que D. basilis évite les hôtes parasités par E. vuilleti, cette dernière parasite les œufs de C. maculatus portant les œufs de D. basilis. Ainsi, en présence de ces deux espèces, la densité de D. basalis est faible et varie peu tandis que celle de E. vuilleti augmente progressivement et le taux d'accroissement de C. maculatus reste élevé (van Alebeek et al., 1993 ; Monge *et al.*, 1995 ; Tchamou, 1995). *Dinarmus basalis* apparait ainsi comme étant le parasitoïde le plus apte à réguler les populations de *C. maculatus* dans les stocks de graines.

Insectes auxilliaires	Références	
TRICHOGRAMMATIDAE		
Uscana lariophaga Steff	Monge et al. (1990) ; van Huis (1991) ; Kapila & Agarwal (1990)	
Uscana semifumipennis Girault		
<i>Uscana mukerju</i> Mani		
EUPELMIDAE		
Eupelmus orientalis Crawf	Monge et al. (1990) ; van Huis (1991)	
Eupelmus vuilleti Crawf		
PTEROMALIDAE		
Anisopteromalus calandrae How		
Chaetospila elegans Westwood	Heong (1991) ; van Huis (1991) ; Rojas-Rousse et al. (1988)	
Dinarmus basalis Rondani		
Dinarmus vagabundus Timberleke		
Lariophaga texacus Crawf		
EURYTOMMIDAE	Prevett (1961)	
Eurytoma sp.	1 leven (1901)	
(C D' 0007)		

Tableau I-1: Ennemis naturels de Callosobruchus maculatus

(Source : Djossou, 2007)

#### I. 6. Apport de la génétique sur la connaissance des insectes d'intérêt économique

Après la découverte de l'ADN et les avancées techniques qui suivirent (PCR, séquençage, etc.), il est devenu possible de déchiffrer et comprendre l'information génétique contenue dans les cellules vivantes, information centralisée au sein de l'ADN. L'histoire des espèces et la séparation entre deux taxa peuvent aussi être étudiées à partir des différences observées au niveau de l'ADN (Avise *et al.,* 1987). En effet, le phénomène de substitution de l'ADN (à un taux variable suivant le gène étudié) permet d'obtenir une datation des événements de spéciation en utilisant des marqueurs à taux de mutation adéquat pour le niveau d'étude. A l'extrême, des marqueurs à taux de mutation très élevé peuvent être utilisés pour des études de paternité.

Une étude des insectes peut nous permettre de mieux cerner la biogéographie d'une région donnée. Ce groupe renferme des espèces qui interviennent sur l'agriculture comme c'est le cas des insectes ravageurs, des pollinisateurs, et des parasitoïdes des ravageurs de cultures, mais aussi sur la santé humaine comme les agents vecteurs de maladie. Ainsi, il est nécessaire d'élucider les patrons de diversité et comprendre les mécanismes de leur diversification ce qui peut donner des informations sur la résolution des problèmes agricoles et médicaux.

L'étude des insectes a connu une révolution importante dans les domaines de la biogéographie, de la génétique des populations, de l'écologie moléculaire..., avec les avancées notées dans le domaine de la biologie moléculaire. A ces fins, de plus en plus de marqueurs moléculaires sont utilisées chez les insectes. Comprendre si les populations d'une espèce phytophage présentent des lignées qui sont structurées en fonction de la géographie ou des plantes hôtes peut fournir des informations pour la mise en place de stratégie de lutte efficace. Des études utilisant des marqueurs moléculaires ont ainsi permis d'élargir les connaissances sur la diversité génétique d'insectes ravageurs qui présentent une importance économique majeure (Thomas *et al.*, 2003 ; Prowell *et al.*, 2004, Alvarez *et al.*, 2005 ; Sembène *et al.*, 2010). De telles études moléculaires peuvent aussi nous permettre de mieux inférer l'histoire évolutive et la phylogéographie d'une espèce ravageuse dans l'optique de mieux cerner les facteurs écologiques et historiques associés de la différentiation de ses populations.

*Callosobruchus maculatus* est une espèce à large distribution géographique ; une étude préalable de sa différentiation génétique intra et inter-populationnelles peut nous informer s'il a les mêmes traits de vie (biologie, écologie, incidences sur les pertes de récoltes) ou pas selon les plantes, les régions. On peut également via une étude de phylogéographie, retracer l'histoire ancienne et récente de l'espèce.

#### Les marqueurs moléculaires

Contrairement aux marqueurs morphologiques, biochimiques ou protéiques, les marqueurs moléculaires sont des marqueurs génétiques basés directement sur l'ADN et permettant une analyse du polymorphisme des séquences de ce dernier. Un marqueur génétique est idéal lorsqu'il est polymorphe (variable entre individus), multiallélique, codominant, non épistatique... La répartition des marqueurs sur l'ensemble du génome est également un critère à retenir. Les principales variations des marqueurs moléculaires proviennent soit d'un polymorphisme de séquence (par exemple substitution, insertion, délétion), soit d'un polymorphisme de nombre d'unités de répétitions (par exemple microsatellites, minisatellites).

Utilisant les connaissances acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication d'ADN, le séquençage de l'ADN a permis l'identification et l'usage de nombreuses régions génomiques ayant des caractéristiques particulières, permettant ainsi d'inférer les mécanismes de l'évolution des espèces. Un certain nombre de gènes nucléaires (18S, 28S, ITS1, ITS2...) et

mitochondriaux (cytochrome b, cytochrome oxydase I, cytochrome oxydase II...) sont à présent bien connus pour détecter les polymorphismes d'ADN et sont utilisés dans le groupe des insectes pour des études phylogénétiques, démo-génétique et phylogéographiques. Les objectifs principaux des analyses utilisant des marqueurs moléculaires sont avant tout d'inférer l'histoire évolutive des organismes étudiés et d'établir les liens de parenté entre eux. Véritable révolution de la biologie moléculaire permettant d'aborder plusieurs disciplines aussi bien fondamentales qu'appliquées, l'accès aux détails des séquences des marqueurs moléculaires a été permis à la suite de la découverte de la technique d'amplification de l'ADN par PCR.

#### Importance de l'utilisation de différents types de marqueurs moléculaires

La multiplicité des marqueurs moléculaires recoupe une variété de propriétés et caractéristiques, plus ou moins compatibles avec les objectifs d'une étude. Ainsi, il est nécessaire de bien choisir les marqueurs en fonction des questions posées, afin de tirer le maximum d'information des régions du génome analysées.

L'ADN mitochondrial (ADNmt), molécule haploïde, d'hérédité maternelle, non recombinante et à taux de mutation élevé se comporte comme un seul gène. Ces caractéristiques permettent aux biologistes de reconstruire les relations évolutives intra- et inter-populationnelles par l'évaluation de modèles de mutation. L'utilisation d'un seul marqueur, et plus globalement de marqueurs simplelocus, pour délimiter des espèces ou des unités de conservation est aujourd'hui beaucoup critiquée et il est recommandé d'utiliser plusieurs gènes issus de différents compartiments génomiques pour inférer l'histoire des espèces (Funk & Omland, 2003 ; Ballard & Rand, 2005 ; Edwards *et al.*, 2005 ; Kuo & Avise, 2005). L'utilisation d'un seul locus (mitochondrial ou autre) a dans le passé conduit à des conclusions erronées, inférant certes l'histoire du gène mais pas celle de l'espèce.

De plus, du fait de la nature haploïde et de l'héritabilité maternelle (Lansman *et al.*, 1983) de l'ADNmt, les marqueurs mitochondriaux sont caractérisés par une taille efficace plus petite que les marqueurs nucléaires (diploïdes et à transmission biparentale) et sont donc plus susceptibles d'être fortement affectés par la dérive génétique que les marqueurs nucléaires (Ballard & Rand, 2005). La dérive génétique seule peut provoquer une discontinuité génétique d'origine stochastique, que ce soit pour des marqueurs mitochondriaux ou nucléaires. Enfin, il a été montré théoriquement (Excoffier & Ray, 2008) et vérifié expérimentalement (Hallatschek *et al.*, 2007) que la dérive génétique combinée avec des événements démographiques, tels que la fondation d'une nouvelle population, pouvaient aussi mener à des discontinuités génétiques.

Chapitre II : Structuration génétique des populations ouest africaines de *Callosobruchus maculatus* 

La génétique des populations, s'intéresse à tous les processus populationnels en quantifiant l'influence qu'ils ont sur l'organisation de la diversité génétique des populations et donc de l'évolution des organismes vivants. Discipline initiée par Fisher (1930), Wright (1931), Haldane (1932), la génétique des populations est une application des principes fondamentaux de la génétique médenlienne à l'échelle des populations. Les modèles mathématiques font partie intégrante de cette discipline et permettent d'expliquer les mécanismes (i.e la mutation, la dérive génétique, la sélection et la migration). Par l'analyse d'échantillons d'ADN provenant d'individus de différentes régions du système étudié, la génétique des populations permet ou non (dépendant de la structure de l'espèce en question) de définir des populations génétiquement distinctes. La génétique des populations de Callosobruchus maculatus reste inconnue en Afrique malgré l'importance économique de cette espèce. Or, comprendre les aspects génétiques de la variation géographique et de la structure des populations de C. maculatus peut fournir d'importantes informations biologiques pour le déploiement de stratégies de lutte contre ce ravageur. Par exemple, la mise en évidence d'une structuration spatiale de la variabilité génétique pourrait être le témoin de processus d'adaptation locale, à prendre en compte dans la gestion éventuelle des populations en question. Par exemple, il a été démontré que la préférence de ponte et la dispersion des œufs entre les populations africaines et asiatiques de C. maculatus était génétiquement fondée (Fox et al., 2004). Une investigation sur la diversité génétique des populations de C. chinensis (L.) menée par Tuda et al. (2004) à partir de sites naturels de pré et de post-récolte a montré que les populations provenant des hôtes d'après récolte et conservés en masse étaient probablement le refuge d'un haplotype commun, alors que les populations des plantes hôtes d'habitats naturels loin des zones agricoles étaient caractérisées par des haplotypes locaux. Par ailleurs, des études antérieures ont suggéré, mais non démontré, la présence de structure génétique chez C. maculatus (Bieri & Kawecki, 2003).

L'isolement géographique est un facteur important de divergence génétique entre les populations. Dans le cas de *C. maculatus*, on ne sait pas si les populations géographiquement isolées sont génétiquement différentes et/ou si elles partagent des génotypes, donc s'il y a ou non des restrictions du niveau de flux gène entre elles. De plus, bien que le commerce international par les humains ait involontairement étendu l'aire de distribution de cet insecte nuisible dans le monde entier, on ignore comment les génotypes liés sont distribués dans une région géographique spécifique. Deux hypothèses contrastées peuvent être émises concernant la structure génétique dans l'espace d'une telle espèce en Afrique de l'Ouest, région où l'homme intervient de façon importante sur l'échange et la propagation des graines hôtes : soit sa structure génétique correspond à des ensembles d'entités géographiques, soit elle a été formée par les événements de dispersion suite à la médiation humaine et est lié à la culture d'un groupe d'hommes. Une hypothèse de plus est qu'en raison des nombreux échanges de graines, l'espèce ne présente aucune structure.

Pour tester ces hypothèses, nous avons utilisé des séquences moléculaires de spécimens de *C. maculatus* d'Afrique de l'Ouest. En l'occurrence, nous utilisons l'ADN mitochondrial (mtDNA) et nucléaire pour faire des investigations sur la variation génétique des populations de *C. maculatus* prélevées sur des graines de niébé provenant de différentes localités dans cinq pays ouest africains. Nous nous posons les questions suivantes : (i) Y a-t-il une évidence de structuration génétique chez *C. maculatus* en Afrique de l'Ouest? (ii) Quels sont les événements démographiques potentiellement à l'origine de la structure génétique de *C. maculatus* en Afrique de l'Ouest?

#### II. 1. Matériels et méthodes

#### II. 1. 1. Echantillonnage

Les populations étudiées proviennent de 5 pays d'Afrique de l'Ouest : Burkina Faso, Mali, Niger, Sénégal et Togo. Ces pays font partie des plus grands producteurs de niébé dans le monde (FAO stat, 2008). Les spécimens de *Callosobruchus maculatus* qui ont fait l'objet de cette étude proviennent des graines de niébé collectées pendant la période sèche (après l'hivernage) sur deux années (2009 et 2010). Les insectes sont collectés dès leur émergence et gardés dans l'éthanol 100% avant leur utilisation. Chaque population correspond à un groupe d'individus provenant du même site. On distingue les échantillons selon l'origine géographique. Chaque échantillon est codé en utilisant les premières lettres du nom du pays d'origine, de la localité de collection et un numéro d'ordre (exemple MaB1, Ma = Mali, B = Benkorowéré, 1= individu numéro 1; Figure II-1, Annexe 1).



**Figure II-1** : Répartition géographique des localités d'origine des populations de *C. maculatus* étudiées. Tenkodogo (Bf), Bougoudéré (MaB), Sikasso (MaS), Niamey (NiN), Coki (SnC), Fouta (SnF), Kébémer (SnK), Tambacounda (SnT), Adidogome (TAd), Assigame (TAs), Dapaong (TDa), Gbinga (TGb), Mango (TMa), Tsévié (TTs)

#### II. 1. 2. Analyse de l'ADN

#### II. 1. 2. 1. Extraction de l'ADN de C. maculatus

La première étape des manipulations en laboratoire consiste à extraire l'ADN génomique des individus de *C. maculatus*. Cette étape permet d'isoler l'ADN en solution aqueuse et ensuite de procéder aux étapes suivantes. Les extractions d'ADN ont été faites en utilisant la trousse d'extraction DNeasy Tissue kit (QIAGEN Inc) en suivant les directives de la procédure standard.

La tête, le thorax et les pattes d'un insecte sont prélevés et placés dans un tube de 1,5 ml. On ajoute 180 µl de tampon ATL puis les organes sont écrasés avec un broyeur jusqu'à désintégration complète. Ensuite 20 µl de protéinase K sont ajoutés et le tout est mélangé grâce à un agitateur de type Vortex. Les tubes sont placés dans un bain-marie à 55°C (température optimale d'action de la protéinase) pendant trois heures, en vortexant de temps en temps durant la lyse. Les tubes sont ensuite refroidis à température ambiante puis centrifugés à 13000 tours/min pendant 5 minutes. Le liquide surnageant contenant l'ADN extrait en suspension est transféré dans un nouveau tube de 1,5 ml pour éliminer les restes de tissus. Après 15 secondes de Vortex, on ajoute 200 µl de tampon AL et on vortexe immédiatement puis on incube à 70°C pendant 10 min. On ajoute ensuite 200 µl d'éthanol 96-100% et on vortexe. Le mélange est pipeté et déposé dans une colonne préalablement placée sur un tube collecteur de 2 ml. La membrane fixée dans les colonnes retient l'ADN, il suffit de faire passer des tampons nettoyants (AW1 puis AW2 à 500 µl de chacun) par centrifugation (13000 tours/min pendant 1 min pour AW1 et 13000 tours/min pendant 3 min pour AW2) à travers la membrane afin d'éliminer les résidus de protéines et les sels. A la fin, l'ADN est resuspendu dans le tampon AE, élué pour être finalement conservé dans des tubes individuels à -20°C. Etant donné la faible quantité de l'ADN habituellement extrait à partir d'échantillons de C. maculatus, le volume du tampon AE pour l'élution a été réduit de 75% par rapport au volume proposé dans le protocole standard. Cette seule modification avait pour but de récupérer la même quantité d'ADN dans un plus petit volume afin d'avoir une concentration suffisante pour les étapes suivantes. En fin, la qualité totale d'ADN extrait de chaque individu a été vérifiée en faisant migrer un aliquot de 2 µl mélangé à 5 µl de bleu de bromophénol sur gel d'agarose 1,5%. L'ajout de bromure d'éthidium, agent intercalant de l'ADN, révèle les bandes par fluorescence sous lumière UV.

#### II. 1. 2. 2. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR est une technique d'amplification *in vitro* permettant d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Elle repose sur la répétition de trois étapes (figure II-2) : la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces sur la matrice et l'élongation de l'extrémité 3' du brin néosynthétisé par une enzyme thermophile, la Taq polymérase. Ces trois étapes constituent

un cycle répété de façon automatique n fois. A chaque cycle, le fragment d'intérêt double en quantité. Cette augmentation exponentielle va permettre d'obtenir une quantité suffisante du fragment d'ADN désiré pour en étudier par la suite son polymorphisme via diverses techniques utilisées en routine en biologie moléculaire.



Figure II-2 : Les trois phases d'un cycle d'amplification par PCR (P.G)

Pour réaliser une bonne amplification par PCR, il est nécessaire d'ajuster les conditions expérimentales afin d'obtenir un bon appariement des amorces sur le brin d'ADN matrice ainsi qu'une activité de la Taq polymérase maximale, de manière à optimiser le rendement de la PCR. A chaque couple d'amorces correspond une température d'hybridation (Tm) ; ainsi il est important de bien déterminer cette Tm. Par ailleurs on peut ajuster la concentration en ions Mg2+ du mélange PCR, un cofacteur de l'enzyme Taq polymérase pour optimiser la stringence de la réaction.

L'amplification du gène nucléaire 28S de l'ADN ribosomique de *C. maculatus* a été effectuée avec le couple d'amorces suivant D4-5F et D4-5R (Belshaw & Quicke, 2002), celle du gène mitochondrial du cytochrome b (CytB) avec le couple d'amorce CB-J-10933 et CB-N-11367 (Simond *et al.* 1994). Les PCR ont été conduites dans un volume réactionnel total de 50 µl. Les volumes des différents réactifs utilisés et les conditions de PCR sont listés dans les Annexes 2 et 3.

Le rendement et la spécificité de ces différentes PCR ainsi que la taille des fragments amplifiés sont ensuite contrôlés en effectuant des électrophorèses sur gel d'agarose à 1,5% dans du tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X) et dans lequel est ajouté 1  $\mu$ l bromure d'éthidium. Un volume de 5  $\mu$ l d'amplifiat est chargé dans chaque puits du gel avec 5  $\mu$ l d'une solution de bleu de bromophénol (0.3% glycérol–0.125% bleu de bromophénol), substance colorée de densité plus importante que l'ADN l'entraînant ainsi dans le fond du puits et utile pour repérer la progression de la migration. Un puits est consacré au marqueur de taille SmartLadder 200 paires de bases (pb) pour vérifier la taille des

amplifiats. Après la migration (100 V pendant 30 s), le gel est déposé sur une plaque possédant une lampe UV : les fragments amplifiés apparaissent alors sous la forme de bandes fluorescentes rosées, fluorescence émise par le bromure d'éthidium intercalé entre les deux brins des fragments d'ADN amplifiés. Une photographie est conservée dans les archives et l'intensité relative de la bande (luminosité et superficie) nous sert à estimer la concentration du fragment amplifié dans la solution et donc la quantité totale qui sera transmise à l'entreprise de séquençage. Si l'amplification a réussi, les 45 µl restants de solution sont transférés dans un tube de 1,5 ml et conservé au froid en attendant leur envoi.

#### II. 1. 2. 3. Séquençage

Le séquençage selon la méthode du Sanger *et al.* (1977), utilise l'amplifiat purifié comme matrice de départ, en ajoutant au milieu de réaction des didésoxyribonucléotides. Ces derniers sont dépourvus de terminaison 3'-OH, bloquant ainsi l'élongation du brin d'ADN qui est en train d'être synthétisé. Ceci conduit à un mélange de brins d'ADN qui diffèrent par leur longueur et qui seront séparés par électrophorèse. Pour ce qui est du séquençage par séquenceur automatique, les quatre types de didésoxyribonucléotides sont liés chacun à un fluorochrome différent. Après la réaction de séquence, les produits amplifiés sont soumis à une électrophorèse. De tailles différentes, les brins d'ADN sont décelés par un détecteur qui enregistre l'intensité et la couleur du signal correspondant au nucléotide terminant. Ceci permet d'obtenir un chromatogramme qui, après traitement informatique, permet la lecture de la succession des bases de l'ADN séquencé (figure II-3).



Figure II-3 : Chromatogramme montrant la succession des bases de l'ADN séquencé

L'étape de séquençage proprement dite de ce chapitre a été sous-traitée à la société Macrogen (Corée du Sud) pour de meilleurs rendements financier et logistique. Cela nous a également permis d'augmenter l'homogénéité des résultats, puisque les protocoles d'analyse de Macrogen sont totalement standardisés et en partie automatisés. Par contre, nous fournissions nous-même les amorces.

Les tubes contenant les produits PCR sont envoyés, avec deux autres tubes de 1,5 ml contenant chacun une solution d'amorce à 5  $\mu$ M, chez Macrogen qui se charge de la purification et du séquençage. Un séquençage est réalisé à partir de chacune des 2 amorces, il s'agît donc d'un
séquençage "*Forward*" et "*Reverse*". Ceci nous permet en assemblant les deux séquences obtenues, de diminuer la probabilité d'erreur due au séquençage. Nous recevons les séquences par mail au bout d'une semaine environ en format 'texte' et 'ab1', ainsi qu'un fichier 'pdf' de la réaction de séquençage afin de pouvoir juger de la qualité des séquences.

#### II. 1. 3. Analyse génétique

#### II. 1. 3. 1. Nettoyage et alignement des séquences

Le «nettoyage» des séquences est la vérification visuelle de la bonne interprétation automatique des chromatogrammes. Il s'agit de vérifier la correspondance entre les chromatogrammes et les séquences de chaque individu, qui n'est pas toujours bien établie dans la partie 5' des séquences. Les éventuelles erreurs d'interprétation ont été repérées et corrigées à l'aide du logiciel BioEdit v.5.0.6 (Hall, 2001).

Au fur et à mesure que les séquences étaient considérées comme «propres», elles étaient alignées, toujours sous BioEdit qui utilise l'algorithme Clustal W (Thompson *et al.*, 1997), et corrigées manuellement. On a pris soin de toujours les nommer selon un format Pays\_localité\_option où «option» est une extension optionnelle permettant de distinguer deux séquences d'individus distincts d'une même population, par exemple un numéro d'extraction.

#### II. 1. 3. 2. Analyse de la diversité génétique

Pour chaque gène, le nombre de sites polymorphes, le nombre de sites informatifs en parcimonie, le taux de transitions/transversions (R) et la fréquence nucléotidique ont été calculés, et le test de modèle de substitution effectué, en utilisant le logiciel MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Pour déterminer la variation génétique de C. maculatus, le nombre d'haplotypes du gène mitochondrial et d'allèles du gène nucléaire de même que les diversités haplotypique et nucléotidique ont été calculés à l'aide du logiciel DnaSP version 5.10.01 (Librado & Rojas, 2009). L'indice de diversité haplotypique (génique) est défini comme la probabilité que deux allèles ou haplotypes tirés au hasard dans un échantillon soient différents (Nei, 1987), tandis que la diversité nucléotidique est définie comme étant la probabilité que deux sites nucléotidiques homologues choisis au hasard soient différents. La structure des codons des séquences du CytB a été vérifiée en les transformant en acides aminés à l'aide du logiciel MEGA et n'a révélé aucune évidence de pseudo gènes nucléaires putatifs (NUMTS ; Lopez et al., 1994) dans l'ensemble de nos données. Finalement, nous avons cherché la preuve de recombinaison (phénomène conduisant à l'apparition, dans une cellule ou dans un individu, de gènes ou de caractères héréditaires dans une association différente de celles observées chez les cellules ou individus parentaux) dans les séquences du gène 28S, en utilisant les méthodes implémentées dans le logiciel «Recombination Detection Program» (RDP) version Béta 4.5 (Martin et al., 2010).

### II. 1. 3. 3. Analyse de la structure génétique

La structure génétique des populations a été investiguée avec une analyse de la variance moléculaire (AMOVA : Analysis of Molecular Variance, Excoffier et al., 1992). L'AMOVA est une analyse de variance/covariance des fréquences haplotypiques (ou alléliques), qui en plus des informations de ces fréquences, utilise les données moléculaires en prenant en compte le nombre de substitutions entre les haplotypes (ou les allèles). Il s'agit d'une analyse de la variance mesurée à chaque niveau de la structure (intra-population, inter-population intra-groupe et inter-groupe, où ici, un groupe représente un pays et les populations représentent les localités d'échantillonnage). Toutes les AMOVAs de même que la différenciation génétique entre paires de populations ont été calculées à l'aide du logiciel ARLEQUIN v3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010), en calculant l'indice de différentiation F (Wright, 1969 ; Weir & Cockerham, 1984) classiquement utilisé pour décrire la répartition de la variabilité génétique entre et au sein des populations. Plus F approche la valeur de un, plus les populations sont structurées génétiquement entre elles. Un test de permutation (1000 bootsraps) pour évaluer le niveau de signification de la différenciation par paire de localités a été appliqué en suivant l'approche décrite dans Excoffier et al. (1992). La distance génétique (d) entre paires de populations a été calculée sous MEGA, en utilisant le modèle Kimura (1980) 2-paramètre (K2P). L'isolement par la distance (IPD) a été examiné par un test de Mantel avec le logiciel XLSTAT 2012 (Addinsoft, Paris, France), testant la corrélation entre la matrice des distances génétiques (d) et la matrice des distances géographiques euclidiennes (en km) générée dans Franson CoordTrans 2.3 (GpsGate AB, Johanneshov, Sweden) à partir des coordonnées géographiques de chaque localité de collection. Le coefficient de corrélation de Kendall a été utilisé et le niveau de significativité a été testé en se basant sur 50.000 permutations aléatoires.

#### II. 1. 3. 4. Les analyses phylogénétiques

Les relations phylogénétiques entre les populations de *C. maculatus* ont été estimées par la méthode de l'inférence bayésienne avec le logiciel MrBayes v. 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Nous avons utilisé le Critère d'Information d'Akaike (Akaike Information Criterion, AIC) pour estimer le meilleur modèle d'évolution pour chaque jeu de séquence, tel que sélectionné dans Paup et MrModeltest v2.2 (Nylander, 2004). Le modèle sélectionné pour le 28S est le HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) et celui sélectionné pour le CytB est le GTR+I+G. Les analyses ont d'abord été exécutées indépendamment sur chaque locus, puis sur le jeu de données combiné, considéré comme une supermatrice. Une analyse complète a été effectuée deux fois pour chaque jeu de données, et pour chacune d'entre elle, nous avons fait tourner 5.000.000 générations sur 4 chaînes MCMC. Les arbres et les paramètres ont été échantillonnés toutes les 1000 générations ce qui permet d'échantillonner 5000 arbres. Le programme Tracer version 1.3 (Rambaut & Drummond, 2007) a été utilisé pour vérifier la

convergence des chaînes. Le calcul des vraisemblances et des probabilités postérieures a été effectué sans les 2500 premiers arbres ce qui donne un total de 5000 arbres analysés. Les reconstructions ont été enracinées avec des séquences homologues de l'espèce *Callosobruchus subinnotatus*.

Pour chaque gène, l'algorithme de Templeton *et al.* (1992) a été utilisé pour estimer le réseau de relations haplotypiques ou alléliques. Les réseaux ont été construits à l'aide du logiciel TCS version 1.21 (Clement *et al.*, 2000).

#### II. 1. 3. 5. Histoire démographique des populations

L'histoire démographique de C. maculatus en Afrique de l'Ouest a été étudiée en calculant les indices de Tajima D (Tajima, 1989) et de Fu's Fs (Fu, 1997) et en analysant la disparité de distribution (mismatch distributions, Roger & Harpending, 1992). Les indices de Tajima's D et de Fu's Fs sont connus pour être sensibles aux écarts à l'équilibre mutation-dérive en raison des changements de tailles de populations (expansion, goulot d'étranglement...) et de la sélection (Ramirez-Soriano et al., 2008). Ces paramètres statistiques ont été calculés en utilisant DnaSP (Librado & Rojas, 2009), et le niveau de significativité a été évalué après 10.000 simulations coalescentes. Sous condition de taille constante de la population on s'attend à ce que les indices D de Tajima et Fs de Fu s'approchent de zéro, alors que des valeurs significativement négatives ou positives suggèrent des expansions soudaines des populations ou des goulots d'étranglement, respectivement. Des valeurs de Fs significativement négatives et celles de D non négatives suggèrent une expansion démographique récente tandis que l'opposé suggère la sélection. Les analyses de mismatch distributions comparent la distribution observée avec celle attendue du nombre de mésappariements nucléotidiques entre paires de séquences. Les valeurs attendues ont été construites en supposant une taille de population constante ; une récente croissance rapide de la population induit une distribution unimodale tandis qu'une distribution multimodale caractérise une population à l'équilibre démographique (Rogers & Harpending, 1992). La somme des carrés des déviations (SSD) entre les distributions observées et attendues de même que l'indice d'irrégularité (rg) de la distribution observée des classes non concordantes ont été calculés comme tests statistiques en utilisant le logiciel ARLEQUIN (Excoffier & Lischer, 2010).

#### II. 2. Résultats

#### II. 2. 1. Diversité génétique

La longueur des séquences analysées du gène 28S est de 520 paires de base (pb). Les séquences sont peu polymorphes: 102 individus présentent 9 allèles différents dont 4 sont uniques. La différence entre les allèles est due à 5 sites variables dont 3 sont informatifs en parcimonie. La diversité haplotypique est de 0,33 +/- 0,059 alors que la diversité nucléotidique est de 0,0006 +/- 0,0001 (Tableau II-1). Les diversités haplotypique et nucléotidique des différentes populations pour le

gène 28S sont représentées dans le tableau II-2. La diversité haplotypique a varié de 0,000 +/- 0,000 à 0,600 +/- 0,1753, alors que la diversité nucléotidique a varié de 0,000 +/- 0.000 à 0,002145 +/- 0,001745 dans les différentes populations. La diversité haplotypique la plus importante a été obtenue dans les populations d'Assigame, de Gbinga et de Tsévié, toutes originaire du Togo. Les diversités génétiques à Benkorowéré (Mali) et à Tambacounda (Sénégal) sont nulles, aucune variation n'a été notée dans les populations de ces localités pour le gène 28S. La diversité nucléotidique la plus importante est obtenue dans la population de Sikasso au Mali.

Les paramètres de la diversité génétique du gène CytB sont représentés sur le tableau II-1. Comme prévu pour le codage des protéines, aucune insertion, délétion ou codon stop n'étaient présent dans les séquences analysées. Ces résultats supportent la conclusion que les séquences représentent bien l'ADN mitochondrial et non des pseudogènes nucléaires. Quarante-six sites variables ont été détectés, trente d'entre eux sont informatifs en parcimonie, sur les 456 pb analysés. Les 98 séquences du gène CytB donnent 44 haplotypes, 23 d'entre eux étant uniques. Les valeurs de la diversité génétique et de la diversité nucléotidique sont plus élevées pour le CytB que pour le 28S (0,97 +/-0,007 et 0,0121 +/- 0,0006, respectivement). La diversité haplotypique des différentes populations pour le gène CytB est représentée dans le tableau II-2. Elle a varié de 0,000 +/- 0,000 à 1,00 +/- 0,126, alors que la diversité nucléotidique a varié de 0,000 +/- 0,000 à 0,0180 +/- 0,0118. La diversité haplotypique la plus importante a été obtenue dans la population de Tenkodogo au Burkina Faso, alors que la diversité nucléotidique la plus importante a été obtenue dans la population de Gbinga (Togo). Les individus de la population de Tambacounda comme pour le gène 28S ne montrent aucune variation (un seul haplotype trouvé).

	28S	CytB
Taille des échantillons	102	98
Longueur des séquences	521	456
Nombre de sites variables	5 (0, 96%)	46 (10, 10%)
Nombre de sites informatifs en parcimonie	3 (60%)	30 (65, 22%)
Taux de Trs/Trv (R)	16,542	16,886
Diversité haplotypique (Dh)	0,33 +/- 0,059	0,97 +/- 0,007
Diversité nucléotidique ( $\pi$ )	0,0006 +/- 0,0001	0,0121 +/- 0,0006
Nombre d'alleles/haplotypes	9	44

 Table II-1. Les paramètres de la diversité génétique des gènes 28S et CytB pour les populations de Callosobruchus maculatus

						6.7						
		28S				CytB						
Pays	Localité											
		Taille échantillon	Nombre d'allèles	Diversité haplotypique (+/- SD)	Diversité nucléotidique (+/- SD)	Taille échantillon	Nombre d'haplotypes	Diversité haplotypique (+/- SD)	Diversité nucléotidique (+/- SD)			
Burkina Faso	Tenkodogo	9	3	0,42 +/- 0,191	0,0020 +/- 0,0020	5	5	1,00+/-0,126	0,0136 +/- 0,0091			
Mali	Bougoudéré	10	1	0,00 +/- 0,000	0,0000 +/- 0,0000	10	8	0,96+/-0,059	0,0124 +/- 0,0073			
	Sikasso	10	4	0,53 +/- 0,180	0,0041 +/- 0,0030	10	4	0,78+/-0,091	0,0086 +/- 0,0053			
Niger	Niamey	4	2	0,20 +/- 0,154	0,0004 +/- 0,0010	10	7	0,93+/-0,062	0,0087 +/- 0,0054			
Senegal	Coki	9	2	0,22 +/- 0,166	0,0004 +/- 0,0010	5	6	0,89+/-0,075	0,0108 +/- 0,0065			
	Fouta	8	2	0,25 +/- 0,180	0,0005 +/- 0,0011	5	4	0,90+/-0,161	0,0150 +/- 0,0100			
	Kébémer	9	2	0,22 +/- 0,166	0,0004 +/- 0,0010	10	3	0,64+/-0,101	0,0065 +/- 0,0042			
	Tambacounda	9	2	0,00 +/- 0,000	0,0000 +/- 0,0000	10	1	0,00+/-0,000	0,0000 +/- 0,0000			
Togo	Adidogome	4	2	0,50 +/- 0,265	0,0010 +/- 0,0012	4	2	0,50 +/- 0,265	0,0077 +/- 0,0060			
	Assigame	5	2	0,60 +/- 0,175	0,0012 +/- 0,0013	5	4	0,90 +/- 0,161	0,0057 +/- 0,0043			
	Dapaong	5	2	0,50 +/- 0,265	0,0011 +/- 0,0012	5	4	0,90 +/- 0,161	0,0105 +/- 0,0072			
	Gbinga	5	2	0,60 +/- 0,175	0,0012 +/- 0,0013	4	3	0,90 +/- 0,161	0,0180 +/- 0,0118			
	Mango	5	2	0,40 +/- 0,237	0,0010 +/- 0,0010	5	3	0,80 +/- 0,164	0,0087 +/- 0,0061			
	Tsévié	10	1	0,60 +/- 0,175	0,0012 +/- 0,0013	10	4	0,83 +/- 0,222	0,0102 +/- 0,0075			

 Table II-2. Diversité génétique des différentes populations de C. maculatus pour le 28S et le CytB.

#### II. 2. 2. Structure génétique des populations

Les résultats des analyses moléculaires de variance sur les populations de *Callosobruchus maculatus* sont présentés sur le tableau II-3. L'analyse de la variance moléculaire de l'ADN des deux régions n'a montré aucune variation génétique significative entre les cinq groupes (pays ; P > 0,05), ce qui suggère des échanges génétiques entre les populations de ces régions. L'AMOVA ne montre aucune variation significative pour le gène 28S entre les populations d'un pays ou à l'intérieur des populations. Par contre pour le gène CytB, une variation génétique significative a été notée aussi bien entre les populations d'un pays qu'à l'intérieur des populations. Les résultats de l'AMOVA pour les deux gènes montrent que plus de 73% de la variation génétique observée est expliquée par la variation au sein des populations.

La valeur globale de Fst pour le gène 28S est de 0,041 (P = 0,13). Selon la comparaison de la différenciation génétique par paire (Fst), seule la population provenant de la localité de Gbinga (Togo) est différente de certaines autres (à l'exception des populations de Assigame, Dapaong, Mango et Tsévié ; tableau II-4). Pour le CytB, la valeur globale du Fst est de 0,26 (P < 0,0001). La valeur de Fst entre les 14 populations varie de -0,05769 à 0,84127 (tableau II-5). Quarante-six paires de populations n'ont montré aucune différenciation génétique significative (P > 0,05), ce qui suggère que la plupart des populations forment un groupe génétique homogène. Spécialement, la valeur maximum de Fst a été trouvée entre les populations SnT au Sénégal et TAs au Togo, tandis que la valeur minimale de Fst s'est produite entre les populations TAs et TMa toutes les deux originaires du Togo. En se basant sur les résultats obtenus avec le test de Mantel, nous ne pouvons pas rejeter l'hypothèse nulle de l'absence de corrélation entre la distance géographique et la distance génétique dans nos données (r = 0,129, P = 0,52 pour 28S ; r = 0,135, P = 0,17 pour CytB). Ainsi, nous ne pouvons pas conclure à l'existence d'un isolement par la distance dans les populations ouest africaines de *C. maculatus*.

**Tableau II-3** : Résultats de l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) pour l'analyse populationnelle de*C. maculatus* avec les marqueurs 28S et CytB séparément

Gène	Source de variation	Somme des carrés	Pourcentage de variation (%)	F (P value)
28S	Entre groupes (pays)	1.173	1.69	Fct = 0.017 (P = 0.33)
	Entre populations au sein des groupes	1.254	2.38	$Fst = 0.041 \ (P = 0.13)$
	A l'intérieur des populations	16.897	95.93	Fsc = 0.024 (P = 0.21)
CytB	Entre groupes (pays)	25.55	4.23	$Fct = 0.042 \ (P = 0.25)$
	Entre populations au sein des groupes	28.679	21.8	$Fst = 0.26 \ (P < 0.0001)$
	A l'intérieur des populations	122.4	73.97	$Fsc = 0.23 \ (P < 0.001)$

 Tableau II-4 : Les valeurs de la différentiation génétique (Fst) (en bas) et de la distance génétique (d) (en haut) entre les 14 populations de C. maculatus pour le

 gène 28S

Localités	Bf	MaB	MaS	NiN	SnC	SnF	SnK	SnT	TAd	TAs	TDa	TGb	ТМа	TTs
Bf		0.00043	0.00074	0.00063	0.00043	0.00062	0.00043	0.00043	0.00092	0.00121	0.00092	0.00160	0.00082	0.00121
MaB	0.01235		0.00039	0.00019	0.00000	0.00024	0.00000	0.00000	0.00049	0.00078	0.00049	0.00117	0.00039	0.00078
MaS	-0.04790	0.10101		0.00058	0.00039	0.00063	0.00039	0.00039	0.00088	0.00117	0.00117	0.00088	0.00078	0.00156
NiN	0.00845	0.00000	0.09259		0.00019	0.00044	0.00019	0.00019	0.00068	0.00097	0.00097	0.00068	0.00058	0.00136
SnC	0.00000	0.01235	0.08047	0.00062		0.00024	0.00000	0.00000	0.00049	0.00078	0.00078	0.00049	0.00039	0.00117
SnF	-0.05059	0.02946	0.06730	0.00298	0.00087		0.00024	0.00024	0.00073	0.00073	0.00102	0.00141	0.00063	0.00102
SnK	0.00000	0.01235	0.08047	0.00062	-0.12500	0.00087		0.00000	0.00049	0.00049	0.00078	0.00117	0.00039	0.00078
SnT	0.00000	0.00000	0.08676	-0.01124	0.00000	0.01562	0.00000		0.00049	0.00078	0.00117	0.00049	0.00039	0.00078
TAd	-0.05155	0.24528	-0.00560	0.08142	0.06596	0.05023	0.06596	0.21739		0.00126	0.00126	0.00097	0.00088	0.00165
TAs	0.07419	0.41748*	0.08098	0.27336	0.25344	0.23255	0.25344*	0.39189	0.14847		0.00093	0.00101	0.00088	0.00086
TDa	0.07419	0.41748*	0.08098	0.27336	0.25344	0.23255	0.25344*	0.39189	0.14847	-0.25000		0.00101	0.00088	0.00086
TGb	0.22645*	0.64286*	0.17819*	0.49881*	0.47752*	0.45449*	0.47752*	0.62185*	0.34783*	-0.15385	-0.15385		0.00107	0.00109
ТМа	-0.04077	0.14894	0.01722	0.03955	0.02951	0.01975	0.02951	0.12621	0.00641	-0.13636	-0.13636	0.10714		0.00068
TTs	-0.05155	0.24528	-0.00560	0.08142	0.06596	0.05023	0.06596	0.21739	0.00000	-0.22642	-0.22642	-0.00515	-0.28099	

**Tableau II-5** : Les valeurs de la différentiation génétique (Fst) (en bas) et de la distance génétique (d) (en haut) entre les 14 populations de *C. maculatus* pour le gène CytB

Localités	Bf	MaB	MaS	NiN	SnC	SnF	SnK	SnT	TAd	TAs	TDa	TGb	TMa	TTs
Bf		0.01319	0.01196	0.01159	0.01260	0.01426	0.01696	0.01619	0.01369	0.01026	0.01167	0.01493	0.01098	0.01154
MaB	0.00474		0.01062	0.01279	0.01143	0.01346	0.01304	0.00886	0.01458	0.01771	0.01201	0.01179	0.01229	0.01211
MaS	0.08594	-0.00186		0.01173	0.01039	0.01250	0.01237	0.00642	0.01277	0.01096	0.01547	0.01022	0.01115	0.01016
NiN	0.04972	0.16376*	0.25290*		0.01228	0.01255	0.01728	0.01244	0.01278	0.01558	0.01110	0.01480	0.00880	0.00780
SnC	0.03171	-0.02681	0.05508	0.19686		0.01251	0.01268	0.00865	0.01379	0.01703	0.01187	0.01124	0.01196	0.01160
SnF	-0.01562	-0.02041	0.07806	0.07918	-0.02498		0.01590	0.01155	0.01549	0.01219	0.01888	0.01404	0.01256	0.01361
SnK	0.44500*	0.26432*	0.3785*	0.55210*	0.30800*	0.3697*		0.00796	0.01741	0.01777	0.02148	0.01136	0.01814	0.01560
SnT	0.56100*	0.29444*	0.3218*	0.64680*	0.37040*	0.5087*	0.58642*		0.01164	0.01198	0.01020	0.01561	0.01198	0.00665
TAd	0.19520	0.26093*	0.3431*	0.34070*	0.29200*	0.24053	0.59694*	0.81221*		0.01233	0.01413	0.01502	0.01425	0.01233
TAs	0.04350	0.19685*	0.3125*	0.04564	0.24120*	0.14234	0.64286*	0.84127*	0.45827*		0.00940	0.01491	0.01509	0.00692
TDa	-0.04960	0.02398	0.05830	0.13674	0.08934	0.05229	0.47560*	0.62471*	0.33764*	0.12736		0.01573	0.01084	0.01357
TGb	0.18070	0.01189	0.08033	0.36700*	0.04739	0.07912	0.29387*	0.47269*	0.39506*	0.4728*	0.22321		0.01720	0.01469
TMa	-0.03660	0.10600	0.21093	-0.00389	0.15898	0.04255	0.58735*	0.74603*	0.32051*	-0.05769	0.09836	0.3478*		0.01517
TTs	0.00550	0.15006	0.17370*	0.17690*	0.17330*	0.11137	0.48237*	0.56978*	0.06297	0.2012*	0.07670	0.14847	0.10294	

### II. 2. 3. Analyses phylogénétiques

L'arbre phylogénétique inféré par la méthode bayésienne pour le 28S de même que celui obtenu avec les deux gènes combinés ne sont pas résolus (annexes 4 et 5). Le réseau d'allèles obtenu avec le 28S est caractérisé par une forme en étoile avec tous les allèles dérivant d'un allèle de base unique (a1). Cet allèle représente 81,4 % de nos données et est présent dans toutes les localités échantillonnées. Les connexions entre l'allèle central et les allèles les moins fréquents varient d'un à cinq pas mutationnels. Le deuxième allèle le plus fréquent (a9) est trouvé chez neuf individus du Togo et provient directement de l'allèle de base par un pas simple. Tous les autres allèles sont partagés au maximum par deux individus. Quatre allèles privés (trouvés dans une population seulement) ont été identifiés (figure II-4).

