

**IDENTIFICATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES  
LIES AUX GENES DE RESISTANCE AU STRIGA CHEZ  
LE NIEBE [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**

## **DEDICACES**

Je dédie ce travail à mes deux parents BIBATA HAMIDOU et ARDALI ABDOU. À ma confidente, ma grande sœur, Mariama Abdou Ardali pour son soutien moral tout au long de cette formation.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biologie moléculaire du **Centre d'étude régional pour l'amélioration et l'adaptation à la sécheresse(CERAAS)** sous la cotutelle des docteurs **Ndiaga Cissé, Daniel Fonceka et du Pr Diaga Diouf**.

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout-puissant, l'unique, le miséricordieux, de m'avoir donné la foi et le courage de surmonter mes peurs et surtout mes faiblesses.

Je tiens à réitérer mes remerciements au gouvernement allemand pour m'avoir donné cette opportunité à travers la bourse de mobilité et d'échange **DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst)**, de poursuivre mes études.

Je remercie la Faculté des sciences de **l'Université Cheikh Anta Diop (UCAD)**, à travers le chef de département de Biologie végétale, le **Dr Djibril Sané**, pour m'avoir permis de m'inscrire.

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le **Dr Ndiaga Cissé**, pour son soutien scientifique indéfectible apporté dans la réalisation de ce travail. Je vous dis merci pour m'avoir donné cette chance unique de mieux comprendre cette plante à travers votre disponibilité.

Je tiens à remercier le **Pr Ibrahima Ndoye** pour ses nombreux conseils, sa patience et ses encouragements quand tout n'allait pas bien, vos conseils m'ont grandement aidé à avancer malgré les difficultés.

Je remercie mon co-directeur, le **Dr Daniel Fonceka**, pour son soutien scientifique strict et rigoureux, son dynamisme et sa disponibilité.

Je tiens à remercier mon enseignant, mon co-directeur de l'UCAD, le **Pr Diaga Diouf** pour sa disponibilité constante, ses remarques, ses conseils, sa rigueur et surtout pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier le **Dr Marie Madeleine SPENCER** Maître de Conférences à l'UCAD pour avoir accepté de présider ce jury.

Je voudrais aussi remercier les membres du jury le **Dr Adeline BARNAUD** chargé de recherche IRD et le **Dr François Abaye BDIANE** assistant à la FASTEF, UCAD pour leurs disponibilités et surtout pour avoir accepté de siéger dans ce jury.

Mes remerciements s'adressent également à ma sœur, ma collègue, **Sassoum Lo** et mon **Papa Mbaye Ndoye Sall** pour m'avoir enseignés les fondements de la biologie moléculaire au **CERAAS**.

Mes remerciements vont à l'encontre de mes deux mamans du **CERAAS Mariama Senghor** et **Thérèse Faye** pour leurs soutiens.

Je remercie également **Halimé Mahamat** pour ses conseils et surtout sa disponibilité permanente.

Mes remerciements vont à l'égard de mes deux grands frères du **CERAAS** le **Dr Belko Nouhoun** et le **Dr Bassiaka Wattara** pour leurs conseils et leurs soutiens indéfectibles.

Mes remerciements s'orientent également vers le **Dr Codou** et le **Dr Cheick Thiaw** pour tous les conseils prodigués et leurs disponibilités. **Dr Cheick Thiaw** vous m'avez accueilli dans votre famille comme un frère je n'oublierai jamais, du fond du cœur 'Jeureujef'.

Je remercie du fond du cœur tout le personnel administratif et scientifique du **CERAAS** (**Tonton Cissé, Ma maman du service comptabilité, Marie, Aziz, Sendene, Faye, Jack, Ali ka, Malick, Jean Michel, Maha, Ibrahim, Mass, Harouna, Hassane, Badji, Ousmane, Tamsirou Ly, mon Papa le jardinier**).

Je remercie également tous mes collègues du master 2 BIOVEM de l'UCAD (**Adama, Amala, Alfonse, Fatou, Marie, Gano, Cheick Omar, Tossim, Marie, Mame Ndella, Jacques, Sonko**) que j'ai côtoyé durant mes 17 mois passés ici au Sénégal.

Je tiens à remercier particulièrement mes deux amis du **CERAAS Khady Diop et Cheikhou Dramé**.

Je tiens à remercier **Abdel Ali** mon compatriote, mon frère, pour son patriotisme et sa disponibilité constante.

Je ne pourrai oublier mes amis, particulièrement, **Aida, Elize, Romuel, Mohamed, Marie Conté, Rose, Maguette, Bintou Diouf, Sosso, mes nouvelles boursières DAAD Aichatou, Haoua, Marie Thérèse, Steve Dassou** qui m'ont soutenu durant mon séjour.

Je remercie mes promotionnaires **DAAD, Kyky Komlan, Dossa Komivi et Joël Romaric** pour tous ces moments passés ensemble.

Je remercie également mon aîné, mon grand frère, le pasteur, le modélisateur, l'ambassadeur de la Côte d'Ivoire Mr **Paul Martial**, mon **doyen Papa Pharel (Roger)**, ainsi que les **Dr k. Kane et Dr B. Ami**.

Je remercie fraternellement le **Dr Bassirou Sine** pour m'avoir accueilli dans le laboratoire d'agronomie.

Merci aussi à tous ceux que je n'aurais pas cités et qui m'ont directement ou indirectement aidé à réaliser ce travail.

Enfin, je tiens aussi à remercier les membres de ma famille, qui m'ont soutenu de multiples façons tout au long de mes études.

**TITRE** : Identification de marqueurs moléculaires liés aux gènes de résistance au Striga chez le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

**Prénom et Nom** : Ousseini Ardaly Abdou

**Nature du mémoire** : Master en Biotechnologies Végétales et Microbiennes

**Présenté et soutenu le** : 17 Mai 2014

**Jury**

<b>Président :</b>	Mme Marie Madeleine	SPENCER	Maître de Conférences	UCAD
<b>Membres</b>	Mme. Adeline	BARNAUD	Chargé de Recherche	IRD
	M. François Abaye	BADIANE	Assistant	FASTEF/ UCAD
	M. Daniel	FONCEKA	Chargé de Recherche	CERAAS/ CIRAD
	M. Diaga	DIOUF	Professeur Titulaire	UCAD

**RESUME**

Légumineuse très riche en protéines cultivée dans plusieurs pays d’Afrique de l’Ouest, le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) est confronté à de nombreux stress biotiques et abiotiques qui ont des effets dépressifs sur sa production. Un des principaux facteurs limitant la production est la plante parasite *Striga gesnorioides* qui provoque des pertes de rendements assez considérables pouvant atteindre 80 à 100%. Ce présent travail porte sur l’identification de marqueurs liés aux gènes de résistance au Striga. Il a été réalisé sur une population BC<sub>1</sub>F<sub>6</sub> issue du croisement entre une variété sensible (Melakh) et une variété résistante (IT97K 499-39) avec des marqueurs microsatellites (SSR) et des Single Nucléotide Polymorphism (SNP) convertis en marqueurs utilisables en PCR de manière spécifique. Au total, le polymorphisme de 12 marqueurs SNP, un ALFP reconverti C42-2B ainsi que ceux de 89 marqueurs SSR ont été testé sur 12 variétés élites du programme de sélection de l’ISRA. À partir du criblage que nous avons réalisé, 9 marqueurs polymorphes ont été identifiés. Parmi ces derniers seul 4 marqueurs discriminent les 2 parents. Il s’agit de VM57, VM70, VM75 et C42-2B. L’étude de l’association phénotype /génotype a montré que les marqueurs VM57, VM70 et VM 75 étaient indépendant ou très éloignés du locus impliqué dans la résistance avec des rapports( $\theta$ ) de 0.47, 0.42, et 0.40 respectivement. Par contre le marqueur C42-2B est lié au gène de résistance au Striga avec un rapport  $\theta = 0.15$ . Ce marqueur pourrait être utilisé pour suivre la résistance au Striga dans un programme de sélection assistée par marqueur.

**Mots clés**: Niébé (*Vigna unguiculata*), *Striga gesnorioides*, SSR, SNP, marqueurs moléculaires polymorphes

## ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is a leguminous crop rich in protein which is cultivated in many countries in West Africa but its production is constrained by a wide range of biotic and abiotic stresses. A major constraint limiting production is the parasitic weed *Striga gesnorioides* which causes considerable yield losses ranging from 80 to 100%. The present work focused on the identification of markers associated with striga resistance gene. For these purposes, a BC<sub>1</sub>F<sub>6</sub> population derived from a cross between the susceptible variety (Melakh) and the resistant (IT97K 499-39) was genotyped with SSR markers and SNP markers converted into PCR specific markers. A total of 12 SNP, one converted ALFP C42-2B and 89 SSR markers were checked for polymorphism on 12 varieties from the ISRA's breeding program, leading to the identification of 9 polymorphic markers. Among these markers only VM57, VM70, VM75 and C42-2B were polymorphic between the parents. Marker/genotype associations showed that VM57, VM 75 and VM70 were independent or very far from the *Striga* resistance gene with recombination fractions ranging from 42%, 47% and 40%. In contrast the markers C42-2B was linked to the gene with a recombination  $\theta = 0.15$ . C42-2B is valuable marker that can be used in a marker assisted selection program for introgressing the striga resistance gene in susceptible lines.

**Key words:** Cowpea (*Vigna unguiculata*), *Striga gesnorioides*, SSR, SNP, DNA Polymorphic marker

## ABREVIATIONS

<b>ADN:</b>	acide désoxyribonucléique
<b>AFLP :</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>APS:</b>	Ammonium per sulfate
<b>BET:</b>	bromure d'éthidium
<b>BSA:</b>	Bulk Segregant Analysis
<b>CERAAS :</b>	Centre d'études régionales pour l'amélioration et l'adaptation des plantes à la sécheresse
<b>CNRA:</b>	Centre National de Recherche Agronomique
<b>CIAA :</b>	Chloroforme Isoamyl alcool
<b>dNTP:</b>	desoxynucleotide triphosphate
<b>DNAZOL :</b>	Genomic ADN isolation
<b>GL :</b>	groupe de liaison
<b>IITA:</b>	International Institute of Tropical Agriculture
<b>MATAB:</b>	Mixed Alkyl Trimethyl ammonium Bromide
<b>MDA :</b>	Ministère du Développement Agricole du Niger
<b>MGCL2:</b>	Dichlorure de magnésium
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>ng :</b>	Nano gramme
<b>pb :</b>	Paire de base
<b>PCR :</b>	Polymérase Chain Reaction
<b>QTL :</b>	Quantitative trait locus (Caractère a effet Quantitatif)
<b>RAPD:</b>	Random Amplified Polymorphic DNA,
<b>RFLP :</b>	Restriction Fragment Length polymorphisme,
<b>RIL :</b>	Ligné recombinante
<b>SSR :</b>	Simple Sequence Repeat
<b>SNP :</b>	Single Nucléotide Polymorphism
<b>TAQ:</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TBE:</b>	Tris, borate, EDTA
<b>TEMED:</b>	N, N, N', N'-tétraméthyléthylenediamine
<b>TE:</b>	Tris EDTA

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. Caractéristiques botaniques du niébé.....	3
2. Généralité sur le niébé .....	3
3. Rétrocroisement et amélioration des plantes .....	4
4. Importance du niébé .....	4
5. Facteurs limitant la production du niébé .....	5
6. Les biotypes de <i>Striga gesnorioides</i> .....	7
7. Les moyens de luttés contre le striga.....	8
8. Marqueurs moléculaires et amélioration des plantes .....	8
8.1 Les différents types de marqueurs.....	9
8-2 Les marqueurs SSR .....	9
8-3 Les marqueurs SNP (Single Nucléotide Polymorphisme).....	10
9. Bulk Segregant Analysis (BSA) .....	11
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	12
1. Matériel végétal .....	8
2. Origine de la population BC1F6.....	8
3. Phénotypage des lignées de Niébé pour la résistance au Striga.....	8
4. Génotypage .....	9
4.1. Extraction de l'ADN .....	9
4.2 Extraction d'ADN sur papier FTA (Flinders Technology Associates).....	9
4.3 Extraction d'ADN par du tampon MATAB .....	9
4.4 Extraction d'ADN par du DNAZOL .....	10
5. Quantification d'ADN .....	10
6. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	10
7. Criblage des marqueurs SSR et SNP .....	10

