UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP - DAKAR

Faculté des Sciences et Techniques

Département de Biologie Végétale

Mémoire pour l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

présenté par

HASSNA FOUNOUNE

CONTRIBUTION A LA CARACTERISATION DE *VIGNA VEXILLATA* (L.) A. RICH. A L'AIDE DE MARQUEURS MORPHO-PHYSIOLOGIQUES (BIOMETRIE) ET GENETIQUES (RAPD)

Soutenu le 26 NOVEMBRE 1997

devant la Commission d'Examen composée de :

Président:	M. Amadou Tidiane BA, Professeur.
Membres:	Mme Marie Madeleine SPENCER-BARRETO, Maître de conférences
	Mme Mame Ourèye SY-AGNE, Maître-assistante.
	Mme Claudine NEF-CAMPA, Chercheur à l'ORSTOM.
	M. Cheikh Alassane FALL, Chercheur au CDH/I.S.R.A..

Fonds Documentaire ORSTOM
Cote : Ax 1646 Ex :

Remerciements

Ce travail à été effectué à Dakar, au Laboratoire de Biotechnologies Végétales de la Faculté des Sciences et Techniques à l'Université Cheikh Anta DIOP, au Laboratoire de Génétique de l'ORSTOM (Bel Air) et au Laboratoire de Chimie à l'Institut de Technologies Alimentaires. Il a également bénéficié de l'appui logistique du Centre pour le Développement de l'Horticulture. Je ne saurais le présenter sans adresser mes sincères remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué à sa réussite.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux autorités de l'Ambassade du Maroc au Sénégal de m'avoir permis de fréquenter l'Université de Dakar.

Mes remerciements vont tout d'abord à Monsieur Le Professeur Libasse DIOP, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques, pour m'avoir accordé l'inscription en A.E.A. et aussi pour ses judicieux conseils.

Tous mes remerciements vont également à Monsieur Le Professeur Amadou Tidiane BA, Chef du Département de Biologie Végétale, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant ma demande d'inscription au troisième cycle et pour l'honneur qu'il me fait en présidant ce jury.

Madame Marie Madeleine SPENCER-BARRETO, Maître de conférences au Département de Biologie Végétale, a accepté de guider mes premiers pas dans la recherche et de diriger ce travail malgré ses nombreuses préoccupations. Sa rigueur, son grand soutien indéfectible m'ont vraiment marqués. Je l'en remercie très sincèrement.

Madame Claudine NEF-CAMPA, Chercheur à l'ORSTOM, pour la spontanéité avec laquelle elle a accepté de guider mon stage. J'ai beaucoup appris à ses côtés; sa rigueur, sa grande disponibilité ont, entre autres, été déterminants dans la réalisation de ce présent travail. Qu'elle trouve ici, l'assurance de ma sincère reconnaissance.

Merci également à Madame Mame Ourèye SY-AGNE, Maître assistante au Département de Biologie Végétale, pour avoir accepté spontanément de juger ce travail et de siéger dans ce jury.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur Cheikh Alassane FALL, Chercheur au CDH, pour l'important appui logistique qu'il a apporté aux analyses statistiques et pour avoir accepté de juger ce travail. Sa constante disponibilité, sa rigueur dans le travail et son abnégation m'ont énormément marqués.

Madame Rokhaya GNING et Monsieur Djibril TRAORE, Techniciens Supérieurs à l'ITA, pour avoir accepté de diriger mon stage à l'ITA. Je les remercie pour leur disponibilité et leur soutien qui ont énormément aidé à la réalisation de ce travail.

Je remercie tout le personnel du CDH, en particulier Monsieur Alain MBAYE, Chef URA/Niayes; tout le personnel de l'ITA, en particulier Monsieur Moustapha KANE, Responsable du Laboratoire de Chimie; tout le personnel de l'ORSTOM et de l'URCI/ISRA, en particulier Monsieur Mamadou GUEYE, Chef de l'URA/Productions Végétales.

J'exprime ma gratitude à tout le personnel de la scolarité de la Faculté des Sciences et Techniques, en particulier à Madame SALL, à tout le personnel du Département de chimie, de l'IFAN, du Département de Biologie Végétale, en particulier à Monsieur PAPE Ibra SAMB, Monsieur Kandioura NOBA, Monsieur Ibrahima NDOYE, Monsieur Samba Sylla NDAO, Monsieur Tahir DIOP, Monsieur Aboubacry SOW, Monsieur Seydna TALL, Monsieur Salif GUEYE et Madame DELGADO pour leur sympathie et leur soutien constant.

Je remercie mes collègues au Département de Biologie Végétale en particulier Mathieu GUEYE, Mamour SECK et Bassirou DIALLO; au Département de chimie; aux Laboratoires de Microbiologie et de Nématologie à l'ORSTOM (Bel Air) pour leur soutien et leur sympathie durant ces moments de travail.

Merci à la famille GNING et à toutes les familles marocaines résidantes à Dakar, en particulier la famille TLEMSANI, pour leur soutien constant pendant les moments les plus difficiles.

Merci à tous mes compatriotes à Dakar en particulier Nouha BOUCHARB, Farah EL HAFED, Boutaina EL KOUZI, Jaouad SQUALLI, Jad BENSOUDA et Nawfel SEMLALI pour les bons moments que nous avons pu passer ensemble.

Mes amis au Maroc m'ont toujours soutenu moralement, en particulier mes collègues à la Faculté des Sciences I à Casablanca. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je remercie tous mes amis à Dakar, Abdou SY, Sidy NDIAYE, Ibrahim SENE et en particulier Moustapha MBOUP, pour leur sympathie, leur disponibilité et surtout pour leur soutien moral.

Je tiens à remercier les autorités de l'UNESCO (contrat SC/BSC/LS n°206.571.7) et de l'ORSTOM qui m'ont offert les moyens nécessaires pour mener à bien cette étude.

Dédicaces

A mes parents.

A ma sœur: Nadia.

A mes frères: Si Mohammed, Abdellatif,

Rachid et Charaf.

A toute la famille: Founoune.

A tous mes amis.

Résumé

Titre: Contribution à la caractérisation de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. à l'aide de marqueurs morpho-physiologiques (Biométrie) et génétiques (RAPD).

Nom du candidat: Hassna Founoune

Nature du mémoire: D.E.A. de Biologie Végétale

L'étude morpho-physiologique et génétique de cinq provenances de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich.: TVNu 1503, 1498, 1502, 1506 et 1492 a fourni un ensemble d'informations se rapportant à: i) la morphologie descriptive, ii) la composition chimique des tubercules comestibles produits par la plante (teneur en eau, protéines, lipides, éléments minéraux et cellulose), iii) l'étude de la diversité génétique par la technique d'amplification aléatoire des fragments d'ADN (RAPD).

Les résultats chiffrés de l'étude morphologique et de la composition chimique des tubercules ont servi, dans le même temps, grâce aux techniques statistiques d'Analyse en Composantes Principales (ACP), à retenir 19 variables (parmi les 30 étudiées) pour la structuration de la population en 6 groupes d'individus. Avec l'amplification de l'ADN par RAPD, il a été possible de définir pour chacune des 6 amorces choisies, un niveau précis d'utilisation dans l'analyse de la diversité génétique chez *Vigna vexillata* (inter ou intra-spécifique). Ces résultats constituent un premier jalon dans la recherche de l'identification et de la caractérisation de marqueurs spécifiques susceptibles de discriminer et/ou de confirmer les relations génétiques entre les deux espèces *Vigna unguiculata* et *Vigna vexillata*.

Mots clés: *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., marqueurs morpho-physiologiques, ACP, analyse de co-inertie, analyse RAPD.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Réaction RAPD: dénaturation / hybridation / polymérisation, permettant l'accumulation d'un nombre élevé de copies des fragments de l'ADN génomique ayant hybridé avec l'amorce. **p18**

Figure 2: Profils électrophorétiques par RAPD avec l'amorce A_1 (lignes de 1 à 4) et l'amorce A_2 (ligne de 7 à 10) de l'ADN extrait de *Vigna vexillata* par la méthode *Supaquick*. Purification au phénol, phénol-chloroforme-alcool isoamylique (lignes 1, 2, 7 et 8) et au chloroforme-alcool isoamylique (lignes 3, 4, 9 et 10). A_1 et A_2, deux amorces utilisées en routine pour l'analyse par RAPD de la diversité génétique chez Acacia. **p22**

Figure 3: Différentes étapes de l'extraction d'ADN. **p25**

Figure 4: Différentes étapes de la RAPD (Williams *et al.*, 1990). **p27**

Figure 5: Types de germination chez *V. vexillata* (Vanderborght, 1989). **p30**

Figure 6: Type de ramification basale chez *Vigna vexillata*, la forme *twining* (à droite), la forme en rosette (à gauche) (James et Lawn, 1991). **p30**

Figure 7: Fleur de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich.. **p34**

Figure 8: Typologie de variables en ACP séparées par tableau. Les vecteurs représentent les variables.. **p39**

Figure 9: Inertie totale des tableaux de données. **p39**

Figure 10: Projection des variables de synthèse sur les composantes principales. **p42**

Figure 11a: Projection de variables sur les axes de co-inertie. **p42**

Figure 11b: Projection des nuages de points (plants) sur la structure commune. **p44**

Figure 12: Typologie des tableaux. Les vecteurs représentent les tableaux de données morphométriques. **p44**

Figu re 13a: Histogramme des vecteurs propres issues de l'ACP. Les 3 premiers histogramme correspondant aux 3 premières composantes sont retenues pour la projection des variables. **p46**

Figures 13b et 13c: Cercles de corrélations des variables sur le plan 1-2 et 1-3, représentation graphique des liaisons entre lers variables. **p46**

Figure 14a: Typologie des individus-plants dans le plan factoriel 1-2. Répartition des individus dans le plan 1-2. Les individus sont représentés par le numéro de la provenance, dans l'ordre TVNu 1503, 1498, 1502, 1506 et 1492, suivi par le numéro du plant (1 à 5) pour chaque provenance. **p48**

Figure 14b: Contribution des individus aux variables. L'importance de la surface des cercles et des carrés quantifie la corrélation. **p49**

Figure 15: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 3. Marqueur 1 kb (ligne 1), lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1503 (ligne 2 et 3), TVNu 1498 (ligne 4 et 5), TVNu 1492 (ligne 6 et 7) et *V. unguiculata* (ligne 8 et9). **p55**

Figure 16: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 4. Lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1503 (ligne 1 et 2), TVNu 1498 (ligne 3 et 4), TVNu 1492 (ligne 5 et 6) et *V. unguiculata* (ligne 7 et 8). **p55**

Figure 17: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 5. Marqueur 1kb (ligne 1), lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1502 (ligne 2 et 3), TVNu 1503 (ligne 4 et 5), TVNu 1492 (ligne 6 et 7),*V. unguiculata* (ligne 8 et 9) et marqueur 1 kb (ligne 10). **p57**

Figure 18: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 6. Marqueur 1 kb (ligne 1), lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1502 (ligne 2 et 3), TVNu 1503 (ligne 4 et 5), TVNu 1492 (ligne 6 et 7), *V. unguiculata* (ligne 8 et 9) et marqueur 1 kb (ligne 10). **p57**

LISTE DES PLANCHES

Planche 1: **p28**

Photo 1: Plant adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provennance TVNu 1503

Photo 2: Plant adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provennance TVNu 1498

Photo 3: Plant adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provennance TVNu 1502

Photo 4: Plant adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provennance TVNu 1506

Photo 5: Plant adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provennance TVNu 1492

Planche 2: **p29**

Photo 1: Tubercule de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provennance TVNu 1503

Photo 2: Tubercule de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provennance TVNu 1498

Photo 3: Tubercule de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provennance TVNu 1502

Planche 3: **p33**

Figure 1: Feuille adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provenance TVNu 1503

Figure 2: Feuille adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provenance TVNu 1498

Figure 3: Feuille adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provenance TVNu 1502

Figure 4: Feuille adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provenance TVNu 1506

Figure 5: Feuille adulte de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., provenance TVNu 1492

Planche 4: **p36**

Figure 1a: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1503 (Vue de face).

Figure 1b: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1503 (Vue de profil).

Figure 2a: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1498 (Vue de face).

Figure 2b: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1498 (Vue de profil).

Figure 3a: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1502 (Vue de face).

Figure 3b: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1502 (Vue de profil).

Figure 4a: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1506 (Vue de face).

Figure 4b: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1506 (Vue de profil).

Figure 5a: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1492 (Vue de face).

Figure 5b: Graine de *Vigna vexillata* (L.)A.Rich., provenance TVNu 1492 (Vue de profil).

Planche 5: **p51**

Figure 1: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 1. Marqueur 1kb (ligne 1), descendance *V. vexillata* TVNu 1506 (ligne 2 à 11) et lignée parentale *V.vexillata* TVNu 1506 (lignes 12 et 13).

Figure 2: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 1. Lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1503 (ligne 1), TVNu 1498 (ligne 2 et 3), TVNu 1502 (ligne 4, 5 et 6), TVNu 1492 (ligne 7 et 8) et marqueur 1kb (ligne 9).

Planche 6: **p53**

Figure 1: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 2. Lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1503 (ligne 1), TVNu 1498 (lignes 2 et 3), TVNu 1502 (lignes 4, 5 et 6), TVNu 1492 (lignes 7 et 8) et le marqueur 1 kb (ligne 9).

Figure 2: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 2. Marqueur 1Kb (ligne1), descendance de *V. vexillata* TVNu 1503 (ligne 2 à 10), TVNu 1502 (ligne 11 à 16) et TVNu 1492 (ligne 17 et 18).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Comparaison des techniques d'extraction d'ADN sur des feuilles de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich.. **p21**

Tableau 2: Comparaison des quantités d'ADN obtenues et de leur degré de pureté en fonction des techniques de purification adoptées dans la technique *Supaquick*.. **p23**

Tableau 3: Dates d'apparition de certains organes, en jours après semis.p29

Tableau 4: Rythme journalier de germination des graines issues des cinq provenances. **p30**

Tableau 5: Forme des feuilles de rang 1. **p31**

Tableau 6: Valeurs des rapports largeur/longueur (l/L) de la foliole médiane (FM) et des folioles latérales (FL) de rangs 2, 3, 4 et 5. **p32**

Tableau 7: Forme des folioles médianes (FM) et latérales (FL) des feuilles de rangs 2, 3, 4 et 5. **p32**

Tableau 8: Taux de tubérisation des 5 Provenances. **p37**

Tableaux 9: Tableau récapitulatif de l'ensemble des résultats de la composition biochimique des tubercules. **p38**

Tableau 10: Valeurs de coefficients de corrélation vectorielle et de la qualité de la représentation des 8 meilleurs tableaux des données morphométriques. **p45**

Tableau 11: Principaux résultats issus de la RAPD. **p59**

QUELQUES DEFINITIONS, SIGLES ET ABREVIATIONS

Définitions:

Provenance: Unité de collecte (graine) correspondant à un numéro de collection.

Cultivar: ensemble d'individus non différenciés par la nomenclature officielle, possédant des caractéristiques agro-technologiques communes définies localement.

Sigles:

C.D.H.: Centre pour le Développement de l'Horticulture.

F.A.O.: Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.

I.I.T.A.: International Institut for Tropical Agriculture, Ibadan, Nigéria.

I.T.A.: Institut de Technologie Alimentaire.

I.S.R.A.: Institut Sénégalais de Recherche Agricoles.

ORSTOM: Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération.

U.C.A.D.: Université Cheikh Anta DIOP de Dakar.

Abréviations:

°C: Degré celsius.

ACOM: Analyse de co-inertie multiple.

ACP: Analyse en Composantes Principales.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AFD: Analyse Factorielle Discriminante.

Anova: Analyse de variance univariée.

BET: Bromure d'éthidium.

covv²: Covariance Vectorielle.

dNTP: désoxyribonucléotide tri-phosphate.

DO: Densité optique.

EDTA: Ethylène diamine tétra-Acétate.

h: Heure.

H_2SO_4: Acide sulfurique

J.A.S.: Jour après semis.

M: Molaire.

$MgCL_2$: Chlorure de Magnésium.

min: Minute.

NaOH: Soude.

p/v: Poids par volume.

pb: paire de base.

PCR: Réaction de polymérisation en chaîne.

pH: Potentiel hydrogène.

PM: Poids moléculaire.

R.V.: Corrélation Vectorielle.

RAPD: Amplification aléatoire des fragments d'ADN.

RFLP: Polymorphisme des longueurs des fragments de restriction de l'ADN.

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate.

Taq polymérase: enzyme (polymérase) extraite de la bactérie *Themus aquaticus*.

TBE: Tris Borate EDTA.

v/v: Volume par volume.

SOMMAIRE

CHAPITRE 1. INTRODUCTION 0

CHAPITRE 2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4

1. **LE GENRE *VIGNA*** 5

1.1. Description morphologique générale des représentants du genre *Vigna* 5

1.2. Ecologie 5

1.3. Ethnobotanique 6

2. *VIGNA VEXILLATA* (L.) A. RICH. 7

2.1. Description botanique 7

2.2. Répartition géographique 8

2.3. Utilité 8

CHAPITRE 3. MATERIELS ET METHODES 9

1. MATERIEL VEGETAL 10

2. METHODES EXPERIMENTALES 10

2.1. Méthode de germination 10

2.2. Etude morphométrique 10

2.2.1. Etude de différents organes 10

2.2.2. Etude du port de la plante 11

2.2.3. Etude de la fructification 11

2.2.3.1. Les fleurs 11

2.2.3.2. Les gousses 12

2.2.3.3. Les graines 12

2.3. Etude de la tubérisation 12

2.4. Analyse biochimique des tubercules 12

2.4.1. Préparation du matériel végétal 12

2.4.2. Evaluation du taux d'humidité 12

2.4.3. Dosage des protéines 13

2.4.4. Dosage des lipides 14

2.4.5. Détermination des éléments minéraux 15

2.4.6. Dosage de la cellulose brute 15

2.5. Méthode d'analyse statistique 16

2.5.1. Structuration des données recueillies 16

2.5.2. Méthodologie d'analyse 17

2.6. Analyse de la diversité génétique réalisée par RAPD 19

2.6.1. Aperçu sur les méthodes d'analyse de la diversité génétique 19
2.6.2. Protocole d'obtention d'ADN 19
2.6.2.1. Evaluation de l'ADN extrait 20
2.6.2.2. Comparaison des deux techniques d'extraction 20
2.6.2.3. Protocole proposé 23
2.6.3. Amplification de l'ADN par RAPD 26
2.6.4. Révélation par électrophorèse sur gel d'agarose 28
2.6.4.1. Préparation du gel 28
2.6.4.2. Préparation des échantillons 28
2.6.4.3. Electrophorèse 28
2.6.4.4. Visualisation 28

CHAPITRE 4. RESULTATS 28

1. LA PLANTE 29

2. COMPORTEMENT GERMINATIF DES GRAINES 29

2.1. Taux de germination 29

2.2. Type de germination 31

3. ETUDE MORPHOMETRIQUE 31

3.1. Etude de différents organes 31
3.1.1. Forme des feuilles 31
3.1.2. Type de port 33
3.1.3. Fructification 35
3.1.3.1. Les fleurs 35
3.1.3.2. Les graines 35

3.2. Taux de tubérisation 35

4. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES TUBERCULES 37

5. ANALYSE STATISTIQUE 40

5.1. Analyse des 18 tableaux de l'étude morphométrique 40
5.1.1. Analyse de l'inertie des tableaux de données morphométriques 40
5.1.2. Comparaison des tableaux 43
5.1.3. Typologie des tableaux 43

5.2. Analyse en Composantes Principales (ACP) finale 45

5.3. Conclusion 50

6. ANALYSE PAR RAPD 50

6.1. Amplification avec l'amorce 1 50

6.2. Amplification avec l'amorce 2 52
6.2.1. Génération parentale 52
6.2.2. Descendance 54

6.3. Amplification avec l'amorce 3 54

6.4. Amplification avec l'amorce 4 56

6.5. Amplification avec l'amorce 5 56

6.6. Amplification avec l'amorce 6 56
6.7. Conclusion de l'analyse par RAPD 58

CHAPITRE 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 58

BIBLIOGRAPHIE 60

ANNEXES 64

Chapitre 1. INTRODUCTION

La famille des *Leguminosae* ou *Fabacea* comporte 16.000 à 19.000 espèces, regroupées en 750 genres et réparties, en se basant sur les formes florales, en trois sous-familles : les *Mimosoideae*, les *Caesalpinoideae* et les *Papilionoideae* (Taubert, 1894 cité par Allen et Allen, 1981). Les *Papilionoideae*, encore appelées *Faboideae*, constituent la plus grande sous-famille et comprennent quelques 440 genres et 12.000 espèces largement répandues, depuis les forêts tropicales humides jusqu'aux abords des déserts froids ou chauds (Porhill et Raven, 1981).