Pour le CytB, nous avons observé une variation génétique beaucoup plus élevée que pour le 28S. L'arbre phylogénétique obtenu par l'inférence bayésienne est polytomique à la base, cependant différents clades ont été identifiés (branches supportées par des valeurs de probabilité postérieure supérieures à 0,50). Dix clades (I à X) et un grade ont ainsi été identifiés. Les clades VII et IX ont une large répartition géographique. Les clades I, VIII (excepté un individu provenant Tenkodogo au Burkina Faso) et X (excepté un individu provenant de Coki au Sénégal) sont composés par des individus provenant du Togo. Les clades I à V sont composés chacun par deux individus provenant de la même localité (Figure II-5). Dans le réseau d'haplotype, les haplotypes les plus fréquents sont h1 et h30 comprenant chacun 10 individus. L'haplotypes h1 est distribué dans tous les pays, alors que h30 est présent seulement dans la partie orientale du Sénégal. L'haplotype h6 est retrouvé chez six individus provenant du Mali, du Sénégal et du Togo. Tous les autres haplotypes sont composés par au plus quatre individus et 23 haplotypes uniques ont été identifiés.



**Figure II-4** : Relations phylogénétiques et distribution spatiale des allèles retrouvés dans le gène 28S de *C. maculatus*. (A) Réseau d'allèles montrant la relation entre les différents allèles. Les branches représentent le nombre de pas de mutation entre deux allèles. Les tailles des ellipses sont proportionnelles à la fréquence observée de chaque allèle. (B) Distribution spatiale des allèles, les parts des camemberts correspondant à la fréquence de chaque allèle et les couleurs se référant au réseau d'allèle



**Figure II-5** : Relations phylogénétiques et distributions spatiales des haplotypes retrouvés dans le gène CytB de *C. maculatus*. (A) Relations phylogénétiques des haplotypes de *C. maculatus* obtenues par l'inférence bayésienne. Les valeurs sur les branches représentent le support des nœuds dérivant de la probabilité postérieure bayésienne (seules les valeurs supérieures à 0,5 sont montrées). (B) Réseau d'haplotypes montrant les relations entre les différents haplotypes. Les branches représentent le nombre de pas de mutation entre deux haplotypes. Les tailles des ellipses sont proportionnelles à la fréquence observée de chaque haplotype. (C) Distribution spatiale des haplotypes, les parts des camemberts correspondant à la fréquence de chaque haplotype et les couleurs se référant aux haplotypes dans le réseau

#### II. 2. 4. Expansion démographique

Les tests statistiques de neutralité sont négatifs pour les deux gènes. Pour le 28S, l'indice D de Tajima de même que l'indice Fs de Fu sont significativement négatifs (Tajima's D = -1.4645, P = 0.005; Fu's Fs = -4.4142, P = 0.0026). Pour le CytB, seul le Fs de Fu est significativement négatif (Fu's Fs = -29.92, P < 0.001), alors que le D de Tajima est négatif mais de façon marginalement significative (Tajima's D = -1.2571, P = 0.083). Ces résultats rejettent l'hypothèse nulle d'une taille constante de la population et suggèrent une expansion démographique rapide. Cette tendance a été confirmée par les analyses de *mismatch distributions* (Figure II-6) qui n'ont montré aucun écart significatif de la distribution observée par rapport à celle attendue pour les deux gènes (28S *PSSD* = 0.55 et CytB *PSSD* = 0.99). L'indice d'irrégularité (rg) confirme la distribution unimodale caractéristique d'une expansion démographique (28S *P.rg* = 0.56 et CytB *P.rg* = 0.97).



**Figure II-6** : Courbes de mismatch distributions des paires de base pour les spécimens ouest africains de *C. maculatus* montrant les fréquences attendues et observées (trait plein et pointillé respectivement) des différences par paire entre les échantillons. A : 28S. B : CytB

### **II. 3. Discussion**

*Callosobruchus maculatus* est un insecte ravageur, dont diverses approches ont été utilisées pour l'étude de ses populations ; cependant peu d'entre elles ont été consacrées à l'aspect génétique. Ce présent travail est la première étude traitant de la structure génétique de *C. maculatus* en Afrique, sa probable région d'origine (voir chapitre suivant).

L'analyse du gène 28S montre une faible variation génétique avec seulement 9 allèles retrouvés parmi les 102 spécimens séquencés et un allèle majoritaire présent dans toutes les localités échantillonnées (tableau II-1). Ce résultat n'est pas surprenant, puisque le gène 28S est connu pour sa faible variation génétique intra-populationnelle (voir par exemple Vink *et al.*, 2003 ; Kavar *et al.*, 2006 ; Ndong *et al.*, 2011). Cependant, le gène 28S dans le cadre de cette étude nous a fourni quelques informations, étant donné que le deuxième allèle le plus représenté se trouve uniquement dans les populations provenant du Togo, ce qui suggère une tendance à une différenciation génétique entre ces dernieres et le reste de nos données.

Le gène mitochondrial du CytB est l'un des gènes les plus régulièrement utilisés dans des études sur l'évolution moléculaire et la structuration des espèces d'insectes ravageurs (voir par exemple Sezonlin *et al.*, 2006 ; Sembène *et al.*, 2010). Il est probablement le gène le mieux connu, qui respecte la structure et la fonction de son produit protéique (Esposti *et al.*, 1993). L'analyse des séquences du CytB révèle un niveau élevé de variation génétique dans les populations de *C. maculatus*, avec 44 haplotypes retrouvés dans les 98 séquences analysées (tableau II-1), comme cela a déjà été montré chez d'autres insectes (exemple voir Sezonlin *et al.*, 2006 ; Torres-Leguizamòn *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2011). Les niveaux de diversité génétique et nucléotidique que nous avons mis en évidence au cours de cette étude tombent dans les gammes standards de la diversité génétique d'insectes ravageurs (Sezonlin *et al.*, 2006 ; Franco *et al.*, 2010 ; Torres-Leguizamòn *et al.*, 2011).

Toute méthode visant à supprimer ou atténuer l'impact d'une espèce nuisible sur d'autres passe nécessairement par une bonne connaissance de sa structure. Jusqu'à présent, peu d'informations étaient disponibles sur la structure génétique de *C. maculatus*. Les résultats des analyses AMOVA pour les séquences des deux gènes (28S et CytB) séparément ont montré que plus de 73 % de la variation génétique observée est expliquée par la variation au sein des populations (tableau II-3). Par contre en se basant sur les valeurs globales de Fct entre les groupes (pays) et sur la phylogénie et les réseaux d'haplotypes (figures II-4 et II-5), nous n'avons trouvé aucune preuve d'une forte subdivision de l'échantillon total, à l'exception de quelques populations provenant du Togo, qui montrent une différentiation génétique significatif. Ceci pourrait indiquer qu'un flux de gène à grande échelle se produit entre les populations ouest africaines de *C. maculatus*, une observation similaire à celles faites sur d'autres insectes ravageurs tels que le puceron *Sitobion avenae* F. (Xu *et al.*, 2011) en Chine, les

Coléoptères *Phyllodecta vulgatissima* L. et *P. vitellinae* L au Royaume-Uni (Batley *et al.*, 2004) ou *Plutela xylostella* (L.) (Endersby *et al.*, 2006). Elles contrastent en revanche avec celles faites par Alvarez *et al.* (2005) chez *Acanthocelides obvelatus* (Bridwell) ou par Torres-Leguizamòn *et al.* (2011) chez *Tecia solanivora* Povolny, études réalisées toutefois sur une plus grande échelle spatiale.

Nos résultats suggèrent donc que la dispersion et la taille de la population sont assez grandes pour que *C. maculatus* se comporte comme une unité panmictique, ou que l'équilibre migration-dérive n'ait pas été atteint. En effet, l'absence de structure génétique observée dans notre étude pourrait s'expliquer par (i) un évènement de dispersion à grande échelle, (ii) une grande taille efficace de la population et/ou (iii) la présence d'un polymorphisme ancestral partagé par les différentes populations ouest africaines de *C. maculatus*, en raison d'une divergence récente de la population. A notre avis, les évènements de dispersion à grande échelle devraient être une composante importante de cette tendance à cause de la probable médiation humaine sur les échanges génétiques entre les populations. En effet, notre échantillonnage comprend plusieurs populations des pays membres du *Comité Permanent Inter-Etats de Lutte contre la Sécheresse dans le Sahel* (CILSS, comprenant notamment le Burkina Faso, le Mali, le Niger et le Sénégal) dont l'un des objectifs est de promouvoir et de faciliter le commerce dans la région, y compris des graines de niébé. Or le Togo ne participe pas à ce comité, ce qui peut expliquer au moins partiellement la différenciation entre les populations de ce pays et celles du reste des pays échantillonnés.

La structure du gène CytB retrouvée dans nos données n'est pas associée à la répartition géographique ; par exemple une différenciation génétique relativement forte est observée entre les populations de Coki et de Kébémer (tableau II-5), alors que ces deux localités ne sont distantes que de 50 km. Ce résultat suggère que la sélection et la dérive peuvent agir fortement au niveau local, un scénario qui serait en accord avec la large utilisation d'insecticides par les agriculteurs dans les populations échantillonnées. En Afrique de l'Ouest, *C. maculatus* est le ravageur le plus dévastateur dans les stocks de graines de niébé, causant de fortes pertes économiques, de sorte que les agriculteurs utilisent le plus souvent des produit chimiques pour bien conserver leurs récoltes (Ajayi & Wintola, 2006 ; Yusuf *et al.*, 2011). Ceci pourrait conduire à une baisse récurrente de la taille efficace des populations locales d'insectes qui sont sous la pression permanente de produits chimiques.

Cependant, il faut signaler que la répartition géographique de la ressource alimentaire peut aussi limiter la dispersion de certains individus et contribuer à la sous-structuration (figure II-5A) observée au cours de cette étude. Il est également important de se poser la question sur le rôle de la variété hôte sur la structure génétique de *C. maculatus*, car cela peut être un facteur important qui influe sur la structure génétique et la différenciation des espèces de Coléoptère nuisibles (voir par exemple Sembène *et al.*, 2012 pour *Caryedon serratus*, la bruche de l'arachide). La formation d'écotypes peut alors être fonction des variétés de niébé sur lesquelles les échantillons de *C. maculatus* 

ont été prélevés, de la même manière que le niveau d'infestation des stocks et des champs de niébé dépend du cultivar et / ou des plantes hôtes sauvages environnantes (Kébé & Sembène, 2011). Cependant, un échantillonnage plus large avec une étude génétique plus fine seraient nécessaire pour tester ces hypothèses.

Finalement, nos analyses de l'histoire démographique de *C. maculatus* suggèrent une récente expansion démographique des populations en Afrique de l'Ouest. En effet, les indices de Tajima's *D* et de Fu's *Fs* sont significativement négatifs pour le gène 28S et ont montré un support modéré pour une expansion de la taille de la population pour le gène CytB, ce qui est confirmé par les courbes de *mismatch distributions*. Les résultats différents entre les deux loci peuvent s'expliquer par le fait que l'ADN mitochondrial est supposé répondre d'une manière forte à des changements dans la taille de la population à cause de sa petite taille efficace de population par rapport aux loci nucléaires (O'Neill, 2009).

Les résultats de cette étude nous ont permis de constater une faible variation des séquences du 28S chez les populations ouest africaines de *C. maculatus*, bien qu'elles nous aient fournit certaines informations, puisque le deuxième allèle le plus représenté est présent uniquement dans les populations togolaises. En revanche, les séquences obtenues chez le gène CytB ont montré une variabilité relativement importante entre les individus, même si la différenciation génétique entre les populations s'est révélée faible à l'exception de quelques populations togolaises bien différenciées des autres. Ainsi, si les deux régions génétiques analysées nous ont fournit des informations similaires à savoir un flux de gène important en Afrique de l'ouest mais aussi une tendance à un isolement des populations togolaises, nous pouvons noter que le gène mitochondrial est le plus informatif entre les populations de *C. maculatus*. En ce qui concerne l'analyse de l'histoire démographique de *C. maculatus* en Afrique de l'Ouest, les deux gènes concordent pour suggérer une expansion démographique récente, résultat devant être étayé par un échantillonnage plus complet.

# Chapitre III :

# Phylogéographie mondiale des populations de *Callosobruchus maculatus*

La phylogéographie, discipline récente alliée à la biogéographie, s'attache directement à l'histoire des taxons plutôt qu'à celle des aires (Avise, 2009 ; Hickerson et *al.*, 2010). Permettant de tester des hypothèses, la phylogéographie étudie la distribution, dans le temps et dans l'espace, de groupes monophylétiques animaux ou végétaux (Avise *et al.*, 1987). Elle intègre différentes informations issues de la phylogénie et de la génétique des populations pour reconstruire l'histoire évolutive ancienne et récente des organismes. Liée à l'avènement de la génétique moléculaire, la phylogéographie permet de mettre en relation structuration génétique et distribution géographique afin d'identifier les facteurs environnementaux et écologiques responsables de l'organisation génétique des populations (Manel et *al.*, 2003). Ainsi, avec une telle approche il est maintenant possible de mettre en évidence des phénomènes géographiques, géologiques, climatologiques et écologiques affectant la distribution de la diversité génétique (Hickerson et *al.*, 2010).

Les médiations humaines sont connues pour favoriser l'apparition de nouvelles zones de contact des populations d'une espèce, notamment les espèces à faible capacité de dispersion ; ainsi la connaissance des relations phylogéographiques entre les populations d'une telle espèce peut fournir des informations sur les conséquences passées et présentes des activités anthropiques sur la distribution actuelle de ses populations.

*Callosobruchus maculatus* est une espèce ravageuse des graines de légumineuses à travers les régions tropicales et subtropicales du monde. Plusieurs données soulignent sa probable origine africaine et une forte association avec une de ses plantes hôte *Vigna unguiculata* (le niébé). On estime que depuis la domestication et la diffusion de plusieurs espèces de légumineuses, *C. maculatus* est devenu cosmopolite grâce à sa dispersion par l'homme et s'est propagé vers d'autres plantes hôtes. Cependant, à ce jour, aucune preuve solide n'a confirmé son centre d'origine ni ses différentes voies de dispersion.

L'analyse moléculaire des populations de *C. maculatus* collectées dans le monde peut nous aider à reconstituer les évènements majeurs de son histoire évolutive. Aussi une étude phylogéographique de cette espèce peut être d'un intérêt agronomique, puisque la connaissance de l'aire de répartition naturelle des lignées d'une espèce peut donner des informations sur les conditions climatiques dans lesquelles cette espèce a initialement évolué, et peut également guider par ailleurs à la recherche d'agents de lutte biologique (Alvarez *et al.*, 2005).

Dans ce chapitre, nous analysons des échantillons de *C. maculatus* provenant de différentes régions du monde pour tester si une lignée simple ou plusieurs a (ont) contribué à l'expansion mondiale de cette espèce. En utilisant des marqueurs moléculaires, les approches de la phylogénie classique associées à la théorie de la coalescence, nous explorons la divergence des lignées, la dispersion et l'histoire démographique de *C. maculatus*. En résumé, nous visons à (i), inférer la structure géographique de ses différentes lignées, (ii) faire la lumière sur l'origine géographique de *C.* 

*maculatus*, (iii) évaluer ses principales routes de dispersion entre les continents, et (iv) inférer l'évolution de la taille efficace de la population en fonction du temps afin de retracer les évènements qui ont façonné l'histoire démographique récente de *C. maculatus*.

# III. 1. Matériel et méthodes

# III. 1.1. Echantillonnage

Pour obtenir la représentation la plus complète possible de la variation génétique de *C*. *maculatus*, nous avons essayé d'échantillonner dans un maximum de régions géographiques connues pour être habitées par l'espèce (Afrique, Amérique, Australasie). Pour cela nous avons pris contact avec des taxonomistes ce qui nous a permis de disposer de spécimens d'origines différentes dans le monde (Figure III-1 et Annexe 6).



Figure III-1 : Distribution géographique des localités d'origine des populations de C. maculatus

### III. 1. 2. Extraction d'ADN, amplification et séquençage

Le matériel et les méthodes d'extraction de l'ADN des spécimens de C. maculatus sont les mêmes que ceux du chapitre précédent. Quatre gènes, un nucléaire (l'espaceur interne transcrit ITS1) et trois mitochondriaux (le cytochrome b [CytB], le cytochrome oxydase I [COI] et le cytochrome oxydase Π [COII]) ont été amplifiés. Les amorces utilisées sont CIL (5'-GCGTTCGAARTGCGATGATCAA-3') et CIU (5'-GTAGGTGAACCTGCAGAAGG-3') (Vogler & Desalle, 1994) pour l'ITS1, mtD26 (5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3') et mtD28 (5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3') (Simond et al., 1994) pour le CytB, C1-N-2191 (5'-CCAGGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3') C1-J-1751 (5'et GGATCACCTGATATAGCATTCCC-3') (Simond et al., 1994) pour le COI et TL2-J-3037 (5'-ATGGCAGATTAGTGCATG-3') et modC2-N-3661 (5'-CCACAAATTTCGAACATTGACCA-3') (Mardulyn et al., 1997) pour le COII. Les PCR ont été conduites dans un volume réactionnel total de 30 µl contenant 1 U de Taq polymerase, 0,1 mM de dNTP, 3 µl du tampon (10X) QUIAGEN (2,5 mM MgCl2) et 1,0 µl de chaque amorce. Après une dénaturation initiale de 1 min 30 s à 93°C et 36 cycles de dénaturation de 35 s à 93°C, la phase d'hybridation était de 1 min à 47°C pour le COI et de 1 min à 53°C pour le COII. Dans les deux cas, le programme se termine par extension de 2 min à 72°C et une extension finale de 8 min à 72°C. Pour l'ITS1, les conditions de PCR sont similaires à celles du COI et COII, excepté que nous avions 35 cycles de dénaturation et une phase d'hybridation de 1 min à 57°C. Pour le CytB, le programme PCR utilisé est : une phase de dénaturation initiale de 3 min à 94°C, puis 35 cycles de dénaturation (1 min à 94°C), une hybridation (1 min à 47°C) et une élongation (1 min à 72°C), suivie d'une phase d'élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits amplifiés ont été vérifiés par électrophorèse (cf chapitre II). Les ADN amplifiés ont ensuite été purifiés en utilisant le Kit de purification QIAquick (Quiagen, Hilden, Germany) conformément aux instructions du fabricant. Finalement, une réaction de séquençage a été faite en utilisant la solution de BigDye 3.1 (Applied Biosystem, Foster City, USA) et les mêmes amorces déjà utilisées dans la PCR initiale, en utilisant le programme suivant : une dénaturation initiale de 3 min à 96°C, suivie par 30 cycles de 15 s à 96°C, une hybridation de 15 s à 50°C et une extension de 1 min 30 s à 60°C sans une extension finale. Le séquençage automatique a été réalisé dans le Centre de Génomique Intégrative (CGI) de l'Université de Lausanne.

## III. 1. 3. Variation des séquences et structure génétique

Le nettoyage et l'alignement des séquences (mitochondriales et nucléaires) ont été réalisés conformément à ce qui est décrit dans le chapitre II. Comme précédement pour le gène du CytB, la structure des codons de chacun des trois gènes mitochondriaux a été vérifiée et n'a révélé aucune évidence de pseudogènes nucléaires putatifs. Les trois gènes mitochondriaux ont ensuite été combinés

pour obtenir une matrice mitochondriale unique (mt\_matrice). Les paramètres de la diversité génétique des séquences nucléaires et mitochondriales ont été calculés avec les mêmes programmes que ceux utilisés dans le chapitre précédent. Les estimations ont été faites pour l'ensemble des données comprenant toutes les séquences, ainsi que pour chaque région géographique échantillonnée (Afrique, Amérique et Asie+Océanie). Nous avons aussi cherché pour la région nucléaire ITS1 la preuve de recombinaison dans les séquences en utilisant le même programme que pour le 28S.

La structure génétique des populations a été examinée par une AMOVA en se basant sur la différence par paire avec le même programme qu'utilisé dans le chapitre II (ARLEQUIN). Les AMOVA ont été effectuées séparément sur l'ITS1 et la matrice mitochondriale (mt\_matrice). Les groupes définis correspondent aux continents et les populations aux localités échantillonnées dans chaque continent. La signification statistique des valeurs a été obtenue en effectuant 10.000 permutations aléatoires des données.

### III. 1. 4. Analyses phylogénétiques

La «Chaîne de Markov Monte Carlo» (MCMC) a été utilisé pour inférer les relations phylogénétiques entre les spécimens de C. maculatus dans le programme BEAST v.1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007). Les analyses ont été effectuées séparément sur la mt\_matrice et sur l'ITS1. Pour le jeu de données mitochondriales, les données ont été partitionnées par locus et un modèle d'évolution moléculaire distinct a été appliqué à chaque partition. Le meilleur modèle d'évolution a été identifié pour chaque partition mitochondriale et pour l'ITS1 en utilisant le Critère d'Information d'Akaike mis en œuvre dans le programme MrModeltest2 v.2.3 (Nylander, 2004). Le modèle GTR a été sélectionné pour l'ITS1 et le COII et le modèle HKY pour le COI et le CytB. Toutes les quatre régions ont été sujettes à une distribution gamma, avec des sites invariables, excepté le CytB. Les taux de substitution considérés ont été différents pour chaque partition en se basant sur Borer et al. (2010) et Pons et al. (2010) ; un modèle d'horloge relaxée non corrélé en supposant une distribution log-normale des taux a été utilisé (Drummond et al., 2006) et un arbre ultramétrique a été inféré en appliquant un «Yule prior» sur les taux de branchement. Six analyses indépendantes des chaînes MCMC ont été exécutées pour 100.000.000 de génération et les arbres ont été échantillonnés toutes les 1000 générations. Après vérification de la convergence des chaînes sous le programme Tracer version 1.3 (Rambaut & Drummond, 2007), les premiers 10% des arbres de chaque cycle ont été rejetés afin de construire un maximum d'arbres crédibles en utilisant le programme TreeAnnotator v1.4.5 (Drummond & Rambaut, 2007).

Nous avons construit des réseaux statistiques parcimonieux à la fois pour la «mt\_matice» et l'ITS1 dans l'ensemble des jeux de données en utilisant le programme TCS v.1.21 (Clement *et al.*,

2000). La probabilité de parcimonie a été fixée à 95%, indiquant que seuls les haplotypes avec moins de 5% des sites différant selon les critères de parcimonie seraient connectés.

### III. 1. 5. Analyses biogéographiques

Puisque la phylogénie de l'ITS1 n'était pas informative (voir ci-dessous), les analyses biogéographiques ont été réalisées uniquement sur l'ensemble des données mitochondriales. L'arbre ultramétrique généré sous BEAST (voir section analyse phylogéographique) a été utilisé. Pour l'inférence biogéographique, nous avons utilisé le modèle Dispersion-Extinction-Cladogenèse (DEC) implémenté dans le programme LAGRANGE v.2.0.1 (Ree & Smith, 2008). Le modèle DEC est gouverné par un Q matrice des taux de transition instantanés, dont les paramètres sont la dispersion et l'extinction locale décrivant le taux de changement géographique de l'ancêtre au descendant par une expansion d'aire ou une contraction d'aire, respectivement (Ree & Smith, 2008). Le modèle DEC suppose qu'un seul évènement, une simple dispersion ou extinction locale peut se produire en un instant du temps (Ree & Sanmartìn, 2009), mais plusieurs évènements peuvent se produire le long d'une branche. Par conséquent, toute transition qui implique plus d'un évènement reçoit un taux de 0 dans la matrice (Buerki *et al.*, 2011). Nous avons utilisé la méthode de vraisemblance pour tester le modèle nul et les scénarios biogéographiques en se basant sur l'hypothèse de la dispersion ou des voies de migration entre l'Afrique, l'Amérique et l'Asie+Océanie. En suivant les recommandations faites par Buerki *et al.* (2011), ces trois aires continentales ont été définies sur la base de critères géologiques.

### III. 1. 6. Histoire démographique

Comme les taux de substitution ne sont pas disponibles pour la région ITS1, l'histoire démographique mondiale de *C. maculatus* a été étudiée en utilisant les données mitochondriales sur trois ensemble de données différentes : i) échantillons provenant de toutes les régions (jeu de données complet), ii) tous les échantillons d'Afrique, iii) tous les échantillons d'Asie.

Trois méthodes ont été utilisées pour tester l'histoire démographique de *C. maculatus*. Les deux premières méthodes sont les mêmes que celles utilisées dans le chapitre précédent pour inférer l'histoire démographique en Afrique de l'Ouest, c'est-à-dire les tests statistiques de neutralité utilisant le *D* de Tajima et le *Fs* de Fu et la disparité de distribution (*mismatch distributions*). En plus, nous avons calculé l'indice *R2* de Ramos-Onsins & Rojas (2002). Les indices de *Fs* et *R2* sont les plus fiables pour détecter la croissance de population, avec *Fs* plus adapté pour les échantillons de grande taille et *R2* pour les échantillons de petite taille (Ramos-Onsins & Rojas, 2002).

La troisième méthode utilisée est l'«Extended Bayesian Skyline Plot» (EBSP), implémentée sous BEAST. Cette méthode a l'avantage de considérer simultanément l'histoire de coalescence de chaque gène pour caractériser la taille efficace de la population en fonction du temps en utilisant un échantillonnage MCMC. Deux cycles indépendants ont été effectués pour 100.000.000 de générations, et les arbres ont été échantillonnés toutes les 10.000 générations. Puisque les modèles les plus complexes n'ont pas pu converger, nous avons appliqué un modèle d'évolution unique (HKY) et un strict taux de substitution identique pour toutes les partitions (0.862%/million d'années), qui est la valeur moyenne des taux de substitutions connus dans la bibliographie (voir ci-dessus, partie analyse phylogénétique) pour les régions mitochondriales utilisées dans cette étude. Une fois que les deux cycles ont convergé, nous avons combiné les résultats en utilisant LogCombiner 1.5.3 (Drummond & Rambaut, 2007) et calculé la taille de la population en fonction du temps sous BEAST.

# III. 1. 7. Effet de la structure des populations et de l'écart à la panmixie sur les résultats de l'EBSP.

La méthode de l'EBSP repose sur des hypothèses fortes concernant les caractéristiques démographiques de la (des) population (s) (Heled & Drummond, 2008). L'une de ces hypothèses, celle de panmixie, est souvent violée dans les analyses phylogéographiques. Puisque nos résultats suggèrent que C. maculatus montre une structuration génétique en fonction de la géographie (voir ci-dessous), associée à une réduction des échanges génétiques entre les dèmes, nous avons effectué des analyses supplémentaires pour explorer comment la violation de la panmixie peut affecter les résultats de l'EBSP. Jusqu'à présent, à notre connaissance, seules deux études (Pannell, 2003 et Chikhi et al., 2010) ont exploré les conséquences de la structure des populations sur la caractérisation de sa taille efficace en fonction du temps, mais aucune de ces deux n'a abordé le sujet d'un point de vu phylogéographique. Dans cette section, nous avons décidé d'évaluer la cohérence des résultats démographiques obtenus lorsque différents jeux de données réduits ont été considérés en se basant sur une sélection aléatoire d'échantillons prélevés (bootstrap de l'ensemble des données). Nous avons donc effectué les mêmes analyses d'EBSP sur cinq séries de dix ensemble de données rééchantillonnées chacun. Nous avons sélectionné aléatoirement un échantillon par population pour i) toutes les populations échantillonnées ii) toutes les populations africaines iii) toutes les populations asiatiques d'une part, et d'autre part, nous avons sélectionné aléatoirement 30 échantillons «au hasard» dans l'ensemble des jeux de données de iv) toutes les populations échantillonnées et v) toutes les populations africaines. Cette dernière sélection ne pouvait pas être réalisée sur les échantillons provenant d'Asie, puisque elles ont conduit à un ensemble de données identiques à celui d'origine (notre jeu de données globales comprend 30 spécimens asiatiques). Nous devrons être en mesure d'identifier un effet de l'absence de panmixie sur les résultats de l'EBSP, en comparant les résultats provenant des analyses avec échantillonnage aléatoire de 30 individus dans chaque ensemble de données «au hasard» (faible structure génétique) de ceux provenant des analyses «d'un échantillon par population» (structure génétique similaire aux données empiriques) de l'ensemble des données.

### III. 2. Résultats

# III. 2. 1. Variation des séquences d'ADN et structure génétique des populations

Comme attendu pour les gènes codant pour les protéines, aucune insertion, délétion ou codon stop n'ont été décelés dans aucune des séquences des trois gènes mitochondriaux (CytB, COI et COII) soutenant ainsi que les séquences récupérées ne sont pas des pseudogènes nucléaires. Aucun des tests effectués dans l'ensemble des données nucléaires (ITS1) n'a décelé de recombinaison. Les gènes mitochondriaux (1536 pb) contiennent 156 sites variables et parmi eux 109 sont informatifs en parcimonie, alors que l'ensemble des données nucléaires (757 pb) contient 24 sites variables, tous informatifs en parcimonie. Soixante-quatre haplotypes et 27 allèles sont présents dans les gènes mitochondriaux et nucléaire respectivement (Tableau III-1). Les diversités haplotypique et nucléotidique ont été respectivement de 0,98 et 0,010 pour les gènes mitochondriaux, et de 0,89 et 0,00047 pour le gène nucléaire.

Les AMOVAs (tableau III-2) montrent que 12,70% de la variation génétique observée dans les régions mitochondriales est significativement expliquée par la variation entre les groupes (continents), tandis que cette dernière n'a pas tenu compte des explications de la variation dans l'ensemble des données nucléaires. Chez les gènes mitochondriaux et nucléaire, 48,68% et 49,03% de la variation génétique sont significativement expliqués par la variation entre les populations, alors que 38,62% et 53,83% de la variation ont été significativement expliqués par la variation à l'intérieur des populations, respectivement pour les gènes mitochondriaux et nucléaire.

Tableau I	<b>II-1</b> : La diversité	génétique tota	ale	et à l'intérie	eur de ch	aque	e conti	nent	de C. maculat	us	util	isant les
séquences	mitochondriales	(mt_matrice)	et	nucléaires	(ITS1).	N,	taille	des	échantillons	;	H,	nombre
d'haplotyp	es ; h, diversité ha	plotypique ; π,	div	ersité nuclé	otidique							

	ADN m	itoch	ondriaux (CytB/CO	DI/COII)	ADN nucléaire (ITS1)					
Groupes	N	Н	h	π	N	Н	h	π		
Total	102	64	0,98+/-0,006	0,0100+/-0,0003	102	28	0,90+/-0,016	0,0005+/-0,0001		
Afrique	58	38	0,97+/-0,009	0,0102+/-0,0004	59	16	0,86+/-0,025	0,0010+/-0,0001		
Amerique	13	5	0,81+/-0,066	0,0050+/-0,0007	12	9	0,94+/-0,058	0,0004+/-0,0002		
Asie+Océanie	31	22	0,96+/-0,020	0,0101+/-0,0006	31	12	0,89+/-0,033	0,0006+/-0,0003		

	Source de variation	df	Variance (%)	Indices de fixation	P-value
mtDNA	Entre groupes (continents)	2	12,7	Fct = 0,13	0,004
	Entre populations à l'intérieur des groupes	22	48,68	Fst = 0,61	< 0,0001
ITS1	A l'intérieur des populations	77	38,62	Fsc = 0,56	< 0,0001
	Entre groupes (continents)	2	-2,87	Fct = -0.03	0,61
	Entre populations à l'intérieur des groupes		49,03	Fst = 0,46	< 0,0001
	A l'intérieur des populations	77	53,83	Fsc = 0,48	< 0,0001

**Tableau III-2** : Résultats des analyses moléculaires de variance (AMOVA) pour l'ADN mitochondrial (mt\_matrice) et nucléaire (ITS1) de *C. maculatus*. Les résultats sont montrés pour le jeu de données totales

#### III. 2. 2. Analyses phylogénétiques

La phylogénie de l'ITS1 a été très polytomique, et alors qu'elle confirme la monophylie de l'espèce (PS = 1.00), elle n'a pas été informative sur les relations entre les lignées de *C. maculatus* (Annexe 7). En revanche, la phylogénie des gènes mitochondriaux a été très informative (figure III-2). La monophylie de *C. maculatus* a été fortement soutenue (PS = 1.00) et l'ancêtre commun le plus récent de l'espèce a été daté du Pléistocène récent. Les analyses ont montré sept clades très solides (PS > 0.90) et deux qui le sont moins (0.9 > PS > 0.50). De même, les relations entre certains d'entre eux étaient faiblement soutenus. Le clade I (PS = 1.00) est composé par des individus provenant d'Asie et du Brésil. Les clades II (PS = 0.99) et VII (PS = 0.98) comprennent des spécimens provenant d'Afrique de l'Ouest et de la Californie. A l'exception d'un individu provenant du Madagascar, le clade V (PS = 0.75) est formé d'individus provenant d'Asie. Le clade VI (PS = 0.76) comprend des individus provenant d'Afrique de l'Ouest plus un individu de Syrie. Le clade VIII (PS = 0.93) est composé par des spécimens provenant d'Afrique et d'Asie. Finalement, les clades III (PS = 1.00) et IX (PS = 1.00) renferment respectivement des échantillons provenant de la République Démocratique du Congo (RDC) et d'Ouganda.

Le réseau de parcimonie (Annexe 8) obtenu avec les gènes mitochondriaux montre les mêmes groupes que l'arbre phylogénétique obtenu par l'inférence bayésienne. Le réseau d'allèles obtenu avec le gène nucléaire (ITS1) a été plus informatif que l'arbre bayésien avec 27 allèles couvrant l'ensemble des données. Parmi ceux-ci, six allèles majeurs (A1, A3, A4, A5, A6 et A17) et 21 allèles mineurs ont été identifiés. Les 27 allèles se distribuent en 9 groupes (A, B, C, D, E, F, G, H, I) (figure III-3), séparés au moins par trois pas dans le réseau d'allèles. Les groupes A et G ont une distribution mondiale et sont retrouvés sur tous les continents. Les groupes B, C et I (à l'exception d'un individu provenant du Brésil et un provenant d'Ouganda) sont composés d'individus provenant d'Asie. Les allèles du groupe D ont été retrouvés en Afrique et en Amérique du Nord, les groupes E et F en Afrique et au Sud des Amériques respectivement, alors que le groupe H est composé par des individus provenant du Sud des Amériques et du Nord de l'Afrique.



**Figure III-2** : (A) Arbre bayésien obtenu avec les séquences mitochondriales de *C. maculatus* inféré sous BEAST. Les valeurs de probabilité postérieure > 0.5 sont montrées sur les nœuds. (B) Distribution spatiale des clades où les parts des camemberts correspondent à la fréquence des clades dans chaque population



**Figure III-3** : (A) Réseau d'allèles obtenu avec les séquences de l'ITS1 de *C. maculatus* et montrant les différents groupes d'allèles (A à I). Les tailles des ellipses sont proportionnelles à la fréquence observée de chaque allèle. (B) Distribution spatiale des groupes d'allèles où les parts des camemberts correspondent à la fréquence de chaque groupe d'allèles et les couleurs se réfèrent au réseau d'allèle

# III. 2. 3. Analyses biogéographiques

La reconstruction des aires anciennes par le modèle DEC (figure III-4) identifie l'ancêtre commun le plus récent de *C. maculatus* en Afrique. Les scénarios biogéographiques suggèrent que la distribution actuelle de *C. maculatus* a été atteinte suite à cinq évènements de dispersion. Trois d'entre eux se sont faits de l'Afrique vers l'Asie, un de l'Asie vers le Sud des Amériques et un de l'Afrique vers le Nord des Amériques. Nos résultats suggèrent que l'Afrique a été le centre de dispersion de *C. maculatus*.



**Figure III-4** : Reconstruction des aires biogéographiques ancestrales en se basant sur le modèle Dispersion-Extinction-Cladogenèse (DEC). Les parts des camemberts correspondent aux proportions des aires ancestrales (identifiées par les couleurs) dans chaque nœud

#### III. 2. 4. Histoire démographique

Les tests de neutralités de Tajima's D (P = 0,033) et de Fu Fs (P = 0,002) montrent des valeurs significativement négatives sur le jeu de données total, suggérant un évènement d'expansion démographique passée. L'indice R2 de Ramos-Onsins & Rozas (P = 0,035) est significatif et donne les mêmes informations que les indices D et Fs. Ces derniers sont négatifs pour les populations africaines et asiatiques, cependant seul Fs l'a été significativement dans les populations africaines (P = 0.021). L'indice R2 n'a été significatif sur aucun des continents (Tableau III-3).

Dans les analyses de *mismatch distributions*, les fréquences des différences par paires dans les ensembles des données complètes et africaines sont conformes à ce qui est attendu selon un modèle d'expansion démographique (figure III-5). Les indices de *SSD* et rg dérivant des *mismatch distributions* ne sont pas significatifs et donc confirment l'hypothèse d'une récente expansion démographique. Ces résultats sont contraires à ceux observés dans les analyses des populations asiatiques, pour lesquels rg est significatif, indiquant une expansion démographique modérée dans cette région.

Les estimations de l'EBSP pour le jeu de données total indiquent une phase initiale avec taille de population constante, qui se serait terminée il y a environ 13.000 ans, suivie d'une seconde phase de croissance de la taille efficace de la population. Cette croissance continue jusqu'à atteindre un pic il y a environ 230 ans, après lequel l'EBSP suggère une forte diminution de la taille efficace de la population. Cette diminution de la taille efficace de la population. Cette diminution est surprenante puisque nous savons que, en particulier au cours des derniers siècles, cette espèce a connu une forte augmentation de la taille de ses populations en raison de l'augmentation des échanges de graines dans le monde. Ce schéma général a aussi été identifié dans l'ensemble des données africaines et asiatiques. Il est important de noter que bien que ce scénario ait été similaire dans tous les cas, les valeurs des tailles de population diffèrent : environ 170.000 pour le jeu de données complètes, environ 128.000 pour le jeu de données africaines et environ 32.000 pour le

**Tableau III-3** : Indices de Tajima's D de Tajima, F de Fu et R2 de Ramons-Onsins et Rozas, somme des carrés de déviation (*SSD*) et indice d'irrégularité (rg) pour les groupes de populations étudiées

Groupe	D	Fs	<i>R</i> 2	SSD	rg
Total	-1,53*	-21,99*	0,05*	0,0022	0,0048
Afrique	-1,40*	-9,11*	0,06	0,0063	0,0075
Asie	-0,25	-2,93	0,11	0,0130	0,0345*



**Figure III-5** : Courbes de mismatch distributions obtenues avec la matrice mitochondriale (mt\_matrice). L'axe des X représente le nombre de différence par paire et l'axe des Y représente le nombre de données simulées et observées. A, population totale ; B, population africaine ; C, population asiatique



**Figure III-6** : Histoire démographique de la population totale, africaine et asiatique inférer avec la méthode de l'«Extended Bayesian Skyline Plot» (EBSP) qui représente les changements de la taille de population en fonction du temps à partir de la matrice mitochondriale (mt\_matrice)

# III. 2. 5. Effet de la structure des populations et de l'écart à la panmixie sur les résultats de l'EBSP

L'analyse des ensembles de données rééchantillonnées identifie un possible effet de la structure génétique sur les résultats obtenus de l'EBSP. Alors que dans l'ensemble des données sélectionnées «au hasard», le même scénario inattendu d'une baisse démographique au cours des siècles a été retrouvé (figure III-7 A et B), l'effet n'était pas perceptible sur les analyses avec «un individu par population» dans l'ensemble des données (figure III-7 C, D et E). Il apparaît que lorsque la structure génétique (ou l'écart à la panmixie) est forte, comme c'est le cas dans les échantillons «au hasard» de l'ensemble des données devient moins structuré (ou plus panmictique), comme c'est le cas dans «un échantillon par population». Il convient de souligner que les résultats de «un échantillon par population» sur le jeu de données total étaient très congruents avec le temps présumé de l'expansion de cette espèce dans le monde entier. Les phases d'expansion démographique pour l'ensemble des données complètes et africaines auraient débuté il y a environ 11000 et 9400 ans,

respectivement, alors que pour le jeu de données asiatique, l'expansion a été plus récente et aurait commencé il y a environ 800 ans.