7.1 L'amplification de l'ADN .....	11
7.2 Migration des amplifiats sur le séquenceur (Licor® modèle 4300).....	12
8. Méthodologie du bulk ségrégant Analysis .....	12
8.1 Extraction d'ADN et quantification des Bulks .....	12
8.1.1 Extraction d'ADN .....	12
8.1.2 Quantification des Bulks.....	12
9. Analyse de l'association marqueurs et gène de résistance au Striga .....	13
RÉSULTATS .....	14
2. Résultats des quantifications .....	14
3. Criblage sur le licor4300 des marqueurs SSR et SNP .....	14
4. Criblage sur les lignées BC1F6 choisies .....	16
5. Bulk Segregant Analysis.....	18
6. Association marqueurs et gène de résistance au <i>Striga</i> .....	19
DISCUSSION .....	20
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	18
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	19
ANNEXES.....	19

## **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

La satisfaction des besoins en nourriture de la population de l'Afrique Subsaharienne est fortement menacée par une démographie galopante qui portera la population à 1,761 milliards d'individus en 2050 (Lutz et Samir, 2011). Il s'y ajoute les déséquilibres occasionnés par les changements climatiques qui sont responsables des sécheresses récurrentes, d'inondations ou des élévations de température qui impactent négativement la production agricole. En réponse à cette demande croissante en nourriture plusieurs approches ont été utilisées. Dans une première approche, il y a eu une utilisation massive des engrais chimiques pour augmenter les rendements agricoles. Cette stratégie a des conséquences néfastes sur l'environnement (pollution des sols, des eaux de surfaces et souterraines, etc...) en plus, leurs prix restent inaccessibles à bon nombre producteurs de l'Afrique Subsaharienne. La deuxième approche était basée sur l'augmentation des surfaces cultivables par les déforestations massives induisant une érosion des sols, une perte de la fertilité des sols et de la diversité génétique. Or la diversité génétique résulte de phénomènes naturels ou artificiels suite aux phénomènes de flux de gènes, de la dérive génétique, des mutations et des recombinaisons qui surviennent au cours du temps. À ce sujet, il s'avère indispensable d'évaluer la diversité génétique des ressources phytogénétiques disponibles avant de mettre en œuvre tout programme de sélection afin d'identifier les variétés ayant des caractères intéressants qui peuvent être transférés chez d'autres cultivars. De telles stratégies ont été développées chez le Niébé pour mettre à la disposition des producteurs de nouvelles variétés en réponse aux contraintes biotiques et/ou abiotiques, qui constituent un frein majeur à l'augmentation de la production. C'est dans ce cadre que certaines variétés telles que Mouride et IT97K499-39 ont été développées pour résister au Striga. Le Striga constitue la principale contrainte liée à la production du niébé en Afrique de l'ouest, avec des pertes importantes de rendement pouvant aller de 80 à 100 % (Muleba *et al.*, 1997).

Plusieurs moyens et techniques sont utilisés pour lutter contre le Striga y compris l'application de stimulants de germination ou d'herbicides. Cependant, ces méthodes ne respectent pas l'environnement et sont trop coûteuses pour être facilement accessibles aux producteurs Africains (Atokple et coll, 1995). De plus, les résidus toxiques de ces produits peuvent s'avérer très nuisibles pour les consommateurs. L'utilisation de cultivars de niébé résistants au Striga avec un bon potentiel de production pourrait être une alternative plus durable et plus avantageuse pour les producteurs.

L'identification de cultivars avec des caractères agronomiques intéressants est aujourd'hui facilitée par des outils de biotechnologies tels que les marqueurs moléculaires, qui ont connu de très grandes avancées ces dernières années. Ainsi, à travers la sélection assistée par marqueurs moléculaires (SAM) on pourrait identifier les génotypes d'intérêt agronomique tout en améliorant l'efficacité de la sélection par un gain de temps, un meilleur contrôle des recombinaisons et une plus grande précision dans la prédiction de génotype (De Vienne, 1998).

Ces dernières années, l'utilisation de ces outils a permis d'identifier des marqueurs moléculaires associés au gène de la résistance contre la race 1 de *Striga gesnerioides* (Ouedraogo *et al*, 2001 et 2002). Par contre aucun marqueur moléculaire associé au gène de résistance à la race 6 de *S. gesnerioides* laquelle n'est actuellement recensée qu'au Sénégal, n'a été encore identifié.

Ce présent travail qui a pour objectif, l'identification de marqueurs moléculaires liés aux gènes de résistance au striga, à partir d'une population de niébé BC1F6. La population BC1F6, est issue du croisement entre une variété sensible au striga (Melakh) et une variété résistante (IT97K 499-39). Les marqueurs polymorphes SSR et SNP identifiés, seront par la suite intégrés dans un programme de sélection assistée par marqueur moléculaire (SAM).

Dans cette étude nous présenterons une étude bibliographique (i) suivie des méthodes expérimentales (ii) qui ont été utilisées pour atteindre les objectifs fixés, ensuite les résultats (iii) obtenus seront présentés, analysés et interprétés. Enfin, une conclusion générale (iv) sera tirée et des perspectives de recherche seront dégagées à partir du travail réalisé.

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Etude Bibliographique

### 1. Caractéristiques botaniques du niébé

Selon des études menées par MARECHAL *et al* en 1978, le niébé appartient à :

Classe : Dicotylédones

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Sous famille : *Faboideae*

Tribu : *Phaseolae*

Sous tribu : *Phaseolinae*

Genre : *Vigna*

Espèce : *Vigna unguiculata*.

Ainsi, selon ADAM.T (1986), trois espèces distinctes composent le genre *Vigna*, il s'agit de :

- *Vigna unguiculata* : Forme primitive, le niébé commun en Asie provenant de l'Afrique
- *V. sinensis* : Niébé commun de l'Afrique
- *V. sesquipedalis* : Cultive pour les gousses immatures notamment en Asie.

Nonobstant, cette variabilité, on s'accorde de plus en plus sur le fait que le niébé cultivé dans le monde appartient à la même espèce *V. unguiculata*, les deux appellations étant synonymes (IITA, 1982).

### 2. Généralité sur le niébé

Dans les systèmes de culture africains, caractérisés par des sols pauvres, le niébé joue un rôle capital dans la fertilisation des sols par la fixation de l'azote atmosphérique (Jackai *et al.*, 1986). Il n'a besoin d'aucune fertilisation azotée car il nodule facilement avec des rhizobia contenus dans le sol. Par ce processus, le niébé cède 60 à 70 kg à l'hectare de l'azote fixé pour la culture associée. Plante cultivée depuis très longtemps dans les pays en développement, le niébé est originaire du Nord-est de l'Afrique, où sa culture est très développée (Coulibaly *et al.*, 2002).

Comparativement aux autres légumineuses, le niébé a de très grandes exigences en phosphore et en potassium. (Rachie, 1985).

Pouvant se développer dans des zones à faibles pluviométries comme le Sahel où la pluviométrie est inférieure à 500 mm/an. Le niébé tolère la sécheresse et s'adapte bien aux sols sablonneux et pauvres. Toutefois, c'est sur des sols bien drainés, à pH 6 ou 7, qu'il atteint ses meilleurs rendements (Dugje *et al.*, 2009).

Au Niger, le niébé occupe la troisième place en tonnage après le mil et le sorgho (Leko, 1986). Ainsi 4.103.710 ha sont sous culture de niébé avec une production moyenne de 549.035 tonnes (MDA, 2004).

Au Sénégal, la superficie totale cultivée en niébé a été estimée à 270. 000 ha en 2009 avec une production moyenne de 126. 000 tonnes (Faye, 2009).

### **3. Rétrocroisement et amélioration des plantes**

Elle consiste à réaliser des séries de croisements entre une variété receveuse ou élite et une variété donneuse du caractère. Les descendants ayant introduit le caractère sont ensuite croisés pendant plusieurs générations avec le parent receveur, ce qui permet d'augmenter la part de la lignée receveuse dans le fond génétique des descendants. Cette technique permet d'obtenir des descendants identiques à la variété receveuse, mais contenant en plus le caractère désiré (Harlan et Pope en 1922).

### **4. Importance du niébé**

Cultivé depuis longtemps au Sénégal, le niébé joue un rôle primordial dans l'alimentation de base pauvre en minéraux organiques indispensables. La graine mûre est très riche en protéines, en amidon, et en vitamine B tel que l'acide folique qui est important dans la prévention de malformation chez le nouveau-né (Chevalier, 1944). La graine est également riche en micro-éléments essentiels, tels que le fer, le calcium et le zinc. C'est aussi une excellente source de fibres alimentaires. Des études sur la teneur en éléments nutritifs contenus le niébé ont été menées par Luiz *et al.*, (2006). Les résultats sont illustrés dans le tableau 1.

La graine sèche est aussi moulue et consommée dans plusieurs plats traditionnels africains, comme la bouillie, le pain, l'aliment de sevrage pour enfants ou encore transformée en beignets (Akara au Sénégal et tchéchéna au Niger).

Tableau 1 : Illustration de quelques éléments essentiels contenu dans le niébé (Luiz *et al.*, 2006).

Eléments minéraux	Valeurs nutritives
Protéines	13g
Fibres alimentaires	11g
Lipides	1g
Acide gras saturés	0 g
Sucres	6g
Cholesterol	0mg
Vitamine A	25.8 UI
Vitamine C	0.7 mg
Vitamine E	0.5 mg
Calcium	41,3 mg
Fer	4,3 mg
Magnésium	91,1 mg

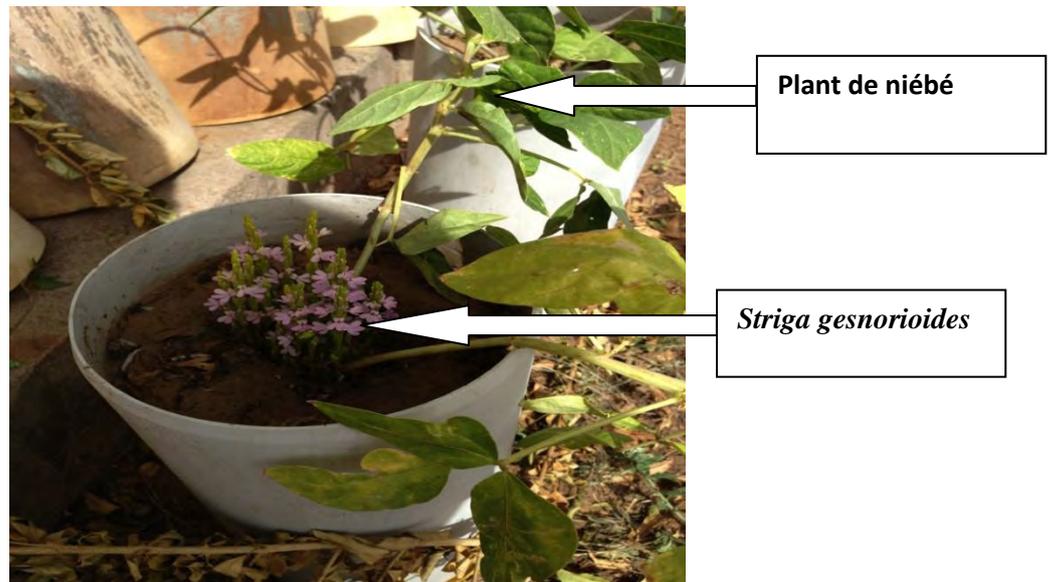
## 5. Facteurs limitant la production du niébé

Parmi les facteurs limitant la production du niébé on peut noter les facteurs abiotiques (salinité, sécheresse etc...) et biotiques appartenant à divers groupes (champignons, bactéries, virus, nématodes etc.) mais surtout la plante parasite *Striga gesnorioides* (Fig. 1).

Cette plante constitue un obstacle important dans la production du niébé dans toutes les zones agro-écologiques du Sénégal où la plante est cultivée (Lane *et al.*, 1997).

Le *S. gesnorioides* (Willd.)Vatke est un parasite obligatoire des dicotylédones à feuilles larges de plusieurs familles, dont les *Leguminosae*, les *Convolvulaceae*, les *Euphorbiaceae* et les *Solanaceae* (Hibberd *et al.*, 1996).

**Figure1** : Plant de niébé infesté par le *Striga gesnerioides*



Cette mauvaise herbe parasite aussi plusieurs adventices, parmi lesquelles l'indigotier (*Indigo fera hirsuta* L.) aux États-Unis (Wunderlin et coll, 1979).