Au sein de la famille, les légumineuses à graines occupent une position particulière du fait de leurs graines utilisées dans l'alimentation, et parfois de leurs racines tubérisées comestibles. En effet, depuis les débuts de l'agriculture, bien que l'on ait longtemps sous-estimé leur valeur en tant que source de protéines, elles entrent pour une bonne part dans l'alimentation des hommes et des animaux. Ainsi, dans le rapport de la réunion technique FAO/CCTA sur les légumineuses dans l'agriculture et l'alimentation humaine en Afrique (1958), la consommation moyenne calculée était de 40 g par jour et par personne (Stanton *et al.*, 1970). Cependant, la quantité de légumineuses à grains consommée dans l'alimentation humaine ou animale dans le monde, varie avec les pratiques agricoles, le climat, la saison et avec les coutumes tribales. Ces légumineuses à grains appartiennent presque toutes à la sous-famille des *Papilionoideae*. Parmi elles, le genre *Vigna*, appelé également Dolique, Mongette, *Lubia* (le haricot en arabe), Niébé ou *Cowpea* (la première utilisation du mot "*Cowpea*" est attribuée à Thomas Jefferson (Allen et Allen, 1981)), constitue la source de protéines la moins onéreuse. Ainsi au Nigeria méridional, l'exploitation de cette source de protéine revient dix fois moins cher que celle des protéines du lait. Certaines espèces telles que *V. vexillata* (L.) A. Rich., *V. pseudotriloba* Harms et *V. stenophylla* Harms = *V. stenophylla* (Harv.) Burtt Davy, présentent la particularité de produire des racines tubérisées, utilisées dans l'alimentation sous les mêmes formes que la patate douce ou la pomme de terre (Harms, 1911 cité par Allen et Allen, 1981). Les espèces sauvages présentent souvent des caractères intéressants d'un point de vue agronomique comme source de gènes qui pourraient être exploités dans l'amélioration des autres espèces. Il en est ainsi de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., choisie dans notre étude, qui manifeste, entre autres, une certaine résistance aux principaux ravageurs du Niébé grâce à la pilosité des feuilles et des tiges (Barone *et al.*, 1992).

La capacité de cette légumineuse à produire des graines et des tubercules pourrait lui permettre également de jouer un rôle positif dans la résolution des problèmes d'accession à l'autosuffisance alimentaire et d'élimination des déficiences protéiques dans la ration quotidienne des populations rurales (Marta Evans *et al.*, 1977).

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet du département de Biologie Végétale (UCAD) réalisé en collaboration avec l'ISRA-Bambey. Il s'intéresse à l'étude fondamentale de *Vigna unguiculata* et à l'amélioration de sa culture en profitant de ses relations génétiques avec les variétés locales et les espèces sauvages. Dans le document présenté ici, nous avons dans une première partie rassemblé la documentation concernant *Vigna vexillata* une espèce sauvage du genre *Vigna*. Dans une deuxième partie, nous essayerons de définir les critères de reconnaissance de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., à travers la comparaison de cinq provenances (TVNu 1503, TVNu 1498, TVNu 1502, TVNu 1506, TVNu 1492). Cette étude est basée sur trois axes.

1. l'étude morphologique des cinq provenances de l'espèce, par comparaison de l'évolution de certains paramètres relatifs à différents organes (feuilles, hypocotyle, épicotyle, ramifications, gousses et graines). A la fin de cette étude, une analyse statistique (Analyse en Composantes Principales) sur l'ensemble des paramètres, permettra d'en choisir les plus intéressants pour une étude discriminante des provenances étudiées.
2. L'analyse de la composition biochimique des tubercules récoltés, portant sur le dosage des protéines, des lipides, des sels minéraux et de la cellulose brute. Les résultats sont également inclus dans l'analyse statistique discriminante.
3. La contribution à l'étude de la diversité génétique de *Vigna vexillata* à l'aide de marqueurs génétiques, l'observation morphologique s'avérant parfois insuffisante pour l'étude de la structuration des populations, du fait de l'influence des facteurs de l'environnement. Parmi les techniques récemment développées, la «*Random Amplified Polymorphic DNA*» (RAPD) ou Amplification aléatoire des fragments d'ADN, basée sur la technique « *Polymerase Chain Reaction* » (PCR) ou Reaction de polymérisation en chaîne, permet l'amplification de l'ADN génomique par hybridation au hasard, dans un sens ou dans l'autre, d'une amorce de courte chaîne, généralement de 10 nucléotides. La longueur du fragment ainsi amplifié dépendra de la position des sites d'hybridation. Les produits d'amplification sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose.

   La présence ou l'absence d'un fragment d'ADN amplifié (bande) révèle les différences dans la distribution des sites d'hybridation amorce/ADN génomique et donc dans les séquences nucléotidiques de l'ensemble du génome de l'individu. La comparaison des profils permet d'estimer les divergences de séquence et d'établir des relations intergéniques entre les individus.

Les différents résultats ainsi obtenus seront discutés et confrontés aux stratégies actuelles de développement agricole, de manière à juger de l'importance que pourrait prendre *Vigna vexillata* dans les futurs programmes d'amélioration variétale.

Chapitre 2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE GENRE *VIGNA*

Le genre doit son nom *Vigna* à Dominico, dans la première moitié du XVII^{ème} siècle. Il regroupe 100 à 150 espèces dont *Vigna catjang* Walp., *Vigna sesquipedalis* (L.) Fruhw et *Vigna sinensis* sont les trois formes cultivées dominantes dans l'histoire de l'agriculture du Niébé. Elles diffèrent par la forme des feuilles, la taille des gousses et les caractéristiques des graines. *Vigna sesquipedalis* et *V. sinensis* seraient considérées actuellement comme des synonymes de *V. unguiculata.* En fait, cette espèce est la plus exploitée car la plus intéressante économiquement. En effet, elle entre dans la composition de nombreux mets africains où ses feuilles sont utilisées comme "légume" et représente un excellent foin pour le bétail (Guèye, 1982). De fait, généralement, le qualificatif de "Niébé" désigne uniquement l'espèce *V. unguiculata* (Allen et Allen, 1981).

1.1. Description morphologique générale des représentants du genre *Vigna*

La morphologie des plants est très variable, allant des formes érigées graciles aux vigoureuses formes prostrées s'étendant sur quatre mètres. La forme des gousses et la dimension des graines varient aussi considérablement. Aussi, ce genre est divisé en plusieurs espèces comprenant elles-mêmes des variétés (Stanton *et al.*, 1970).

Décrits depuis 1865 par Bentham et Hooker (Allen et Allen, 1981), les plants peuvent être herbacés, annuels ou pérennes, se caractérisant par :

- un port volubile ou rampant rarement droit;
- des feuilles composées (trifoliées), à disposition alterne;
- des fleurs à :
  - couleur jaune, blanche, rose, violette, ou tachetée,
  - bractées et bractéoles petites, caduques ou persistantes,
  - calice parfois scabre,
  - anthères uniformes, à étamines diadelphes,
  - ovaire sessile à style linéaire et stigmate oblique, subterminal rarement terminal,
  - gousses linéaires, cylindriques, droites ou incurvées, à deux valves.

1.2. Ecologie

Le cycle d'évolution de *Vigna* est largement tributaire des différentes conditions écologiques telles que l'éclairement ou la présence d'insectes. En effet, les types de jour

court présentent généralement un port étalé (Stanton *et al.*, 1970) et la présence d'insectes prolonge la période de floraison (Booker, 1965 cité par Stanton *et al.*, 1970). Les *Vigna* sont très exposés à l'attaque de divers ennemis et maladies, y compris les maladies virales, l'incidence de ces dernières étant étroitement liée à l'infestation par les insectes.

Les plants du genre *Vigna* peuvent être cultivés sur des sols peu fertiles de types très divers, depuis les sols sablonneux jusqu'aux sols argileux les plus lourds (Stanton *et al.*, 1970).

1.3. Ethnobotanique

La taxonomie du genre *Vigna* est très controversée et sujette à de nombreux remaniements. En effet, les ressemblances morphologiques entre les genres *Vigna* et *Phaseolus* ainsi que leurs capacités à se croiser et à produire des hybrides fertiles ont longtemps suscité des confusions (Gillett, 1956; Verdcourt, 1970 cités par Allen et Allen, 1981). Certaines espèces du genre *Vigna* sont parfois incluses dans le genre *Dolichos* (Verdcourt, 1968 cité par Allen et Allen, 1981); par contre, le genre a pris de l'importance après l'insertion de certaines espèces asiatiques du genre *Phaseolus,* telles que *P. aconitifolius* Jacq., *P. angularis* Willd., *P. aureus* Roxb., *P. calcaratus* Roxb. et *P. mungo* L. (Ohwi et Ohashi ,1969; Verdcourt, 1969 cités par Allen et Allen, 1981).

L'origine et la dispersion du genre *Vigna* demeurent ambiguës. Néanmoins, il est généralement admis que *V. unguiculata* est originaire de l'Afrique tropicale. *Vigna* a été longtemps cultivé en Afrique avant son introduction accidentelle aux Etats Unis au XVIIIème siècle, par des pêcheurs européens ou au cours d'expéditions (Carrier, 1923 cité par Allen et Allen, 1981). En effet, Wight (1907) rapporte que c'est en 1775 que le "*Natural History of East and West Florida*" publie pour la première fois l'existence de *Cowpea* aux Etats Unis (Allen et Allen, 1981). Son développement a donné lieu à une diversification secondaire qui rend sa classification très complexe. Ainsi, de nouvelles formes sont apparues dans la classification américaine: *Crowders* (cultivars précoces), *Blackeyes* (cultivars précoces érigés, ou rampants à maturation moyenne, qui ont tous des graines montrant un cercle noir caractéristique autour du hile) et des variétés plus tardives comme les *Vigna* fourragères et le cultivar *Clay* (Allen et Allen, 1981). Toutefois, ces classifications ne conviennent pas à la diversité des formes que l'on peut trouver en Afrique, où l'on rencontre des types encore plus variés que dans le Nouveau Monde, notamment des formes à très grosses graines ou des formes sauvages, encore mal connues, contenant des gènes aptes à conférer à la graine et à la plante des caractéristiques ne se trouvant nulle part

ailleurs (Stanton *et al.*, 1970). Au Sénégal, le Niébé est surtout connu par l'espèce *V. unguiculata*, elle est cultivée dans toutes les régions du Sénégal, le centre Nord en étant la principale zone productrice. Elle apparaît comme la légumineuse de choix qui pourrait contribuer à rétablir l'équilibre alimentaire, par la richesse de ses graines en acides aminés (lysine, histidine), en vitamines (thiamine, niacine, riboflavine) et en éléments minéraux (fer, calcium, phosphore, magnésium, etc.) (Guikoune, 1992).

2. *VIGNA VEXILLATA* (L.) A. RICH.

2.1. Description botanique

V. vexillata présente une grande variabilité morphologique. La présence d'un revêtement sur les feuilles et les tiges, qui lui permet de se protéger contre les insectes, est une des caractéristiques morphologiques qui distingue l'espèce du *V. unguiculata* (L.) Walp (Anonymous, 1979). A notre connaissance, à part Berhaut (1976), aucun auteur ne s'est intéressé à la description morphologique générale de *V. vexillata*, sinon à quelques parties anatomiques. Ainsi, c'est à partir des critères mentionnés ci-dessous que l'on a pu avoir une idée sur l'aspect général de la plante.

- Feuilles composées (trifoliolées) à disposition alterne, base arrondie, un peu dissymétrique dans les folioles latérales, sommet en coin acuminé. La base des folioles est trinervée et possède en plus 3 à 4 autres nervures latérales dont le sommet est recourbé sur la nervure précédente; entre ces nervures, on note un réseau de nervilles parallèles, distantes entre elles de 1 à 1,5 mm. Le pétiole est long de 3 à 8 mm, les pétiolules latéraux ainsi que le terminal sont longs, épaissis au sommet. Le pétiole, le pétiolule terminal et la tige sont scabres, parcourus par un sillon central. Les stipelles sont linéaires filiformes longues de 2 à 3 mm, les stipules sont lancéolées, striées et longues de 5 à 8 mm.
- Fleurs regroupées en épi de 3 à 5, disposées au sommet d'un pédoncule scabre et présentant les caractères suivants :
  - corolle d'un rose violacé clair ou d'un bleu violacé, large de 3 cm;
  - calice de 12 à 15 mm à longues dents triangulaires.
- Gousse légèrement concave, longue de 7 à 9 cm, avec un léger filet sur les sutures.
- Graines tachetées de petites tailles, de couleur sombre.

2.2. Répartition géographique

Vigna vexillata présente une vaste distribution géographique (Verdcourt 1970; Vanderborght, 1989). Elle est commune en Afrique (centre du Soudan, Zaïre, Sierra Leone, Liberia, Côte d'Ivoire, Togo, Nigéria, Cameroun, Angola, Kenya, Tanzanie, Malawi, Zambie) et en Amérique tropicale (Colombie, Venezuela) (Allen et Allen, 1981). En Australie, la plante est connue sous le nom de "*wild cowpea*" par similarité des fleurs avec celles de *Cowpea* ou Niébé (James et Lawn, 1991). En Asie, elle est très répandue sur l'Himalaya entre 1200 et 1500 m d'altitude et sur les collines de l'Est et du Nord de l'Inde (Anonymous, 1979). Il faut noter que la présence de la plante a été également signalée au Sénégal dans la région de Saint-Louis, sur les rives du fleuve Sénégal lors des missions de J. G. Adam (1963).

La distribution de certaines variétés de *Vigna vexillata* a pu être déterminée par Maréchal *et al.* (1978), cité par Vanderborght (1989).

Variété de *V. vexillata*	Distribution
var. *Vexillata*	pantropicale
var. *Macrosperma Maréchal*, Mascherpa et Stainier	non précisée
var. *Angustifolia* (K. Schum. et Thonn.) Bak.	pantropicale
var. *Dolichomena* (Harms) Verdc	Afrique
var. *Yunnanensis* Franchet	SE Asie
var. *Pluriflora Franchet*	SE Asie

2.3. Utilité

Vigna vexillata (L.) A. Rich. est une plante annuelle à la levée vigoureuse, qui pousse bien en saison des pluies et étouffe les mauvaises herbes. Elle est également utilisée comme engrais vert et pour limiter l'érosion grâce à ses racines tubérisées. De plus, Milford (1967) rapporte qu'en Australie le fourrage de *Vigna vexillata* est très apprécié pour son excellente valeur nutritive (James et Lawn, 1991).

Les racines tubérisées de *Vigna vexillata* sont utilisées en Afrique et en Inde pour la consommation humaine (Irvine (1952); Chandel *et al.* (1972) cités par James et Lawn, 1991). En Australie, les tubercules comptent parmi les aliments traditionnels des Aborigènes. Les tubercules sont riches en protéines. Ils en contiennent 15 %, alors que ceux du manioc n'en comptent que 3%, ceux de la patate douce ou de la pomme de terre

5%. Malgré sa richesse en protéines, les essais de culture de cette plante sont très rares (Anonymous, 1979 cité par Vanderborght, 1989).

Les graines et les tubercules sont consommés bouillis comme "légume". Selon Siddhuraju *et al.*(1994), les graines contiennent des éléments minéraux (P, Cu et K), des protéines (surtout les globulines et les albumines) et des lipides (surtout l'acide linoléïque et l'acide palmitique) en quantité importante. De plus, les travaux de Dardenne (1972) ont montré la présence d'un acide aminé essentiel pour l'homme, le L-p-aminophénylalanine dans les graines et les feuilles. Ainsi, il pourrait être intéressant d'améliorer des variétés ou espèces du genre *Vigna* par transfert de gènes responsables de l'expression de certains de ces caractères, bien que ceci puisse être confronté à certaines difficultés liées, par exemple, aux barrières d'hybridation interspécifique. C'est le cas du croisement entre *Vigna vexillata* et *Vigna unguiculata* dont la réussite est liée à l'utilisation de *V. vexillata* comme parent femelle (Barone *et al.*, 1992).

Vigna vexillata apparaît donc comme une plante intéressante à double titre: elle pourrait non seulement constituer une plante alimentaire dans les régions marginales à très faibles potentialités agricoles (dunes côtières, dunes de la région Centre Nord), mais elle pourrait également constituer une source de gènes pour l'amélioration de *V. unguiculata.*

Chapitre 3. MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL VEGETAL

Le matériel étudié est constitué de graines de 5 provenances différentes de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., gracieusement mises à notre disposition par l'IITA (Ibadan, Nigéria). Ces provenances sont répertoriées sous les références suivantes: TVNu 1503, TVNu 1498, TVNu 1502, TVNu 1506, TVNu 1492 .

Les graines de *Vigna unguiculata* (L.) Walp proviennent du germplasm de Niébé de l'ISRA-Bambey.

2. METHODES EXPERIMENTALES

2.1. Méthode de germination

Pour les 5 provenances de *V. vexillata* et pour *V. unguiculata*, 5 graines choisies au hasard sont mises à tremper dans une fiole conique de 100 ml contenant de l'eau distillée. Après 24h, les graines sont semées, à raison d'une graine par semis, dans des pots en terre cuite de capacité 1 Kg contenant du sable prélevé dans les parcelles expérimentales de "Bel Air". Les pots sont placés sous abri et l'arrosage se fait manuellement toutes les 48 heures.

Pour les graines de la provenance TVNu 1498, on a observé une absence de germination après 14 jours de semis. Ces graines ont alors été déterrées et, après scarification mécanique et trempage, remises en terre dans les mêmes pots.

On considère qu'une graine a germé suite à l'apparition de l'hypocotyle ou des cotylédons. Ainsi, le nombre de graines germées est noté chaque jour.

2.2. Etude morphométrique

Le suivi en fonction du temps des caractères morphologiques est fait quotidiennement à partir du 11ème jour après semis (11 J.A.S) et ce jusqu'au 26ème jour (26 J.A.S). Par la suite, il est fait au 30ème, 38ème et 54ème jour après semis.

2.2.1. Etude de différents organes

L'étude des différents caractères se rapportant aux parties anatomiques permettra de décrire la plante et de comparer les 5 provenances étudiées.

Au niveau de l'hypocotyle et de l'épicotyle, la variable observée est la longueur; au niveau des feuilles de rang 2, 3, 4 et 5 retenues dans notre étude, les variables observées sont la longueur et la largeur des folioles.

A partir du 2ème noeud, les feuilles sont composées trifoliolées (deux folioles latérales et une terminale). L'analyse se fait sur la moyenne des mesures des deux folioles latérales (L) et sur les mesures de la foliole médiane (M) ou terminale.

Ainsi, les variables de morphologie utilisées dans cette étude sont :

- longueur moyenne des folioles latérales (**OLx***);
- largeur moyenne des folioles latérales (**ALx**);
- longueur de la foliole médiane (**OMx**);
- largeur de la foliole médiane (**AMx**);
- longueur de l'hypocotyle (**HYP**);
- longueur de l'épicotyle (**EPI**);

En plus de ces caractères de morphologie, la comparaison concerne également le taux de tubérisation et la forme des folioles; celle-ci est déterminée à partir de la valeur du rapport de la largeur sur la longueur des folioles (Merlier et Montégut (1982) cités par Noba, 1990).

Pour les deux premières feuilles, ce rapport représente une moyenne des variables de deux feuilles; par contre, pour les feuilles de rangs 2, 3, 4 et 5, il représente Amx/OMx et ALx/OLx. L'interprétation de ces rapports se fait sur la moyenne des variables des plants qui composent la provenance.

2.2.2. Etude du port de la plante

Pendant les jours de mesures, le nombre de rameaux latéraux de chaque individu des 5 provenances (**RAMI**) sert de critère d'évaluation de l'allure des plants (port).

2.2.3. Etude de la fructification

L'étude de la fructification est réalisée à travers les paramètres suivants:

- morphologie des graines avant le semis: les observations sont réalisées à la loupe binoculaire;
- macromorphologie des fleurs par des observations à l'œil nu;
- nombre de gousses récoltées par pied étudié;
- biométrie des gousses et des graines: à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse, on mesure la longueur, la largeur et l'épaisseur des gousses et des graines.

2.2.3.1.Les fleurs

La macromorphologie des fleurs des différentes provenances de *Vigna vexillata* est appréciée par des observations à l'œil nu.

* x= rang de la feuille

2.2.3.2.Les gousses

Après récolte des premières gousses formées, les variables étudiées sont la longueur (**OGS**), la largeur (**AGS**), le nombre de gousses récoltées par pied (**NGS**) et le nombre de graines par gousse récoltée (**NGR**).

2.2.3.3.Les graines

La morphologie est appréciée par observation de quelques graines choisies au hasard dans le lot reçu de l'IITA et considérées comme étant une génération parentale.

Vu le grand nombre des graines obtenues après décorticage des gousses (descendance), l'étude biométrique est réalisée sur un nombre de graines (n=25) échantillonnées au hasard et se rapporte à la longueur (**OGR**), la largeur (**AGR**) et l'épaisseur (**EGR**) des graines.

2.3. Etude de la tubérisation

Cette étude porte sur le taux de tubérisation de chaque provenance, déterminé comme suit : (Nombre d'individus tubérisés / Nombre totale de graines semées) x 100.

2.4. Analyse biochimique des tubercules

Ces analyses ont été réalisées à l'I.T.A (Institut de Technologie Alimentaire) et effectuées sur des tubercules récoltés.

2.4.1. Préparation du matériel végétal

les tubercules de chaque provenance sont pesés (poids frais des tubercules noté **PFT**), puis broyés dans un mortier avant d'être conservés à -20° C dans une boîte de Pétri.

2.4.2. Evaluation du taux d'humidité

Le taux d'humidité (**HUM**), correspondant à la teneur en eau de l'échantillon, est déterminé par la mesure de la perte de poids subie par les tubercules après dessiccation à l'étuve.

Une partie des broyats de chaque provenance est placée dans une capsule en aluminium. Ces capsules ont été, au préalable, passées à l'étuve pendant 1 heure, puis refroidies dans un dessiccateur et pesées (Pc).