**Figure III-7** : Résultats des analyses de l'ensemble de données rééchantillonnées. A : «random, jeu de données total». B : «random, jeu de données africaines». C : «un échantillon par population, jeu de données totales». D : «un échantillon par population, jeu de données africaines». E : «un échantillon par population, jeu de données asiatiques». L'axe des X représente le temps en million d'années et l'axe des Y, les taille efficace de population

#### **III. 3. Discussion**

Dans cette étude, nous avons cherché à élucider l'histoire phylogéographique mondiale de C. maculatus, un insecte cosmopolite étroitement associé avec les graines de ses plantes hôtes durant sa phase larvaire, donc assujetti à la dispersion par l'homme via les échanges commerciaux de semences. Cette étude a été basée sur quatre gènes, un nucléaire et trois mitochondriaux, contrairement aux précédentes études phylogéographiques d'insectes qui n'ont employées qu'une seule région mitochondriale (Mardulyn, 2001; Sezonlin et al., 2006; Rousselet et al., 2010). Nous avons mis l'accent sur le nombre de loci plutôt que sur les tailles d'échantillons, parce que l'augmentation du nombre de loci, comparée au nombre d'échantillons est le moyen le plus efficace pour améliorer l'estimation de la taille de populations (Felsenstein, 2006 ; Heled & Drummond, 2008). Cependant, cela n'empêche pas d'essayer d'avoir les échantillons les plus importants (donc représentifs) possibles (Granjon, com.pers). Alors que Kébé et al. (soumis) ont mis l'accent sur la structuration génétique de C. maculatus à une petite échelle géographique en Afrique de l'Ouest, cette présente étude a été basée sur un échantillonnage de l'espèce dans le monde entier et une combinaison d'outils biogéographiques et de génétique des populations pour inférer les schémas de l'évolution spatiale et temporelle de cette espèce ravageur à l'échelle de son aire de distribution. Une variation spatiale de la structure génétique a été observée chez l'ADN mitochondrial (tableau III-2). Par contre, la région nucléaire (ITS1) n'a pas montré une variabilité suffisante pour être informative dans les analyses. Il est bien connu que les gènes mitochondriaux montrent des tailles efficaces de populations beaucoup plus faibles que les gènes nucléaires (Lynch et al., 2006), et par conséquent tendent à montrer un niveau élevé de fixation d'allèles dans les populations. Dans notre jeu de données, même si une tendance à certains regroupements se retrouve dans l'analyse de l'ITS1, il est probable que le signal démographique et les évènements biogéographiques sont brouillés par le partage d'un niveau élevé de polymorphisme ancestral dû aux grandes tailles efficaces de population. A partir de là, nous avons organisé la discussion sur la base des résultats obtenus avec l'ADN mitochondrial.

#### III. 3. 1. Tendance globale de la structure géographique

L'essentiel de la variance génétique sur l'ADN mitochondrial est observée entre et au sein des populations avec une faible différenciation entre les groupes (continents) (tableau III-2), probablement dûe aux multiples dispersions de *C. maculatus* en dehors de son centre d'origine (voir ci-dessous). Huit des neuf clades identifiés (figure III-2) comprennent des spécimens provenant d'Afrique, et quatre sont exclusifs à l'Afrique. En Afrique, une forte différenciation génétique a été observée entre les populations du centre, de l'est, du nord et de l'ouest, un schéma qui a aussi été identifié dans d'autres espèces. Par exemple, les divergences génétiques observées entre l'Afrique de l'Ouest et la RDC et entre l'Afrique de l'Ouest et l'Ouganda sont similaires à celle trouvée chez

*Busseola fusca* (Sezonlin *et al.*, 2006). Cependant, contrairement à cette dernière étude dans laquelle la date de divergence des lignées a été estimée au début du Pléistocène, la différenciation des lignées chez *C. maculatus* est plus récente et probablement expliquée par l'absence d'échanges de graines de niébé entre ces différentes régions. En Asie, les spécimens sont surtout concentrés dans trois clades, dont l'un est exclusif aux spécimens sud-est asiatiques. En Amérique, la structure génétique des populations est bien marquée avec des spécimens californiens qui sont groupés avec des individus provenant de la région ouest africaine, alors que les spécimens provenant du Brésil ont été regroupés avec des populations asiatiques. Ceci peut être expliqué par le fait que la lignée nord américaine provient de l'Afrique de l'Ouest suite aux échanges importants de graines de légumineuses entre ces deux régions, alors le Brésil échangeait plutôt avec la région asiatique.

#### III. 3. 2. Origine africaine de C. maculatus

Nos analyses de l'histoire biogéographique de C. maculatus fournissent la première preuve de l'origine africaine de l'espèce dans le courant de la fin du Pléistocène. L'hypothèse d'une origine africaine est aussi supportée par le nombre d'haplotypes uniques qui est plus élevé dans les populations africaines que dans celles des autres continents. En se basant sur les analyses de Dispersion-Extinction-Cladogenèse, et sur la base de l'échantillonnage disponible, l'histoire de la distribution mondiale de C. maculatus serait jalonnée par cinq évènements de dispersion intercontinents, trois d'entre eux de l'Afrique vers l'Asie et deux vers l'Amérique, à partir de l'Afrique ou de l'Asie. Même si notre analyse de datation suggère que le premier évènement de dispersion de C. maculatus en dehors de l'Afrique a probablement eu lieu il y a environ 20.000 ans, les intervalles de confiance sont larges et il est évident que notre estimation est antérieure aux évènements de dispersion étant donné que la période glaciaire (Würm, il y a environ 120.000 à 10.000 ans) semble être incompatible avec un scénario de dispersion naturelle de l'Afrique vers l'Asie (Barton et al., 2011). Nous pouvons donc suggérer que tous les évènements de dispersion à partir de l'Afrique interviennent suite à la domestication du niébé et sa dispersion mondiale, suite aux activités anthropiques via les échanges commerciaux. Friedman & Rowland (1977) ont souligné l'existence d'échanges sur de longues distances il y a 5000 ans entre quelques régions de l'Afrique et l'Asie. Selon Allen (1983), le niébé a été introduit à partir de l'Afrique dans le sous-continent Indien, il y a approximativement 2000 à 3500 ans ; une période qui pouvait correspondre au moment où *C. maculatus* a été introduit en Asie. Cependant, nous ne pouvons strictement pas exclure une dispersion naturelle de l'Afrique, par exemple à partir d'autres plantes hôtes sauvages, compte tenu du niveau élevé de diversité génétique rencontré en Asie et de la structuration marquée des clades I et V, comprenant de nombreux spécimens asiatiques.

# III. 3. 3. Histoire démographiques de C. maculatus

Nos analyses de l'histoire démographique mondiale de C. maculatus utilisant les tests de neutralité, de mismatch distributions et le modèle de l'«Extended Bayesian Skyline Plot» à travers le temps convergent en indiquant une récente expansion démographique dans l'ensemble des données et dans le sous-ensemble composé des spécimens provenant des populations africaines, alors que nous avons observé un faible soutien statistique pour une telle augmentation dans les populations asiatiques. Le scénario déduit de l'analyse de l'EBSP sur le total et l'échantillonnage au hasard de 30 individus montre une première expansion de la taille de la population il y a environ 13.000 ans, suivie d'une baisse brutale de la taille de la population, il y a environ 230 ans. Cette tendance pourrait être due soit à un évènement démographique dramatique qui est intervenu simultanément partout ou à un résultat biaisé, suite à la violation de l'hypothèse de panmixie (Ho & Shapiro, 2011). Puisque la diminution de la taille de la population n'était pas perceptible dans les analyses de l'EBSP «pour un individu par population», et puisque la structure génétique de C. maculatus semble être structurée spatialement, la dernière hypothèse est la plus probable. Par ailleurs, nous n'avons pu identifier aucun évènement démographique qui aurait pu expliquer un phénomène de décroissance de la taille de population de cette espèce il y a environ deux siècles, et privilégié un scénario d'une croissance démographique récente, suite à l'augmentation des échanges commerciaux de semences à travers le monde.

Les résultats de l'analyse de l'EBSP avec «un individu par population» indiquent une croissance de la population de *C. maculatus* au début de l'Holocène pour l'ensemble des données totale, ainsi que pour le jeu de données africaines. Cette croissance est antérieure à l'augmentation modeste dans les populations asiatiques et confirme à nouveau l'origine africaine de cette bruche ravageur de graine de légumineuse dans le monde. La récente expansion modérée de *C. maculatus* en Asie nous informe qu'il a été introduit dans cette région il y a environ 800 ans. Il est possible que cette dispersion ait été associée à un changement de plante hôte, du niébé à d'autres légumineuses, un cas souvent mis en évidence dans des organismes sauvages (Espindola *et al.*, 2012).

Comme dans le cadre du chapitre précédent, les séquences de l'ADN nucléaire (ITS1) ont montré une faible variation comparativement aux séquences obtenues avec l'ADN mitochondrial (mt\_matrice) qui ont montré une structuration génétique significative entre l'Afrique, l'Amérique et l'Australasie, cependant cette structuration est plus marquée entre les populations et à l'intérieur des populations. En se basant sur nos données, l'Afrique apparaît être le continent d'origine de *C. maculatus* mais aussi son centre de dispersion, bien qu'un deuxième centre de dispersion soit noté en Asie. Les résultats de cette étude nous ont montré une importante expansion démographique dans les populations mondiale et africaine de *C. maculatus*, cette expansion étant modérée et beaucoup plus récente dans les populations asiatiques. Ces expansions de populations de *C. maculatus* se sont produites dans des périodes postérieures à la domestication des légumineuses, où des échanges sur de

longues distances se sont produits entre l'Afrique, l'Amérique et l'Australasie. Le mouvement des graines de niébé à travers le monde pourrait être le moyen par lequel *C. maculatus* a migré dans les autres continents, ce qui pourrait suggérer une co-expansion entre ce ravageur et cette légumineuse considérée comme sa principale plante hôte (Tuda *et al.*, 2006).

# Chapitre IV : Etude bioécologique

Le niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp.) est une légumineuse à graines cultivée et consommée extensivement en Asie, en Amérique du Sud et du Centre, dans les Caraïbes, aux Etats Unis, au Moyen Orient et en Europe du Sud. Ces graines constituent la source de protéines la moins onéreuse pour la plupart des populations africaines (Ndoutoume-Ndong & Rojas-Rousse, 2007). En effet, elles contiennent la plupart des acides aminés nécessaires à l'alimentation humaine à l'exception des acides aminés soufrés (Smart, 1964), de l'amidon, des vitamines, des micro-éléments essentiels tels que le fer, le calcium et le zinc. Dans un système de rotation, le niébé joue également un important rôle comme source d'azote pour les cultures céréalières (telles que le maïs, le mil et le sorgho), notamment dans les zones caractérisées par une faible fertilité du sol. Ses besoins en azote sont peu élevés et ses racines sont munies de nodosités peuplées de bactéries (*Rhizobium* Frank) qui contribuent à la fixation de l'azote atmosphérique.

Au Sénégal, le niébé est la deuxième légumineuse après l'arachide, en termes de représentation dans le système de culture traditionnel. C'est un aliment de base apprécié ; sa culture revêt donc un intérêt considérable, surtout dans les zones Nord et Centre-Nord du Sénégal où elle constitue parfois la principale ressource vivrière des populations.

Plusieurs espèces d'insectes peuvent réduire considérablement les rendements et la productivité du niébé (Cissé & Hall, 2003). Au champ, les insectes ravageurs les plus nuisibles sont entre autres : la chenille poilue *Amsacta moloneyi* Druce qui s'attaque principalement aux plantules ; le puceron *Aphis craccivora* Koch qui peut également causer des problèmes graves à tout moment de la culture par suite d'attaques directes sur la plante et/ou par les dégâts du virus de la mosaïque qu'il véhicule ; le thrips des fleurs *Megalurothrips sjostedti* Trybom, qui est également très nuisible. Dans les systèmes de stockage, les espèces qui causent le plus de dégâts au niébé sont les Coléoptères de la sous-famille des Bruchinae, dont plusieurs espèces ont été recensées en Afrique de l'Ouest, notamment *Bruchidius atrolineatus* Pic, *Callosobruchus rhodesianus* Pic et *Callosobruchus maculatus* F (Amevoin *et al.*, 2006 ; Doumma *et al.*, 2006). *Callosobruchus rhodesianus* et *B. atrolineatus* sont présents dans les cultures, mais sont peu adaptés aux systèmes de stockage dans les conditions naturelles. Dès les premières générations de stockage, plus de 90 % des adultes sont en diapause reproductrice et quittent les greniers souvent mal clos. Par contre, *C. maculatus* se maintient durant toute la saison sèche dans les greniers et représente, grâce à son potentiel reproducteur élevé, le ravageur le plus important.

Au vu de l'importance du niébé au Sénégal, en particulier dans la partie nord du bassin arachidier sénégalais, toute étude augmentant nos connaissances biologiques de ces espèces d'insectes phytophages est susceptible d'être utilisée dans les efforts de lutte contre ces ravageurs. C'est ainsi que, dans ce chapitre nous nous intéressons :

 à la dynamique de l'infestation du niébé au champ par les bruches, en rapport avec différents facteurs climatiques;
- au comportement des populations de *C. maculatus* sur trois variétés de niébé en situation de choix et de non-choix.

# I : Infestation du niébé au champ par les bruches

La dynamique des populations s'intéresse à l'étude des paramètres démographiques dans les populations d'êtres vivants. Chez les animaux par exemple, parmi les paramètres étudiés on trouve les répartitions de poids ou la composition par âge des individus, et les processus qui influencent ces paramètres. La dynamique des populations permet ainsi de comprendre les influences environnementales sur les effectifs des populations, ce qui permet *in fine* de prévoir les accroissements ou diminutions des populations. Des études de ce type sont incontournables, en particulier pour le contrôle des populations d'animaux dit nuisibles. Des questions concernant la dynamique de telles populations touchent en effet directement à l'environnement de l'homme et à son bien-être. Les questions de ce genre incorporent souvent de nos jours une exigence de prédiction en raison des implications économiques potentielles de telles pullulations. Elles correspondent à une demande sociale de gestion du monde vivant, et donc des populations, qui assure une perspective de pérennité ou de «développement durable».

La connaissance précise de la dynamique de contamination permet de situer le début de l'infestation primaire et d'intervenir pour l'empêcher ou l'atténuer. Cela est important chez les espèces polyvoltines, comme chez les bruches ravageurs du niébé, dont le grand nombre de générations par an amplifie considérablement les dégâts.

Beaucoup d'informations disponibles sur les méthodes de contrôle des bruches ravageurs du niébé portent sur les systèmes post-récoltes, mais il n'existe que peu d'informations sur l'infestation du niébé aux champs. L'objectif de cette étude est donc d'évaluer le niveau d'infestation du niébé au champ en fonction de la distance par rapport aux lieux de stockage et des types de variétés cultivées. Le taux d'émergence des adultes en fonction des variétés de même que les autres espèces de Bruchinae identifiées ont aussi été étudiés. Il existe une bibliographie abondante sur les méthodes de choix des différentes unités d'échantillonnage pour une étude de ce type (Drew et al., 1978 ; De Lima, 1979). Le choix des villages, des parcelles comme des variétés de niébé ne s'est fait ni de façon aléatoire, ni de façon représentative ; il a, dans une certaine mesure, été fait en fonction des objectifs que nous avions définis. En effet, notre objectif n'était pas de faire une étude précise des pertes à l'échelle régionale. De tels chiffres seraient coûteux, longs et difficiles à obtenir, et on a autant besoin d'informations sur des situations particulières, que de moyennes régionales ou nationales. Ceci nous a conduit à fonder notre démarche sur des études de cas localisés, faisant l'objet d'un suivi périodique et régulier à partir du semis jusqu'à la récolte des gousses de niébé. Ce type d'opération peut donner des renseignements suffisamment fiables sur les niveaux d'infestation et leurs causes pour servir de bases solides à des activités ultérieures visant leur réduction (Adam, 1977).

#### I. 1. Matériel et Méthodes

#### I. 1. 1. Zones d'étude

La présente étude s'est déroulée dans la partie nord du bassin arachidier sénégalais située entre les longitudes 14° 15' et 17° 15' ouest et les latitudes 13° 60' et 16° 15' nord. Il appartient en grande partie à la zone sahélo-soudanienne qui traverse le Sénégal d'ouest en est. La saison des pluies, appelée «hivernage», s'étale de juin-juillet à octobre selon les latitudes, avec des précipitations annuelles moyennes allant de 200 à 900 mm du nord au sud. C'est une zone de forte production de niébé qui fournit la plus grande quantité du niébé consommé au Sénégal. Plusieurs variétés de niébé y sont cultivées (obs. personnelle). Les critères de choix des parcelles cultivées, pour la comparaison des paramètres étudiés, ont porté notamment sur l'emplacement de la parcelle par rapport aux lieux de stockages, la variété de niébé cultivée et les périodes d'échantillonnage.

#### I. 1. 2. Les variétés de niébé

Pour le choix des variétés de niébé de notre étude, une enquête préliminaire a été réalisée dans différents villages. Nous avons identifié cinq variétés communes à ces villages : Ndiaga Aw, Mélax, Mame Fama, Ndoute et Baye Ngagne. Ndiaga Aw est la variété la plus cultivée, destinée à la consommation tout au long de l'année et à la commercialisation qui apporte des revenus non négligeables. Ensuite viennent respectivement les variétés Baye Ngagne et Mame Fama. Finalement, les autres variétés sont faiblement cultivées du fait de l'importance minime que les villageois leur accordent.

Ainsi, notre étude a porté sur les variétés Baye Ngagne, Mame Fama et Ndiaga Aw. Ces variétés se distinguent par la longueur des gousses (les gousses des variétés Mame Fama et Baye Ngagne sont plus grandes et presque de même longueur ; celles de la variété Ndiaga Aw sont les plus petites (Tableau IV-1). La variété Baye Ngagne mûrit environ 75 jours après le semis, et elle présente avec la variété Ndiaga Aw une certaine résistance à la sécheresse et une large capacité d'adaptation. De ce fait, ces variétés sont recommandées dans les zones nord et centre-nord du pays. La variété Mame Fama à plus faible rendement que les deux autres s'est maintenue dans la zone nord, car elle arrive à maturité quelques jours plus tôt que les autres ce qui la rend plus fiable quand la saison de croissance est très courte. Les variétés Ndiaga Aw et Baye Ngagne sont résistantes au chancre bactérien, mais sont sensibles au virus de la mosaïque du niébé transmis par les pucerons ainsi qu'à la mauvaise herbe parasite *Striga* Lour et à plusieurs insectes ravageurs, notamment la chenille poilue, les pucerons du niébé, les thrips des fleurs et les bruches.

Variété de niébé	Longueur moyenne des gousses (cm)
Baye Ngagne	18,20
Mame Fama	17,77
Ndiaga Aw	14,20

**Tableau IV-1** : Longueur moyenne des gousses des différentes variétés (donner les gammes de variation ou les écart-types)

#### I. 1. 3. Les parcelles

Six parcelles de niébé (P1 à P6), cultivées par des paysans de différents villages ont été suivies depuis le semis jusqu'à la récolte. Pour chaque variété, deux champs sont choisis en fonction de la proximité avec les lieux de stockage. (Tableau IV-2).

**Tableau IV-2** : Les champs étudiés des différentes variétés et leurs distances par rapport aux villages les plus proches. Le signe moins indique que le champ de la variété est proche d'un lieu de stockage ( $\leq 200$  m) et le signe plus indique que le champ de la variété est loin de tout lieu de stockage ( $\geq 1000$  m)

Variété de niébé	Parcelle	Village le plus proche	Distance (m)
Mame Fama	P1 (-)	Mérina	200
	P2 (+)	Kandala Mbengue	1100
Ndiaga Aw	P3 (-)	Mérina	130
	P4 (+)	Gade Kébé	1200
Baye Ngagne	P5 (-)	Gadafé	150
	P6 (+)	Gade Kébé	1200

#### I. 1. 4. Méthode d'échantillonnage

Les graines ont été semées entre fin juin et début juillet 2009 et les premières gousses sont apparues fin août. Trois échantillonnages espacés de 15 jours ont été faits. Le premier a été fait le 01/09/2009, le second le 15/09/2009 et le troisième le 30/09/2009. Pour chaque échantillonnage, 50 gousses sont récoltées au hasard dans chaque champ. Le niveau d'infestation initiale des gousses a été déterminé à partir du dénombrement des œufs pondus sur les gousses et des trous d'émergence des adultes. Les gousses ont ensuite été conservées au laboratoire dans des bocaux aérés et à température ambiante. Elles ont été inspectées quotidiennement ; si une bruche émerge, elle est identifiée puis isolée du bocal pour éviter un accouplement.

# I. 1. 5. Paramètres analysés et tests statistiques

Dans chaque échantillon, le nombre d'œufs pondus par les bruches sur les gousses, le taux d'émergence des adultes et l'effectif de chaque espèce trouvée ont été étudiés en fonction de la distance avec les lieux de stockage, des variétés de niébé et de la période d'échantillonnage. Le taux d'émergence des adultes (en %) est le nombre d'adultes émergés sur le nombre d'œufs pondus multiplié par 100 ; l'effectif d'une espèce est le rapport du nombre d'adultes émergés de cette espèce sur le nombre total d'adultes multiplié par 100.

Toutes les données recueillies ont été analysées sous R (version 2.12.0) et sous Statview 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Celles qui ne présentent pas de distribution normale ont été transformées en utilisant la fonction X^0.5. Après analyse de variance, le test F de Fisher et le test-t ont été utilisés pour la comparaison des moyennes avec un niveau de significativité de 5%.

# I. 2. Résultats

#### I. 2. 1. Variation des œufs pondus en fonction des lieux de stockage

Les résultats montrent que le nombre d'œufs pondus par les bruches lorsque le champ est à  $\leq$  200 m de distance est en moyenne trois fois supérieur à celui pondu lorsque le champ est à  $\geq$  1000 m (figure IV-1). Cette différence entre les deux groupes est significative (F = 0,17; P = 0,02).



**Figure IV-1** : Œufs pondus en relation avec la position des lieux de stockage. Les champs étudiés se répartissent dans deux groupes ; le premier groupe 'proche' composé des champs situés au plus à 200 m d'un lieu de stockage et le second groupe composé des champs situés à plus de 1000 m d'un lieu de stockage. Sur l'axe vertical de la boîte à moustache, nous avons l'echelle des valeurs de la variable œufs. Le trait inférieur de la boîte correspond à la valeur de la 1<sup>ère</sup> quartile (Q1), le trait horizontal à l'intérieur de la boîte représente la valeur du 2<sup>ème</sup> quartile (médiane), le trait supérieur de la boîte correspond à la valeur du 3<sup>ème</sup> quartile (Q3). Les moustaches inférieure et supérieure représentée en pointillet de part et d'autre de la boîte. Ces deux moustaches, délimitent les valeurs dites adjacentes qui sont déterminées à partir de l'écart interquartile (Q3-Q1)

# I. 2. 2. Choix de ponte et taux d'émergence en fonction des variétés

Bien que la ponte au champ par les insectes soit faible dans les différentes variétés, les femelles de Bruchinae ont pondu différemment en fonction des variétés (figure IV-2). Statistiquement, la différence de ponte des bruches sur les différentes variétés est non significative (P = 1,18; F = 1,94). Les différences d'œufs pondus entre Mame Fama et Ndiaga Aw et entre Mame Fama et Baye Ngagne ne sont pas significatives (P > 0,05). Par contre, entre Ndiaga Aw et Baye Ngagne la différence d'infestation est significative (P < 0,05) (Tableau IV-3).

Les effectifs d'adultes de bruches ayant émergé de gousses ont été faible sur toutes les trois variétés et la différence d'émergence entre les trois variétés est non significative (P = 0,26; F = 1,46). Bien que le nombre d'œufs pondus au champ soit plus élevé dans la variété Baye Ngagne, le taux d'émergence des adultes est plus important dans la variété Mame Fama (figure IV-2). Cependant, ces valeurs ne sont pas significativement différentes (P > 0,05). Chez la variété Ndiaga Aw, ce taux est négligeable et sa comparaison avec ceux obtenus dans les autres variétés donne des différences très significatives (P < 0,05; tableau IV-3).



**Figure IV-2** : Nombre d'oeufs pondus et taux d'émergence des adultes en fonction des variétés de niébé. Des lettres différentes au dessus de barres indiquent des différences significatives ; une même lettre indique des différences non significatives d'un point de vue statistique

Variables	Variétés comparées	Р	F
Œufs pondus	Mame Fama, Ndiaga Aw	0,1074	4,86
	Mame Fama, Baye Ngagne	0,3524	0,41
	Ndiaga Aw, Baye Ngagne	0,017*	0,085
Taux d'émergence	Mame Fama, Ndiaga Aw	0,003**	0,095
	Mame Fama, Baye Ngagne	0,83	1,1
	Ndiaga Aw, Baye Ngagne	0,005**	0,002

**Tableau IV-3** : Résultat Test de Fisher comparant le nombre d'œufs pondus et les taux d'émergence en fonction des variétés

#### I. 2. 3. Ponte et taux d'émergence en fonction des périodes d'échantillonnage

Le niveau de ponte des bruches le plus élevé est observé dans les échantillons du 30/09/2009 (figure IV-3). Ce nombre diffère de peu de celui obtenu dans les échantillons du 01/09/2009 (P = 0,7 ; t = -0,405). En valeur absolue le nombre d'œufs pondus par les bruches à la période du 15/09/2009 est plus faible, cependant, sa différence avec ceux pondus dans les échantillons du 01/09/2009 est non significative (P = 0,40 ; t = 0,91). Par contre entre les échantillons du 15/09/2009 et du 30/09/2009 la différence est significative (P = 0,40 ; t = -2,34). En valeur absolue, le taux d'émergence des adultes issus des échantillons du 30/09/2009 est supérieur à celui obtenu dans les échantillons du 01/09/2009 et du 15/09/2009 et du 15/09/2009 et du 15/09/2009 est supérieur à celui obtenu dans les échantillons du 01/09/2009 et du 15/09/2009 et du 30/09/2009 et du 30/09/2009



**Figure IV-3** : Nombres d'oeufs pondus et taux d'émergence en fonction des périodes d'échantillonnage. Des lettres différentes au dessus de barres indiquent des différences significatives ; une même lettre indique des différences non significatives d'un point de vue statistique

# I. 2. 4. Espèces de bruches trouvées

Les bruches émergées des gousses de niébé stockées au laboratoire se répartissent en deux espèces : *Bruchidius atrolineatus* et *Callosobruchus maculatus*. Les émergences les plus importantes de *B. atrolineatus* sont obtenues des échantillons provenant des champs situés prés des lieux de stockage (figure IV-4). Statistiquement la différence d'émergence des individus de *B. atrolineatus* entre les deux groupes de champ est significative (P = 0,015, F = 0,153). Chez l'espèce *C. maculatus*, la différence d'émergence entre les deux groupes de champ n'est pas significative (P = 0,16, F = 2,81).

Une variation des effectifs de chaque espèce en fonction des périodes d'échantillonnage est observée (figure IV-5). Le nombre d'émergence le plus important de *B. atrolineatus* est obtenu des échantillons du 01/09/2009. La différence d'émergence est significative entre les périodes 01/09/2009 et 15/09/2009 (P < 0,0001; F = 0,400) et entre les périodes 15/09/2009 et 30/09/2009 (P < 0,0001; F = 0,001); entre le 01/09/2009 et 30/09/2009 cette différence est non significative (P = 0,96; F = 0,96). Chez *C. maculatus*, le nombre d'émergence le plus important est obtenu des échantillons 30/09/2009. Entre le 01/09/2009 et le 15/09/2009 (P = 0,14; F = 4,12) et entre le 01/09/2009 et le 30/09/2009 (P = 0,06; F = 1,54), les différences des taux d'émergences ne sont pas significatives. Entre les périodes 15/09/2009 et 30/09/2009 la différence d'émergence est significative (P = 0,002; F = 0,37).



Figure IV-4 : Effectifs de B. atrolineatus et de C. maculatus en fonction des champs



Figure IV-5 : Effectifs des espèces trouvées en fonction de la période d'échantillonnage

#### I. 3. Discussion

Dans les zones rurales, les paysans préfèrent semer leurs graines dans les champs situés loin des habitations, pour protéger les cultures des animaux domestiques. Ceux qui cultivent à côté des maisons mettent des clôtures pour la protection des cultures. Bien que ces deux méthodes permettent de se protéger des animaux domestiques, il y a d'autres menaces pour les cultures comme certains insectes qui attaquent directement les cultures ou d'autres animaux comme les rongeurs. Cependant, ces attaques, s'il y en a, sont limitées aux champs et les premiers dégâts sont visibles ce qui permet aux paysans de prendre des mesures et de les maîtriser. Le problème récurrent auquel les paysans doivent faire face tout le temps est l'attaque des bruches dans les récoltes stockées, surtout celles du niébé. Cette infestation, si elle n'est visible qu'après la récolte, débute toutefois dans les cultures en début de fructification des plantes. Existe-t-il une relation entre le nombre des œufs pondus sur les gousses de niébé et la position des champs en fonction des lieux de stockage? Nous avons constaté au cours de cette étude qu'il y avait plus de champ situés loin des villages, où la disponibilité des ressources exploitables par les bruches était plus importante. En norme, l'infestation des gousses de niébé devrait y être plus importante. Les résultats obtenus sont contraires, puisque des deux groupes de champ ( $\leq$ 200 m et  $\geq$  1000 m), nous avons noté une différence significative de la ponte des bruches ; les champs situés près des lieux de stockage présentent les gousses les plus infestées (figure IV-1). Nous pouvons donc affirmer, dans la limite de notre étude, que la plupart des bruches responsables de l'infestation du niébé au champ provient des lieux de stockage. Cet effet de la distance sur les infestations des gousses de niébé par les bruches peut être associé au fait que les femelles pondeuses ne peuvent voler que sur de faibles distances. Nansen et al. (2005) ont observé que les infestations des champs de blé par Cephus cinctus Norton montrent un effet de lisière, les infestations étant plus fortes en bordure des champs et moindres vers le centre. Seck (1991) en étudiant l'infestation initiale des champs de mil par Sitotroga cerealella (Oliv) a observé une plus grande infestation des champs de cases par rapport aux champs éloignés. Ces observations sont différentes de celles faites par Ganasalingham & Krishnarajah (1979) sur le riz, où la position des champs par rapport aux habitations n'avait aucune incidence sur l'infestation initiale de S. cerealella. Cependant, il n'est pas à écarter l'hypothèse selon laquelle certaines de ces bruches infestant le niébé au champ proviennent d'autres plantes hôtes sauvages.

Des trois variétés de niébé utilisé toutes ont été infestées ; cependant, une préférence de ponte des bruches sur les gousses des variétés Baye Ngange et Mame Fama est notée, alors que sur la variété Ndiaga Aw cette ponte est négligeable (figure IV-2). Ceci montre que le niveau d'infestation dépend de la variété de niébé. Doumma *et al.* (2006), à partir de données obtenues aussi bien pour l'activité de ponte que pour les émergences des bruches, ont permis d'identifier des variétés qui se sont bien comportées aussi bien dans les cultures que pendant le stockage avec un niveau de contamination très faible contrairement à d'autres variétés qui sont les plus infestées. Dans notre cas, la différence

d'infestation entre les variétés peut s'expliquer soit par les longueurs des gousses qui sont plus grandes chez les variétés Baye Ngagne et Mame Fama et du coup offrent plus d'espace aux insectes, soit parce que les gousses de la variété Ndiaga Aw renfermeraient des substances moins préférées par les femelles pondeuses. Ainsi, il apparaît clair qu'au niveau de la variété Ndiaga Aw, les bruches ont une activité réduite. Cette variété semble avoir des gousses et/ou des graines dont le tégument ne semble pas constituer un substrat favorable aux bruches. Selon Silim Nahdy (1995) l'épaisseur des gousses réduit la pénétration des larves. Silim Nahdy et al. (1999) ont ainsi montré que certaines caractéristiques des gousses du pois cajan influent aussi bien sur le niveau d'infestation que sur les dégâts causés par Callosobruchus chinensis. Selon eux, comparées aux gousses sans poils et aux gousses à faible pilosité, les gousses avec une forte densité de poils réduisent considérablement le nombre d'œufs pondus par C. chinensis. Naveena et al. (2010) en corrélant les caractères physiques des gousses et des graines avec les dégâts causés par Callosobruchus theobromae ont conclu qu'aucun des caractères n'a montré une relation significative ; cependant la forme des gousses, la forme et la couleur des graines montrent une corrélation positive alors que la couleur et l'odeur des gousses présentent une corrélation négative. Dans cette étude, nous avons montré que la variété Ndiaga Aw est la plus résistante ou la moins attaquée par les bruches en termes d'œufs déposés.

Si le nombre d'œufs déposés sur les gousses au champ est plus élevé dans la variété Baye Ngagne, le taux d'émergence est plus important dans la variété Mame Fama. Dans la variété Ndiaga Aw, ce taux est négligeable comparé à ceux obtenus dans les autres variétés (figure IV-2). Les taux d'émergence plus importants dans les variétés Baye Ngagne et Mame Fama peuvent expliquer pourquoi les bruches pondent plus sur ces variétés. Ces bruches auraient été sélectionnées par la sélection naturelle pour pondre sur des substrats qui vont assurer un meilleur de survie à leur descendance.

Nos résultats ont aussi montré que la ponte et le taux d'émergence sont plus importants dans les échantillons du 30/09/2009 (figure IV-3). Olubayo & Port (1997) ont montré que le niébé récolté tardivement (4 semaines après la période de récolte recommandée) à Katumani est significativement plus infesté par les bruches que le niébé récolté très tôt (2 semaines avant la période de récolte recommandée) ou à la période recommandée.

Le suivi des échantillons de gousses de niébé provenant des différentes localités visitées a permis de répertorier deux espèces de Bruchinae : *Bruchidius atrolineatus* et *Callosobruchus maculatus*. Cette observation est en phase avec celle de Doumma *et al.* (2006), selon qui ces deux espèces de Coléoptères Bruchinae se développent au dépend des gousses et des graines de niébé en zone sahélienne. Amevoin *et al.* (2006) ont identifiés en plus de ces deux espèces, une troisième espèce *Callosobruchus rhodesianus* (Pic.) sur des échantillons de graines de niébé en zone guinéenne au Togo.

La différence significative du nombre d'adultes émergés de l'espèce B. atrolineatus en fonction des champs montre que les populations de cette espèce déposent leurs œufs sur les premières gousses disponibles ce qui n'est pas le cas chez celles de C. maculatus, dont le nombre d'adultes émergés bien qu'en valeur absolue supérieur dans les champs situés prés des lieux de stockage, n'est statistiquement pas différent selon la distance des champs aux lieux de stockage. Nous avons aussi noté que les infestations les plus importantes de B. atrolineatus sont obtenues dans les échantillons du 01/09/2009 ce qui est contraire chez C. maculatus dont les infestations les plus importantes sont obtenues dans les échantillons du 30/09/2009 (figure IV-5). Dans les échantillons du 15/09/2009, les infestations sont très faibles. Maina & Lale (2004) ont montré que C. maculatus produit un nombre d'adultes significativement plus élevé que C. subinnotatus aux générations F2 et F3. On peut donc dire que C. maculatus opère un choix de ponte en ne déposant que quelques œufs sur les premières gousses formées ce qui n'est pas le cas de B. atrolineatus qui pond en masse des que la ressource est disponible. Selon Alzouma (1986, 1987), les femelles de B. atrolineatus ont un comportement opportuniste en déposant leurs œufs sur les stades phénologiques les plus abondants dans les cultures, alors que celles de C. maculatus semblent opérer un choix de site de ponte en déposant 60 % de leurs œufs sur les gousses jaunissantes. Ceci est en phase avec nos observations car le nombre d'adultes émergés de l'espèce C. maculatus le plus important est obtenu des gousses du troisième échantillonnage où 100 % étaient sèches. Au vu de ces résultats C. maculatus semble être l'espèce la plus présente dans les systèmes de stockage du niébé au Sénégal, ce qui est confirmé par nos observations sur le terrain (données non publiées). La domination des populations de C. maculatus sur les stocks de niébé peut s'expliquer par le fait que les adultes de B. atrolineatus ne restent que quelques semaines dans les stocks puis disparaissent ; cela pourrait être dû au fait que C. maculatus entraîne la disparition de B. atrolineatus après quelques générations par compétition. Amevoin et al. (2006) ont montré que des trois espèces de Bruchinae associées au niébé au Togo, seules les populations de C. maculatus se maintiennent pendant les 6 ou 8 mois de stockage, les autres espèces à savoir C. rhodesianus et B. atrolineatus disparaissant 2 à 3 mois après la mise en grenier. Ces observations sont contraires à celles faites par Doumma et al. (2006) ; selon eux, dans leurs conditions de stockage au Niger, il apparaît que les dégâts les plus importants sont occasionnés par B. atrolineatus.

De cette étude, nous avons montré que l'infestation du niébé au champ par les bruches est fonction de la position des champs avec les lieux de stockage. Ainsi, l'utilisation de champs loin des villages pour les cultures n'est pas seulement une solution pour se protéger des animaux domestiques, mais elle peut permettre de minimiser l'infestation du niébé par les bruches dont la majeure partie proviendrait des lieux de stockage. Bien que le niveau d'infestation au champ dans les trois variétés utilisées ait été faible, la variété Ndiaga Aw est la moins attaquée. Cette infestation est aussi dépendante des périodes d'échantillonnage, les graines du dernier échantillonnage étant les plus infestées. Ainsi, pour limiter cette infestation, les paysans peuvent récolter les gousses le plutôt possible. De cette étude nous avons montré que *C. maculatus* est l'espèce de Bruchinae qui est le principal responsable des dégâts observés sur les graines de niébé stockés bien qu'au début elle interagit avec *B. atrolineatus*, l'autre espèce de Bruchinae retrouvée dans cette région du Sénégal.

# II : Comportement de Callosobruchus maculatus sur trois variétés de niébé

Très diversifiés et parfois complexes (Thompson, 1994), les processus d'interactions trophiques entre plantes hôtes et insectes phytophages permettent à ces derniers de prospérer dans leur environnement et leur étude peut être utile pour le contrôle des insectes ravageurs de denrées stockées. Les insetces phytophages consomateurs de graine sont hautement spécialisés, chaque larve ne pouvant se développer qu'en strict monophage, quelle que soit l'étendue de la niche trophique de l'espèce consommatrice. Ainsi, cette spécialisation offre un modèle d'interactions trophiques particulièrement intéressant (Janzen, 1976 ; Gillon, 1986). Les insectes de la sous-famille des Bruchinae sont très bien caractérisés par leur régime alimentaire qui est étroitement spécialisé et la spécificité d'une sous-famille, un genre ou un groupe d'espèces botaniques est la règle (Gillon *et al.*, 1992). Leurs larves ne sont rencontrées dans la nature que dans les graines d'un nombre réduit de plantes hôtes (Delobel *et al.*, 1995 ; Anton & Delobel, 2004).

Les produits chimiques peuvent être utilisés pour le contrôle des populations de *C. maculatus* (Jackai & Daoust, 1986), mais les considérations économiques, sanitaires et environnementales font que d'autres méthodes sont préconisées. L'utilisation d'extrait de végétaux tels que les huiles essentielles a souvent été recommandé (Seck *et al.*, 1993 ; Ketoh *et al.*, 2002) ; cependant, l'efficacité de ces substances, dans les conditions réelles de stockage, est à démontrer. Selon Sanon *et al.* (1998), la lutte biologique, notamment avec l'introduction d'hyménoptères parasitoïdes larvophages tels que *Dinarmus basalis* Rond, peut être également une méthode de contrôle efficace. Cependant, la sélection de variétés résistantes est l'un des principaux moyens explorés pour faire face à ce ravageur (Dobie, 1981 ; Olakojo *et al.*, 2007). Il existe plusieurs variétés de niébé, montrant une large gamme de caractéristiques telles que la couleur de la graine, la texture, la taille, la dureté, la composition chimique, qui les différencient les unes des autres (Henshaw, 2008). Celles-ci ont notamment été associées à leur résistance à l'attaque des bruches (Akingbohungbe, 1976 ; Fatunla & Badaru, 1983 ; Caswell, 1984). Ainsi, la variété TVu 2027, riche en inhibiteurs de protéases (Piergiovanni *et al.*, 1994) et toxique vis-à-vis des larves, a été identifiée comme résistante à *C. maculatus* (Singh, 1978).

Au Sénégal, *C. maculatus* est le principal ravageur des graines de niébé stockées. C'est ainsi que, dans cette section, nous avons étudié certains paramètres biologiques (le potentiel de ponte des femelles et la capacité de développement des larves) de populations en situation de choix et de non choix sur trois variétés de niébé.

# II. 1. Matériel et méthodes

# II. 1. 1. Matériel végétal

Les expériences ont été réalisées avec les graines des trois variétés de niébé étudiées dans la partie précédente : Baye Ngagne, Mame Fama et Ndiaga Aw. Les graines de ces différentes variétés se distinguent par leur couleur (blanche chez Mame Fama, marron chez Ndiaga Aw et tachetée de gris et bleu sur fond blanc chez Baye Ngagne) et par leur taille (les graines de Mame Fama étant les plus grandes ; celles de Ndiaga Aw les plus petites ; figure IV-6). Aussitôt après la récolte, des graines de chaque variété, non traitées avec des produits chimiques, sont conservées au congélateur pendant trois semaines pour empêcher leur infestation éventuelle par les bruches.



Figure IV-6 : Les trois variétés de niébé testées

# II. 1. 2. Elevage des bruches

La souche d'origine de *C. maculatus* provient au nord du bassin arachidier sénégalais. Pour l'élevage en masse, des adultes mâles et femelles sont mis dans des bocaux contenant chacun environ 450 g de graines saines de niébé. Après avoir assuré l'accouplement et la ponte des œufs, les adultes sont éliminés une semaine après ; on rajoute à ce moment une petite quantité de graines saines de

niébé, environ 50 g. Les larves issues des œufs réalisent l'ensemble de leur cycle de développement dans les graines et émergent. Les adultes provenant du même élevage sont récupérés et étudiés au cours de nos expériences. Durant l'expérimentation (septembre-octobre-novembre), la température a varié entre 25 et 32°C, l'humidité relative entre 50 et 70% avec une durée d'éclairage d'environ 13 heures.

# II. 1. 3. Etude expérimentale en situation de non choix

#### II. 1. 3. 1. Fécondité de C. maculatus

Cinq couples d'adultes de *C. maculatus* ne dépassant pas 48 heures d'âge sont introduits dans une boite de Pétri contenant 25 g de graines de l'une des variétés testées. Cette expérience a été répétée trois fois pour chaque variété. Après quatre jours, les adultes sont retirés des boites de Pétri, les œufs pondus dans chaque boite sont dénombrés à l'aide d'une loupe binoculaire. Le taux de fécondité dans chaque boite a été calculé ; il est défini comme étant le rapport du nombre d'œufs pondus sur le nombre de couples utilisés.

#### II. 1. 3. 2. Taux d'émergence et sex-ratio sur les différentes variétés

Pour étudier le taux d'émergence des adultes, cinq couples de *C. maculatus* répondant aux mêmes caractéristiques que ceux utilisés ci-dessus sont introduits dans une boite de pétri contenant 25 g de graines saines de chaque variété. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque variété. Cinq jours après, les adultes sont éliminés et le nombre d'œufs pondus dénombrés. Environ un mois après, nous avons compté dans chaque boite le nombre d'adultes émergés sur une durée de 15 jours. La mortalité intra cotylédonaire n'a pas été prise en considération. Le taux d'émergence dans chaque boite a ensuite été calculé ; il se définit comme le rapport du nombre total d'adultes émergés sur le nombre total d'œufs pondus multiplié par cent.

Cette étude consistait aussi à déterminer la sex-ratio. La sex-ratio correspond au rapport entre l'effectif des descendants mâles et l'effectif des descendants femelles. Pour qu'il y'ait un équilibre des sexes ce rapport doit être voisin de l'unité.

#### II. 1. 4. Essai à choix multiples

Des boites de Pétri en verre (20 cm de diamètre sur 3 cm de hauteur) ont été aménagées en une arène centrale circulaire qui communique avec trois compartiments, contenant chacun 15 g de graines de chaque variété (figure IV-7). Chaque case correspond à une variété de niébé. Dix couples de *C. maculatus* âgés de 0 à 24 heures sont lâchés dans l'arène centrale séparée des cases par des cloisons dont la hauteur permettait une libre circulation des bruches d'un compartiment à l'autre. L'expérience a été répétée six fois. Cinq jours après, les œufs pondus dans chaque compartiment sont dénombrés puis

les adultes sont retirés des boites. Les graines de chaque variété sont mises dans une boite de Pétri et un mois après nous avons dénombré les adultes qui ont émergé sur une période de 15 jours. Les taux de fécondité et d'émergence ont ensuite été étudiés.



Figure IV-7 : Test de choix multiples sur les trois variétés

# II. 1. 5. Analyse statistique des données

Toutes les données recueillies ont été analysées sous R (version 2.12.0) et sous Statview 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Celles qui ne présentent pas de distribution normale ont été transformées en utilisant la fonction X^0.5. Après analyse de la variance, la comparaison des différentes moyennes a été faite avec le test F de Fisher avec des niveaux de significativité de 5%.

# II. 2. Résultats

#### II. 2. 1. Situation de non choix

# II. 2. 1. 1. La fécondité

La quasi-totalité des œufs (plus de 90%) est pondu sur les graines de niébé. La ponte la plus élevée est obtenue sur la variété Mame Fama (425 œufs), alors que la moins élevée est obtenue sur la variété Ndiaga Aw (188 œufs). Les taux de fécondité (figure IV-8) diffèrent entre les trois variétés, le taux le plus élevé est obtenu sur la variété Mame Fama ; cependant, ces différences sont globalement statistiquement non significatives (P = 0,11; F = 3,32). Par contre entre Mame Fama, Ndiaga Aw une différence significative de la ponte des bruches est notée (Annxe 9).



**Figure IV-8** : Taux de fécondité dans les 3 variétés. Le trait inférieur de la boîte correspond à la valeur de la  $1^{\text{ère}}$  quartile (Q1), le trait horizontal à l'intérieur de la boîte représente la valeur du  $2^{\text{ème}}$  quartile (médiane), le trait supérieur de la boîte correspond à la valeur du  $3^{\text{ème}}$  quartile (Q3). Les moustaches inférieure et supérieure représentée en pointillet de part et d'autre de la boîte. Ces deux moustaches, délimitent les valeurs dites adjacentes qui sont déterminées à partir de l'écart interquartile (Q3-Q1)

#### II. 2. 1. 2. Estimation du taux d'émergence

Après 1 mois, toutes les graines (soit 100%) de Mame Fama présentaient chacune au moins un trou de sortie, contre 98,7 % chez Baye Ngagne, et 96,7 % chez Ndiaga Aw. Cependant, le nombre de trous d'émergence par graines dépassait rarement 5.

Le taux d'émergence des adultes dans les différentes variétés est présenté à la figure IV-9. Le plus fort taux d'émergence a été obtenu avec les graines de la variété Mame Fama sur lesquelles on a observé un taux moyen de 41,01 %. Sur les graines de la variété Ndiaga Aw ce taux a été de 16,26 % contre 35,50 % sur les graines de la variété Baye Ngagne. Cette différence de taux d'émergence des adultes a varié significativement entre les variétés de niébé (F = 12,85, P = 0,007). La comparaison entre les variétés prises deux à deux montre une différence significative entre Mame Fama et Ndiaga Aw et entre Ndiaga Aw et Baye Ngagne ; par contre entre Mame Fama et Baye Ngagne la différence de taux d'émergence est non significative (Annexe 10).



**Figure IV-9** : Taux d'émergence moyen des adultes en fonction des variétés. Des lettres différentes au dessus de barres indiquent des différences significatives ; une même lettre indique des différences non significatives d'un point de vue statistique

# II. 2. 1. 3. Sex-ratio

Aussi bien chez la variété Mame Fama que chez la variété Baye Ngagne, le nombre de femelles émergées est légèrement supérieur au nombre de mâles émergés ; par contre chez la variété Ndiaga Aw, le nombre de mâles émergés est supérieur au nombre de femelles émergées. Les femelles représentent 54,86% des adultes émergés sur la variété Mame Fama, 41,03 % des adultes émergés sur la variété Ndiaga Aw et 50,45% des adultes émergés sur la variété Baye Ngagne. La sex-ratio est plus élevé chez la variété Ndiaga Aw et plus faible chez la variété Mame Fama (figure IV-10). La différence de sex-ratio entre les variétés est significative (F = 6.17; P = 0.035). Entre Mame Fama et Ndiaga Aw et entre Ndiaga Aw et Baye Ngagne, les sex-ratios sont significativement différents ce qui n'est pas le cas entre Mame Fama et Baye Ngagne (Annexe 11).



**Figure IV-10** : Moyenne de la sex-ratio en fonction des variétés. Le trait inférieur de la boîte correspond à la valeur de la  $1^{\text{ère}}$  quartile (Q1), le trait horizontal à l'intérieur de la boîte représente la valeur du  $2^{\text{ème}}$  quartile (médiane), le trait supérieur de la boîte correspond à la valeur du  $3^{\text{ème}}$  quartile (Q3). Les moustaches inférieure et supérieure représentée en pointillet de part et d'autre de la boîte. Ces deux moustaches, délimitent les valeurs dites adjacentes qui sont déterminées à partir de l'écart interquartile (Q3-Q1)

#### II. 2. 2. Choix multiples

# II. 2. 2. 1. Taux de fécondité des femelles

La répartition des pontes a varié significativement en fonction des variétés quand les insectes étaient en situation de choix (F = 7,1; P < 0,0068). Les variations de la fécondité de *C. maculatus* sur les différentes variétés présentées à la figure IV-11 montrent des fécondités plus importantes sur les variétés Mame Fama et Baye Ngagne (différence non significative) que sur la variété Ndiaga Aw (différences de fécondité significatives entre Mame Fama et Ndiaga Aw et entre Ndiaga Aw et Baye Ngagne) (Annexe 12).



**Figure IV-11** : Fécondité de *C. maculatus* en fonction des variétés. Le trait inférieur de la boîte correspond à la valeur de la 1<sup>ère</sup> quartile (Q1), le trait horizontal à l'intérieur de la boîte représente la valeur du 2<sup>ème</sup> quartile (médiane), le trait supérieur de la boîte correspond à la valeur du 3<sup>ème</sup> quartile (Q3). Les moustaches inférieure et supérieure représentée en pointillet de part et d'autre de la boîte. Ces deux moustaches, délimitent les valeurs dites adjacentes qui sont déterminées à partir de l'écart interquartile (Q3-Q1)

# II. 2. 2. 2. Taux d'émergence des adultes

Le taux d'émergence des bruches (figure IV-12) montre une différence très significative entre les variétés (F = 19,1 ; P < 0,0001). Les taux d'émergence entre les variétés Mame Fama et Baye Ngagne diffèrent de peu ; par contre leur taux d'émergence est significativement différent de celui de la variété Ndiaga Aw (Annexe 13).



**Figure IV-12** : Taux d'émergence de *C. maculatus* en fonction des variétés (situation de choix). Des lettres différentes au dessus de barres indiquent des différences significatives ; une même lettre indique des différences non significatives d'un point de vue statistique

# II. 2. 3. Durée de développement de C. maculatus sur les trois variétés

Des adultes de *C. maculatus* ont émergé des graines des trois variétés de niébé testées. Les larves de cette espèce se développent normalement dans les graines des ces variétés. Cependant, une différence de durée du cycle de développement est observée entre ces trois variétés. Sur les graines de la variété Mame Fama, la phase de développement (durée moyenne de développement de l'œuf à l'adulte) dure en moyenne de  $23 \pm 1,5$  jours. Sur les graines de la variété Baye Ngagne, la durée de développement est de  $25 \pm 1,45$  jours, tandis que sur la variété Ndiaga Aw ce cycle de développement est presque égal à un mois ( $29 \pm 1,25$  jours). Cependant, ces différences de durée de développement sont pas significatives (P > 0.05; F = 4,57).

#### II. 3. Discussion

Dans la section précédente, nous avons montré que deux espèces de Bruchinae (*B. atrolineatus* et *C. maculatus*) interagissent de manière différente avec le niébé au champ dans le nord du bassin arachidier sénégalais. Cependant, *C. maculatus* semble être la seule espèce à rester dans les stocks de niébé, devenant du coup son principal ravageur. Aussi, dans cette section, nous avons évalué certains paramètres biologiques de ses populations sur les graines des trois mêmes variétés de niébé que celles étudiées au champ.

Les graines de niébé représentent un substrat favorable à la ponte des femelles de *C. maculatus*. Beaucoup d'études ont été faites dans le but d'augmenter la résistance du niébé vis-à-vis des insectes ravageurs ; cependant selon Olajire *et al.* (2011) aucune à l'exception de TVu 2027 n'a produit une variété entièrement résistante à *C. maculatus*. Par conséquent, *C. maculatus* peut infester la grande majorité des variétés de niébé et produire une nouvelle génération d'adultes.

Au cours de cette étude, nous avons constaté que la grande majorité des œufs pondus a été déposée sur les graines aussi bien en situation de choix que de non choix. Cette observation est en phase avec celle faite par Singh & Singh (1992). Ceci est normal, puisque les femelles *C. maculatus* déposent leurs œufs sur un substrat qui va permettre un bon développement de leur larves. Les résultats de cette étude nous ont aussi montré que les femelles ont pondu le plus grand nombre d'œufs lors des deux premiers jours de leur existence et que les mâles ont été les premiers à mourir. Selon Kellouche (2005), la majorité des œufs sont pondus durant les trois premiers jours de la vie des bruches. La décroissance dans la fécondité est peut être due aux effets de vieillissement et d'épuisement qui commencent à apparaître mais aussi à l'absence de nourriture ce qui fait que les mâles dépensant le plus d'énergie auraient une activité reproductrice réduite jusqu'à ne plus s'accoupler avec les femelles comme l'a montré Khalfi (1983).

Nous avons remarqué en situation de non choix que la ponte des bruches n'a globalement pas varié d'une variété à une autre. Par contre, une différence significative est mise en évidence entre Mame Fama et Ndiaga Aw, cette dernière variété recueillant le moins d'œufs (figure IV-8). En situation de choix, la fécondité entre les variétés a varié de manière significative ; les insectes ont pondu plus d'œufs sur les graines des variétés Mame Fama et Baye Ngagne (figure IV-11). La différence de ponte globalement non significative en situation de non choix peut s'expliquer par le fait que toutes les variétés utilisées sont des hôtes favorables. Callosobruchus maculatus est aussi une des espèces de Bruchinae qui présente une large gamme de plantes hôtes, la plupart étant des légumineuses ; dès que les graines de l'une de ces espèces sont disponibles les femelles en l'absence de choix pondent de manière indifférente. Cependant, quand les femelles sont dans une situation où elles peuvent faire un choix, une différence de ponte significative peut être notée entre les différenres plantes hôtes. Ainsi dans la situation où les femelles avaient le choix de ponte entre les trois variétés, elles ont pondu plus sur les graines de Mame Fama et Baye Ngagne. Edde & Amatobi (2003) ont montré que quand les femelles de C. maculatus ont le choix de ponte entre des graines intactes et des graines décortiquées, elles préfèrent les graines intactes. La différence de ponte significative des femelles de C. maculatus que nous avons mise en évidence sur les différentes variétés peut être expliquée par la texture, la taille, la couleur, la dureté des téguments ou la composition chimique des graines. Selon Kellouche et al. (2004) la texture des graines peut influencer le comportement de ponte des femelles, alors que pour Souza et al. (2011) les composés des téguments des graines peuvent entrainer l'évitement de ces dernières par C. maculatus. La taille des graines est-elle un facteur influançant ou non la plonte des bruches? Cope & Fox (2003) ont montré que quand plusieurs graines de même taille sont présentées aux femelles de C. maculatus, ces dernières ont tendance à distribuer leurs œufs sur les graines de manière uniforme. Cependant, quand les graines diffèrent par leur taille, elles déposent leurs œufs de façon à maximiser la ressource disponible pour leurs progénitures et elles pondent donc sur les grandes graines de préférence. Donc les femelles peuvent évaluer la quantité relative de ressources disponibles à l'intérieur d'une graine plus précisément en évaluant la différence de taille entre les graines. Somta et al. (2006, 2008) ont par contre montré que la taille des graines n'est en rien responsable de la différence d'infestation observée sur différentes variétés de Vigna radiata, un parent sauvage du niébé. Selon Edde & Amatobi (2003), la taille des graines n'est probablement pas l'explication de la variation du nombre d'œufs pondus d'une variété à une autre ; ces mêmes auteurs mentionnent que le tégument de la graine n'a aucun effet sur la ponte des bruches. Somta et al. (2008) ont aussi montré que le tégument des graines des variétés résistantes n'a aucun effet sur la protection contre les bruches. Si la taille semble être un facteur influançant la ponte dans notre étude, cet influence serait très faible. En effet, les graines de Ndiaga Aw qui sont les moins infestées sont plus petites que les graines de Mame Fama et de Baye Ngagne ; cependant, la différence de taille entre ces trois variétés est très faible pour être la seule explication de ces différences observées. La différence de ponte non significative entre Ndiaga Aw et Baye Ngagne en situation de non choix nous informe aussi de l'influence minime de la taille des graines sur la ponte des femelles de C. maculatus. D'autres facteurs que la taille des graines apparaissent être responsables de cette différence de ponte entre les trois variétés. Selon Delobel et al. (2000), le choix de ponte des femelles de bruches dépend des facteurs environnementaux tels que les stimuli provenant de la graine, comme l'odeur, la texture ou le degré d'humidité. Pour Parr et al. (1998), les composés chimiques présents à la surface des graines (acides gras et alkanes) jouent un rôle important dans l'induction du comportement de ponte chez C. maculatus. Ces composés chimiques à la surface des téguments, probablement en relation avec la couleur et la dureté du tégument, expliquent la différence de ponte significative aussi bien en situation de choix que de non choix entre Mame Fama (variété de couleur blanche) et Ndiaga Aw (variété de couleur marron). Selon Lattanzio et al. (2005) les téguments des graines de niébé colorées contiennent un taux élevé de tannins (dépendant de l'intensité de la couleur), un polyphenol qui confère des degrés différents de protection contre les phytophages. Morrison et al. (1995) ont montré que la teneur en lignine contenue dans le tégument des graines colorées est plus élevée que celle contenue dans les téguments des graines blanches. La capacité des insectes parasites à distinguer la qualité des hôtes peut donc considérablement affecter leur fécondité. Le choix de ponte devrait être basé en partie sur la qualité des ressources disponibles, les femelles préférant les ressources de qualité plus haute (Mitchell 1975).

Une préférence de ponte des femelles de *C. maculatus* sur les graines des variétés Mame Fama et Baye Ngagne au détriment de Ndiaga Aw a été mise en évidence. Cependant, selon Vir & Jindal (1981) et Shazali (1989), la préférence de ponte n'implique pas forcément une meilleure performance

lors du développement larvaire. Ainsi, nous avons étudié l'émergence des adultes en fonction des variétés. Il est clair que si on se limitait juste au nombre d'adultes émergés, une corrélation positive serait mise en évidence avec les œufs pondus puisque toutes les variétés utilisées sont favorables au développement des larves de *C. maculatus*. Il est donc préférable comme nous l'avons fait d'étudier le taux d'émergence (nombre d'adultes émergés sur le nombre d'œufs pondus) en fonction des variétés.

Le nombre d'émergences a varié d'une graine à l'autre et d'une boite à l'autre. Chez la variété Mame Fama, toutes les graines présentaient au moins un trou de sortie, chez Baye Ngagne 98.7 % des graines ont présenté au moins un trou de sorti et 96.7 % des graines chez Ndiaga Aw. Cependant, ce nombre a dépassé rarement 5 bien que chez Mame Fama et Baye Ngagne, variétés les plus infestées, nous avons compté sur certaines graines jusqu'à plus de 10 œufs. De cette observation, nous pouvons dire que si la graines est fortement attaquée, seuls quelques œufs arrivent à maturité ; ceci, peut être expliqué par l'existence d'une compétition larvaire à l'intérieur de ces graines. Une dissection de ces dernières afin de voir le comportement et le stade des larves à l'intérieur nous aurait donné une idée de la présence ou non de compétition ; cependant, nous n'avons pas pris en compte cet aspect, vu qu'il ne faisait pas partie de notre objectif de départ.

L'observation du rythme d'émergence des adultes a été journalier et s'est étalé sur une durée de 15 jours ; ceci nous a permis de voir le comportement de chaque variété vis-à-vis de *C. maculatus*. La variété Ndiaga Aw, la plus résistante, a pu être distinguée des variétés Mame Fama et Baye Ngagne. En effet, chez Ndiaga Aw, les émergences des adultes sont retardées alors que chez les variétés Mame Fama et Baye Ngagne l'émergence à été précoce. Cette observation est en phase avec celle faite par Singh & Singh (1992).

Les taux d'émergence obtenus entre les variétés ont varié de manière significative aussi bien en situation de choix que de non choix. La variété Mame Fama présente le taux le plus élevé, suivi de la variété Baye Ngagne ; chez Ndiaga Aw, ce taux est faible. Ce pourcentage d'émergence faible chez Ndiaga Aw indique une mortalité larvaire plus importante, qui peut être expliquée par plusieurs raisons. Une première explication est que le tégument, par sa composition chimique et sa dureté, constitue une barrière à la pénétration des larves de première stade pour entrer dans les cotylédons. Les larves peuvent traverser plus facilement les téguments des graines de Mame Fama et de Baye Ngagne que ceux des graines de Ndiaga Aw, probablement plus riches en lignine et autres composés chimiques. Ainsi, des larves ne pouvant pas traverser cette dure barrière meurrent avant d'atteindre les cotylédons et certaines parmi celles qui ont pu traverser n'ont peut-être pas vu leur développement aboutir à cause de la forte énergie dépensée préalablement. Cette mortalité pourrait aussi être expliquée par le fait que certaines larves se soient alimentées du tégument et que des composés chimiques défavorables à leur bon développement, présents (ou plus concentrés) à la surface du tégument des graines de Ndiaga Aw et absents (ou moins concentrés) à la surface des téguments des

graines de Mame Fama et de Baye Ngagne, aient entrainé une mortalité plus importante chez Ndiaga Aw. Selon Dobie et al. (1990), le tégument séminal de certaines plantes, riches en tannins et en lignine, peut constituer une barrière de nature chimique contre la pénétration de larves de bruches. Pour Gbaye & Holloway (2011), la lignine renforce la paroi des cellules végétales ; ainsi la larve de premier stade fournira beaucoup d'energie pour pénétrer le tégument des graines colorées riches en tanin et en lignine. Cependant, selon Somta et al. (2008) le fait que les larves de bruches soient capables de pénétrer les téguments de graines résistantes et de se retrouver dans les cotylédons de Vigna radiata suggère que les téguments des graines résistantes n'ont pas de rôle effectif sur la protection des graines contre les bruches. Le taux d'émergence faible chez Ndiaga Aw peut aussi être expliqué par une forte mortalité des larves dans les cotylédons, due sans doute à la présence de composés biochimiques que certaines larves n'ont pas pu détoxifier. Edde & Amatobi (2003) ont observé une mortalité plus élevée de C. maculatus sur les graines de variétés de niébé moins sensibles ; cependant, les barrières mécaniques et chimiques offertes par le tégument des graines ne sont pas les causes. Pour eux, cette mortalité est du aux antibioses au niveau des cotylédons. Selon Souza et al. (2011), un très grand nombre de proteines et de peptides trouvés dans les cotylédons ont été associés à la résistance de quelques graines contre les insectes.

Concernant la durée de développement, les résultats montrent l'importance du substrat de ponte sur le développement des larves. La durée de développement est plus rapide sur les graines de Mame Fama et de Baye Ngagne comparativement aux graines de Ndiaga Aw. Nos résultats sont en phase avec l'observation faite par Kellouche *et al.* (2004). En comparant la durée du développement embryonnaire et post-embryonnaire de *C. maculatus* dans les graines de *Cicer arietinum* et de *Vigna unguiculata*, ces auteurs ont constaté une durée de développement beaucoup plus rapide sur les graines de niébé les plus sensibles. De même Appleby & Credland (2004) ont observé sous les mêmes conditions expérimentales que le temps de développement des adultes est beaucoup plus long sur les graines des variétés de niébé résistantes que sur les variétés sensibles.

Le niveau de sensibilité des variétés de niébé vis-à-vis de *C. maculatus* a aussi été testé en mesurant l'interaction entre le sexe des adultes à l'émergence. Nous avons constaté que le nombre de femelles est légèrement supérieur chez les adultes émergés des graines de Mame Fama; presque égal au nombre de mâles chez Baye Ngagne ; par contre chez Ndiaga Aw le nombre de mâles émergés dépasse celui des femelles (figure IV-10). Ainsi, on peut donc dire que Ndiaga Aw par sa composition physique ou chimique entraîne une sex-ratio en faveur des mâles ce qui n'est pas le cas chez les deux autres variétés. Si les femelles dominent dans la nouvelle génération, elles auront un rôles prépondérant dans l'infestation des graines stockées puis qu'il y aura plus d'œufs pondus d'où l'importance des dégâts dans les graines sensibles, ce qui ne sera pas le cas chez Ndiaga Aw où on aura probablement une compétition entre les mâles pour les femelles disponibles.

Cette étude, nous a permis de constater que quand les femelles de *C. maculatus* sont dans des situations d'absence de choix, elles pondent globalement de manière indiférente sur les différentes variétés qui leurs sont proposées, bien qu'une différence significative est notée entre Mame Fama et Ndiaga Aw, par contre si elles ont le choix, leur ponte est plus importante sur les variétés Mame Fama et Baye Ngagne que sur la variété Ndiaga Aw. Cependant, aussi bien en situation de choix que de non choix, le taux d'émergence est significativement plus important chez les variétés Baye Ngagne et Mame Fama. Chez la variété Ndiaga Aw, nous avons noté un faible taux d'émergence. Il en est de même pour la sex ratio qui est en faveur des femelles chez Baye Ngagne et Ndiaga Aw et en faveur des mâles chez la variété Ndiaga Aw et aussi des durées de développement plus courts chez Baye Ngagne et Mame Fama que chez Ndiaga Aw.

Conclusion générale et perspectives

*Callosobruchus maculatus* est l'une des espèces d'insectes nuisibles pour lesquelles on dispose du maximum d'information sur sa biologie et son écologie. Ceci est probablement dû à son importance économique ainsi qu'à sa répartition mondiale, favorisée par sa grande capacité d'adaptation. L'importance accordée à cette espèce est aussi liée au fait qu'elle appartient au groupe d'animaux le plus facile à manipuler et que son cycle de développement est très court (Beck & Blummer, 2007). Le contrôle des populations de cette espèce est primordial dans la lutte contre les insectes ravageurs de denrées stockées. Cependant, une bonne réussite des actions entreprises contre ses populations nécessite une meilleure connaissance de l'espèce. C'est ainsi que nous avons investigué son écologie et sa structuration génétique pour tirer le maximum d'information sur ce ravageur cosmopolite.

Dans les deux premiers chapitres de cette thèse, l'aspect génétique de C. maculatus a été exploré à différents niveaux. En se basant sur les séquences nucléaires, nous n'avons pas pu résoudre les relations phylogénétiques entre les populations de C. maculatus aussi bien pour l'étude de sa structuration génétique en Afrique de l'Ouest qu'au niveau mondial. Cependant, les réseaux d'allèles ont été plus informatifs et nous ont permis d'identifier certains groupes d'allèles caractéristiques de certaines régions géographiques. L'utilisation de séquences nucléaires dans l'étude des relations génétiques entre populations de C. maculatus s'avère être peu informatif, probablement en raison de la grande taille efficace des gènes nucléaires. Contrairement aux régions nucléaires, les régions mitochondriales nous ont permis d'obtenir plus d'informations sur les populations de C. maculatus. Ainsi, notre étude est en phase avec celles qui ont déjà mis en évidence l'avantage des séquences mitochondriales sur les séquences nucléaires dans le cadre d'études phylogéographiques d'insectes ravageurs (Mardulyn et al., 2011; O'Neill et al., 2009). En effet, le débat sur l'utilisation des marqueurs mitochondriaux face aux marqueurs nucléaires est toujours d'actualité (Zink & Barrowclough 2008 ; Barrowclough & Zink 2009 ; Edwards & Bensch 2009). Les allèles mitochondriaux sont réciproquement monophylétiques quatre fois plus rapidement que les allèles nucléaires, ce qui les rend plus appropriés que les derniers pour connaitre et définir des unités évolutives dans un contexte phylogéographique (Zink & Barrowclough, 2008).

# Différenciation ou homogénéisation génétique des populations ouest africaines de C. maculatus?

Dans la région ouest africaine, nous avons montré que les populations de *C. maculatus* forment *un groupe génétique homogène à l'exception de quelques populations au Togo*. Ceci suggère *un flux de gènes important* dans cette partie de l'Afrique, et *les échanges des graines de niébé favorisée par la mise en place de Comité Inter-Etat de Lutte contre la Sécheresse dans le Sahel (CILSS), mais aussi l'absence de barrières géographiques entre ces différentes régions, constituent des facteurs expliquant ces migrations. Le flux de gènes très répandu dans les* 

populations ouest africaines de *C. maculatus* a des implications sur les méthodes de lutte utilisée par ces pays. L'homogénéité génétique entre les sites géographiques est de bon augure pour une stratégie de contrôle régional ; cependant, une telle stratégie, qui devrait tenir compte des niveaux élevés de diversité génétique et du flux de gènes suggéré dans cette étude, demeure une question ouverte. En effet, le niveau élevé de la diversité pourrait suggérer un réservoir génétique suffisamment élevé pour permettre une sélection naturelle qui sélectionne les spécimens résistants aux insecticides et le niveau élevé de flux de gènes pourrait permettre aux spécimens résistants aux insecticides de se propager rapidement dans la région ouest africaine.

# Origine géographique, principales voies de dispersion et histoire démographique de C. maculatus?

Une analyse phylogéographique réalisée au niveau de populations échantillonnées au sein de la distribution mondiale de C. maculatus nous a permis d'observer une différenciation faiblement significative en fonction des différents continents ce qui peut expliquer une importante dispersion de C. maculatus à partir de son lieu d'origine, identifiée dans cette étude comme étant le continent africain. Les populations ouest africaines qui se sont mélangées dans certains clades avec les populations nord-américaines et asiatiques ont vraisemblablement envahi le monde par différentes voies et à différentes périodes suite aux échanges de semences par l'homme. Quant aux populations sud-américaines, elles montreraient plutôt une origine asiatique, leur introduction ayant probablement été facilitée, ici également, par le commerce de graines de niébé à grande échelle. En comparant les populations ouest africaines avec celles du nord, du centre et de l'est du continent africain, nous avons constaté une forte différentiation génétique et une quasi absence de flux de gènes, ce qui peut être expliqué par l'absence d'échange entre ces différentes régions. Le Sahara qui acquiert son climat aride actuel à la fin du Pleistocène/début de l'Holocène a probablement limité les échanges commerciaux entre le nord de l'Afrique et les autres régions. La divergence génétique entre l'Afrique de l'ouest et l'Afrique de l'est et du centre peut s'expliquer par la présence de barrières géographiques. La ligne volcanique du Caméroun a probablement limité les échanges entre l'ouest et l'est africain limitant ainsi le flux de gènes. La colonisation de l'Asie à partir de l'Afrique a été la plus ancienne et a probablement eu lieu en Inde où le niébé, principale plante hôte de C. macuatus, a été introduit pour la première fois en dehors de l'Afrique. La colonisation du nouveau monde est plus récente, et s'est déroulée après l'exploration de l'Amérique par les Européens, puis par les Asiatiques, ce qui a permis une double introduction de C. maculatus à partir de l'ouest africain et de l'Asie. L'évolution de l'espèce humaine et de son mode de vie aurait certainement permis l'expansion de C. maculatus. En effet, nous avons montré que les populations de ce ravageur ont connu une expansion démographique à une période qui coïncide

avec la période où l'homme a abandonné son statut de chasseur-cueilleur pour devenir producteur ce qui a impliqué aussi la domestication de plantes. Il est possible que la domestication du niébé soit l'élément majeur de cette expansion. *Callosobruchus maculatus* est une espèce à faible capacité de dispersion et une durée de vie très courte. Sa propagation est étroitement liée aux activités humaines, notamment la dissémination de graines infestées par ses larves. Le phénomène de domestication qui aurait permis l'invasion de *C. maculatus* a été observé chez d'autres insectes tels que *Drosophila melanogatser* et *Musca domestica*.

#### Etude Bioécologie

Le dernier chapitre de cette thèse a été consacré à l'étude bioécologique des populations de C. maculatus dans le nord du bassin arachidier sénégalais. La particularité de cette étude par rapport à celles qui l'ont précédées est que ces populations ont d'abord été étudiées dans les milieux naturels de cultures, en tenant compte de facteurs pouvant influer plus ou moins leur dynamique, avant que le comportement de ces populations dans des situations de stocks en présence de choix et de non choix ne soit exploré. Nos résultats montrent que la distance des lieux de stockage avec les champs n'influe pas de manière significative sur la ponte des femelles de C. maculatus, contrairement à Bruchidius atrolineatus l'autre espèce de Bruchinae avec qui elle interagit dans le nord du Sénégal. En effet, nous avons montré que bien qu'en valeur absolue la ponte des femelles soit plus importante dans les champs proches des lieux de stockage, sa différence avec ceux situés loin des lieux de stockage est non significative. Ceci nous amène à émettre l'hypothèse selon laquelle certaines des femelles responsables de l'infestation primaire peuvent provenir d'autres plantes hôtes naturelles. Cependant, ce fait confirme l'optique selon laquelle C. maculatus opère un choix de ponte sur les gousses de niébé au champ. En effet, en plus de cette quasi homogénéisation de la ponte dans les deux groupes de champs, nous avons constaté que les individus de C. maculatus ayant émergé des échantillons de la première collecte sont peu nombreux, ce qui montre qu'au lieu de pondre en masse sur les premières gousses disponibles, C. maculatus préfère déposer ses œufs sur les rares gousses matures qui permettront un bon développement et un taux de survie plus élevé à sa descendance. Ceci peut expliquer son émergence importante dans les gousses du dernier échantillonnage.

Nos résultats ont aussi montré que le *comportement de C. maculatus est fonction de la variété de niébé exploitée*. En effet, bien que toutes les variétés utilisées aient permis un développement de *C. macalatus*, ses populations se sont mieux comportées sur les variétés Mame Fama et Baye Ngagne, variétés blanche et tacheté respectivement, alors que sur Ndiaga Aw de couleur marron son taux de réussite est moins important. La mortalité larvaire plus importante chez Ndiaga Aw que chez les deux autres variétés est probablement liée à des facteur anti-nutritionels

contenus dans les cotylédons de cette dernière. Par ailleurs, la variété Ndiaga Aw a été caractérisée par un faible taux d'émergence des adultes de *C. maculatus*, une durée de développement plus longue, une sex-ratio en faveur des mâles par rapport aux autres variétés qui sont plus sensibles. Ceci est en phase avec l'idée selon laquelle le sort de *C. maculatus* est susceptible d'être déterminé par les facteurs biochimiques qui interviennent dans l'alimentation de la larve en cours de développement. Cependant, les composés nuisibles à l'insecte dans les téguments des graines peuvent aussi jouer un rôle important dans la discrimination des graines de niébé par *C. maculatus* et constituer aussi un mécanisme de défense efficace qui empêche l'arrivée des larves d'ennemis naturels dans les cotylédons des graines. Toutes les raisons énumérées ci-dessus expliquent pourquoi *la variété Ndiaga Aw est la moins préférée par C. maculatus pour son développement*, ce qui expliquerait du coup sa forte utilisation par les paysans. Ceci est une information importante dans le domaine de la sélection variétale pour lutter contre ce ravageur. Une étude similaire à grande échelle et sur une large gamme de variété pourrait permettre de mettre en évidence la ou les variétés qui se comportent mieux contre l'attaque de ce ravageur, et dont la culture pourrait être encouragée.

#### **Perspectives**

Bien qu'en Afrique de l'Ouest un flux de gènes entre populations existe, nous avons noté une sous structuration dans certaines régions. Ceci montre que d'autres facteurs que l'isolement géographique interviennent pour contribuer à structurer ces populations. Il ne faut pas négliger l'effet de la plante hôte puisque nous savons que C. maculatus est une espèce qui est polyphage. Il serait donc nécessaire de faire une étude plus approfondie pour essayer de mettre en évidence une influence éventuelle de ces plantes sur les sous-structurations mises en évidence ici. Il serait aussi nécessaire d'étudier l'effet des composés chimiques utilisés pour lutter contre cette espèce sur la taille de certaines populations mais également sur l'émergence éventuelle d'individus résistants. Si nos résultats nous ont permis d'identifier l'Afrique comme étant le continent d'origine de C. maculatus, nous ne sommes pas en mesure de préciser la région précise de cette origine. Or connaitre le lieu précis d'origine de C. maculatus peut se révéler important, particulièrement en ce qui concerne les efforts pour trouver des parasitoïdes capables de lutter contre ce ravageur. En effet, des ravageurs introduits dans une nouvelle aire géographique peuvent être responsables de dégâts très importants, puisqu'ils ne sont pas contrôlés par leurs ennemis naturels (prédateurs, parasitoïdes), comme c'est le cas dans leur aire d'origine. Cette méthode a dans le passé connu un grand succès, notamment, dans le cas de la lutte contre la cochenille de Citrus sp., Icerya pruchasi qui a été durablement maîtrisé grâce à la coccinelle Rodalia cardinalis importée d'Australie, l'aire d'origine de la cochenille ravageur des plantations d'agrumes californiennes (Hoddle, 2004). Pour

atteindre cet objectif une étude similaire avec un large échantillonnage couvrant toutes les régions de l'Afrique est nécessaire. Par ailleurs, il faut noter que certaines populations échantillonnées dans cette étude ne comprennent qu'un faible nombre d'individus ; une perspective serait d'augmenter l'échantillonnage de ces populations pour les rendre plus représentatives. Il pourrait également être pertinent d'utiliser d'autres types de marqueurs, comme les microsatellites, ce qui nous permettrait de tirer le maximum d'informations sur la structure des populations de *C. maculatus* via son génome nucléaire. Ainsi, dans nos projets futurs, il est prévu de mettre sur pied des marqueurs microsatellites chez *C. maculatus*.

Références bibliographiques

Adams, J.M. (1977). Post-harvest losses in cereals and pulses. The results of a questionnaire survey. *Tropical Stored Product Information*, 34: 23-48.

Ajayi, F.A. & Wintola, H.U. (2006). Suppression of the cowpea Bruchid (*Callosobruchus maculatrus* F.) infesting stored cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seeds with some edible plant product powders. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 1454-1459.

Akingbohungbe, A.E. (1976). A note on the relative susceptibility of unshelled cowpeas to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). *Tropical Grain Legume Bulletin*, 5: 11-13.

Akpovi, C.S. (1993). Etude au laboratoire de l'efficacité de *Dinarmus basalis* Rondani. (hymenoptera : Pteromalidae) ectoparasite de *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera : Bruchidae). Mémoire d'ingénieur Agronome. Univ. Nation. du Bénin. Cotonou Bénin ; 98p.

Allen, D.J. (1983). The pathology of tropical food legumes. John Wiley and Sons, Chichester.

Alvarez, N., McKey, D., Hossaert-McKey, M., Born, C., Mercier, L. & Benrey, B. (2005). Ancient and recent evolutionary history of the bruchid beetle, *Acanthoscelides obtectus* Say, a cosmopolitan pest of beans. *Molecular Ecology*, 14(4): 1015-1024.

Alzouma, I. (1981). Observations of the ecology of *Bruchidius atrolineatus* Pic. and *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) in Niger. In: *The Ecology of Bruchids Attacking Legumes*. Edited by Labeyrie, Sunk, The hague: pp.205-213

**Alzouma, I.** (1986). Les bruches de niébé (*V. unguiculata* (L) Walp en zone sahélienne, au Niger: perspective pour un développement de stratégies de lutte contre les ravageurs. *Annale de l'Université de Niamey*, 3: 55-73.

Alzouma, I. (1987). Reproduction et développement de *Bruchidius atrolineatus* Pic. (Coleoptera : Bruchidae) aux dépens des cultures de *Vigna unguiculata* L. Walp (Leguminosae : Papilionaceae) dans un agrosystème sahélien au Niger. Thèse de Doctorat d'Etat, Univ. François-Rabelais, Tours France, 162p.

Alzouma, I., Huignard, J. & Lenga, A. (1996). Les coléoptères Bruchidae et autres insectes ravageurs des légumineuses alimentaires en zone tropicale. In : *Post-récolte : Principes et applications en zone tropicale*. Edité par Verstraeten C., ESTEM/AUPELF. pp. 79-103

Amevoin, K., Glitho, I.A., Nuto, Y. & Monge, J.P. (2006). Dynamique des populations naturelles de bruches et de leurs parasitoïdes nympholarvophages en situation expérimentale de stockage du niébé en zone guinéenne. *Tropicultura*, 24 (1): 45-50.

Anton, K. W. & Delobel. A. (2004). Description of Five New Species in the Genus *Caryedon* Schoenherr, With a Taxonomical Note on C. Angeri (Semenov) (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerinae). *Genus*, 15(1): 65-90.

**Appleby, J.H. & Credland, P.F. (2004)**. Environmental conditions affect the response of West African *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) populations to susceptible and resistant cowpeas. *Journal of Stored Products Research*, 40: 269-287.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.

Avise, J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36 (1): 3-15.

Bale, J.S., Masters, G.J., Hodkinson, I.D., Awmack, C., Bezemer, T.M., Brown, V.K., Butterfield, J., Buse, A., Coulson, J.C., Farrar, J., Good, J.E., Harrington, R., Hartley, S., Jones, T.H., Lindroth, R.L., Press, M.C., Symrnioudis, I., Watt, A.D. & Whittaker J.B. (2002). Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, 8: 1-16.

**Ballard, J.W.O. & Rand, D.M. (2005)**. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annual Review Ecology, Evolution Systematics*, 36: 621-642.

**Barrowclough, G.F. & Zink, R.M. (2009)**. Funds enough, and time: mtDNA, nuDNA and the discovery of divergence. *Molecular Ecology*, 18: 2934-2936.

Barton, C.M., Riel-Salvatore, J., Anderies, J.M. & Popescu, G. (2011). Modeling human ecodynamics and biocultural interactions in the Late Pleistocene of Western Eurasia. *Human Ecology*, 39: 705-725.

Batley, J., Edwards K.J., Barker J. H. A., Dawson, K.J., Wiltshire C.W., Glen D.M. & Karp, A. (2004). Population structure of the beetle pests *Phyllodecta vulgatissima* and *P. vitellinae* on UK willow plantations. *Insect Molecular Biology*, 13: 413-421.

**Beck, C.W. & Blumer, L.S. (2007)**. A Hand Book of Bean Beetles *Callosobruchus maculatus*. (http://www.beanbeetles.org/ handbook, assessed on 10.4.2007).

Beck, C.W. & Blumer, S.B. (2011). A Handbook on Bean Beetles, *Callosobruchus maculatus*. www.beanbeetle.org

Belshaw, R. & Quicke, D.L.J. (2002). Robustness of ancestral state estimates: evolution of life history strategy in ichneumonoid parasitoids. *Systematic Biology*, 51: 450-477.

**Bieri, J. & Kawecki, T.J. (2003)**. Genetic architecture of differences between populations of cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) evolved in the same environment. *Evolution*, 57: 274-287.

Borer, M., Alvarez, N., Buerki, S., Margraf, N., Rahier, M. & Naisbit, R.E. (2010). The phylogeography of an alpine leaf beetle: divergence within *Oreina elongata* spans several ice ages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 703-709.
Borror, D.J., Triplehorn, C.A. & Johnson, N.F. (1989). An introduction to the study of Insects. Saunders College Publishing. New York, 996 p.

**Buerki, S., Forest, F., Alvarez, N., Nylander, J.A.A., Arrigo, N. & Sanmartín, I. (2011)**. An evaluation of new parsimony-based versus parametric inference methods in biogeography: a case study using the globally distributed plant family Sapindaceae. *Journal of Biogeography*, 38 (3): 531-550.

Cassey, P., Blackburn, T.M., Duncan, R.P. & Chown, S.L. (2005). Concerning invasive species: Reply to Brown and Sax. *Austral Ecology*, 30: 475-480.

**Caswell, G.H.** (1984). The value of the pod in protecting cowpea seed from attack by bruchid beetles. *Samaru Journal of Agricultural Research*, 2: 49-55.

Chikhi, L., Sousa, V., Luisi, P., Goossens, B. & Beaumont, M.A. (2010). The confounding effects of population structure, genetic diversity and the sampling scheme on the detection and quantification of population size changes. *Genetics*, 186: 983-995.

Cissé, N. & Hall, A.E. (2003). Traditional Cowpea in Senegal, a case study. 27 p.

Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10): 1657-1660.

**Cope, J.M. & Fox J.W. (2003)**. Oviposition decision in the seed beetle *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): effects of seed size on superparasitism. *Journal of Stored Products Research*, 39: 355-365.

Credland, P.F., Dick, K.M. & Wright, A.W. (1986). Relationships between larval density, adult size and egg production in the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Ecological Entomology*, 11: 41-50.

Daly, H.V., Doyen, J.T. & Purcell III, A.H. (1998). *Introduction to Insect Biology and Diversity*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, New York.

**Decelle, J. (1981)**. Bruchidae related to grain legumes in the afrotropical area. *In : The ecology of bruchids attacking legumes*, CABEYRIE Edit., The Hague, W. Junk, p. 193-197.

**De Lima, C.P.F. (1979)**. Appropriate techniques for use in the assessment of country loss in stored produce in the tropics. *Tropical Stored Product Information*, 38: 15-19.

**Delobel, A. & Tran, M. (1993)**. Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. Institut français de recherche pour le développement en coopération, Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale, Paris.

Delobel A., Delobel, H., Tran, M., Sembene, M. & Han, H.S. (1995). Observations sur les relations trophiques entre les bruches du genre *Caryedon* (Coléoptère, Bruchidae) et leurs plantes hôtes sauvages au Sénégal. *Bulletin De L'institut Fondamental D'afrique Noire, Cheick Anta Diop, Dakar*, Série A, 48: 79-88.

**Delobel, A., Tran, M. & Sembene, M. (2000)**. Influence du choix alimentaire sur la fécondité et le développement larvaire des *Caryedon* des légumineuses (Coleoptera :Bruchidae) Au Sénégal. *Annale de la Société Entomologique de France*, 36(1): 61-73.

**Djossou, J. (2007)**. Etude des possibilités d'utilisations des formulations à base de fruits secs de *Xylopia aethiopica* Dunal (Annonaceae) pour la protection des stocks de niébé contre *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera : Bruchidae). Mémoire, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux Belgique.

**Dobie, P. (1981)**. The use of resistant varieties of cowpea (*Vigna unguiculata*) to reduce losses due to post harvest attack by *Callosobruchus maculatus*. *In: The Ecology of Bruchids Attacking Legumes* (Pulses): 185-192. (ed. V. Labeyrie). Dr. W. Junk Publisher. London.

**Dobie, P., Dendy, J., Sherman, C., Padgam, J., Wood, A. & Gatehouse, A.M.R. (1990)**. New sources of resistance to *A. obtectus* and *Z. subfasciatus* bokeman (*Coleoptera: Bruchidae*) in mature seed of five species of *Phaseolus. Journal of Products Stored Research*, 4: 177-186.

Doumma, A., Liman, A.I., Toudou, A. & Alzouma, I. (2006). Comportement de vingt variétés de niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) vis-à-vis de *Bruchidius atrolineatus* (Pic) et *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera : Bruchidae). *Cahiers Agricultures*, 15 (2): 187-193.

Drew, B.A., Granovsky, T.A. & Lindblad, C.J. (1978). Representative sampling, interpretation of result, accuracy and reliability. *American Association. Cereal Chemist*, 45-55.

Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J. & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4: e88.

**Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007)**. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionry Biology*, 7: 214.

Edde, A.P. & Amatobi, C.I. (2003). Seed coat has no value in protecting cowpea seed against *Callosobruchus maculatus* (F.). *Journal of Stored Product Research*, 39: 1-10.

Edwards, K.D., Lynn, J.R., Gyula, P., Nagy, F., & Millar, A.J. (2005). Natural allelic variation in the temperature compensation mechanisms of the *Arabidopsis thaliana circadian* clock. *Genetics*, 170: 387-400.

Edwards, S. & Bensch, S. (2009). Looking forwards or looking backwards in avian phylogeography? A comment on Zink and Barrowclough 2008. *Molecular Ecology*, 18: 2930-2933.

Endersby, N.M., Mckechnie, W., Ridland, P.M. & Weeks, A.R. (2006). Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Molecular Ecology*, 15: 107-118.

**Espindola, A., Buerki, S. & Alvarez, N. (2012)**. Ecological and historical drivers of diversification in the fly genus *Chiastocheta* Pokorny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63: 466-474.

**Esposti, M. D., DeVries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T. & Meyer, A. (1993)**. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143: 243-271.

**Everett, R.A.** (2000). Patterns and pathways of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 177-178.

**Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992)**. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

**Excoffier, L. & Ray, N. (2008)**. Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends in Ecology and Evolution*, 23(7): 347-351.

Excoffier, L. & Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource*, 10: 564-567. FAO stat (2008): http://faostat.fao.org/default.aspx

Fatunla, T. & Badaru, K. (1983). Resistance of cowpea pods to *Callosobruchus maculatus* (Fabr.). *Journal of Agricultural Science*, 100: 205-210.

**Felsenstein, J. (2006)**. Accuracy of coalescent likelihood estimates: do we need more sites, more sequences, or more loci? *Molecular Biology and Evolution*, 23(3): 691-700.

Fisher, R.A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press, Oxford, 318 pp.

Fox, C.W. (1994). The influence of egg size on offspring performance in the seed beetle, *Callosobruchus maculatus. Oikos*, 71: 321-325.

Fox, C.W., Stillwell, R.C., Amarillo, A.R., Czesak, M.E. & Messina, F.J. (2004). Genetic architecture of population differences in oviposition behaviour of the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 17: 1141-1151.

Franco, F.A.L., Morillas-Márquez, F., Barón, S.D., Morales-Yuste, M., Gálvez, R., Díaz, V., Pesson, B., Alves-Pires, C., Depaquit, J., Molina, R., Afonso, M.O., Gállego, M., Guernaoui, S., Bounamous, A. & Martín-Sánchez, J. (2010). Genetic structure of *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: epidemiological implications. *International Journal for Parasitology*, 40: 1335-1346.

Friedman, J. & Rowlands, M.J. (1977). Notes Toward an Epigenetic Model of Civilization. In The Evolution of Social Systems, edited by Jonathan Fried-man and Michael J. Rowlands, pp. 201-276. Duckworth,London.

**Fu, Y.X.** (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.

Funk, D.J. & Omland, K.E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34: 397-423.

Ganesalingham, V.K. & Krishnarajah, S.R. (1979). Infestation of *Sitotroga cerealclla* (Olivier) under field conditions and storages in Northem Sri Lanka. *Ceylan Journal of Science. (Biological Sciences)*, 13: 1-2.

Gatehouse, R., Dewey, I., Dowe, J., Fenten, A. & Pusztai, A. (1984). Effects of seed lectins from *Ph. vulgaris* mechanism of toxicity. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 35: 375-380.

**Gbaye, O.A. & Holloway, G. (2011)**. Varietal effects of cowpea, *Vigna unguiculata*, on tolerance to malathion in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Product Research*, 47 (4): 365-371.

Gillon, Y. (1986). Coévolution cumulative et coévolution substitutive. *Acta Oecologica, Oecalogia. Generalis,* 7(1): 27-36.

Gillon, Y., Rasplus, J.Y., Bougdadad, A. & Mainguet, A.M. (1992). Utilisation de légumineuses par un peuplement de bruchidae d'anthribidae (Coleoptera) en zone de mosaïque forêt -savane. *Journal of African Zoology*, 106:421-443.

Glitho, I.A., Nuto, Y., Attoh A., Sambena, B. & Kounnou, K. (1988). Ecologie et biologie de la reproduction des Bruchidae parasites des légumineuses alimentaires cultivées au Togo et au Bénin. Rapport ABN (Biosciences), Lomé ; 81p.

Goix, J. (1986). La bruche du haricot, revue Phytoma- Défense des cultures pp : 48-49.

Habibi T. (1998). L'inventaire et évaluation des dégâts des principaux insectes ravageurs des céréales stockés au niveau de la wilaya de Tiaret. Thèse Ing, Univ. Tiaret, 108 p.

Haldane, J. B. S. (1932). The Causes of Evolution. Longmans, Green & Co., London, 60 pp.

Hall, T. (2001). BioEdit version 5.0.6. Department of Microbiology, North Carolina State University.

Hallatschek, O., Hersen, P., Ramanathan, S. & Nelson, D.R. (2007). Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *Proceeding of the National Academy Sciences*, 104: 19926-19930.

Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985). Dating the Human-Ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.

Heled, J. & Drummond, A.J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1): 289.

Henshaw, F.O. (2008). Varietal differences in physical and proximate composition of cowpea (*Vigna unguiculata*). *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(3): 302-306.

Heong, K. L. (1981). Searching preference of the Food Nutr. Bull., 3(1): 24-38.

Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F. & Yoder, A.D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54 (1): 291-301.

Ho, S.Y.W. & Shapiro, B. (2011). Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, 11: 423-434.

Hoddle, M. (2004). The strength of biological control in the battle against invasive pests: a reply. *Conservation Biology*, 18: 61-64.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001). Mrbayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.

Huignard, J., Leroi, B., Alzouma, I. & Germain, J.F. (1985). Oviposition and development of *Bruchidae atrolineatus* Pic and *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) in *Vigna unguiculalata* L. Walp cultures in Niger. *Insect Science and its Application*, 6: 691-699.

Jackai, L.E.N. & Daoust, R.A. (1986). Insects pests of cowpea. Annual Review Entomology, 31: 95-119.

Janzen, D.H. (1976). *The interaction of seed predators and seed chemistry*. Colloques internationaux, Tours. 13-17 sept. 1976, Editions du CNRS, Paris, no 265. 415-428.

Kapila, R. & Agarwal, H. C. (1990). Biology, of an egg parasite of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). In *Proc. 5th Int. Work. Conf. on Stored-Prod. Prot.* Vol. II, Paris, Fleurat-Lessard F. et Ducom P., pp. 1265-1273.

Kavar, T., Pavlovčič, P., Sušnik, S., Meglič, V. & Virant-Doberlet, M. (2006). Genetic differentiation of geographically separated populations of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research*, 96: 117-128.

Kawecki, T.J. (1995). Adaptative plasticity of egg size in response to competition in the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Oecologia*, 102: 81-85.

Kébé, K. & Sembène, M. (2011). Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) field infestation by the bruchids (Coleoptera: Bruchidae) in the northern Senegal: preliminary biological and ecological data. *Journal of Applied Bioscience*, 41: 2788-2796.

**Kellouche, A. (2005)**. Etude de la bruche du poi-chiche, *Callosobruchus muculatus* (Coleoptera : bruchidae) : Biologie, physiologie, reproduction et lutte, Thèse. Doc d'état. Univ. Tizi-Ouzou, 154 p.

Kellouche, A., Soltanin, N. & Huignard, J. (2004). Activité de reproduction et capacité de dévelopment de la descendance de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) dans des graines de différents cultivars de *Vigna unguiculata* (Walp) et de *Cicer arietinum*. *International Journal of Tropical Insect Science*, 24 (4): 304-310.

**Kergoat, G.J., Silvain, J.F., Delobel, A, Tuda, M. & Anton, K.W. (2007)**. Defining the limits of taxonomic conservatism in host–plant use for phytophagous insects: Molecular systematics and evolution of host–plant associations in the seed-beetle genus *Bruchus* Linnaeus (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 251-269.

Ketoh, C. K., Glitoh, A. I. & Huignard, J. (2002). Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Col.: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. *Journal of Economic Entomology*, 95(1) : 174-182.

Khalfi, W. (1983). Biologie de la reproduction de *Callosobruchus maculatus*, effet de trois insecticides de synthèses sur la reproduction. Thèse de Magister en agronomie. INA EL, 75p.

**Kimura, M. (1980)**. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution*, 16: 111-120.

**Kingsolver, J.M. (2004)**. Handbook of the Bruchidae of the United States and Canada.United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service Technical Bulletin No. 1912. Vol. 1: 324 pp.

Kossou, D.K., & Aho, N. (1993). Stockage et conservation des grains alimentaires tropicaux: *Principes et Pratiques*. Les éditions du Flamboyant, 125p.

Kuo, C.H. & Avise, J.C. (2005). Phylogeographic breaks in low-dispersal species: the emergence of concordance across gene trees. *Genetica*, 124: 179-186.

Lammers, P.M. & van Huis, A. (1989). *Uscana lariophaga* Steffan (Hym: Trichogrammidae), egg parasitoid of the stored insect pests *Callosobruchus maculatus* F. and *Bruchidius atrolineatus* Pic. (Coleoptera: Bruchidae) population studies in the field and in the stored in Niger. Proc Intern Conf. Intgr. pest Manag. trop subtrop. Ecosystems, Bad Dürkheim, 3: 1013-1022.

Lansmanr, A., Avise, J.C., Aquadroj, C.F., Shapira, F. & Daniel, S.W. (1983). Extensive genetic variation in mitochondrial DNAs among geographic populations of the deer mouse, *Peromyscus maniculatus. Evolution*, 37: 1-1 6.

Larson, A.O. & Fischer, C.K. (1924). Longevity and fecondity of *Bruchus quadrirnacu1atus* Fab. as influenced by different Foods. *Journal of Agricultural Research*, 06: 297-306.

Lattanzio, V., Terzano, R., Cicco, N., Cardinali, A., Di Venere, D. & Linsalata, V. (2005). Seed coat tannins and bruchid resistance in stored cowpea seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 839-846.

**Lenting, M.I.** (2000). Preferences and performances of *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) on pods of various plant species towards naturals vegetation manipulation on cowpea production in Benin. Thesis of Msc n°003. Univ. Wageningen, 31p.

Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP version v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.

Lienard, V. & Seck, D. (1994). Revue des méthodes de lutte contre *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera : Bruchidae), ravageur des graines de niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp) en Afrique Tropicale. *Insect Science and its Application*, 15 (3): 301-311.

Lockwood, J.L., Hoopes M.F. & Marchetti, M.P. (2007). Invasion Ecology. Blackwell publishing, 304 pp.

Lopez, J.V., Yuhki, N., Modi, W., Masuda, R. & O'Brien, S.J. (1994). "Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA in the nuclear genome of the domestic cat". *Journal Molecular Evolution*, 39: 171-190.

Lynch, M., Koskella, B. & Schaack, S. (2006). Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science*, 311: 1727-1733.

Maina, Y.T. & Lale, N.E.S. (2004). Efficacy of integrating varietal resistance and neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) and seed oil for the management of *Callosobruchus maculatus* infesting bambara groundnut in storage. *Nigerian Journal of Entomology*, 21: 94-103.

Manel, S., Schwartz, M., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189-197.

Mardulyn, P. (2001). Phylogeography of the Vosges mountains populations of *Gonioctena pallida* (Coleoptera: Chrysomelidae): a nested clade analysis of mitochondrial DNA haplotypes. *Molecular*. *Ecology*, 10: 1751-1763.

Mardulyn, P., Milinkovitch, M. C. & Pasteels, J. M. (1997). Phylogenetic analyses of DNA and allozyme data suggest that *Gonioctena* leaf beetles (Coleoptera; Chrysomelidae) experienced convergent evolution in their history of host-plant family shifts. *Systematic Biology*, 46: 722-747.

Mardulyn, P., Othmezouri, N., Mikhailov, Y.E. & Pasteels, J.M. (2011). Conflicting mitochondrial and nuclear phylogeographic signals and evolution of host-plant shifts in the boreo-montane leaf beetle Chrysomela lapponica. *Molecular Phylogeny and Evolution*, 61(3): 686-696.

Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D. & Lefeuvre, P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26: 2462-2463.

Messina, J.F. (1984). Influence of cowpea pod maturity on the oviposition choices and larval survival of a bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Entomologia Experimentalis and et Applicata*, 35: 241-248.

Messina, F.J. & Mitchell, R. (1989). Intraspecific variation in the egg-spacing behavior of the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Behavior*, 2: 727-742.

Messina, F.J. & Renwick, J.A.A. (1985). Ability of ovipositing seed beetles to discriminate between seeds with differing egg loads. *Ecological Entomology*, 10: 225-230.

Messina, F.J & Jones, J.C. (2009). Does rapid adaptation to o poor-quality host by *Callosobruchus maculatus* (F.) cause cross-adaptation to other legume host? *Journal of Stored Products Research*, 45: 215-219.

Mikolo, B., Massamba, D., Matos, L., Lenga, A., Mbani, G., & Balounga, P. (2007). Conditions de stockage et revue de l'entomofaune des denrées stockées du Congo-Brazzaville. *Journal des Sciences*, 7 (1): 1-9.

Mitchell, R. (1975). The evolution of oviposition tactics in the bean weevil, *Callosobruchus maculatus* (F). *Ecology*, 56: 696-702.

Mitchell, R. (1990). Behavioural ecology of *Callosobruchus maculatus*, K. Fujii, A.M.R. Gatehouse, C.D. Johnson, R. Mitchell, T. Yoshida, Editors, *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., 317-329.

**Monge J. P. & Huignard J. (1991)**. Population fluctuations of two bruchid species *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Bruchidius atrolineatus* (Pic.) and their parasitoids *Dinarmus basalis* (Rondani) and *Eupelmus vuilleti* (Crawford) (Hymenoptera, Pteromalidae, Eupelmidae) in storage situation in Niger. *Journal of African Zoology*, 105: 187-196.

Monge J. P., Ouedraogo A. P. & Huignard J. (1990). Development of two bruchid species *Bruchidius atrolineatus* (Pic) and *Callosobruchusmaculatus* (F.) and their larval parasitoids during storage of cowpea seeds *Vigna unguiculata* (Walp) in West Africa. In *Proc. 5th Int. Working. Cofn Stored- Prod. Prot.* Vol. 1, Paris, Fleurat-Lessard F. et Ducom P., pp. 151-160.

Monge, J.P., Dupont, P., Idi, A. & Huignard, J. (1995). The consequence of interspeific competition between *Dinarmus basalis* Rond and *Eupelmus vuilleti* Crw (Hymenoptera: Eupelmidae) on the development of their host populations. *Acta Oecologia*, 16(1): 19-30.

Mooney, H.A. & Cleland, E.E. (2001). The evolutionary impact of invasive species. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 98: 5446-5451.

Morrison, I., Asiedu, E. A., Stuchbury, T. & Powell, A. A. (1995). Determination of tannins and lignin in cowpea seed coat. *Annals of Botany*, 76: 287-290.

Murdock, L.L., Shade, R.E., Kitch, L.W., Ntourkam, G., Lowenberg-Deboer, J., Huesing, J.E., Moar, W., Chamblis, O.L., Endondo, L. & Wolfson, J.L. (1997). Post-harvest storage of cowpea research. Copublication of IITA and JIRCAS: pp. 303-312.

Nansen, C., Weaver, D.K., Sing, S.E., Runyon, J.B., Morrill, W.L. & Grieshop, M.J. (2005). Within-field spatial distribution of *Cephus cinctus* (Hymenoptera: Cephidae) larvae in Montana wheat fields. *Canadian entomologist*, 137 (2): 202-214.

Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K. & Frati, F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 14: 2729-2738.

Naveena, N.L., Jagadeesh Babu, C.S. & Byregowda, M. (2010). Evaluation of biopesticides against field infestation of bruchid, *Callasobruchus theobromae* L. on fieldbean, *Dolichos lablab*. *Journal of Biopesticides*, 3(3): 622-623.

Ndong, A., Diome, T., Thiaw, C., Ndiaye, A., Kébé, K., Douma, A., Ketoh, K.G., Sanon, A. & Sembène, M. (2011). Several haplotypes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seed-beetle, *Caryedon serratus* Ol. (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae), in West Africa: Genetic identification using 28S sequences. *African Journal of Biotechnology*, 10 (54): 11409-11420.

Ndoutoume, A. & Rojas-Rousse, D. (2007). Y a-t-il élimination d'*Eupelmus orientalis* Craw par *Eupelmus vuilleti* Craw (Hymenoptera : Eupelmidae) des systèmes de stockage du niébé (*Vigna unguiculata* Walp)? *Annales de la Société Entomologique de France*, 43 (2): 139-144.

Nei, M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

Nylander, J.A.A. (2004). MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre: Uppsala University Uppsala, Sweden.

**Odah, B.K. (1995)**. Impact du développement de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera : Bruchidae) sur les graines de trois variétés de *Vigna unguiculata* L. Walp. Thèse de D.E.A., Univ. du Bénin, Lomé-Togo; 67p.

Olajire, A.A., Azeez, L. & Oluyemi, E.A. (2011). Exposure to hazardous hazardous air pollutants along Oba Akran Road, Lagos-Nigeria. *Chemos*, 84: 1044-1051.

Olakojo, S.A., Omueti, O., Ajomale, K. & Ogunbodede, B.A. (2007). Development of quality protein maize: biochemical and agronomic evaluation. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, (7): 97-104.

**Olubayo, F.M. & Port, G.R. (1997)**. The efficacy of harvest time modification and intercropping as methods of reducing the field infestation of cowpeas by storage bruchids in Kenya. *Journal of Stored Product Research*, 33: 271-276.

**O'Neill, S.B., Buckley, T.R., Jewell, T.R. & Ritchie, P.A. (2009)**. Phylogeographic histoty of the New Zealand stick insect *Niveaphasma annulata* (Phasmatodea) estimated from mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 53: 523-536.

**Ouedraogo, P.A. (1978)**. "Etude de quelques aspects de la biologie de *Callosobruchus maculatus* F. (Coléoptère Bruchidae) et de l'influence des facteurs externes stimulants (plante-hôte et copulation) sur l'activité reproductrice de la femelle". Thèse de 3ème cycle, Université de Toulouse, 101 p.

**Ouédraogo, P.A. (1991)**. Le déterminisme du polymorphisme imaginal chez *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera : Bruchidae), son importance sur la biologie de cette bruche. Thèse Doctorat. Univ. Tours (France) ; 197p.

Paddock, F.B. & Reinhard, H.J. (1919). The cowpea weevil. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin*, 256: 1-92.

**Pannell, J.R.** (2003). Coalescence in a metapopulation with recurrent local extinction and recolonization. *Evolution*, 57: 949-961.

Parr, M. J., Tran, B. M. D., Simmonds, M. S. J., Kite, G. C. & Credland, P. F. (1998). Influence of some fatty acids on oviposition by the bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 1577:1593.

Piergiovanni, A.R., della Gatta, C., Sergio, L. & Perrino, P. (1994). High antinutrient levels and bruchid resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Euphytica*, 80: 59-62.

Pimentel, D., Zuniga, R., & Morrison, D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, 52: 273-288.

Podoler, H. & Applebaum, S.W (1968). Physiological aspects of host specificity in the bruchidae.V. Varietal differences in the resistance of *Vicia faba* to *Callosabruchus chinensis* L. *Journal of Stored Product Research*, 7: 97-105.

**Pons, J., Ribera, I., Bertranpetit, J. & Balke, M. (2010)**. Nucleotide substitution rates for the full set of mitochondrial protein-coding genes in Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 796-807.

**Prevett, P. F. (1961)**. Field infestation of cowpea (*Vigna unguiculata*) pods of beetles of the families Bruchidae and Curculionidae in Northern Nigeria. *Bulletin of Entomological Research*, 52: 635-645.

**Prowell, D.P., McMichael, M. & Silvain, J.F. (2004)**. Multilocus genetic analysis of host use, introgression and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97: 1034-1044.

Rambaut, A. & Drummond A.J. (2007). Tracer version 1.4. Available at <u>http//tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer</u>.

Ramos-Onsins, S.E. & Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092-2100.

Ramirez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J, Calafell, F. & Navarro, A. (2008). Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, 179 : 555-567.

Ree, RH. & Sanmartín, I. (2009). Prospects and challenges for parametric models in historical biogeographical inference. *Journal of Biogeography*, 10: 1365-2699.

**Ree, R.H. & Smith, S.A. (2008)**. Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology*, 57: 4-14.

Régnière, J., Nealis, V. & Porter, K. (2009). Climate suitability and management of the gypsy moth invasion into Canada. *Biological Invasions*, 11: 135-148.

Ridley, M. (1993). Evolution. Editions Blacwell Publishing, 751 pp.

Rojas-Rousse, D., Kalmes, R., Combescot, C., Eslami, J. & Gomez-Alvarez, L. (1988). Bilan nutritionnel au cours du développement de l'ectoparasite grégaire *Dinarmus vagabundus* et du solitaire *Dinarmus basalis*. *Entomologia Experimentalis Applicata*, 46: 63-70.

Rogers, A.R. & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic difference. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-569.

Rousselet, J., Zhao, R., Argal, D., Simonato, M., Battisti, A., Roques, A & Kerdelhué, C. (2010). The role of topography in structuring the demographic history of the pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Notodontidae). *Journal of Biogeography*, 37: 1478-1490.

Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M. & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265: 687-695.

Sanon A. (1997). Contribution à l'étude du contrôle biologique des populations de Bruchidae ravageurs des graines de niébé, *V. unguiculata* (L.) Walp., au cours de leur stockage au Burkina Faso. Thèse de Doctorat 3e cycle. Université de Ouagadougou. 162 pages.

Sanon, A. & Ouedraogo, A.P. (1998). Etude de variation des paramètres démographiques de *Callosobruchus maculatus* (F.) et de ses parasitoïdes, *Dinarmus basalis* (Rond.) *et Eupelmus vuiletti* (Crwf), sur le niébé dans une perspective de lutte biologique. *Insect Science and its Application*, 18 (3): 241-250.

Sanon, A., Ouedraogo, A. P., Tricault, Y., Credland, P. F. & Huignard, J. (1998). Biological control of bruchids in cowpea stores by release of *Dinarmus basalis* adults. *Environmental Entomology*, 27: 717-725.

Sax, D. F., Stachowicz, J.J. & Gaines, S.D. (2005). Species Invasions: Insights into Ecology, Evolution, and Biogeography. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Seck, D., Lognay, G., Haubruge, E., Wathelet, J.P., Marlier, M., Gaspar, C. & Severin, M. (1993). Biological activity of the shrub *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. ex Poir. (Capparaceae) on stored grain insects. *Journal of Chemical. Ecology*, 19(2): 377-389.

**Seck, D.** (1991). Etude de l'infestation initiale de *Sitotroga cerealella* Oliv. (Lepidoptera, Gelechiidae) en fonction de la localisation des champs de mil *Pennisetum typhoides* L (Leeke). *Insect Science and its Application*, 12: 507-509.

Sembène, M., Kébé, K., Delobel, A. & Rasplus, J.Y. (2010). Phylogenetic information reveals the peculiarity of *Caryedon serratus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) feeding on *Cassia sieberiana* DC (Caesalpinioideae). *African Journal of Biotechnology*, 9: 1470-1480.

Sembène, M., Kébé, K. & Delobel, A. (2012). Effet structurant de la plante hôte chez la bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* (Olivier, 1790) (Coleoptera : Bruchidae). *Biotechnology Agronomie Société et Environnment*, 16: 3-11.

Sezonlin, M., Dupas, S., Le Ru, B., Le Gall, P., Moyal, P., Calatayud, P.-A., Giffard, I., Faure,
N. & Silvain, J.F. (2006). Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Molecular Ecology*, 15: 407-420.

Shazali, M.E. (1989). The susceptibility of faba bean and other seed legumes to infestation by *Bruchidius incarnatus* (Bon) and *Callosobruchus maculatus* F (Coleoptera: Bruchidae). *Faba Bean Information Services*, 23: p. 20-24.

Silim Nahdy, M. (1995). Biotic and abiotic factors influencing the biology and distribution of common storage pests of pigeon pea, PhD thesis. University of Reading, UK.

Silim Nahdy, M., Silim, S.N. & Ellis, R.H. (1999). Effect of field infestation of immature Pigeon Pea *Cajanus cajan* (L.) Millsp., pods on production of active (flight) and sedentary (flightless) morphs of *Callosobruchus chinensis* (L.). *Journal of Stored Product Research*, 35: 339-354.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annal of the Entomological Society of America*, 87: 651-702.

Singh, S.R. (1978). Pests of grain legumes and their control in Nigeria. *In: Singh, S.R., Van Emden, H.F., Taylor, T.A. (Eds.), Resistance to pests of cowpeas in Nigeria*. Academic Press, New York, pp. 267-297.

Singh, B.B. & Singh, S.R. (1992). Sélection du niébé résistant aux bruches. La recherche à l'IITA, N°5 Septembre 1992. pp. 1-5.

Smart, J. (1964). Pulses in human nutrition, p 96-104 in: Tropical pulses. Longman, London.

Somta, P., Kaga, A., Tomooka, N., Kashiwaba, K., Isemura, T., Chaitieng, B., Srinives, P. & Vaughan, D.A. (2006). Development of an interspeciWc *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi and *V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics. *Plant Breed*, 125:7784.

Somta, P., Musch, W., Kongsamai, B., Chanprame, S., Nakasathien, S., Toojinda, T., Sorajjapinun, W., Seehalak, W., Tragoonrung, S. & Srinives, P. (2008). New microsatellite markers isolated from mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Molecular Ecology Resource*, 8:1155-1157.

Souza, A.J., Santos, P.O., Pinto, M.S.T., Wermelinger, T.T., Ribeiro, E.S., Souza, S.C., Deus, M.F., Souza, M.C., Xavier-Filho, J., Fernandes, K.V.S. & Oliveira, A.E.A. (2011). Natural seed coats provide protection against penetration by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Crop Protection*, 30 (6): 651-657.

**Tajima, F.** (1989). Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-599.

**Tchamou, K.S. (1995)**. Impact des hyménoptères parasitoïdes: *Dinarmus basilis* R. et *Eupelmus vuilleti* Craw ; sur les populations de *Callosobruchus maculatus* F. dans un système de stockage de niébé : *Vigna unguiculata* L. Walp. Mémoire de D.E.A. de Biologie de Développement. Univ. du Bénin. Lomé-Togo ; 54p.

**Tchassanti, M.T.A. (1995)**. Dynamique des populations de trois Coléoptères Bruchidae et de leurs parasitoïdes dans les cultures de niébé : *Vigna unguiculata* Walp. Mémoire de D.E.A. de Biologie de Développement. Univ. Lomé-Togo ; 45p.

Templeton, A.R., Crandall, K. A. & Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. *Genetics*, 132: 619-633.

Thomas, Y., Bethenod, M.T., Pelozuelo, L., Frérot, B. & Bourguet, D. (2003). Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. I. Sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. *Evolution*, 57: 261-273.

Thompson, J. N. (1994). The coevolutionary process. University of Chicago Press, Chicago.

**Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. (1997)**. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4690.

Thuiller, W., Lavorel, S., Araujo, M.B., Sykes, M.T. & Prentice, I.C. (2005). Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 102: 8245-8250.

Torres-Leguizamon, M., Dupas, S., Dardon D., Gomez, Y., Nino, L., Carnero, A., Padilla, A. Merlin I., Fossoud A., Zeddam J.-L., Lery X., Capdevielle-Dulac C., Dangles, O. & Silvain, J.-F. (2011). Inferring native range and invasion scenarios with mitochondrial DNA: the case of *T. solanivora* successive north–south step-wise introductions across Central and South America. *Biological Invasions*. pp 15.

Tuda, M., Wasano, N., Kondo, N., Horng, S.B., Chou, L.Y. & Tateishi, Y. (2004). Habitatrelated mtDNA polymorphism in the stored-bean pest *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Bulletin of Entomological Research*, 94: 75-80.

Tuda M., Chou, L-Y., Niyomdham, C., Buranapanichpan, S. & Tateishi, Y. (2005). Ecological factors associated with pest status in *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): high host specificity of non-pests to Cajaninae (Fabaceae). *Journal of Stored Products Research*, 41: 31- 45.

Tuda, M., Rönn, J., Buranapanichpan, S., Wasano, N. & Arnqvist, G. (2006). Evolutionary diversification of the bean beetle genus *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): traits associated with stored-product pest status. *Molecular Ecology*, 15: 3541-3551.

Utida, S. (1954). Phase dimorphism observed in the laboratory population of the cowpea weevil, *Callosobruchus quadrimaculatus. Japanese Journalof Applied. Entomology and Zoology*, 18: 161-168.

van Alebeek, F. A. N., Rojas- Rousse, D. & Leveque, L. (1993). Interspecific competition between *Eupelmus vuilleti and Dinarmus basalis*, two solidary ectoparasitoids of Bruchidae larvae and pupae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 69: 21- 31.

van Huis, A. (1991). Biological methods of bruchids control in thevtropics. *Insect Science and its Application*, 12: 87-102.

van Huis, A., Schutte, C., Cools, M.H., Famget, P., van der Hoer, K. & Piquet, S.P. (1994). The role of semiochemicals in host location by *Uscana lariophaga*, egg parasitoid of *Callosobruchus maculatus*. Proceeding 6<sup>th</sup> International working conference on stored product protection. *Camberra, Australia*, 2: 1158-1164.

van Huis, A. & de Rooy, M. (1998). The effect of leguminous plant species on *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its egg parasitoid *Uscana lariophaga* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Bulletin of Entomological Research*, 88: 93-99.

Vink, C.J., Phillips, C.B., Mitchell, A.D., Winder, L.M. & Cane, R.P. (2003). Genetic variation in *Microctonus aethiopoides* (Hymenptera : Braconidae). *Biological Control*, 28: 251-264.

Vir, S. & Jindal, S.K. (1981). The oviposition an development of *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae) on different host species. *Bulletin of Grain Technology*, 19: 180-184.

**Vogler, A. P. & Desalle, R. (1994)**. Evolution and phylogenetic information content of the ITS1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 393-405.

Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian Populations. Genetics, 16: 97-159.

Wright, S. (1969). *Evolution and the Genetics of Populations: The Theory of Gene Frequencies*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Xu, Z.H., Chen, J.L., Cheng, D.F., Liu, Y. & Francis, F. (2011). Genetic variation among the geographic population of the grain aphid, *Sitobion avanae* (Hemiptera : Aphidae) in China inferred from mitochondrial COI gene sequence. *Agricultural Science in China*, 10: 1041-1048.

Yang, M., Ma, Y. & Wu, J. (2011). Mitochondrial genetic differentiation across populations of the malaria vector *Anopheles lesteri* from China (Diptera: Culicidae). *Malaria Journal*, 10: 216.

**Yusuf, A.U., Dike, M.C., Adebitan, S.A. & Ahmed, B.I. (2011)**. Comparative efficacy of seven plant products on the cowpea burchid, *Callosobruchus maculatus* F. development and damage. *Journal of Biopesticides*, 4: 19-26.

Zink, R.M. & Barrowclough, G.F (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17: 2107-2121.

# Glossaire

Acides aminés : (ou aminoacides) sont une classe de composés chimiques possédant deux groupes fonctionnels : à la fois un groupe carboxyle –COOH et un groupe amine –NH<sub>2</sub>.

AIC : Critère Informatif d'Akaike est utilisé pour comparer les modèles d'évolution des séquences et est défini par la formule suivante : AIC =  $2k - 2\ln L$  où *L* est la vraisemblance maximisée et *k* le nombre de paramètres dans les modèles.

Allèle : une des différentes formes que peut prendre un même gène. Les allèles occupent la même position (locus) sur les chromosomes homologues.

**Amorce** : courte séquence d'ARN ou d'ADN, complémentaire du début d'une matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette dernière par une ADN polymérase.

**Bootstrap** : utilisée pour tester la fiabilité des branches internes. Le bootstrap consiste à effectuer un tirage des sites au hasard avec remise, donc dans chaque réplication de bootstrap certains sites peuvent être présents plusieurs fois, tandis que les autres peuvent être absents. Chaque réplication produit un nouvel alignement "artificiel" qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne, on calcule le pourcentage des arbres "artificiels" contenant cette branche.

**Bottleneck** (**population**) : le goulot d'étranglement se produit lorsqu'une population subit une sévère réduction de sa taille. Dans une population, le goulot d'étranglement est un facteur diminuant de la diversité génétique.

Caractère : un caractère est une particularité anatomique ou moléculaire définie par un chercheur.

**Clade** : " clados = branche ". En phylogénie, branche ou taxon qui contient un ancêtre et tous ses descendants.

**Cladogenèse** : apparition de lignées divergentes au cours de l'évolution à partir d'une même espèce ancestrale.

**Coalescence** : un événement coalescent est le temps inverse d'un événement de réplication d'ADN, c'est à dire l'événement menant à l'ancêtre commun de deux séquences en regardant en arrière dans le temps.

**Codominant** : l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes ; il peut être distingué de chacun des homozygotes parentaux.

**Dérive génétique** : mécanismes de l'évolution qui aboutit à la création de nouvelles espèces à partir de populations d'individus. Ce mécanisme est celui de la variation aléatoire des fréquences alléliques au sein d'une population et au cours des générations.

**Distance évolutive** : distance évolutive entre 2 séquences est égal au nombre de substitutions qui se sont produites sur les 2 lignées évolutives depuis l'ancêtre commun / nombre de sites.

**Dimorphisme sexuel** : ensemble des différences morphologiques plus ou moins marquées entre les individus mâles et femelles d'une espèce.

Divergence génétique : évolution génétique différente entre deux populations d'une même espèce.

#### Évolution des séquences (modèles):

#### Modèle de Jukes-Cantor (JC) : 1 paramètre

- les 4 bases ont les mêmes fréquences ( $\pi A = \pi T = \pi G = \pi C$ )
- les transitions ( $\alpha$ ) et les transversions sont équiprobables ( $\alpha = \beta$ )

#### Modèle de Kimura (K2P) : 2 paramètres

- les 4 bases ont les mêmes fréquences ( $\pi A = \pi T = \pi G = \pi C$ )
- les transitions ( $\alpha$ ) et les transversions ( $\beta$ ) ne sont pas équiprobables ( $\alpha \neq \beta$ )

#### Modèle de Tajima-Nei (TN) = Felsenstein (F81) : 6 paramètres

- les 4 bases ont les fréquences différentes ( $\pi A \neq \pi T \neq \pi G \neq \pi C$ )
- les transitions et les transversions sont équiprobables ( $\alpha = \beta$ )

#### Modèle de Hasegawa, Kishino et Yano (HKY 85) : 6 paramètres

- les 4 bases n'ont pas les mêmes fréquences ( $\pi A \neq \pi T \neq \pi G \neq \pi C$ )
- les transitions ( $\alpha$ ) et les transversions ( $\beta$ ) ne sont pas équiprobables ( $\alpha \neq \beta$ )

#### Modèle GTR (General Time Reversible) : 10 paramètres

- les 4 bases ont des fréquences différentes ( $\pi A \neq \pi T \neq \pi G \neq \pi C$ )
- il existe 6 types de substitutions (AC, AT, AG, CT, CG, TG)

Paramètres additionnels : distribution gamma (G) et proportion de sites invariables (I).

Fst: indice de différenciation inter-population.

**Fu's** *Fs*: test statistique basé sur la distribution des haplotypes pour détecter une éventuelle expansion démographique de populations. Si Fu's Fs est fortement négatif significativement, cela suggère une population en expansion.

**Génotype** : ensemble ou une partie de donnée de la composition génétique (information génétique) d'un individu. Le génotype d'un individu est donc la composition allélique de tous les gènes d'un individu.

Haploïde : organisme ayant un seul jeu de chromosome.

Haplotype : combinaison unique de marqueurs génétiques présents dans un échantillon.

**Horloge moléculaire (hypothèse de l')** : hypothèse selon laquelle les molécules d'une même classe fonctionnelle évoluent régulièrement dans le temps et à rythme égal dans différentes lignées. Ainsi la quantité des différences moléculaires constatées de nos jours dans des séquences homologues d'espèces distinctes peut être utilisée pour estimer le temps écoulé depuis le dernier ancêtre commun à ces deux espèces (ou temps de divergence).

**Inférence bayesienne (méthode)** : c'est une méthode qui fait appel au concept des probabilités postérieures (le théorème de Bayes), où la probabilité est estimée sur la base d'un modèle et d'une certaine connaissance des données.

**Insertion et délétion** : l'addition ou la suppression d'une ou de plusieurs bases implique l'insertion ou la délétion.

**Matrice (de caractère)**: tableau à double entrée comportant, en général, verticalement une série d'espèces (ou de taxons) et horizontalement une série de caractères

**Microsatellite** : est une séquence d'ADN particulière. Elle se caractérise par la répétition d'un motif de dinucléotides ou de trinucléotides.

**Minisatellite** : séquences du génome répétées en tandem dont la taille du motif unitaire est comprise entre 10 et 100 nucléotides.

**Non épistatique** : son génome peut être «lu» à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres locus.

**Migration** : échange d'individus et donc de gènes entre populations. Ces échanges sont aussi appelés flux génique. Les migrations ont comme conséquence principale de modifier les fréquences alléliques dans la population en y introduisant de nouveaux mutants.

**Mismatch distribution** : représentation graphique de la distribution du nombre des différences génétiques existant entre les individus d'une population pris deux à deux.

**Mutation** : modification de l'information génétique dans le génome d'une cellule ou d'un virus. C'est donc une modification de la séquence de l'ADN, ou bien dans l'ARN pour un virus à ARN. C'est l'une des causes principales de l'évolution des espèces.

Outgroup : séquence plus ancienne que les autres servant à enraciner un arbre phylogénétique.

**Phylogénie** : " phylon = tribu, race, peuple; genos ou generis = origine, naissance ". Cours historique de la descendance des êtres organisés.

**Polymorphisme** : du grec poly: plusieurs et morphis: forme. C'est la variété des caractères ou formes que peut présenter une population d'êtres ou de choses.

**Polymorphisme de Longueur des Fragments Amplifiés**, ou AFLP (sigle anglais *d'amplified fragment-length polymorphism*) est un outil utilisé en génétique et en transgénèse.

Polytomie : lorsque plus de deux ramifications sont présentes à un noeud.

**Sélection naturelle** : processus par lequel un individu (une molécule) bénéficie d'un succès reproductif différentiel dû aux interactions entre les qualités intrinsèques de son génotype (de sa structure) et son environnement.

**Substitution** : type de mutation dans une séquence qui consiste en un remplacement d'un ou de plusieurs acide (s) aminé (s) par un ou plusieurs autres, d'un ou de plusieurs nucléotide (s) par un ou plusieurs autres.

**Taille efficace** : effectif d'une population idéale (de type Wright-Fisher) pour laquelle on aurait une fluctuation du polymorphisme équivalente à celle de la population naturelle. C'est donc le nombre

d'individus d'une population idéale pour lequel on aurait un degré de dérive génétique équivalent à celui de la population réelle.

**Tajima's** D: est un test statistique qui a pour but de distinguer les populations évoluant aléatoirement de celles dont l'évolution prend en compte d'autres facteurs comme par exemple les migrations de population ou encore la sélection naturelle.

**Temps de divergence (ou temps de séparation, entre deux taxons)** : date du dernier ancêtre commun à deux taxons. Plus précisément et en d'autres termes, date à laquelle l'espèce ancêtre commune à deux taxons a perdu son intégrité génétique, c'est à dire a subi une spéciation.

**Test** *R2* (**Ramos-Onsins et Rozas, 2002**) : calcule la différence entre le nombre de mutations uniques par rapport à la moyenne du nombre de différences partagées par deux individus : une population récente en expansion conduira à une faible valeur de cet indice. Test mieux adapté pour faible échantillonnage.

Vie imaginale : période de vie pendant laquelle l'insecte est adulte, c'est-à-dire qu'il a atteint sa maturité sexuelle.

## Annexes

Pays	localité	Coordonnées géographiques	Code	Taille échantillon	Année
Burkina Faso	Tenkodogo	11°46'59''N/00°22'00.31W	Bf	10	2010
Mali	Benkorowéré	14°36'00'' N / 05°51'00W	MaB	10	2010
	Sikasso	11°18'55.02''N/5°40'08.80''W	MaS	10	2009
Niger	Niamey	13°30'55.83''N/2°07'00.03''E	NiN	10	2009
Sénégal	Coki	15°30'15.11''N/15°59'12.06''W	SnC	10	2010
	Fouta	16°30'41,69''N/15°30'41.69'' W	SnF	10	2010
	Kébémer	15°22'25.66''N/16°26'26.64''W	SnK	10	2009
	Tambacounda	13°46'09.16''N/13°40'04.26''W	SnT	10	2009
Togo	Adidogome	6°10'45,08''N/00°09'43,69''E	Tad	5	2010
	Assigame	7°10'14.08''N/00°41'29.99''E	TAs	5	2010
	Dapaong	10°51'59.94''N/0°11'59.89''E	TDa	5	2010
	Gbinba	10°31'59.88"N/0°31'59.9988"E	TGb	5	2010
	Mango	10°21'20.10''N/0°28'31.95''E	TMa	5	2010
	Tsévie	6°25'11.26''N/1°12'39.33''E	TTs	5	2010

### Annexe 1 : Caractéristiques des différentes populations analysées de C. maculatus

Annexe 2 : Amorces utilisés, volume des différents réactifs et conditions de PCR pour le gène 28S ribosomal

Gène amplifié	285	
	D4-5F (5'-CCCGTCTTGAAACACGGACCAAGG-3')	
Amorces	D4-5R (5'-GTTACACACTCCTTAGCGGA-3')	
Réactifs	Volume (µl)	
Tampon (5X) QUIAGEN	10	
MgCl2	2	
dNTP	1	
CB1 (10 µM)	0,35	
CB2 (10 µM)	0,35	
Taq Polymerase (QUIAGEN)	0,25	
Eau MilliQ	32,05	
ADN matrice	4	
	Conditions PCR	
Dénaturation initiale	$94^{\circ} \rightarrow 3 \min$	
Nombre de cycles	30, puis	
Dénaturation	$92^{\circ} \rightarrow 30 \text{ sec}$	
Hybridation	$57^{\circ} \rightarrow 30 \text{ sec}$	
Elongation	$72^{\circ} \rightarrow 1 \min$	
Elongation finale	$72^\circ \rightarrow 10 \min$	

Gène amplifié	CytB	
Amoreos	mtD26 (5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3')	
	mtD28 (5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3')	
Réactifs	Volume (µl)	
Tampon (5X) QUIAGEN	10	
MgCl2	2	
dNTP	1	
CB1 (10 µM)	0,5	
CB2 (10 µM)	0,5	
Taq Polymerase (QUIAGEN)	0,4	
Eau MilliQ	33.6	
ADN matrice	2	
	Conditions PCR	
Dénaturation initiale	$94^{\circ} \rightarrow 3 \min$	
Nombre de cycles	35, puis	
Dénaturation	$94^{\circ} \rightarrow 1 \min$	
Hybridation	$47^{\circ} \rightarrow 1 \min$	
Elongation	$72^{\circ} \rightarrow 1 \min$	
Elongation finale	$72^{\circ} \rightarrow 10 \text{ min}$	

Annexe 3 : Amorces utilisés, volume des différents réactifs et conditions de PCR pour le gène CytB



0.006

Annexe 4 : L'arbre phylogénétique inféré par la méthode bayésienne et montrant la faible variation du gène 28S chez les populations de *C. maculatus* 



0.3

Annexe 5 : L'arbre phylogénétique obtenu par l'inférence bayésienne sur les deux genes combinés. Les relations phylogénétiques ne sont pas très résolues, cependant, nous pouvons noter certains groupes caractéristiques de certains regions géographiques

Pays	Location	Code	Latitude	Longitude	Taille échantillons	Collecté par
Algérie	Tizi-Ouzou	ATO	36°43'N	4°03'E	5	Abdellah Kellouche
Bénin		Be	9°N	2°E	5	Goran Arnqvist
Burkina Faso	Tenkodogo	Bf	11°46'59''N	00°22'01''W	5	Antoine Sanon
Brésil	Fortaleza	Br	3°43'S	38°32'W	8	Carlos Peres et Katia Fernades
Nigéria	Оуо	NgOy	1°02'S	15°40'E	4	Goran Arnqvist
USA	California	Ca	36°N	119°W	5	Midori Tuda et Goran Arnqvist
Chine	Yunnan	Chi	25°02'N	102°43'E	2	Midori Tuda
Inde	Tirunelveli	IS	8°43'N	77°40'E	6	Goran Arnqvist et Chuck Fox
Japon	Okinawa	Jp	26°13'N	127°41'E	1	Midori Tuda
Mali	Sikasso	MaS	11°18'55''N	5°40'09''E	5	Laurent Granjon
Madagascar	Manjakandriana	Mad	18°55'S	47°49'E	1	Midori Tuda
Malaysie	Kota Kinabalu	Mal	5°38'N	116°07'E	1	Midori Tuda
Nouvelle Zélande		Nze	38°S	175°E	1	Midori Tuda
Népal	Kathmandu	Nep	27°42'N	85°19'E	2	Midori Tuda
Nigéria		NgOf	9°N	9°E	6	Goran Arnqvist
Niger	Lossa	NiN	13°56'N	1°34'E	1	Goran Arnqvist
Niger	Niamey	NiL	13°30'56''N	2°07'00''E	5	Laurent Granjon
Oman		Om	23°N	58°E	5	Goran Arnqvist
Sénégal	Coki	SnC	15°30'15''N	15°59'12''W	1	Khadim Kébé
Sénégal	Fouta	SnF	16°30'42''N	15°30'42"W	2	Khadim Kébé
Sénégal	Kebemer	SnK	15°22'26''N	16°26'27''W	1	Khadim Kébé
Sénégal	Tambacounda	SnT	13°46'09''N	13°40'04''W	1	Khadim Kébé
Syrie	Lattakia	SyL	35°31'N	35°48'E	2	Midori Tuda
Togo	Assigame	TAs	7°10'14''N	00°41'30''E	1	Guillaume Ketoh
Togo	Dapaong	TDa	10°51'59''N	0°11'59"E	1	Guillaume Ketoh
Togo	Gbinga	TGb	10°31'59''N	0°31'59"E	1	Guillaume Ketoh
Togo	Lome	TLo	6°08'N	1°12'E	1	Goran Arnqvist
Togo	Mango	ТМа	10°21'20''N	0°28'32''E	1	Guillaume Ketoh
Togo	Tsevie	TTs	6°25'11''N	1°12'39"E	1	Guillaume Ketoh
Taiwan	Tainan	Tai	23°01'N	120°15'E	3	Midori Tuda
Uganda	Uganda	Ug	1°N	32°E	5	Midori Tuda et Goran Arnqvist
Viet Nam	Thanh Hoa	Vie1, 2	19°48'N	105°46'E	2	Midori Tuda
Viet Nam	Tam Ky	Vie3	15°34'N	128°29'E	1	Midori Tuda
Yémen	-	Ye	15°N	48°E	5	Goran Arnqvist
Zaire		Za	4°S	21°E	5	Midori Tuda et Goran Arnqvist

Annexe 6 : Sites d'échantillonnage, coordonnées géographiques et abréviations des populations de *Callosobruchus maculatus* étudiées



Annexe 7 : Arbre bayésien inféré à partir de l'ADN nucléaire (ITS1) de *C. maculatus* 



Annexe 8 : Réseau d'haplotypes obtenu avec les séquences de la matrice d'ADN mitochondrial. Les numéros dans les ellipses correspondent aux neufs clades identifiés (figure III-2)

Annexe 9 : Résultats brutes des tests sur le taux de fécondité en fonction des variétés en situation de non choix

### Tableau de moyennes pour TauxF Effet : variete

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Baye Ngagne	3	59,067	2,212	1,277
Mame Fama	3	71,467	14,478	8,359
Ndiaga Aw	3	49,267	10,981	6,340

### Test PLSD de Fisher pour TauxF Effet : variete Niveau de significativité : 5 %

Baye Ngagne, Mame Fama
Baye Ngagne, Ndiaga Aw
Mame Fama, Ndiaga Aw

_	Valeur p	Diff.crit.	Diff. moy.
	,2008	21,115	-12,400
	,2994	21,115	9,800
S	,0422	21,115	22,200

125

Annexe 10 : Résultats brutes des tests sur le taux de d'émergence en fonction des variétés en situation de non choix

#### Tableau de moyennes pour TauxE Effet : variete

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Baye Ngagne	3	35,500	8,757	5,056
Mame Fama	3	41,010	5,514	3,184
Ndiaga Aw	3	16,267	3,327	1,921

## Test PLSD de Fisher pour TauxE Effet : variete Niveau de significativité : 5 %

Diff.moy.	Diff.crit.	Valeur p
-5,510	12,539	,3236
19,233	12,539	,0095
24,743	12,539	,0029
	Diff. moy. -5,510 19,233 24,743	Diff. moy.Diff. crit5,51012,53919,23312,53924,74312,539

S

S

Annexe 11 : Résultats brutes des tests sur le taux de fécondité en fonction des variétés en situation de non choix

## Tableau de moyennes pour Sex-ratio Effet : Variete

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Baye Ngagne	3	,983	,101	,058
Mame Fama	3	,907	,106	,061
Ndiaga Aw	3	1,417	,304	,175

## Test PLSD de Fisher pour Sex-ratio Effet : Variete Niveau de significativité : 5 %

Baye Ngagne, Mame Fama
Baye Ngagne, Ndiaga Aw
Mame Fama, Ndiaga Aw

_	Valeur p	Diff.crit.	Diff.moy.
	,6464	,389	,077
S	,0343	,389	-,433
] s	,0183	,389	-,510

127

Annexe 12 : Résultats brutes des tests sur le taux de fécondité en fonction des variétés en situation de choix

#### Tableau de moyennes pour fecondite Effet : variete

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Baye Ngagne	6	26,700	5,787	2,362
Mame Fama	6	30,467	3,932	1,605
Ndiaga Aw	6	19,850	4,956	2,023

### Test PLSD de Fisher pour fecondite Effet : variete

Niveau de significativité : 5 %

Baye Ngagne, Mame Fama
Baye Ngagne, Ndiaga Aw
Mame Fama, Ndiaga Aw

Diff.moy.	Diff. crit.	Valeur p	_
-3,767	6,092	,2073	
6,850	6,092	,0300	S
10,617	6,092	,0021	s

Annexe 13 : Résultats brutes des tests sur le taux de d'émergence en fonction des variétés en situation de choix

## Tableau de moyennes pour tauxE Effet : variete

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Baye Ngagne	6	43,343	7,952	3,247
Mame Fama	6	44,513	6,236	2,546
Ndiaga Aw	6	25,302	2,681	1,095

## Test PLSD de Fisher pour tauxE Effet : variete Niveau de significativité : 5 %

	Diff.moy.	Diff.crit.	Valeur p	_
Baye Ngagne, Mame Fama	-1,170	7,428	,7417	
Baye Ngagne, Ndiaga Aw	18,042	7,428	,0001	8
Mame Fama, Ndiaga Aw	19,212	7,428	<,0001	8

3

Annexe 14 : Article soumis dans la revue Pest Management Science

## Population structure of the insect cowpea pest *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in West Africa

Khadim Kébé<sup>1, 2\*</sup>, Nadir Alvarez<sup>1</sup>, Anahí Espíndola<sup>1</sup>, Fabienne Justy<sup>3</sup>, Isabelle Olivieri<sup>3</sup>, Mbacké Sembène<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Département d'Ecologie et d'Evolution, Faculté de Biologie et de Médecine, Biophore, Université de Lausanne, CH -1015 Lausanne, Suisse.

<sup>2</sup> Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, B. P. 5005 Dakar, Sénégal.

<sup>3</sup> Université Montpellier 2, CNRS, Institut des Sciences de l'Evolution, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05

\*Authors for correspondence: Fax: +4121 692 4265, <u>bambasoda@yahoo.fr</u> / <u>kebekh86@gmail.com</u>

Running title: Population structure of C. maculatus

#### Abstract

BACKGROUND: The bean beetle *Callosobruchus maculatus* is a worldwide generalist legume seed pest, distributed throughout the tropical and subtropical climates. Despite its economic importance, little is known about the population structure and migration patterns of this bruchid beetle both at local and regional scales. Gaining knowledge in the demographic processes experienced by the species, in particular in its native area, might give clues to improve its management in traditional agroecosystems. Here, we analyze the population structure and gene flow of 14 West African populations of *C. maculatus* located in five different countries, using nuclear (28S) and mitochondrial cytochrome b (CytB) sequences, and further apply phylogenetic and demographic analyses.

RESULTS: From a spatial perspective, one 28S and two CytB alleles are widely distributed across all sampled population. The lack of global genetic structuring is confirmed by the non-significant overall proportion of genetic variation among countries as well as by the absence of overall isolation by distance. This indicates low genetic differentiation among populations from these regions, suggesting high levels of gene flow at a large spatial range. In contrast more than twenty CytB haplotypes are found in only one or two localities, indicating that gene flow might in fact be locally restricted. Finally, various demographic inference methods suggest evidence of recent population expansion, a result in agreement with the possibility for the beetle, to travel hundreds of kilometers through trade of legume seeds for human consumption in West Africa.

CONCLUSION: Overall, it is likely that the lack of population structure at a large scale results from historical gene flow during population expansion, but that once the population has been established migration is mostly local.

Keywords: Callosobruchus maculatus, demographic history, genetic variation, legume pest, population structure, West Africa
# **1 INTRODUCTION**

The Southern cowpea beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchinae) is one of the most widely distributed legume pests in the world.<sup>1</sup> It develops on ca. 10 genera of legumes,<sup>2,3</sup> among which soybean (*Glycine max* L.), lentils (*Lens culinaris* Medikus), fava beans (*Vicia faba* L.), peas (*Pisum* spp.), chickpea (*Cicer arietinum* L.), pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and in particular the African cowpea, *Vigna unguiculata* L,<sup>4</sup> its probable main host plant,<sup>5</sup> on which it causes large cultivation yield losses, particularly across West Africa.<sup>6</sup> Adults of *C. maculatus* typically lay their eggs on the surface of pods or dehisced seeds in the field before or around the time of harvest.<sup>7,8</sup> These eggs are later brought unnoticed into seed stores, where the protected environment, buffered from major external environmental fluctuations, results in rapid insect development and population growth. If unchecked, storage populations of *C. maculatus* can grow exponentially causing significant losses in seed weight, germination viability and marketability.<sup>7,9</sup> The ability of *C. maculatus* to multiply fast under storage conditions results in rapid population build-up and deterioration of pulse seeds in storage.<sup>10</sup> According to Tuda *et al.*<sup>5</sup> the Southern cowpea weevil forms a monophyletic group with *C. analis* (F.), *C. rhodesianus* (Pic), and *C. subinnotatus* (Pic), all those species using dry beans from the cowpea genus *Vigna* (Savi) as their natural hosts. The economic importance of *C. maculatus* in West Africa makes this species particularly suitable for studies of the genetic variation of African pest insects.

Similarly to several other insect pests, *C. maculatus* shows great intraspecific variation in a large number of bionomic traits, which is accompanied by a tremendous ability to adapt to localized environmental conditions and/or hosts.<sup>11</sup> Indeed, populations originating from different locations have been found to exhibit significant differences in life-history traits such as female fecundity, development time, survival, adult weight,<sup>12</sup> oviposition behavior<sup>13</sup> and larval competition strategies.<sup>14</sup> The occurrence of intraspecific variation has a significant impact on the development and implementation of effective, long term and sustainable control method against this and, potentially, other bruchids species.

Understanding the genetic aspects of geographic variation and population structure of an insect pest can also provide important biological information for deploying bruchid-resistant cultivars and control strategies, since spatial genetic structure could indicate the potential for evolution of local adaptation. For instance, oviposition preference and egg dispersion were reported to be genetically-based<sup>15</sup> between Asian and African populations of *C. maculatus*. Tuda *et al.*<sup>16</sup> investigated the genetic diversity of populations of *C. chinensis* (L.) from natural, pre-harvest and post-harvest sites, and showed that populations from post-harvest hosts that were mass stored were highly likely to harbour the common haplotype, whereas populations from host plants in natural habitats away from agriculture were characterized by local haplotypes. Moreover, previous studies have suggested, but could not demonstrate, the presence of genetic structure in the case of *C. maculatus.*<sup>17</sup>

Geographical isolation is one major factor leading to genetic divergence among populations. However, it is unknown if geographically isolated populations of *C. maculatus* are genetically differentiated or share genotypes or both if there is restricted level of gene flow. Moreover, although international trade by humans has unintentionally spread this pest worldwide, it is not known to what extent related genotypes are distributed in a specific geographical region. Two contrasting hypotheses can be drawn regarding the spatial genetic structure of such a species in West Africa, a region harboring frequent human-mediated long-dispersal seed exchange and dispersal: either its genetic structure corresponds to wide geographical entities or it has been shaped by human-mediated dispersal events and it is linked to human cultural groups. A further hypothesis is that due to the numerous seed exchanges the species does not present either pattern. To test these hypotheses, we aim at using sequence-based molecular markers on specimens from *C. maculatus* spanning West Africa.

In this study, we use both mitochondrial (mtDNA) and nuclear DNA to investigate the genetic variation of *C*. *maculatus* sampled on cowpea at various localities from five West African countries (Burkina Faso, Mali, Niger, Senegal

and Togo). We ask the following questions: (i) Is there any evidence of genetic structure in *C. maculatus* in West Africa? (ii) What demographic events have likely shaped the genetic structure of *C. maculatus* in West Africa?

# 2 MATERIALS AND METHODS

## 2.1 Sampling

Cowpea seeds were collected during the dry season of years 2009 and 2010 in 14 populations from five West African countries: Burkina Faso, Mali, Niger, Senegal and Togo (Fig.1). These countries were chosen because they are among the largest worldwide cowpea producers and thus more likely to host large populations of *C. maculatus*. Adults of *C. maculatus* were obtained by rearing the larvae found infesting seeds and were preserved in 100% ethanol after final development. The close weevil species *C. subinnotatus* was used as an outgroup.

# 2. 2 DNA extraction, gene amplification, sequencing and alignment

DNA was extracted from the thorax, head and legs of specimens, following the standard QIAGEN DNeasy tissue kit (Qiagen GmbH, Germany) protocol. Amplification of partial sequences of the mitochondrial (cytochrome b, CytB) and nuclear (28S ribosomal RNA gene; 28S) genes of 102 individuals from fourteen populations of *C. maculatus* was accomplished by standard PCR. The primers used were D4-5F (5'-CCCGTCTTGAAACACGGACCAAGG-3') and D4-5R (5'-GTTACACACTCCTTAGCGGA-3')<sup>18</sup> for 28S and CB-J-10933 (5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3') and CB-N-11367 (5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3')<sup>19</sup> for CytB. PCRs were performed in 50 µl, containing 1 U Taq-polymerase and 2 µl of genomic DNA at 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 mM dNTP (0.1 mM). After an initial denaturation at 94°C for 3 min, conditions for 28S consisted of 30 cycles of a denaturation phase of 30 sec at 92°C, an annealing of 1 min at 47°C and an extension of 1 min at 72°C. For CytB, conditions included 35 cycles of a denaturation phase of 1 min at 94°C, an annealing of 1 min at 47°C and 1 min of extension at 72°C. In both cases, the program finished with a final extension of 10 min at 72°C.

DNA sequencing was performed by Macrogen Inc., Seoul, South Korea. Both strands of the PCR products were sequenced by the Sanger *et al.*<sup>20</sup> dideoxy method. Alignments were performed using  $ClustalW^{21}$  as implemented in BioEdit v.5.0.6, <sup>22</sup> and followed by minor manual adjustments.

# 2. 3 Analysis of the genetic diversity

We calculated the number of variable sites and parsimony informative sites, the transitions/transversions rate bias (R) and the frequency of nucleotides using MEGA v.  $4.0.^{23}$  To determine the genetic variability of *C. maculatus*, the numbers of unique mtDNA haplotypes and nDNA alleles, as well as haplotype and nucleotide diversity were calculed using DnaSP version  $5.10.01.^{24}$  Codon frames of CytB sequences were checked using MEGA v. $4.0.^{23}$  and revealed no evidence of putative nuclear pseudogenes (NUMTS)<sup>25</sup> in our dataset. Finally, we searched for evidence of recombination in 28S, using methods implemented in the software Recombination Detection Program (RDP) version 4.5 Beta.<sup>26</sup>

## 2. 4 Analysis of genetic structure

Genetic population structure was investigated using hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA). The groups were defined according to the countries of origin of samples and the populations corresponded to the sampling localities within countries. All AMOVAs, as well as genetic differentiation between population pairs were performed in ARLEQUIN v3.5.1.2,<sup>27</sup> by calculating pairwise *Fst* statistics. A permutation test (1000 bootsraps) for evaluating the level of significance in differentiation of pairs of localities was applied following the approach described in Excoffier *et al.*<sup>28</sup>. The genetic distance (*d*) between pairs of populations was computed in MEGA v.4.0<sup>23</sup> using Kimura 2-parameter (K2P).<sup>29</sup> We

examined for isolation by distance (IBD) by running a Mantel test using XLSTAT 2012 (Addinsoft, Paris, France), testing the correlation between the genetic distance (*d*) matrix and the Euclidian geographic distance (in km) matrix generated in Franson CoordTrans 2.3 (GpsGate AB, Johanneshov, Sweden) from the geographic coordinates of each collected locality. The Kendall correlation coefficient was considered and significance was determined based on 50,000 randomized permutations.

#### 2. 5 Phylogenetic and network analyses

Phylogenetic relationships were examined using MrBayes v. 3.1,<sup>30</sup> performing four MCMC runs, each of them with four chains. The best-fit models were selected using MrModeltest;<sup>31</sup> HKY<sup>32</sup> for 28S and GTR+I+G for CytB. Analyses were first run independently on each locus and then on the combined dataset considered as a supermatrix. Each phylogenetic search ran for 5,000,000 generations, sampling every  $1000^{\text{th}}$  tree and applying a burn-in of 2500 sampled trees (what left 5000 trees from both runs to estimate posterior probabilities). Tracer v.  $1.3^{33}$  was used to check chain convergence. Statistical parsimony networks with a confidence limit of 95% were obtained using TCS v. $1.21^{34}$  for each DNA region independently.

# 2. 6 Demographic history of the population

To test the null model of neutral mutation and constant population size, Tajima's D,<sup>35</sup> Fu's Fs test<sup>36</sup> and mismatch distribution analyses were used. Tajima's D and Fu's Fs are known to be sensitive to departures from mutation-drift equilibrium due to population size changes (*i.e.*, expansion, bottlenecks) and selection.<sup>37</sup> These statistics were calculated using DnaSP, with significance assessed with 10,000 coalescent simulations. Under constant population size conditions, Tajima's D and Fu's Fs are expected to approach zero, while significant negative or positive values suggest sudden population expansions or recent population bottlenecks, respectively. Significant negative Fs and non-significative D values indicate expanding populations, while the opposite suggests selection. Mismatch distribution analyses compare the observed and expected distributions of the number of nucleotide mismatches between sequence pairs. Expected values were constructed assuming a constant population size: rapid recent demographic growth is characterized by unimodal distributions, while multimodal distributions are observed for populations at demographic equilibrium.<sup>38</sup> The sum of squared deviations (SSD) between observed and expected distributions, as well as the raggedness index rg of the observed distribution of the mismatch classes was computed as test statistics under the hypothesis of population growth using ARLEQUIN.

#### **3 RESULTS**

#### 3.1 Genetic diversity

The length of the 28S alignment was 520 base-pairs (bp) and recombination was not detected. Sequences were weakly polymorphic with five polymorphic sites, of which three were phylogenetically informative, yielding nine alleles, four of which being restricted to single individuals (Table 1). The overall haplotype and nucleotide diversity were 0.33 + 0.059 and 0.0006 + 0.0001, respectively. The haplotype diversity of the different populations varied from zero to 0.60 + 0.0017 (Table 2).

The length of CytB was 456 bp. As expected for protein coding genes, no insertions, deletions or stop codons were present in CytB sequences, providing evidence that those sequences are not nuclear pseudogenes. Forty-six variable sites were detected, of which 30 were parsimony informative, yielding 44 different haplotypes among which 23 were restricted to single individuals (Table 1). Values of haplotype diversity and nucleotide diversity (0.97 +/- 0.007 and 0.0121 +/- 0.0006,

respectively) were higher than in 28S. Haplotype diversity in the different populations varied from zero to 1.00 + - 0.126, while nucleotide diversity varied from zero to 0.0180 + - 0.0120 (Table 2).

#### 3. 2 Population genetic structure

Molecular variance analysis of the two DNA regions showed no significant genetic variation among the five groups (i.e., countries) (P > 0.05) indicating genetic exchange among populations from these regions. Among populations within groups and within populations, AMOVA showed no significant genetic variation for 28S gene; in contrast, for CytB it showed significant genetic variation both among and within populations. Most of the variation occurred within populations for both 28S and CytB (Table 3).

The global *Fst* value for 28S was 0.041 (P = 0.13). According to the pairwise comparison of differentiation (*Fst*) only one population from Togo (Gbinga), was different from the others (except Assigame, Dapaong, Mango and Tsevie populations) (Table S1). For CytB, the global *Fst* value was 0.26 (P < 0.0001). *Fst* pairwise values among the 14 populations ranged from -0.05769 to 0.84127 (Table S2). Forty-six population pairs showed no significant genetic differentiation (P > 0.05), suggesting that most populations formed one single genetic group. Specifically, the maximum *Fst* value was found between populations SnT in Senegal and TAs in Togo, while the minimum *Fst* value occurred between populations TAs and TMa both from Togo. Based on results from the Mantel test, we could not reject the null hypothesis of absence of correlation between genetic and geographic distances in our dataset (r = 0.129, P = 0.52 for 28S; r = 0.135, P = 0.17 for CytB). Thus, we cannot conclude for IBD in the *C. maculatus* populations of West Africa.

# 3. 3 Phylogenetic and network analyses

The Bayesian phylogenies of 28S, as well as of the combined dataset, are not resolved (trees not shown). The 28S minimum spanning network (Fig.2) is characterized by a star-like pattern with all alleles deriving from one unique core allele (a1). This dominant allele, represented in 81.4% of the dataset, is widely distributed and is present at all sampled sites. Connections between the central allele and the less frequent alleles range from one to five mutation steps. The second most frequent allele (a9) is found in nine individuals from Togo and derives directly from the core allele by one single step. All other alleles are shared by a maximum of two individuals. Four private alleles (*ie.*, found in one population only) have been identified.

The genetic variation in CytB was much higher than in its nuclear counterpart. The Bayesian tree is basally polytomized, but different supported clades can be distinguished (*ie.*, branches supported by Bayesian Posterior Probabilities higher than 0.50). Ten clades (I-X) and one grade were thus identified. Clades VII and IX have a wide geographic distribution. Clades I, VIII (except one sample from Tenkodogo in Burkina Faso) and X (except one individual from Coki in Senegal) comprise specimens from Togo. Clades I to V are composed each by two individuals coming from the same locality (Fig.3). In the Statistical Parsimony Network, the most frequent haplotypes are h1 and h30, which comprise ten samples each. Haplotype 1 is distributed in all countries, while h30 is present only at one location from Eastern Senegal. Haplotype h6 is found in 6 individuals from Mali, Senegal and Togo. All other haplotypes are shared by at most four individuals, and 23 private haplotypes have been identified.

#### 3. 4 Demographic expansion

The neutrality test statistics were negative for the two genes. For the 28S both Tajima's *D* and Fu's *Fs* statistic were significantly negative (Tajima's D = -1.4645, P = 0.005; Fu's *Fs* = -4.4142, P = 0.0026). For the CytB only Fu's *Fs* was significantly negative (Fu's *Fs* = -29.92, P < 0.001), while the Tajima's *D* value was negative but only marginally non-significant (Tajima's D = -1.2571, P = 0.083). These results reject the null hypothesis of constant population size,

suggesting a rapid population expansion. This pattern was corroborated by the mismatch analyses (Fig.4) which revealed no significant deviation from the null hypothesis of population expansion in the two genes (28S *PSSD* = 0.55 and CytB *PSSD* = 0.99), and the raggedness index confirmed the unimodal distribution characteristic of population expansion (28S *P.rg* = 0.56 and CytB *P.rg* = 0.97).

## **4 DISCUSSION**

This work is the first study addressing aspects of the genetic structure of *C. maculatus* in Africa, its probable area of origin. Our analyses demonstrated that 28S showed low levels of genetic diversity with only 9 alleles found in the 102 sequenced specimens and the major allele present in all studied localities. This result is not surprising given that 28S is known for demonstrating low intraspecific variability (*e.g.*, Vink *et al.*<sup>39</sup>; Kavar *et al.*<sup>40</sup>). However, 28S still provides us with some information given that the second most frequent allele is only found in Togo populations, suggesting a trend towards genetic differentiation between the latter and the rest of our dataset.

In contrast, CytB is known to contain both slowly and rapidly evolving codon positions.<sup>41</sup> Our analysis of mtDNA CytB gene revealed a high level of genetic variation in *C. maculatus*, with 44 haplotypes found in the 98 sequences analyzed, as already shown in other insects (e.g., Sezonlin *et al.*<sup>42</sup>; Torres-Leguizamòn *et al.*<sup>43</sup>; Yang *et al.*<sup>44</sup>). We found levels of nucleotide and genetic diversity falling in the standard ranges of genetic diversity for insect pest species.<sup>42,45,43</sup>

Until now, little was known on the population genetic structure of *C. maculatus*. AMOVA results for separate analyses of 28S and CytB sequences in *C. maculatus* showed that most (> 73%) of the genetic variation occurred within populations. In contrast, based on global *Fct* values between countries, and on phylogenies and networks, we could not find any evidence for strong population subdivision, with the exception of populations from Togo, showing significant differentiation from the others. This result is confirmed by the absence of significant IBD in our dataset. However, results from populations outside Togo suggest that patterns of spatial genetic structure are not clear-cut. This might indicate that large-scale gene flow occurs among *C. maculatus* in Western Africa, an observation similar to those done on other insect pests as the aphid *Sitobion avenae* F.<sup>46</sup> in China, the beetles *Phyllodecta vulgatissima* L. and *P. vitellinae* L. in the United Kingdom<sup>47</sup> or the Australian diamondbacks,<sup>48</sup> but contrasting to those done by Alvarez *et al.*<sup>49</sup> for *Acanthocelides obtectus* Say or Torres-Leguizamòn *et al.*<sup>43</sup> for *Tecia solanivora* Povolny although the latter were performed at a larger spatial scale.

Our results thus suggest that dispersal and population size are large and that the whole species shows a trend towards a pannictic behaviour at the scale of our study, or that the migration-drift equilibrium has not been reached. Indeed, the lack of genetic structure observed in our study might be explained by (i) large-scale dispersal events, (ii) a large effective population size and (iii) the presence of ancestral polymorphism shared by different West African populations of *C. maculatus*, due to recent population divergence. To our opinion, large-scale dispersal events should be an important component of this pattern because of likely human-mediated genetic exchange among populations as shown in other bruchid species.<sup>50</sup> Indeed, our sampling includes several populations from countries member of the "Permanent Interstate Committee for drought control in the Sahel" (comprising notably Senegal, Mali, Niger and Burkina Faso), aiming to promote and facilitate trade in the region, including cowpea seeds. Interestingly, Togo does not take part in this Committee, what might explain the differentiation between populations from Togo from the rest of the collected specimens.

The CytB structure found in our dataset was not associated with geographical distribution; for example, a strong genetic differentiation is observed between populations from Kebemer and Coki while these localities are only ca. 50 km distant from each other. This pattern suggests that selection and drift may act strongly at the local level, a scenario that would be in agreement with the wide use of insecticides by farmers in the sampled populations. In West Africa, *C. maculatus* is currently the most devastating pest in cowpea storage, producing strong economic losses, in a way that farmers

strongly rely on chemicals.<sup>51,52</sup> This can lead to the recurrent decrease of effective population size in insects that are under permanent chemical pressure.

However, it should be noted that the geographical distribution of food resources may also limit the dispersal of some individuals and contribute to the sub-structure observed in this study. It is also important to ask the question about the role of the host variety on the genetic structure of *C. maculatus*, since this can be an important factor influencing genetic structure and differentiation of beetle pest species (as shown, for instance in *Caryedon serratus* Olivier).<sup>53</sup> The formation of ecotypes could then be driven by the cowpea variety on which samples *C. maculatus* were collected, in a similar way that the infestation level of stocks and cowpea fields depend on the cultivar and / or surrounding wild host plants.<sup>54</sup> However, a wider sampling and a more fine-tuned landscape genetics study would be needed to test these hypotheses.

Finally, our analyses of historical demography of *C. maculatus* indicate recent historical population expansion in West Africa. Indeed, Tajima's *D* and Fu's *Fs* were significantly negative for 28S and showed moderate support for a population size expansion for CytB, what was also confirmed by the mismatch distribution analysis. The different results from the two loci may reflect the fact that mtDNA is expected to respond in a stronger manner to changes in population size due to its smaller effective population size relative to nuclear loci.<sup>55</sup>

# **5 CONCLUSION**

Our results show that there is little genetic differentiation in the five West-African countries studied here with the exception of populations from Togo. This suggests high levels of human-mediated gene flow, maintaining high haplotype diversities despite probable recurrent bottlenecks in populations due to wide insecticide use.

Widespread gene flow throughout West Africa populations of *C. maculatus* has implications on the control methods used in these countries. The ecological homogeneity across geographical sites bodes well for regional control strategy; however, whether such a strategy should take into account the high levels of genetic diversity and gene flow suggested in the present study remains an open question. Indeed, high levels of diversity might suggest that the genetic reservoir is high enough to allow natural selection selecting for insecticide-resistant specimens and the high levels of gene flow suggested here could provide to insecticide-resistant specimens the potential to spread quickly throughout the West African region.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by the SCAC (Service de cooperation et d'Action Culturel de l'ambassade de France à Dakar) and the Institut de Recherche pour le Développement (IRD-DSF). The authors would like to thank Assane Ndong and Toffène Diome for help in sampling specimens and three anonymous reviewers for their helpful comments on an earlier version of this manuscript.

#### REFERENCES

1 Wightman JA and Southgate BJ, Egg morphology, host and probable regions of origin of the bruchids (Coleoptera: Bruchidae) that infest stored pulses-an identification aid. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* **10**: 95-99 (1982).

2 Anton K, Halperin J and Calderon M, An annotated list of the Bruchidae (Coleoptera) of Israel and adjacent areas. *Israel Journal of Entomology* **31** 59-96 (1997).

3 Tuda M, Chou LY, Niyomdham C, Buranapanichpan S and Tateishi Y, Ecological factors associated with pest status in *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): high host specificity of non-pests to Cajaninae (Fabaceae). *Journal of Stored Products Research* **41**: 31-45 (2005).

4 Jackai LEN and Daoust RA, Insects pests of cowpea. Annual Review Entomology 31: 95-119 (1986).

5 Tuda M, Rönn J, Buranapanichpan S, Wasano N and Arnqvist G, Evolutionary diversification of the bean beetle genus *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): traits associated with stored- product pest status. *Molecular Ecology* **15**: 3541-3551 (2006).

6 Appleby JH and Credland PF, Variation in responses to susceptible and resistant cowpeas among West African populations of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Economic Entomology* **96**: 489-502 (2003).

7 Caswell GH, The storage of cowpeas in the northern states of Nigeria. *Proceedings of the Agricultural Society of Nigeria* **5**: 4-6 (1968).

8 Germain JF, Monge JP and Huignard J, Development of two bruchid populations (*Bruchidius atrolineatus* (Pic) and *Callosobruchus maculatus* (Fab.)) infesting stored cowpeas *Vigna unguiculata* Walp.) pods in Niger. *Journal of Stored Products Research* 23: 157-162 (1987).

9 Southgate BJ, Biology of the Bruchidae. Annual Review of Entomology 24: 449-473 (1979).

10 Adugna H, On farm storages studies in Eritrea. African Journal Biotechnol 5: 1537-1544 (2006).

11 Appleby JH and Credland PF, Environmental conditions affect the response of West African Callosobruchus

*maculatus* (Coleoptera: Bruchinae) populations to susceptible and resistant cowpea. *Journal of Stored Product Research* **40**: 269-287 (2004).

12 Credland PF, Dick KM and Wright AW, Relationships between larval density, adult size and egg production in the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Ecological Entomology* **11**: 41-50 (1986).

13 Messina FJ and Mitchell R, Intraspecific variation in the egg-spacing behavior of the seed beetle *Callosobruchus* maculatus. Journal of Insect Behavior **2**: 727-742 (1989).

14 Mitchell R, Behavioural ecology of *Callosobruchus maculatus*, K. Fujii, A.M.R. Gatehouse, C.D. Johnson, R. Mitchell, T. Yoshida, Editors, *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., 317-329 (1990).

15 Fox CW, Stillwell RC, Amarillo AR, Czesak ME and Messina FJ, Genetic architecture of population differences in oviposition behaviour of the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Evolutionary Biology* **17**: 1141-1151 (2004).

16 Tuda M, Wasano N, Kondo N, Horng SB, Chou LY and Tateishi Y, Habitat-related mtDNA polymorphism in the storedbean pest *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Bulletin of Entomological Research* **94**: 75-80 (2004).

17 Bieri J and Kawecki TJ, Genetic architecture of differences between populations of cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) evolved in the same environment. *Evolution* **57**: 274-287 (2003).

18 Belshaw R and Quicke DLJ, Robustness of ancestral state estimates: evolution of life history strategy in ichneumonoid parasitoids. *Systematic Biology* **51**: 450-477 (2002).

19 Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H and Flook P, Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annal of the Entomological Society of America* **87**: 651-702 (1994).

20 Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM and Smith M, Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**: 687-695 (1977).

21 Thompson J, Higgins D and Gibson T, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4690 (1997).

22 Hall T, BioEdit version 5.0.6. Department of Microbiology, North Carolina State University (2001)

23 Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-599 (2007).

24 Librado P and Rozas J, DnaSP version v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452 (2009).

25 Lopez JV, Yuhki N, Modi W, Masuda R and O'Brien SJ, "Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA in the nuclear genome of the domestic cat". *Journal Molecular Evolution* **39**: 171-190 (1994).

26 Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D and Lefeuvre P, RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* **26**: 2462-2463 (2010).

27 Excoffier L and Lischer HE, Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource* **10**: 564-567 (2010).

28 Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM, Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491 (1992).

29 Kimura M, A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution* **16**: 111-120 (1980).

30 Huelsenbeck JP, and Ronquist F, Mrbayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 754-755 (2001).

31 Nylander JAA, MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre: Uppsala University Uppsala, Sweden (2004).

32 Hasegawa M, Kishino H and Yano T, Dating the Human-Ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal Molecular Evolution* **22**: 160-174 (1985).

33 Rambaut A and Drummond AJ, Tracer version 1.4. Available at http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer (2007)

34 Clement M, Posada D and Crandall KA, TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657-1660 (2000).

35 Tajima F, Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595 (1989).

36 Fu YX, Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics* **147**: 915-925 (1997).

37 Ramirez-Soriano A, Ramos-Onsins SE, Rozas J, Calafell F and Navarro A, Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics* **179**: 555-567 (2008).

38 Rogers AR and Harpending H, Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic difference. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 552-569 (1992).

39 Vink CJ, Phillips CB, Mitchell AD, Winder LM and Cane RP, Genetic variation in *Microctonus aethiopoides* (Hymenptera: Braconidae). *Biological Control* **28**: 251-264 (2003).

40 Kavar T, Pavlovčič P, Sušnik S, Meglič V and Virant-Doberlet M, Genetic differentiation of geographically separated populations of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research* **96**: 117-128 (2006).

41 Farias IP, Orti G, Sampaio I, Schneider H and Meyer A, The cytochrome *b* gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationship among Cichlid fishes. *Journal Molecular Evolution* **53**: 89-103 (2001).

42 Sezonlin M, Dupas S, Le Ru B, Le Gall P, Moyal P, Calatayud PA, Giffard I, Faure N and Silvain JF, Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Molecular Ecology* **15**: 407-420 (2006).

43 Torres-Leguizamon M, Dupas S, Dardon D, Gomez Y, Nino L, Carnero A, Padilla A Merlin I, Fossoud A, Zeddam JL, Lery X, Capdevielle-Dulac C, Dangles O and Silvain JF Inferring native range and invasion scenarios with mitochondrial DNA: the case of *T. solanivora* successive north–south step-wise introductions across Central and South America. *Biological Invasions*. pp 15 (2011).

44 Yang M, Ma Y and Wu J, Mitochondrial genetic differentiation across populations of the malaria vector *Anopheles lesteri* from China (Diptera: Culicidae). *Malaria Journal* **10**: 216 (2011).

45 Franco FAL, Morillas-Márquez F, Barón SD, Morales-Yuste M, Gálvez R, Díaz V, Pesson B, Alves-Pires C, Depaquit J, Molina R, Afonso MO, Gállego M, Guernaoui S, Bounamous A and Martín-Sánchez, Genetic structure of *Phlebotomus* (*Larroussius*) *ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: epidemiological implications. *International Journal for Parasitology* **40**: 1335-1346 (2010).

46 Xu ZH, Chen JL, Cheng DF, Liu Y, Francis F, (2011) Genetic variation among the geographic population of the grain aphid, *Sitobion avanae* (Hemiptera: Aphidae) in China inferred from mitochondrial COI gene sequence. *Agricultural Science in China* **10**: 1041-1048 (2011).

47 Batley J, Edwards KJ, Barker JHA, Dawson KJ, Wiltshire CW, Glen DM and Karp A, Population structure of the beetle pests *Phyllodecta vulgatissima* and *P. vitellinae* on UK willow plantations. *Insect Molecular Biology* **13**: 413-421 (2004).

48 Endersby NM, Mckechnie W, Ridland PM and Weeks AR, Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Molecular Ecology* **15**: 107-118 (2006).

49 Alvarez N, McKey D, Hossaert-McKey M, Born C, Mercier L and Benrey B, Ancient and recent evolutionary history of the bruchid beetle, *Acanthoscelides obtectus* Say, a cosmopolitan pest of beans. *Molecular Ecology* **14**: 1015-1024 (2005).

50 Alvarez N, Hossaert-McKey M, Restoux G, Delgado-Salinas A, Benrey B, Anthropogenic effects on population genetics of phytophagous insects associated with domesticated plants. Evolution 61:2986-2996 (2007).

51 Ajayi FA and Wintola HU, Suppression of the cowpea Bruchid (*Callosobruchus maculatrus* F.) infesting stored cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seeds with some edible plant product powders. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **9**: 1454-1459 (2006).

52 Yusuf AU, Dike MC, Adebitan SA and Ahmed BI, (2011) Comparative efficacy of seven plant products on the cowpea burchid, *Callosobruchus maculatus* F. development and damage. *Journal of Biopesticides* **4**: 19-26 (2011).

53 Sembène M, Kébé K and Delobel A, Effet structurant de la plante hôte chez la bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Bruchidae). *Biotechnology Agronomie Société et Environnment* **16**: 3-11 (2012).

54 Kébé K and Sembène M, Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) field infestation by the bruchids (Coleoptera: Bruchidae) in the northern Senegal: preliminary biological and ecological data. *Journal of Applied Bioscience* **41**: 2788-2796 (2011).

55 O'Neill SB, Buckley TR, Jewell TR and Ritchie PA, (2009) Phylogeographic histoty of the New Zealand stick insect *Niveaphasma annulata* (Phasmatodea) estimated from mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Phylogenetic and Evolution* **53**: 523-536 (2009).

# Tables

# Table 1. Summary statistics for 28S and CytB sequences of C. maculatus.

	28S	CytB
Sample size	102	98
Sequence length	521	456
Number of variables sites	5 (0.96%)	46 (10.10%)
Number of parsimony informative sites	3 (60%)	30 (65.22%)
Trs/Trv rate bias (R)	16.542	16.886
Haplotype diversity (Hd)	0.33 +/- 0.059	0.97+/-0.007
Nucleotide diversity $(\pi)$	0.0006+/- 0.0001	0.0121+/-0.0006
Number of alleles/haplotypes	9	44

Table 2. Genetic diversity in the different sampled populations of *C. maculatus* for 28S and CytB.

		288				CytB					
Country	Locality	Sample	Number of	Haplotype diversity	Nucleotide diversity	Sample	Number of	Haplotype diversity	Nucleotide diversity		
		size	alleles	(+/- SD)	(+/- SD)	size	haplotypes	(+/- SD)	(+/- SD)		
Burkina Faso	Tenkodogo	9	3	0.42 +/- 0.191	0.0020 +/- 0.0020	5	5	1.00+/-0.126	0.0136 +/- 0.0091		
Mali	Bougoudere	10	1	0.00 +/- 0.000	0.0000 +/- 0.0000	10	8	0.96+/-0.059	0.0124 +/- 0.0073		
	Sikasso	10	4	0.53 +/- 0.180	0.0041 +/- 0.0030	10	4	0.78+/-0.091	0.0086 +/- 0.0053		
Niger	Niamey	4	2	0.20 +/- 0.154	0.0004 +/- 0.0010	10	7	0.93+/-0.062	0.0087 +/- 0.0054		
Senegal	Coki	9	2	0.22 +/- 0.166	0.0004 +/- 0.0010	5	6	0.89+/-0.075	0.0108 +/- 0.0065		
	Fouta	8	2	0.25 +/- 0.180	0.0005 +/- 0.0011	5	4	0.90+/-0.161	0.0150 +/- 0.0100		
	Kebemer	9	2	0.22 +/- 0.166	0.0004 +/- 0.0010	10	3	0.64+/-0.101	0.0065 +/- 0.0042		
	Tambacounda	9	2	0.00 +/- 0.000	0.0000 +/- 0.0000	10	1	0.00+/-0.000	0.0000 +/- 0.0000		
Togo	Adidogome	4	2	0.50 +/- 0.265	0.0010 +/- 0.0012	4	2	0.50 +/- 0.265	0.0077 +/- 0.0060		
	Assigame	5	2	0.60 +/- 0.175	0.0012 +/- 0.0013	5	4	0.90 +/- 0.161	0.0057 +/- 0.0043		
	Dapaong	5	2	0.50 +/- 0.265	0.0011 +/- 0.0012	5	4	0.90 +/- 0.161	0.0105 +/- 0.0072		
	Gbinga	5	2	0.60 +/- 0.175	0.0012 +/- 0.0013	4	3	0.90 +/- 0.161	0.0180 +/- 0.0118		
	Mango	5	2	0.40 +/- 0.237	0.0010 +/- 0.0010	5	3	0.80 +/- 0.164	0.0087 +/- 0.0061		
	Tsevie	10	1	0.60 +/- 0.175	0.0012 +/- 0.0013	10	4	0.83 +/- 0.222	0.0102 +/- 0.0075		

Table 3. AMOVA results for each level of variation in the *C. maculatus* samples, based on separate analysis of 28S and CytB.

Gene	Source of variation	Sum of squares	Percentage of variation (%)	F (P value)
28S	Among groups (i.e., countries)	1.173	1.69	Fct = 0.017 (P = 0.33)
	Among populations within groups	1.254	2.38	$Fst = 0.041 \ (P = 0.13)$
	Within populations	16.897	95.93	$Fsc = 0.024 \ (P = 0.21)$
CytB	Among groups (i.e., countries)	25.55	4.23	$Fct = 0.042 \ (P = 0.25)$
	Among populations within groups	28.679	21.8	$Fst = 0.26 \ (P < 0.0001)$
	Within populations	122.4	73.97	$Fsc = 0.23 \ (P < 0.001)$

# **Figure captions**

**Figure 1.** Geographical distribution of sampled localities of *Callosobruchus maculatus* in West Africa: Tenkodogo (Bf), Bougoudere (MaB), Sikasso (MaS), Niamey (NiN), Coki (SnC), Fouta (SnF), Kebemer (SnK), Tambacounda (SnT), Adidogome (TAd), Assigame (TAs), Dapaong (TDa), Gbinga (TGb), Mango (TMa), Tsevie (TTs).

**Figure 2.** Phylogenetic relationships and spatial distribution of 28S alleles found in *C. maculatus*. (**A**) Statistical Parsimony network showing the relationships among alleles. Circles on branches represent the number of mutation steps between two alleles. Sizes of ellipses are proportional to the observed frequency of each allele. (**B**) Spatial distribution of alleles with pie-chart proportions corresponding to the frequency of alleles in each population and colors referring to alleles in the network.

**Figure 3**. Phylogenetic relationships and spatial distribution of CytB haplotypes found in *C. maculatus*. (**A**) Bayesian phylogenetic relationships of *C. maculatus* haplotypes.Values on branches represent node supports derived from Bayesian posterior probability (only values above 0.5 are shown). (**B**) Statistical Parsimony Network showing the relationship among haplotypes. Circles on branches represent the number of mutation steps between haplotypes. Sizes of ellipses are proportional to the observed frequency of each haplotype. (**C**) Spatial distribution of haplotypes with pie-chart proportions corresponding to the frequency of haplotypes in each population and colors referring to haplotypes in the network.

**Figure 4**. Mismatch distribution analysis for the West African specimens of *Callosobruchus maculatus* with the expected and observed frequencies (as full and dotted lines, respectively) of ranked pairwise distances among specimens. A: 28S. B: CytB.



Figure 1



Figure 2







Figure 4

# Supplementary material

Locality	Bf	MaB	MaS	NiN	SnC	SnF	SnK	SnT	TAd	TAs	TDa	TGb	TMa	TTs
Bf		0.00043	0.00074	0.00063	0.00043	0.00062	0.00043	0.00043	0.00092	0.00121	0.00092	0.00160	0.00082	0.00121
MaB	0.01235		0.00039	0.00019	0.00000	0.00024	0.00000	0.00000	0.00049	0.00078	0.00049	0.00117	0.00039	0.00078
MaS	-0.04790	0.10101		0.00058	0.00039	0.00063	0.00039	0.00039	0.00088	0.00117	0.00117	0.00088	0.00078	0.00156
NiN	0.00845	0.00000	0.09259		0.00019	0.00044	0.00019	0.00019	0.00068	0.00097	0.00097	0.00068	0.00058	0.00136
SnC	0.00000	0.01235	0.08047	0.00062		0.00024	0.00000	0.00000	0.00049	0.00078	0.00078	0.00049	0.00039	0.00117
SnF	-0.05059	0.02946	0.06730	0.00298	0.00087		0.00024	0.00024	0.00073	0.00073	0.00102	0.00141	0.00063	0.00102
SnK	0.00000	0.01235	0.08047	0.00062	-0.12500	0.00087		0.00000	0.00049	0.00049	0.00078	0.00117	0.00039	0.00078
SnT	0.00000	0.00000	0.08676	-0.01124	0.00000	0.01562	0.00000		0.00049	0.00078	0.00117	0.00049	0.00039	0.00078
TAd	-0.05155	0.24528	-0.00560	0.08142	0.06596	0.05023	0.06596	0.21739		0.00126	0.00126	0.00097	0.00088	0.00165
TAs	0.07419	0.41748*	0.08098	0.27336	0.25344	0.23255	0.25344*	0.39189	0.14847		0.00093	0.00101	0.00088	0.00086
TDa	0.07419	0.41748*	0.08098	0.27336	0.25344	0.23255	0.25344*	0.39189	0.14847	-0.25000		0.00101	0.00088	0.00086
TGb	0.22645*	0.64286*	0.17819*	0.49881*	0.47752*	0.45449*	0.47752*	0.62185*	0.34783*	-0.15385	-0.15385		0.00107	0.00109
TMa	-0.04077	0.14894	0.01722	0.03955	0.02951	0.01975	0.02951	0.12621	0.00641	-0.13636	-0.13636	0.10714		0.00068
TTs	-0.05155	0.24528	-0.00560	0.08142	0.06596	0.05023	0.06596	0.21739	0.00000	-0.22642	-0.22642	-0.00515	-0.28099	

Table S1. Fst and genetic distance (d) values among populations of Callosobruchus maculatus for 28S (above diagonal: d; below diagonal: Fst).

\*: level of significance at P < 0.05.

Locality	Bf	MaB	MaS	NiN	SnC	SnF	SnK	SnT	TAd	TAs	TDa	TGb	TMa	TTs
Bf		0.01319	0.01196	0.01159	0.01260	0.01426	0.01696	0.01619	0.01369	0.01026	0.01167	0.01493	0.01098	0.01154
MaB	0.00474		0.01062	0.01279	0.01143	0.01346	0.01304	0.00886	0.01458	0.01771	0.01201	0.01179	0.01229	0.01211
MaS	0.08594	-0.00186		0.01173	0.01039	0.01250	0.01237	0.00642	0.01277	0.01096	0.01547	0.01022	0.01115	0.01016
NiN	0.04972	0.16376*	0.25290*		0.01228	0.01255	0.01728	0.01244	0.01278	0.01558	0.01110	0.01480	0.00880	0.00780
SnC	0.03171	-0.02681	0.05508	0.19686		0.01251	0.01268	0.00865	0.01379	0.01703	0.01187	0.01124	0.01196	0.01160
SnF	-0.01562	-0.02041	0.07806	0.07918	-0.02498		0.01590	0.01155	0.01549	0.01219	0.01888	0.01404	0.01256	0.01361
SnK	0.44500*	0.26432*	0.3785*	0.55210*	0.30800*	0.3697*		0.00796	0.01741	0.01777	0.02148	0.01136	0.01814	0.01560
SnT	0.56100*	0.29444*	0.3218*	0.64680*	0.37040*	0.5087*	0.58642*		0.01164	0.01198	0.01020	0.01561	0.01198	0.00665
TAd	0.19520	0.26093*	0.3431*	0.34070*	0.29200*	0.24053	0.59694*	0.81221*		0.01233	0.01413	0.01502	0.01425	0.01233
TAs	0.04350	0.19685*	0.3125*	0.04564	0.24120*	0.14234	0.64286*	0.84127*	0.45827*		0.00940	0.01491	0.01509	0.00692
TDa	-0.04960	0.02398	0.05830	0.13674	0.08934	0.05229	0.47560*	0.62471*	0.33764*	0.12736		0.01573	0.01084	0.01357
TGb	0.18070	0.01189	0.08033	0.36700*	0.04739	0.07912	0.29387*	0.47269*	0.39506*	0.4728*	0.22321		0.01720	0.01469
TMa	-0.03660	0.10600	0.21093	-0.00389	0.15898	0.04255	0.58735*	0.74603*	0.32051*	-0.05769	0.09836	0.3478*		0.01517
TTs	0.00550	0.15006	0.17370*	0.17690*	0.17330*	0.11137	0.48237*	0.56978*	0.06297	0.2012*	0.07670	0.14847	0.10294	

Table S2. Fst and genetic distance (d) values among populations of Callosobruchus maculatus for CytB (above diagonal: d; below diagonal: Fst).

\*: level of significance at P < 0.05.

Annexe 15 : Article en préparation pour la revue Molecular Ecology

# Biogeographic and demographic analyses reveal the origin and the evolutionary history of the cosmopolitan insect pest *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera, Bruchinae).

Khadim Kébé<sup>1,2</sup>, Mbacké Sembène<sup>1</sup>, Midori Tuda<sup>3</sup>, Goran Arnqvist<sup>4</sup>, Charles W. Fox<sup>5</sup>, Nadir Alvarez<sup>2</sup>, Anahí Espíndola<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup> Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, B. P. 5005 Dakar, Sénégal.

<sup>2</sup> Département d'Ecologie et d'Evolution, Faculté de Biologie et de Médecine, Biophore, Université de Lausanne, CH -1015 Lausanne, Suisse.

<sup>3</sup> Institutes of Biological Control, Faculty of Agriculture Kyushu University Fukuoka 812-8581, Japan.

<sup>4</sup> Department of Animal Ecology, Evolutionary Biology Centre (EBC), Uppsala University Norbyvägen 18 D, SE-752
36 Uppsala Sweden.

<sup>5</sup> Department of Entomology S-225, Agricultural Science Center North University of Kentucky Lexington, KY 40546-0091, USA.

<sup>6</sup> University of Idaho, Biological Sciences, Life Sciences South 252, Moscow, ID, 83843, USA

#### Abstract

The bean beetle (Callosobruchus maculatus) is distributed throughout the tropical and subtropical world. Throughout its whole distribution, it is preferentially associated with Vigna unguiculata, the cowpea, but is also able to develop on other legumes, whose seeds are home to larvae development. Evidence suggests a probable African origin of C. maculatus, which since the domestication and diffusion of several legume species, has become cosmopolitan through human-mediated dispersals. However, to date, no solid evidence has confirmed the centre of origin of the species, nor the different routes of dispersal it experienced. Here we use molecular markers, parametric biogeography, and state-ofthe-art coalescence analyses, to explore lineage divergence, dispersal, and demographic history. Sampled populations span a large fraction of the species' distribution area. Our results show regional and continental structuring of the genetic variation with most of the diversity found in Africa. Based on dispersal-extinction-cladogenesis analysis, Africa is confirmed as the origin of C. maculatus, sometime in the late Pleistocene 60.000 to 36.000 years ago. Africa is further revealed to host the highest diversity, and notably four lineages that dispersed out of the continent. A fifth lineage is shown to have spread from Asia to America. The three different methods used for inferring the demographic history of C. maculatus concur in indicating a recent population size expansion when considering the whole dataset as well as a subset comprised of African populations only, whereas we found weak support for such an increase when only the subset of Asian populations was analyzed. The demographic expansion is shown to have occurred through the Holocene and is likely to be explained by the spread of cowpea and other legumes out of Africa, in association with global climatic conditions tending towards a more humid world.

# Introduction

Deliberate or accidental human-mediated dispersal greatly contributes to the global expansion of species originally localized in a single region (Däumer et al. 2012; Blakeslee et al. 2012). The number of species, which after their introduction became cosmopolitan and sometimes invasive, is considerable (Rius et al. 2008; Brunel, 2009; Roche et al. 2009; Hussner, 2012) although their success is highly variable, depending on a combination of biotic and abiotic characteristics of invaded habitats and/or life-history traits (Gurevitch et al. 2011). Many invasive species are specialized on crop plants and their ecological and economic damage when they invade a new area can be devastating to a region or country (Sax et al. 2005; Pimentel et al. 2005). Among these species, insect pests are among those showing the largest geographical and ecological distribution, notably because human activities and more particularly the commercial exchange of fruits and seeds in the case of herbivorous species, has the potential to spread them over all continents. Tracing back the large-scale biogeographic history of a pest species is thus informative of human-mediated key-dispersal events that have shaped its spatial genetic diversity. In the last decade, investigations of the spatial genetic structure of several insect species have allowed identifying the number of successful introduction that led to the establishment of populations and further spread in non-native areas. Understanding the degree of population connectivity at a continental scale is central to a global study of the phylogeography of widespread fragmented populations (Taberlet, 1998). For instance, a worldwide study of Locusta migratoria, a species demonstrating high intrinsic dispersal capabilities, showed strong regional and local structuring (Chapuis et al. 2008). In the olive fly Bactrocera oleae, a worldwide study using molecular data suggested the existence of several allopatric genetic lineages, in particular in the Paleotropics and in the Mediterranean region, the latter having recently invaded North America (Nardi et al. 2005). Those two species, however, are not physically tight to the crop on which they develop, which greatly limits their spread through human trade. Bruchid beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), in contrast, demonstrate an obligatory larval state within seeds of legumes (ie, larvae are protected and concealed inside the host seeds), a feature that largely increases their potential for dispersal through human trade and exchange for the species associated with legumes of economic importance. To our knowledge, only one study so far has investigated the worldwide phylogeography of a bruchid beetle, showing that the Neotropical Acanthsocelides obtectus has experienced one single main introduction in the Old World that first reached Europe, before spreading to Africa (Alvarez et al. 2005). This latter study, however, considered specimens from only a few locations. Here, we aim at going further by investigating the fate of another worldwide bruchid beetle, the cowpea weevil Callosobruchus maculatus Fabricius, mostly associated with cowpea in Africa, but nowadays found in fields and stocks from other legumes belonging to not less than four botanical subtribes (Tuda et al. 2005). We analyze specimens from a large fraction of the species' distribution area to test whether or not one single or several lineages contributed to its worldwide expansion. Using molecular markers, parametric biogeography, and state-of-the-art coalescence analyses, we explore lineage divergence, dispersal, and demographic history. In summary we aim at (1) inferring the geographical structure of its different lineages (2) shedding light on the geographical origin of C. maculatus, (3) investigating the main migration routes of the species between the continents, and (4) inferring the evolution of the effective population size through time in order to catch up the events that shaped the species' recent demographic history. Given the wide range of ecological habitats occupied by the species and its great ability to adapt to new hosts as showed in many herbivorous insects (Singer et al. 1993; Carroll et al. 1997; Fordyce & Nice, 2003), one can expect either large genetic differentiation among lineages showing different demographic histories, or a plastic response of a single homogeneous gene pool. Studying the phylogeographic pattern of this species is also of particular agronomic concern, because knowledge of the native range of a species' lineages may give an insight on the climatic conditions in which the species evolved, and can also otherwise guide the search for agents of biological control (Alvarez et al. 2005).

# Materials and methods

#### The studied species

*Callosobruchus maculatus* is a pest species mainly found in Africa and Asia but nowadays distributed over all continents in tropical and subtropical habitats (Beck & Blumer, 2011). According to Tuda et al. (2006), *C. maculatus* forms a monophyletic group together with *C. analis* Fabricius, *C. rhodesianus* Pic, and *C. subinnotatus* Pic. Its origin is uncertain, but its distribution is probably closely linked to that of its principal host plant, cowpea. Cowpea is considered as having been used as a crop plant since Neolithic times (Summerfield et al. 1974). The precise location where cowpea was first domesticated is still under discussion, although the restricted distribution of its wild counterparts exclusive to Africa and Madagascar argues towards an African origin. Because the centre of diversity of cultivated cowpea is found in West Africa (Ng & Marechal, 1985) it is likely that this crop was domesticated in this region (Ba et al. 2004). In contrast, the centre of diversity of wild *Vigna* species seems located in south-eastern Africa (Padulosi & Ng 1997), while the closest wild parent of cowpea (ie, *Vigna unguiculata* var. *spontanea*) was shown to have originated in Eastern Africa.

*Callosobruchus maculatus* completes several generations per year in stocks (ie, a single generation can be completed in 30-40 days). Once inseminated, adult females will lay (oviposit) single fertilized eggs on the external surface of a seed (Beck & Blumer, 2011). The larvae that hatched from the eggs burrow from the eggs through the seed coats and into the bean endosperm. They pupate and metamorphose within the seeds and adults that result from pupation chew through the seed coats and emerge from the bean. The economical importance of *C. maculatus* is not only related to the fact that it is a pest of legumes in the field, but it also consumes the seeds that are further stored prior to human consumption. Indeed, if not controlled, storage populations of *C. maculatus* can grow exponentially causing significant losses in seed weight, germination viability and marketability (Caswell, 1968; Southgate, 1979).

# Sampling, DNA extraction, amplification and sequencing

To obtain the most complete representation of the genetic variation of C. maculatus we sampled different geographical regions known to be inhabited by the species across all continents (see Fig. 1 and Supplementary material). Genomic DNA was extracted for all specimens using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Four DNA regions: (ie, one nuclear - the ITS1 internal transcribed spacer - and three mitochondrial regions - cytochrome oxydase b (cytb), cytochrome oxydase I (COI) and cytochrome oxydase II (COII) were amplified and sequenced. Primers used were CIL (5'-GCGTTCGAARTGCGATGATCAA-3') and CIU (5'-GTAGGTGAACCTGCAGAAGG-3') (Vogler & 1994) ITS1, CB1 (5'-Desalle, for TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3') and CB2 (5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3') (Simon et 1994) for cytb, C1-N-2191 (5'-CCAGGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3') and C1-J-1751 (5'al. GGATCACCTGATATAGCATTCCC-3') (Simon et al. 1994) for COI and TL2-J-3037 (5'-ATGGCAGATTAGTGCATG-3') and modC2-N-3661 (5'-CCACAAATTTCGAACATTGACCA-3') (Mardulyn et al. 1997) for COII. PCR reactions were performed in a 30 µl volume containing 1 U Taq-polymerase, 0.1 mM dNTP, 3 µl of 10X PCR buffer (2.5 mM MgCl2) and 1.0 µM of each primer, and consisted in an initial denaturation at 93°C for 1 min 30 s followed by 35 to 36 cycles of a 35 s denaturation phase at 93°, 1 min annealing (at 47°C for cytb and COI, 53°C for COII and 57° for ITS1) and a 1 min extension, and ending with a final extension at 72°C for 10 min.

The success of amplification was checked by electrophoresis on a 1% agarose/TBE gel and stained with ethidium bromide for band visualization. PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Finally, cycle sequencing was performed using the Big Dye 3.1 protocol (Applied Biosystem, Foster City, USA) and the same primers already used in the initial

PCR, using the following program: initial denaturation at 96°C for 3 min followed by 30 cycles composed of 96°C for 15 s, 50°C for 15 s and 60°C for 1 min 30 s, without final extension. Automated sequencing was performed at the Center for Integrative Genomics (CIG) from the University of Lausanne.

#### Sequence variation and genetic structure

The sequences obtained were checked and edited using MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007). Alignments were performed using the ClustalW algorithm (Thompson et al. 1997) as implemented in BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 2001), and then manually revised. Codon frames of mtDNA sequences were checked using MEGA v.4.0 (Tamura et al. 2007) and revealed no evidence of putative nuclear pseudogenes (NUMTS; Lopez et al. 1994) in our dataset. The three mtDNA gene alignments were then concatenated to obtain a mitochondrial (mtDNA) supermatrix using the program Sequence Matrix v. 1.7.8 (Vaidya et al. 2010).

The number of variable sites and parsimony informative sites, the number of unique haplotypes, haplotype (h) and nucleotide ( $\pi$ ) diversities with their standard deviation were obtained using DNAsp version 5.10.01 (Librado & Rojas, 2009). Estimates were calculated for the entire dataset comprising all sequences, as well as for each sampled geographic region (Africa, America and Asia+Oceania). We searched for evidence of recombination in the ITS1 nuclear marker using methods implemented in the software Recombination Detection Program (RDP) Beta 4.5 (Martin et al. 2010).

Population genetic structure was examined with an Analysis of Molecular Variance (AMOVA) based on pairwise Fst values and computed using the program ARLEQUIN v.3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). AMOVAs were performed on the ITS1 and the mtDNA datasets separately. The group (or supra-population) level corresponds to the three continents and the population level corresponds to sampled localities within continents. The statistical significance of values was obtained by performing 10.000 random permutations of the data.

#### Phylogenetic analyses

Monte Carlo Markov Chain (MCMC) was performed to infer the phylogenetic relationships among *C. maculatus* specimens using BEAST v.1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007). Analyses were done on the mtDNA and ITS1 datasets separately. For the mtDNA dataset, the data were partitioned by locus and a separate model of molecular evolution was applied to each partition. The best fit model was identified for each mtDNA partition and for ITS1 using the Akaike information criteria (AIC) model selection implemented in the program MrModeltest2 v.2.3 (Nylander, 2004). A general time reversible (GTR) model was selected for the ITS1 and COII loci and a Hasegava-Kishino-Yano (HKY) model for COI and cytb. All four regions were subject to a gamma distribution and, except cytb, presented invariable sites. Substitution rates were different for each partition and were defined based on Borer et al. (2010) and Pons et al. (2010); an uncorrelated relaxed clock model assuming lognormal distribution of rates was used (Drummond et al. 2006) and an ultrametric tree was inferred applying a Yule prior on branching rates. Six independent MCMC analyses were run for 100.000.000 generations, sampling one tree every 1.000 generations. After confirming stationary and convergence of parameter estimates using Tracer v1.4 (Rambaut & Drummond, 2007) the first 10% of trees (ie, the burn-in period) of each run were discarded in order to construct a maximum credibility tree using TreeAnnotator v1.4.5 (Drummond & Rambaut, 2007).

We built statistical parsimony networks for both mtDNA and ITS1 datasets by using the program TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000). Parsimony probability was set at 95%, indicating that only the haplotypes with less than 5% of the sites being different according to the parsimony criterion would be connected.

# **Biogeographical analyses**

Because the ITS1 phylogeny was not informative (see below), biogeographical analyses were performed on the mitochondrial dataset only. We used the dispersal-extinction-cladogenesis (DEC) model implemented in LAGRANGE v.2.0.1 (Ree & Smith, 2008) with all areas connected with a dispersal probability equal to 1. Following recommendations made by Buerki et al. (2011), areas were defined based on the geological criterion. Three areas were delimited by continental divisions 1) Africa; 2) America and 3) Asia+Oceania.

# Demographic history

As substitution rates were not available for the ITS1 region, the demographic history was studied using mtDNA data on three different datasets: i) samples from all regions (complete dataset), ii) all samples from Africa, iii) all samples from Asia.

Three methods were used to test the demographic history of *C. maculatus*. First, we used the neutrality test statistics Tajima's *D* (Tajima, 1989), Fu's *Fs* (Fu, 1997) and *R2* (Ramos-Onsins & Rojas, 2002) in order to test for evidence of population expansion in the history of *C. maculatus*. The *Fs* and *R2* tests are the most robust analyses for detecting population growth, with *Fs* being better adapted for large sample sizes and *R2* for small sample size (Ramos-Onsins & Rojas, 2002). These statistics were calculated using the program DNAsp version 5.10.01 (Librado & Rojas, 2009) and significance was assessed with 10.000 coalescent simulations. Whereas values of Tajima's *D* and Fu's *Fs* values indicate a constant population size, significant negative or slightly positive Tajima's *D* and Fu's *Fs* values indicate a recent population expansion, while significant positive Tajima's *D* and Fu's *Fs* values indicate population bottlenecks.

Second, we performed a mismatch distribution analysis using ARLEQUIN v.3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010), which evaluates the distribution of the number of nucleotide mismatches between all pairs of DNA sequences belonging to a population sample. Because of different demographic dynamics, populations that have experienced rapid demographic growth in the recent past exhibit unimodal distributions, while populations at the demographic equilibrium have multimodal distributions (Rogers & Harpending, 1992). We statistically tested the validity of the expansion model with a bootstrap approach followed by calculation of the sum of square deviations (SSD) between the observed and the expected distribution (Schneider et al. 2000) using ARLEQUIN v.3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). The Harpening's Raggedness Index (Rg), which is an estimate of the fluctuation in the frequency of pairwise differences (Harpending et al. 1993) was also computed.

Third, we used the Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) method, as implemented in BEAST. This method has the benefit of considering the coalescent history of each gene and simultaneously to characterize the effective population size through time using a MCMC sampling. Two independent runs were performed for 100.000.000, and sampling one tree every 10.000 generations. Because more complex models could not reach convergence, we applied a unique model of evolution (HKY) and an identical strict substitution rate to all partitions (0.862%/million years), which was the mean value of the substitution rates known from the bibliography (see above) for the mitochondrial regions studied here. Once two runs reached convergence, we combined the results using LogCombiner 1.5.3 (Drummond & Rambaut, 2007) and calculated the population sizes over time in BEAST.

# The effect of population structure and departure to panmixia on EBSP results

The EBSP method relies on strong assumptions regarding the demographic characteristics of the population(s) (Heled & Drummond, 2008). One of these assumptions concerns panmixia, which is often violated in phylogeographic analyses. Because our results show that *C. maculatus* presents a geographic genetic structure (see below) that is

associated with reduced among-demes genetic exchanges, we performed supplementary analyses to explore how violation of panmixia might affect the results. So far, to our knowledge, only two studies (Pannell, 2003 & Chikhi et al. 2010) have investigated consequences of population structure on the characterization of effective population size through time, but none of those approached the topic from a phylogeographic point of view. In this section, we decided to evaluate the consistency of the demographic results obtained when different reduced datasets were considered based on a random selection of the sampled specimens (dataset bootstrapping). We thus performed the same EBSP analysis for five sets of ten bootstrapped datasets each. We randomly selected one sample per population ("one sample per populations "one sample per population, Africa" dataset), iii) all Asian populations "one sample per population, Asia" dataset), while we randomly selected 30 samples ("random" datasets) from iv) all sampled populations ("random, Africa" dataset). This last selection could not be done on Asian samples, because they led to a dataset identical to the original one (ie, our global dataset comprises 30 Asian specimens). We should be able to identify an effect of the lack of panmixia on the EBSP results, by comparing results from "random" (little genetic structure) to those from "one sample per population" (genetic structure similar to the empirical data) datasets.

#### Results

#### DNA sequence variation and genetic structure

As expected for protein coding genes, no insertions, deletions or stop codons were present in any of the sequences of cytb, COI and COII, supporting that the sequences retrieved are not nuclear pseudogenes. Recombination was not detected in any of the tests performed in the nuclear dataset. Mitochondrial genes (1536 pb) contained 156 variable sites and among them 109 were parsimony informative, whereas the nuclear dataset (757 pb) contained 24 variable sites, all parsimony informative. 64 haplotypes and 27 alleles were present in the mitochondrial and nuclear genes, respectively (Table 1). Haplotype (h) and nucleotide ( $\pi$ ) diversities were, respectively, 0.98 and 0.010 for the mitochondrial genes, whereas they were 0.89 and 0.00047, respectively, for the ITS1 dataset.

AMOVAs (Table 2) showed that 12.70% variance of the mtDNA dataset was significantly explained by among-continents differences, whereas the latter did not account for variance explanation in the nuclear dataset. Among-population differences significantly explained 48.68% and 49.03% of the genetic variance for the mitochondrial and nuclear datasets, respectively, while 38.62% and 53.83% of the variation was significantly explained by within-population differences for the mitochondrial and nuclear datasets, respectively.

## Phylogenetic analysis

The ITS1 phylogeny was highly polytomized and while it confirmed monophyly of *C. maculatus* [posterior clade support value (PS) = 1.00], it did not inform on lineages relationships (fig. S1). In contrast, the mtDNA phylogeny (fig. 1) was highly informative. The monophyly of *C. maculatus* was strongly supported (PS = 1.00) and the most recent common ancestor of the species was dated back to the late Pleistocene, ca. 36.000 to 60.000 years ago. The analysis retrieved seven well supported clades (PS > 0.9) and two less well-supported clades (0.9 > PS > 0.5). The relations between some of them, though, yielded weak support. Clade I (PS = 1) was composed by samples from Asia and Brazil. Clade II (PS = 0.99) and clade VII (PS = 0.98) comprised samples from West of Africa. Clade IV (PS = 1) was composed by individuals from Africa and California. With the exception of one individual from Madagascar, clade V (PS = 0.75) was composed by individuals from Asia. Clade VI (PS = 0.76) comprised samples from West Africa plus

one specimen from Syria. Clade VIII (PS = 0.93) was composed by individuals from Africa and Asia. Finally, clades III (PS = 1) and IX (PS = 1) were respectively composed of samples from Zaire and Uganda.

The mtDNA parsimony network (fig. S2) showed the same grouping as the Bayesian phylogenetic tree. The ITS1 parsimony network (fig. S3) showed slightly more information than the Bayesian tree with 27 alleles spanning the dataset. Among them were retrieved six majors (A1, A3, A4, A5, A6 and A17) and twenty-one minor alleles. The 27 alleles were grouped in 9 groups (A, B, C, D, E, F, G, H, I), separated by at least three steps in the parsimony network. The groups A and G had a worldwide distribution and were found over the three continents. Groups B, C and I (excepted one individual from Uganda and one from Brazil) were composed by individuals from Asia. Alleles from group D were found in Africa and (North) America, groups E and F were found in Africa and (South) America, respectively, while the group H was composed by samples from (South) America and (North) Africa.

#### **Biogeographical analyses**

The DEC ancestral area reconstruction (fig. 2) identified the most recent common ancestor of C. *maculatus* in Africa. The biogeographical scenarios suggest that the current distribution of *C. maculatus* has been reached after five dispersal events. Three of these happened from Africa to Asia, one from Asia to (South) America and one from Africa to (North) America. Our results suggest that Africa has been the centre of dispersal of *C. maculatus*, with no reverse migration observed.

#### Historical demography

The neutrality tests of Tajima's D (P = 0.033) and Fu's Fs (P = 0.002) showed significant negative values when considering the complete sampling, suggesting a past occurrence of demographic expansion. Ramos-Onsins and Rozas' R2 was significant (P = 0.035) and reached similar results than the D and Fs. Both D and Fs were negative in African and Asian populations, but only Fs was significant in African populations (P = 0.021). R2 values were not significant in any of the continents (Table 3).

In the mismatch distribution analysis, frequencies of pairwise differences within the full and the African datasets were consistent with what is expected under a model of expansion (Fig. 3). The SSD and Rg statistic derived from the mismatch distribution were not significant and thus failed to reject the null hypothesis of recent population expansion. These results contrast with the analysis of Asian populations, for which the Rg was significant, indicating a moderate demographic expansion in this region.

EBSP estimation for the full dataset indicated an initial phase of constant effective population size that ended about 13000 years ago with a second phase of effective population size increase. This growth continued until reaching a peak at about 230 years ago, after what the EBSP registered a strong decrease in the effective population size. This decrease is surprising, since we know that, particularly during the last centuries, this species has seen its population size growing strongly as a result of increased worldwide commercial seed exchanges. This general pattern was also identified in the African and Asian datasets. It is important to mention that although the general patterns are similar in all cases, the population size values differ, i.e., ca. 170.000 for the complete dataset, ca. 128.000 for the African dataset and ca. 32000 for the Asian (Fig.4).

# The effect of population structure and departure to panmixia on EBSP results

The analysis of the bootstrapped datasets identified a possible effect of the genetic structure on the EBSP results obtained. While in all "random" datasets the same unexpected pattern of a demographic decrease during the last centuries was retrieved (Fig.5 A and B), the effect was not perceptible in the "one sample per population" datasets

(Fig.5 C, D and E). It appears that when the genetic structure (or departure to panmixia) is stronger, as it is the case in "random" datasets, the analysis registered biased demographic patterns, which disappeared when the dataset becomes less structured (or more panmictic), as in the "one sample per population").

It should be pointed out that all "one sample per population" results were also highly congruent with the suspected timing of the species worldwide expansion. The timing of population expansions observed for the full and African datasets started ca. 11000 and ca. 9400 years ago, respectively, whereas for the Asian dataset, expansion was more recent, starting ca. 800 years ago.

#### Discussion

In this study, we aimed at unravelling the phylogeographic history of *Callosobruchus maculatus*, a cosmopolitan insect pest tightly associated with its host plant seeds during larval phase and thus subject to human-driven dispersals through commercial exchange of seeds. Whereas a companion paper focused on the fine-scale genetic structuring in West-Africa (Kébé et al. submitted), the present study was based on a worldwide sampling of the species and combined tools from biogeography and population genetics to infer the spatial and temporal patterns of evolution of this insect pest at the scale of its whole distribution. Spatially-structured genetic variation was obtained from mtDNA. In contrast, the nuclear region ITS1 did not show a spatial structuring of genetic variation clear enough to be informative in biogeographic analyses. It is well known that mtDNA genes show much lower effective population sizes than nuclear genes (Lynch et al. 2006), and as a consequence tend to demonstrate higher rates of alleles fixation in populations. In our dataset, although a trend to some clustering is found in the ITS1 analysis, it is likely that the signal of demographic and biogeographic events is still blurred by high levels of shared ancestral polymorphisms due to higher effective population sizes. Here, we thus favour discussion of mtDNA-based results.

#### Overall patterns of geographic structure

Most of the mtDNA genetic differentiation occurred among and within populations with little differentiation among continents (Table 2), likely due to multiple dispersals out from the species' centre of origin (see below). Among the nine clades retrieved, eight comprised African samples, and four were exclusively African (see Fig. 1). In Africa, a strong genetic differentiation was observed between western, eastern, northern and central populations, a pattern also identified in other species. For instance, the geographic divergence observed between West Africa and Zaire as well as between West Africa and Uganda is similar to that found for *Busseola fusca* (Sezonlin et al. 2006). However, in contrast to the latter study in which timing for this divergence was estimated sometime in the early Pleistocene, differentiation in *C. maculatus* was more recent (see fig. 2) and probably explained by the absence of cowpea seeds exchange among these different regions. In Asia, specimens mainly clustered in three clades, with one of them private to South-Eastern Asian specimens. In America, structure was also well marked with Californian specimens being grouped with West Africa samples, while specimens from Brazil were clustered with Asian populations.

#### African origin of C. maculatus

Our analysis of the biogeographic history of *C. maculatus* provides the first evidence on the species' African origin sometime in the late Pleistocene (between 60.000 and 36.000 years ago). The African origin was also supported by the number of unique haplotypes, which was higher in African populations than in the other continents (data not shown). Based on the DEC analysis, the worldwide distribution of *C. maculatus* is explained by five inter-continental dispersal events: three of them from Africa to Asia and two towards America, from either Africa or Asia. Even if our dating analysis suggests that the first dispersal event of *C. maculatus* outside Africa probably occurred ca. 20.000 years ago, confidence intervals are wide (data not shown) and it is likely that our estimation predates the dispersal events

given that the last glacial period seemed to be incompatible with a scenario of natural dispersal from Africa to Asia (Barton et al. 2011). We would thus suggest that all out-of-Africa dispersal events occurred after cowpea domestication through human-mediated long-range dispersals. Friedman & Rowland (1977) emphasized the existence of long-distance exchanges since 5000 years ago between some regions of Africa and Asia. According to Allen (1983), cowpea was introduced from Africa to the Indian sub-continent approximately 2000 to 3500 years ago; a period that could correspond to the time when *C. maculatus* was introduced in Asia. However, we cannot strictly rule out a natural dispersal from Africa to Asia, especially given the high levels of diversity encountered in Asia, and the marked structuring in clades I and V, mostly comprising Asian specimens.

# Historical demography of C. maculatus

Our analyses of demographic history using neutrality tests, mismatch distributions and the Extended Bayesian skyline plot through time converge in indicating a recent population size expansion in the whole dataset as well as in the subset composed of African populations specimens, whereas we found weak support for such an increase in Asia. The pattern retrieved from the EBSP based on the whole and the "random" dataset show a first expansion of the population size about 13.000 years ago, followed by a brutal decrease about 230 years ago. This pattern could be due either to a dramatic demograhic event that occurred contemporaneously or to a biased result, following violation of the assumption of panmixia (Ho & Shapiro 2011). Because the decrease in population size was not perceptible in the "one sample per population" dataset and because the genetic structure of *C. maculatus* seems structured spatially (see Fig. 1), the latter hypothesis is the most likely. Moreover, we could not identify any demographic event that could have explained a pattern of decrease in effective population size two centuries ago, and rather favour a scenario of recent population size growth as a result of increased worldwide commercial seed exchanges.

The EBSP with the "one sample per population" dataset indicates a population growth in the early Holocene both for the whole dataset and for the African subset. The later predates the more modest increase in Asian populations (see Fig. 5) and argues, again, towards an African origin of this pest. The recent moderate expansion of *C. maculatus* in Asia informs us that it was introduced in this region about 800 years ago. It is possible that this dispersal was associated with a switch in host plant, from cowpea to other legumes, a case often evidenced in wild organisms (Espindola et al. 2012).

#### References

Allen, D.J. (1983). The pathology of tropical food legumes. John Wiley and Sons, Chichester.

Alvarez, N., McKey, D., Hossaert-McKey, M., Born, C., Mercier, L. & Benrey, B. (2005). Ancient and recent evolutionary history of the bruchid beetle, *Acanthoscelides obtectus* Say, a cosmopolitan pest of beans. *Molecular Ecology* 14(4), 1015-1024.

Ba, F.S., Pasquet, R.E. & Gepts, P. (2004) Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as revealed by RAPD markers. *Genet Resource Crop Evol* 51, 539-550.

Barton, C.M., Riel-Salvatore, J., Anderies, J.M. & Popescu, G. (2011). Modeling human ecodynamics and bioculturalinteractions in the Late Pleistocene of Western Eurasia. *Hum Ecol* 39, 705 -725.

Beck, C.W. & Blumer, S.B. (2011). A Handbook on Bean Beetles, Callosobruchus maculatus. www.beanbeetle.org.

Blakeslee, A.M.H., Altman, I., Miller, A.W., Byers, J.E., Hamer, C.E. & Ruiz, G.M. (2012). Parasites and invasions: a biogeographic examination of parasites and hosts in native and introduced ranges. *Journal of Biogeography* 39, 609-622.

Brunel, S. (2009). Pathway analysis: aquatic plants imported in 10 EPPO countries. EPPO Bulletin 39, 201-213.

Buerki, S., Forest, F., Alvarez, N., Nylander, J.A.A., Arrigo, N., Sanmartín, I. (2011). An evaluation of new parsimonybased versus parametric inference methods in biogeography: a case study using the globally distributed plant family Sapindaceae. *J. Biogeogr.* 38 (3), 531-550.

Borer, M., Alvarez, N., Buerki, S., Margraf, N., Rahier, M. & Naisbit, R.E. (2010). The phylogeography of an alpine leaf beetle: divergence within *Oreina elongata* spans several ice ages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 703-709.

Carroll, S. P., Dingle, H, & Klassen, S.P. (1997). Genetic differentiation of fitness-associated traits among rapidly evolving populations of the soapberry bug. Evolution 51, 1182-1188.

Caswell, G.H. (1968). The storage of cowpeas in the northern states of Nigeria. *Proceedings of the Agricultural Society* of Nigeria 5, 4-6.

Chapuis, M.P., Lecoq, M., Michalakis, Y., Loiseau, A., Sword, G.A., Piry, S. & Estoup, A. (2008). Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular Ecology* 17, 3640–3653

Chikhi, L., Sousa, V., Luisi, P., Goossens, B., Beaumont, M.A., (2010) The confounding effects of population structure, genetic diversity and the sampling scheme on the detection and quantification of population size changes. *Genetics*, 186, 983-995.

Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10), 1657-1660.

Däumer, C., Greve, C., Hutterer, R., Misof B. and Haase M. (2012). Phylogeography of invasive land snail: natural range expansion versus anthropogenic dispersal in *Theba pisana pisana*. *Biological Invasions* 14, 1665-1682.

Drummond, A.J. Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.

Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J. & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biol. 4, e88. (doi:10.1371/journal.pbio. 0040088)

Espindola A., Buerki S., Alvarez N., 2012. Ecological and historical drivers of diversification in the fly genus *Chiastocheta* Pokorny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63, 466-474.

Excoffier, L. & Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource* 10, 564-567.

Fordyce, J. A. & Nice, C.C. (2003). Contemporary patterns in a historical context: phylogeographic history of the pipevine swallowtail, *Battus philenor* (Papilionidae). *Evolution* 57, 1089-1099.

Friedman, J. & Rowlands, M.J. (1977). Notes Toward an Epigenetic Model of Civilization. In The Evolution of Social Systems, edited by Jonathan Fried-man and Michael J. Rowlands, pp. 201-276. Duckworth,London.

Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics* 147, 915-925.

Gurevitch, J., Fox, G.A., Wardle, G.M., Inderjit. Taub, D. (2011). Emergent insights from the synthesis of conceptual frameworks for biological invasions. *Ecology Letters* 14, 407-418.

Hall, T. (2001). BioEdit version 5.0.6. Department of Microbiology, North Carolina State University

Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R., and Stoneking, M. (1993). The genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthropol.* 34: 483-496.

Heled, J. & Drummond, A.J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology* 8(1), 289.

Ho, S.Y.W. & Shapiro, B. (2011). Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources* 11, 423-434.

Hussner, A. (2012). Alien aquatic plant species in European countries. Weed Research 52, 297-306.

Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP version v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.

Lynch, M., Koskella, B. & Schaack, S. (2006). Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science* 311:1727-1733.

Mardulyn, P., Milinkovitch, M. C. & Pasteels, J. M. (1997). Phylogenetic analyses of DNA and allozyme data suggest that Gonioctena leaf beetles (Coleoptera; Chrysomelidae) experienced convergent evolution in their history of host-plant family shifts. *Syst. Biol.* 46:722-747.

Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D. & Lefeuvre, P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462-2463.

Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K. & Frati, F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* 14, 2729-2738.

Ng, N.Q. & Maréchal, R. (1985). Cowpea taxonomy, origin and germplasm. In: Singh S, Rachie K (eds) Cowpea research, production, and utilization. Wiley, Chichester, UK, pp 11-21.

Nylander, J.A.A. (2004). MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre: Uppsala University Uppsala, Sweden.

Padulosi, S. & Ng, N.Q. (1997). Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: Singh, B.B., Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN (eds) Advances in Cowpea Research. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS). Sayce, Devon, UK, pp 1-12.

Pannell, J.R. (2003). Coalescence in a metapopulation with recurrent local extinction and recolonization. *Evolution*, 57, 949-961.

Pimentel, D., Zuniga, R., & Morrison, D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52, 273-288.

Pons, J., Ribera, I., Bertranpetit, J. Balke, M. (2010). Nucleotide substitution rates for the full set of mitochondrial protein-coding genes in Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 796-807

Rambaut, A. & Drummond A.J. (2007). Tracer version 1.4. Available at http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer.

Ramos-Onsins, S.E, Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol.* 19, 2092-2100.

Ree, R.H. & Smith, S.A. (2008) Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. Systematic Biology, 57, 4-14.

Roche, D. G., Torchin, M. E., Leung, B. & Binning, S. A. (2009). Localized invasion of the North American Harris mud crab, *Rhithropanopeus harrisii*, in the Panama Canal: implications for eradication and spread. *Biological Invasions* 11, 983-993.

Rius, M., Pascual, M. Turon, X. (2008). Phylogeography of the widespread marine invader *Microcosmus squamiger* (Ascidiacea). *Diversity and Distributions* 14: 818-828

Rogers, A.R. & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic difference. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552-569.

Sax, D. F., Stachowicz, J.J. & Gaines, S.D. (2005). Species Invasions: Insights into Ecology, Evolution, and Biogeography. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. (2000). In: Genetics and Biometry Lab. Dept. of Anthropology, University of Geneva

Sezonlin, M., Dupas, S., Le Ru, B., Le Gall, P., Moyal, P., Calatayud, P.-A., Giffard, I., Faure, N. & Silvain, J.F. (2006). Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Molecular Ecology* 15, 407-420.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annal of the Entomological Society of America* 87, 651-702.

Singer, M., Thomas, C.D. & Parmesan, C. (1993). Rapid human induced evolution of insect diet. *Nature* 366, 681-683. Southgate, B.J. (1979). Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology* 24, 449-473.

Summerfield, R.J, Huxley, P.A, Steele, N.N. (1974). Cowpea (*Vigna unquiculata* (L) walp.) *Field Crop Abstr.* 27: 301-312.

Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G. & Cosson, J.F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Mol. Ecol. 7, 453-464.

Tajima, F. (1989). Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-599.

Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. (1997). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4690.

Tuda M., Chou, L-Y., Niyomdham, C., Buranapanichpan, S. & Tateishi, Y. (2005). Ecological factors associated with pest status in *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): high host specificity of non-pests to Cajaninae (Fabaceae). *Journal of Stored Products Research* 41, 31-45.

Tuda, M., Rönn, J., Buranapanichpan, S., Wasano, N. & Arnqvist, G. (2006). Evolutionary diversification of the bean beetle genus *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): traits associated with stored-product pest status. *Molecular Ecology* 15, 3541-3551.

Vaidya, G, Lohman, D.J. & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27, 171-180

Vogler, A. P. & Desalle, R. (1994). Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis. Mol. Biol. Evol.* 11:393-405.

# Figure legends

**Figure 1**. (A) Bayesian maximum credibility tree of the mitochondrial dataset of *C. maculatus* from the BEAST analysis. Bayesian posterior probabilities (> 0.5) are shown on nodes. (B) Spatial distribution of clades with pie-chart proportions corresponding to the frequency of clades in each population.

**Figure 2.** Reconstruction of ancestral biogeographic areas for *C. maculatus* based on the dispersal-extinctioncladogenesis (DEC) algorithm and displayed on the Bayesian maximum credibility tree. Proportions in pie-charts correspond to ancestral area(s) probabilities for each node, with colours indicating ancestral areas.

**Figure 3.** Sequence-pairwise mismatch distribution. The frequency distribution of mtDNA polymorphisms within *C. maculatus* was calculated with the concatenated dataset. X-axes are in number of differences and Y-axes are number of observed and simulated data. A: all populations. B: African populations. C: Asian+Oceanian populations.

**Figure 4.** Demographic history of all, African and Asian datasets using the extended Bayesian skyline plot (EBSP) method, which represents population size changes over time inferred from the mtDNA matrix. X-axes represent time in years ago and Y-axes are effective population size.

**Figure 6.** Results of the analyses of the bootstrapped datasets. A: "random, full" dataset. B: "random, Africa" dataset. C: "one sample per population, Africa" dataset. E: "one sample per population, Africa" dataset. E: "one sample per population, Asia" dataset. X-axes are time in years ago and Y-axes are effective population size.

Tables

**Table 1.** Total genetic diversity of *Callosobruchus maculatus* and genetic diversity within each of the three continent using the mtDNA (cytb/COI/COII) and ITS1 sequences. N, sample size; H, number of haplotypes; h, haplotype diversity;  $\pi$ , nucleotide diversity estimates.

		Mit	tochondrial DNA (	cytb/COI/COII)	Nuclear DNA (ITS1)					
Groups	N	Н	h	π	N	Н	h	π		
Total	102	64	0.98+/-0.006	0.0100+/-0.0003	102	28	0.90+/-0.016	0.0005+/-0.0001		
Africa	58	38	0.97+/-0.009	0.0102+/-0.0004	59	16	0.86+/-0.025	0.0010+/-0.0001		
America	13	5	0.81+/-0.066	0.0050+/-0.0007	12	9	0.94+/-0.058	0.0004+/-0.0002		
Asia+Oceania	31	22	0.96+/-0.020	0.0101+/-0.0006	31	12	0.89+/-0.033	0.0006+/-0.0003		

Table 2. Analyses of molecular variance (AMOVA) for mtDNA (cytb/COI/COII) and ITS1 loci of Callosobruchus maculatus. Results are shown for the whole data set.

	Source of variation	df	Variance (%)	Fixation indices	<i>P</i> -value
mtDNA	Among continents	2	12.7	Fct = 0.13	0.004
	Among population within groups	22	48.68	Fst = 0.61	< 0.0001
ITS1	Within populations	77	38.62	Fsc = 0.56	< 0.0001
	Among continents	2	-2.87	Fct = -0.03	0.61
	Among population within groups	22	49.03	Fst = 0.46	< 0.0001
	Within populations	77	53.83	Fsc = 0.48	< 0.0001

FsR2 SSD Rg D Group Total -1.53\* -21.99\* 0.05\*0.0022 0.0048 Africa -1.40\* -9.11\* 0.06 0.0063 0.0075-0.25 -2.93 0.11 0.0130 0.0345\* Asia

**Table 3.** Tajima's *D*, Fu' *Fs*, Ramons-Onsins and Rozas *R2*, sum of square deviation SSD and Raggedness indiex (Rg) for the studied groups of populations






Figure 2







Figure 4





#### Supplementary material

Code	Country	Location	Latitude	Longitude	Collected by
ATO	Algeria	Tizi-Ouzou	36°43' N	4°03' E	Abdellah Kellouche
Be	Benin		9°N	2° E	Goran Arnqvist
Bf	Burkina Faso	Tenkodogo	11°46'59" N	00°22'01" W	Antoine Sanon
Br	Brazil	Fortaleza	3°43' S	38°32' W	Carlos Peres and Katia Fernades
NgOy	Nigeria	Оуо	1°02' S	15°40' E	Goran Arnqvist
Ca	USA	California	36° N	119° W	Midori Tuda and Goran Arnqvist
Chi	China	Yunnan	25°02' N	102°43' E	Midori Tuda
IS	India	Tirunelveli	8°43' N	77°40' E	Goran Arnqvist and Chuck Fox
Jp	Japan	Okinawa	26°13' N	127°41' E	Midori Tuda
MaS	Mali	Sikasso	11°18'55" N	5°40'09" E	Laurent Granjon
Mad	Madagascar	Manjakandriana	18°55' S	47°49' E	Midori Tuda
Mal	Malaysia	Kota Kinabalu	5°38' N	116°07' E	Midori Tuda
Nze	New Zealand		38° S	175° E	Midori Tuda
Nep	Nepal	Kathmandu	27°42' N	85°19' E	Midori Tuda
NgOf	Nigeria		9° N	9° E	Goran Arnqvist
NiN	Niger	Lossa	13°56' N	1°34' E	Goran Arnqvist
NiL	Niger	Niamey	13°30'56" N	2°07'00'' E	Laurent Granjon
Om	Oman		23° N	58°E	Goran Arnqvist
SnC	Senegal	Coki	15°30'15" N	15°59'12" W	Khadim Kébé
SnF	Senegal	Fouta	16°30'42" N	15°30'42" W	Khadim Kébé
SnK	Senegal	Kebemer	15°22'26" N	16°26'27" W	Khadim Kébé
SnT	Senegal	Tambacounda	13°46'09" N	13°40'04" W	Khadim Kébé
SyL	Syria	Lattakia	35°31' N	35°48' E	Midori Tuda
TAs	Togo	Assigame	7°10'14'' N	00°41'30" E	Guillaume Ketoh
TDa	Togo	Dapaong	10°51'59" N	0°11'59" E	Guillaume Ketoh
TGb	Togo	Gbinga	10°31'59" N	0°31'59" E	Guillaume Ketoh
TLo	Togo	Lome	6°08' N	1°12' E	Goran Arnqvist
TMa	Togo	Mango	10°21'20" N	0°28'32" E	Guillaume Ketoh
TTs	Togo	Tsevie	6°25'11" N	1°12'39" E	Guillaume Ketoh
Tai	Taiwan	Tainan	23°01' N	120°15' E	Midori Tuda
Ug	Uganda	Uganda	1° N	32° E	Midori Tuda and Goran Arnqvist
Vie1, 2	Viet Nam	Thanh Hoa	19°48' N	105°46' E	Midori Tuda
Vie3	Viet Nam	Tam Ky	15°34' N	128°29' E	Midori Tuda
Ye	Yemen	-	15° N	48° E	Goran Arnqvist
Za	Zaire		4° S	21° E	Midori Tuda and Goran Arnqvist

Table S1. Sampling sites, geographical coordinates and abbreviations of Callosobruchus maculatus' populations.

#### Supplementary material

#### Figure S1: Bayesian maximum credibility tree of the ITS1 dataset of C. maculatus

**Figure S2**: Haplotype network of *Callosobruchus maculatus* based on the combined mtDNA loci. Circles on branches represent the number of mutation steps between haplotypes. Sizes of ellipses are proportional to the observed frequency of each haplotype and numbers in the ellipses correspond to the nine clades identified in Fig.2.

**Figure S3**: (A) Statistical Parsimony network of *Callosobruchus maculatus* based on the ITS1 sequences. Ellipses represent alleles whose areas are proportional to the number of individuals bearing these alleles. Sizes of ellipses are proportional to the observed frequency of each allele. (B) Spatial distribution of groups of alleles with pie-chart proportions corresponding to the frequency of groups in each population.



Figure S1

0.5



Figure S2





Annexe 16 : Article publié dans la revue Journal of Applied Biosciences



Journal of Applied Biosciences 41: 2788 - 2796

#### ISSN 1997-5902

# Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) field infestation by the bruchids (Coleoptera: Bruchidae) in the northern Senegal: preliminary biological and ecological data

# \*KEBE Khadim, SEMBENE Mbacké

Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et techniques, B.P. 5005, Dakar, Senegal \*Corresponding author e-mail: <u>khadim.kebe@ird.fr; bambasoda@yahoo.fr</u> Original submitted in 25<sup>th</sup> January 2010. Published online at <u>www.biosciences.elewa.org</u> on May 10, 2011.

# ABSTRACT

*Objective:* The objective of this study is to assess, firstly, the effects of distance between the maturing cowpea field and attics storage and secondly the degree of varietal resistance to bruchid infestation *Methodology and Results:* This study was carried out in the northern Senegal. Three cowpea varieties were used: the Mame Fama, the Baye Ngagne and the Ndiaga Aw. For each cowpea variety, two distances between cowpea fields and cowpea store were considered: one cowpea field situated closer and another one farther from cowpea store. Three cowpea samples were collected and then the level of infestation was calculated. The cowpea pods were preserved in the laboratory to identify the emerging species. Results showed that there was a significant effect of field distances to cowpea store on the eggs laid by weevils (P = 0.02). The number of eggs laid also varied with the cowpea variety. Insects preferred laying their eggs more on the Baye Ngagne cowpea variety than the others. But, the highest rate for emerging species is found on the Mame Fama cowpea variety. The main emerging species identified were *Bruchidius atroilineatus* (Pic) and *Callosobruchus maculatus* (F).

*Conclusion and application:* This preliminary study proved that the level of cowpea infestation in the field varied with the proximity of the field to store and cowpea varieties. The Ndiaga Aw cowpea variety was the most resistant one or the least preferred by weevils. Therefore, it is necessary to widely extend this study to more cowpea fields and more cowpea varieties in order to identify some cowpea varieties which will be more resistant to bruchids than others, and make them accessible for cultivators who face many problems for the conservation of their cowpea crops.

Key words: Cowpea, Senegal, bruchids, Bruchidius atrolineatus, Callosobruchus maculatus.

# INTRODUCTION

Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) is the most important food legume grown in the tropical Savanna zones of Africa. Although indigenous to southeastern Africa, cowpea has spread worldwide and is extensively cultivated and consumed in regions of Asia, South and Central America, the Caribbean, the United States, the Middle East and southern Europe. Cowpea is a preferred staple food in many regions of Africa. Its desirability reflects the fact that the leaves, immature pods, fresh seeds (southern peas or "green pods"), and dry grain can be eaten or marketed. Also, some varieties have a short cycle and mature early and thus are able to provide food during the "hungry period"—the period at the end of the wet season when food can become extremely scarce in semiarid regions of Sub-Saharan Africa. The dry grain is also commonly milled and consumed in

numerous traditional main dishes of Africa as porridge and breads, fed to young children as weaning foods, and eaten as processed snack foods. Cowpea grains, as well as the vegetative parts, make major nutritional contributions to diets. The mature grain contain 23-25% protein, 50-67% starch, B vitamins such as folic acid which is important in preventing birth defects, and essential micronutrients such as iron, calcium, and zinc. Although a significant amount of cowpea is commercialized, it plays a critical subsistence role in the diets of many households in Africa, Latin America and Asia, providing nutrients that are deficient in cereals. An added advantage of cowpea is that the plants can be harvested as fodder for livestock. In certain regions of West and Central Africa the fodder (haulms) is highly valued. During the height of the dry season stored cowpea fodder becomes an important feed for livestock (Cissé & Hall, 1998).

Cowpea (Vigna unguiculata (L) Walp) is the main edible leguminous plant which is cultivated all over the West of Africa (Mondedji et al., 2002). In Senegal, it is the second leguminous plant after groundnut. It is also part of the traditional system of cultivation. As a basic and appreciated food, it is also the cheapest food which provides proteins to most of the rural people (Ndoutoume-Ndong & Rojas-Rousse, 2007). In fact, the cowpea seeds contain most of the amino acids necessary for human feeding, except the sulphured amino acids (Smart, 1964). Thus, its cultivation is considerably interesting, especially in areas located in the North and North-Center of Senegal where it is sometimes considered as the main food supplier for people. Besides its importance for human feeding, cowpea can be the favourite food for cattle because of the virtue of its leaves.

However, the main problem that farmers face is the conservation of the cowpea crops because 80 to 100 % of grains are destroyed by two bruchid species namely *Bruchidius atrolineatus* (Pic) and *Callosobruchus maculatus* (Fab), in a period of 2 to 3 months after storage (Ndoutoume-Ndong & Rojas-Rousse, 2008). Cowpea storage bruchid) eats cowpea grain making distinctive round holes. The infestation of cowpea pods by these insects begins in the fields when the cowpea plant starts producing pods. The eggs are laid on the cowpea pods and then hatch within 5 to 7 days for both species in the best conditions (Djossou, 2006); Damage is apparent about 2 to 3 months after harvest and virtually all of the grain may have holes by 6 months.

After the hatching, the new larva which has not yet got legs to walk, drills the outer side of the cowpea pod peel or of the seed skin and gets inside (Lenting, 2000). The larval development duration varies with the conditions in which the development occurs. The development passes through four larval phases and one nymphal phase (Nammour, 1985). The average total development period is 28 days in the Sahelian area (Doumma, 1998).

Unlike the cowpea seed where the larva can directly have access to the nutritious provisions with more possibilities to survive, in the case of the cowpea pods the young larva may be lost in the empty space (the space between the cowpea seeds) or during its atrophic transit, and arrives at a small seed (with little nutritional reserve) which will not enable it to reach the final phase of development. In the latter case, the death of the larva is inevitable.

In cowpea, it is difficult to see the symptoms indicating the presence of the insect. In general, they are always undetectable. But after the harvest, it is obviously easier to distinguish the seeds of cowpea which is infested with those intact, particularly when the infestation is relatively old.

In fact, the cowpeas seem to be wholesome at the beginning of the larval evolution. Then, after some times, they have small and perfectly round-shaped spots with colours that vary according to the tint of the cowpea seeds. The appearance of these spots are due to the fact that one part of the cowpea seed is eaten by the larva, and what has left is only an operculum which will be smashed later by the weevil in order to get out. Several months after the infestation starts, some identifications such as perforated cowpea seeds, adult insects and cowpea seeds in which the larvae continue their evolution, are made.

In the aim at reducing the losses caused by the weevils, many control strategies were considered; Consumers have a strong aversion to grain that has been damaged by weevils, but it still can be effective as seed, although, germination percentage may have been reduced.. Among the strategies, there is the use of cowpea varieties which are resistant to weevils' attack. However, a few researches are made to show the relation between the levels of infestation on cowpea in the

#### MATERIALS AND METHODS

**Study area:** The present study was conducted in the northern Senegal located between the longitudes 14° 15' and 17° 15' west and the latitudes 13° 60' and 16° 15' north, where cultivation of groundnut dominates. The rainy season generally starts from June up to October with yearly rainfalls averaged 200 to 900 mm. Its largest territory is part of the Sahelo-soudanese area which extends across Senegal from West to East. In this area, the rainy season also called "wintering", starts from June-July up to October according to the latitudes, with yearly rainfalls averaged 200 to 900 mm from North to South. This study was conducted in the Northern part of this area.

**Cowpea varieties:** In the main cowpea production zone in the northern and center-north areas, the following varieties have been recommended during the 1980's and 1990's: 58-57, Ndiambour, Mougne, Bambey 21, CB5, Mouride and Melakh. Each of these varieties has specific characteristics that make them useful in specific areas of the main production zone and specific environmental conditions.

Cowpea improvement started in the early 1960's, with the identification of adapted and high performing landraces such as the small-seeded 58-57. The variety Baye Ngane was bred using 58-57 and a parent that has larger grain size than Ndiaga Aw, It has a 100-seed weight of 16g compared with 12g for 58-57 (Sene and N'diaye 1974). Baye Ngane also is spreading and matures about 75 days after planting under optimal conditions. Baye Ngane and Ndiaga Aw have some drought resistance and wide adaptation, and they have been recommended for cultivation in the northern and center-north areas. The landrace Mame Fama with a lower potential yield of both hay and grain maintained itself in the northern zone because it reaches maturity 5 days earlier and probably is more reliable than 58-57 when the growing season is very short. The varieties Ndiaga Aw and Baye Ngane are resistant to bacterial

field in proportion to the places where the cowpeas are stored and the cultivated cowpea varieties.

The objective of this study is to evaluate the level of cowpea infestation by weevils in the field in proportion to the places where the cowpea is stored and also to the kind of cowpea variety. The rate of emergence of insects is also studied for the varieties.

blight, but are susceptible to cowpea aphid-borne mosaic virus, the parasitic weed striga and several insect pests including: hairy caterpillar, cowpea aphids, flower thrips and bruchids.

**Three cowpea varieties were selected:** the Mame Fama cowpea variety, the Ndiaga Aw cowpea variety and the Baye Ngagne cowpea variety. Both the Mame Fama cowpea pods and the Baye Ngagne cowpea pods have almost the same length whereas those of the Ndiaga Aw are shorter (See table 1).

Cowpea fields: Six cowpea fields, cultivated by farmers from different villages, were regularly examined from sowing to harvest. For each cowpea variety, two fields are selected according to their proximities or not from the places where the cowpeas are stored. Two signs are used to distinguish the different distances. The minus sign (-) indicates that the cowpea field of the variety is closer (less than 500 m) to a place where the cowpeas are stored and the plus sign (+) indicates that the cowpea field of the same variety is farther ( more than 500 m) from any places where the cowpeas are stored (See tab.2).

Samples and data analysis: The cowpea seeds were sown by the farmers between the late of June and the early of July 2009 under the same standard cultural practices. At the end of August when the first cowpea pods appeared three cowpea samples were collected with 15 days intervals. The first cowpea sample was collected on 1st September, the second on 15th September and the third on 30th September, 2009, For each cowpea sample, 50 cowpea pods were collected at random from each cowpea field. The initial level of cowpea pods infestation was determined by counting the number of eggs laid on the cowpea pods and also through the number of holes from where adult insects emerge. Afterwards, the cowpea pods were conserved at the laboratory in ventilated scientific jars under the ambient temperature and examined every day for

weevil emergence. Adult weevils were identified using Delobel & Tran (1993).

For each cowpea sample, the initial level of infestation on cowpea pods in the field proportionally to the position of the places where the cowpeas are stored and to the kinds of cowpea variety were determinate. Additionally, the rates for emerging adult insects and the number of each identified species were also calculated for each cowpea sample. The initial level of infestation for each sample corresponds to the number of eggs laid by the weevils.

If X is the number of eggs laid and Y the number of emerging adult insects, the algebraic expression for the rate of emergence (Re) is: Re = (Y / X)\*100

If Z is a kind of identified species, the algebraic expression for the whole number of species in Z is: (number of species for Z/Y)\*100.

**Statistical analyses:** All the collected data were analysed through R (version 2.12.0). Those which are not correctly distributed were transformed by using the following function: X^0.5. After variance analysis, Fisher's experiment was chosen to separate the averages from the level of 5%.

Table 1: The a	average length	of cowpea po	ods for the	different	cowpea varieties
----------------	----------------	--------------	-------------	-----------	------------------

Cowpea Varieties	Average length of the cowpea pods (cm)		
Mame Fama	17.77		
Ndiaga Aw	14.2		
Baye Ngagne	18,2		

Cowpea varieties	Cowpea fields		Closer villages	Distances (m)	
Mame Fama(vb)	P1	vb (-)	Mérina	200	
	P2	vb (+)	Kandala Mbengue	1100	
Nidiago Aur (ur)	P3	vr (-)	Mérina	130	
Tulaya Aw (VI)	P4	vr (+)	Gade Kébé	1200	
Bave Nagano(ut)	P5	vt (-)	Gadafé	150	
	P6	vt (+)	Gade Kébé	1200	

Table 2: The different cowpea fields and their distances to the closest villages

#### RESULTS

Eggs laid by weevils in the cowpea field as affected by field-store distance: The sharing out of eggs laid by bruchids, has significantly varied in proportion to the groups of cowpea fields (P = 0.02). The number of eggs laid by weevils on the group of cowpea fields termed as 'closer cowpea fields' is the double of the number of eggs laid on the group of cowpea fields termed as 'farther cowpea fields' (fig.1).

Effect of different cowpea varieties on the egg laid and on the adult emergence rates: Among the cowpea fields, insects prefer laying more eggs on the Baye Ngane cowpea variety and after on the Mame Fama cowpea variety. But, with the Ndiaga Aw cowpea variety, the insects lay few eggs on it in the cowpea field (fig. 2). Statistically, the differences in terms of the number of eggs laid between the Mame Fama cowpea and the Ndiaga Aw cowpea and on the other side between the Mame Fama cowpea and the Baye Ngagne cowpea are not significant (P > 0.05). But, between the Ndiaga Aw cowpea variety and the Baye Ngagne cowpea variety, the number of eggs laid on them by weevils is significantly different (P = 0.017).

The whole numbers of adult weevils emerging from cowpea pods were small for all of the three cowpea varieties but with significant differences on the rates for emerging adults. Though the number of eggs laid on the cowpea fields is larger with the Baye Ngagne cowpea variety, the rates for emerging adults is more important with the Mame Fama cowpea variety. Yet, the difference is not significant (P > 0.05). With the Ndiaga Aw cowpea variety, this rate is very few and its difference with those obtained from the other cowpea varieties is very significant (between the Mame Fama cowpea variety and the Ndiaga Aw cowpea variety, P = 0.003 and on the other side between Ndiaga Aw and Baye Ngagne, P = 0.005).



Figure 1: The number of eggs laid in the fields in proportion to the position of the places where the cowpeas are stored





**The identified species of weevils:** The emerging weevils from cowpea pods that were conserved at the laboratory are divided into two species: Bruchidius atrolineatus (Pic) and the *Callosobruchus maculatus* (F). The most important numbers of emerging B. atrolineatus species are obtained from the cowpea samples collected from the cowpea fields which are closer to the places where the cowpeas are stored. This difference in terms of the emerging adults between the two groups of cowpea fields is significant (P=0.01). With the *C. maculatus* species, though in terms of absolute magnitude the rate for emerging species is slightly superior with the cowpea samples collected

from cowpea fields which are closer to the places where the cowpeas are stored, this difference is statistically not significant between the two groups (P>0.05) (fig.3). It is found that the whole numbers for each species vary in proportion to the periods when the cowpea samples are collected. The most important number of emerging *B. atrolineatus* species is obtained from the cowpea samples collected on 1st September, 2009. But, with *C. maculatus*, the most important number of emerging species is obtained from the cowpea samples collected on 30th September, 2009 (figure 2).



Figure 3: The sharing out of the *B. atrolineatus* adults and the *C. maculatus* adults in the two groups of the cowpea fields

# DISCUSSION

From the field up to the places where it is stored, the cowpea is threatened by various insects. If some of them are in the cowpea fields, the damages they cause are only limited in the fields and the first signs are visible there. These signs are warnings for cultivators to take some measures in order to control them. The recurring problem, of which the cultivators have to fight every time, is the weevils' attack on the crops that are already stored, especially on the stored cowpea crops. Even if this infestation is only visible after the cowpea harvest it starts in the cowpea fields when the cowpea plants start its fruition (Doumma et al., 2006). The question that needs to be asked is: Does relation exist between eggs laid on the cowpea pods and the position of the cowpea fields from the places where the cowpeas are stored? During this study, it was noticed that the cowpea fields located far from villages were more numerous, and in those cowpea fields the availability of resources usable by weevils was more substantial. Normally, in those cowpea fields, the infestation on cowpea pods should have been more important. The results that are found proves the contrary, since from the two groups of cowpea fields that are termed as ('farther cowpea fields' and 'closer cowpea fields'), it is noticed that there is a significant

difference in terms of the number of eggs laid by weevils either on the farther cowpea fields or on the closer cowpea fields. The cowpea fields which are located near the places where the cowpeas are stored. have the most infested cowpea pods. This may be due to the fact that most of the weevils which are responsible for the infestation of cowpea in the closer field come from the places where the cowpeas are stored. This effect of the distance on the infestations of cowpea pods by weevils may be due to the fact that the female egg-layers have a weak flight ability and cannot also live for a long time, only a few of them can fly to reach the farther cowpea fields. In the same way, Nansen et al. (2005) have found that field borders have an effect on the infestations on wheat fields by Cephus cinctus. In this case, the infestations are more important on the wheat located closer to the borders and less important on those situated centre-wards. Likewise, while Seck (1991) was studying the initial infestation for millet fields by Sitotroga cerealella (Oliv), he found that the millet fields which were closer to huts were more infested than those which were far away from the huts. These discoveries are different from the one done by Ganasalingham & Krishnarajah (1979) on rice fields. In that case, the distance from rice fields to

Kebe and Sembene. J. Appl. Biosci. 2011.

Cowpea field infestation by bruchids: Biological and ecological data

places where houses are located had no impact on the initial infestation on S. cerealella. Nevertheless, the hypothesis which states that some of the weevils which infest the cowpea in the fields come from others wild plants that host them should not be neglected.

From the three cowpea varieties used for study, all of them were infested. However, it is noticed that weevils prefer to lay more eggs on the Mame Fama cowpea pods and the Baye Ngagne cowpea pods than on the Ndiaga Aw variety where they lay few eggs. So, the level of infestation on cowpea pods depends on the cowpea variety. According to Doumma et al. (2006), data collected from both the egg-laying process on cowpea fields and the process of emerging weevils from the cowpeas, have enabled them to identify some cowpea varieties which have shown some resistance both in the cowpea fields and during the period of storage, with a very low level of contamination contrary to the other cowpea varieties which are the most infested. The difference in terms of infestation between the cowpea varieties may be explained either by the length of some cowpea pods which are longer with the Mame Fama and Baye Ngagne varieties and consequently provide the most important quantity of resources for the larval development, or by the fact that the Ndiaga Aw cowpea pods contain substances less preferred by the female egg-layers. Among the three cowpea varieties studied, the Ndiaga Aw cowpea variety is the most resistant one or otherwise the least preferred by weevils for the laying of their eggs. This is why it is the most cultivated cowpea variety in all over the visited villages.

If the number of eggs laid on the cowpea pods in the field is more numerous with the Baye Ngagne cowpea variety, the rate for emerging species is on the other side more important with the Mame Fama cowpea variety. But, with the Ndiaga Aw cowpea variety, this rate is very few compared to those of the other cowpea varieties. This difference in terms of the number of emerging species may prove the reason why the weevils lay their eggs more on the Baye Ngagne cowpea and the Mame Fama cowpea varieties. Like any living creature, these weevils prefer laying their eggs on egg substrata in which a high rate of survival will be ensured for their descendants. Thus, concerning the Ndiaga Aw cowpea variety, it is guite clear that the weevils have a limited activity. This cowpea variety seems to have cowpea pods and/or cowpea seeds of which the integument does not seem to form an egg substratum favourable to weevils as the same as those of the Mame Fama cowpea and the Baye Ngagne

cowpea varieties. Kogan & Ortman (1978) consider this kind of resistance as an antixenosis resistance which is proved by Cuthbert & Davis (1972) on the Chinese cowpea. According to Pathak & Saxena (1976), the fastest and most effective way to fight against devastators and infestations is the resistance by variety.

The regular examination of cowpea pod samples collected from the different visited localities has enabled us to identify two kinds of Bruchidae species named as: the Bruchidius atrolineatus species (Pic) and the Callosobruchus maculatus (F) species. This identification is in phase with the one done by Doumma et al., (2006). According to them these two species of Bruchidae Beetles grow up to the detriment of the cowpea pods and seeds (Vigna unguiculata) in the Sahelian area. In addition to these two species. Amevoin et al., (2006) have identified a third kind of species named as the Callosobruchus rhodesianus species (Pic) from samples of cowpea seeds collected in the Guinean area in Togo.

The significant difference in terms of the number of emerging adults for the B. atrolineatus species according to the cowpea fields shows that the flock of this species lay their eggs on the first available cowpea pods. Contrary to that, with the flock of C. maculatus the number of emerging adults is statistically not significant though in terms of absolute magnitude it is superior in the cowpea fields located near the places where the cowpeas are stored. It is also noticed that with B. atrolineatus the most important infestations were obtained from the cowpea samples collected on 1st September contrary to what happened with the C. maculatus of which the most important infestations were obtained from the cowpea samples collected on 30th September. Therefore, it can be said that C. maculatus choose to lay only a few eggs on the first formed cowpea pods contrary to the B. atrolineatus which lay massively their eggs as soon as the resource is available. For Alzouma (1986, 1987), the B. atrolineatus female egg-layers are opportunistic species which lay their eggs on the most abundant stages of cowpea pods evolution in the fields whereas the C. maculatus female egg-layers seem to choose the place where they lay 60 % of their eggs on the yellowing cowpea pods. This is in phase with the identifications that are made, because the most important number of emerging adults for the C. maculatus species is obtained from the cowpea pods of the third sample where 100 % of them were dried. In Senegal, the flock of C. maculatus species are the main

Kebe and Sembene. J. Appl. Biosci. 2011.

responsible for damages made on the stored cowpea. This is understood since the first formed cowpea pods where the flock of B. atrolineatus species dominate, are supposed to be used for immediate consumption. On the other hand, most of the dried cowpea pods coinciding with the harvest period and where the flock of C. maculatus species dominate, are supposed to be stored. This may also be explained by the fact that the B. atrolineatus adults stay only for a few weeks in the stored cowpeas and then disappear. Amevoin et al. (2006) have demonstrated that in Togo if the three

#### CONCLUSION

From this study, it is proved that there is a relation between the infestation on cowpea in the field and the position of the places where the cowpeas are stored. The most important infestations occur in the fields which are closer to the places where the cowpeas are stored. It is also shown that, among the three cowpea varieties used for study, the Ndiaga Aw cowpea variety which is the most cultivated one is the least fragile to weevils. This study should be widely extended to other

ACKNOWLEDGEMENTS: This work is financially supported by IRD-DSF and the Observatoire Homme-

## REFERENCES

- Azouma I, 1987. Reproduction et développement de Bruchidius atrolineatus Pic. (Coleoptera: Bruchidae) aux dépens des cultures de Vigna unguiculata L. Walp (Leguminosae : Papilionaceae) dans un agrosystème sahélien au Niger. Thèse de Doctorat d'Etat, Univ. François-Rabelais, Tours France, 162p.
- Alzouma I, 1986. Les bruches de niébé (V. unquiculata (L) Walp en zone sahélienne, au Niger: perspective pour un développement de stratégies de lutte contre les ravageurs. Ann Univ Niamey 3: 55-73.
- Amevoin K, Glitho, IA, Nuto, Y, Monge JP, 2006. Dynamique des populations naturelles de bruches et de leurs parasitoïdes nympholarvophages en situation expérimentale de stockage du niébé en zone guinéenne. Tropicultura 24 (1): 45-50.
- Cuthbert FP. and Davis BW, 1972. Factors contributing to cowpea curculio resistance in Southern peas. J Econ Ent 65: 778-781.
- Delobel A, Tran M, 1993. Les coléoptères des denrées alimentaires entreposés dans les régions chaudes, édition ORSTOM-CTA Paris, 424 p.

species of Bruchidae are put together with the stored cowpea, only the flock of C. maculatus species stay there for the 6 or 8 months of the storage, the other species such as C. rhodesianus and B. atrolineatus disappear around 2 to 3 months after the cowpea are stored in the cowpea garret. These identifications are different from those made by Doumma et al. (2006). According to them, the conditions in which the cowpeas are stored in Niger, seems to reveal that the most important damages are caused by the B. atrolineatus species.

cowpea fields and also to a bigger number of cowpea varieties in order to confirm the relation that exists between the level of infestation on cowpea pods and the position of the places where the cowpeas are stored, and also to identify some cowpea varieties which are more resistant to weevils than others and make them accessible for cultivators who face many problems to conserve their cowpea crops.

Milieu (OHM-Tessékéré). The authors thank Talla Kebe for his proofreading of this article.

- Djossou J, 2006. Etude des possibilités d'utilisations des formulations à base de fruits secs de Xylopia aethiopica Dunal (Annonaceae) pour la protection des stocks de niébé contre Callosobruchus maculatus Fabricius (Coleoptera : Bruchidae). Mémoire, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux Belgigue.
- Doumma A, 1998. Contribution à la recherche de méthodes de lutte contre B. atrolineatus P. et C. maculatus F. (Coleoptera-Bruchidae), ravageurs du niébé (V. unguiculata (L.) Walp) (Leguminosae-Papilionacea), en zone sahélienne. Thèse de doctorat 3e cycle, Université A.M. de Niamey, 136 pages.
- Doumma A, Liman Al, Toudou A, Alzouma I, 2006. Comportement de vingt variétés de niébé (Vigna unguiculata (L.) Walp) vis-à-vis de Bruchidius atrolineatus (Pic) et Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera : Bruchidae). Cahiers Agricultures 15 (2): 187-193
- Cissé, N., Hall, A.E. 1998. Traditional cowpea in Senegal. Crop Science 39: 3782

- Ganesalingham VK. and Krishnarajah S R, 1979.Infestation of Sitotroga cerealclla (Olivier) under field conditions and storages in Northem Sri Lanka. Ceylan J. Sci. (Bio Sci.) 13: 1-2.
- Kogan M. and Ortman EF, 1978. Antixenosis a new term proposed to define Painter's 'non preference' modality of resistance. Bull Entomol Soc 24: 175-6.
- Lenting MI, 2000. Preferences and performances of Callosobruchus maculatus F. (Coleoptera: Bruchidae) on pods of various plant species towards naturals vegetation manipulation on cowpea production in Benin. Thesis of Msc n°003. Univ. Wageningen, 31p.
- Mondedji D, Amevoin K, Nuto Y, Glitho IA, 2002. Potentiel reproducteur de D. basalis Rond. (Hymenoptera: Pteromalidae) en présence de son hôte Callosobruchus maculatus F. (Coleoptera: Bruchidae) en zone guinéenne. Insect Science and its Application 22: 113– 121.
- Nammour D, 1985. Analyse du développement de B. atrolineatus dans différences conditions thermiques et photopériodiques, conséquences sur le métabolisme et l'activité reproductrice. DEA, université de Tours, 1985.
- Nansen C, Weaver DK, Sing SE, Runyon JB, Morrill WL, Grieshop MJ, 2005. Within-field

spatial distribution of Cephus cinctus (Hymenoptera: Cephidae) larvae in Montana wheat fields. Canadian entomologist 137 (2): 202-214.

- Ndoutoume A. and Rojas-Rousse D, 2007. Y a-t-il élimination d'Eupelmus orientalis Craw par Eupelmus vuilleti Craw (Hymenoptera: Eupelmidae) des systèmes de stockage du niébé (Vigna unguiculata Walp) ? Annales de la Société Entomologique de France 43 (2):139-144
- Ndoutoume-Ndong A. and Rojas-Rousse D, 2008. Rôle de l'intensité lumineuse sur les capacités parasitaires d'Epelmus orientalis Crawford et d'Epelmus vuilleti Crawford, parasitoïdes de Bruchidae ravageurs de graines de niébé (Vigna unguculata Walp.). Biotechnol. Agrom. Soc. Environ 12(1): 3-8.
- Pathak MD. and Saxena RC, 1976. Insect resistance in crop plants. Current Adv Sci 27: 1233- 1252.
- Seck D, 1991. Etude de l'infestation initiale de Sitotroga cerealella Oliv. (Lepidoptera, Gelechiidae) en fonction de la localisation des champs de mil Pennisetum typhoides L (Leeke). Insect Sci Applic 12: 507-509.
- Smart J, 1964. Pulses in human nutrition, p 96-104 in: Tropical pulses. Longman, London