Cette plante semble démontrer une spécificité très élevée vis-à-vis de ses hôtes respectifs (Berner *et al*, 1995). Les caractères morphologiques du *S. gesnerioides* varient aussi d'un hôte à l'autre (Aggarwal, 1985). Son cycle biologique est très bien adapté aux conditions climatiques difficiles. Les graines de *S. gesnerioides* nécessitent une période de 6 à 7 mois de post-maturation en conditions sèches et chaudes (Thalouam et Fer, 1993), à une température comprise entre 25 et 35°C (Worsham, 1987; Kuiper *et al*, 1996). Ces graines ont aussi besoin d'une période d'imbibition de 10 à 21 jours avant de pouvoir germer, généralement en début de saison des pluies (Okonkwo, 1991).

Après contact avec une racine de l'hôte, la racicule de *Striga* cesse de croître, et les papilles s'allongent en direction de la surface de la racine. Environ 48 heures après le contact, les radicules pénètrent dans les couches cellulaires superficielles de la racine. Par la suite, la racicule croît au travers du cortex grâce à des cellules intrusives, et prend une forme conique et s'appelle alors haustorium primaire (Nwoke, 1978).

Des pectinases ou d'autres enzymes permettant de dégrader les parois cellulaires, comme les hémicellulases et les cellulases, pourraient être impliquées dans le processus de pénétration, même si on n'a pas pu le démontrer de façon claire (Bailey, 1998).

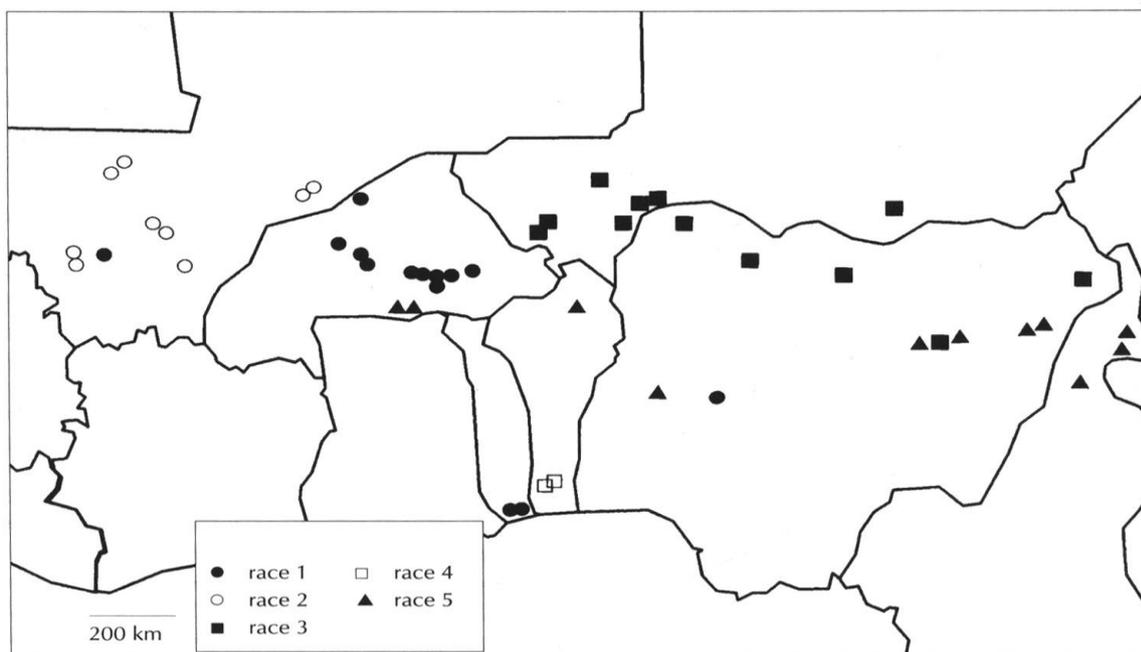
## 6. Les biotypes de *Striga gesnorioides*

Des travaux réalisés sur divers cultivars de niébé mettent en évidence l'existence de différents biotypes (Fig.2), ou races physiologiques du *S. gesnorioides* (Touré *et al.*, 1998).

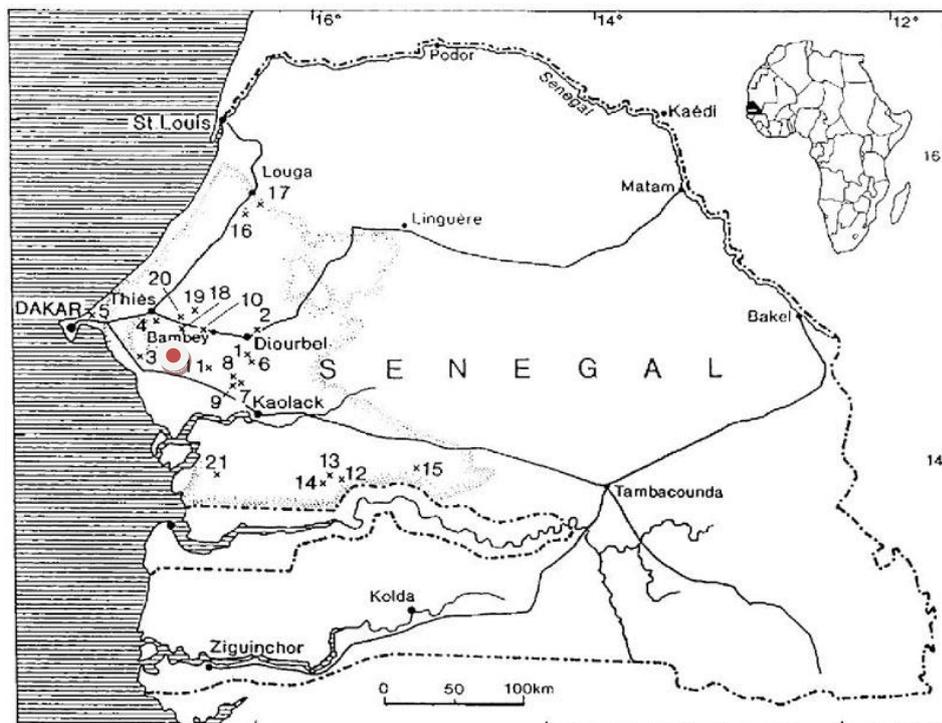
La spécificité du *S. gesnorioides* envers ses différents hôtes a permis de différencier les races existantes. À l'heure actuelle, 6 races distinctes du parasite, possédant chacune une virulence spécifique envers différents cultivars de niébé (Lane *et al.*, 1997) ont été proposées. Ainsi, la race 1 est surtout présente au Burkina Faso, mais aussi au Mali, au Togo et au Nigeria, alors que la race 2 est exclusive du Mali, et que la race 3 n'est retrouvée qu'au Niger et au Nigeria (Lane *et al.*, 1997).

La race 4 ne se retrouve qu'au sud du Bénin (Lane *et al.*, 1994). La cinquième race, identifiée en 1995, est retrouvée un peu partout en Afrique de l'Ouest, soit au Bénin, au Burkina Faso, au Cameroun et au Nigeria (Moore *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1997). La race 6 n'est recensée pour le moment qu'au Sénégal (Botanga et Timko, 2006).

**Figure 2** : Distribution des races de *Striga gesnorioides* en Afrique de l'Ouest (Lane *et al.* 1997).



**Figure 3** : Provenance du *Striga* utilisé dans ce travail (M.I, 2012)



- Bambe

## 7. Les moyens de luttres contre le striga

Plusieurs méthodes existent pour luttres contre cette plante parasite. Il y a notamment l'arrachage à la main des plants de *Striga* émergés, les rotations avec des faux hôtes qui font germer les graines sans permettre l'attachement (trap crops) (Vissoh *et al.*, 2008), la luttres biologique avec l'utilisation du *Fusarium* (Sauerborn *et al.*, 2007; Zahran *et al.*, 2008), et la luttres chimique par l'utilisation d'éthylène ou divers herbicides.

L'utilisation de variétés résistantes, en combinaison avec des pratiques culturales appropriées, est cependant la méthode la plus adéquate, la plus accessible et la plus simple pour luttres contre le *Striga*. (De Groote *et al.*, 2008).

## 8. Marqueurs moléculaires et amélioration des plantes

La notion de marqueur génétique ou moléculaire, a été introduite en 1980. Il s'agit d'une séquence d'ADN repérable spécifiquement sur le chromosome. En cartographie génétique, le marqueur est utilisé pour baliser le génome (INRA, 2012).

## 8.1 Les différents types de marqueurs

Il existe plusieurs types de marqueurs moléculaires. Les marqueurs biochimiques les plus utilisés sont les isozymes. Ils correspondent aux différentes formes d'une même enzyme et permettent de déterminer la présence de l'allèle correspondant à chacune de ces formes. Ce sont donc des révélateurs du polymorphisme entre individus pour les séquences codantes du génome.

Les marqueurs de l'ADN sont à l'heure actuelle les plus utilisés. Ils correspondent à des séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Les plus utilisés sont le marqueurs RFLP, RAPD, AFLP, microsatellites et SNP (INRA, 2012).

## 8-2 Les marqueurs SSR

Principalement développées par Zietkiewicz *et al* (1994), les SSR sont des régions spécifiques du génome constituées de courtes séquences d'ADN répétées en tandem sur le chromosome. Ils sont très polymorphes, dispersés à travers le génome, et sont détectés par PCR en utilisant des amorces flanquant les répétitions. La révélation se fait sur des gels d'agarose.

Les SSR sont très utilisés dans les études de diversité d'espèces agronomiques d'une part et d'autre part pour la cartographie génétique et la détection de QTL (Quantitative Trait locus) impliqués dans la résistance aux maladies ou dans la variation de caractères agronomiques intéressants (Gupta *et al*, 2008).

Les marqueurs SSR ont été utilisés chez le niébé pour l'analyse de la diversité génétique de l'espèce et pour la construction de carte de liaison génétique. En ce qui concerne la construction de cartes génétiques, une carte saturée a été développée par Andargie *et al* (2011) à partir de lignées recombinantes obtenues suite au croisement entre les variétés 219-01 et 524B. Dans ce travail 912 marqueurs SSR ont été testés. Sur ces derniers uniquement 639 ont donné un produit d'amplification et 202 polymorphes ont été utilisés pour la construction de la carte. Plusieurs QTL majeurs impliqués dans le développement de la graine ont été positionnés sur cette carte. Des travaux de cartographie récents réalisés par Asare *et al* (2013) ont permis d'identifier deux marqueurs SSR1 et C42-2B très proches du gène de résistance au *striga*. Ces deux marqueurs possèdent des pouvoirs de détection des lignées résistantes très remarquables de 93% pour SSR1 et de 87.5% pour C42-2B.

### 8-3 Les marqueurs SNP (Single Nucléotide Polymorphisme)

Les récents progrès en matière d'analyse de séquences d'ADN et la mise au point de séquençage à haut débit ont rendu possible l'identification et l'analyse de la variation nucléotidique à grande échelle. Le SNP est défini comme étant un polymorphisme mono nucléotidique se trouvant dans les régions codantes (SNPc) et dans les régions régulatrices des gènes. Les SNP constituent la forme la plus abondante de variation génétique dans le génome.

Les travaux de Muchero *et al* en 2009 (Tableau 2) ont permis de construire une carte consensus du niébé contenant 11 groupes de liaisons. Pour cette carte, 1536 marqueurs SNP, 6 populations de lignées recombinantes d'un nombre total de 741 lignées ont été utilisés (Tableau 3). Parmi ces SNP environ 90 % étaient faciles d'utilisation, soit un total de 1375 marqueurs fiables. Sur ces derniers sélectionnés 928 ont été intégrés dans la carte consensus qui couvre une distance totale de 680 CM et une distance moyenne entre les marqueurs de 0,73 CM.