L'ensemble est pesé (P), placé à l'étuve à 105° C pendant 4 h, puis pesé après refroidissement (P').

Les résultats sont exprimés en pourcentage en appliquant la formule suivante :

% Humidité = (P - P') x 100 / (P - Pc)

où:

Pc : poids de la capsule vide,
P' : poids des capsules contenant l'échantillon séché,
P : poids de la capsule + échantillon frais.

Pour plus de précision, la mesure s'effectue sur 2 échantillons pour chaque individu, et le résultat final est exprimé par la moyenne des deux valeurs.

2.4.3. Dosage des protéines

Ce dosage s'appuie sur la technique de dosage de l'azote total de Kjedahl. La teneur en protéines (**PRO**) est obtenue à partir des résultats de la teneur en azote total, en appliquant un facteur de conversion.

La technique Kjedahl nécessite une minéralisation des échantillons par l'acide sulfurique (H_2SO_4) à chaud, en présence d'un catalyseur (sélénium, 1 g; sulfate de potassium, 100 g; sulfate de cuivre, 10 g). Ainsi, l'azote organique contenu dans les échantillons est réduit en sulfate d'ammonium. Par l'action de la soude lors de la distillation, ce dernier est déplacé sous forme d'ammoniac dont la quantité est déterminée par titration.

La minéralisation s'effectue sur les broyats (environ 0,5 g) de chaque provenance placés dans des tubes de minéralisation (tube Kjedahl) en présence de 15 ml d'acide sulfurique concentré et d'une pincée du catalyseur. Les échantillons sont minéralisés pendant une heure à 250° C dans un bloc de minéralisation (de type Büchi, série 425) installé sous une hotte aspirante.

La distillation est réalisée dans un appareil type Büchi série 315, pendant 3 min. Elle permet de déplacer le sulfate d'ammonium par l'action de la lessive de soude (NaOH).
Le distillat est recueilli dans une fiole conique contenant une solution **A** ayant:

- un volume (V_1) H_2SO_4 de normalité N_1
- quelques gouttes de l'indicateur de Tachiro qui est un mélange à volume égal de deux solutions R et B, avec:
  + Solution R :0,1g de Rouge de méthyle + 100 ml d'éthanol 95°;
  + Solution B :4 ml d'une solution aqueuse de Bleu de méthyle à 1 % + 96 ml d'éthanol 95°.

Le système de titration est constitué d'une burette contenant du NaOH de normalité N_2 égale à N_1 et d'une fiole conique contenant le mélange du distillat et de la solution **A**. Selon le volume de NaOH versé dans la fiole d'Erlenmeyer, la couleur du mélange change

jusqu'à atteindre la zone de neutralité, visualisée par un virage de la couleur du rose pâle au vert clair.

Les résultats sont exprimés en pourcentage, la formule appliquée est la suivante:

% Protéine = ((V1 x N1) - (V2 x N2) / 1000) x PM d'azote x facteur conversion x % PE

où :

V_1 : volume (en ml) de H_2SO_4 (0,1N) dans la solution **A** (V_1 = 20 ml)
N_1 : normalité de H_2SO_4 dans la solution **A** (N_1 = 0,1)
V_2 : volume (en ml) de NaOH versé pour neutraliser (V_1+ distillat)
N_2 : normalité de NaOH utilisé pour la neutralisation (N_2 = 0,1)
PM d'azote = 14 g / mole
Facteur de conversion = 6,25
% PE : pourcentage de la prise d'essai.

Le facteur de conversion 6,25 ne donne une évaluation exacte du taux de protéines que si les proportions des acides aminés libres et des petits peptides se révèlent faibles, ce qui est le cas pour *Vigna vexillata* (Marta Evans *et al.*, 1977).

2.4.4. Dosage des lipides

Les lipides sont extraits à chaud par la méthode Soxhlet, dans un appareil de type Soxtec System HT2 1045 Extraction Unit.

Les cartouches contenant les échantillons sont plongées dans des capsules en aluminium. Ces dernières sont posées sur des plaques chauffées par l'intermédiaire du Soxtec System HT2 1046 Service Unit (contenant de l'huile de silicone chauffée à 125° C). Les Soxtec 1045 et 1046 sont reliés par de gros tuyaux où circule l'huile de silicone chaude.

Lorsque l'hexane contenu dans la capsule bout, les vapeurs montent vers le condenseur (intégré dans l'extracteur), traversent la cartouche, se chargent de matières grasses de l'échantillon, se condensent et retombent sous forme de gouttelettes recueillies dans une capsule préalablement tarée (P_1).. C'est une extraction à reflux durant 30 min, au bout desquelles toutes les matières grasses de l'échantillon sont extraites.

Ensuite, les capsules contenant les matières grasses sont mises à sécher à l'étuve pendant 30 min à 105° C pour éliminer toute trace d'hexane et pesées (P_2) après refroidissement au dessiccateur.

Le résultat du dosage (**LIP**) est exprimé en pourcentage, calculé par la formule suivante. L'interprétation des résultats portera sur la moyenne des échantillons d'une même provenance.

% Lipide = (P_2 - P_1) x 100 / P_0

où:

P_2 : poids du pot après extraction.
P_1 : poids du pot avant extraction.
P_0 : poids frais de l'échantillon.

2.4.5. Détermination des éléments minéraux

Des prises d'essai (5 g) sont placées dans des creusets en porcelaine tarés après séchage à l'étuve (105° C) puis au four pendant 5 à 10 min. Les creusets sont maintenus sur la flamme du bec Bunsen jusqu'à carbonisation de l'échantillon (disparition des fumées). Les creusets sont ensuite placés au four (400° C) pendant 4 h, jusqu'à l'obtention de cendres qui sont alors pesées, après refroidissement au dessiccateur.

La pesée s'effectue en double pour chaque échantillon. Ainsi les calculs sont réalisés à partir de la moyenne des deux valeurs. Le résultat (CEN) est exprimé en pourcentage, en appliquant la formule ci-après :

% des éléments minéraux = $(Pc_2 - Pc_1) \times 100 / PE$

où :

PE : Prise d'essai ou poids frais de l'échantillon.
Pc_1 : Poids du creuset avant carbonisation.
Pc_2 : Poids du creuset après carbonisation.

2.4.6. Dosage de la cellulose brute

Ce dosage, réalisé en plusieurs étapes, permet d'évaluer la quantité de matières insolubles après hydrolyse de la matière alimentaire par un acide fort (H_2SO_4 en général), puis par une base forte (NaOH en général) dans des conditions très précises.

Une prise d'essai (PE = 1g) est mise dans un ballon de 500 ml à fond rond et à col rodé, contenant 50 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4 à 0,3N) plus une goutte d'agent anti-moussant. L'ensemble est chauffé à reflux avec un réfrigérant, à douce ébullition pendant 30 min, en agitant doucement toutes les 5 min de façon à ce que l'échantillon n'adhère pas aux parois du ballon.

Après l'hydrolyse acide, 25 ml de soude (NaOH 1,5N) sont ajoutés au mélange réactionnel que l'on chauffe encore pendant 25 min. Ensuite, une pincée d'éthylène diamine tétra-acétate (EDTA) est dissoute dans le mélange en prolongeant le chauffage pendant 5 min.

Le produit est filtré sous vide sur creuset de Gooch de porosité 2 préalablement taré (Pc). La filtration est prolongée en lavant le produit, successivement avec 25 ml d'H_2SO_4 à 0,3 N, de l'eau distillée (3 fois 50 ml), 25 ml d'éthanol et 25 ml d'acétone. L'éthanol et l'acétone servent à l'élimination de l'eau.

Les creusets contenant le produit sont passés au four thermostaté à 130° C pendant 2h, refroidis au dessiccateur et pesés (Pi_1). Après calcination (ou incinération) des échantillons au four (400° C) pendant 2h, les creusets sont de nouveau refroidis au dessiccateur puis pesés (Pi_2).

Le résultat est exprimé en %, la formule de calcul est la suivante :

% de cellulose brute = ((Pi_1 - Pc) - (Pi_2 - Pc)) x 100 / PE

où :

Pc : Poids du creuset vide (en g)
PE : Prise d'essai (en g)
Pi_1 : Poids du creuset avant incinération (en g)
Pi_2 : Poids du creuset après incinération (en g)

2.5. Méthode d'analyse statistique

2.5.1. Structuration des données recueillies

L'analyse statistique regroupe d'une part l'ensemble des données biométriques des différents organes cités au paragraphe 2-2 du chapitre III et d'autre part les données de récolte (gousses, graines et tubercules).

L'Analyse en Composantes Principales simple des données brutes est impossible à réaliser avec les 342 variables (19 variables pour chaque jour de mesure) obtenues aux 18 dates d'observations (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 30, 38, 54 J.A.S), en plus des données de récolte sur les 25 plants. Avec un tel nombre de variables, il aurait fallu avoir au minimum 1000 individus-plants pour que l'Analyse en Composantes Principales (ACP) soit possible en terme d'inversion de matrice.

Cela étant, nos données seront structurées en 18 tableaux de morphologie correspondant aux 18 dates d'observations, auxquels nous ajouterons, après choix des tableaux les plus structurants, le tableau de récolte.

Les 18 tableaux seront constitués de manière homogène, comportant les 19 variables morphologiques mesurés à une date donnée et 25 plants.

Les 19 variables de morphologie sont :

- longueur des folioles médianes (**OMx**) et latérales (**OLx**) des feuilles de rangs 2, 3, 4 et 5, soit 8 variables,
- largeur des folioles médianes (**AMx**) et latérales (**ALx**) des feuilles de rang 2, 3, 4 et 5, soit 8 variables,
- longueur de l'hypocotyle (**HYP**),
- longueur de l'épicotyle (**EPI**),
- nombre de ramifications par plant (**RAMI**).

Le tableau de données de récolte comporte:

- nombre de gousses récoltées (**NGS**),
- longueur des gousses (**OGS**),
- largeur des gousses (**AGS**),
- nombre de graines par gousse (**NGR**),
- longueur (**OGR**), largeur (**AGR**) et épaisseur (**EGR**) des graines de récolte,
- poids frais des tubercules (**PFT**),
- composition biochimique des tubercules concernant l'humidité (**HUM**), les protéines (**PRO**), les lipides (**LIP**) et les cendres (**CEN**). Les résultats sur la cellulose ne sont pas inclus dans l'analyse, certains échantillons n'ayant pas été dosés du fait de leur faible masse.

2.5.2. Méthodologie d'analyse

Le but de l'analyse adoptée est de choisir parmi tous les paramètres étudiés, ceux qui contribueraient le mieux à l'étude discriminante de la population. La méthode retenue est l'analyse factorielle de K- tableaux (Torre et Chessel, 1994; Chessel et Hanafi, 1996), le tableau de données étant l'ensemble des mesures réalisées à une date donnée. Cette analyse se fera en plusieurs étapes à l'aide du logiciel ADE (Thioulouse et Lobry, 1995):

1. Comprendre la structure de chaque tableau afin de pouvoir en choisir les plus pertinents pour la typologie de la population. Ceci est réalisé par une analyse séparée en composantes principales (ACP), le résultat est une typologie des variables de chacun des tableaux (sans lien entre chacune des analyses). Cette première étape ne permet pas de comparer les tableaux entre eux mais permet de comprendre la structure de chaque tableau.

2. Procéder à la comparaison des tableaux de données par l'analyse de co-inertie multiple qui donne une typologie de ces tableaux par rapport à une structure de référence qui en est issue par synthèse. Dans ces conditions, les critères de qualité tels que le carré de la covariance vectorielle ($covv^2$) et la corrélation vectorielle (RV) permettront de choisir les tableaux les plus pertinents c'est à dire fournissant le plus d'informations à une analyse factorielle (Sabatier, 1993; Thioulouse et Chessel, 1993).

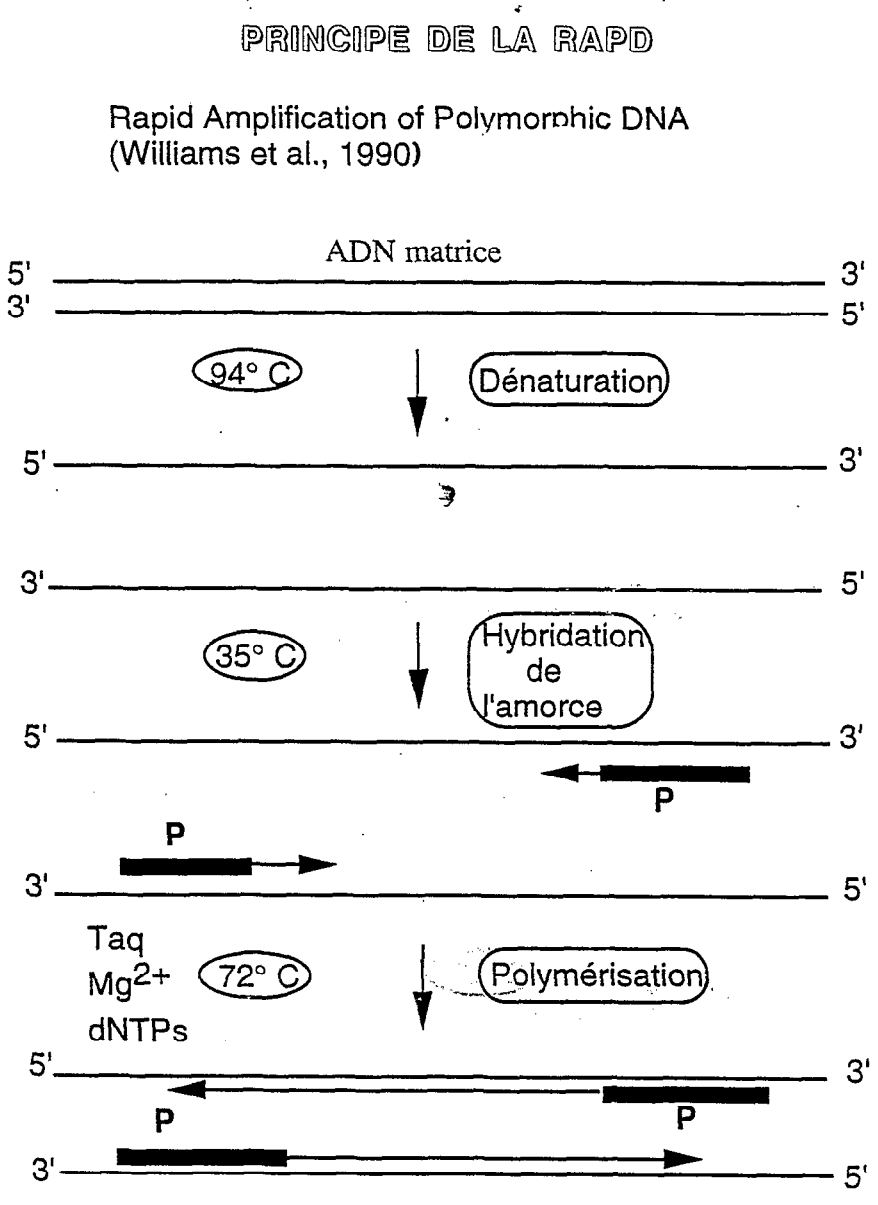


Figure 1. Réaction RAPD: dénaturation / hybridation / polymérisation, permettant l'accumulation d'un nombre élevé de copies des fragments de l'ADN génomique ayant hybridé avec l'amorce.

3. A partir des tableaux sélectionnés, une analyse simple en composantes principales permettra la sélection des variables devant entrer dans l'analyse factorielle discriminante. C'est donc cette dernière analyse qui éprouvera, par **Anova** univariée, les différents paramètres retenus et qui donnera la structure de groupe recherchée. Cette dernière sera validée par le test de permutation.

2.6. Analyse de la diversité génétique réalisée par RAPD

2.6.1. Aperçu sur les méthodes d'analyse de la diversité génétique

Les énormes progrès de la biologie moléculaire pendant ces dernières années ont conduit au développement de plusieurs méthodes d'analyse de la diversité génétique, parmi lesquelles, la technique d'amplification aléatoire des fragments polymorphes d'ADN ou RAPD (figure 1).

Dans le cadre de ce travail sur *V. vexillata*, notre choix s'est porté sur cette technique pour plusieurs raisons. Elle présente l'avantage d'être rapide et simple à réaliser, elle peut s'effectuer valablement avec de très faibles quantités d'ADN matrice (Qing-Ming Yi *et al* ., 1995). Elle nécessite cependant l'obtention d'un ADN très pur, présentant peu ou pas de contamination par les autres constituants cellulaires (ARN, protéines, lipides, etc) ce qui suppose la mise au point d'un bon protocole d'extraction et de purification de l'ADN à amplifier.

2.6.2. Protocole d'obtention d'ADN

L'objectif de cette partie de notre travail était de mettre au point une technique d'extraction d'ADN rapide, la moins onéreuse possible, demandant peu de matériel végétal et du matériel peu sophistiqué. Ces conditions nous ont conduits à sélectionner dans la bibliographie deux méthodes d'extraction simples : celle de Guidet (1994) et la technique *Supaquick* (non publiée) que l'on a testées sur notre matériel végétal. La validité de chaque technique est estimée à la fois par la quantité et par la pureté de l'ADN obtenu. Ces deux paramètres sont estimés par la mesure de la densité optique de l'extrait d'ADN à différentes longueurs d'onde et sont ensuite vérifiés par la plus ou moins grande capacité de l'extrait à être amplifié.

2.6.2.1.Evaluation de l'ADN extrait

La quantité et la pureté de l'ADN extrait sont évaluées pour chaque extraction par une mesure de la densité optique, à différentes longueurs d'onde, d'une solution diluée 50 fois.

- La concentration de l'ADN est déterminée par la valeur de la densité optique à 260 nm selon la formule suivante :

[ADN] (µg/ml) = DO_{260} x facteur de dilution x 50

- La qualité de l'ADN est estimée par les rapports des densités optiques à 230, 260 et 280 nm. Ainsi :

- lorsque le rapport DO_{260}/DO_{280} est égal ou supérieur à 1,6 et inférieur à 2 et que le rapport DO_{260}/DO_{230} est égal ou supérieur à 2,1, on considère que l'ADN est peu contaminé;
- lorsque le rapport DO_{260}/DO_{280} est inférieur à 1,6, l'extrait d'ADN est contaminé par des protéines;
- lorsque le rapport DO_{260}/DO_{230} est inférieur à 2,1, l'extrait d'ADN est contaminé par du phénol, du chloroforme, ou des sels.

2.6.2.2.Comparaison des deux techniques d'extraction

L'obtention d'ADN comporte deux étapes essentielles:

- Une étape d'extraction de l'ADN du matériel végétal réalisée par broyage dans un tampon d'extraction puis centrifugation, permettant d'obtenir l'ADN dans le surnageant,
- Une étape de purification de l'ADN extrait réalisée par solubilisations successives de l'ADN dans différents solvants, permettant de la séparer des autres composés extraits dans la tampon d'extraction (protéines, glycoprotéines, lipides, etc).

Afin de déterminer la meilleure technique d'extraction de l'ADN, un échantillon de feuilles de *V. vexillata* a été divisée en 4 lots de masse identique; 2 lots ont été extraits selon la technique Guidet, les 2 autres selon la technique *Supaquick*.

Tableau 1. Comparaison des techniques d'extraction d'ADN sur des feuilles de *Vigna vexillata*. La quantité d'ADN est évaluée par mesure de la D.O. à 260 nm sur deux échantillons.

Technique d'extraction	Quantité d'ADN (µg/ml)		Pourcentage d'ADN extrait (%)
	Surnageant	Culot	
Guidet	60	100	37,5
	67,5	110	38,5
Supaquick	247	100	71,2
	283	53	84,2

La mesure de la teneur en ADN des surnageants et des culots après extraction (Tableau 1) montre que plus de 60 % de l'ADN extrait par la méthode Guidet n'a pas été solubilisé et est resté dans les culots. Par contre, la technique d'extraction *Supaquick* permet d'obtenir plus de 70 % de l'ADN dans le surnageant. Aussi, nous avons choisi de conserver la technique *Supaquick* pour la méthode d'extraction d'ADN.

Les mesures de densité optique à trois longueurs d'onde différentes montrent que les échantillons sont fortement contaminés quelle que soit la technique choisie (sous-paragraphe 2.6.2.1.). En particulier, les extraits obtenus par la technique Guidet présentent une couleur brune, attribuée à la présence de glycoprotéines dégradées, qui interfère dans les mesures en spectrophotométrie. De même, l'étape de purification d'ADN proposée par la technique *Supaquick* ne semble pas convenir à notre matériel. Une extraction au phénol, puis phénol-chloroforme et phénol-chloroforme-alcool isoamylique a donc été testée, en comparaison avec la purification au chloroforme-alcool isoamylique proposée par cette technique. (tableau 2).

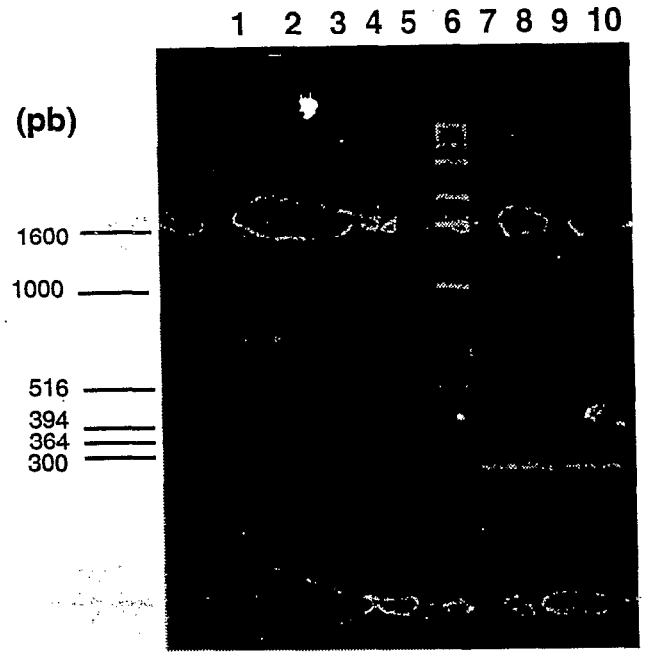


Figure 2. Profils électrophorétiques par RAPD avec l'amorce A_1 (lignes de 1 à 4) et l'amorce A_2 (lignes de 7 à 10) de l'ADN extrait de *Vigna vexillata* par la méthode *Supaquick*. Purification au phénol, phénol - chloroforme - alcool isoamylique (lignes 1, 2, 7, 8) et au chloroforme - alcool isoamylique (lignes 3, 4, 9, 10). A_1 et A_2, deux amorces utilisées en routine pour l'analyse par RAPD de la diversité génétique chez le genre *Acacia*.

Tableau 2. Comparaison des quantités d'ADN obtenues et de leur degré de pureté (2 échantilons par technique) en fonction des techniques de purification adoptées dans la technique *Supaquick*

Technique de purification	DO260	Quantité d'ADN (µg/ml)	DO260/DO280	DO260/DO230
A	0,054 0,075	135 187	1,85 1,72	2,0 1,90
B	0,186 0,330	467 827	1,14 0,98	0,48 0,72

A: phénol, phénol-chloroforme et phénol-chloroforme-alcool isoamylique.
B: chloroforme-alcool isoamylique.

Les résultats du tableau 2 montrent que la nouvelle technique proposée ne permet pas d'extraire une forte quantité d'ADN, mais le culot d'ADN obtenu est peu contaminé (Tableau 2). L'amplification des extraits purifiés par ces 2 différentes techniques montre également un résultat meilleur lorsque la purification est réalisée en présence de phénol (Figure 2). En effet, en présence de l'amorce A_1, l'un des 2 échantillons extraits et amplifié par la technique *Supaquick* "classique" ne montre pas de bandes. Par contre, lorsque la purification est réalisée avec la technique modifiée, l'amplification en présence de l'amorce A_2 permet d'obtenir un plus grand nombre de bandes à plus forte densité.

2.6.2.3.Protocole proposé

Le protocole décrit dans la figure 3 a donc été mis au point à partir des techniques de Guidet (1994) et *Supaquick* (non publié).

Des feuilles de jeunes plantes (60 à 80 mg) conservées à -80° C sont broyées dans un mortier maintenu dans la glace et préalablement placé à -80° C, en présence de 500 µl de tampon d'extraction autoclavé (20 min à 110° C), de 50 µl d'une solution de SDS à 5% et de sable de Fontainebleau stérile. Le tampon d'extraction est un tampon Tris-HCl 200 mM (pH 8) contenant du EDTA (25 mM) et du NaCl (250 mM).

Les broyats sont récupérés dans des tubes Eppendorf stériles maintenus dans la glace. L'ensemble est mis à incuber au bain-marie à 60° C durant 1 h , puis centrifugé 5 min à 4.000 x g. Sur le surnageant, récupéré et placé dans un tube Eppendorf, on ajoute 500 µl de phénol. Après agitation, le mélange est centrifugé dans une microcentrifugeuse pendant 1 min. Sur la phase supérieure, placée dans un nouveau tube, on ajoute 250 µl de phénol et 250 µl de chloroforme. Après agitation et centrifugation (mêmes conditions que précédemment), la phase supérieure est récupérée dans un nouveau tube dans lequel on

place 250 µl de phénol et 250 µl de mélange chloroforme/ alcool isoamilique (24/1) (v/v). Après agitation et centrifugation (mêmes conditions que précédemment), la phase supérieure est récupérée dans un nouveau tube dans lequel on ajoute de l'éthanol 95 % froid (2x le volume) et une solution d'acétate de sodium 3 M, pH 4,8 (1/10 du volume). Après agitation et centrifugation (2 min à 10 000 x g), l'éthanol est éliminé. L'ADN précipité est rincé par 500 µl d'éthanol 70 %. L'ensemble est centrifugé 2 min à 10 000 x g, puis l'éthanol est retiré et l'ADN mis à sécher sous vide (Speed Vac) pendant 15 min. Le culot d'ADN est alors repris dans 100 µl de tampon TE (tampon Tris-HCl 10 mM (pH 8) additionné d'EDTA 1 mM) et conservé à -20° C.

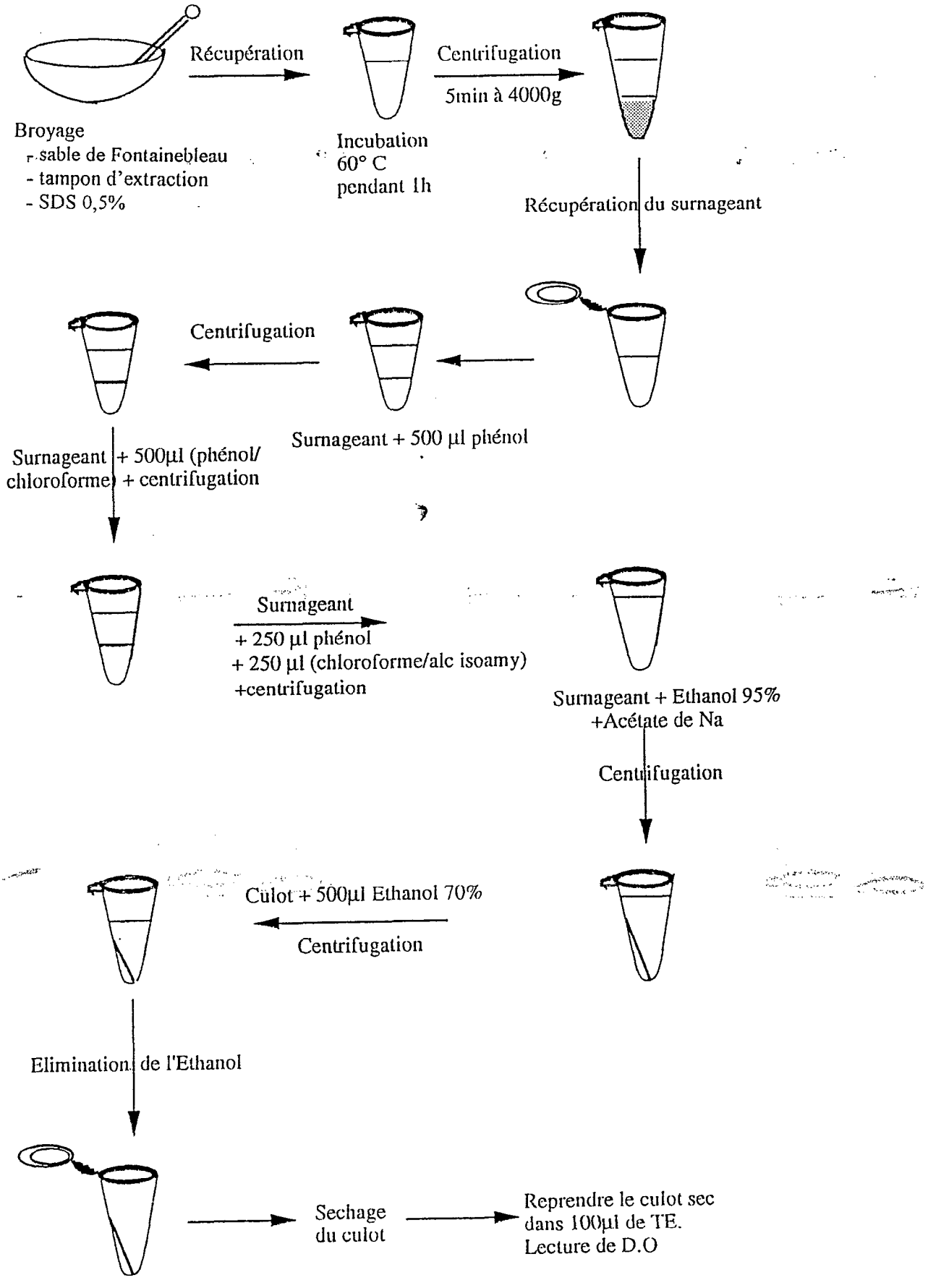


Figure 3: Différentes étapes d'extraction d'ADN.

2.6.3. Amplification de l'ADN par RAPD

La méthode RAPD (Figure 4) se base sur la technique PCR (amplification *in vitro* de segments spécifiques d'ADN au sein d'un mélange), en utilisant une amorce courte (10 oligonucléotides) à séquence arbitraire.

Pour nos essais, nous avons utilisé 6 amorces:

- Amorce 1: 5'GGT-GGG-TGC-T3'
- Amorce 2 : 5'CGA-GGC-GCA-A3'
- Amorce 3 : 5'AGC-CAG-CGA-A3'
- Amorce 4 : 5'GTC-AAT-CCG-A3'
- Amorce 5 : 5'GGC-TCG-TAC-C3'
- Amorce 6 : 5'CGG-AGA-GTA-C3'

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur et comporte trois phases :

- **Phase 1 :** Dénaturation de l'ADN (94° C, 4 min)

- **Phase 2 :** Dénaturation de l'ADN par la chaleur (94° C, 1 min)

Hybridation de l'amorce (35° C pendant 1 min)

Polymérisation de l'ADN par la Taq polymérase, en présence de dNTPs (72° C, 2 min).

Cette seconde phase se répète 43 fois avec à chaque reprise les 3 étapes décrites précédemment.

- **Phase 3 :** Elongation finale des brins d'ADN, par la Taq polymérase (72° C, 6 min).

La composition du mélange réactionnel pour 10 tubes est la suivante:

-27 µl tampon spécifique à la Taq polymérase,
-110 µl de solution de dNTPs à 150 µM final pour chaque dNTP,
-17 µl $MgCl_2$ (25 mM)
-66 µl de préparation d'amorce à 0,4 µM final
-1 µl Taq polymérase à 0,04 U/µl

Chaque tube d'amplification contient 20 µl du mélange réactionnel et 5 µl de la préparation d'ADN à 0,2 ng/µl. Les réactifs sont mélangés puis disposés dans le thermocycleur préalablement programmé.

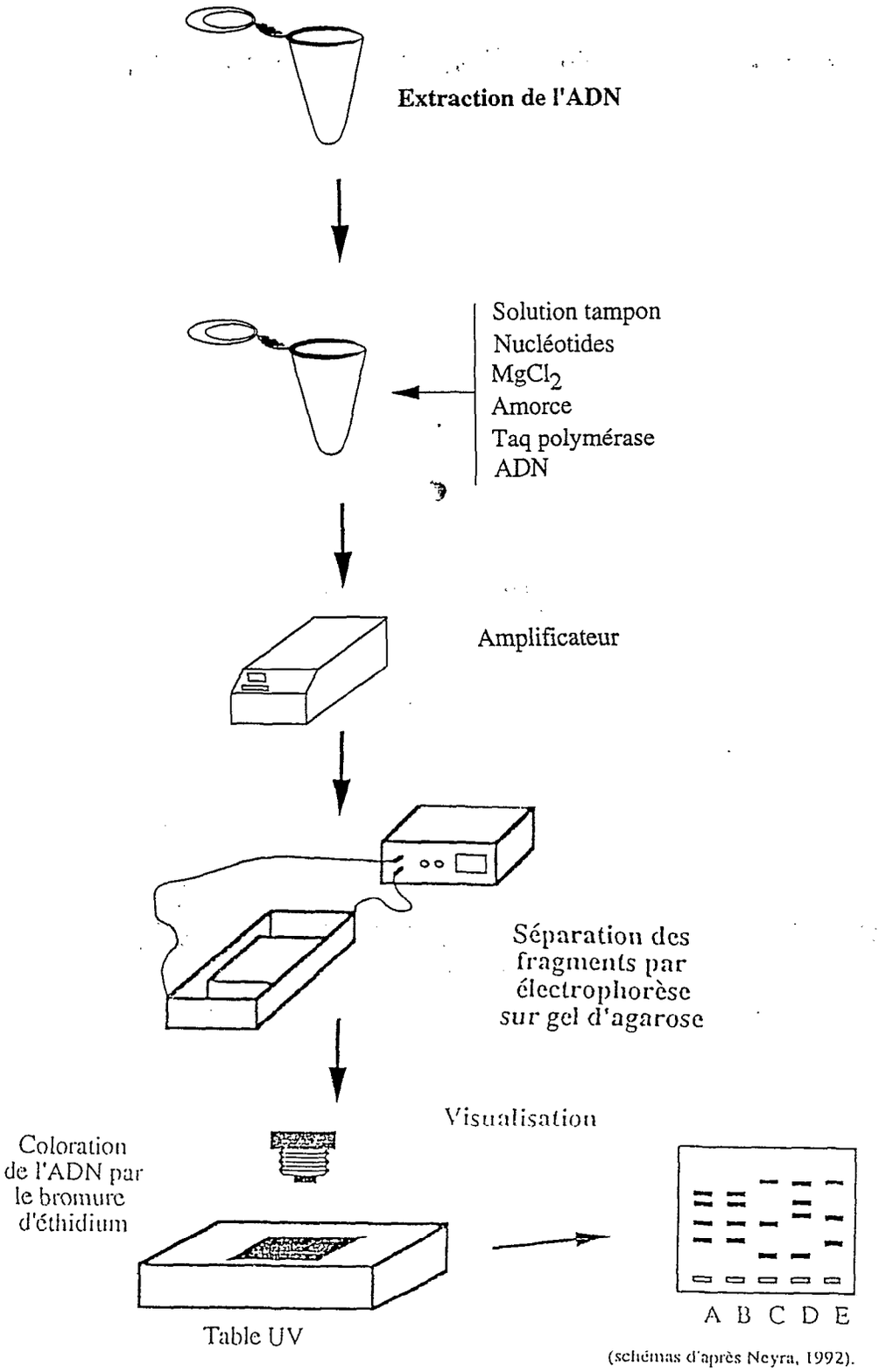


Figure 4: Différentes étapes de la RAPD (Williams *et al.*, 1990).

Remarque : Après amplification, les échantillons sont maintenus à 4° C, soit dans le thermocycleur soit dans le réfrigérateur.

2.6.4. Révélation par électrophorèse sur gel d'agarose

2.6.4.1.Préparation du gel

Un gel à 1,8 % (p/v) d'agarose est réalisé par dissolution de 5 g d'agarose dans 280 ml de tampon TBE (Trizma base (90 mM), acide borique (90 mM), EDTA (2 mM), pH 8) en chauffant au four à micro-ondes. Après léger refroidissement (environ 55° C), ce gel est coulé dans la cuve de migration et une fois pris en masse, il sera couvert de tampon TBE versé dans la cuve.

2.6.4.2.Préparation des échantillons

Avant le dépôt sur le gel, 3 µl d'une solution de bleu de charge (Bleu de bromophénol (0,25 %), glycérol (30 %) dans une solution d'EDTA 0,1 mM, pH 8) est ajouté à chaque échantillon amplifié (amplifiat). Après agitation, 20 µl du mélange sont disposés dans les puits.

2.6.4.3.Electrophorèse

En plus des échantillons déposés, 3 µl d'une solution de marqueur de poids moléculaire (ladder 1 Kb, comprenant 13 fragments de poids moléculaire compris entre 1 et 12 Kb) sont déposés dans un puis à part, servant de témoin de migration et de révélation. La migration s'effectue sous tension de 100 volts pendant 4 h.

2.6.4.4.Visualisation

Le gel est coloré en le plongeant dans une solution de bromure d'ethidium (BET) à 2 µg/ml pendant 20 mn, puis rincé 2 fois à l'eau distillée (2 x 10 mn). Les fragments d'ADN sont alors rendus visibles sous lumière U.V. L'analyse du gel se fait sur la photo Polaroïd en comparant les bandes des échantillons et en se référant à la taille des bandes du marqueur 1Kb

Chapitre 4. RESULTATS

Morphologie des 5 provenances de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich.

1. LA PLANTE

D'après nos observations, *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. apparaît comme une plante herbacée rampante (Planche 1). Les deux premières feuilles sont simples, opposées et à partir du deuxième nœud, les feuilles sont composées, trifoliolées pennées, à disposition alterne (annexe 3). Les fleurs sont groupées au sommet d'un pédoncule de 5 à 7 cm, de couleur bleu violacé ou rose violacé. Les graines sont petites, de 0,4 à 0,6 cm. Le fruit est une gousse légèrement recourbée au sommet en bec aigu, longue de 3 à 8 cm. Les tubercules racinaires récoltés sont fusiformes (planche 2). Le tableau ci-après présente des dates d'apparition de certains organes.

Tableau 3. Dates d'apparition de certains organes, en jours après semis.

Provenances	Fleur	Fruit	Fruit mûr
1503	53	67	93
1498	–	–	–
1502	53	67	93
1506	53	67	93
1492	39	54	74

2. COMPORTEMENT GERMINATIF DES GRAINES

2.1. Taux de germination

Le tableau 4 montre que le début de germination est observé au 3ème jour après semis, chez les provenances TVNu 1503, 1502 et 1506 avec différents taux respectivement égaux à 100%, 60% et 80%. Pour la TVNu 1492, les premières germinations débutent au 7ème J.A.S avec un taux de 20% et au 17ème pour la provenance TVNu 1498 avec un taux de 80%.

Chez les provenances TVNu 1503, 1502 et 1506, le maximum de germination est atteint 4 J.A.S et respectivement 18 et 20 J.A.S pour les provenances 1498 et 1492. Néanmoins, au bout de 20 J.A.S., les taux de germination atteignent les 100 % pour toutes les provenances.

Les différentes de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich.

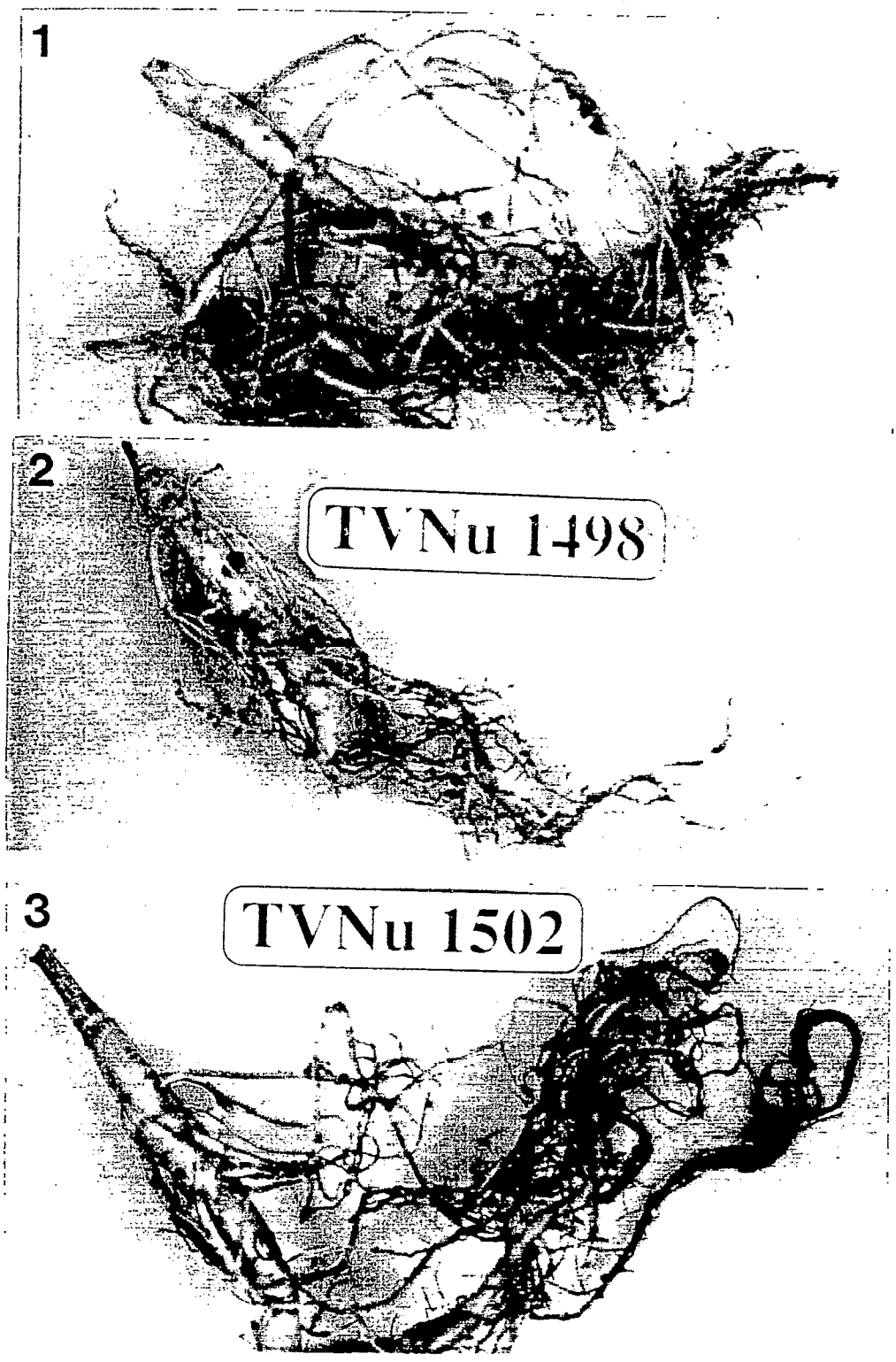


Tableau 4. Rythme journalier de germination des graines issues des cinq provenances en pourcentage (%).

J.A.S.	1503	1498	1502	1506	1492
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	100	0	60	80	0
4		0	100	100	0
5		0			0
6		0			0
7		0			20
8		0			40
9		0			60
10		0			60
11		0			80
12		0			80
13		0			80
14		0			80
15		0			80
16		0			80
17		80			80
18		100			80
19					80
20					100

Le comportement germinatif des graines des différentes provenances permettrait de les classer en trois groupes.

* 1er groupe : comprenant les provenances TVNu 1503, 1506 et 1502, caractérisées par un début de germination situé entre le 3ème J.A.S. et le 6ème J.A.S.

* 2ème groupe : comporte la provenance TVNu 1492 qui est caractérisée par un début de germination au 7ème J.A.S.

* 3ème groupe : comporte la provenance TVNu 1498 dont la germination se situe au 17ème J.A.S. Cette germination d'ailleurs, nécessite une scarification mécanique par frottement sur une surface abrasive (papier sable). En général, l'inaptitude à la germination, peut être due à l'embryon lui-même qui est incapable de germer quelles que soient les conditions du milieu; on parle alors de dormance embryonnaire, soit à la dureté des enveloppes séminales qui entravent les échanges d'eau et d'oxygène. Dans le deuxième cas, la suppression des barrières mécaniques par scarification rend possible la germination; on parle alors d'inhibition tégumentaire (NOBA, K., 1990).

Dans le cas de la provenance TVNu 1498, on peut donc penser que le retard observé dans la germination était lié à une inhibition tégumentaire, comme c'est le cas d'ailleurs pour de nombreuses légumineuses (Côme, 1970).

2.2. Type de germination

La position des cotylédons par rapport au sol détermine le type de germination. Leonard (1957) cité par Vanderborght (1989) établit deux types (figure 5).

-Germination épigée désignée généralement par **(E)**, regroupant les types A (cotylédons au-dessus du sol) et C (cotylédons au niveau du sol).

-Germination hypogée désignée généralement par **(H)**, regroupant le type B où les cotylédons sont au-dessous du sol.

Chez les 5 provenances étudiées, on retient la germination épigée **(E)** avec les types A pour TVNu 1503, 1498, 1502, 1506 et C pour TVNu 1492.

3. ETUDE MORPHOMETRIQUE

3.1. Etude de différents organes

3.1.1. Forme des feuilles

La forme des feuilles est déterminée à partir de la valeur du rapport largeur moyenne / longueur moyenne (Annexe 1).

Tableau 5. Forme des feuilles de rang 1.

Provenance	l / L	Forme
1503	0,57	Triangulaire (type)
1498	0,50	Triangulaire (type)
1502	0,55	Triangulaire (type)
1506	0,53	Triangulaire (type)
1492	0,50	Triangulaire (type)

Les deux premières feuilles des 5 provenances sont simples, opposées et présentent la même forme (Triangulaire type). Cette homogénéité nous a permis de ne pas inclure ces données dans l'étude discriminante des provenances.

Tableau 6. Valeurs des rapports largeur/longueur (l /L) de la foliole médiane (F.M.) et des folioles latérales (FL) de rang 2, 3, 4 et 5.

Prove-nance	FM2	Fl2	FM3	Fl3	FM4	Fl4	FM5	Fl5
1503	0,375	0,450	0,346	0,368	0,414	0,440	0,428	0,442
1498	0,324	0,340	0,362	0,344	0,300	0,300	0,360	0,360
1502	0,470	0,450	0,374	0,375	0,440	0,400	0,532	0,456
1506	0,424	0,436	0,424	0,480	0,500	0,436	0,750	0,625
1492	0,550	0,500	0,565	0,500	0,525	0,525	0,560	0,550

Tableau 7: Forme des folioles médianes (FM) et latérales (FL) des feuilles de rang 2, 3, 4 et 5

Prove-nance	FM2	Fl2	FM3	Fl3	FM4	Fl4	FM5	Fl5
1503	a	a	a	a	a	a	a	a
1498	a	a	a	a	a	a	a	a
1502	a	a	a	a	a	a	b	a
1506	a	a	a	b	b	a	b	b
1492	b	b	b	b	b	b	b	b

a = forme ovale losangique (type) ou lancéolé.
b = forme ovale losangique (type).

La forme des folioles (tableau 7) est déduite des rapports largeur moyenne sur longueur moyenne du tableau 6 (Merlier et Montégut, 1982). Par simple observation, on retient alors la série ovale losangique avec des variabilités (type et lancéolé) définies par la "clé" de Merlier et Montégut. Ainsi, les rapports l/L compris généralement entre 0,2 et 0,5 des folioles de rangs 2, 3, 4 et 5 des provenances TVNu 1503, 1498, 1502 et 1506, seront attribués aux deux variabilités: ovale losangique (type) et lancéolée. Ces provenances peuvent présenter alors les deux formes.

Les rapports l/L compris entre 0,500 et 0,565 représente la forme ovale losangique (type) que l'on rencontre sur les folioles de rangs 2, 3, 4 et 5 de la provenance TVNu 1492 et de rang 5 de la provenance TVNu 1506.

Ainsi, l'espèce est caractérisée, en ce qui concerne les feuilles, par la forme ovale losangique avec cependant une légère variabilité au sein de cette forme, permettant de distinguer 2 types sur toutes les provenances étudiées: type et lancéolé (planche 3).

Planche 3

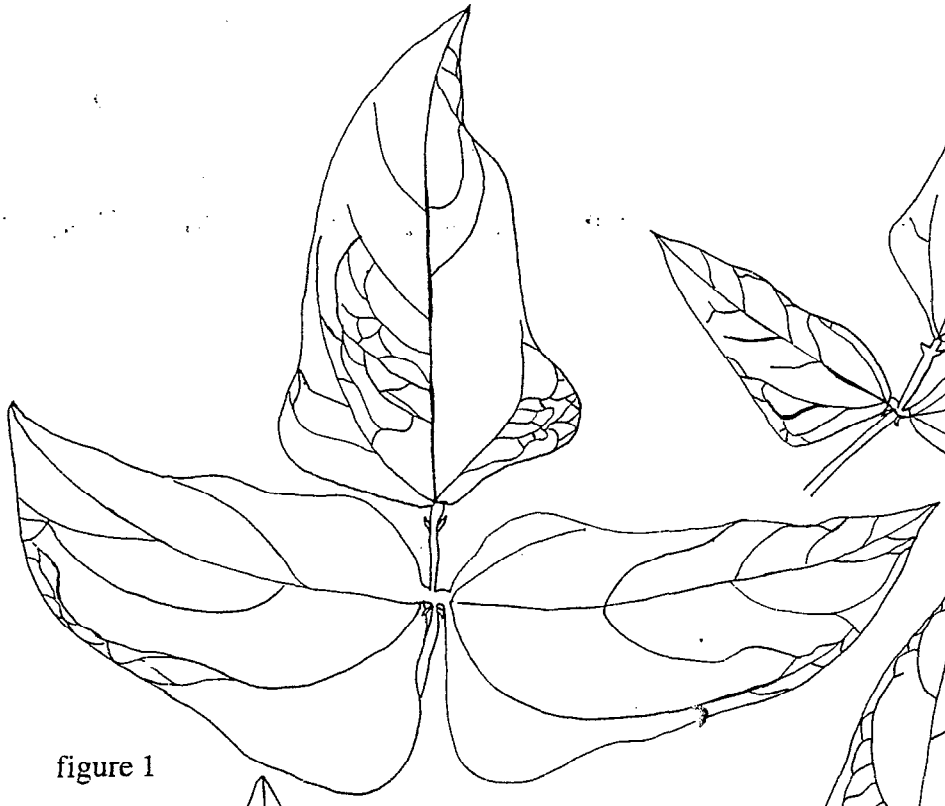


figure 1

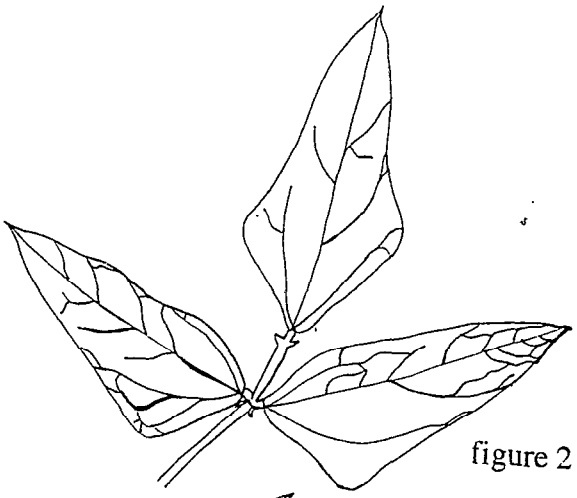


figure 2

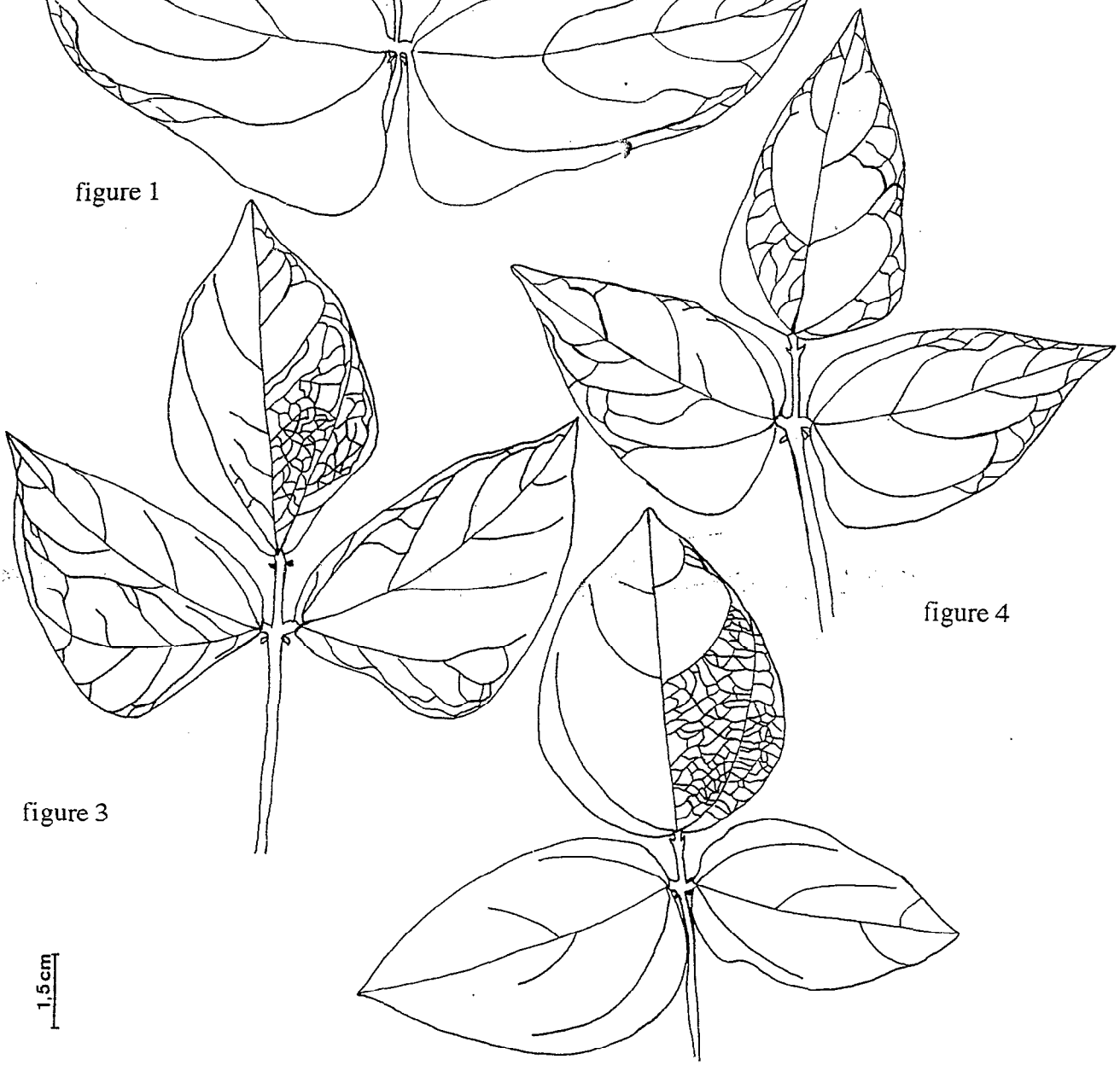


figure 4

figure 3

1,5 cm

figure 5

3.1.2. Type de port

Dans les provenances TVNu 1503, 1498, 1502 et 1506, le port est rampant et la présence d'un tuteur a permis son redressement.

La provenance TVNu 1492 présente un axe principal à port érigé, avec des entre-nœuds très réduits et des ramifications rampantes qui partent plus ou moins du même point à la base du plant, ce qui donne une structure en "*rosette*"(figure 6). Par contre, chez les autres provenances, le point de ramification basale ne présente que deux rameaux. Ce type de ramification est appelée "*twining*". Ces différences phénotypiques, *rosette* et *twining*, seraient, d'après Fery (1980) respectivement liées, chez *Vigna vexillata*, à l'allèle récessif *"tw"* à l'état homozygote et du dominant " TW" à l'état homozygote aussi (James et Lawn, 1991).

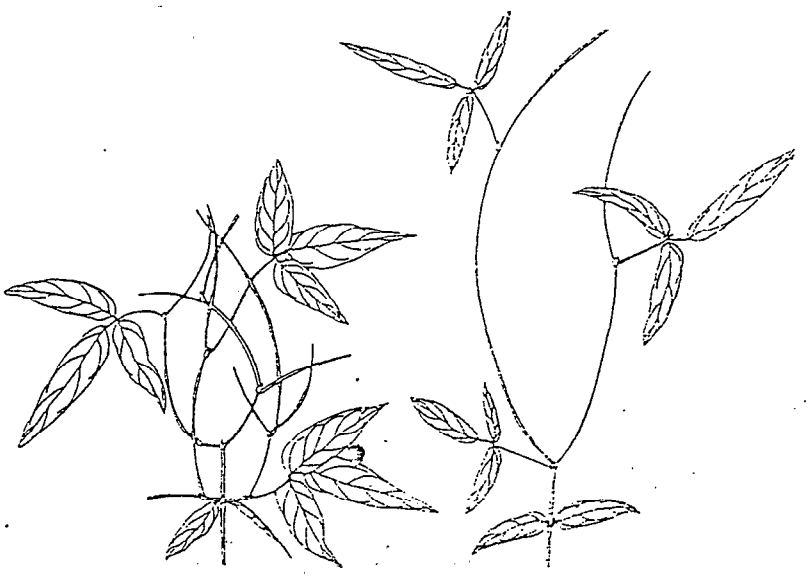


Figure 6. Type de ramification basale chez *Vigna vexillata* (L.) A. Rich.: la forme en *rosette* (à gauche), la forme *twining* (à droite) (James et Lawn, 1991).

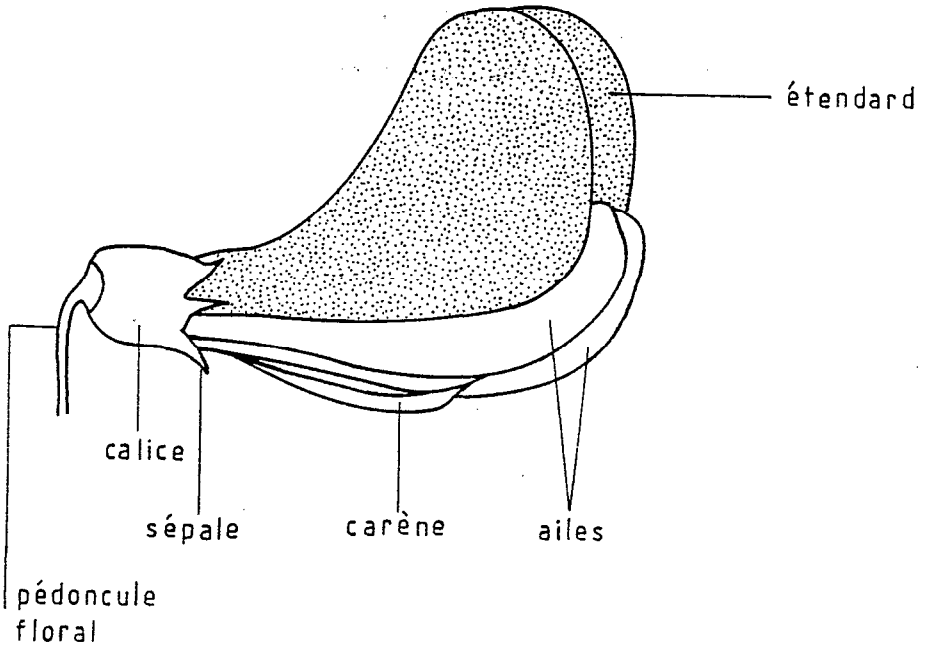


Figure 7. La fleur de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich..

3.1.3. Fructification

3.1.3.1.Les fleurs

La macromorphologie de la fleur de *Vigna vexillata* est similaire à la fleur caractéristique des Papilionacées (figure 7) caractérisée par:

- une inflorescence plus ou moins allongée sous forme de grappe,
- chaque fleur présente un périanthe double avec un calice à 5 sépales plus ou moins soudés en tube et une corolle à 5 pétales.

Néanmoins, quelques différences peuvent être notées:

- Chez la provenance TVNu 1492, la taille de la fleur est plus petite que chez les provenances TVNu 1503, 1498, 1502 et 1506.
- La fleur est de couleur bleu violacé chez la TVNu 1492 et rose violacé chez les autres provenances.

3.1.3.2.Les graines

La forme des graines est généralement légèrement différente d'une provenance à l'autre. Mais la provenance TVNu 1492 présente, quant à elle, une forme bien distincte par rapport aux autres par la position de l'embryon à l'extrémité terminale de la graine (planche 4).

3.2. Taux de tubérisation

Le tableau 8 montre que sur les 5 provenances testées, seules TVNu 1503, 1502, 1506 et 1498 ont produit des tubercules racinaires. Mais le taux 100 % n'est atteint chez aucune provenance. Il faut également noter que c'est la provenance TVNu 1492 non tubérisée qui présentait un port en rosette différent des autres.

L'absence de tubérisation pourrait être due aux conditions de semis (profondeur d'enfouissement, arrosage) ou à l'action de différents facteurs écologiques (nature du sol, lumière etc.), ce qui reste à préciser.

Planche 4

Figure 1a

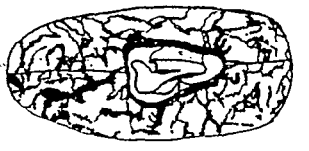


Figure 2a

Figure 1b

Figure 2b

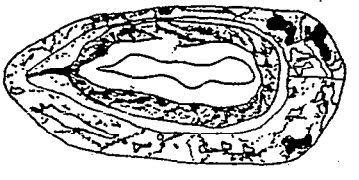


Figure 3a

Figure 3b

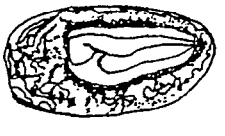


Figure 4a

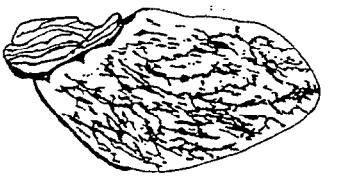


Figure 5a

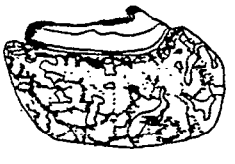


Figure 4b

Figure 5b

Tableau 8. Taux de tubérisation des 5 provenances.

Provenances	% tubérisation
TVNu 1503	20
TVNu 1498	40
TVNu 1502	20
TVNu 1506	20
TVNu 1492	0

4. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES TUBERCULES

Tableau 9 : tableau récapitulatif de l'ensemble des résultats de la composition biochimique des tubercules.

Provenance	PFT (g)	% HUM	% PROT	% LIP	% CEND	% CELLU
1503	16,49	53,34	4,10	2,47	2,1	14,47
		53,03	5,21	3,55	n.d	18,24
Moyenne		**53,19**	**4,66**	**3,01**	**2,1**	**16,36**
1498	9,11	62,99	4,60	2,68	n.d	n.d
		63,65	4,59	1,66	n.d	n.d
Moyenne		**63,32**	**4,6**	**2,17**	**n.d**	**n.d**
1498	13,76	59,07	5,75	0,52	3,31	n.d
		59,81	5,66	0,85	3,66	n.d
Moyenne		**59,44**	**5,71**	**0,69**	**3,49**	**n.d**
1502	25,62	55,35	2,31	1,86	2,74	n.d
		54,77	2,32	1,56	2,70	n.d
Moyenne		**55,06**	**2,31**	**1,71**	**2,72**	**n.d**
1506	7,32	60,63	4,94	1,85	2,85	n.d
		61,45	5,22	2,4	3,39	n.d
Moyenne		**61,04**	**5,08**	**2,13**	**3,12**	**n.d**

Des résultats consignés dans le tableau 9 , on peut tirer les informations suivantes.

- le poids frais des tubercules (PFT) obtenus varie en fonction des provenances et des individus: le plus faible est observé pour la provenance TVNu 1506 (7 g) et le plus fort pour la TVNu 1502 (25,6 g).

- Les teneurs en eau sont assez voisines pour toutes les provenances analysées (environ 60 %).

- le pourcentage en protéines est proche de 5 % pour toutes les provenances, sauf la TVNu 1502 (2,3 %).

- le pourcentage en lipides est compris entre 0,7 % chez la provenance TVNu 1498 et 3 % chez la provenance TVNu 1503.

- le pourcentage des cendres qui représente la teneur en éléments minéraux varie de 2 % pour la provenance TVNu 1503 et 3,5 % pour la TVNu 1498.

- le pourcentage en cellulose ou plus exactement de matières insolubles reste, quant à lui, assez important pour TVNu 1503 (16,36 %). Pour les autres provenances, on ne peut tirer de conclusions car la quantité des échantillons était trop faible.

Néanmoins, c'est la provenance TVNu 1498 qui présente d'importantes quantités en eau (61.38 %), protéines (5,15 %) et cendres (3,49 %) alors que la TVNu 1503 est plutôt riche en lipides (3,01 %).

Les résultats de la teneur en protéines des tubercules analysés s'avèrent différents de la littérature (15 %), ce qui pourrait être du aux conditions de l'expérimentation.

Les résultats de la composition biochimique des tubercules seront associés à ceux de l'étude morphométrique pour la structuration de la population.

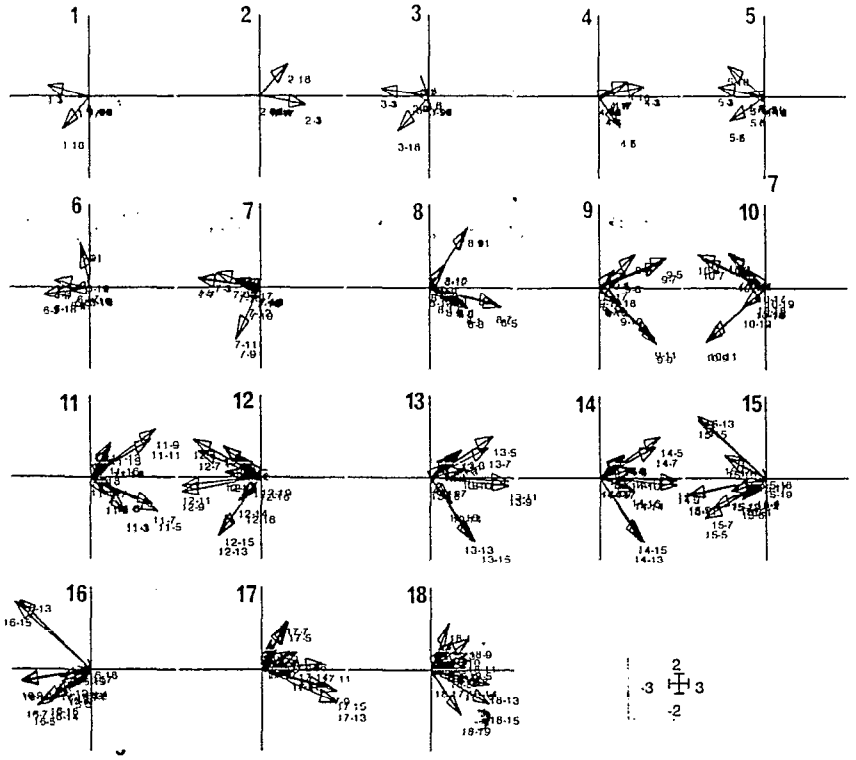


Figure 8. Typologie des variables en ACP séparée par tableau. Les vecteurs représentent les variables.

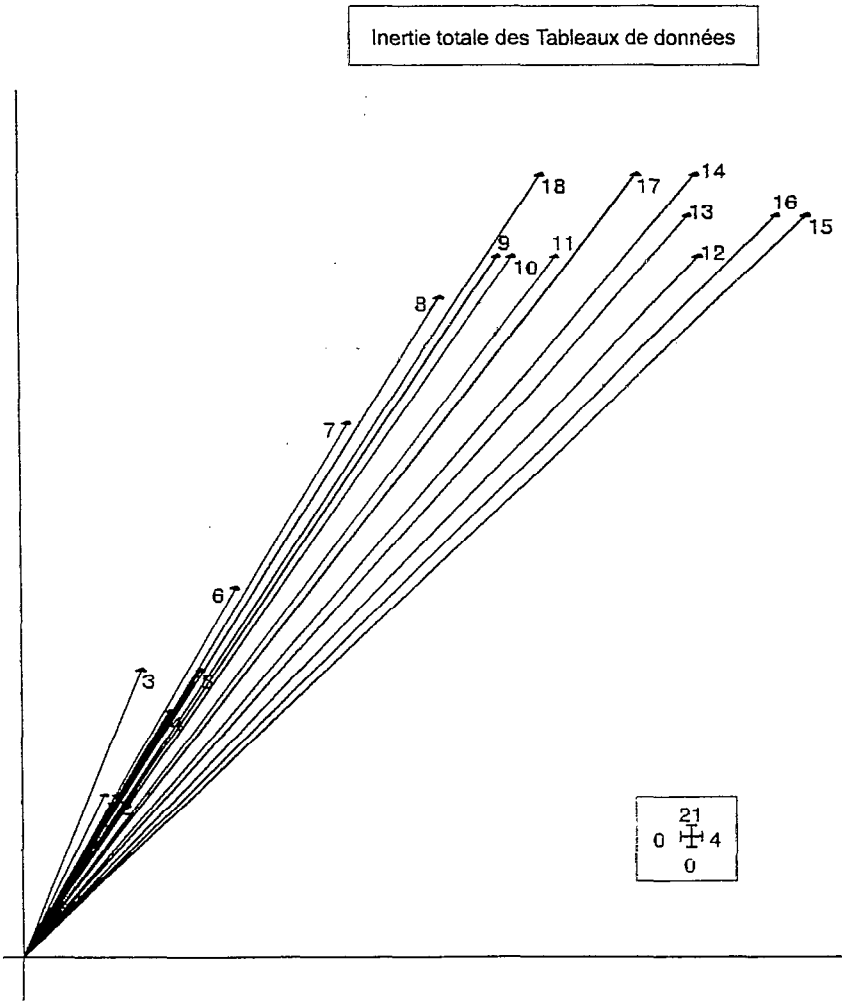


Figure 9. Inertie totale des tableaux de données.

5. ANALYSE STATISTIQUE

Cette analyse a été entreprise afin d'essayer de dégager parmi les paramètres retenus par les mesures biométriques, les caractères les plus représentatifs qui pourraient être, dans l'avenir, pris en compte pour la caractérisation intraspécifique des différentes provenances de *Vigna vexillata*.

L'analyse est réalisée sur les 18 tableaux de l'étude morphologique correspondant aux dates d'observations (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 30, 38, 54 J.A.S.) et le tableau de récolte, décrits au paragraphe 2.5.1. du chapitre. III.

5.1. Analyse des 18 tableaux de l'étude morphométrique

5.1.1. Analyse de l'inertie des tableaux de données morphométriques

L'Analyse séparée en Composantes Principales des 18 tableaux de données nous montre, à partir de leurs cartes factorielles représentées sur la figure 8, que :

- sur les tableaux 1 à 6 (11 à 16 J.A.S.), la variabilité est insuffisante, vue la longueur des vecteurs, pour éventuellement trouver une quelconque structure des plants,

- sur les tableaux 16 à 18 (30 à 54 J.A.S.), on a une diminution de l'inertie et un fort regroupement indiquant que les différentes variables semblent dire la même chose,

- d'une manière générale, on constate un changement de direction des variables d'une carte à une autre comme par exemple sur les couples 1 et 2, 2 et 3, 11 et 12, 17 et 18. Ce qui, probablement, indique un changement de la matrice de projection d'une carte à l'autre.

La figure 9, issue de la même analyse que précédemment, montre la valeur d'inertie totale contenue dans chacun des 18 tableaux. Elle permet de visualiser l'observation que nous avons faite précédemment sur les tableaux 1 à 6 qui représentent les dates d'observation 11 J.A.S. à 16 J.A.S.

En conclusion, des observations faites sur les graphiques issus de l'ACP séparée on peut dire que :

1. les dates 11 à 16 J.A.S (tableaux 1 à 6) sont trop précoces pour permettre une structuration des plants. Pour la suite des dates, la variabilité des différents tableaux est plus forte.
2. L'instabilité des structures de projection, illustré par la figure 8 de l'ACP séparée, ne permet pas la comparaison rigoureuse des différents tableaux.

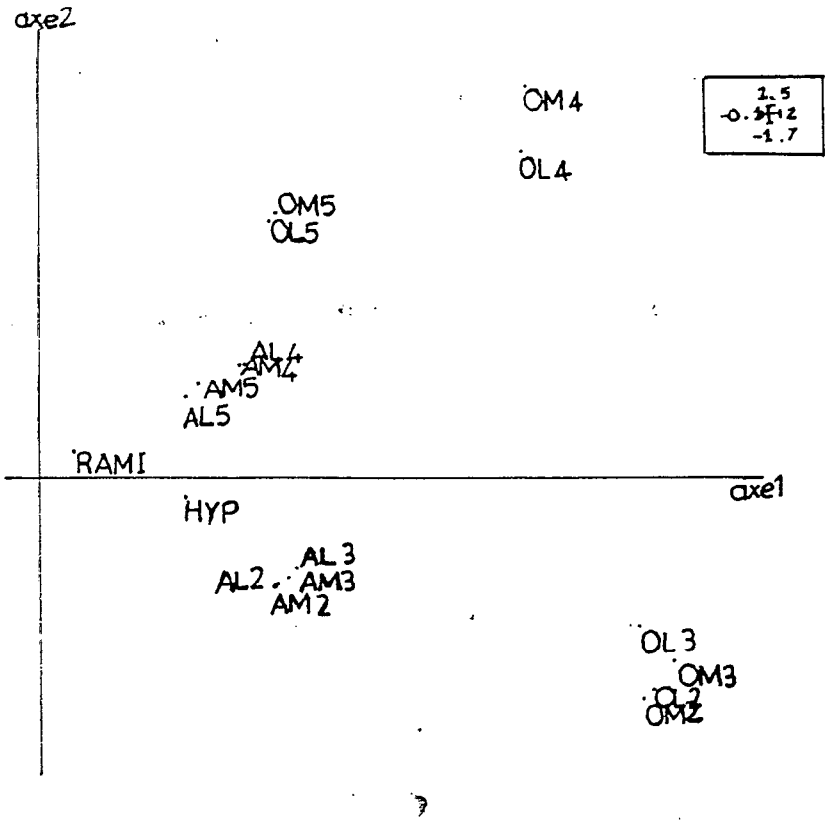


Figure 10. Projection des variables de synthèse sur les composantes principales.

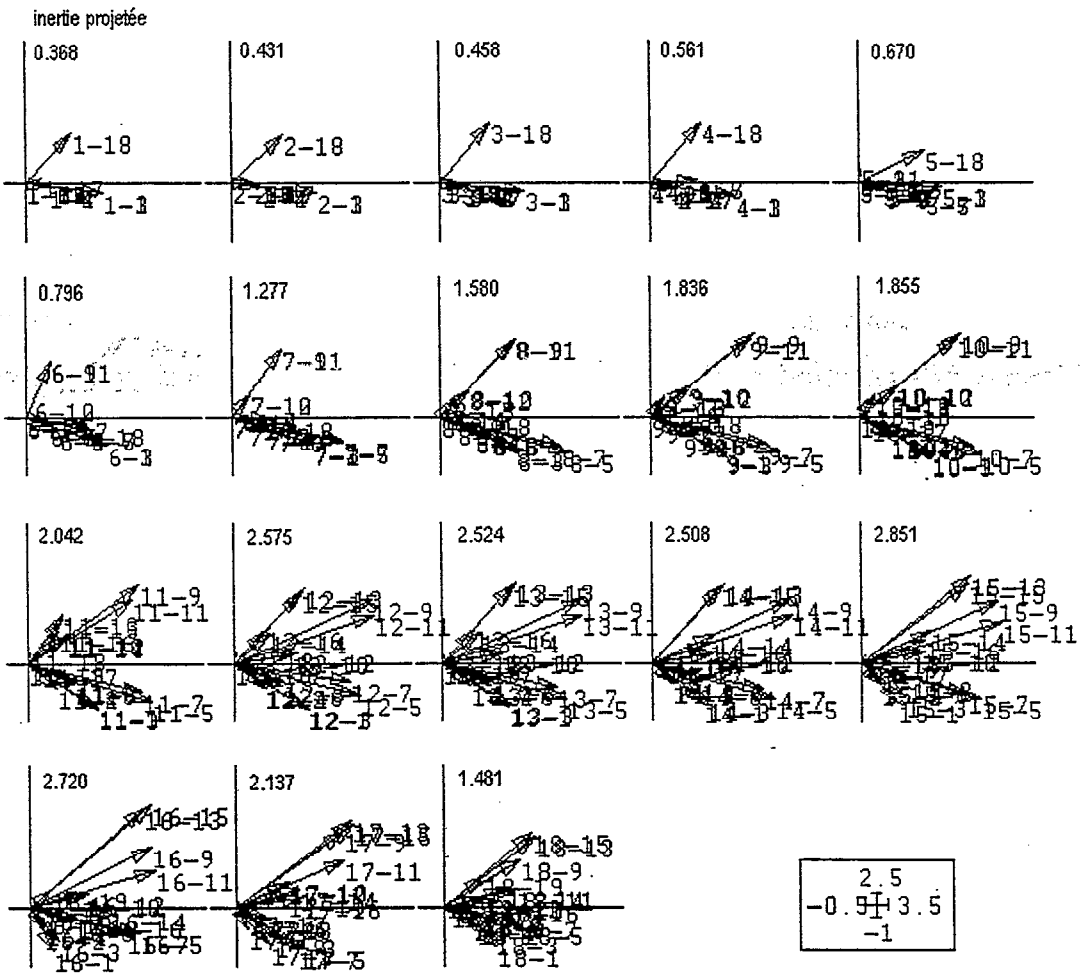


Figure 11a. Projection des variables sur les axes de co-inertie.

5.1.2. Comparaison des tableaux

L'analyse de co-inertie multiple (ACOM) utilisée génère des composantes canoniques à partir de variables de synthèse issues des variables brutes (figure 10), ce qui permet d'apprécier la participation des tableaux à la typologie de synthèse.

La structure de référence retenue a une première composante canonique expliquée positivement par les longueurs des feuilles de rang 2, 3 et 4 . Une seconde composante expliquée positivement par la longueur des feuilles de rang 4, et négativement par les longueurs des feuilles de rangs 2 et 3. Ce qui dénote à une certaine stabilité des variables constitutives de la structure et leur réduction à 6 variables au maximum.

La figure 11a, avec les valeurs des inerties projetées de chacune des cartes factorielles, illustre la stabilité de la typologie des variables, confirmant ainsi le caractère homogène (c'est-à-dire les mêmes variables) des 18 tableaux de morphométrie. Toujours par rapport à la structure de référence que sont les axes de co-inertie, la projection des individus (plants) montre l'apparition d'une légère structure de groupe (2 groupes) sur les cartes factorielles 11 et 15 (figure 11b). Quant aux cartes 17 et 18, elles montrent que les individus sont très mal représentés dans la structure de référence, d'ailleurs une baisse importante de l'inertie projetée est notée pour la carte 18. Cette baisse est moins significative pour la carte 17 (figure 11a). Cela montre qu'à un certain niveau de précocité de l'observation, les variables analysées peuvent montrer une certaine importance pour la différenciation des plants mais à un stade plus avancé, quand les génotypes dormants sont mieux constitués, la valeur typologique de ces variables baisse considérablement. C'est ce que l'on observe sur les cartes 17 et 18, rendant moins pertinents les tableaux 17 et 18.

5.1.3. Typologie des tableaux

L'examen du graphe de projection sur les axes canoniques du nuage de tableaux montre une typologie en 3 groupes (figure 12). Les tableaux qui nous intéressent sont ceux qui maximisent la corrélation vectorielle (RV) entre les coordonnées de la composante principale du tableau et la variable canonique de synthèse. Un second critère de qualité, bien connu pour les analyses en composantes, sera observé. Il s'agit du cos^2 de la représentation. Seuls les résultats du groupe 1 qui maximisent les facteurs de qualité, sont repris dans le tableau 10 afin d'illustrer notre choix.

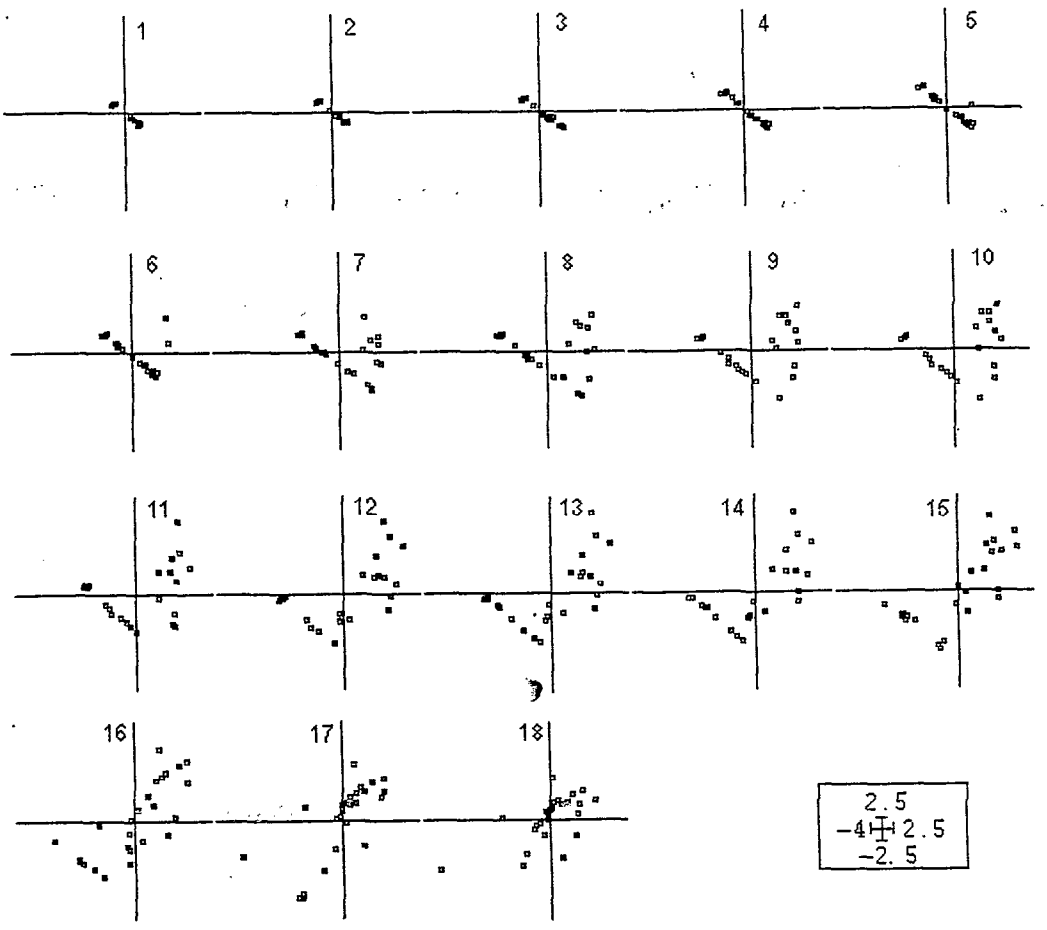


Figure 11b. Projection des nuages de points (plants) sur la structure commune.

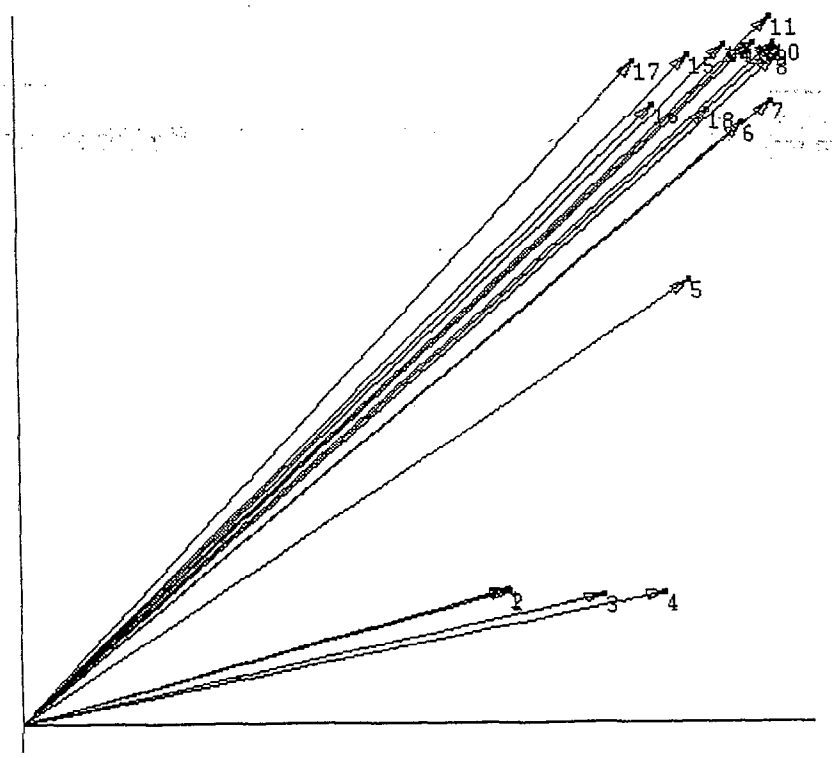


Figure 12. Typologie de Tableaux morpho-métriques (vecteurs).

Tableau 10. Valeurs de coefficients de corrélation vectorielle et de la qualité de la représentation des 8 meilleurs tableaux de données morphométriques.

N° tableau de données	RV	cos^2 axe 1	cos^2 axe 2
8	0,901	0,92	0,87
9	0,904	0,92	0,90
10	0,911	0,92	0,91
11	0,919	0,91	0,98
12	0,878	0,87	0,94
13	0,875	0,85	0,90
14	0,853	0,80	0,90
15	0,811	0,72	0,88

Ainsi, les observations morphométriques au 21ème J.A.S (tableau 11). ayant la meilleure représentation dans le plan 1-2 est retenue pour être couplé au tableau de relevés de récolte (tableau 19) dans une analyse en composante principale (tableau 11 et 19, voir annexe 2).

Le tableau 10 correspondant aux observations du 20ème J.A.S., est aussi bien représenté, mais l'homogénéité des tableaux fait qu'il est inutile de le retenir car il n'y aura que de la redondance au lieu d'une information supplémentaire pour l'ACP à réaliser.

5.2. Analyse en Composantes Principales (ACP) finale

Avant la réalisation de l'ACP, les tableaux 11 et 19 (observations au 21èmeJ.A.S. et à la récolte) sont, après leur fusion en une matrice de données de 30 variables,"nettoyés" de leurs variables redondantes, c'est-à-dire celles qui ont des valeurs de corrélation de Pearson supérieures ou égales à 0,94.

L'histogramme des vecteurs propres (figure 13a) conduit à retenir 3 axes de projection ou composantes principales, représentant ensemble, 75% de la variation totale ou inertie de la matrice de données.

L'interprétation du cercle de corrélation sur les plans 1-2 et 1-3 (figures 13b et 13c), nous indique que:

- la première composante (F1)représente positivement la géométrie des folioles médianes et des gousses.

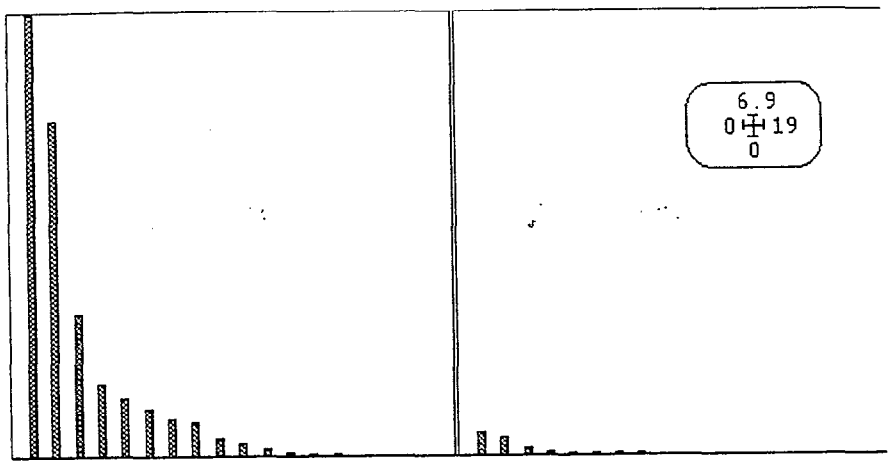
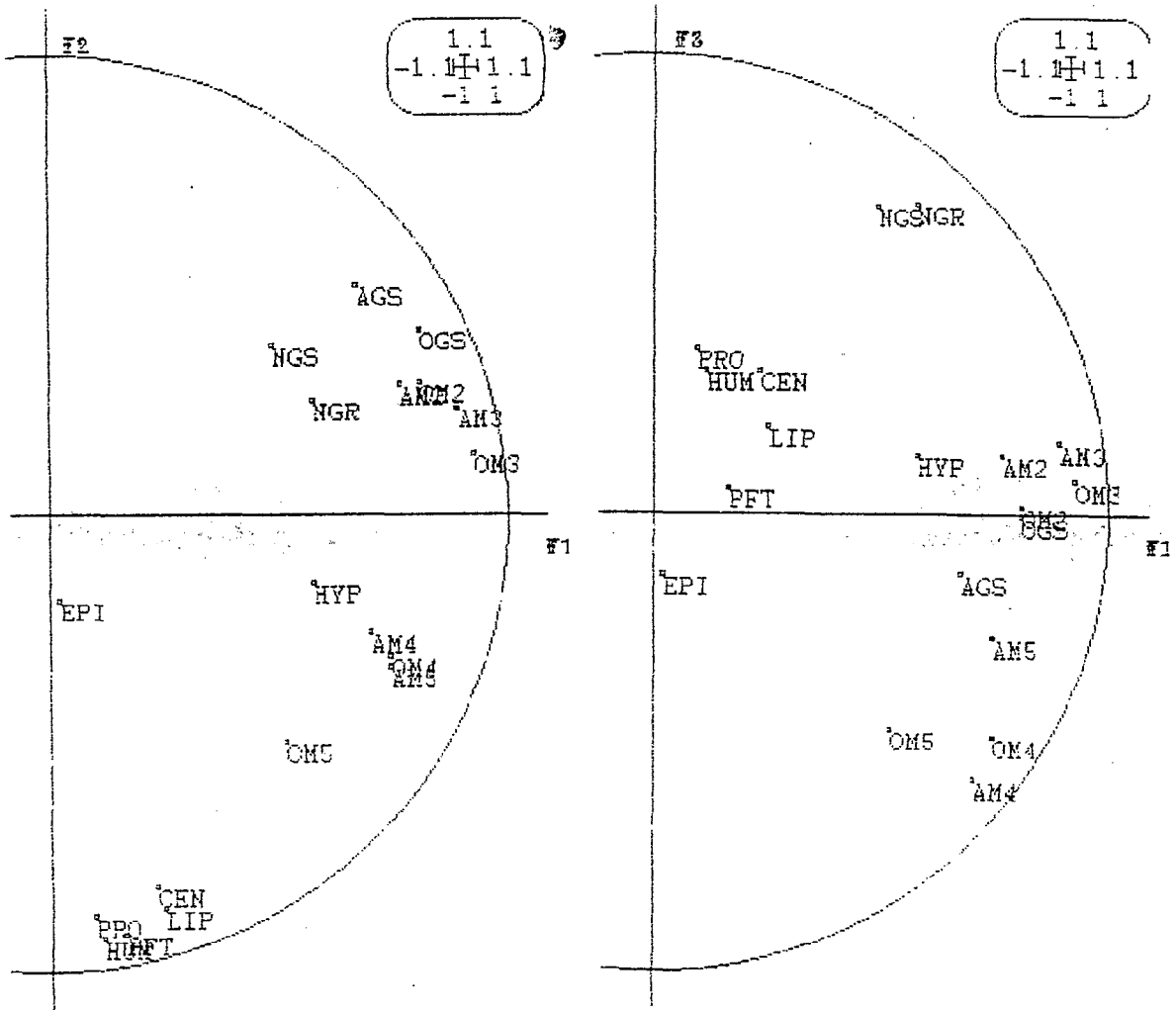


Figure 13a. Histogramme des vecteurs propres issus de l'ACP. Les 3 premiers histogrammes correspondant aux 3 premières composantes principales sont retenues pour la projection des variables.



Figures 13b et.c Cercles de corrélations des variables sur le plan factoriel 1-2 et 1-3. Représentation graphique des liaisons entre les variables.

- la seconde composante (F2) distingue le rang des feuilles, ainsi positivement on a les folioles de rang 2 et 3 et, négativement celles de rang 4 et 5 plus récentes, mais cette seconde composante principale a comme signification biologique, le poids frais des tubercules (PFT).
- la troisième composante avec 11% de variation représente le nombre de gousses (NGS).

L'analyse de la figure 14a, révèle une structure de groupe de la population de 25 plants. Six groupes sont observés et leurs différences seront commentées avec l'appui simultané de la figure 14b:

- le Groupe 1, se distingue des groupes 2 et 3 par l'importance de leur surface foliaire. Les individus 2 et 4 de la provenance TVNu 1506 (4.2 et 4.4) étirent le groupe par la grande dimension de la surface des feuilles de rang 4 et 5 pour ce qui est de l'individu 4.4 contre la petitesse de la surface des feuilles de même rang (4 et 5) pour l'individu 4.2 (figure 14b).

- le Groupe 2 est assez mal représenté et comprend des individus de très petite taille avec des feuilles réduites.

- le Groupe 3 est constitué d'individus qui au 21ème J.A.S. venaient à peine de germer. Ces individus présenteraient inhibition tégumentaire.

- Les groupes 4 et 5 présentent tous deux, des individus pouvant tubériser vu leur position par rapport à l'axe 2. Mais ce qui les différencie en 2 groupes est l'importance des feuilles de rang 4 et 5 dans le cas du groupe 5 contre l'absence de ces feuilles dans le groupe 4. Absence due à l'inhibition qu'avait manifesté cette provenance (TVNu 1498).

- L'individu du groupe 6 se distingue du groupe 5 par la faiblesse du nombre de gousses chez ce dernier et des individus du groupe 1, plus précisément des individus de la provenance (TVNu 1506) par la composition chimique de ses tubercules (figure 14b).

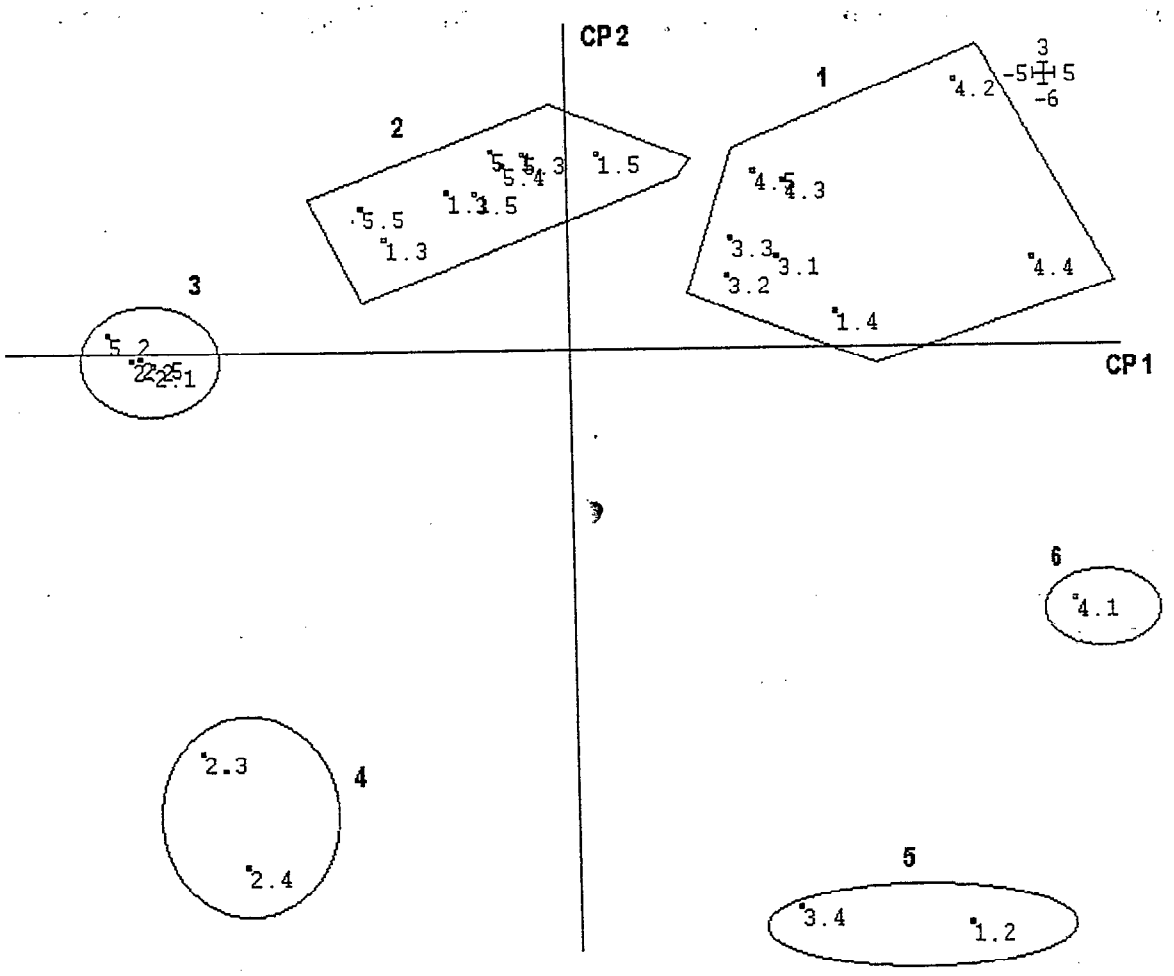


Figure 14a. Typologie des individus-plants dans le plan factoriel 1-2. Répartition des individus dans le plan 1-2. Les individus sont représentés par le numéro de la provenance , dans l'ordre TVNu 1503, 1498, 1502, 1506 et 1492, suivi par le numéro du plant (1 à 5) pour chaque provenance.

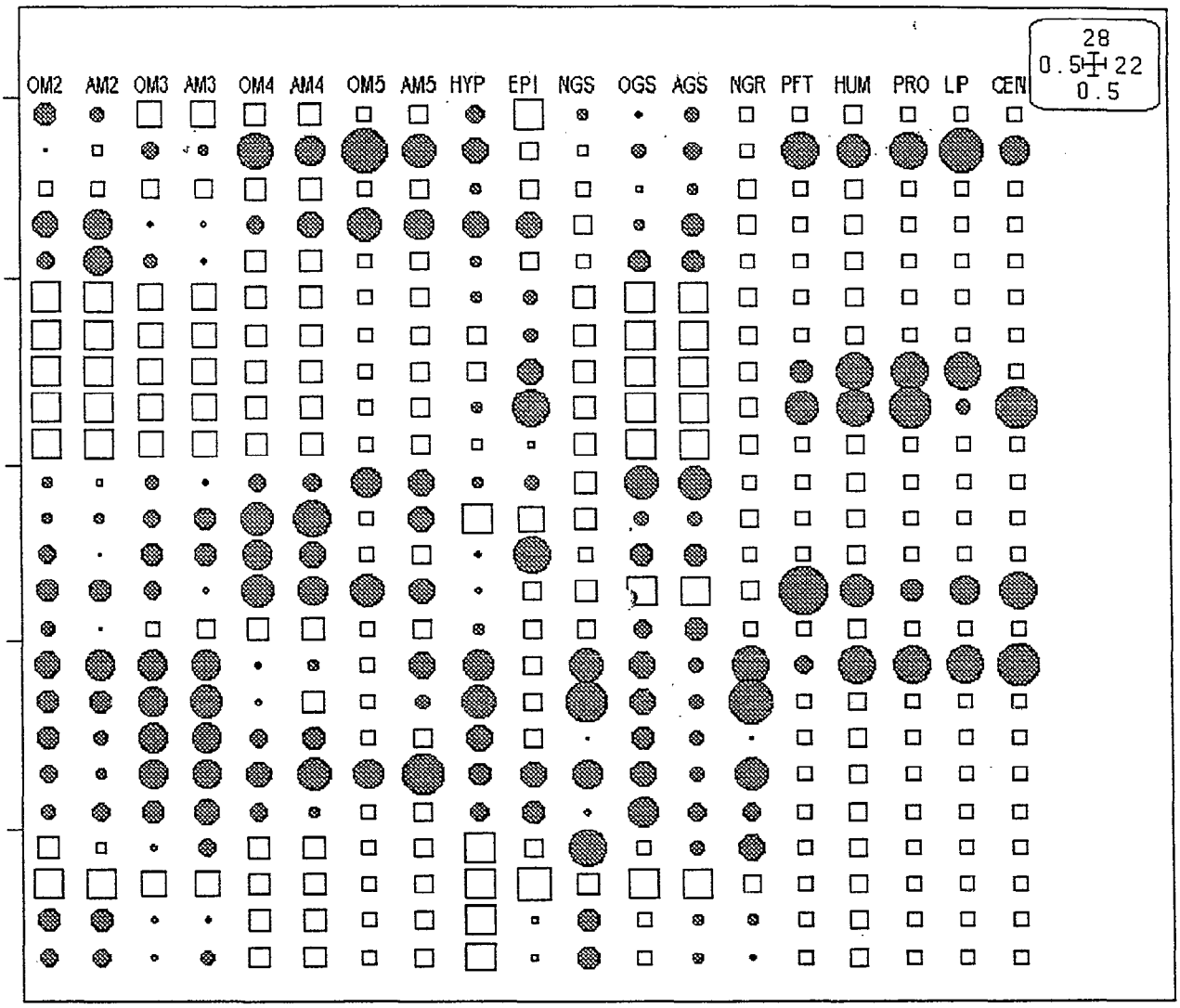


Figure 14b. Contribution des individus aux variables. L'importance de la surface des cercles et des carrés quantifie la corrélation.

cercle grisé: présence de corrélation.
Carré vide: pas de corrélation.

5.3. Conclusion

L'aboutissement final des analyses multidimensionnelles, est une structuration ou typologie des plants en plusieurs groupes. Ces groupes ne représentent pas automatiquement les provenances étudiées. Ainsi, un test supplémentaire, à l'aide de l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) permettrait, en se basant sur les mêmes variables sélectionnées que précédemment, de discriminer les provenances et de tester la validité du classement.

6. ANALYSE PAR RAPD

Six amorces ont été testées sur les différents échantillons de *Vigna vexillata* et de *V. unguiculata*. Nous ne présenterons ici que les profils électrophorétiques qui permettent de mettre en évidence les amorces intéressantes pour l'étude de la diversité génétique chez ces deux espèces. L'étude de la diversité génétique chez *Vigna vexillata* portera sur les 5 provenances étudiées dans les chapitres précédents (TVNu 1492, TVNu 1498, TVNu 1502, TVNu 1503, TVNu 1506).

6.1. Amplification avec l'amorce 1

Testée sur différents individus de la provenance TVNu 1506 de *Vigna vexillata* et sur sa descendance, les profils obtenus (planche 5: figures 1 et 2) sont rigoureusement homogènes. De même, appliquée sur des individus de la génération parentale des provenances TVNu 1492, 1498, 1502, 1503, 1506 de *Vigna vexillata*, elle fournit des profils identiques.

Ces résultats indiquent que l'amorce 1 ne permet pas de mettre en évidence une variabilité génétique ni au sein d'une provenance de *Vigna vexillata* ni entre provenances.

L'utilisation de cette amorce avec d'autres espèces du genre *Vigna* et l'obtention, avec ces espèces, de profils différents, permettrait d'utiliser cette amorce pour la caractérisation de l'espèce.

Ainsi, l'amplification à l'aide de l'amorce 1 ne peut être intéressante dans l'étude d'analyse de diversité inter provenances.

Planche 5

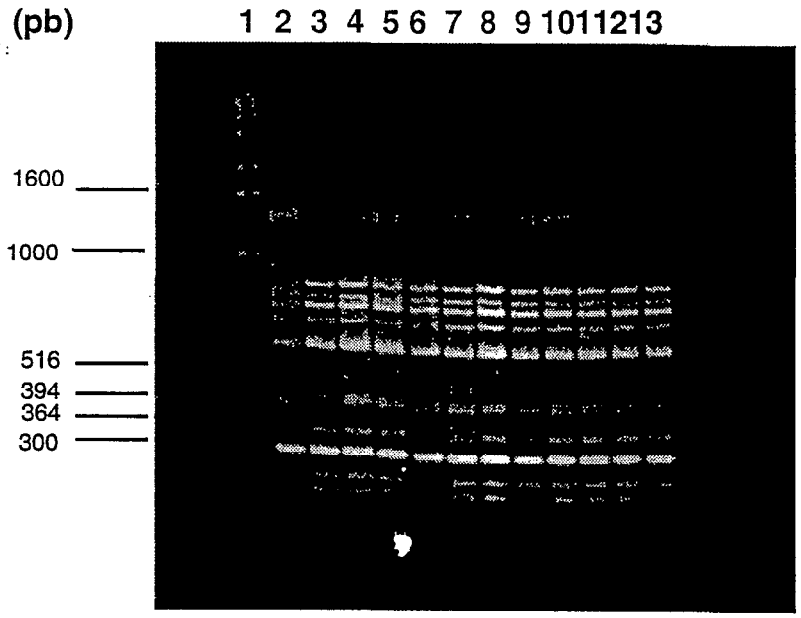


Fig 1: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 1. Marqueur 1Kb (ligne 1), descendance *V. vexillata* TVNu1506 (ligne 2 à 11) et lignée parentale TVNu 1506 (lignes 12 et 13).

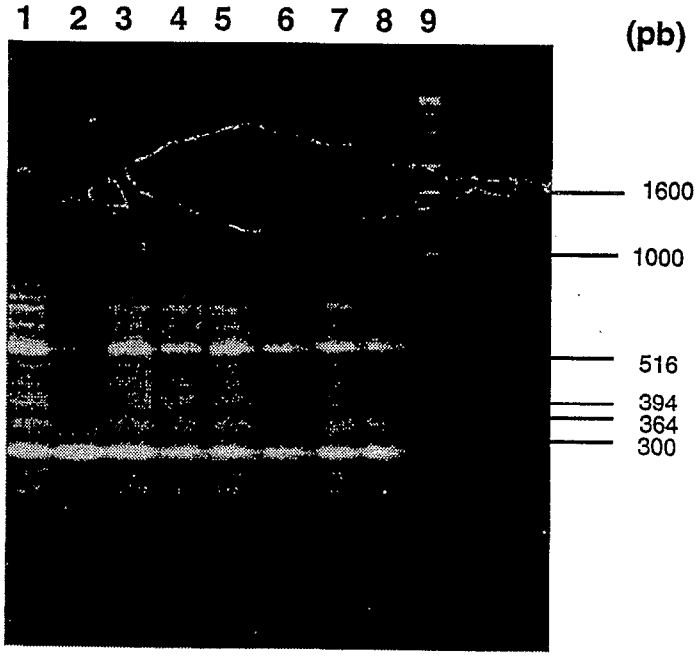


Fig 2: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 1. Lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1503 (ligne 1),TVNu 1498 (lignes 2 et 3), TVNu 1502 (lignes 4, 5 et 6), TVNu 1492 (lignes 7 et 8) et le marqueur 1Kb (ligne 9).

6.2. Amplification avec l'amorce 2

6.2.1. Génération parentale

Cette amorce a été utilisée pour l'amplification de l'ADN de la génération parentale des provenances TVNu 1503, 1498, 1502 et 1492. Bien que de nombreuses bandes de forte intensité soient communes à tous les profils (planche 6 figure 1), quelques différences apparaissent entre les provenances ainsi qu'entre individus de même provenance.

Sur 13 bandes observées, correspondant à des fragments d'ADN dont la taille est comprise entre 150 et 1000 pb, seulement 8 bandes sont systématiquement développées dans tous les profils.

Par contre, 3 bandes de taille proche de 900 pb, sont présentes uniquement chez les parents de la provenance TVNu 1502 et pourraient être considérées comme discriminantes pour cette provenance. A ce même niveau (900 pb) , on ne peut distinguer que deux bandes pour les TVNu 1503 et 1492, une seule bande pour la TVNu 1498.

En ce qui concerne les autres bandes, leur présence ou leur absence est notée au sein d'une même provenance, ce qui ne les rend pas intéressantes pour une analyse de la diversité "inter-provenance" ou intraspécifique. Ainsi, au sein des provenances TVNu 1502 et 1492, certaines différences peuvent être relevées:

- Pour l'individu 2 de la provenance TVNu 1502 :

  1 bande en moins de taille voisine de 1000 pb
  1 bande de plus de taille >1000 pb.

- Pour l'individu 3 de la provenance TVNu 1502 :

  1 bande en moins de taille entre 400 et 500 pb

- Pour l'individu 2 de la provenance TVNu 1492 :

  1 bande en plus de taille environ 700 pb
  1 bande en plus de taille environ 450 pb
  1 bande en moins de taille environ 400 pb

Pour confirmer cette variabilité intra-provenance et inter-provenance, on réalise une autre amplification avec l'ADN de la descendance de cette génération parentale et en utilisant la même amorce 2.

Planche 6

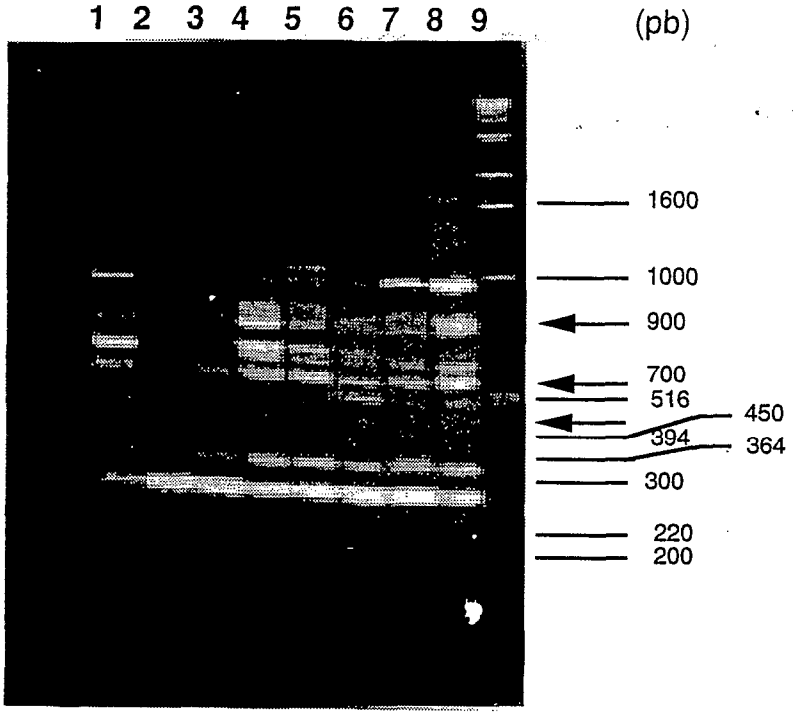


Fig 1: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 2. Lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1503 (ligne 1), TVNu 1498 (lignes 2 et 3), TVNu 1502 (lignes 4, 5 et 6), TVNu 1492 (lignes 7 et 8) et le marqueur 1 Kb (ligne 9).

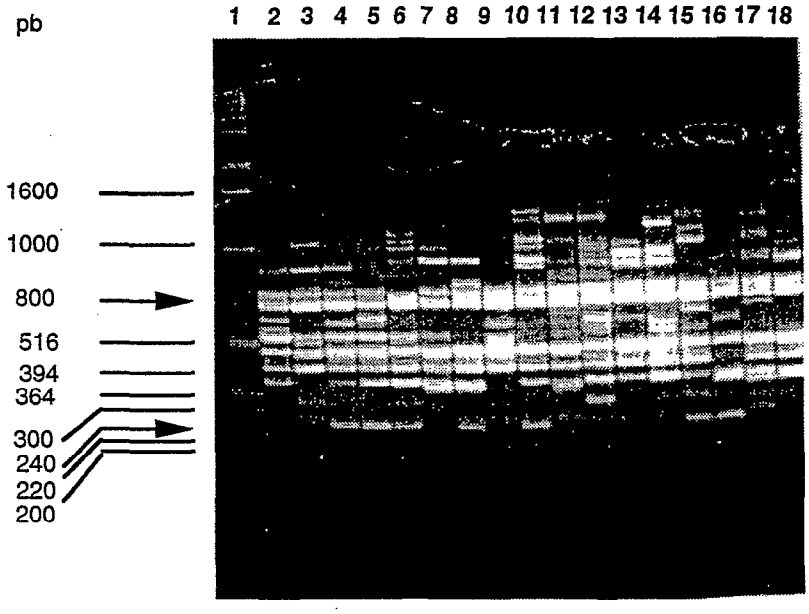


Fig 2: Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 2. Marqueur 1 Kb (ligne 1), descendance de V. vexillata TVNu 1503 (ligne 2 à 10), TVNu 1502 (ligne 11 à 16) et TVNu 1492 (lignes 17 et 18).

6.2.2. Descendance

Dans l'étude de la descendance des provenances TVNu 1503, 1502 et 1492, 13 bandes sont également retenues pour analyser la diversité (planche 6 figure 2). La descendance de chaque provenance présente une importante hétérogénéité. En effet, des bandes considérées comme caractéristiques de l'espèce disparaissent chez certains individus.

Il en est ainsi pour l'une ou les deux bandes de taille voisine de 240 pb, chez les individus 1, 2 et 6 de la provenance TVNu 1503, l'individu 1 de la provenance TVNu 1502 et les deux individus de la provenance TVNu 1492. De même, les 3 bandes caractéristiques des parents de TVNu 1502 (à environ 800 pb) ne sont visibles que chez les individus 1, 2, 6 et sont également retrouvées chez les individus 2 et 3 de la provenance TVNu 1503.

Cette amorce 2 semble donc intéressante pour caractériser les provenances, à condition que l'on puisse pratiquer l'analyse sur des lignées parentales bien identifiées.

6.3. Amplification avec l'amorce 3

L'amorce 3 (figure 15) a été appliquée sur les provenances TVNu 1503, TVNu 1498 TVNu 1492 de *Vigna vexillata* et une provenance de *Vigna unguiculata.*

Vingt et une bandes ont été retenues pour l'analyse de la diversité. Parmi celles-ci, 7 sont systématiquement retrouvées dans tous les profils de *V. vexillata* dont deux, situées aux environs de 600 pb, n'apparaissent qu'en alternance chez les 2 individus de *V. unguiculata* (la bande supérieure est visible pour l'individu 1 et la bande inférieure pour l'individu 2). Si ce résultat était confirmé sur plusieurs provenances de *V. unguiculata* (une seule était à notre disposition pour cette étude), ces 2 bandes, obtenues avec l'amorce 3, pourraient être considérées comme discriminantes pour les deux espèces et l'amorce pourrait être utilisée pour une étude de diversité interspécifique.

En ce qui concerne la diversité entre les provenances, les profils montrent que les 2 individus de la provenance 1498 se différencient des 4 individus des autres provenances, par la présence d'une bande supplémentaire située aux environs de 700 pb. De même, seuls les individus de la provenance TVNu 1492 présentent 3 bandes supplémentaires, toutes de taille supérieure à 1000 pb.

L'amorce 3 semble donc intéressante pour étudier la diversité interspécifique chez *Vigna* ainsi que pour caractériser les provenances chez *V. vexillata.*

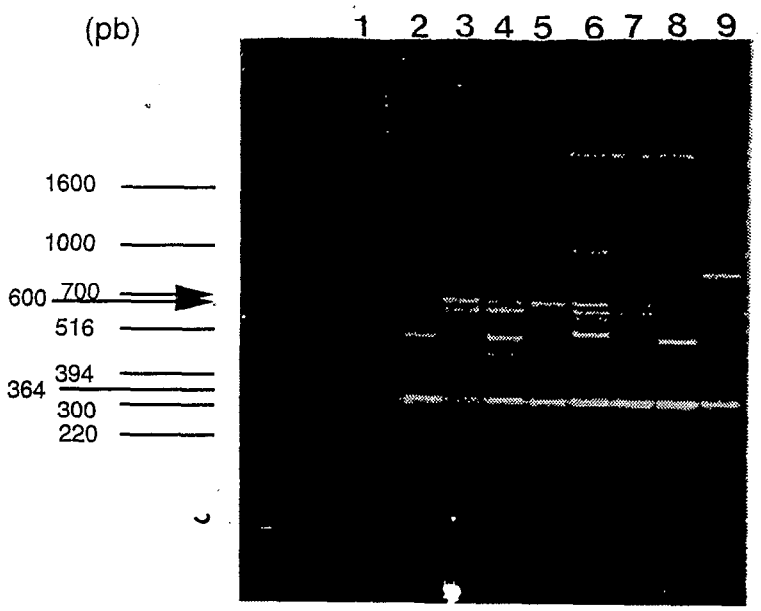


Figure 15. Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 3. Marqueur 1 Kb (ligne 1) lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1503 (lignes 2 et 3), TVNu 1498 (lignes 4 et 5), TVNu 1492 (lignes 6 et 7) et *V. unguiculata* (lignes 8 et 9).

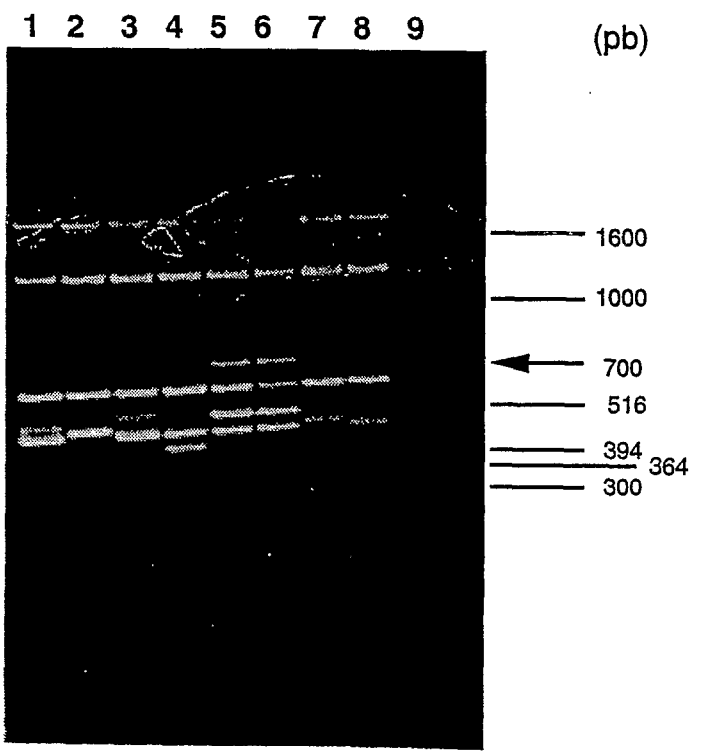


Figure 16. Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 4. Lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1503 (lignes 1 et 2), TVNu 1498 (lignes 3 et 4), TVNu 1492 (lignes 5 et 6) *V. unguiculata* (lignes 7 et 8) et le marqueur 1 Kb (ligne 9).

6.4. Amplification avec l'amorce 4

Les profils obtenus avec cette amorce pour les provenances TVNu 1503, 1498 et 1492 de *V. vexillata* et pour la provenance de *V. unguiculata* montrent 15 bandes différentes qui sont retenues pour l'analyse de la diversité (figure 16). Parmi elles, 7 sont communes aux provenances et au genre *Vigna* (présentes chez *V. unguiculata* et *V. vexillata*). Pour les 8 restantes, une seule bande d'une taille de 700 pb semble pouvoir caractériser la provenance TVNu 1492.

L'amorce 4 pourrait alors être utilisée pour différencier les provenances de *V. vexillata*.

6.5. Amplification avec l'amorce 5

Sur les 11 bandes retenues pour l'analyse, 4 sont communes à tous les individus (figure 17).

Les profils des provenances de *Vigna vexillata* sont pratiquement identiques sauf pour la provenance TVNu 1503 qui présente une bande supplémentaire d'une taille de 600 pb.

Une bande située aux environs de 300 pb n'apparaît pas dans les échantillons de *V. unguiculata* et pourrait être considérée comme discriminante de l'espèce (*V. vexillata*).

L'amorce 5 peut être considérée comme intéressante dans une étude de diversité interspécifique entre *Vigna vexillata* et *Vigna unguiculata* et "inter-provenance" chez *V. vexillata.*

6.6. Amplification avec l'amorce 6

Sur les 13 bandes retenues, 7 sont communes à tous les échantillons. Les profils montrent peu de variabilité entre les provenances de *Vigna vexillata* (figure 18), essentiellement marquée entre les échantillons d'une même provenance. L'échantillon de *Vigna unguiculata* se distingue des *V. vexillata* par l'absence d'une bande située aux environs de 600 pb.

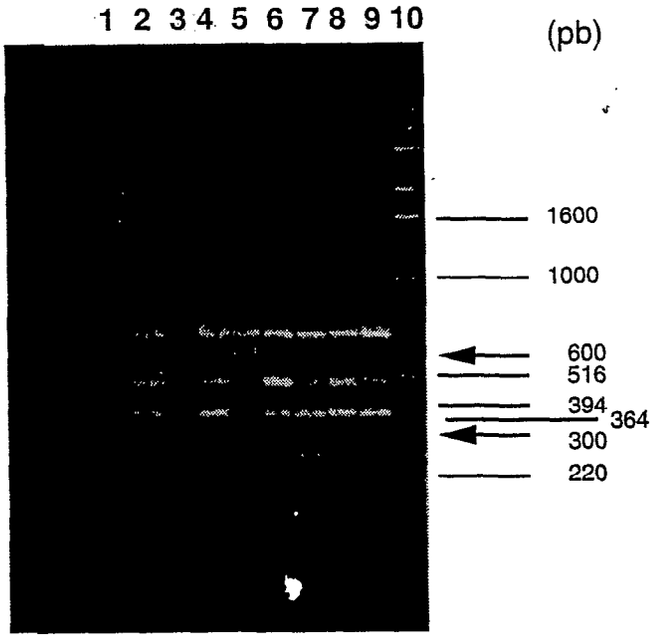


Figure 17. Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 5. Marqueur 1 Kb (ligne 1) lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1502 (lignes 2 et 3), TVNu 1503 (lignes 4 et 5), TVNu 1492 (lignes 6 et 7), *V. unguiculata* (lignes 8 et 9) et le marqueur 1Kb (ligne 10)..

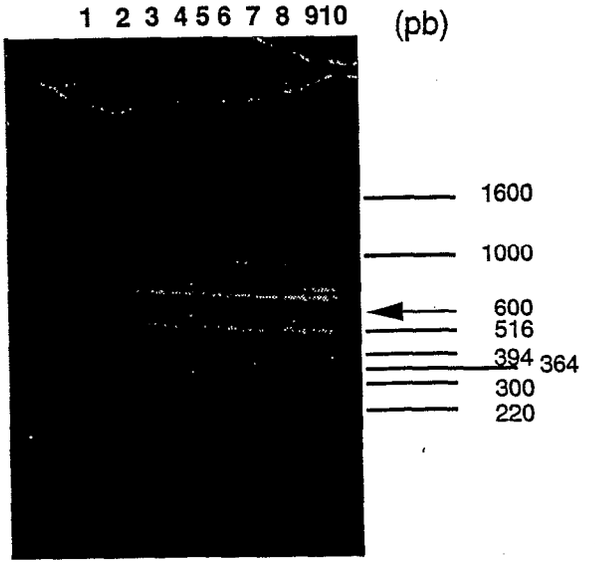


Figure 18. Profils électrophorétiques de RAPD par l'amorce 6. Marqueur 1 Kb (ligne 1) lignée parentale *V. vexillata* TVNu 1502 (lignes 2 et 3), TVNu 1503 (lignes 4 et 5), TVNu 1492 (lignes 6 et 7), *V. unguiculata* (lignes 8 et 9) et le marqueur 1 Kb (ligne 10).

6.7. Conclusion de l'analyse par RAPD

A partir des six amorces testées, ce sont les amorces 3, 5 et 6 qui pourraient contribuer à l'étude de la diversité génétique entre les deux espèces *V. unguiculata* et *V. vexillata*. Les amorces 2, 3, 4 et 5, pourraient servir à l'étude de la diversité inter provenances de *V. vexillata*.

Il faut noter que certaines amorces (3 et 5) peuvent être utilisées aussi bien dans la diversité inter-provenance que dans la diversité interspécifique.

L'utilisation d'un nombre plus important d'amorces devrait nous permettre d'approfondir l'étude en déterminant les marqueurs génétiques capables de détecter le polymorphisme aussi bien entre les deux espèces *V. vexillata* du *V. unguiculata* (diversité interspécifique) qu'au sein d'une même espèce. D'autant plus que peu de travaux utilisant les techniques d'électrophorèse ont été réalisés pour la distinction génotypique des espèces de Niébé (Oghiakhe, 1992).

Tableau 11. Principaux résultats issus de la RAPD.

Photo	Amorce	Nombre total des bandes	Nombre de bandes communes	Nombre de bandes discriminantes	Qualité
1 et 2	Amorce 1	11 bandes	11 bandes	0	Négatif
3 et 4	Amorce 2	13 bandes	8 bandes	3 pour TVNu 1502 (900 pb) 1 pour TVNu 1498 (900 pb) 2 pour TVNu 1503, 1492 (900 pb)	Positif pour la diversité génétique inter-provenance (lignée parentale)
5	Amorce 3	21 bandes	7 bandes : *5 communes à *V. vexillata* et *V. unguiculata* *2 en alternance chez *V. unguiculata*	1 pour TVNu 1498 (700pb) 3 pour TVNu 1492 (>1000 pb)	Positif pour la diversité génétique interspécifique et inter-provenance
6	Amorce 4	15 bandes	7 bandes	1 pour TVNu 1492 (700 pb)	Positif pour la diversité génétique inter-provenance
7	Amorce 5	11 bandes	4 bandes	1 pour TVNu 1503 (600 pb) 1 pour *V. vexillata* (300 pb)	Positif pour la diversité génétique interspécifique et inter-provenance
8	Amorce 6	13 bandes	7 bandes	1 pour *V. vexillata* (600 pb)	Positif pour la diversité génétique interspécifique

Chapitre 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les paramètres étudiés de la diversité morphologique de cinq provenances (TVNu 1503, 1498, 1502, 1506 et 1492) de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. pendant 18 jours après semis, associés à ceux de la composition chimique des tubercules ont permis de donner plus d'information descriptive sur l'espèce, de noter la grande variabilité morphologique (phénotypique) des provenances étudiées et de structurer en 6 groupes la population ciblée par l'étude de 25 individus.

A partir de six amorces choisies au hasard et testées par RAPD sur l'espèce *Vigna unguiculata* (L.) Walp et sur les 5 provenances de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., nous avons pu les classer selon le type de diversité génétique qu'elles définissent:

- Diversité entre les provenances (inter-provenance) par les amorces 2 et 4.
- