

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**

**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE**



Mémoire présenté et soutenu publiquement le 25 Juin 2016 au Département  
de Biologie Végétale pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologies Végétales et  
Microbiennes

**Développement de nouveaux marqueurs microsatellites à partir du  
transcriptome du fonio chez les espèces cultivés (*Digitaria exilis*,  
*Digitaria iburua*) et sauvage (*Digitaria longiflora*)**

**Par: Katina Floride OLODO**

**Devant le jury composé de:**

<b>Président de Jury :</b> M. Diegane DIOUF	Maître de Conférences	UCAD
---	-----------------------	------

**Membres du Jury :**

M. Diaga DIOUF	Professeur Titulaire	UCAD
----------------	----------------------	------

Mme Marie Madeleine SPENCER-BARRETO	Maître de Conférences	UCAD
-------------------------------------	-----------------------	------

Mme Adeline BARNAUD	Chargée de recherche	IRD
---------------------	----------------------	-----

**Année académique 2015-2016**

# Table des matières

Résumé .....	iv
Dédicaces .....	v
Remerciements .....	vi
Liste des tableaux .....	viii
Liste des photos .....	viii
Liste des figures .....	viii
Liste des annexes.....	ix
Liste des sigles et acronymes .....	ix
Liste des sigles et abréviations .....	ix
I. Introduction.....	1
1. Contexte et problématique .....	1
2. Objectifs de l'étude .....	3
2.1. Objectif global.....	3
2.2. Objectifs spécifiques .....	3
II. Revue bibliographique .....	4
1. Généralités sur les fonios .....	4
1.1. Les fonios, un potentiel pour la résilience des systèmes agricoles en Afrique de l'Ouest	4
1.2. Généralité sur le genre Digitaria .....	5
1.2.1. Taxonomie .....	5
1.2.2. Description botanique, aire de répartition et histoire évolutive des fonios .....	5
1.3. Relations entre espèces.....	9
1.4. La diversité des fonios.....	9
2. Les marqueurs moléculaires comme outils d'analyse de diversité génétique .....	10
2.1. Généralité sur les marqueurs moléculaires.....	10
2.2. Les microsatellites (SSR).....	10
2.3. Développement des marqueurs SSR .....	12
2.4. Le transcriptome.....	13
3. La complexité de l'analyse des données générées par les SSR chez les espèces polyploïdes .....	13

3.1.	La polyploidie .....	13
3.2.	L'analyse des données générées par les SSR chez les espèces polyploïdes .....	14
III.	Matériel et Méthodes.....	16
1.	Matériel Végétal.....	16
2.	Méthodologie .....	17
2.1.	Extraction d'ADN .....	17
2.2.	Identification des marqueurs SSR.....	18
2.3.	Test d'amplification des marqueurs .....	18
2.4.	Génotypage des accessions .....	22
2.5.	Lecture des résultats .....	23
2.6.	Analyses des données.....	23
IV.	Résultats .....	25
1.	Caractéristiques des marqueurs.....	25
2.	Diversité allélique et allèles privés par espèces .....	28
3.	Différentiation et relation génétique entre espèces .....	30
V.	Discussion.....	35
1.	Amplification .....	35
2.	Transférabilité des marqueurs entre espèces.....	35
3.	Relation entre espèces.....	36
5.	Comparaison des méthodes de développement des SSR chez le fonio et leurs différentes implications. ....	37
6.	Ressources génétiques : les fonio cultivés et sauvages un réservoir de diversité à explorer et à conserver.....	38
	Conclusion et perspectives.....	40
	References bibliographiques .....	41
	Annexe	

## Abstract

White fonio (*Digitaria exilis* Stapf) and black fonio (*Digitaria iburua* Stapf) are key resources for food and nutrition security in West Africa. However, they remain neglected by research and agricultural policies due to a still incomplete knowledge of the crops and their wild relative's genetic resources. Characterizing genetic diversity is a prerequisite for any improvement program. These studies require proficient molecular tools, which are useful tools for quantifying genetic variation and, by providing an effective way to link phenotype and genotype. Among these, simple sequence repeat markers (SSR) have taken an utmost importance. However, only 38 SSR markers of which 21 polymorphic are listed for *D. exilis* and none for its relatives. This study aims to develop new SSR markers for *D. exilis* and provide a first marker set for *D. iburua* and *D. longiflora*.

Thirty-seven primer pairs were designed from fonio's transcriptome and tested for their ability to amplify across forty-seven fonio's accessions (32 *D. exilis*, 10 *D. longiflora* and 5 *D. iburua*). Clear amplification profiles were observed for twenty-four primers pairs generating a total of 104 alleles in all three species. The percentage of amplification observed were 65%, 62% and 46% for *D. exilis*, *D. longiflora*, *D. iburua* respectively, and transferability range of this markers was 95.2% and 71% to *D. longiflora* and *D. iburua* respectively. For most markers, genotypic profile was 1-2 alleles per accession except for three markers that show 2-4 alleles per individual and one marker, which showed 2-6 alleles in one accession. The number of allele per locus varies from 1 to 14 with an average of  $4.33 \pm 2.27$  by marker. The polymorphic information content (PIC) in developed markers varies from 0.04 to 0.83. The number of polymorphic markers obtained is relatively high in *D. exilis* and *D. longiflora*. *D. iburua* has a low polymorphism rate. As expected, these new SSR reflect the greater taxonomic proximity between *D. exilis* and *D. longiflora* and highlight the usefulness of wild relatives as potential tank to improve cultivated plant. These new microsatellites markers complement the molecular tools and may lead to future diversity studies in fonio's species.

**Keywords:** Fonio, Transcriptome, Simple Sequence Repeat (SSR), wild relatives, genetic diversity

## Résumé

Le fonio blanc (*Digitaria exilis* Stapf) et le fonio noir (*Digitaria iburua* Stapf) sont des ressources clés pour l'alimentation et la sécurité nutritionnelle en Afrique de l'Ouest. Cependant, ils restent négligés par la recherche et les politiques agricoles en raison d'une connaissance encore incomplète des ressources génétiques existantes et des parents sauvages. Caractériser la diversité génétique est une condition préalable à tout programme d'amélioration. Ces études nécessitent des outils moléculaires efficaces. Les marqueurs moléculaires sont des outils utiles pour quantifier la variation génétique et fournissent un moyen efficace pour associer le phénotype à son génotype. Parmi ces marqueurs, les microsatellites (ou SSR) ont pris une importance capitale. À ce jour, seulement 38 marqueurs SSR dont 21 polymorphes ont été répertoriés pour *D. exilis* et aucun marqueur n'a été publié pour ses apparentées. Cette étude vise à développer de nouveaux marqueurs SSR pour *D. exilis* et fournir les premiers marqueurs chez *D. iburua* et *D. longiflora*.

Trente-sept couples d'amorces ont été développés à partir du transcriptome du fonio (*D. exilis*) et testés sur quarante-sept accessions couvrant l'aire de répartition de ces espèces en Afrique de l'Ouest (32 *D. exilis*, 10 *D. longiflora* et 5 *D. iburua*). L'amplification a été observée pour vingt-quatre marqueurs générant un total de 104 allèles chez les trois espèces. Les pourcentages d'amplifications observés étaient de 65%, 62% et 46% pour *D. exilis*, *D. longiflora*, et *D. iburua* respectivement. Les taux de transférabilité de ces marqueurs étaient respectivement de 95,2% et 71% pour *D. longiflora* et *D. iburua*. Pour la plupart des marqueurs, le profil génotypique observé était de 1-2 allèles par accession, sauf pour trois marqueurs qui ont montré 2-4 allèles par accession et un marqueur qui a montré 2-6 allèles dans une accession. Le nombre d'allèle observé par locus varie de 1 à 14 avec une moyenne de  $4,33 \pm 2,27$  par marqueur. Le contenu polymorphique (PIC) chez les marqueurs développés varie de 0,04 à 0,83. Le nombre de marqueurs polymorphes obtenus est relativement élevé chez *D. exilis* et *D. longiflora* tandis que *D. iburua* a un taux de polymorphisme faible. Ces nouveaux SSR confirment la plus grande proximité taxonomique entre *D. exilis* et *D. longiflora* et soulignent l'utilité des apparentés sauvages comme un réservoir potentiel de diversité pour l'amélioration des plantes cultivées. Ces nouveaux marqueurs microsatellites complètent les outils moléculaires et laissent supposer d'intéressantes études sur la diversité du fonio.

**Mots-clés :** Fonio, Transcriptome, microsatellites (SSR), espèces apparentées, diversité génétique

## Dédicaces

*A*

*Mon père, OLODO A. Michel, pour les multiples efforts qu'il consent chaque jour pour mon instruction. Puisse Dieu te bénir et te garder aussi longtemps près de moi pour que tu puisses jouir des fruits de tes efforts.*

*Ma mère AGBO L. Evelyne pour ses conseils et son amour. Reçois en ces lignes mes sincères remerciements. Puisse Dieu te bénir et te donner longue vie à mes côtés.*

## Remerciements

Le présent travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'Office Allemand d'Echanges Universitaires (DAAD) en collaboration avec le Centre d'Etudes Régional pour l'Amélioration et l'Adaptation à la Sécheresse (CERAAS). Il s'inscrit conjointement dans le Projet « Caractérisation, Valorisation et Conservation des Ressources Phylogénétiques du fonio au Sénégal (2013-2016, WAAPP 2), et du Projet ARCAD (2009-2014): Agropolis Ressources Center for Crop Conservation, Diversity and Adaptation.

Cette étude a été réalisée dans le Laboratoire National de Recherche sur les Productions Végétales (LNRPV) de l'Unité de Recherche en Culture *in vitro* (URCI) de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) de Bel-Air d'une part. D'autre part sur la plateforme de Biologie Moléculaire du LMI LAPSE (Laboratoire Mixte International Adaptation des Plantes et Microorganismes associés aux Stress Environnementaux), de concert avec la plateforme de génotypage du CIRAD (Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement). Au terme de cette étude, nous tenons à exprimer nos sincères et profondes gratitude à certaines personnes grâce à qui nous avons pu réaliser ce travail. C'est donc l'occasion pour nous de remercier :

- Dr. Ndiaga CISSE, Directeur du CERAAS qui volontiers, a accepté de nous accueillir très chaleureusement au CERAAS ;
- Dr. Daniel FONCEKA, Coordonnateur Scientifique du CERAAS pour vos conseils, vos orientations;
- Dr. Adeline BARNAUD, Chargée de recherche à l'ISRA, pour votre dévouement, votre patience, votre rigueur scientifique tout le long de notre travail malgré vos multiples occupations. Merci infiniment pour votre encadrement ;
- Dr. Mame Codou GUEYE CISSE, Chercheur au CERAAS, pour vos conseils, votre gentillesse et votre soutien inébranlable ;
- Dr. Marie-Madeleine BARRETO-SPENCER, Enseignant-chercheur à l'UCAD, pour votre encadrement et votre intérêt pour cette thématique malgré vos nombreuses occupations. Merci infiniment pour vos orientations et vos suggestions ;
- Dr. Claire BILLOT pour vos diverses contributions dans ce travail sans lesquelles ce travail n'aurait pas débuté ;
- Pr. Ibrahima NDOYE, Coordonnateur du Master BIOVEM, pour votre simplicité et votre charisme. Merci pour votre contribution à la résolution des difficultés liées à notre inscription à l'UCAD ;

- La Directrice du LNRPV, Dr. Yacine Badiane NDOUR, pour avoir accepté notre demande de stage au sein de l'URCI ;
- Les membres de jury Professeur Diaga Diouf et Dr. Diegane Diouf pour avoir accepté évaluer ce travail ;
- Pr. Dr. Ir. Léonard Essè AHOTON, Enseignant-Chercheur à l'UAC/FSA qui m'a assisté tant sur le plan scientifique que social jusqu'à la fin de cette étude ;
- Mes professeurs de la Faculté des Sciences Techniques de l'UCAD ;
- Le personnel administratif, Technique et Scientifique du CERAAS et du LNRPV notamment Mme Mariama SENGHOR pour votre disponibilité et votre appui sans limite ;
- Les chargés de recherche, Dr. Cécile BERTHOULY-SALAZAR, Dr. Ndjido KANE, vos diverses contributions au cours des animations scientifiques ont permis d'améliorer la qualité scientifique de cet travail ;
- Les techniciens du CIRAD particulièrement Caroline CALATAYUD pour votre aide ;
- Les techniciens du LNRPV Binta NDAO et Adama Ndiaye pour votre aide ;
- Mes camarades de promotion du Master 2 BIOVEM pour leur sympathie, et particulièrement mes camarades boursiers DAAD, Ange ZOCLANCLOUNON, Joseph DEMBELE, Kodjo Mawuena GBEDEVI ; Nadre GBEDIE pour l'ambiance fraternelle qui a toujours régné parmi nous ;
- Les doctorants du LNRPV, particulièrement Omar Diack, Abdoulaye NGOM, et Baye Maguette DIOP, Claude GNACADJA pour leur assistance ;
- Les doctorants du CERAAS Arlette Zazou ZAIYA, Komivi DOSSA, Romaric N'GUEDJOP, GANYO Kyky, Jack AKATA et les « nouveaux docteurs » Thierry TOVIGNAN, Emile AGBANGBA, pour leur encouragement ;
- Les Chercheurs du Nigéria, Valentine NTUI et Edak UYOH pour la collaboration et les accessions en provenance du Nigéria ;
- Mes amis de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'UAC, et particulièrement Johannes FAGBOHOUN pour l'affection partagée et la bienveillance à mon égard.

Enfin mes remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification taxonomique du genre <i>Digitaria</i> selon Cronquist (1981).....	5
Tableau 2 Collection et nombre d'échantillon par espèce .....	16
Tableau 3 : Liste des marqueurs microsatellites étudiés .....	20
Tableau 4 : Bilan test amplification : Polymorphisme, Profil génotypique, et Taille observée .....	26
Tableau 5 : Hétérozygotie observée (Ho), et attendue (He) par espèce pour les marqueurs à profil "diploïde". .....	28
Tableau 6 : Nombre d'allèle, Contenu polymorphique, et fréquences alléliques .....	29

## Liste des photos

Photo 1 : Plant de <i>D. exilis</i> .....	6
Photo 2 : Graine de <i>D. iburua</i> et <i>D. exilis</i> .....	6
Photo 3: Plant de <i>D. longiflora</i> .....	8
Photo 4 : Gels générés par l'amplification des microsatellites De-arc 034 et De-arc 01 sur <i>D. exilis</i> .....	25

## Liste des figures

Figure 1 : Distribution de <i>D. exilis</i> et <i>D. iburua</i> en Afrique de l'Ouest.....	6
Figure 2 : Carte de distribution géographique des accessions. ....	16
Figure 3 : Profil génotypique des marqueurs par espèces .....	27
Figure 4 : Polymorphisme de marqueurs par espèce.....	27
Figure 5 : Diversité allélique par espèces.....	30
Figure 6 : Analyse Factorielle sur les 46 Accessions de fonio avec les 17 marqueurs communs aux 3 espèces. ....	31
Figure 7 : Dendrogramme des 46 accessions avec les 17 SSR communs aux espèces.....	32
Figure 8: Estimation du nombre de K sur 46 accessions après 10 répliquât de chaque K.....	33
Figure 9 : Estimation du nombre de populations par une analyse bayésienne de type STRUCTURE.....	33
Figure 10 : Estimation du nombre de K sur 41 accessions après 10 répliquât de chaque K...34	

Figure 11 : Estimation de l'introggression entre *D. exilis* (rouge) et *D. longilflora* (vert). ..... 34

## Liste des annexes

Annexe 1 : Référence des 47 accessions étudiées

Annexe 2 : Poster

## Liste des acronymes

**ARCAD:** Agropolis Ressources Center for Crop Conservation, Diversity and Adaptation

**CERAAS :** Centre d'Etudes Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse

**CIRAD :** Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement

**FAO :** Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

**IRD:** Institut de Recherche pour le Développement

**ISRA :** Institut Sénégalais pour la Recherche Agricole

**LMI-LAPSE :** Adaptation des Plantes et Microorganismes associés aux Stress Environnementaux

**LNRPV :** Laboratoire National de Recherches sur les Productions Végétales

**UCAD:** Université Cheikh Anta DIOP

**URCI :** Unité de Recherche en Culture *in Vitro*

**WAAPP:** West Africa Agricultural Productivity Program

## Liste des sigles et abréviations

°C : Degrée Celsius

**ADN :** Acide DésoxyriboNucléique

**AFLP:** Amplified Fragment Length Polymorphism

**BET:** Bromure d'éthidium

**dNTP** : mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy-adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy-cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy-guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy-thymine tri-phosphate).

**EDTA**: Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

**EST-SSR**: Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat

**Hz**: Hertz

**min**: Minute

**ml**: millilitre

**mM**: millimolaire

**NGS**: Séquençage nouvelle génération

**pb** : Paire de base

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**RAPD**: Random Amplified Polymorphic DNA

**RFLP**: Restriction Fragment Length Polymorphism

**rpm** : Rotation par minute

**Sec**: Seconde

**SNP**: Single Nucleotide Polymorphism

**SSR**: Simple Sequence Repeat

**Taq**: Polymerase extraite de *Thermus aquaticus*

**TBE** : Tris Borate EDTA

**TE** : Tris EDTA

**UV** : Ultraviolet

**Volt** : Voltage

**µl** : microlitre

A decorative graphic consisting of a horizontal scroll with rounded ends. The scroll is outlined in a light green color. The text is centered within the scroll.

## **I. INTRODUCTION GENERALE**

## Introduction

### 1. Contexte et problématique

Parmi les quelques 7 000 espèces cultivées connues, seules quelques-unes participent quantitativement à la sécurité alimentaire mondiale (Altieri, 1999). Les céréales par exemple constituent le socle de l'alimentation du monde en général (Jideani, 2012) et du continent africain en particulier. Selon la FAO (2010), le riz, le blé et le maïs constituent la base de l'alimentation d'une grande partie de l'humanité. En Afrique Sub-saharienne, plus de 130 millions de personnes ont leurs rations alimentaires journalières dépendantes des millets (Obilana *et al.*, 2003). Les millets font références aux graminées à petits grains et parmi elles, le fonio constitue l'espèce la moins étudiée (Adoukonou-Sagbadja *et al.*, 2010). *Digitaria exilis* est l'espèce de fonio cultivée la plus connue. Elle est rencontrée en Afrique de l'Ouest du Sénégal au Nigéria. Une autre espèce de fonio cultivé, *D. iburua*, présente une aire de culture plus restreinte mais participe néanmoins à la production de revenus substantiels dans les zones rurales les plus éloignées au Nigéria (Dachi et Gana 2008). Ces espèces, ainsi que leurs apparentées sauvages (respectivement *D. longiflora* et *D. ternata*), représentent cependant un réservoir sous caractérisé et inexploité de diversité génétique neutre et fonctionnelle. Longtemps considérée comme une céréale marginale, le fonio doit son abandon à la quasi absence de politiques agricoles en sa faveur, sa non-inclusion dans les programmes d'amélioration, la pénibilité de sa récolte, et la difficulté des opérations de transformation mais également à la faible connaissance de la diversité qu'offre cette culture pour la résilience des systèmes agricoles.