**Tableau 2 :** Caractéristiques de la carte consensus mise en place par Muchero et ses collaborateurs en 2009 à partir de SNP

Population	RILs	SNP Polymorphe	SNP avec CRG <0,3	SNP cartographiés	Taille de la carte, CM	Le plus grand écart entre les SNP, CM	Traits ségrégation
524B × IT84S-2049	79	469	33	436	665	13.3	RP, PGI, RN, RS, RV, STF
CB27 × 24-125B-1	90	366	67	299	651	17,0	AR, PGI, RC, RN, M, RTF,
CB46 × IT93K-503-1	103	422	34	388	601	17.1	RN, PGI, TS, RTF, M, RM, Y, AR, RF
Dan Ila × TVu-7778	109	524	236	288	665	16.3	TS, Y, RBB
TVu-14676 × IT84S-2246-4	137	409	60	349	600	17,9	RS, RN
Yacine × 58-77	114	499	84	415	657	17,6	RTF, PGI,

**RM** : résistance au *Macrophomina*

**RP** : la résistance aux pucerons

**RC** : résistance du niébé charançon

**RN** : résistance aux nématodes

**RS** : résistance au *Striga*

**RBB** : résistance à la brûlure bactérienne

**RF** : résistance au *Fusarium*

**RTF** : résistance des fleurs aux thrips **RV** : résistance aux virus **TS** : tolérance à la sécheresse  
**STF** : Semis tolérant au froid **PGI** : poids du grain individuel **R** : rendement **M** : Maturité

**Tableau 3** : Illustration de quelques travaux réalisés sur le niébé de 2009 à 2013 à partir de SSR et de SNP. Pop: population utilisée pour la cartographie; DM: distance moyenne entre les marqueurs; GL: nombre de groupe de liaison; RIL: lignées recombinantes ; Longueur de la carte en CM.

Marqueurs utilisés	Pop	Parents	Longueur (CM)	DM (CM)	GL	Références
SNP	RIL	Six paires de parents	680	0.73	11	Muchero et al, 2009
SSR	RIL	219-01; 524B	677	3.00	11	Andargie et al, 2011
SNP, SSR	RIL	Zhijiang282; ZN016	745	1.98	11	Xu et al, 2011
SSR	RIL	JP81610; TVnu457	852.4	3.96	11	Kongjaimun et al, 2012
SSR	RIL	524B ; 219-01	667	-	11	Andargie et al 2013

## 9. Bulk Segregant Analysis (BSA)

Le Bulk Segregant Analysis (BSA) est une approche très efficace permettant de détecter une liaison génétique entre un marqueur moléculaire et un gène. Cette technique consiste à analyser dans une famille en ségrégation, l'ADN en mélange pour deux groupes d'individus (bulks) ayant des caractéristiques extrêmes pour le caractère phénotypique étudié (Par exemple : résistant contre sensible). L'analyse du polymorphisme de l'ADN permet alors d'identifier les marqueurs qui différencient ces deux "bulks".

En effet, les marqueurs susceptibles d'être génétiquement liés au gène codant pour l'expression du caractère sont représentés par des allèles différents dans chaque "bulk"(Arnheim *et al.*, 1985 ; Michelmore *et al.*, 1991).

À l'inverse, les marqueurs dont les allèles se répartissent de façon aléatoire dans chaque "bulk" ne sont pas liés aux gènes contrôlant le caractère. Le "BSA", alternative au typage de tous les individus d'une famille en ségrégation, apparaît très économique pour détecter des gènes à déterminisme mono génique car les effectifs nécessaires sont considérablement réduits (Boukar *et al.*, 2004).

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Les variétés utilisées pour développer la population de backcross sont « IT97K 499-39 » fourni par l'IITA et « Melakh » sélectionnée par le Centre National de Recherche Agronomique (CNRA/ISRA) de Bambey (Sénégal).

Melakh est une variété hâtive à cycle court de 55 et 60 jours et principalement cultivée dans les zones à pluviométrie faible à moyenne. Elle a été créée comme variété à double usage pour la production de graines sèches et de gousses ou haricots verts dans la zone sahélienne du Sénégal. Elle a été obtenue à partir d'un croisement entre une lignée avancée de l'ISRA 'IS86-292' et une autre de l'IITA, 'IT83S-742-13'. Melakh est résistante aux pucerons, à la virose causée par le 'CABMV' (Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus), au chancre bactérien et partiellement aux thrips. (Cissé, 2002). Cependant cette variété est sensible au *Striga*.

La variété IT97K 499-39 a été créée par l'IITA du Nigeria. C'est une variété à cycle intermédiaire et très résistante au *striga*.

Par ailleurs, 10 lignées élites du programme de sélection niébé de l'ISRA ont été utilisées pour tester le polymorphisme de marqueurs microsatellites. Il s'agit de Mouride, Diongoma, Bambey 21, CB5, UC-CB46, ITB1D-994, K VX525, Suvita, 503-1 et Yacine.

### 2. Origine de la population BC<sub>1</sub>F<sub>6</sub>

Cette population a été obtenue à la suite du croisement entre Melakh et IT97K 499-39. La F<sub>1</sub> obtenue a ensuite été croisée avec le parent receveur Melakh pour donner la BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>. Cinq générations successives d'autofécondation ont ensuite été effectuées pour obtenir la population finale (BC<sub>1</sub>F<sub>6</sub>) qui a fait l'objet de notre étude.

### 3. Phénotypage des lignées de Niébé pour la résistance au *Striga*

Il a été réalisé en 2013. L'infestation a été réalisé le 10/07/2013 par du *Striga gesnorioides* récolté le 20/11/2011 à Bambey Sérère (Fig.3) sur du niébé, suivi de semis de graines de niébé le 18/07/2013.

## **4. Génotypage**

### **4.1. Extraction de l'ADN**

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de jeunes feuilles (environ 10 jours) provenant des 75 lignées de la population BC<sub>1</sub>F<sub>6</sub>, des parents Melakh et IT97K- 499-39 et des 10 lignées élites.

### **4.2 Extraction d'ADN sur papier FTA (Flinders Technology Associates)**

Elle a été réalisée sur des feuilles fraîches préalablement récoltées, enroulées dans du papier aluminium et mis dans de la glace. Les feuilles ont été ensuite déposées sur le papier FTA subdivisé en quatre parties distinctes. Chacune des parties a été soigneusement numérotées.

À l'aide d'un petit marteau, les feuilles ont été étalées sur le papier jusqu'à ce que celui-ci change de couleur et vire au vert clair, puis le papier a été séché dans une étuve. Après le séchage, un disque a été prélevé sur chaque partie à l'aide d'un stylet puis déposé dans un tube. Deux cents microlitres de solution de purification ont ensuite été ajoutés dans les tubes contenant les disques pendant 5 min. Après, cette solution de purification a été éliminée et les disques ont été conservés dans les tubes. Ces étapes ont été répétées 2 fois de suite. Pour le TE 1X on a utilisé la même procédure que pour la solution de purification. Les disques ont ensuite été séchés pendant 1h 30 min à l'étuve à 37°C. Cette étape a permis d'obtenir des disques purifiés contenant de l'ADN prêt à être utilisé.

### **4.3 Extraction d'ADN par du tampon MATAB**

Pour cette extraction 100 à 150 mg de feuilles fraîches ont été prélevées. Elles ont été ensuite placées dans un mortier contenant 750 µl de tampon Matab, puis broyées manuellement à l'aide d'un petit pilon. Les broyats ont été ensuite transférés dans un tube eppendorf de 2 ml, puis homogénéisés pendant quelques secondes et incubés dans un bain-marie pendant 20 min. Les échantillons ont été homogénéisés toutes les 5 min et remis dans le bain. Les tubes ont été ensuite refroidis à température ambiante pendant 5 min avant d'ajouter de 750 µl de Chloroforme Isoamyl Alcool (CIAA), homogénéisés et centrifugés à 13000 rpm pendant 20 min à 4°C. Après cette étape, 600µl du surnageant ont été prélevés et transférés dans un autre tube de 1,5 ml puis 600 µl d'isopropanol à froid ont été ajoutés. Les tubes ont ensuite été agités légèrement jusqu'à la formation d'une pelote d'ADN puis conservés pendant 2 h au congélateur à -20°C. Les tubes ont été centrifugés à 13000 rpm pendant 20

min à 4 °C. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot d'ADN lavé en ajoutant 500 µl d'éthanol (70%). Les tubes ont été de nouveau centrifugés à 13000 rpm pendant 20 min à 4°C.

Le surnageant a été éliminé et le culot séché pendant 1h dans une étuve à 37 C puis l'ADN a été dissout dans 50 à 150 µl d'eau distillée à température ambiante pendant une nuit.

#### **4.4 Extraction d'ADN par du DNAZOL**

C'est une technique d'extraction simple qui est réalisée en quelques heures. Pour sa réalisation des jeunes feuilles ont été prélevées et déposées dans de la glace.

100 à 150 mg de feuilles ont été pesés et déposés dans un mini-mortier, auxquels ont été ajoutés 750 µl de DNAZOL. Le broyat obtenu a été placé dans des tubes de 2ml puis 750 µl de CIAA ont été ajoutés et l'ensemble homogénéisé délicatement. Les tubes ont été centrifugés à 1200 rpm pendant 20 min puis 600 µl du surnageant ont été prélevés et transférés dans un nouveau tube. Dans ce tube, un volume équivalent d'isopropanol a été ajouté et centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min. Le culot d'ADN a été lavé avec 600 µl d'éthanol (70%) puis centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min. Il a été ensuite séché à l'étuve pendant 30 min à 37 °C. L'ADN a enfin été dissous dans 50 µl de TE 1X à température ambiante pendant 1h.

### **5. Quantification d'ADN**

La quantification de l'ADN a été réalisée sur un gel d'agarose à 1%. Les concentrations ont été estimées en référence à l'intensité des bandes du marqueur de taille Smart Ladder correspondant à des concentrations connues.

### **6. Electrophorèse sur gel d'agarose**

La migration a été réalisé sur un gel d'agarose à 1% dans un tampon TBE 0,5X contenant 5 µl de BET (0.5 µg/ml) pendant 30 min à 100 mA. La visualisation a été réalisée sous lumière UV (302/312 nm) et la capture d'image à l'aide d'un appareil photo numérique (Canon).

### **7. Criblage des marqueurs SSR et SNP**

102 marqueurs: 89 SSR et 13 amorces reconverties en PCR spécifiques provenant d'AFLP (C42-2B) et de séquences de SNP ont été testés sur les 12 accessions de niébé.

Le marqueur C42-2B a été choisi car plusieurs auteurs l'ont trouvé lié à la résistance au *Striga* (Li and Timko, 2009, Asare *et al*, 2013). Une queue M13 de 19 paires de base (Voire annexe) a été rajoutée aux amorces sens de chaque marqueur pour permettre leur marquage avec un fluochrome au cours de la PCR. Les PCR ont ensuite été réalisées à des températures d'hybridation (Voir annexe) spécifiques pour chaque marqueur afin d'obtenir des produits d'amplification qui ont été séparés par électrophorèse à l'aide d'un séquenceur.

## 7.1 L'amplification de l'ADN

La PCR a été réalisée dans un volume total de 10  $\mu$ l, contenant 5  $\mu$ l d'ADN génomique à une concentration de 5ng/  $\mu$ l et 5  $\mu$ l d'un mélange de dNTP (200 $\mu$ M), de tampon 10X (1.08 $\mu$ l), de MgCl (0.50 mM), d'amorces sens et antisens (0.10  $\mu$ M), d'une amorce M13 marquée à l'IRD 700 ou 800, de Taq et d'eau. L'amorce marquée à l'IRD 700 ou 800 sert à marquer les amplifiats en cours de la PCR. Les concentrations de chacun des constituants du mélange sont consignées dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Protocole tailing avec M13-amorce + M13 marqué en 700 ou 800 pour 12 réactions

<b>Volume D'ADN par réaction</b>	25 ng	<b>Volumes des réactifs du mix</b>
<b>Concentration final des réactifs</b>		
TP 1,0 X		
DNTP 200 $\mu$ M		TP: 13, 80 $\mu$ l
MgCL2 0, 50 Mm		DNTP: 13, 80 $\mu$ l
Am1-M13 0, 08 $\mu$ M		Mgcl2: 1, 38 $\mu$ l
AM2 0, 10 $\mu$ M		Am1-M13: 1, 10 $\mu$ l
M13 marqué 0, 10 $\mu$ M		AM2: 1,38 $\mu$ l
Taq 0,10 U/ $\mu$ l		M13 marqué : 1,38 $\mu$ l
<b>Nombre de réactions</b>	12	Taq : 6,90 $\mu$ l
<b>Volumes de réaction</b>	10 $\mu$ l	H2O :29,26 $\mu$ l
<b>Marge pour le mix</b>	15%	
		<b>Volume final du mix :69<math>\mu</math>l</b>
		<b>Volume à distribuer :5<math>\mu</math>l</b>

La PCR a été réalisée dans des plaques à 96 échantillons. Après distribution de l'ADN et du mélange réactionnel, quelques gouttes d'huile minérale ont été ajoutées dans chaque puits pour éviter l'évaporation des produits. Les plaques ont ensuite été déposées dans un thermocycleur pour une amplification programmée de 2h.