Pourtant, dans le contexte actuel de croissance démographique, de changements environnementaux, d'insécurité alimentaire et nutritionnelle, ces espèces négligées présentent des caractéristiques intéressantes. En effet, le fonio arrive à maturité alors que les autres cultures comme le sorgho, le riz, le maïs continuent encore leurs cycles végétatifs : c'est donc une culture de soudure par excellence. Selon Temple et Bassa (1991), les grains de fonio contiennent tous les acides aminés essentiels, avec une forte teneur en méthionine et en cystine (environ 7%), ce qui lui confère des caractéristiques nutritionnelles intéressantes. Par ailleurs, l'itinéraire technique de sa culture est peu contraignant et demande peu de temps, et pas ou peu d'intrants, même si la récolte est un moment délicat (égrenage rapide).

Enfin, ces dernières années, le fonio a bénéficié d'un regain d'intérêt pour l'amélioration technique des méthodes de transformation post-récolte (Cruz *et al.*, 2011) et de la recherche fondamentale (Barnaud *et al.*, 2011).

Jusqu'à récemment peu de ressources génomiques étaient disponibles pour permettre l'étude génétique du fonio. L'arrivée des nouvelles technologies de séquençage à haut-débit offre des possibilités jusqu'alors inespérées pour l'exploration des génomes inconnus (Huelsenbeck et *al.*, 2001) et ouvre ainsi des opportunités égales aux cultures négligées. Actuellement, des données sur les ressources génomiques sont disponibles pour *D. exilis* : des marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques (Barnaud et *al.*, 2012), des SNPs chloroplastiques (Scarcelli et *al.*, 2011), le séquençage intégral du génome de chloroplaste a été réalisé (Mariac et *al.*, 2014), et le transcriptome établi (Sarah et *al.*, Com. pers).

Actuellement, l'utilisation la plus courante des NGS chez les espèces non-modèles est la caractérisation du transcriptome (Ekblom et Galindo 2011). Chez les espèces dont la séquence du génome intégral n'est pas disponible comme chez le fonio, l'identification de nouveaux marqueurs repose sur le transcriptome. Cette banque fournit « les premiers éléments d'informations » sur l'espèce et contribue de développer des marqueurs moléculaires pour les études futures (SSR ou SNP). Les marqueurs moléculaires sont des outils nécessaires pour quantifier la variation génétique et fournissent, quand ils sont assez nombreux et densément répartis sur le génome, un moyen efficace d'associer des traits phénotypique au génotype (Varshney et *al.*, 2005). Parmi ces marqueurs, les SSR ont pris une importance capitale dans la génétique des plantes du fait de leurs nombreuses qualités (Zane, 2002). Les vingt-et-un (21) marqueurs développés pour le fonio (Barnaud et *al.*, 2012) concernaient exclusivement *D. exilis* et aucune étude n'évoque la transférabilité de ces marqueurs ni sur *D. iburua*, ni sur d'autres espèces apparentées sauvages (*D. longiflora* ou *D. ternata*), qui sont de potentielles sources de diversité et d'adaptation.

Compte-tenu du nombre réduit de marqueurs SSR pour *D. exilis* (38 marqueurs SSR dont 21 polymorphes), et l'inexistence de marqueurs pour *D. iburua*, *D. longiflora* et *D. ternata*, l'objectif de notre étude est de développer de nouveaux marqueurs microsatellites (SSR) à partir des séquences du transcriptome de *D. exilis* obtenu dans le cadre du projet ARCAD<sup>1</sup> afin d'augmenter le nombre de marqueurs SSR disponibles pour *D. exilis*, et de fournir une première série de marqueurs SSR pour *D. iburua* et *D. longiflora*. Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet WAAPP<sup>2</sup> et dans la continuité du projet ARCAD. Ce document est structuré en cinq parties: l'introduction générale, la revue bibliographique, le matériel et méthodes, les résultats et discussion puis la conclusion et perspectives.

---

<sup>1</sup> ARCAD : Agropolis Ressources Center for Crop Conservation, Diversity and Adaptation (<http://www.arcad-project.org/>)

<sup>2</sup> WAAPP : West Africa Agricultural Productivity Program

## 2. Objectifs de l'étude

### 2.1. Objectif global

L'objectif de cette étude est de développer à partir du transcriptome de *D. exilis* de nouveaux marqueurs SSR chez les fonios cultivés (*D. exilis* et *D. iburua*) et un apparenté sauvage (*D. longiflora*)<sup>3</sup>.

### 2.2. Objectifs spécifiques

De façon spécifique, il s'agit de:

- Identifier de nouveaux SSR à partir de séquences du transcriptome de *D. exilis* ;
- Vérifier le polymorphisme, la qualité et la transférabilité aux espèces apparentées de ces nouveaux marqueurs;
- Analyser la diversité génétique sur un germoplasme de 46 accessions regroupant 3 espèces *D. exilis*, *D. iburua*, et *D. longiflora*.

---

<sup>3</sup> Aucun échantillon de l'autre apparenté sauvage (*D. ternata*) n'étant disponible pour cette étude, seule l'espèce *D. longiflora* a pu être considérée.



## **II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**



## Revue bibliographique

### 1. Généralités sur les fonios

#### 1.1. Les fonios, un potentiel pour la résilience des systèmes agricoles en Afrique de l'Ouest

L'agriculture familiale constitue le modèle dominant des systèmes agricoles dans le monde (Morton, 2007) et couvre des millions d'hectares. Elle est restée très largement diversifiée et elle a majoritairement recours aux variétés traditionnelles. La contribution majoritaire de l'agriculture familiale dans la sécurité alimentaire est reconnue par la consécration de l'année 2014 comme "Année Internationale de l'Agriculture Familiale (AIAF)".

Les études de diversité sur les plantes cultivées ont montré que les variétés traditionnelles, bien que moins productives, sont génétiquement plus diversifiées que les variétés améliorées (Ahmadi *et al.*, 1988). Par ailleurs, la sauvegarde de ces variétés traditionnelles, quelle que soit leur modalité (ex-situ, in-situ, etc.), contribue au maintien de leur richesse génétique (Frankel *et al.*, 1995) et permet de conserver le potentiel génétique nécessaire pour faire face à de nouveaux impératifs (Cherifi *et al.*, 1993). Les organisations internationales et nationales se doivent donc de reconsidérer les politiques agricoles afin de prendre en compte la diversité qui caractérise les agrosystèmes africains.

Le XXème siècle a vu l'essor d'un modèle d'intensification agricole, qui favorisait la monoculture d'un nombre limité de variétés améliorées. Ce goulot d'étranglement sur la diversité génétique agricole a ainsi créé deux groupes d'espèce selon l'intérêt accordé : les espèces dites majeures et les espèces sous exploitées ou NUS<sup>4</sup> (i.e. le fonio, le teff, le voandzou, etc.). Selon la FAO (2010), cette "homogénéisation" de l'agriculture est la principale cause de l'érosion génétique des plantes qui estime encore à 75% la perte de diversité génétique agricole au cours du siècle dernier. Ce terme d'espèces sous-utilisées fait référence à des espèces qui offrent un potentiel pour la sécurité alimentaire et la souveraineté des peuples mais qui sont reléguées au second rang, surtout au niveau de la recherche et de la commercialisation du fait de leur faible compétitivité avec les cultures dites principales. C'est le cas du fonio qui malgré son importance reconnue au niveau local, son adaptabilité à des environnements marginaux, et sa contribution significative dans la résilience des agro systèmes (Vodouhe *et al.*, 2007) reste peu valorisé.

---

<sup>4</sup> NUS : Neglected and underutilized species

La valorisation de ces espèces mineures est considérée comme une des voies de transition vers une agriculture plus durable (Rudebjer et *al.*, 2014). La diversification des cultures et surtout le recours aux espèces moins exigeantes en intrants, et parfaitement adaptées aux conditions rurales sont considérés comme des pistes de résiliences des systèmes agricoles africains.

## 1.2. Généralité sur le genre *Digitaria*

### 1.2.1. Taxonomie

Les Digitaires regroupent plus de trois-cent espèces de la famille des Poacées. Parmi elles, deux espèces sont cultivées en Afrique de l'Ouest : *Digitaria exilis* Stapf (le fonio blanc) et *Digitaria iburua* Stapf (le fonio noir). Les deux espèces sauvages apparentées les plus probables sont *Digitaria longiflora* Pers et *Digitaria ternata* Stapf. Le Tableau 1 présente une classification selon Cronquist, (1981) du genre *Digitaria*.

Tableau1 : Classification taxonomique du genre *Digitaria* selon Cronquist (1981)

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Embranchement</b>	Tracheobionta
<b>Division</b>	Magnoliophyta (Angiospermes)
<b>Classe</b>	Liliopsida (Monocotylédones)
<b>Sous-Classe</b>	Commelinidae
<b>Ordre</b>	Cyperales
<b>Famille</b>	Poaceae
<b>Sous-famille</b>	Panicoideae
<b>Tribu</b>	Paniceae
<b>Genre</b>	<i>Digitaria</i>

### 1.2.2. Description botanique, aire de répartition et histoire évolutive des fonios

#### ➤ Le fonio blanc (*D. exilis*)

##### *Description botanique*

Selon Haq et Ogbe (1995), le fonio est une petite céréale, à métabolisme C4 avec un cycle végétatif court et une taille moyenne (30-80 cm), au tallage multiple (2-6 talles selon les variétés). Il présente une inflorescence composée le plus souvent de deux ou 3 racèmes ou épis. Il développe des racines fasciculées qui s'enfoncent profondément dans le sol.



Photo 1 : Plant de *D. exilis*  
<http://www.cabi.org/isc/datasheet/18915>



Photo 2 : Graine de *D. iburua* (a) et *D. exilis* (b) (d'après J. Hernandez-USDANRCS PLANTS Database)

Les grains de couleur claire sont de petites tailles (0.5-1 mm de diamètre, 0.75-2 mm de longueur) et lisses avec un poids de 1 000 grains de l'ordre de 0,5 à 0,6 g. Comme le riz, le fonio est une céréale vêtue c'est-à-dire que les grains restent couverts de glumes (Photo 1 et 2) et de glumelles après battage. Il est reproduit par semis direct. Les grains de fonio germent normalement 2-4 jours après semis et se développent rapidement. La floraison survient généralement 6 à 8 semaines après émergence. Le cycle végétatif s'étend de 2 à 6 mois selon les variétés.

### *Aire de répartition :*

L'aire de culture s'étend entre les 8ème et 14ème parallèles nord ; du Sénégal au lac Tchad (Figure 1). C'est surtout en Guinée dans les régions montagneuses du Fouta Djallon que le fonio représente l'une des bases de l'alimentation. Le fonio est généralement cultivé au Mali, au Bénin, au Burkina Faso, au Nigeria au Sénégal et au Niger.

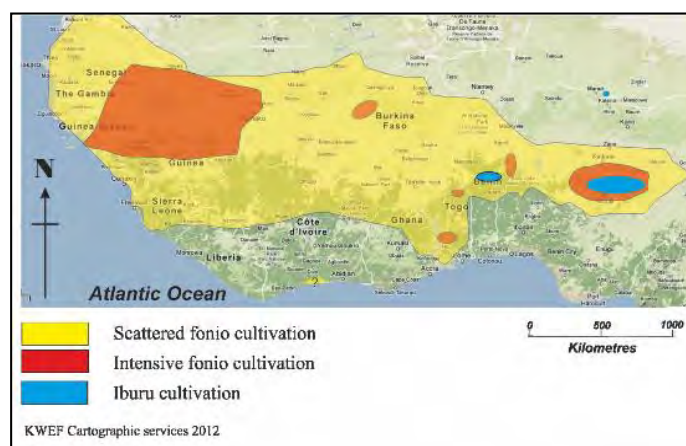


Figure 1 : Distribution de *D. exilis* et *D. iburua* en Afrique de l'Ouest (Blench, 2012)

***Histoire évolutive :***

La première référence écrite sur le fonio date de 1068 avec Albakari quand il mentionnait qu'à Sijilmasa (Maroc) « le blé avait de très petit grain ». Les premières références du fonio comme aliment sont rapportées dès le milieu du 19<sup>ème</sup> siècle par l'explorateur Ibn Battûta lors de son voyage au Soudan (actuel Mali). La primo-domestication du fonio daterait de 5000 avant J-C (Jideani, 2012) et se situerait dans la région de Guinée/Mali. Il aurait été cultivé pour la première fois par le groupe linguistique Mandé (Vodouhe et *al.*, 2003). Le fonio se serait par la suite répandu vers l'ouest et puis vers l'est au Nigéria où il y aurait eu une diversification secondaire.

Morales-Payán et *al.*, (2002) ont indiqué qu'il est cultivé en République Dominicaine et qu'il y aurait été introduit lors de la traite négrière. On connaît assez peu l'histoire de dispersion du fonio en Afrique de l'Ouest sauf au Togo où plusieurs scénarii de dispersion ont été rapportés. Au Togo, le premier scénario stipule que les races locales étaient jadis cultivées le long des montagnes de Ouali (à proximité de Atakpamè au Sud du Togo) et de Defale (Doufelgou district dans le Nord Togo) par les ancêtres des ethnies Akposso et Lamba qui ont respectivement occupées ces sites. Le second scénario serait une introduction des races locales du Togo via les pays limitrophes tels que le Burkina Faso, le Bénin, le Ghana et la Côte d'Ivoire suivant la trajectoire d'immigration des peuples et leurs sédentarisations (Adoukonou-Sagbadja, et *al.*, 2006).

➤ **Le fonio noir (*D. iburua*)**

***Description botanique***

*D. iburua* est caractérisée par des graines noires (Photo 2). Les variétés botaniques n'ont pas été décrites aussi précisément chez *D. iburua*. Portères (1946) a rapporté néanmoins l'existence de deux variétés de fonio noir distinctes dans les zones de culture du Bénin et du Togo.

***Aire de répartition***

*D. iburua* est restreinte dans sa distribution (Figure 1). La principale zone de distribution actuelle du fonio noir est le centre du Nigéria et dans les montagnes de l'Atacora au Bénin (Portères, 1946).

### ***Histoire évolutive***

En ce qui concerne *D. iburua*, Portères (1946) a lié son nom local "iburu" à la culture Haussa et a indiqué que sa domestication a pu être réalisée dans le nord du Nigeria et la récolte a pu se propager vers le sud après la désertification du Sahara.

#### **➤ Le fonio sauvage (*D. longiflora*)**

### ***Description botanique***

*Digitaria longiflora* présente un intérêt agronomique de par ses caractéristiques morphologiques (port érigé, tiges longues, grandes, dures, fortes, panicules longues et riches en grains). *D. longiflora* est une herbe annuelle ou brièvement pérenne, à port variable et haute de 10-60 cm (Photo 3).



Photo 3: Plant de *D. longiflora*  
(IDAO)

Les chaumes sont grêles, rampants, stolonifères, radicans aux nœuds inférieurs. Ils sont ramifiés, puis ascendants et dressés, glabres mais souvent ciliés sous l'inflorescence (Poilecot, 1995). La plante est rustique, pionnière, colonisant les plaques de sol restées nues (Bossier, 1969).

### ***Aire de répartition***

L'espèce est commune sous tous les tropiques (espèce paléotropicale, devenue pantropicale). Très peu de références existent dans la littérature quant à sa présence effective en Afrique de l'Ouest exception faite du Nigéria où il semble très répandu. Au Sénégal, *D. longiflora* se retrouve dans les fourrés ouverts à arbustes épineux et pousse sur des sables rudéralisés : champs, jachères, friches, brûlis, pacages, bord de chemins, etc. (Vanden Berghen, 1991).

### 1.3. Relations entre espèces

Les espèces ancestrales ou parents sauvages du fonio ne sont pas définitivement identifiés. Diverses espèces sauvages ont été proposées, comme ancêtres ou proches parents basés sur leurs affinités morpho-botaniques pour les espèces de fonio cultivées (Adoukonou -Sagbadja 2010). Parmi ceux-ci, *D. longiflora* et *D. ternata* sont respectivement les proches parents du fonio blanc et du fonio noir. Dans leur approche phylogénétique moléculaire basée sur des marqueurs RAPD, Hilu et al., (1997) ont confirmé la parenté génétique élevée de *D. longiflora* et *D. ternata* à *D. exilis* et *D. iburua* respectivement. De même, Adoukonou-Sagbadja et al., (2010) ont confirmé la proximité génétique entre *D. exilis* et *D. longiflora* à l'aide de marqueurs AFLP. Les espèces de fonio ont précédemment été rapportées comme diploïde ( $2n = 2x = 18$ ), tétraploïde ( $2n = 4x = 36$ ) ou hexaploïde ( $2n = 6x = 54$ ) (Zeven et al., 1982) mais seulement la tétraploïdie a été récemment confirmée. Le génome est relativement, petit, (1C) s'étendant de 904 à 956 Mbp (Adoukonou-Sagbadja et al., 2007). Le mode de reproduction serait l'autogamie (Barnaud et al., soumis) mais d'autres auteurs suggèrent la fécondation croisée (Hilu et al., 1997) ou encore l'apomixie (Adoukonou-Sagbadja et al., 2007).

### 1.4. La diversité des fonios

La biodiversité des fonios est importante comme en atteste les nombreuses variétés locales ou écotypes recensés. Portères (1976) a identifié 4 races. Il s'agit de var. *stricta* trouvée en Casamance (Sénégal), Guinée, Mali et Burkina Faso, de var. *rustica* trouvée en Casamance (Sénégal), Guinée, Mali et Burkina Faso, de var. *mixta* rencontrée en Guinée et de var. *densa* rencontrée au Togo.

La caractérisation morphologique au sein de 67 accessions originaires du Niger a permis de montrer cette variabilité dans les paramètres agro morphologiques (couleurs des grains et tiges) mais aussi dans les paramètres quantitatifs liés aux rendements (biomasse sèche, le poids des grains par hectare et poids de la biomasse sèche par hectare etc.) (Saidou et al., 2015). Peu d'étude de diversité génétique se basant sur les marqueurs moléculaires ont été réalisées sur le fonio. Adoukonou-Sagbadja et al., (2010), se basant sur les AFLP ont réalisé une caractérisation moléculaire sur 122 accessions de fonio de 5 différents pays en Afrique de l'Ouest. Ils ont montré trois groupes génétiques majeurs selon l'origine géographique. Cette diversité génétique serait inégalement répartie dans le bassin supérieur du fleuve Niger alors qu'une très faible diversité est présente dans la zone de l'Atacora.

Après la publication des 21 SSR polymorphes, Diallo, (2014) a caractérisé 61 accessions originaires de la Guinée avec 16 SSR pour une diversité génétique ( $H_e$ ) de 0,397. Au Sénégal des études de caractérisation moléculaire avec 15 SSR sont en cours (Com. Pers) et une étude de transférabilité des marqueurs SSR précédemment développés vers les Digitaires du Sénégal est également en cours (Com. Pers). Ces études préliminaires démontrent l'existence d'un polymorphisme moléculaire et phénotypique. Néanmoins, la diversité génétique du fonio, la structure et aussi le modèle de distribution en Afrique de l'Ouest restent encore peu caractérisés.