## **7.2 Migration des amplifiats sur le séquenceur (Licor® modèle 4300)**

Le but principal de cette migration sur le séquenceur est la séparation des amplifiats PCR selon leurs tailles. Pour sa réalisation, un volume de 10 µl de bleu d'urée a été ajouté dans chaque échantillon. Le tout a été dénaturé à 94°C pendant 3 min et refroidi à 4°C dans de la glace. Un volume de 1,5 µl de chaque échantillon a été placé sur un rack de dépôt. Le dépôt a été réalisé à l'aide d'un peigne membrane (Bio-Rad® : the gel compagny). La migration a été réalisée pendant 1h 30 min, à 1500 V. La révélation des produits d'amplification a été réalisée automatiquement grâce à la fluorescence des IRD 700 ou 800.

## **8. Méthodologie du bulk ségrégant Analysis**

Pour ce Bulk, 10 lignées résistantes et 10 sensibles aux *Striga gesnorioides* ont été choisies en fonction du résultat des phénotypages réalisés en 2013, puis ont été mélangés pour former deux lots d'ADN. Chaque lot contenait environ 250 mg de feuilles prélevées au niveau des échantillons à l'aide d'un stylet de 2 cm de diamètre.

Bulk 1 (lignées sensibles au striga) :17, 125, 21, 71, 53, 12, 64, 105, 57, 120

Bulk 2 (lignées résistantes au striga) :148, 60, 55, 114, 29, 129, 139, 7, 103, 134

### **8.1 Extraction d'ADN et quantification des Bulks**

#### **8.1.1 Extraction d'ADN**

Elle a été réalisée sur les deux lots de Bulks. À l'aide d'un stylet, des surfaces égales de feuilles de chacune des 10 plantes constitutives des différents bulks ont été prélevées. Elles ont été ensuite mises en pools dans des tubes et les ADN ont été extraits par la technique de MATAB.

#### **8.1.2 Quantification des Bulks**

Elle a été réalisée à partir des deux bulks sur un gel d'agarose à 1 %, selon les mêmes principes et les mêmes dosages que les précédents.

## 9. Analyse de l'association marqueurs et gène de résistance au Striga

Les données de phénotypage sur la résistance au Striga de 2013 ont été utilisées pour les analyses d'association avec les marqueurs.

Soit  $a$  et  $b$  les deux formes alléliques au marqueur,  $S$  et  $R$  les formes alléliques au gène,  $aS$  les gamètes fournis par le parent sensible (Mélakh) et  $bR$  ceux du parent résistant (IT97K-499-39). Dans la population  $BC_1F_6$  les différents types de gamètes sont  $aS$  et  $bR$  pour les gamètes d'origine parentaux (i.e. non recombinés) et  $aR$  et  $bS$  les gamètes recombinés. Dans le cas d'une indépendance entre le marqueur et le gène nous devons observer autant de gamètes recombinés que de gamètes parentaux, soit un rapport ( $\theta$ ) nombre de gamètes recombinés sur nombre de gamètes totaux. En d'autres termes on observerait autant d'individus portant l'allèle du parent Mélakh au marqueur et ayant un phénotype sensible au Striga que d'individus portant l'allèle Mélakh au marqueur et ayant un phénotype résistant au Striga. Le même raisonnement est valable pour les allèles du parent IT97K-499-39.

## **RÉSULTATS**

## RÉSULTATS

### 1. Résultats du phénotypage

Sur les 75 lignées de niébé semées et qui ont levé, 45 lignées se sont révélées sensibles au *Striga* et 30 lignées ont montré une résistance.

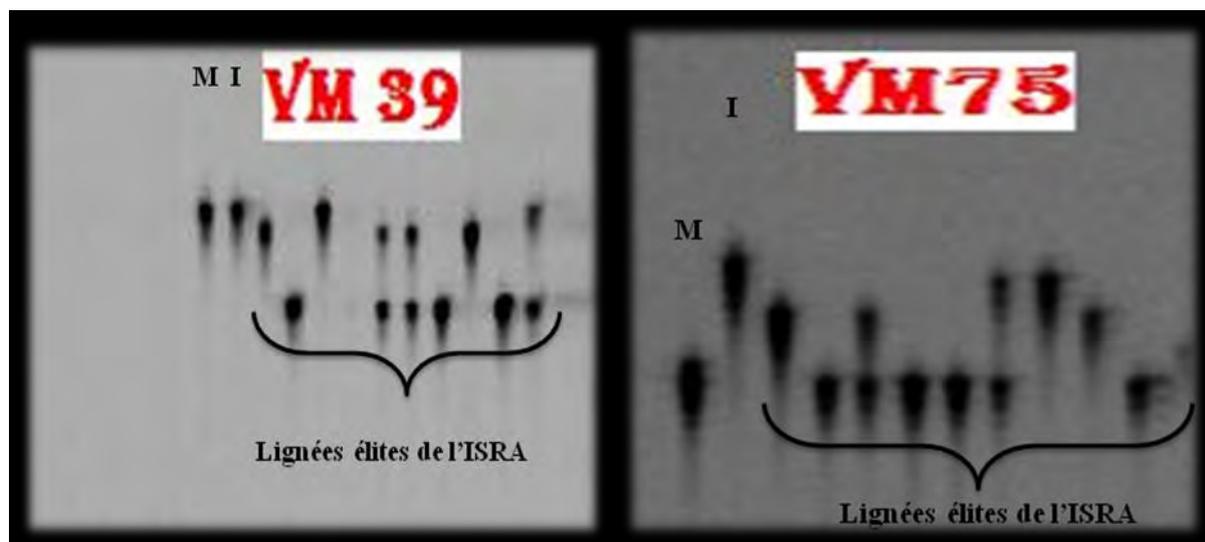
### 2. Résultats des quantifications

Parmi les trois techniques d'extraction utilisées, le protocole utilisant le MATAB nous a donné les meilleurs résultats. Les extraits d'ADN obtenus par ce protocole sont de bonne qualité avec des concentrations variant de 20 à 400 ng par comparaison avec les bandes du smart Ladder. Ces extraits ont été dilués pour obtenir des solutions de travail estimable à 5 ng / $\mu$ l.

### 3. Criblage sur le licor4300 des marqueurs SSR et SNP

Dans ce travail 102 marqueurs dont 89 SSR et 13 PCR spécifiques provenant de séquences de SNP ou AFLP ont été utilisées. Sur les 89 SSR, 6 ont révélé un polymorphisme entre les 12 lignées élites choisies. Cela donne un pourcentage de polymorphisme de 6.74 %. Au niveau des marqueurs PCR spécifiques nous avons obtenu un pourcentage de 23% de polymorphisme correspondant à 3 marqueurs polymorphes sur les 13 utilisés. Les marqueurs SSR polymorphes sont les suivants: VM 57, VM 39, VM 70, VM 75, VM 66, VM 30. Les marqueurs PCR spécifiques polymorphes sont C42-2B, 6673 1R, 10811 1R. Parmi ces marqueurs polymorphes VM 75 et VM 39 ont révélé le plus grand nombre d'allèles suivis des marqueurs VM66, VM 70, VM57, VM30, 6673 1 R et 10811 1R qui ont révélé respectivement le nombre d'allèles suivant : 5, 5, 4, 4, 4, 3, 2 et 2 (Fig. 4, Tableau 5,6 ).

**Figure 4:** criblage avec des SSR sur les 12 accessions de niébé



**I = IT97K-399-39**

**M = Melakh**

**Tableau 5:** Données de génotypage des 12 accessions de niébé avec des SSR polymorphes

	VM75	VM 39
Mélakh	a	a
IT97K-399-39	b	a
YACINE	c	b
SUVITA	d	c
MOURIDE	b:d	a
5031	d	c
IT82K-994	d	d : c
BAMBEY 21	d:e	d : c
CB5	e	c
DIOUNGOMA	c	d
KVX525	d	c
UCB46	f	e : c

**Tableau 6** : Allèles révélés par quelques marqueurs polymorphes sur les 12 accessions de niébé

<b>Marqueurs</b>	<b>Nombres d'alleles révélés</b>
<b>VM 66</b>	4 alleles
<b>VM 75</b>	5 alleles
<b>VM 57</b>	4 alleles
<b>VM 30</b>	3 alleles
<b>VM 70</b>	4 alleles
<b>10811 1R</b>	2 alleles
<b>6673 1 R</b>	2 alleles
<b>VM 39</b>	5 alleles

#### **4. Criblage sur les lignées BC1F6 choisies**

Nous avons observé 9 marqueurs polymorphes entre les 12 accessions utilisées pour le criblage. Parmi les marqueurs polymorphes seuls 4 ont pu différencier les parents Melakh et IT97K-439-39. Il s'agit de : VM 75, VM 57, VM 70 et C42-2B.

Ces marqueurs ont été analysés sur un bulk de lignées sensibles, sur un bulk de lignées résistantes ainsi que sur les lignées sensibles et résistantes prises séparément. Les résultats du génotypage des bulks sensible et résistant ainsi que des lignées sont montrés sur la figure 4 et tableau 7.

Chaque marqueur a été testé sur 24 échantillons : les parents Melakh et IT97K-499-39 (pistes 1 et 2), les bulks résistants et sensibles (pistes 3 et 4), les 10 lignées constitutives du bulk résistant (piste 5 à 14) et les 10 lignées constitutives du bulk sensible (piste 15 à 24).

**Tableau 7:** Données de génotypage des lignées BC1F6 choisies

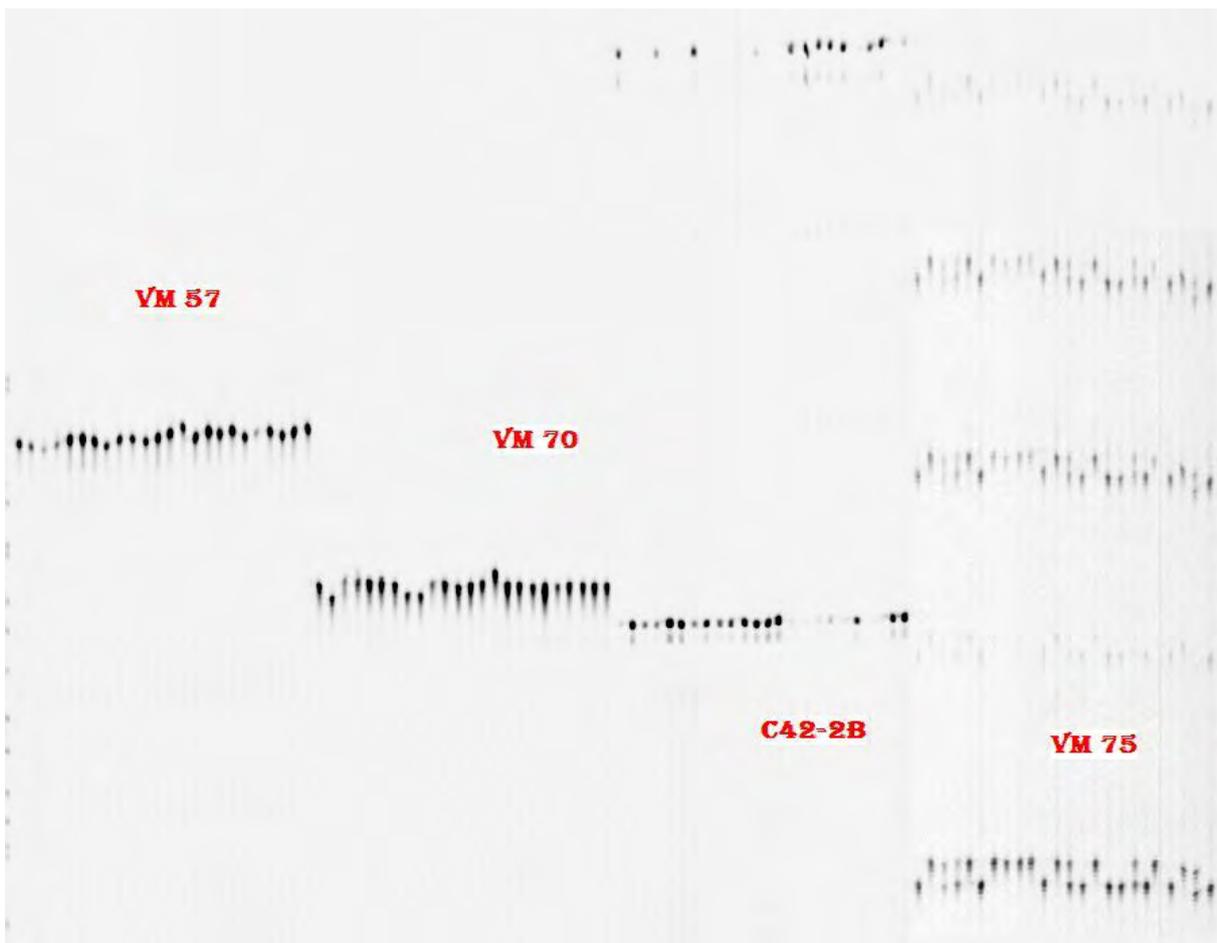
	Melakh	IT97K	BR	BS	R 148	60	55	114	29	129	139	7	103	R 134
Marqueurs														
VM 57	a	b	b	a	a	a	a	b	a	a	b	a	a	c
VM 70	a	b	h	a	a	a	a	b	b	a	a	a	a	a
C42 B	a	b	b	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
VM 75	a	b	b	a	b	a	b	b	b	b	a	b	b	a
	S 17	125	21	71	53	12	64	105	57	S 120				
VM57	b	a	a	a	b	a	a	a	a	a				
VM70	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a				
C42B	a	a	a	a	a	b	a	a	b	b				
VM75	b	a	a	a	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b

## 5. Bulk Segregant Analysis

Dans notre étude nous l'avons utilisé pour des raisons techniques : tester la sensibilité du BSA par rapport aux protocoles d'extraction d'ADN, de PCR et de migration utilisés sur le niébé au CERAAS.

Nous avons comparé la composition allélique des bulks aux allèles présents dans les lignées prises de manière individuelle. Les résultats (Fig. 5) montrent que nous avons pu mettre en évidence dans les Bulks les différents allèles portés par les lignées. Un des exemples les plus frappants est représenté par le bulk de lignées résistantes du marqueur VM70 (piste 3) pour lequel nous avons réussie à révéler deux allèles provenant du parent IT97K-499-39 parmi huit allèles provenant du parent Mélakh.

**Figure 5** : Profil généré par les marqueurs SSR polymorphes utilisés sur les lignées choisies.



## 6. Association marqueurs et gène de résistance au *Striga*

L'association entre les marqueurs et le gène de résistance au *Striga* a été testée en faisant le rapport du nombre de gamètes recombinés sur le nombre de gamètes totaux. Les résultats de cette analyse sont consignés dans le tableau 8.

**Tableau 8** : analyse de l'association entre les marqueurs et le gène de résistance au *Striga*

Génotype	VM57	VM70	C42B-2B	VM75	
as		8	9	7	5
br		2	2	10	7
ar		7	8	0	3
bs		2	0	3	5
Recombinés		9	8	3	8
Total		19	19	20	20
Rapport (r)		0,47	0,42	0,15	0,40

Aux marqueurs, VM57, VM70 et VM75 nous avons dénombré environ autant de gamètes recombinés que de gamètes parentaux avec des rapports (r) nombre de gamètes recombinés sur nombre de gamètes totaux de 0.47, 0.42 et 0.40 respectivement. Au marqueur C42-2B nous avons dénombré trois gamètes recombinés avec  $\theta = 0.15$ . A ce marqueur, tous les individus portant l'allèle de Melakh sont sensibles au *striga* et, à l'exception de trois individus, tous les individus portant l'allèle de IT97K-499-39 sont résistants au *Striga*. Ces résultats sont en faveur d'une liaison génétique entre le marqueur C42-2B et le gène de résistance au *Striga*.

## **DISCUSSION**

## DISCUSSION

Dans ce travail trois techniques d'extraction d'ADN ont été utilisées. Il s'agit de la méthode d'extraction par Matab, par le DNAZOL et sur papier FTA. Elles ont été employées dans un but d'obtenir de l'ADN en quantité et en qualité suffisante pour les amplifications PCR. Parmi toutes ces techniques d'extraction, une seule a permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Il s'agit de la technique d'extraction par le tampon Matab. Pour obtenir ces résultats nous avons modifié certains paramètres du protocole pour l'adapter au niébé. Ces modifications sont une augmentation de la quantité de feuille à 300 mg, du volume de tampon Matab (850 $\mu$ l) et de Chloroforme Isoamyl Alcool (CIA) à 850  $\mu$ l ainsi que la température d'incubation à 55 °C. À la fin les culots obtenus ont été repris dans 50  $\mu$ l d'eau distillée pendant toute une nuit. Nous avons donc pu observer après quantification sur gel d'agarose des quantités d'ADN variant de 20 à 400 ng. Elles sont de loin supérieures aux quantités obtenues dans nos travaux antérieurs (20 à 100 ng). Ces résultats intéressants obtenus nous ont donc permis de réaliser très facilement nos réactions d'amplifications, mais aussi avoir de l'ADN en quantité suffisante pour la suite des manipulations.

En ce qui concerne les marqueurs SSR utilisés dans cette étude ils ont révélé un polymorphisme faible (6.74 %) sur les lignées élites du programme de sélection du niébé de l'ISRA. Les marqueurs PCR spécifiques ont montré un polymorphisme plus élevé (23%) que les SSR. Cependant le polymorphisme global révélé par l'ensemble des marqueurs demeure faible. Ceci pourrait être expliqué par une proximité génétique du matériel de sélection (i.e. lignées partageant des parents communs dans leur pedigree) ou par une diversité globale limitée chez le niébé. Ce faible taux de polymorphisme chez le niébé est aussi confirmé par les études menées par Kouakou *et al*, 2007 ; Coulibaly *et al*, 2002 ; Diouf et Hilu, 2005 ; Badiane *et al*, 2012).

Dans notre étude, quatre marqueurs ont été polymorphes entre les parents de la population BC1F6 : 3 marqueurs SSR (VM57, VM70, VM75) et un marqueur PCR spécifique (C42-2B). Ces marqueurs ont été utilisés pour génotyper la population BC1F6 et pour analyser leur liaison avec le gène de résistance au *Striga*. L'analyse de l'association phénotype/génotype montre qu'à l'exception du marqueur C42-2B, les autres marqueurs seraient indépendants génétiquement du locus impliqué dans la résistance au *Striga*. Le marqueur C42-2B est lié au locus impliqué dans la résistance au *Striga* avec un taux de recombinaison  $\theta = 0.15$  estimé sur la base de nos effectifs. Une liaison génétique entre C42-2B et le locus impliqué dans la résistance au *Striga* a aussi été trouvé par Li et Timko (2009) et par Asare et ses

collaborateurs (2013). Ouedraogo et ses collaborateurs (2002) ont également identifié des marqueurs AFLP liés à des locus conférant la résistance à la race 1 du *Striga gesnorioides* par un BSA.

À travers ces études 3 marqueurs liés au locus de résistance du striga (*994-Rsg*) se sont illustrés. De manière très intéressante, un taux similaire de recombinaison entre le C42-2B a été observé dans notre étude ( $\theta = 0.15$ ) et dans celle de Asare et ses collaborateurs (2013) ( $\theta = 0.14$ ). Nos résultats confirment donc ceux obtenus dans les études précédentes.

Par ailleurs, dans les précédentes études, le marqueur C42-2B a été trouvé associé au locus impliqué dans la résistance à la race 3 du Striga (Omoigui *et al*, 2009). Or, au Sénégal, les études ont montré que c'est la race 6 du Striga qui était présente (Lane et al, 1996). Nos résultats portent à penser que le locus impliqué dans la résistance à la race 3 du striga serait aussi impliqué dans la résistance à la race 6. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cela : (i) les races 3 et 6 du Striga sont similaires ou très proches donc un gène unique conférerait la résistance aux deux races, (ii) le marqueur C42-2B est proche d'un locus majeur de résistance au Striga et les variations alléliques à ce locus seraient responsables de la résistance spécifique, (iii) au locus de résistance au Striga il existe plusieurs gènes, chacun étant responsable de la résistance à une race donnée du Striga.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour but d'identifier parmi un lot de marqueurs moléculaires qu'on avait à notre disposition, ceux qui étaient liés au gène de résistance du *striga*. Il a permis d'identifier un certain nombre de marqueurs polymorphes parmi lesquels un marqueur (C42-2B) qui est lié au locus impliqué dans la résistance au Striga. C42-2B pourrait donc valablement être utilisé dans une approche de Sélection Assistée par Marqueur (SAM) pour la résistance au Striga. Cependant, nous avons observé environ 15% de recombinaison entre C42-2B et le locus de résistance ce qui implique que ce marqueur aurait une efficacité de 85% si on veut l'utiliser dans un programme de SAM pour suivre la transmission du locus au fil des générations successives de croisement. Il serait donc important, pour la suite de ce travail, de tester de nouveaux marqueurs génétiques pour en trouver des marqueurs plus proche du locus de résistance. L'étude de Asare et ses collaborateurs (2013) a décrit un marqueur (SSR-1) qui serait plus proche du locus de résistance au Striga que ne l'est C42-2B avec une efficacité de discrimination d'environ 93%. Il serait donc intéressant de tester ce nouveau marqueur sur notre population d'étude.

Par ailleurs, dans notre étude, nous avons mis au point un protocole performant de BSA dans les conditions de laboratoire du CERAAS. La BSA ayant été proposée comme une technique efficace pour génotyper un grand nombre d'individus à moindre coût, il serait opportun de développer des populations en ségrégation de plus grandes tailles pour améliorer la résolution de la cartographie du locus de résistance au Striga ce qui aura un effet positif sur l'efficacité de la SAM.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam T.A. (1986). Contribution à la connaissance des maladies du niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) au Niger avec mention spéciale au *macrophomina phaseolina* (Tassi) Goïd. Thèse de doctorat, Université de Rennes I : 128.
- Aggarwal V.D. (1985). Cowpea Striga research. In Singh S.R., Rachie K.O. (Eds). John Wiley and Sons, New York. Cowpea research, production and utilization. 335-340.
- Alisa K., Prakrit S., Norihiko T., Akito K., Duncan A.V. and Peerasak S. (2012). QTL mapping of pod tenderness and total soluble solid in yardlong bean [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata* cv.gr. *sesquipedalis*] faculty of agriculture at kamphaeng saen kasetsart university, nakhon pathom 73140. Thailand.
- Andargie M., Pasquet R.S., Gowda B.S., Muluvi G.M. and Timko M.P. (2011). Construction of a SSR-based genetic map and identification of QTLs for yield and domestication traits using recombinant inbred lines from a cross between wild cultivated cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walp.). Mol. breed. **28**: 413-420.
- Andargie *et al.* (2013). Mapping of quantitative trait loci for floral scent compounds in cowpea (*Vigna unguiculata* L.). Genome. **56(5)**: 289-294.
- Arnheim N., Strange C., Erlich H. (1985) Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of the HLA class II loci. Proc Natl Acad Sci USA. **82**: 6970-6974
- Asare T., Isaac K., Francis K., Emmanuel P.O. and Takrama J.F. (2013). Responses of recombinant imbreed lines [*V. unguiculata* (L.) Walp. ] to *striga gesnoroides* to Ghana. 1st annual international interdisciplinary conference AIIC 2013, 24-26 April, Azores, Portugal.
- Atokple I.D.K., Singh B.B. and Emechebe A.M. (1995). Genetics of résistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea heredity. **86**: 45-49.

- Badiane F.A., Gowda B.S., Cissé N., Diouf D., Sadio O. and Timko M.P. (2012). Genetic relationship of cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walp.) varieties from Senegal based on SSR markers. *Genet and Mol Res.* **11(1)**: 292-304, 2012.
- Berner D.K. and Williams O.M. (1998) .Germination stimulation of *Striga gesnorioides* seeds by hosts and no hosts. *Plant disease.* **82(11)**: 1242-1247.
- Berner D.K., Kling J.G and Singh B.B. (1995). Shigu research and control: a perspective from Africa. *Plant disease.* **79(7)**: 652-660.
- Botanga C.J., Timko M.P. (2006). Phenetic relationships among different races of *Striga gesnorioides* (Willd.) Vatke from West Africa. *Genome.* **49**: 1351-1365.
- Carsky R.J., Akakpo C., Singh B.B., Detongnon J. (2003). Cowpea yield gain from resistance to *Striga gesnorioides* parasitism in Southern Benin. *Experimental Agriculture.* **39**: 327-333.
- Chevalier A. (1944). The cowpea in Africa. *Rev bot appl.* **24**: 128 -152.
- Cissé N., Hall A.E. (2003). Traditional cowpea in Senegal.27 pages . Disponible à l'adresse:[www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/publicat/cowpea\\_Cisse/](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/publicat/cowpea_Cisse/)
- Hausmann B.I.G., Hess D.E., Welz H.G. and Geiger H.H. (2000). Improved methodologies for breeding *Striga*-resistant sorghums. *Field crops res.* **66 (3)**: 195-211.
- Coulibaly S., Pasquet R.S., Papa R. and Gepts P. (2002). AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. Reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. *Theor Appl Genet.* **104**: 358-366.
- De Groote H., Wangare L., Kanampiu F., Odendo M., Diallo A., Karaya H. and Friesen D. (2008). The potential of a herbicide resistant maize technology for *Striga* control in Africa. *Agricultural Systems.* **97**: 83-94.
- De Vienne D. (1998). Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. (2<sup>e</sup> éd). INRA Paris: 200.

- Diouf D., Hilu K.W. (2005). Microsatellites and RAPD markers to study genetic relationship among cowpea breeding lines and local varieties in Senegal. *Genet Res and Crop Evol.* **52**: 1057-1067.
- Dugje I.Y., Omoigui L.O., Ekeleme F., Kamara A.Y., Ajeigbe H. ( 2009). *Farmers' Guide to Cowpea Production in West Africa*. IITA, Ibadan, Nigeria: 20.
- Faye J., Bâ C. O., Dièye P. N., Dansokho M. (2007). Implications structurelles de la libéralisation sur l'agriculture et le développement rural au Sénégal (1950-2006). Rapport première phase Rural Struc. Banque Mondiale/ASPRODEB : 224.
- Fatokun C.A., Tarawali S.A., Sign B.B., Korawa M.P. and Tumo M. (2000). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Proceedings of the 3rd world cowpea conference, september 4-8. International institute of tropical agriculture (IITA Ibadan Nigeria)
- Gupta S.K., Souframanien.J., Gopalakrishna.T. (2008). Construction of a genetic linkage map of black gram, *Vigna mungo* (L.) Hepper, based on molecular markers and comparative studies. *Genome.* **51**: 628-637.
- Hausmann B., Hess D.E., Welz H.G. and Geiger H.H. (2000). Improved methodologies for breeding Striga-resistant sorghums. *Field Crops Res.* **66 (3)**: 195-211.
- Hibberd J.M., Quick W.P., Press M.C. and Scholes J.D. (1996). The influence of the parasitic angiosperm *Striga gesnerioides* on the growth and photosynthesis of its host. *Journal of experimental botany.***47 (297)**:507-512.
- Egbadzor K., Yeboah M., Danquah E.Y., Ofori K. and Offei S.K. (2013). Identification of SNP markers associated with seed size in cowpea [*V. unguiculata* (L.) Walp.]. *International journal of plant breeding and genetics.***7**: 115-123.
- Harlan H.V., Pope MN. (1922). The germination of barley seeds harvested at different stages of growth. *Journal of Heredity.***13**:72–75.

Koffy N., Koussémon M., Alloue-Boraud W.A.M. and Kouassi K. (2013). Assessing the microbiological level and the incidence of water-soaking on the proximate composition of two cultivars of cowpea [*V. unguiculata* (L.) Walp. ] grains grown in Côte d'Ivoire. British Microbiol. Res. Journ. **3(3)**: 206-217.

INRA. (2012). Génétique et amélioration des plantes. Disponible à l'adresse suivante : [https://www6.paca.inra.fr/institut\\_sophia\\_agrobiotech/Enseignement\\_Formation/Master-recherche/Genetique\\_Immunité\\_Developpement-Animal-ou-Vegetal/Genetique\\_et\\_amelioration\\_des\\_plantes](https://www6.paca.inra.fr/institut_sophia_agrobiotech/Enseignement_Formation/Master-recherche/Genetique_Immunité_Developpement-Animal-ou-Vegetal/Genetique_et_amelioration_des_plantes). Consulté le 25 novembre 2013.

Kuiper E., Verkleij J.A.C., Pieterse A.H. (1996). Differences in the primary dormancy pattern of *Striga* species; an ongoing study. In M.T. Moreno, J.I. Cubero, D. Berner, D. Joel, L.J. Musselman., Parker C. (eds). Advances in parasitic plant research. Junta de Andalucia, Cordoba, Spain. Proceedings 1 of the 6th international parasitic weed symposium. 441-450.

Kouakou C.H., Macauley H.R., Guey .M.C., Otto M.C., Rami J.F., Cissé N., Pasquet. S. (2007). Diversité génétique des variétés traditionnelles de niébé [*V. unguiculata* (L.) Walp.] au Sénégal : Etude préliminaire. Plant Genetic Ressources Newsletters. 152-155.

Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A. and Dalyet M.J. (1987). MapMaker: an interactive computer package for constructing genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics.**1**: 174-181.

Lane J.A., Child D.V., Reiss G.C., Entcheva V., Bailey J.A. (1997). Crop resistance to parasitic plants. In the gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions. Crute IR, Holub E.B., Burdon J.J. CAB international, wallingford, Oxon, UK. 81-97. *Vigna unguiculata*. Journal of experimental botany. **47**: 507-512.

Lane J.A., Moore T.H.M., Child D.V., Bailey J.A. (1997). Variation in virulence of *Striga gesnorioides* on cowpea: new sources of crop resistance. In Singh B.B., Mohan D.R., Dashiell K.E., Jackai L.E.N. (eds). Co publication of international institute of tropical agriculture (IITA) and Japan international research center for agricultural sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria. Advances in cowpea research. 225-230.

- Lane J.A., Bailey J.A, Butler R.C. and Terry P.J. (1993). Resistance of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ] to *Striga gesnorioides* (Willd.) Vatke, a parasitic angiosperm. *New Phytologist*. **125**: 405-412.
- Lane J.A., Moore T.H.M., Child D.V., Cardwell K.F, Singh B.B., Bailey J.A. (1994). Virulence characteristics of a new race of the parasitic angiosperm, *Striga gesnorioides*, from southern Benin on cowpea (*Vigna unguiculata*). *Euphytica*. **72**: 183-188.
- Li J. and Timko M.P. (2009). Gene-for gene resistance in *Striga*-cowpea associations. *Science*. **325**: 1080 -1094.
- Li CD., Rosnagel. B.G., Scoles. G.J. (2000). The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. **101**: 1259-1268.
- Lucas M.R, Ehlers J.D., Roberts.P.A. and Close T.J. (2012). Markers for quantitative inheritance of resistance to foliar thrips in cowpea. *Crop Sci*.**52**: 2075-2081.
- Lucas M.R., Diop N.N., Wanamaker S., Ehlers J.D., Roberts P.A., Close T.J. (2011). Cowpea-soybean synteny clarified through an improved genetic map. *Plant Genome*. **4**: 218-225.
- Luiz G. E., Roberto. C., Ricardo.B . (2006). The Nutritive Value of Eight Varieties of Cowpea (*Vigna sinensis*). *Journal of Food Science*.**29**. 118–122.
- Lutz W. and Samir K.C. (2011). Dimensions of global population projections: what do we know about future population trends and structures *Phil. Trans R Soc B*. **365**: 2779-2791.
- Marechal R., Mascherpa. J. M., Stainier .F. (1978). Etude taxonomique d'un groupe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (*Papilionaceae*) sur la base des données morphologiques, traités pour l'analyse informatique. *Boissiera*. **28**: 1-273.
- Michelmore RW., Paran I., Kesseli .R.V. (1991). Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**: 9828-9832

- Moore T.H.M., Lane J.A., Child D.V., Arnold G.M., Bailey J.M. and Hoffmann G. (1995). New sources of resistance of cowpea [*V. unguiculata* (L.) Walp. ] to *Striga gesnerioides*, a parasitic angiosperm. *Euphytica*. **84**: 165-174.
- Muchero W., Diop N.N., Bhat P.R, Fenton R.D., Wanamaker S., Pottorff M., Hearne S., Cissé N., Fatokun C., Ehlers J.D., Roberts P.A. and Close T.J.( 2009). A consensus genetic map of cowpea [ *Vigna unguiculata* (L) ] and synteny based on est-derived SNPs. *Proc. natl. acad. sci. USA*. **106**:18159-18164.
- Okonkwo S. N. C. and woke N. (1978). Initiation, development and structure of the Primary haustorium in *Striga gesnerioides* (*Scrophulariaceae*). *Ann bot.* **42**: 445-463.
- Okonkwo S.N.C. (1991). The germination of *Striga* a review. In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D., Parker C. (eds). *Proceedings of the 5th international symposium of parasitic weeds*. CIMMYT, Nairobi, Kenya. 144-154.
- Omoigui I.O., Timko M.P., Ishiyaku F.S., Ousmane B., Muranaka B.S, Kamara A.Y. and Yeye M.Y. (2009). Molecular characterization of cowpea breeding line for *Striga* resistance using FTA technology. *African Crop Science Conference, Uganda*. **9**: 527-530.
- Ouédraogo J.T., Tignegre J.B., Timko M.P. and Belzile F. J. (2002). AFLP markers linked to resistance against *Striga gesnerioides* race 1 in cowpea [ *V. unguiculata* (L.) Walp.] . *Genome*. **45**: 787-793.
- Ouédraogo J.T., Maheshwari V., Berner D.K., St-Pierre C.-A., Belzile F. and Timko M.P. (2001). Identification of AFLP markers linked to resistance of cowpea [ *V. unguiculata* (L.) Walp. ] to *Striga gesnerioides*. *Theor Appl Genet*. **102**: 1029-1036.
- Parker C. and Polniaszek T.I. (1990). Parasitism of cowpea by *Striga gesnerioides*: Variation in virulence and discovery of a new source of host resistance. *Ann Appl Biol*. **116**: 305-311.
- Pei Xu, Wu X., Wang B., Liu Y., Ehlers J.D., Close T.J., Roberts P., Diop N.N., Qin D., Hu T., Lu Z. and Li G. (2011). A SNP and SSR based genetic map of asparagus bean (*Vigna*.

*Unguiculata* ssp.*sesquipedialis*) and comparison with the broader species. *HortSci.* **46**:1102-104.

Rachie K O. (1985). Nutritive Value of Cowpea. In: cowpeas research, production and utilization, Singh S.R., Rachie K.O. (eds.). John Wiley and Sons, New York, USA: 21-23.

Sauerborn J., Müller-Stöver D., Hershenhorn .J. (2007). The role of biological control in managing parasitic weeds. *Crop Protection.* **26**: 246-254.

Thalouarn P. and Fer A. (1993). Le *Striga*, un ravageur de cultures vivrières: le point sur les connaissances récentes et sur les méthodes de lutte. *Cahiers agricultures.* **2**: 167-182.

Touré M., Olivier A., Ntare B.R., Lane J.A. and St-Pierre C.A. (1998). Reaction of cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars to *Striga gesnerioides* races from Mali and Niger. *Canadian Journal of plant science.* **78**: 477-480.

Touré M., Olivier A., Ntare B.R., Lane J.A. and St-Pierre C.A. (1997). Inheritance of resistance to *Striga gesnerioides* biotypes from Mali and Niger in cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walp.). *Euphytica.* **94**: 273-278.

Vissoh P.V., Gbèhounou G., Ahanchédé A., Röling N.G. and Kuyper T.W. (2008). Evaluation of integrated crop management strategies employed to cope with *Striga* infestation in permanent land use systems in southern Benin. *Inter. Journ. of Pest Manag.* **54(3)**: 197-206.

Worsham A.D. (1987). Germination of witchweed seeds. In Musselman L.J. (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A. *Parasitic weeds in agriculture.* **1**: 45-61.

Wunderlin R.P., Musselman L.J., Shuey A.G. (1979). *Striga gesnerioides* (*scrophulariaceae*), first record of the species in the new world. *Plant Disease Reporter.* **63(4)**: 251-252.

Zahran E., Sauerborn J., Elmagid A.A., Abbasher A.A., Müller .S .D. (2008). Granular formulations and seed coating: delivery options for two fungal biological control agents of *Striga hermonthica*. *Journ. of Plant Dis. and Prot.* **115(4)**: 178-185.

## **ANNEXES**

## **ANNEXE 1**

### **Marqueurs SNP, PCR spécifique**

Amorce code	Sequence (5'>3')	Température d'hybridation
6673F	AAGAGGTGCTTTATAAGAAG	55
6673-1R	CAGGACCGATCATTTC AAATA	55
6673-2R	CAGGACCGATCATTTC AAATG	55
10811F	CAAGTACATTTACAAGTCAC	55
10811-1R	AATAAGATGAGGACGTACAAG	55
10811-2R	AATAAGATGAGGACGTACAAA	55
17133F	CCGTCCTCTGCTTCCTCTGA	55
17133-1R	ACATAGCAATAGCACTCATC	55
17133-2R	ACATAGCAATAGCACTCATG	55
439F	TCAAAGGAGTATGTGCATAT	55
439-1R	ACTCAAATTATCTATGTACCG	55
439-2R	ACTCAAATTATCTATGTACCC	55
1989-1F	TGGTCCAACAAGCAACAAAT	55
1989-2F	TGGTCCAACAAGCAACAAAC	55
1989R	TGAAGA ACTGATTGGAGAGC	55
13665-1F	TGTTCTTAGACGCACCATGCT	55
13665-2F	TGTTCTTAGACGCACCATGCC	55
13665R	ATGATTCTCAACCCACCTT	55

## **ANNEXE 2**

### **PCR spécifique C42-2B**

Amorce code	Sequence (5'>3')	Température d'hybridation
C42B-2B F	CAAGCTCATCATCTCGATG	55
C42B-2B R	CAGTTCCTAATGGACAAACC	55

### **ANNEXE 3**

#### **Marqueurs SSR (Li *et al.*, 2000)**

Amorce Code	Sequence (5'>3')	Température d'hybridation
VM118	GTGGGAGTTAACGAATGATGAAA	57
VM118	CCGAAGAGTAACTAGGACCAAT	
VM2	GTAAGGTTTGGAAAGAGCAAAGAG	55
VM2	GGCTATATCCATCCCTCACT	
VM3	GAGCCGGGTTCAATAGGTA	55
VM3	GAGCCAGGGCACAGGTAGT	
VM4	AGTAAATCACCCGCACGATCG	55
VM4	AGGGGAAATGGAGAGGAGGAT	
VM5	AGCGACGGCAACAACGAT	55
VM5	TTCCCTGCAACAAAAATACA	
VM6	GAGGAGCCATATGAAGTGAAAAT	55
VM6	TCGGCCAGCAACAGATGC	
VM11	CGGGAATTAACGGAGTCACC	61
VM11	CCCAGAGGCCGCTATTACAC	
VM14	AATTCGTGGCATAGTCACAAGAGA	55
VM14	ATAAAGGAGGGCATAGGGAGGTAT	
VM15	CGGCTGCAGCAAACAAGAG	55
VM15	AAACCCGTGCAAGAAACCAA	
VM16	TCCTCGTCCATCTTCACCTCA	55
VM16	CAAGCACCGCATTAAAGTCAAG	
VM24	TCAACAACACCTAGGAGCCAA	55
VM24	ATCGTGACCTAGTGCCACC	
VM26	GGCATCAGACACATATCACTG	55
VM26	TGTGGCATTGAGGGTAGC	
VM41	TGAATTCGTGGCATAGTCA	50
VM41	TAAAGGAGGGCATAGGGAGGTA	
VM42	CCCGAACCAGCAGCAGT	54
VM42	TGGATTCGTGGCAGATAAA	
VM44	TGGATTCGTGGCAGATAAAT	52
VM44	ACGCTCCACGGTGAAGATGT	
VM46	TGAATTCGTGGCAAAACTC	53
VM46	CCCTGGACGGAAGACTC	
VM51	CATTGCCACTGGTTTCACTTA	53
VM51	GAGGCTCAGCATTTTGTCTAT	
VM53	GAGTTCCGTTTCGTTGTGAGTAGAG	53
VM53	ACAGAGGAGGAAAAGGAAGTATGC	

### Marqueurs SSR (Li *et al.*, 2000)

VM66	AAACAACAGAAAGGGAGAACTAAA	52
VM66	TTGCAAGAAGAATGTGAGGTGT	
VM68	CAAGGCATGGAAAGAAGTAAGAT	55
VM68	TCGAAGCAACAAATGGTCACAC	
VM73	CGGCGTGATTTGGGGAAGAAG	61
VM73	CTAGTAACGGCCGAGTGTCTCTG	
VM74	CTGCTACACCTTCCATCATTC	58
VM74	CCTTTGCTGTGTGGTGGTTT	
VM81	TGTCAAGTGCTGGAGGATTATTCT	60
VM81	ACCCCAACCAAAAACAACAACAT	
VM86	CCGCGACACTATTCCTACTACTAA	61
VM86	GGACCAATCGTTTCGTTCAA	
VM94	TCGAACTTTGGCTTGAGG	62
VM94	TGTCGTTTTGTCCCCATTA	
VM8	TGGGATGCTGCAAAGACAC	55
VM8	GAAAACCGATGCCAAATAG	
VM9	ACCGCACCCGATTTATTTTCAT	55
VM9	ATCAGCAGACAGGCAAGACCA	
VM10	TCCCACTCACTAAAATAACCAACC	55
VM10	GGATGCTGGCGGCGGAAGG	
VM12	TTGTCAGCGAAATAAGCAGAGA	55
VM12	CAACAGACGCAGCCCAACT	
VM17	GGCCTATAAATTAACCCAGTCT	48
VM17	TGTGTCTTTGAGTTTTTGTCTAC	
VM20	GGGGACCAATCGTTTCGTTT	55
VM20	ATCCAAGATTCGGACACTATTCAA	
VM22	GCGGGTAGTGTATAACAATTTG	55
VM22	GTAAGTTCCATGGAAGATCT	
VM23	AGACATGTGGGCGCATCTG	61
VM23	AGACGCGTGGTACCCATGTT	
VM27	GTCCAAAGCAAATGAGTCAA	55
VM27	TGAATGACAATGAGGGTGC	
VM28	GAATGAGAGAAGTTACGGTG	55
VM28	GAGCACGATAATATTTGGAG	
VM30	CTCTTTCGCGTTCACACTT	61
VM30	GCAATGGGTTGTGGTCTGTG	

**Marqueurs SSR (Li *et al.*, 2000)**

VM35	GGTCAATAGAATAATGGAAAGTGT	55
VM35	ATGGCTGAAATAGGTGTCTGA	
VM39	GATGGTTGTAATGGGAGAGTC	55
VM39	AAAAGGATGAAATTAGGAGAGCA	
VM48	TGGAACAATAAACTAACCTCTCA	50
VM48	TACCTCCACACTCTCCCTCAT	
VM49	GATCTTCCCGTTGTCTCTTTTT	52
VM49	ATCCGTGCTTGGTTTATTTATTCC	
VM55	GCGCCGCGCGACACTATT	54
VM55	GTTGCCGGTGACCAATCGTTT	
VM57	GGAAGGGGTAGAGGAAAAGTGAA	54
VM57	TGATGATGATGGGTGAATGAGTTG	
VM65	CGCCGCGACACTATTCACTACACT	54
VM65	CGGGGACCAATCGTTTCGTTCA	
VM70	AAAATCGGGGAAGGAAACC	55
VM70	GAAGGCAAATACATGGAGTCAC	
VM1	CACCCGTGATTGCTTGTTG	55
VM1	GTCCCCTCCCTCCACTG	
VM18	AGCCGTGCACGAAATGAT	55
VM18	TGGCCTCTACAACAACACTCT	
VM31	CGCTCTTCGTTGATGGTTATG	55
VM31	GTGTTCTAGAGGGTGTGATGGTA	
VM32	GAAAAAGGGAGGAACAAGCACAAC	55
VM32	AGCGAAAACACGGAACACTGAAATC	
VM33	GCACGAGATCTGGTGCTCCTT	55
VM33	CAGCGAGCGCGAACC	
VM34	AGCTCCCCTAACCTGAAT	55
VM34	TAACCCAATAATAAGACACATA	
VM37	TGTCCGCTTCTATAAATCAGC	55
VM37	CGAGGATGAAGTAACAGATGATC	
VM38	AATGGGAAAAGAAAGGGAAGC	55
VM38	TCGTGGCATGCAGTGTGAG	
VM50	TAGCACGTGCGGGGAAAGAAA	54
VM50	CACCCAAACGATGACAATGA	
VM52	GTGTATATGGGTTCTGTGAT	51
VM52	CTGCATTACGCGCTAGTTTCTCT	
VM54	CACACACACACATAGATATAG	49
VM54	TCCATCACTGATCACCTGTT	
VM56	GACTGCCAATCATTTTCGTTCAA	54
VM56	TGCCAGATTCGGACACTATTCAA	

### Marqueurs SSR (Li *et al.*, 2000)

VM58	TGGTGTTATTTTAAGGTGAAC	52
VM58	CGATGCGCAACCACTCA	
VM59	AGTAAATTGGTCCCTCCTCT	48
VM59	ACCACTACTAATATAAGCCACAAT	
VM62	CGACTCTTATACCACTTTGTT	47
VM62	CTTTTAATAGCCCGTCTCAGTTC	
VM63	CGGGGACCAATCGCTTCGTT	57
VM63	TGCCAGATTCGGACACTATTCAAA	
VM64	AATCCAGAAGTTTGTGAGC	49
VM64	AGTTTTCTAATATTTGAGGTCCAT	
VM67	CGCCGTTGTCGAGGACCAA	50
VM67	CCAACTCAACCACACCTGAA	
VM71	TCGTGGCAGAGAATCAAAGACAC	55
VM71	TGGGTGGAGGCAAAAACAAAAC	
VM72	TGCTGAAGTGAACAATCGC	55
VM72	CCTTCTCCAACAACCTCTAC	
VM75	TGTGGTCCAATTTACCTTACA	58
VM75	GGTGAGTGTAGGAGCTAGAA	
VM76	CAAGCCAAGAAGGATCAACAAAC	58
VM76	TCCTAAACGAATGCAACTAAAT	
VM77	TCCACCCTCCACTTCATCTTTC	58
VM77	CGTGACTACTACTCGATAGAGA	
VM78	GGATACCCATACCCGCTAAAC	58
VM78	ACATCAATGCCTCCACAGTATCT	
VM79	AATCAAACAACAGAAAGGGAGAAC	58
VM79	AAGGGTGTGGTGGAGTGAGG	
VM80	GATCATGCAACACTCGGTCGTA	60
VM80	GTGTTGGTATAGCCTTGATTGGTG	
VM82	GAATTCGTGACAAGTGTGTAT	56
VM82	GCTAGTTTCTCCTCAATT	
VM83	CCGCGACACTATTCACTACACT	62
VM83	GGGGACCAATCGTTTCGTTCAA	
VM84	CGAACTGCATCAACTCCCTCAACC	65
VM84	CTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCT	
VM85	ATTCGTGGAGCCTCTGAAGGT	62
VM85	CACGAGTTGTGGCTTGTGACA	
VM87	GTGGGGTATGGCCTCTATCAA	62
VM87	GCCGCGACACTATTCATTCTACAT	
VM88	GGGTGCGTGCGTTTCGTA	61
VM88	AATGCGACAACACAACTCACAT	
VM89	CGCCGTTGTCGAGGACCA	60
VM89	CCAACTCAACCACACCTGAA	
VM90	AACCACCTCATCTTCTTCC	59
VM90	ATGTGATCCGTTGGTATTTT	

### **Marqueurs SSR (Li et al., 2000)**

VM95	TCCACCCCAACCTCTCGTC	59
VM95	TTGGATGTTGGGGTTGTGT	
VM96	CAGTCCCCCAGCCTTGCTA	62
VM96	AAAACCGTCACCGATCCTATCTAT	
VM97	TTCGTGCTGATTTTATTAGATGAC	56
VM97	CAAATAGAGAAATAGAGGAAGAA	
VM98	GGAAGCCTTTGGAAATTGATG	58
VM98	CCCTACATTGAAGGTCAACAA	
VM99	AGAGCAAAGAGGGAGAAACAAG	61
VM99	GGTGCTGGTGATGCTAAGATAA	
VM100	TTTCGGTTCGCCTTCCCG	60
VM100	AACCCACCTGCAAAACAAC	

### **ANNEXE 4**

#### **Que M13**

Que M13	CACGACGTAAACGAC
---------	-----------------