## **2. Les marqueurs moléculaires comme outils d'analyse de diversité génétique**

### **2.1. Généralité sur les marqueurs moléculaires**

Un marqueur génétique est une séquence de protéine ou d'ADN facilement détectable et dont l'hérédité peut être suivie et associée à l'hérédité d'un caractère phénotypique déterminé indépendamment des variations de l'environnement. On distingue 3 groupes de marqueurs : les marqueurs morphologiques, les biochimiques et les moléculaires. Jusqu'en 1980, les marqueurs étaient morphologiques car basés uniquement sur l'analyse du phénotype. Le développement des marqueurs moléculaires durant ces dernières décennies offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour caractériser la diversité génétique et améliorer les stratégies de sélection.

Les marqueurs moléculaires sont des outils utiles pour quantifier la variation génétique et fournissent un moyen efficace de relier phénotype et génotype (Varshney et *al.*, 2005). Un bon marqueur doit être polymorphe, distribué de manière régulière et équidistante dans tout le génome, co-dominant, facile, rapide et peu coûteux à identifier. Plusieurs types de marqueurs moléculaires ont été développés pendant ces 50 dernières décennies: les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), les SSR (Simple Sequence Repeat), les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) etc.

### **2.2. Les microsatellites (SSR)**

Les microsatellites sont des courtes répétitions en tandem de 1-6 pb (Duran et *al.*, 2009). Ils sont composées de motifs répétés en tandem ex: [(CG)  $n$ , (CAGC)  $n$ ], etc. et ont une



fréquente occurrence dans tous les génomes procaryotes et eucaryotes analysés à ce jour (Zane, 2002).

Selon Powell et *al.*, (1996) les plantes sont riches en motif AT par contre chez les animaux le motif AC est commun. Ils sont présents dans les régions codantes et non codantes et sont distribués dans tout le génome nucléaire. Ils peuvent également être trouvés dans le chloroplaste (Chung et *al.*, 2006) et dans les mitochondries (Rajendrakumar et *al.*, 2007). La grande popularité des SSR est également soulignée par le nombre croissant d'articles décrivant le développement de ces marqueurs pour de nombreux organismes et par la création du Journal *Molecular Ecology Notes* avec sa base de données associée. L'identification et la caractérisation de marqueurs SSR offrent une voie pour l'analyse de diversité, la cartographie comparée et d'association.

Quel que soit le nombre de marqueurs SSR déjà disponible chez les espèces, Il y a un intérêt constant dans le développement de nouveaux marqueurs (Santana et *al.*, 2009) et dans l'amélioration de l'efficacité de ceux existants . Leur répartition au sein d'un génome n'est pas aléatoire (Toth et *al.*, 2000). En effet, leur présence est rare dans les régions télomériques et centromériques des chromosomes (Wintero et *al.*, 1992). Selon le nombre de nucléotides par unité de répétition (1, 2, 3, 4, 5, 6) ; on distingue respectivement les mono, di, tri, tétra, penta ou hexa nucléotides. Les répétitions à di-nucléotides sont les plus courantes dans de nombreuses espèces. Chez les céréales, le triplet le plus commun est la GCC (Cordeiro et *al.*, 2001). L'abondance de la répétition de la GCC est une caractéristique spécifique des monocotylédones et il peut être une raison de leur teneur élevée en GC (Morgante et *al.*, 2002).

Les marqueurs SSR ont l'avantage d'être polymorphes ; de nature multiallélique, codominante, héritable, reproductible, abondante dans le génome, spécifique à un locus (Parida et *al.*, 2009). Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite. Les séquences flanquantes permettent de définir les amorces qui seront utilisées pour l'amplification PCR.

Ces marqueurs sont précieux en raison de leur capacité élevée de transférabilité à des espèces apparentées, et ils peuvent souvent être utilisés comme des marqueurs pour la cartographie comparative et les études d'évolution. Ils sont utiles pour la sélection assistée par marqueurs, en particulier lorsque les marqueurs se trouvent liés à des traits phénotypiques d'intérêt (Varshney et *al.*, 2005).



Malgré de nombreux avantages, les marqueurs microsatellites présentent également plusieurs contraintes qui, au mieux, compliquent l'analyse des données, et au pire limitent considérablement leur utilisation et mènent à la confusion dans leur analyse. C'est le cas des allèles nuls; des allèles de mêmes tailles non différenciables (phénomènes d'homoplasie) (Garza et Freimer 1996); le cas également de la spécificité des amorces (les amorces doivent être généralement développées à nouveau pour chaque espèce (Glenn et Schable 2005) ; et des problèmes de non amplification dues à des mutations sur la région flanquante (Paetkau et Strobeck 1995).

### **2.3. Développement des marqueurs SSR**

Ces dernières années, les microsatellites sont devenus l'un des marqueurs moléculaires les plus populaires. Ils sont utilisés dans de nombreux domaines (Zane, 2002). Plusieurs laboratoires commerciaux et universitaires peuvent fournir un ensemble de microsatellites polymorphes pour une nouvelle espèce à un coût raisonnable en 3 à 6 mois. L'identification des SSR dans les séquences de gènes d'espèces de plantes a débuté dès 1993 par (Morgante et *al.*, 2002). Cette découverte des SSR remonte à 20 ans seulement mais déjà d'importantes techniques sont disponibles pour les identifier et les isoler. En dépit d'une large applicabilité des marqueurs SSR en génétique des plantes, leur développement reste un défi pour la majorité des espèces en particulier pour les cultures mineures. Cela est dû au fait qu'ils doivent être isolés *de novo* pour les espèces examinées pour la première fois. Pour développer les SSR, une première approche consiste à la mise au point directement à partir de banques d'ADN génomique enrichies.

Les microsatellites peuvent également être trouvés avec des outils adaptés (SSR Finder ; MISA, Repeatfinder) dans les bases de données publiques telles que GenBank et EMBL (méthode dite *in silico*). Bien que, le nombre de génomes séquencé augmente avec la disponibilité de nouvelles technologies de séquençage, seuls 114 génomes eucaryotes ont été séquencés à ce jour (<http://genomesonline.org>). Pour la majorité des espèces, il n'y a pas ou peu de séquences dans les bases de données publiques. Par conséquent, générer des banques SSR-enrichies reste un outil essentiel pour développer des microsatellites pour des espèces sous-exploitées comme le fonio.

L'arrivée des nouvelles technologies de séquençage haut-débit offrent des possibilités jusqu'à lors inespérées pour l'exploration des génomes (Huelsenbeck et *al.*, 2001). Actuellement l'utilisation la plus courante des NGS chez les espèces non-modèles est la caractérisation du transcriptome (Ekblom et Galindo 2011).

## **2.4. Le transcriptome**

Le transcriptome est l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome, dans un tissu donné, à une étape de la vie d'un organisme ainsi que la caractérisation fonctionnelle de ce dernier. La première étude décrivant un transcriptome chez une espèce non-modèle par NGS a été effectuée sur la guêpe *Polistes metricus* (Toth et *al.*, 2000). Les analyses sur le transcriptome fournissent des informations utiles sur l'activité transcriptionnelle des cellules. Elles permettent l'identification de marqueurs, l'expression de profil de gènes, et la compréhension des mécanismes moléculaires complexes à l'échelle de la physiologie cellulaire (Klopfleisch et Gruber 2012).

Sarah et *al.*, (article soumis) ont récemment produit un ensemble de 26 transcriptome de référence sur quelques espèces mineures dont le fonio, le mil, et l'igname grâce à la très grande capacité de séquençage des Nouvelles Techniques de Séquençage (NGS). L'avantage de développer des marqueurs à partir de séquences de transcriptome est que ceux-ci seront associés à des gènes fonctionnels, ce qui augmente l'intérêt de ces derniers pour les études d'adaptation (Imelfort et *al.*, 2009). Par exemple, les EST- SSR ont été référencés chez l'arabette (Morgante et *al.*, 2002), le maïs (Varshney et *al.*, 2007), le riz (Temnykh et *al.*, 2000), le sorgho (Taramino et *al.*, 1997) ou le blé (Varshney et *al.*, 2007).

## **3. La complexité de l'analyse des données générées par les SSR chez les espèces polyploïdes**

### **3.1. La polyploidie**

La polyploïdisation est un événement récurrent chez la plupart des plantes cultivées. La polyploidie se définit comme l'existence dans un même noyau de plusieurs jeux de chromosomes (Roullier, 2012).

Chez les angiospermes, elle est considérée comme un facteur majeur dans l'évolution des végétaux (Adams et Wendel 2005). On estime même que l'ensemble des angiospermes pourrait ainsi avoir une origine polyploïde (Cui et *al.*, 2006). Elle est souvent considérée comme un élément clé dans la diversification des taxons (Doyle et *al.*, 2008). On distingue classiquement deux modes de formation d'une espèce polyploïde. Les autopolyploïdies sont composées de plusieurs jeux de chromosomes homologues issues de la même espèce. Chez les allopolyploïdes, les jeux de chromosomes dupliqués proviennent d'espèces différentes (génomés homéologues) mais suffisamment proches pour s'hybrider (Parisod et *al.*, 2010).

Selon Otto, (2007), la polyploïdisation serait le résultat d'une division méiotique anormale, phénomène relativement courant chez les angiospermes. Les espèces polyploïdes présentent très souvent une augmentation de l'hétérozygotie par rapport à leurs progénitures diploïdes et montrent ainsi une vigueur accrue, et ce, à différents stades du développement de la plante (Chen et *al.*, 2010). De plus, cet état hétérozygote permet d'obtenir par recombinaison génétique une grande diversité de combinaisons alléliques (plus grande qu'à l'état diploïde), élargissant ainsi les possibilités de sélection des cultivateurs. Il est important de noter que l'état polyploïde génère une intensification des mutations et des possibilités de variations, tout en permettant de supporter ou "tamponner" les potentiels effets négatifs de ces réarrangements par la redondance génétique que cet état leur confère.

### **3.2. L'analyse des données générées par les SSR chez les espèces polyploïdes**

De nombreux travaux sur les taxons polyploïdes ont recours à des marqueurs AFLP car les méthodes d'analyse des microsatellites pour une espèce polyploïde sont limitées d'un point de vue théorique et pratique (Roullier, 2012). En effet, la plupart des logiciels en génétique des populations sont destinés aux espèces diploïdes. Malgré l'importance de la tétraploïdie dans le règne végétal (Soltis et *al.*, 2004), la plupart des études de génétique de population se consacrent aux espèces diploïdes en raison de la difficulté d'appréhender le véritable génotype à partir de données microsatellites chez les espèces polyploïdes.

Par exemple, si l'amplification de microsatellites chez une espèce tétraploïde pour un locus donné présente les trois allèles suivants ABC, il est impossible de savoir si le génotype exact de l'individu est AABC, ABBC ou encore ABCC et donc de calculer les fréquences alléliques. On est en pratique confronté à un problème d'identification des différents allèles. De plus, peu de logiciels d'analyse de génétique des populations sont capables de prendre en compte des données microsatellites polyploïdes.

Une manière de contourner ce problème est de coder les données microsatellites polyploïdes comme des marqueurs dominants, c'est à dire à utiliser un codage binaire en 0/1 (0 pour l'absence de l'allèle et 1 pour sa présence). Ce type de codage représente une perte d'information importante mais permet d'utiliser de nombreux logiciels et méthodes statistiques capables de traiter ces données (Clark et Jasieniuk 2011). Une autre possibilité est de traiter ces données comme chez une espèce diploïde en utilisant uniquement des échantillons avec un maximum de deux allèles par locus (Saltonstall, 2003), avec le risque de résultats biaisés.

Le développement des SSR pour les espèces diploïdes, de façon classique implique également, l'estimation des allèles nuls, du déséquilibre de liaison entre paires de loci. De même, la plupart des analyses de diversité sur marqueurs microsatellites chez les espèces diploïdes se basent sur le calcul des indices de diversité classiques tels que des fréquences alléliques à chaque locus, et les taux d'hétérozygotie. Chez les polyploïdes, l'ambiguïté du nombre de copies présent à chaque locus est un problème majeur (Obbard *et al.*, 2006). Néanmoins quelques logiciels tels que STRUCTURE, le package POLYSAT® (Clark et Jasieniuk 2011), permettent de traiter ces données avec chacun leurs limites. D'autres méthodes de structuration de la diversité sont basées sur le calcul d'indice de similarité entre individus puis sur la représentation de cette diversité au travers de méthodes factorielles (qui recherchent une représentation globale de la diversité et chassent les effets individuels) ou de représentations arborées (qui au contraire cherchent à représenter les relations individuelles). Il existe de nombreux indices de similarité possibles (indices de Sokal et Michener, de Dice, de Jaccard, de Nei, etc). Certains indices prennent en compte à la fois les "présences et absences" partagées (indice de Sokal et Michener), d'autres ne considèrent que les "présences partagées" (indice de Jaccard ou indice de Dice, par exemple) dans le calcul de la similarité. Selon le type de marqueurs utilisés (dominant, codominant), le niveau de ploïdie, mais aussi le niveau d'hétérozygotie des individus en question, les différents indices apparaissent plus ou moins pertinents (Kosman et Leonard 2005). Le choix de l'indice pour les taxons polyploïdes s'avère particulièrement délicat et aucune étude systématique ne permet d'éclairer ce choix (Kosman et Leonard 2005). Les indices considérant uniquement les présences de bandes sont généralement utilisés (comme par exemple l'indice de Lynch ou encore de Jaccard). Toutefois, il est en général préférable d'utiliser plusieurs types d'indices et de comparer les patrons de diversité observés. Compte-tenu des difficultés énoncées précédemment, l'analyse des données polyploïdes est délicate et la précision des méthodes difficiles à évaluer. Il est donc essentiel de croiser plusieurs approches. Les méthodes d'analyses utilisées dans cette étude sont explicitées dans la suite du document.



### **III. MATERIEL ET METHODES**

## Matériel et Méthodes

### 1. Matériel Végétal

Trois espèces de fonio sont utilisées dans cette étude. Il s'agit des espèces cultivées *D. iburua*, *D. exilis* et l'apparenté sauvage *D. longiflora* de *D. exilis*. Dans le but de couvrir l'aire de distribution du fonio décrite selon Blench et *al.*, (2012) et tenant compte de son centre de domestication probable, quarante-sept (47) échantillons ont été choisis pour ce travail. Ce germoplasme est représentatif de huit (8) pays (Figure 2) et proviennent de trois collections (Tableau 2).

Tableau 2 : Collection et nombre d'échantillons par espèce

Organisme	Espèce (Nb accessions disponibles)	Matériel utilisé	Nombre accessions choisies	Pays représentés
IRD (Clément et Leblanc, 1984)	<i>D. exilis</i> (65)	Graine	<i>D. exilis</i> (24)	Bénin-Mali-Niger-Togo-Burkina-Guinée
Projet WAAPP-Fonio, 2015	<i>D. exilis</i> (180) <i>D. longiflora</i> (310)	Feuille	<i>D. exilis</i> (5) <i>D. longiflora</i> (10)	Sénégal
Collection National du Nigéria	<i>D. exilis</i> (26) <i>D. iburua</i> (8)	ADN	<i>D. exilis</i> (3) <i>D. iburua</i> (5)	Nigéria

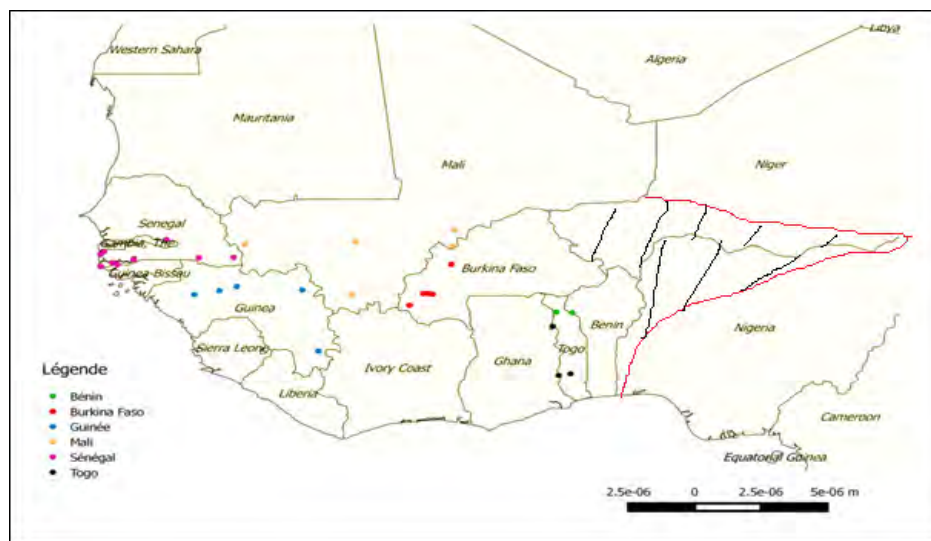


Figure 2 : Carte de distribution géographique des accessions. Les échantillons du Niger et du Nigeria n'avaient pas de coordonnées GPS. La zone hachurée représente la zone de production du fonio pour ces deux pays

## 2. Méthodologie

### 2.1. Extraction d'ADN

Pour *D. exilis*, le matériel végétal disponible était les graines. De ce fait, les graines des accessions (65) ont été semées dans des alvéoles contenant du sol sableux léger et humidifié à raison de 2 répétitions par accessions. Elles ont été placées sous ombrière et arrosées avec de l'eau quotidiennement pendant 3 à 4 semaines jusqu'à l'obtention des jeunes plantes à l'ISRA/IRD de Bel-Air (Dakar, Sénégal). Chez *D. longiflora* et *D. iburua*, les feuilles puis l'ADN ont été utilisés respectivement.

#### ➤ Broyage des jeunes feuilles pour extraction

Un prélèvement foliaire de 2 à 3 feuilles (environ 50 mg) a été réalisé sur une jeune plante de *D. exilis* par accession. Elles ont été ensuite broyées au mortier. Les feuilles du *D. longiflora* ont été séchées à l'étuve à 45°C durant 8 heures et broyées en même temps que deux billes au vibrobroyeur (AP-02LT) à la fréquence de 30 Hz durant 10-20 min chacune selon la rigidité des feuilles.

#### ➤ Extraction de l'ADN

Un volume de 750 µL d'une solution tampon de lyse (CTAB 2% ; Tris 100 mM, pH8 ; NaCl 1,4 M ; EDTA 200 M ; 1-2% de sulfite de sodium extemporanément et 0,2% de DTT 0.1M) a été ajouté au broyat et mis à incubation à 74°C pendant 20 min. Après 2 min de refroidissement à température ambiante, 750 µL d'une solution de chloroforme iso-amylque (24:1) ont été ajoutés dans chaque tube puis homogénéisés, centrifugés à 10.000 rpm à 4°C pendant 2 min. Le surnageant a été récupéré puis, ont été rajoutés successivement, 500 µL d'isopropanol et 50 µL d'acétate de sodium 3 M à pH=5 et le tout incubé à -20°C pendant 15 min. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 10.000 rpm à 4°C pendant 10 min.

Le culot d'ADN a été lavé avec 1 mL d'éthanol à 70% puis centrifugé à nouveau à 10.000 rpm à 4°C pendant 10 min. L'ADN précipité a été séché à l'étuve à 35/45°C et dissout dans 50 µL d'une solution de TE à 0,1X (50 ml de Tris 10 mM et 250 µL d'EDTA 0,1 mM).

#### ➤ Pureté et normalisation de l'ADN

La qualité et la quantité de l'ADN extrait ont été vérifiées par spectrophotométrie au NanoDrop (LEMSAT, AP-66LT) et par migration sur gel d'agarose à 0,8% contenant du TBE (Tris Borate EDTA). L'ADN complexé au BEt (Bromure d'Ethidium) a été visualisé sous UV (Transilluminateur). Seules les accessions (46) présentant un ratio d'absorbance 260 nm vs 280 nm compris entre 1,8 et 2 (correspondant à une faible contamination par des protéines ou autres composés organiques) et des bandes d'ADN de haut poids moléculaires ont

été sélectionnées et diluées à 5 ng/μL puis à 0,7 ng/μL dans le Tris EDTA (TE) pour les PCRs. L'ADN a été conservé à -20°C.

## 2.2. Identification des marqueurs SSR

Trente-sept (37) couples d'amorces ont été identifiés en exploitant le transcriptome du fonio (Sarah et al. article soumis). Les critères utilisés pour sélectionner les motifs microsatellites ont été les suivants : avoir un niveau de redondance suffisant dans le séquençage du transcriptome, privilégier les trinuécléotides pour leur facilité de lecture, et un nombre de répétitions élevé (C. Billot, Com. Pers). Les couples d'amorces (sens et antisens, communément appelées *Forward* et *Reverse*) ont été synthétisés. Le Tableau 3 présente les motifs répétés SSR, les séquences des amorces *Forward* et *Reverse*, la température d'hybridation, la taille attendue de l'amplicon.

## 2.3. Test d'amplification des marqueurs

Afin d'évaluer l'aptitude des couples d'amorces à amplifier, des tests ont été réalisés. Ces tests ont été effectués à un volume réactionnel de 10 μl par échantillon : soit, 2 μL du Tampon 5X; 1 μL de DNTP 2 mM, amorce F (100μM) à 0,04 μl, amorce R (100 μM) à 0,04 μL ; 0,10 μl de BSA 100X, 0,2/μl de Taq (GoTaq Promega 5U), 2 μL d'ADN (5ng/μl) et 4,62 μL d'eau milliQ.

Dans le thermocycleur Techne (TC-PLUS), pour chaque PCR le programme suivant a été utilisé: une phase de dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min, suivie de 10 cycles de "TouchDown" comprenant une dénaturation de 30 s à 94°C, puis une hybridation de 1 min 30s (incrémenté de -0.5°C par cycle permettant ainsi une hybridation spécifique) à 50-60°C, et une élongation de 30 s à 72°C. Cette étape est suivie de 30 cycles classiques incluant une dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation à 55°C pendant 1 min 30s et une élongation à 72°C pendant 30 s, et se termine par une élongation finale de 10 min à 72°C. Pour chaque accession, un volume (10 μl de PCR +1 μL de Bleu de Bromophenol) a été déposé sur gel d'agarose de 2 %, suivi d'une migration de 40 min à 100 Volt en présence d'un marqueur de taille (pBR322DNA/BsuRI Marker, 5 (80-587pb) – Fermentas) pour séparer les bandes selon leur taille. Ces gels d'agarose ont été trempés dans une solution de Bromure éthidium pendant 15-20 min afin de permettre la visualisation des fragments d'ADN sous lumière UV. Les photos des gels obtenus ont ensuite été traitées. Sans ambiguïté, le nombre de marqueurs amplifiés a été noté par espèce. Ce test d'amplification a été dupliqué sur la



plateforme de génotypage du CIRAD afin de vérifier la reproductibilité et la transférabilité des données. Les résultats obtenus par les deux équipes ont été ensuite confrontés.

Tableau 3 : Liste des marqueurs microsatellites étudiés

Locus_name	SSR	Multiplexe	Dye	Annealing (°C)	5' Forward_seq	3' Forward_tm	5' Reverse_seq	3' Reverse_tm	Product_size
De-ARC 001	(tca)6 (tctt)3				CTCAGCCCATCACACTCAAA	59,83	TCTAAAAACCTGCGGACTGG	60,24	201
De-ARC 002	(gca)5				TCCAGTAGGCTGCTGTCCTT	60,01	AATGGAAACCCACCATCAAA	60,03	282
De-ARC 003	(cca)5	U	Vic	60-55	GTTGTGACCTGACTCGTCCA	59,71	GCTCTGCACTGGGAAGTTCT	59,6	179
De-ARC 004	(ctg)6	T	Fam	60-55	TTCAGCATATTCCCCTCAGC	60,18	AACTGGAAGTCCACATGGAAA	59,44	123
De-ARC 005	(ctg)6	V	Vic	60-55	TTCAGCATATTCCCCTCAGC	60,18	AGCCATACAGCAAGCACAAA	59,49	212
De-ARC 006	(tca)5				TCACTATCAGCGGGGCTATC	60,2	TCGTGATGTTCCAACACCTG	60,57	174
De-ARC 007	(ga)10 (ccat)3	R	Fam	55-50 et 60-55	CGTACTACGTGCGCAACATT	59,82	GCGTTGGTTCGTCTACCTCT	59,36	153
De-ARC 008	(ctg)7	U	Ned	60-55	TACACTTGGGGCAAACATCA	59,96	ACTAGCGAAGCCATCCAGAA	59,98	208
De-ARC 009	(gct)5				TGGTGTTTAGGGGTCGTCTT	61,69	CCAATACCTCCCAAGTCAGC	59,55	179
De-ARC 010	(gt)6 (gtgtac)4	W	Vic	60-55	CAACCGTGGAGCGATAAGTA	58,8	GTGCTACGACACCTGCACAT	59,78	189
De-ARC 011	(at)6	T	Vic	60-55	TCATCAATGCCAGATTTCCT	60,01	GGTGTGTTGGTCTGGGGATA	60,63	175
De-ARC 012	(tc)6 (acg)5				GAGCGCCTCTAAAGCTTCG	60,38	TTCAGACCATATCCGGTGGT	60,19	152
De-ARC 013	(tct)5	X	Fam	60-55	CCTTTTGCCACCATCATTCT	59,93	GAGGGCAATGAAGTGGACAT	59,93	180
De-ARC 014	(ac)6 (ccgtt)3 (cgggcc)3	S	Ned	55-50	GGTGATACAACCTGCAACGACA	59,63	ACCTTCTACCGCTCCTTCGT	60,27	201
De-ARC 015	(cgc)5	Y	Ned	55-50 et 60-55	TCAGGTCTGGACACTTGAGC	58,97	ACGCGTCCAACATAACCATA	58,92	174
De-ARC 016	(cga)5	T	Pet	60-55	GAACGCCTGGACATTCACAT	60,94	TGGTGGAGGAGCTAAGGATG	60,21	209
De-ARC 017	(ct)6 (gtca)3	Z	Ned	60-55	ACACGGTGCTTCATGTACGA	60,18	CGATACAGCAGGGACGTGTA	59,74	201
De-ARC 018	(ga)6 (tcaa)3	X	Vic	60-55	TCTGCAAGAGCTGTCAATCG	60,29	TTGTGTGCCATCATTACCT	59,97	282

Locus_name	SSR	Multiplexe	Dye	Annealing (°C)	5' Forward_seq 3'	Forward_tm	5' Reverse_seq 3'	Reverse_tm	Product_size
De-ARC 019	(gca)5	W	Fam	60-55	TGCCAACCAGAAAACCATT	60,34	TACCAGAGGAACAAGCAGCA	59,59	154
De-ARC 020	(cct)9 (aagg)3				GAAGCCACGATCTCCAATTC	59,63	ATCCAAGCATCCATCCTTCA	60,43	195
De-ARC 021	(gcc)5 (cca)6	Y	Vic	60-55	CGCTCATACTCTGACCACCA	59,85	GCAGTTGAGTGAGGTCATGC	59,42	296
De-ARC 022	(atg)5				GTGGCGATCGTCAGAGAACT	60,42	TGCCGACGCCTTAACATTAT	60,48	200
De-ARC 023	(cgat)3				TCATGCTGAACAATGCAACA	59,83	AGCGAACCCAACATCAAGAA	60,64	215
De-ARC 024	(ca)6 (cagta)4	S	Fam	55-50 et 60-55	ACCGTCGTGCTCAGCTTTTA	60,96	AGGACCTGTCGTGAGCTACC	59,33	155
De-ARC 025	(cca)5	R	Pet	55-50 et 60-55	GCTGAACCAGATAGGGCAAC	59,7	GCTCTCTGCAGATGGTTGAA	59,12	198
De-ARC 026	(gc)6 (cacg)4	V	Fam	60-55	AAAAAGTTAAGCGCGCACAC	60,44	TCCCGTTATTTTGAAACACCA	60,21	142
De-ARC 027	(ta)8				CCTCAGTCGGATGCATCTTT	60,22	CAACCACCGCTAAATGGAGA	61,02	179
De-ARC 028	(tgg)6 (gtgctg)3	R	Vic	55-50 et 60-55	TAAACTTTGCCTTCCGTGGT	59,61	TTGGACCAAACAATCCAGGT	60,21	189
De-ARC 029	(ctt)5 (attc)3	U	Pet	60-55	AGGGTGGATCACTTCGTCAG	60,11	GCATGCAGTTGAATGCCTTA	59,84	292
De-ARC 030	(ctg)6	V	Pet	60-55	CAACAGGCAGCATGACCTAA	59,86	AGAGGGTTCATGTGGATTGG	59,78	315
De-ARC 031	(agc)5	V	Ned	60-55	CCACGATGTGTTGAATCAGG	59,96	CTGAAGGAGATCCCCACTTG	59,65	193
De-ARC 032	(tg)6 (ga)20				AGATAGAGACGCCGACCTTG	59,45	CCACTCGGCATACTAGTGGAA	60,14	201
De-ARC 033	(aacc)4	Y	Fam	60-55	AGACTCGCTGAACAACCACA	59,47	CCGTGGTTGAACTTTGAAGG	60,52	135
De-ARC 034	(acc)5	S	Vic	55-50 et 60-55	CCGCTTCAGGAGTCTGGTCT	61,91	GAGAAGAAGGCCCTGATTGA	59,36	298
De-ARC 035	(gag)5				GAAGCCAATGAATTCGAGGA	60,15	TTGCCGCATTTTTCCTTCTA	60,69	295
De-ARC 036	(ctc)7				TGTCACCTCATCGTTTCTGC	59,84	CGAAATCAACGGAACCTGAT	59,93	179
De-ARC 037	(gca)6				ATCACGATCGTCGGTTTCAC	60,94	GTTGCAGAAGTGCCTCCAAT	60,26	171

## 2.4. Génotypage des accessions

Les marqueurs microsatellites testés sur gel d'agarose ayant donné de bons résultats d'amplification ont ensuite été passés sur l'ensemble des échantillons avec le séquenceur à capillaire (ABI 3500 Prism) sur la plateforme de génotypage du CIRAD. Le système ABI permet de détecter 5 fluorescences différentes à 5 longueurs d'onde différentes. Il est donc possible de multiplexer les produits de PCR obtenus par différents marqueurs microsatellites en fonction de la taille des allèles et selon le marquage des amorces par l'un des 4 colorants (FAM, NED, PET et VIC), le cinquième étant gardé pour un marqueur de taille interne. Ainsi, les marqueurs ont été associés en multiplex après la PCR sur la base de la taille attendue de leur amplicons, et en évitant le chevauchement des marqueurs afin d'alléger les manipulations et de diminuer le coût de l'expérimentation (Tableau 3).

La PCR a été effectuée en utilisant un Tampon (10X) à 1,1 µL, le MgCl<sub>2</sub> (50mM) à 0,11 µL, le dNTP (2 mM) à 1,1 µL, l'amorce Forward (10 µM) à 0,09 µL, l'amorce Reverse (10 µM) à 0,11 µL, BSA (10 µg) à 0,11 µL, Taq (2 U/µL) 0,55 µL, H<sub>2</sub>O à 2,332 µL et 3,5ng d'ADN. Les amplifications ont été effectuées dans des thermocycleurs (Eppendorf Master Cycler 384). Pour chaque PCR le programme suivant a été utilisé: une phase de dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min, suivie de 10 cycles "*TouchDown*" comprenant une dénaturation de 30 s à 94°C, puis une hybridation 50-60°C (incrémenté de -0.5°C par cycle permettant ainsi une hybridation spécifique) de 1 min 15 s à 60°C, et une élongation de 1 min 30 s à 72°C. Cette étape est suivie de 25 cycles classiques incluant une dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation à 55°C pendant 1 min 15 s et une élongation à 72°C pendant 1 min 30 s, et se termine par une élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits de PCR ont été multiplexés en mélangeant des quantités variables de produits de PCR en fonction de leur fluorochrome, soient 2 µl de Fam, 3,5 µl de Pet, 2 µl de Vic, 2,5 µl de Ned, qsp 20 µl avec de l'eau. Deux µl de ce mélange ont été ajoutés à 10 µl de tampon contenant le marqueur de taille Gene Scan 600-LIZ Size-Standard V2.0 et de la formamide (48 µL de 600-LIZ avec 4 mL de formamide).

Ce mélange a été ensuite déposé sur un séquenceur capillaire (ABI 3500 Prism) pour visualiser les amplicons. Des témoins positifs et négatifs ont été disposés dans les plaques afin d'assurer la qualité des données obtenues. Des témoins négatifs (eau) permettent de vérifier des contaminations éventuelles et des témoins positifs qui permettent de détecter si les signaux attendus ont été utilisés.

## 2.5. Lecture des résultats

Les données de génotypage ont été ensuite visualisées à l'aide du logiciel Gene Mapper 5 (Applied Biosystems). Les pics correspondants aux allèles ont été déterminés en paires de bases (pb) en fonction d'une taille standard (GLiz 600) et en corrigeant selon le type de motif microsatellite. Les résultats de génotypage ont été lus à plusieurs reprises et indépendamment par trois personnes afin d'assurer la fiabilité d'interprétation des données.

## 2.6. Analyses des données

Les marqueurs amplifiés par espèce, le statut des marqueurs, le profil génotypique et le nombre d'allèle présent pour chaque locus par individu ont été déterminés. Le pourcentage de transférabilité a été calculé comme décrit par Kuleung et *al.*, (2004) chez le blé.

Du fait de la complexité d'analyse des microsatellites avec les espèces polyploïdes comme le fonio, les données alléliques ont été recodées en données binaires comme pour les marqueurs dominants de type AFLP (0 = absence, 1 = présence d'un allèle donnée) et plusieurs approches ont été utilisées pour gérer ces difficultés.

### ➤ Polymorphism information content

Comme utilisé par Ghislain et *al.*, (2009) pour la pomme de terre (espèce tétraploïde), le contenu polymorphique (PIC) a été calculé selon la statistique de Nei (1993). A savoir  $PIC = 1 - \sum p_i^2$  où  $p_i$  est la fréquence allélique du  $i$ ème individu de la population.

### ➤ Hétérozygotie et allèles privés

Le nombre d'allèle privé a été évalué par GenAlex 6.5 (Peakall et Smouse, 2012). Du fait de la difficulté d'appréhender le génotype véritable chez les espèces polyploïdes, l'hétérozygotie a été estimé par espèce en tenant seulement compte des marqueurs ayant 1-2 allèles par individu en utilisant GenAlex 6.5 (Peakall et Smouse, 2012).

### ➤ Structuration entre espèces

#### ***Diversité génétique au sein des trois espèces***

Les analyses suivantes ont été faites sur un jeu de données de 46 accessions à partir de 17 marqueurs communs aux trois espèces avec 7% de données manquantes. Dans le but d'identifier les relations entre les différentes espèces, un dendrogramme basé sur la méthode Neighbor-Joining a été construit avec 10000 bootstraps. Ceci en utilisant une matrice de distance obtenu selon Michener et Sokal (1957) dans le Logiciel Darwin 6 (Perrier et Jacquemoud-Collet 2006).

Une analyse factorielle des correspondances a été réalisée avec le package ade4 sur R (Thioulouse et *al.*, 1997). En outre, nous avons testé la structuration génétique des différentes populations de fonio par une analyse bayésienne à l'aide du logiciel STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard et *al.*, 2003). Dans notre cas, le logiciel a été exécuté avec le modèle « Admixture » et fréquence des allèles corrélés. Nous avons sélectionné 1 à 8 clusters différents (K=1-8) pour l'analyse. Nous avons réalisé une simulation avec 10 répétitions de 500 000 MCMC (chaîne de Monte Carlo Markov) après 200 000 itérations de burn-in. Nous avons ensuite déterminé le nombre correct de clusters en utilisant STRUCTURE HARVESTER (Earl et von Holdt 2012). Un pic dans la courbe du delta K est alors observé pour le nombre le plus probable de clusters (Evanno et *al.*, 2005). Ce nombre est validé en comparant aux informations de biologie connues.

### ***Potentielle introgression entre D. exilis et D. longiflora***

Afin d'évaluer une potentielle introgression entre *D. longiflora* et *D. exilis*, nous avons également vérifié la structuration entre les deux espèces et comme précédemment décrit la valeur de K a été identifiée en utilisant STRUCTURE HARVESTER (Earl et von Holdt 2012) selon la méthode d'Evanno et *al.*, (2005). Cette analyse a été faite sur un jeu de données de 41 accessions à partir de 23 marqueurs communs aux deux espèces avec 4% de données manquantes



## **IV. RESULTATS**

## Résultats

### 1. Caractéristiques des marqueurs

#### ➤ Amplification

Après confrontation des résultats d'amplification entre les deux laboratoires, sur un total de trente-sept (37) marqueurs, 24 marqueurs c'est à dire 64,86% ont donné un produit d'amplification à la taille attendue (Tableau 4). La photo 6 présente 2 gels dont l'un (à gauche) montre une amplification de marqueurs à la taille attendue tandis que l'autre (à droite) indique une amplification à une taille différente de celle attendue.

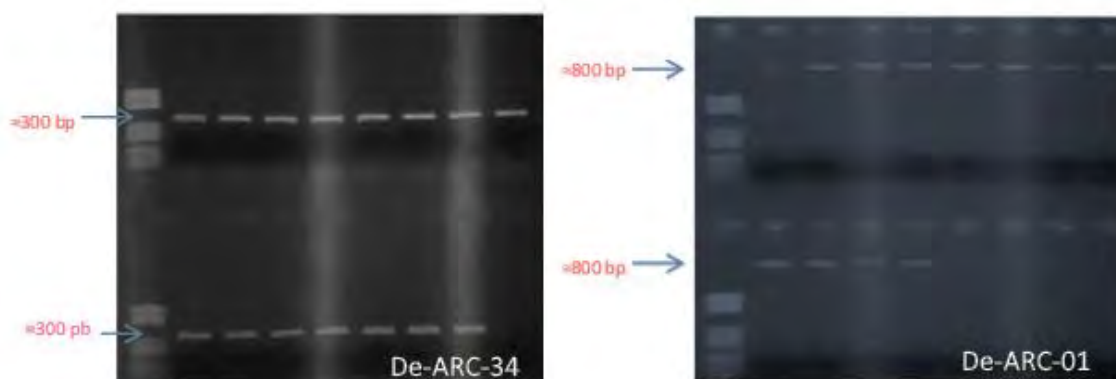


Photo 6 : Gels générés par amplification des microsatellites De-arc 034 et De-arc 001 sur *D. exilis*



Tableau 4 : Bilan test amplification : Polymorphisme, Profil génotypique, et Taille observée

<i>D. exilis</i>					<i>D. iburua</i>				<i>D. longiflora</i>				Product size (bp)	Taille observée (bp)
Marqueurs	A	NI	Statut	Pg	A	NI	Statut	Pg	A	NI	Statut	Pg		
De-ARC 003	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	2	PP	Diploide	179	191-194
De-ARC 004	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	123	133-139
De-ARC 005	OUI	1	MM	Diploide	OUI	2	PP	Diploide	OUI	1-2	PP	Diploide	212	224-230
De-ARC 007	OUI	1-2	PP	Diploide	NON	-	-	-	OUI	2-3	PP	Tétraploide	153	159-178
De-ARC 008	OUI	1-3	PP	Tétraploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	2-4	PP	Tétraploide	208	216-232
De-ARC 010	OUI	1-2	PP	Diploide	NON	-	-	-	NON	-	-	-	189	199-208
De-ARC 011	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	175	190-203
De-ARC 013	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	2	PP	Diploide	180	186-218
De-ARC 014	OUI	2-4	PP	Tétraploide	OUI	2-3	PP	Tétraploide	OUI	1-2	PP	Diploide	201	173-239
De-ARC 015	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	2	PP	Diploide	OUI	1-2	PP	Diploide	174	174-217
De-ARC 016	OUI	2	PP	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	209	211-224
De-ARC 017	OUI	1-2	PP	Diploide	NON	-	-	-	OUI	1	MM	Diploide	201	217-222
De-ARC 018	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1	PP	Diploide	282	300-308
De-ARC 019	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1-2	PP	Diploide	154	154-168
De-ARC 021	OUI	1-2	PP	Diploide	NON	-	-	-	OUI	1-3	PP	Tétraploide	296	310-320
De-ARC 024	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1-2	PP	Diploide	155	168-198
De-ARC 025	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	2	PP	Diploide	198	213-216
De-ARC 026	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	1	PP	Diploide	142	124-158
De-ARC 028	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	2	PP	Diploide	OUI	2	PP	Diploide	189	200-224
De-ARC 029	OUI	2-3	PP	Tétraploide	NON	-	-	-	OUI	2-6	PP	Hexaploide	292	300-320
De-ARC 030	OUI	1	MM	Diploide	NON	-	-	-	OUI	1	MM	Diploide	315	333
De-ARC 031	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	OUI	2-3	PP	Tétraploide	193	206-215
De-ARC 033	OUI	1	MM	Diploide	NON	-	-	-	OUI	1	PP	Diploide	135	145-154
De-ARC 034	OUI	1	PP	Diploide	OUI	1-2	PP	Diploide	OUI	1	MM	Diploide	298	314-316

A: Amplification, NI: nombre d'allèle par individus, Pg: profil du génotype, PP: polymorphe, MM: Monomorphe

### ➤ Profil génotypique des marqueurs et hétérozygotie

Nous avons noté un maximum de deux allèles par individu (profil "diploïde") pour tous les locus amplifiés à l'exception des loci: De-arc 07-08-14-21-29-31 qui présentent pour certains individus plus de deux allèles (profil tétraploïde et hexaploïde) (Tableau 4). Le profil "diploïde" est dominant avec respectivement 21, 16 et 18 SSR pour *D. exilis*, *D. iburua* et *D. longiflora* (Figure 3).

Le taux d'hétérozygotie observé pour le fonio chez les marqueurs à profil "diploïde" dans cette étude varie entre 0 et 1 (Tableau 5).

### ➤ Polymorphisme et transférabilité des marqueurs entre espèces

Le taux d'amplification et le nombre de marqueurs polymorphes varient entre les espèces. Il est de 64.9 %, 62.2 % et 45.9 % respectivement chez *D. exilis*, *D. longiflora* et *D. iburua*. La Figure 4 nous montre le nombre de marqueurs polymorphes et monomorphes par espèce. Le plus grand nombre de marqueurs monomorphes est noté chez *D. iburua* (11). Le nombre de marqueurs polymorphes observés chez *D. exilis* (18) et *D. longiflora* (17) est supérieur à celui observé chez *D. iburua* (6). Quatre marqueurs (De-arc13-14-15-28) sont polymorphes chez les trois espèces par contre le marqueur De-arc11 est monomorphe pour les trois espèces. Le taux de transférabilité des marqueurs de *D. exilis* vers ses apparentés est de 95,8% (23 sur 24) vers *D. longiflora* et 71% (17 sur 24) vers *D. iburua*.

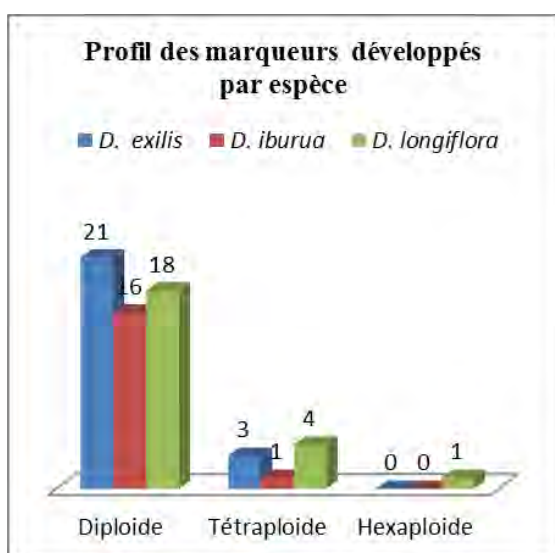


Figure 3 : Profil génotypiques des marqueurs par espèces

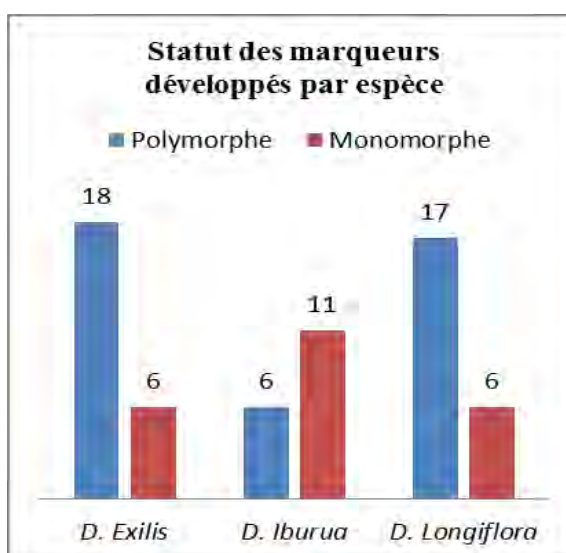


Figure 4 : Taux de polymorphisme de marqueurs par espèce

Tableau 5 : Hétérozygotie observée (Ho), et attendue (He) par espèce pour les marqueurs à profil "diploïde".

<i>D. exilis</i>			<i>D. iburua</i>			<i>D. longiflora</i>		
SSR	Ho	He	SSR	Ho	He	SSR	Ho	He
De-ARC 003	<b>0,935</b>	0,498	De-ARC 003	0	0	De-ARC 003	<b>1</b>	0,5
De-ARC 004	0,032	0,148	De-ARC 004	0	0	De-ARC 004	0	0
De-ARC 005	0	0	De-ARC 005	<b>1</b>	0,5	De-ARC 005	0,3	0,255
De-ARC 007	<b>0,931</b>	0,498	De-ARC 008	0	0	De-ARC 011	0	0
De-ARC 010	0,036	0,416	De-ARC 011	0	0	De-ARC 013	<b>1</b>	0,645
De-ARC 011	0	0	De-ARC 013	0,6	0,46	De-ARC 14	<b>0,9</b>	0,495
De-ARC 013	<b>0,967</b>	0,515	De-ARC 015	<b>1</b>	0,5	De-ARC 015	<b>0,8</b>	0,58
De-ARC 015	<b>0,852</b>	0,597	De-ARC 016	0	0	De-ARC 016	0	0
De-ARC 016	<b>1</b>	0,5	De-ARC 018	0	0	De-ARC 017	0	0
De-ARC 017	0,033	0,065	De-ARC 019	0	0	De-ARC 018	0	0,18
De-ARC 018	0	0	De-ARC 024	0	0	De-ARC 019	<b>0,9</b>	0,495
De-ARC 019	<b>0,964</b>	0,499	De-ARC 025	0	0	De-ARC 024	0,1	0,095
De-ARC 021	<b>0,964</b>	0,534	De-ARC 026	0	0	De-ARC 025	<b>1</b>	0,5
De-ARC 024	0,04	0,039	De-ARC 028	<b>1</b>	0,5	De-ARC 026	0	0,78
De-ARC 025	<b>0,967</b>	0,499	De-ARC 031	0	0	De-ARC 028	<b>1</b>	0,685
De-ARC 026	0	0	De-ARC 34	<b>1</b>	0,5	De-ARC 030	0	0
De-ARC 028	<b>0,903</b>	0,603				De-ARC 033	0	0,642
De-ARC 030	0	0				De-ARC 34	0	0
De-ARC 031	<b>0,933</b>	0,498						
De-ARC 033	0	0						
De-ARC 034	0	0,062						
Mean	0,455	0,284	Mean	0,288	0,154	Mean	0,389	0,325
SE	0,104	0,055	SE	0,113	0,059	SE	0,109	0,069
Ho: Hétérozygotie observé, He: Hétérozygotie attendu, SE: Ecart type, Mean= Moyenne <b>Ho : en gras sont sensiblement égal à 1</b>								

## 2. Diversité allélique et allèles privés par espèces

Sur les 24 marqueurs amplifiés un total de 104 allèles a été observé chez les trois espèces. Le nombre d'allèles par locus varie de 1 à 14 avec une moyenne de  $4,33 \pm 2,27$  allèles par marqueur. Le contenu polymorphique (PIC) des marqueurs développés varie de 0,04 à 0,83 et les fréquences des 104 allèles sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Nombre d'allèles, Contenu polymorphique, et fréquence allélique

Locus	N.A	PIC	A	F
De-ARC 003	2	0,5	191	0,54
			194	0,46
De-ARC 004	3	0,3	133 <sup>ý</sup>	0,06
			137*	0,11
			139	0,83
De-ARC 005	4	0,42	220 <sup>‡</sup>	0,06
			224*	0,1
			227*	0,1
			230	0,75
De-ARC 007	7	0,62	159	0,47
			164 <sup>‡</sup>	0,01
			166 <sup>‡</sup>	0,01
			168	0,39
			170 <sup>‡</sup>	0,01
			176 <sup>‡</sup>	0,06
			178 <sup>‡</sup>	0,04
De-ARC 008	6	0,58	216 <sup>‡</sup>	0,02
			220	0,06
			222	0,14
			226	0,62
			229 <sup>‡</sup>	0,06
			232 <sup>‡</sup>	0,11
De-ARC 010	4	0,43	199 <sup>ý</sup>	0,03
			202 <sup>ý</sup>	0,03
			206 <sup>ý</sup>	0,21
			208 <sup>ý</sup>	0,72
De-ARC 011	2	0,17	190	0,9
			203*	0,1
De-ARC 013	6	0,59	186	0,04
			191*	0,01
			194	0,52
			198	0,36
			207 <sup>‡</sup>	0,06
			218 <sup>ý</sup>	0,01
Locus	N.A	PIC	A	F
De-ARC 014	12	0,83	173*	0,03
			186*	0,03
			188*	0,02
			194*	0,04
			210 <sup>ý</sup>	0,28
			211 <sup>‡</sup>	0,09
			212 <sup>‡</sup>	0,08
			217 <sup>ý</sup>	0,26
			220 <sup>ý</sup>	0,02
			230 <sup>ý</sup>	0,08
			237 <sup>ý</sup>	0,08
			239 <sup>ý</sup>	0,01
De-ARC 015	5	0,65	174	0,08
			178	0,09
			185	0,42
			190	0,4
			217 <sup>‡</sup>	0,01
De-ARC 016	3	0,55	211*	0,07
			222 <sup>ý</sup>	0,4
			224	0,53
De-ARC 017	3	0,09	217	0,95
			219 <sup>ý</sup>	0,02
			222 <sup>ý</sup>	0,02
De-ARC 018	2	0,04	300	0,98
			308 <sup>‡</sup>	0,02
De-ARC 019	2	0,5	154	0,47
			168	0,53
De-ARC 021	4	0,54	310	0,51
			313	0,44
			317	0,03
			320 <sup>‡</sup>	0,01
De-ARC 024	2	0,22	168	0,88
			198	0,13
De-ARC 025	2	0,5	213	0,52
			216	0,48
Locus	N.A	PIC	A	F
De-ARC 026	7	0,47	124 <sup>‡</sup>	0,02
			141*	0,07
			145 <sup>‡</sup>	0,07
			151 <sup>‡</sup>	0,07
			153	0,71
			155 <sup>‡</sup>	0,02
			158 <sup>‡</sup>	0,02
De-ARC 028	8	0,71	200*	0,06
			202	0,08
			205	0,09
			209	0,39
			211	0,34
			215 <sup>‡</sup>	0,01
			218 <sup>ý</sup>	0,02
De-ARC 029	11	0,69	224 <sup>ý</sup>	0,01
			300 <sup>‡</sup>	0,01
			302 <sup>‡</sup>	0,02
			306	0,02
			308 <sup>‡</sup>	0,04
			309 <sup>‡</sup>	0,04
			311	0,41
			314	0,36
			317 <sup>‡</sup>	0,03
			319 <sup>‡</sup>	0,01
De-ARC 030	1	-	320 <sup>‡</sup>	0,04
			326 <sup>‡</sup>	0,01
De-ARC 030	1	-	333	1
De-ARC 031	3	0,51	206	0,54
			210	0,45
De-ARC 033	3	0,24	215 <sup>‡</sup>	0,01
			145 <sup>‡</sup>	0,08
			149	0,87
De-ARC 034	2	0,21	154 <sup>‡</sup>	0,05
			314	0,12
			316	0,88

N.A=Nombre d'allèles observé par marqueur ; PIC : Polymorphism information content ; A : la taille de l'allèle, et F la fréquence de l'allèle parmi tous les allèles du même locus au sein des trois espèces.

\* Allèle spécifique à *D. iburua*, ‡ allèle spécifique à *D. longiflora* et ý allèle spécifique à *D. exilis*. Le marqueur De-arc 10 n'a amplifié que chez *D. exilis*

Le plus grand nombre d'allèles et d'allèles privés est noté chez *D. longiflora* (Figure 5). Etant donné que le nombre d'individu considéré par espèce n'était pas égal, une moyenne de 7 allèles est observée chez *D. longiflora*. Par contre, chez *D. exilis* et *D. iburua*, elle est respectivement de 1,9 et 5,2.

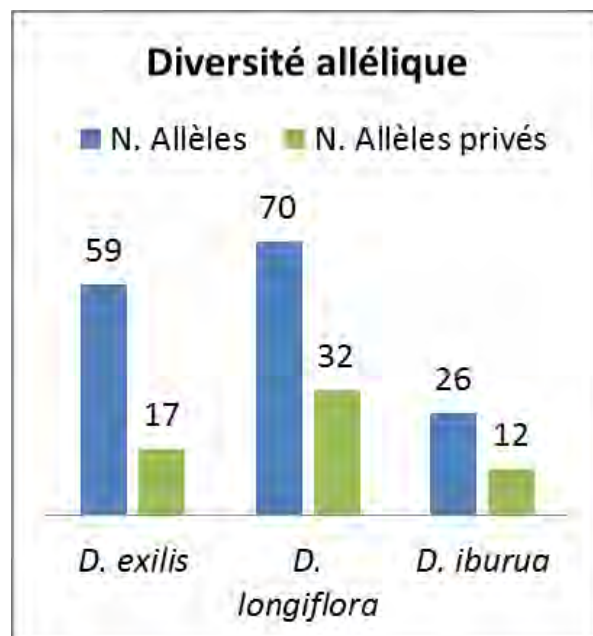


Figure 5 : Diversité allélique par espèces

### 3. Différentiation et relation génétique entre espèces

#### ➤ Diversité inter-espèces

##### *Analyse factorielle et Dendrogramme*

Les relations génétiques entre espèces ont été observées dans un premier temps par une analyse factorielle des correspondances (AFC) (Figure 6). Les deux premiers axes expliquent à 50,68% l'inertie totale. L'axe 1 (35,32%) sépare les accessions de *D. exilis* (sauf deux *D. exilis* du Nigeria) et *D. longiflora* de la totalité des *D. iburua*. L'axe 2 (15,36%) sépare quant à lui, les *D. longiflora* des *D. exilis* dans leur globalité. L'axe 1 différencie ainsi le fonio noir du fonio blanc et de son apparenté le plus proche, tandis que l'axe 2 discrimine les deux individus *D. exilis* du Nigeria et *D. longiflora*.

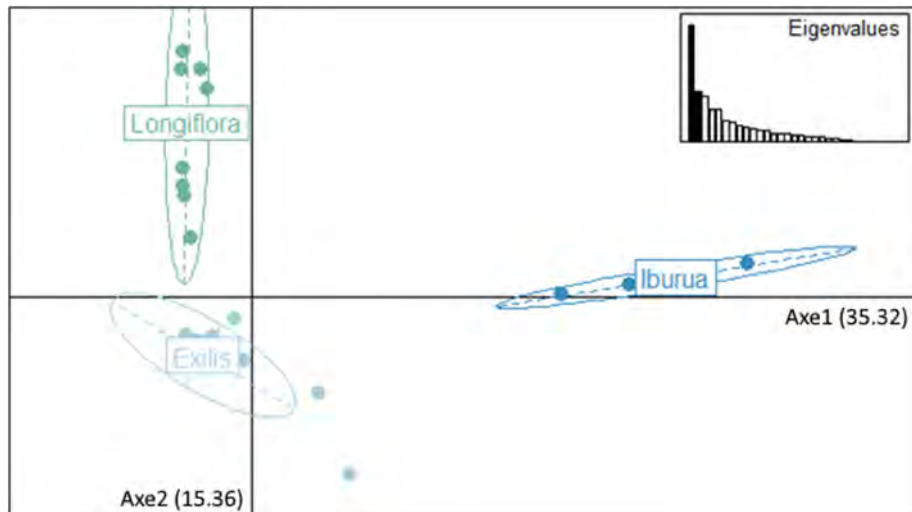


Figure 6 : Analyse Factorielle sur les 46 Accessions de fonio avec les 17 marqueurs communs aux 3 espèces.

Nous avons construit dans un second temps un dendrogramme selon la méthode Neighbor-Joining pour affiner cette structuration (Figure 7). Le dendrogramme construit est soutenu par une forte valeur de bootstrap ( $\geq 50$ ), indiquant la robustesse de l'arbre construit avec l'ensemble des données (Figure 7). L'organisation de l'arbre construit confirme la structuration de l'AFC et deux (2) groupes distincts s'identifient. Le Groupe 1 se partage en deux sous-groupes. Le Sous-groupe I regroupe d'une part des *D. exilis* du Bénin, Togo, Niger, Guinée, Burkina Faso, Mali, Sénégal et un *D. exilis* du Nigeria. Le sous-groupe II réunit les accessions de *D. longiflora*. Le groupe 2 réunit d'une part, tous les individus *D. iburua* et d'autre part les deux individus *D. exilis* du Nigéria précédemment identifiés.

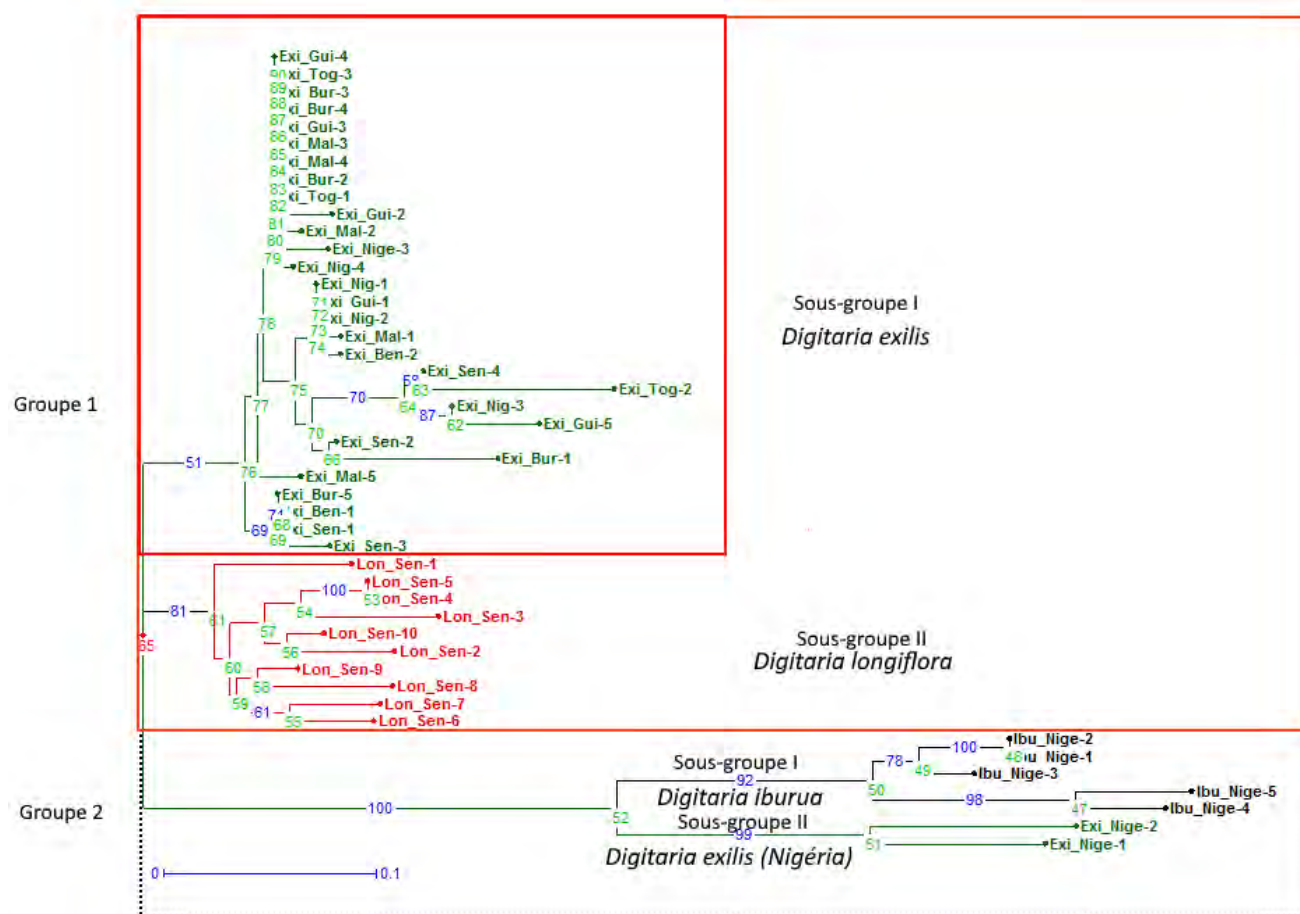


Figure 7 : Dendrogramme des 46 accessions avec les 17 SSR communs aux espèces (seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 sont indiquées)

Remarquons également la proximité des sous-groupes I (*D. exilis*) et II (*D. longiflora*). Cette structuration montre les relations de parenté entre *D. exilis* et *D. longiflora* et sépare distinctement les accessions de *D. iburua* (Figure 6, 7).

### Approche bayésienne de type STRUCTURE

Afin de confirmer les résultats de la structuration chez les 3 espèces, une autre approche sans a priori d'analyse de type bayésienne a été effectuée. Le principe de l'analyse est de pouvoir déterminer le nombre de population (K) le plus probable dans un ensemble de population. La détermination du nombre probable de population se base sur la valeur delta K.

Un pic dans la courbe du delta K est alors observé pour le nombre le plus probable de *clusters*. L'analyse de la courbe de delta K (Figure 8) révèle que les 46 individus pouvaient se classer en trois *clusters* distincts représentant chacune une espèce (Figure 9). Cette démarche confirme la structuration des populations définies par l'analyse factorielle et le dendrogramme.



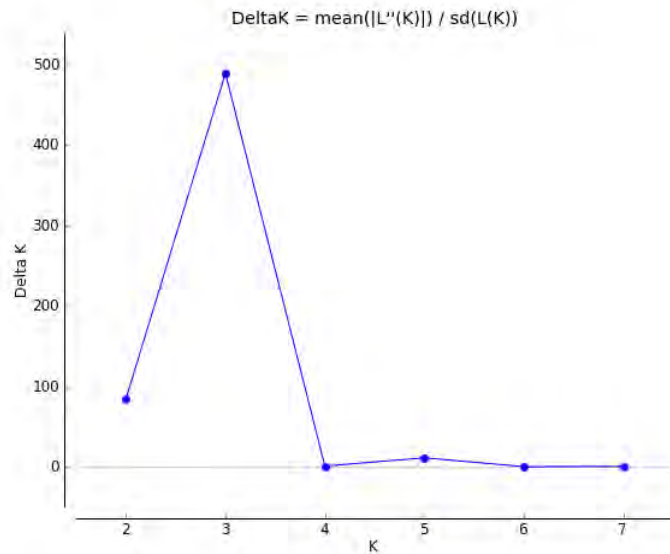


Figure 8 : Estimation du nombre de K sur 46 accessions après 10 répliquât de chaque K

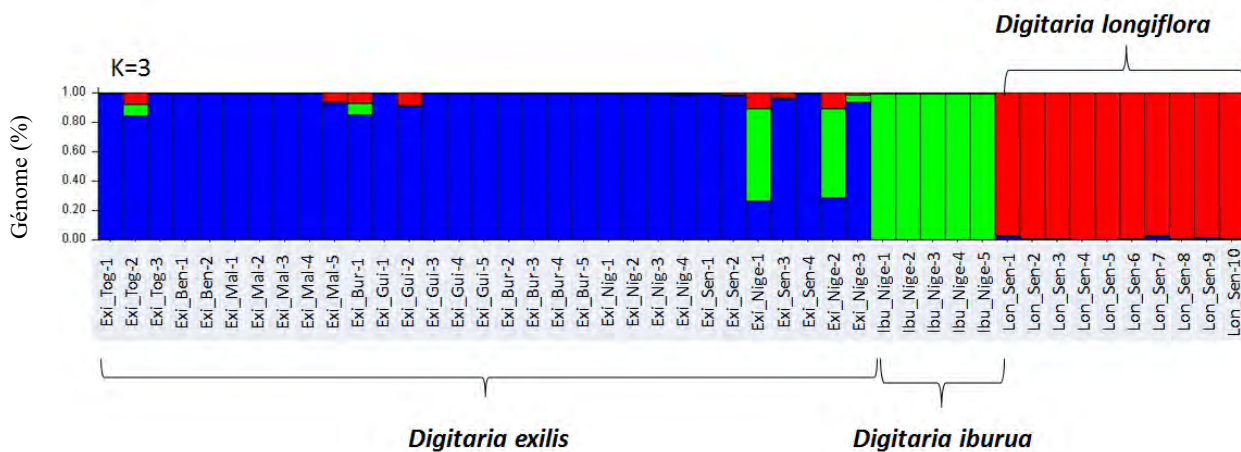


Figure 9 : Estimation du nombre de populations par une analyse bayésienne de type STRUCTURE. En bleu (*Digitaria exilis*) ; vert (*D. iburua*) et rouge (*D. longiflora*). Chaque barre représente un individu et le pourcentage de son génome affecté à chaque groupe.

### ➤ Introgression entre *D. exilis* et *D. longiflora*

Nous avons fait une deuxième analyse bayésienne sur 41 individus (*D. exilis* et *D. longiflora*) afin d'évaluer les flux de gènes entre le fonio blanc cultivé et son apparenté sauvage (*D. longiflora*).



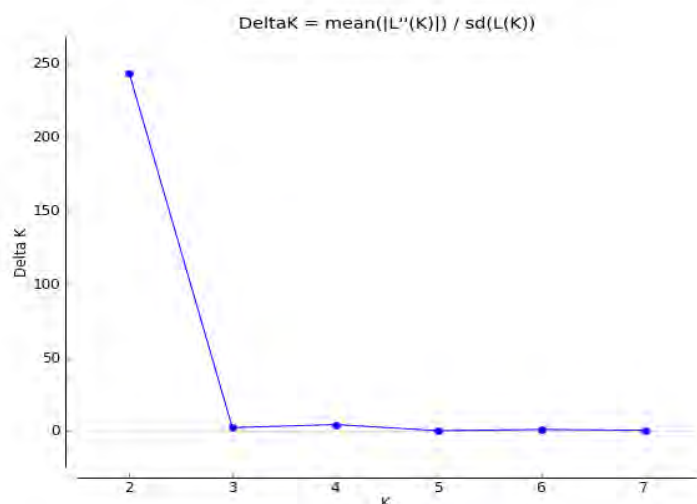


Figure 10 : Estimation du nombre de K sur 46 accessions après 10 répliquât de chaque K

Comme décrit précédemment, l'analyse de la courbe de Delta K nous a permis de retenir deux populations faisant chacune référence à une espèce (Figure 10). L'analyse de la Figure 11 nous montre que l'introggression entre *D. longiflora* (vert) et *D. exilis* (rouge) est existante. Chez *D. exilis*, elle est relativement faible ( $\leq 25\%$ ) à l'exception de deux accessions du Nigéria.

A l'inverse le taux d'introggression observé de *D. exilis* vers *D. longiflora* est toujours inférieur à 10%.

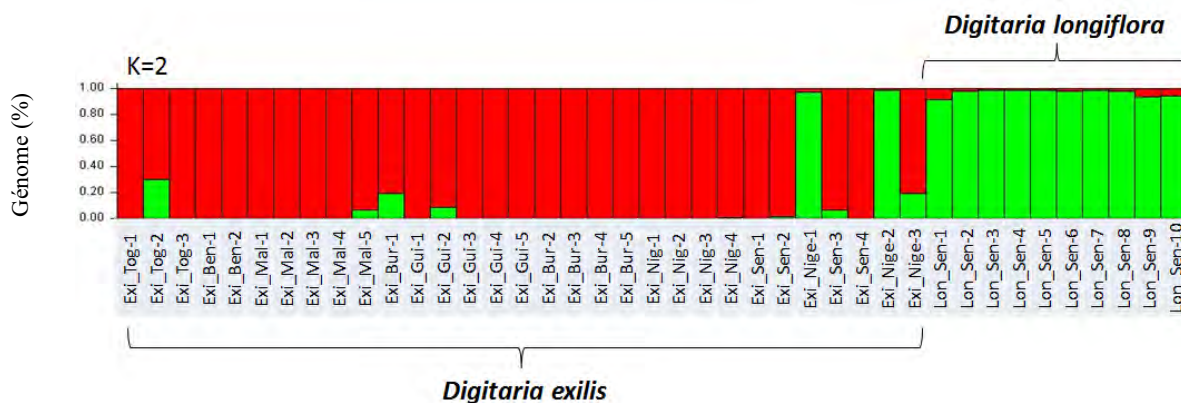


Figure 11 : Estimation de l'introggression entre *D. exilis* (rouge) et *D. longiflora* (vert). Chaque couleur représente une espèce et chaque barre représente un individu, le pourcentage de son génome affecté à chaque groupe



## V. DISCUSSION

## Discussion

### 1. Amplification

Dans notre étude, nous avons eu un succès d'amplification d'environ 65%. L'échec à l'amplification (35%) de certains marqueurs pourrait s'expliquer par des amplifications non spécifiques (amplicon de taille largement supérieure à la taille attendue) liées à la présence d'introns par exemple. C'est le cas des marqueurs De-Arc 01-02-06 qui amplifient à des tailles d'amplicons  $\approx 800$  bp. Liu et *al.*, (2014) suggèrent que l'emplacement de l'amorce à travers les sites d'épissage d'introns pourrait expliquer cette absence d'amplification des marqueurs SSR. Les mutations sur les régions flanquantes (Paetkau et Strobeck, 1995) peuvent également expliquer la non-amplification des marqueurs SSR. Remarquons aussi qu'après identification des SSR qu'ils soient des EST-SSR ou des SSR neutres, le taux d'amplification des marqueurs après test varie selon les espèces. Ainsi, chez *Vicia sativa* (plante fourragère), Liu et *al.*, (2014) a noté la non-amplification de 96 SSR sur 450 testés. Chez *Allium fistulosum* (la ciboulette), Yang et *al.*, (2015) a rapporté l'échec d'amplification de 6 sur 38 SSR. Signalons que chez le sorgho, Shehzad et *al.*, (2009) a noté que sur 144 SSR développés, 106 n'ont pas amplifiés. Un taux d'échec d'amplification de 35% des EST-SSR développés chez le mil est également rapporté par Senthilvel et *al.*, (2008).

### 2. Transférabilité des marqueurs entre espèces

L'amplification de marqueurs SSR développés d'une espèce à une autre, est appelée "transférabilité". Dans cette étude, nous avons eu 23 marqueurs transférables à *D. longiflora* contre 17 pour *D. iburua*. La transférabilité des marqueurs développés dans cette étude entre espèces apparentées peut s'expliquer par les régions conservées entre les espèces proches. En effet, les études de génétique comparative tendent à montrer la forte homologie entre les génomes d'espèces proches et la syntenie entre leurs gènes. Selon Kuleung et *al.*, (2004), les données de séquences obtenues à partir de plusieurs plantes cultivées indiquent une homologie importante entre les génomes sur les régions flanquantes des locus SSR. De même, chez d'autres espèces, il est rapporté des valeurs proches. Par exemple, il est mentionné dans la littérature, un taux de transférabilité de 74,5% des marqueurs microsatellites EST-SSR du maïs vers la canne à sucre (Hernández et *al.*, 2001). La transférabilité des marqueurs de la canne à sucre vers le sorgho était de 100% (Cordeiro et *al.*, 2001).

A l'instar des études précédentes, la transférabilité des EST-SSR de l'arachide cultivé est de 100% vers ses apparentées sauvages (Liang *et al.*, 2009).

Le transfert de ces marqueurs semble être donc une bonne approche pour *D. longiflora* mais cette approche reste limitée pour *D. iburua*. En effet, pour cette dernière il faudrait envisager des marqueurs plus spécifiques et les testés sur un nombre d'échantillons plus important.

### **3. Relation entre espèces**

L'analyse factorielle des correspondances (AFC) et la structuration par l'approche bayésienne permettent de distinguer les trois espèces (*D. exilis* ; *D. iburua* et *D. longiflora*). La proximité observée entre *Digitaria exilis* et *D. longiflora* lors de la représentation arborée (dendrogramme) et sur l'AFC nous montre la proximité génétique entre *D. exilis* et *D. longiflora*. Cette proximité se traduit également par un fort pourcentage de transférabilité des marqueurs développés dans cette étude vers *D. longiflora* et par un nombre de marqueur polymorphe élevé.

En effet, se basant sur les caractères botaniques, Portères (1976) et Hilu *et al.*, (1997) avaient proposé *D. longiflora* comme parent sauvage de *D. exilis*. Adoukonou-Sagbadja *et al.*, (2007) ont également montré une similarité de 92% entre ces deux espèces après une caractérisation moléculaire avec les AFLP. Une autre étude de transférabilité avec 8 SSR (8 des 21 développés en 2012) réalisée par Ngom *et al.*, (Com. Pers) a également montré une transférabilité de 100% vers *D. longiflora* contre une transférabilité d'environ 62% vers d'autres espèces du genre *Digitaria* du Sénégal.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que *D. iburua* est plus éloignée de *D. exilis* et *D. longiflora* du point de vue génétique. Ceci se justifie par le nombre d'allèle privés observés, et le taux de transférabilité des marqueurs légèrement inférieur à celui obtenu chez *D. longiflora*. Cette étude montre également trois espèces génétiquement bien définies avec très peu de flux de gènes apparents à l'exception de deux individus.

### **4. *Digitaria exilis* : deux accessions du Nigéria sortent du lot**

Les différentes analyses de données utilisées montrent qu'Exi\_Nige\_1 et Exi\_Nige\_2 se différencient clairement des trois espèces en présence. Ces deux individus de *D. exilis* du Nigéria, présentent parmi les *D. exilis* les plus forts taux de données manquantes (respectivement 39% et 34 %). Ceci pourrait biaiser la structuration entre accessions.

Un autre constat fait, est qu'ils partagent en commun avec les trois espèces des allèles privés<sup>5</sup>. Par exemple, ils partagent avec *D. iburua* l'allèle 202 pour le marqueur Arc 28 et Allèle 178 pour le marqueur Arc15 et chez *D. longiflora* les allèles 220 du marqueur Arc 08. Ceci se reflète dans le pourcentage d'introggression observé qui est supérieur à 90% et peut donc entraîner la formation d'un groupe séparé des autres *D. exilis*. Aussi, la présence dans leur génotype d'allèles spécifiques de *D. iburua* pourrait aussi poser des questions de flux de gènes entre *D. exilis* et *D. iburua* au Nigéria puisqu'elles sont cultivées en sympatrie et que le Nigéria est probablement un centre de domestication du fonio. Pour confirmer ces résultats, ces accessions devraient être génotypées une seconde fois.

## **5. Comparaison des méthodes de développement des SSR chez le fonio et leurs différentes implications.**

### **➤ Diversité allélique**

Les SSR développés à partir de l'ADN génomique ont l'avantage d'informer sur le polymorphisme dans les régions codantes et non codantes. Ce qui n'est pas le cas chez les EST-SSR qui montrent spécifiquement le polymorphisme au sein des régions transcrites ou exprimées. Ainsi, la diversité allélique révélée par les EST-SSR est faible par rapport à celle obtenue chez les SSR génomiques. La diversité allélique observée chez les EST-SSR du fonio (1-14 allèles pour un PIC variant de 0,04 à 0,83) dans cette étude est relativement faible comparé à celle observée par Barnaud et *al.*, (2012) avec les marqueurs SSR neutres du fonio (1-22 allèles). Chez d'autres espèces des résultats similaires ont été observés avec 23 EST-SSR du *Metasequoia glyptostroboides* (conifère) qui présente 2 à 8 allèles pour un PIC de 0,11 à 0,66 (Jin et *al.*, 2015), et avec 19 EST-SSR *Brassica rapa* (Choux chinois) qui montre 2 à 6 allèles (Ding et *al.*, 2015). A l'opposé, les EST-SSR génèrent des amplicons potentiellement exprimés et sont intéressants pour des études de génétique comparative, de sélection assistée par marqueurs et de cartographie génétique.

### **➤ L'hétérozygotie des marqueurs**

Le taux d'hétérozygotie observé dans cette étude pour le fonio varie de 0 à 1 et a été calculé sur les marqueurs avec 1-2 allèle par individus. Ces marqueurs sont à priori des profils "diploïdes". Ces valeurs sont deux fois plus grandes que celles observées par Barnaud et *al.*, (2012) qui variaient de 0 à 0,429. Récemment, Barnaud et *al.*, (article soumis) ont suggéré que le fonio serait autogame.

<sup>5</sup> Allèles privés ici ce n'est pas pour dire qu'ils sont uniques à une espèce mais des allèles à faibles fréquences chez l'espèce et que s'ils n'étaient pas présents chez ces deux individus ils pourraient être spécifiques de l'espèce chez laquelle ils sont présents.

Ce mode de reproduction suppose un taux d'hétérozygotie faible. Se basant sur ce mode de reproduction, nous remarquons que les valeurs d'hétérozygotie observées sont encore au-delà de l'attendue chez une espèce autogame. Ce constat peut donc s'expliquer par des marqueurs à profil tétraploïde et non diploïde. C'est-à-dire homozygote pour chaque allèle (AABB). Ces résultats confirment donc que le fonio est tétraploïde comme l'avait suggéré Adoukonou-Sagbadja *et al.*, (2007).

#### ➤ **Polyplœdie : Implication et intérêt des SSR**

La nécessité de recodage des données alléliques en données binaires générées par les SSR chez ces espèces polyplœides peut soulever des questionnements pertinents. Pourquoi ne pas simplement utiliser les AFLP pour les espèces polyplœides? Quelles sont donc les raisons qui peuvent justifier l'utilisation des SSR pour l'amplification et ensuite le traitement des données générées comme des marqueurs moléculaires dominants? Il reste toujours un intérêt significatif d'utiliser les SSR pour les espèces polyplœides : 1) les AFLP nécessitent des ADN de très bonne qualité, ce qui n'est pas facile à obtenir chez le fonio ; 2) les marqueurs AFLP nécessitent une étape de digestion enzymatique ; et enfin 3) les SSR sont plus fiables pour croiser les données de différents laboratoires.

### **6. Ressources génétiques : les fonio cultivés et sauvages, un réservoir de diversité à explorer et à conserver**

#### ➤ **Problématique de collectes**

L'amélioration des plantes repose entre autre sur une connaissance fine de la diversité existante dans les collections et le germoplasme disponible. D'importants efforts ont été réalisés afin de pouvoir disposer de collections d'études : 1) La collection régionale du fonio (6 pays de l'Afrique de l'Ouest représentés) conservée à l'IRD, 2) Projet WAAPP FONIO. Malgré ces efforts importants consacrés pour permettre au fonio d'apporter sa contribution à la diversification alimentaire en Afrique de l'Ouest et à la durabilité des systèmes agricoles, d'importantes problématiques demeurent. Les collections de fonio sont encore incomplètes.

A notre connaissance, il n'y a pas de collection de fonio sauvages ni de collection de fonio noir à l'échelle de la sous-région. Pour *D. exilis*, il semble essentiel de continuer les efforts de collecte en faisant participer les autres pays de l'Afrique de l'Ouest où la présence du fonio est rapportée dans la littérature. La base de données qui suivra ces nouvelles collections devrait être assez fournie pour permettre l'utilisation et la traçabilité des échantillons dans la sous-région

➤ **Apparentés sauvages : réservoir de diversité**

Le processus de domestication des espèces a réduit la diversité génétique au sein du pool cultivé. Dans notre étude, et comme à l'attendu, l'espèce sauvage a montré une diversité génétique plus élevée que les espèces cultivées. Ceci se justifie d'ailleurs par les nombres d'allèles spécifiques et d'allèles observés chez les sauvages qui ont dû être perdus au cours de la culture ou de la domestication. Ces résultats, comme rapporté dans le cas de l'orge par Varshney et *al.*, (2007) démontrent de l'utilité des collectes de germoplasme sauvage pour exploiter leur diversité dans les programmes d'amélioration. Enfin, *D. longiflora* présente des caractères intéressants pour le fonio cultivé comme le port érigé de la plante. Ce caractère peut être par conséquent exploité si les gènes responsables venaient à être identifiés.

A decorative graphic of a scroll, outlined in a light green color. The scroll is horizontal and has a rounded right end. On the left side, there is a vertical strip that folds over the top and bottom edges of the scroll, creating a loop at the top and a tail at the bottom. The text is centered within the main body of the scroll.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons développé pour le fonio cultivé (*D. exilis*), un second lot de 24 marqueurs EST-SSR complémentaires à ceux déjà rapportés dans la littérature. Pour ses espèces apparentées, nous avons présenté respectivement 17 et 23 premiers EST-SSR pour *D. iburua* et *D. longiflora*. De même, nous avons présenté pour chacune des trois espèces les marqueurs qui les discriminent et qui peuvent aider à leur identification respective. Les marqueurs développés dans cette étude ont confirmé la proximité entre *D. exilis* et son apparenté sauvage *D. longiflora*. Ils ont également montré une forte transférabilité entre espèces apparentées. Toutefois l'approche de transférabilité de ces marqueurs à *D. iburua* reste limitée du fait de sa différenciation génétique.

Ces marqueurs seraient intéressants pour affiner les connaissances encore incomplètes sur la diversité des *Digitaria* et l'existence de flux de gènes entre espèces apparentées. Il serait intéressant de poursuivre les travaux de recherche afin de :

- Caractériser et conserver la diversité intra et inter espèces chez les *Digitaires sp.* dans chaque pays de l'Afrique de l'Ouest ;
- Appréhender la diversité des apparentés sauvages comme potentiel d'adaptation ;
- Comprendre les processus évolutifs ou d'adaptation au sein des *Digitaires Sp* au cours de ces trente dernières années ;
- Vérifier de potentielle introgression entre *D. exilis* et *D. iburua* du Nigeria (situation sympatrique) ;
- Développer un réseau régional pour les collectes et gestion des collections de fonio en Afrique de l'Ouest ;
- Développer d'autres marqueurs EST-SSR et SSR pour le fonio noir (*D. iburua*) et vérifier leur transférabilité à *D. ternata* ;
- Évaluer l'introgression génétique entre *D. longiflora* et *D. exilis* au Sénégal.

## References bibliographiques

- Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2), 135–141.
- Adoukonou-Sagbadja, H. (2010). Genetic characterization of traditional fonio millets (*Digitaria exilis*, *D. iburua* Stapf) landraces from West-Africa: Implications for conservation and breeding. Universitätsbibliothek Giessen.
- Adoukonou-Sagbadja, H., Dansi, A., Vodouhè, R., & Akpagana, K. (2006). Indigenous knowledge and traditional conservation of fonio millet (*Digitaria exilis*, *Digitaria iburua*) in Togo. *Biodiversity and Conservation*, 15(8), 2379–2395. <http://doi.org/10.1007/s10531-004-2938-3>.
- Adoukonou-Sagbadja, H., Schubert, V., Dansi, A., Jovtchev, G., Meister, A., Pistrick, K., Friedt, W. (2007). Flow cytometric analysis reveals different nuclear DNA contents in cultivated Fonio (*Digitaria* spp.) and some wild relatives from West-Africa. *Plant Systematics and Evolution*, 267(1-4), 163–176. <http://doi.org/10.1007/s00606-007-0552-z>.
- Ahmadi, N., Becquer, T., Larroque, C., & Arnaud, M. (1988). Variabilité génétique du riz (*Oryza sativa* L.) à Madagascar. *L'Agronomie Tropicale*, 43(3), 209–221.
- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1), 19–31.
- Barnaud, A., (2011). Compte rendu de conférence. *Cahiers Agricultures*, 20(4), 310–312.
- Barnaud, A., Vignes, H., Risterucci, A.-M., Noyer, J.-L., Pham, J.-L., Blay, C., Billot, C. (2012). Development of nuclear microsatellite markers for the fonio, *Digitaria exilis* (Poaceae), an understudied West African cereal. *American Journal of Botany*, 99(3), e105–e107. <http://doi.org/10.3732/ajb.1100423>.
- Bosser, J. (1969). Graminées des pâturages et des cultures à Madagascar. Retrieved from <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:13413>.
- Chen, Z. J. (2010). Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science*, 15(2), 57–71.
- Cherifi, K., Boussaïd, M., & Marrakchi, M. (1993). Diversité génétique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L) Krock et de *Medicago intertexta* (L) Mill. I. Analyse de la variabilité morphologique. *Agronomie*, 13(10), 895–906.
- Chung, S.-M., Staub, J. E., & Chen, J.-F. (2006). Molecular phylogeny of Cucumis species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. *Genome*, 49(3), 219–229. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g05-101>.
- Clark, L. V., & Jasieniuk, M. (2011). POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 562–566. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x/full>.
- Clément J. and Leblanc J.M. 1984. Collecte IBPGR-ORSTOM de 1977 au Togo. In Prospection des *Digitaria exilis* (Fonio) en Afrique de l'Ouest. Catalogue ORSTOM 1984, pp. 3–7.
- Cordeiro, G. M., Casu, R., McIntyre, C. L., Manners, J. M., & Henry, R. J. (2001). Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *erianthus* and *sorghum*. *Plant Science*, 160(6), 1115–1123.

- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.
- Cui, L., Wall, P. K., Leebens-Mack, J. H., Lindsay, B. G., Soltis, D. E., Doyle, J. J., others. (2006). Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research*, 16(6), 738–749.
- Dachi, S. N., & Gana, A. S. (2008). Adaptability and yield evaluation of some Acha (*Digitaria exilis* and *Digitaria iburua* Stapf) accessions at Kusogi–Bida, Niger State, Nigeria. *African Journal of General Agriculture*, 4(2), 73–77.
- Diallo, M.A. (2014). Diversité génétique du fonio (*Digitaria exilis* Stapf) en Guinée. Mémoire de Master: Biologie Végétale Tropicale, 28 pages.
- Ding, Q., Li, J., Wang, F., Zhang, Y., Li, H., Zhang, J., & Gao, J. (2015). Characterization and Development of EST-SSR by Deep Transcriptome Sequencing in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *International Journal of Genomics*, 2015, 1–11. <http://doi.org/10.1155/2015/473028>
- Doyle, J. J., Flagel, L. E., Paterson, A. H., Rapp, R. A., Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Wendel, J. F. (2008). Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review of Genetics*, 42, 443–461.
- Dramé, D., Cruz, J.-F., & Béavogui, F. (2011). *Le fonio, une céréale africaine*. Quae.
- Duran, C., Appleby, N., Edwards, D., & Batley, J. (2009). Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualisation. *Current Bioinformatics*, 4(1), 16–27.
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <http://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Eklblom, R., & Galindo, J. (2011). Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity*, 107(1), 1–15.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- FAO. (2010). Agrimonde. Scénarios et défis pour nourrir le monde en 2050. Retrieved April 28, 2016, from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2013102601>
- Frankel, O. H., Brown, A. H., & Burdon, J. J. (1995). *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press.
- Garza, J. C., & Freimer, N. B. (1996). Homoplasmy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Research*, 6(3), 211–217. <http://genome.cshlp.org/content/6/3/211.short>
- Ghislain, M., Núñez, J., del Rosario Herrera, M., Pignataro, J., Guzman, F., Bonierbale, M., & Spooner, D. M. (2009). Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding*, 23(3), 377–388. <http://doi.org/10.1007/s11032-008-9240-0>
- Glenn, T. C., & Schable, N. A. (2005). Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395, 202–222.
- Haq, N., & Ogbe, F. D. (1995). Fonio (*Digitaria exilis* and *D. iburua*). *Cereals and pseudocereals. Underutilized Crop Series*, 2, 225–245.

- Hernandez, P., Oorado G, Laurie D, Martin A, Snape J (2001). Microsatellites and RFLP probes from maize are efficient sources of molecular markers for the biomass energy crop *Miscanthus*. *Theor Appl Genet* 102:616–622.
- Hilu, K. W., M’Ribu, K., Liang, H., & Mandelbaum, C. (1997). Fonio millets: ethnobotany, genetic diversity and evolution. *South African Journal of Botany*, 63(4), 185–190.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., & Bollback, J. P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294(5550), 2310–2314.
- Idi Saidou, S., Bakasso, Y., Inoussa, M., Zaman-Allah, M., Atta, S., Barnaud, A., Saadou, M. (2015). Diversité agro-morphologique des accessions de fonio. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(4), 1710. <http://doi.org/10.4314/ijbcs.v8i4.31>
- Imelfort, M., Duran, C., Batley, J., & Edwards, D. (2009). Discovering genetic polymorphisms in next-generation sequencing data. *Plant Biotechnology Journal*, 7(4), 312–317.
- Jideani, I. A. (2012). *Digitaria exilis* (acha/fonio), *Digitaria iburua* (iburu/fonio) and *Eluesine coracana* (tamba/finger millet) Non-conventional cereal grains with potentials. *Scientific Research and Essays*, 7(45), 3834–3843.
- Jin, Y., Bi, Q., Guan, W., & Mao, J.-F. (2015). Development of 23 Novel Polymorphic EST-SSR Markers for the Endangered Relict Conifer *Metasequoia glyptostroboides*. *Applications in Plant Sciences*, 3(9), 1500038. <http://doi.org/10.3732/apps.1500038>
- Klopfleisch, R., & Gruber, A. D. (2012). Transcriptome and Proteome Research in Veterinary Science: What Is Possible and What Questions Can Be Asked? *The Scientific World Journal*, 2012, 1–14. <http://doi.org/10.1100/2012/254962>
- Kosman, E., & Leonard, K. J. (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species: Similarity Coefficients for Molecular Markers. *Molecular Ecology*, 14(2), 415–424. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02416.x>.
- Kuleung, C., Baenziger, P. S., & Dweikat, I. (2004). Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 108(6), 1147–1150. <http://doi.org/10.1007/s00122-003-1532-5>.
- Liang, X., Chen, X., Hong, Y., Liu, H., Zhou, G., Li, S., & Guo, B. (2009). Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species. *BMC Plant Biology*, 9(1), 35. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-9-35>.
- Liu, Z. (2014). Exploiting Illumina Sequencing for the Development of 95 Novel Polymorphic EST-SSR Markers in Common Vetch (*Vicia sativa* subsp. *sativa*). *Molecules*, 19(5), 5777–5789. <http://doi.org/10.3390/molecules19055777>.
- Mariac, C., Scarcelli, N., Pouzadou, J., Barnaud, A., Billot, C., Faye, A., Couvreur, T. L. P. (2014). Cost-effective enrichment hybridization capture of chloroplast genomes at deep multiplexing levels for population genetics and phylogeography studies. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1103–1113. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12258>.
- Michener, C. D., & Sokal, R. R. (1957). A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution*, 130–162. <http://www.jstor.org/stable/2406046>.
- Morales-Payán, J. P., Ortiz, J. R., Cicero, J., & Taveras, F. (2002). *Digitaria exilis* as a crop in the Dominican Republic. *Supplement to: Trends in New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria.

- Morgante, M., Hanafey, M., & Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with non repetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30(2), 194–200.
- Morton, J. F. (2007). The impact of climate change on smallholder and subsistence agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19680–19685.
- Obbard, D. J., Harris, S. A., & Pannell, J. R. (2006). Simple allelic-phenotype diversity and differentiation statistics for allopolyploids. *Heredity*, 97(4), 296–303.
- Obilana, A. B. (2003). Overview: importance of millets in Africa. *World (all Cultivated Millet Species)*, 38, 28.
- Otto, S. P. (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, 131(3), 452–462.
- Paetkau, D., & Strobeck, C. (1995). The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology*, 4(4), 519–520.
- Parida, S. K., Kalia, S. K., Kaul, S., Dalal, V., Hemaprabha, G., Selvi, A., others. (2009). Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(2), 327–338.
- Parisod, C., Holderegger, R., & Brochmann, C. (2010). Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, 186(1), 5–17. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2009.03142.x/full>.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J. P. (2006). *DARwin software*.
- Poilecot, P. (1995). Les Poaceae de Côte-d'Ivoire: manuel illustré d'identification des espèces (Vol. 50). Boissiera.
- Portères, R. (1946). L'aire culturale du *Digitaria Ibura* Stepf., céréale mineure de l'Ouest-Africain. *Agron. Trop*, 1, 589–592.
- Portères, R. (1976). African Cereals: Eleusine, Fonio, Black Fonio, Tefi', Brachiaria, paspalum, Pennisetum, and African Rice. *Origins of African Plant Domestication*, 409.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2(3), 225–238.
- Pritchard, J. K., Wen, W., & Falush, D. (2003). Documentation for STRUCTURE software: Version 2.
- Rajendrakumar, P., Biswal, A. K., Balachandran, S. M., Srinivasarao, K., & Sundaram, R. M. (2007). Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics*, 23(1), 1–4.
- Roullier, C. (2012). Aux origines de la diversité de la patate douce (*ipomoea batatas*): une enquête phylogéographique en Amérique tropicale (aire d'origine) et en Océanie (aire d'introduction). Thèse de Doctorat, Université de Montpellier, France, 385 pages.
- Rudebjer, P., Meldrum, G., Padulosi, S., Hall, R., & Hermanowicz, E. (2014). Realizing the promise of neglected and underutilized species: Policy Brief.
- Saltonstall, K. (2003). Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. *Molecular Ecology*, 12(7), 1689–1702.

- Sarah, G. A large set of 26 new reference transcriptomes dedicated to comparative population genomics in crops and wild relatives. Article soumis
- Santana, Q. C., Coetzee, M. P., Steenkamp, E. T., Mlonyeni, O. X., Hammond, G. N., Wingfield, M. J., others. (2009). Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *Biotechniques*, 46(3), 217.
- Scarcelli, N., Barnaud, A., Eiserhardt, W., Treier, U. A., Seveno, M., d' Anfray, A., Pintaud, J.-C. (2011). A Set of 100 Chloroplast DNA Primer Pairs to Study Population Genetics and Phylogeny in Monocotyledons. *PLoS ONE*, 6(5), e19954. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019954>.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234.
- Senthilvel, S., Jayashree, B., Mahalakshmi, V., Sathish Kumar, P., Nakka, S., Nepolean, T., & Hash, C. T. (2008). Development and mapping of Simple Sequence Repeat markers for pearl millet from data mining of Expressed Sequence Tags. *BMC Plant Biology*, 8(1), 119. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-8-119>.
- Shehzad, T., Okuizumi, H., Kawase, M., & Okuno, K. (2009). Development of SSR-based sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) diversity research set of germplasm and its evaluation by morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(6), 809–827. <http://doi.org/10.1007/s10722-008-9403-1>.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Tate, J. A. (2004). Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*, 161(1), 173–191. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1469-8137.2003.00948.x/full>.
- Taramino, G., Tarchini, R., Ferrario, S., Lee, M., & others. (1997). Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSR) in *Sorghum bicolor*. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(1-2), 66–72.
- Temnykh, S., Park, W. D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., McCOUCH, S. R. (2000). Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 100(5), 697–712.
- Temple, V. J., & Bassa, J. D. (1991). Proximate chemical composition of Acha (*Digitaria exilis*) grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56(4), 561–563.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dole, S., Olivier, J.-M., & others. (1997). ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*, 7(1), 75–83.
- Tóth, G., Gáspári, Z., & Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10(7), 967–981.
- Vanden Berghen, C. (1991). Monocotylédones et Ptéridophytes. In *Flore illustrée du Sénégal* (Vol. X). Dakar, Sénégal: Ministère du Développement rural et de l'Hydraulique, Direction des Eaux et Forêts.
- Varshney, R. K., Chabane, K., Hendre, P. S., Aggarwal, R. K., & Graner, A. (2007). Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science*, 173(6), 638–649. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.08.010>.
- Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 48–55. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005>.

- Vodouhe, R. S., Dako, G. A., Dansi, A., Adoukonou-Sagbadja, H., Vodouhe, R., Atta-Krah, K., others. (2007). Fonio: a treasure for West Africa. In *Plant genetic resources and food security in West and Central Africa. Regional Conference, Ibadan, Nigeria, 26-30 April, 2004*. (pp. 219–222). Bioversity International.
- Vodouhe, S. R., Zannou, A., & Dako, E. A. (2003). Actes du premier atelier sur la diversité génétique du fonio (*Digitaria exilis* Stapf.) en Afrique de l'Ouest.
- Wintero, A. K., Fredholm, M., & Thomsen, P. D. (1992). Variable (dG-dT) n·(dC-dA) n sequences in the porcine genome. *Genomics*, 12(2), 281–288.
- Yang, L., Wen, C., Zhao, H., Liu, Q., Yang, J., Liu, L., & Wang, Y. (2015). Development of Polymorphic Genic SSR Markers by Transcriptome Sequencing in the Welsh Onion (*Allium fistulosum* L.). *Applied Sciences*, 5(4), 1050–1063. <http://doi.org/10.3390/app5041050>.
- Zane, L. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1), 1–16. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x/full>.





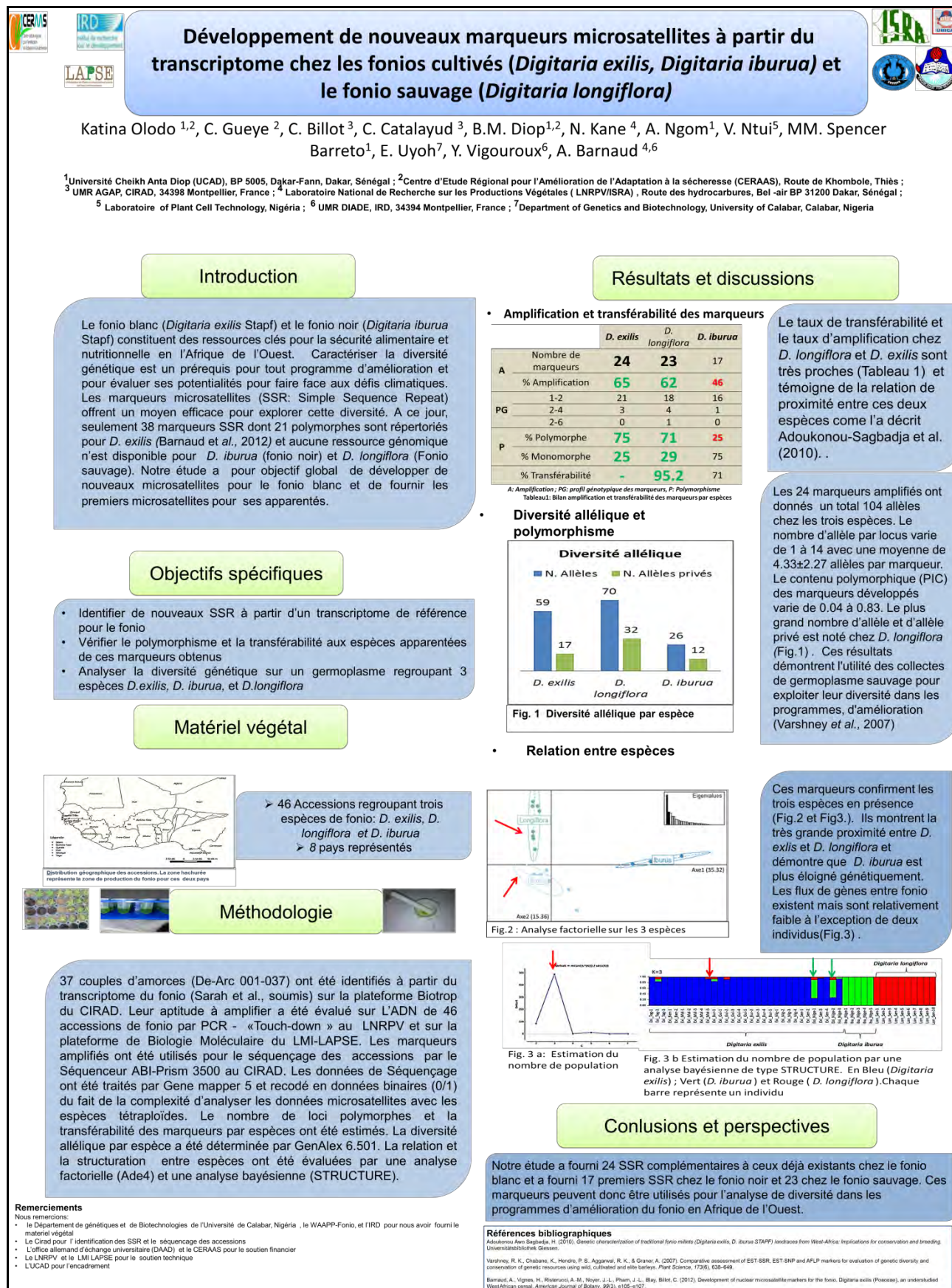
Annexe 1 : Référence des 47 accessions étudiées

ECHANTILLON	CODE	ESPECE	LONGITUDE*	LATITUDE*	ANNEE	ORGANF	LIBELLE_6	PAYS	TOTAL/PAYS	CONCENTRATION	A260/A280
<b>G12_08_F_A01</b>	<b>Exi_Sen_2</b>	<i>D. exilis</i>	-11,42482	12,4717	07/11/2013	WAAPP	Fodebinea	Sénégal	5	133,7	1,86
<b>I06-11-F-A01</b>	<b>Exi_Sen_3</b>	<i>D. exilis</i>	-15,28931	12,41718	21/12/2013	WAAPP	Manécounda	Sénégal		189,8	1,98
<b>I07-07-F-A01</b>	<b>Exi_Sen_4</b>	<i>D. exilis</i>	-15,65803	12,27858	22/12/2013	WAAPP	Faradianto	Sénégal		175,9	1,96
<b>M05-02-F-A01</b>	-	<i>D. exilis</i>	-13,01004	12,46793	03/03/2014	WAAPP	Némataba mandingue	Sénégal		391,7	1,99
<b>G03_03_F_A01</b>	<b>Exi_Sen_1</b>	<i>D. exilis</i>	-14,14522	13,37107	02/11/2013	WAAPP	Missirah seydou	Sénégal		284,8	1,98
<b>CM04489</b>	<b>Exi_Ben_1</b>	<i>D. exilis</i>	1,86723	10,24	1978	IBPGR	Atacora	Bénin	2	104,6	1,94
<b>CM04491</b>	<b>Exi_Ben_2</b>	<i>D. exilis</i>	1,26723	10,21	1978	IBPGR	Atacora	Bénin		174,5	2,02
<b>CM07357</b>	<b>Exi_Gui_5</b>	<i>D. exilis</i>	-6,16277	8,43	1982	IBPGR	Beyla	Guinée	5	141,2	2
<b>CM07229</b>	<b>Exi_Gui_1</b>	<i>D. exilis</i>	6,78277	11,27	1982	IBPGR	Siguiiri	Guinée		117,5	2
<b>CM07294</b>	<b>Exi_Gui_3</b>	<i>D. exilis</i>	9,90277	11,24	1982	IBPGR	Labe	Guinée		123,6	2,02
<b>CM07312</b>	<b>Exi_Gui_4</b>	<i>D. exilis</i>	10,85277	11,06	1982	IBPGR	Telimele	Guinée		148,9	2,01
<b>CM07278</b>	<b>Exi_Gui_2</b>	<i>D. exilis</i>	9,25277	11,43	1982	IBPGR	Tougue	Guinée		237,5	1,99
<b>CM07900</b>	<b>Exi_Bur_3</b>	<i>D. exilis</i>	2,21277	11,11	1981	IBPGR	Orodara	Burkina Faso	5	144,9	1,99
<b>CM07902</b>	<b>Exi_Bur_4</b>	<i>D. exilis</i>	2,03277	11,11	1981	IBPGR	Bono	Burkina Faso		117,8	2
<b>CM07896</b>	<b>Exi_Bur_2</b>	<i>D. exilis</i>	2,73277	10,56	1981	IBPGR	Orodara	Burkina Faso		223,9	2,01
<b>CM06506</b>	<b>Exi_Bur_1</b>	<i>D. exilis</i>	1,15277	12,47	1981	IBPGR	Nouna	Burkina Faso		144,9	1,97
<b>CM07908</b>	<b>Exi_Bur_5</b>	<i>D. exilis</i>	1,86277	11,08	1981	IBPGR	Toussiana	Burkina Faso		122,2	1,95
<b>CM05843</b>	<b>Exi_Mal_4</b>	<i>D. exilis</i>	1,03277	14,08	1978	IBPGR	Bankass	Mali	5	138,8	1,94

ECHANTILLON	CODE	ESPECE	LONGITUDE*	LATITUDE*	ANNEE	ORGANF	LIBELLE_6	PAYS	TOTAL/PAYS	CONCENTRATION	A260/A280
CM05798	Exi_Mal_3	<i>D. exilis</i>	4,91277	11,06	1978	IBPGR	Bougouni	Mali		298,4	1,95
CM05747	Exi_Mal_2	<i>D. exilis</i>	8,94277	13,4	1978	IBPGR	Kayes	Mali		263,3	1,85
CM05848	Exi_Mal_5	<i>D. exilis</i>	1,12277	13,3	1978	IBPGR	Bankass	Mali		326,9	1,96
CM05736	Exi_Mal_1	<i>D. exilis</i>	4,77277	13,53	1978	IBPGR	Kolokani	Mali		141,5	1,99
CM12212	Exi_Nig_2	<i>D. exilis</i>	2,33723	0	0	Inconnu	Inconnue	Niger		181,9	1,93
CM12215	Exi_Nig_3	<i>D. exilis</i>	2,33723	0	0	Inconnu	Inconnue	Niger	4	225,5	1,96
CM12233	Exi_Nig_4	<i>D. exilis</i>	2,33723	0	0	Inconnu	Inconnue	Niger		115,2	2,01
CM12203	Exi_Nig_1	<i>D. exilis</i>	2,33723	0	0	Inconnu	Inconnue	Niger		110,6	1,97
CM03436	Exi_Tog_3	<i>D. exilis</i>	1,77723	7,29	1977	IBPGR	Amlame	Togo		147,1	2,04
CM03434	Exi_Tog_2	<i>D. exilis</i>	1,32723	7,37	1977	IBPGR	Atakpame	Togo	3	267	1,98
CM03391	Exi_Tog_1	<i>D. exilis</i>	1,99723	9,58	1977	IBPGR	Mango	Togo		155,5	1,92
284	Lon_Sen_1	<i>D. longiflora</i>	-16,59637	13,06604	09/10/2015	WAAPP	Diouloulou	Sénégal	10	368,70	1,80
346	Lon_Sen_2	<i>D. longiflora</i>	-16,73037	12,93417	10/10/2015	WAAPP	Kafountine	Sénégal		249,80	1,82
361	Lon_Sen_3	<i>D. longiflora</i>	-16,73037	12,93417	10/10/2015	WAAPP	Kafountine	Sénégal		216,40	1,92
387	Lon_Sen_4	<i>D. longiflora</i>	-16,73037	12,93414	10/10/2015	WAAPP	Kafountine	Sénégal		135,60	1,95
393	Lon_Sen_5	<i>D. longiflora</i>	-16,73037	12,93414	10/10/2015	WAAPP	Kafountine	Sénégal		407,80	1,91
415	Lon_Sen_6	<i>D. longiflora</i>	-16,28845	12,54855	12/10/2015	WAAPP	Ziguinchor	Sénégal		352,40	1,88
418	Lon_Sen_7	<i>D. longiflora</i>	-16,28845	12,54855	12/10/2015	WAAPP	Ziguinchor	Sénégal		394,00	1,84
430	Lon_Sen_8	<i>D. longiflora</i>	-16,28882	12,54972	12/10/2015	WAAPP	Ziguinchor	Sénégal		242,50	1,89
535	Lon_Sen_9	<i>D. longiflora</i>	-16,72701	12,37095	13/10/2015	WAAPP	Cap skirring	Sénégal		240,70	1,87

ECHANTILLON	CODE	ESPECE	LONGITUDE*	LATITUDE*	ANNEE	ORGANF	LIBELLE_6	PAYS	TOTAL/PAYS	CONCENTRATION	A260/A280
545	Lon_Sen_10	<i>D. longiflora</i>	-16,72701	12,37095	13/10/2015	WAAPP	Cap skirring	Sénégal		105,50	1,83
Jarab1	Ibu_Nige_3	<i>D. iburua</i>	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Nigéria	5	1482,5	1,95
Nibang2	Ibu_Nige_4	<i>D. iburua</i>	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Nigéria		683	1,82
Gotip1	Ibu_Nige_2	<i>D. iburua</i>	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Nigéria		617,5	1,87
Sunpiya1	Ibu_Nige_5	<i>D. iburua</i>	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Nigéria		391,9	1,88
Dampep1	Ibu_Nige_1	<i>D. iburua</i>	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Nigéria		619,1	1,86
Napiya4	Exi_Nige_2	<i>D. exilis</i>	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Nigéria	3	318,5	1,65
Gong-Arandona1	Exi_Nige_1	<i>D. exilis</i>	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Nigéria		610,1	1,96
Tishi3	Exi_Nige_3	<i>D. exilis</i>	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Nigéria		1100,1	1,67

\* : En degré décimaux



**Titre :** Développement de nouveaux marqueurs microsatellites à partir du transcriptome du fonio chez les espèces cultivées (*Digitaria exilis*, *Digitaria iburua*) et sauvage (*Digitaria longiflora*)

**Prénom et nom:** Katina Floride OLODO

**Date de naissance :** 06 Avril 1992

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

**Présenté et soutenu le :** 25 Juin 2016

**Président de Jury :** M. Diegane DIOUF      Maître de Conférences      UCAD

**Membres du Jury :**

M. Diaga DIOUF      Professeur Titulaire      UCAD

Mme Marie Madeleine SPENCER-BARRETO      Maître de Conférences      UCAD

Mme Adeline BARNAUD      Chargée de recherche      IRD

## Résumé

Le fonio blanc (*Digitaria exilis* Stapf) et le fonio noir (*Digitaria iburua* Stapf) sont des ressources clés pour l'alimentation et la sécurité nutritionnelle en Afrique de l'Ouest. Cependant, ils restent négligés par la recherche et les politiques agricoles en raison d'une connaissance encore incomplète des ressources génétiques existantes et des parents sauvages. Caractériser la diversité génétique est une condition préalable à tout programme d'amélioration. Ces études nécessitent des outils moléculaires efficaces. Les marqueurs moléculaires sont des outils utiles pour quantifier la variation génétique et fournissent un moyen efficace pour associer le phénotype à son génotype. Parmi ces marqueurs, les microsatellites (ou SSR) ont pris une importance capitale. À ce jour, seulement 38 marqueurs SSR dont 21 polymorphes ont été répertoriés pour *D. exilis* et aucun marqueur n'a été publié pour ses apparentées. Cette étude vise à développer de nouveaux marqueurs SSR pour *D. exilis* et fournir les premiers marqueurs chez *D. iburua* et *D. longiflora*.

Trente-sept couples d'amorces ont été développés à partir du transcriptome du fonio (*D. exilis*) et testés sur quarante-sept accessions couvrant l'aire de répartition de ces espèces en Afrique de l'Ouest (32 *D. exilis*, 10 *D. longiflora* et 5 *D. iburua*). L'amplification a été observée pour vingt-quatre marqueurs générant un total de 104 allèles chez les trois espèces. Les pourcentages d'amplifications observés étaient de 65%, 62% et 46% pour *D. exilis*, *D. longiflora*, et *D. iburua* respectivement. Les taux de transférabilité de ces marqueurs étaient respectivement de 95,2% et 71% pour *D. longiflora* et *D. iburua*. Pour la plupart des marqueurs, le profil génotypique observé était de 1-2 allèles par accession, sauf pour trois marqueurs qui ont montré 2-4 allèles par accession et un marqueur qui a montré 2-6 allèles dans une accession. Le nombre d'allèle observé par locus varie de 1 à 14 avec une moyenne de  $4,33 \pm 2,27$  par marqueur. Le contenu polymorphique (PIC) chez les marqueurs développés varie de 0,04 à 0,83. Le nombre de marqueurs polymorphes obtenus est relativement élevé chez *D. exilis* et *D. longiflora* tandis que *D. iburua* a un taux de polymorphisme faible. Ces nouveaux SSR confirment la plus grande proximité taxonomique entre *D. exilis* et *D. longiflora* et soulignent l'utilité des apparentés sauvages comme un réservoir potentiel de diversité pour l'amélioration des plantes cultivées. Ces nouveaux marqueurs microsatellites complètent les outils moléculaires et laissent supposer d'intéressantes études sur la diversité du fonio.

**Mots-clés :** Fonio, Transcriptome, microsatellites (SSR), espèces apparentées, diversité génétique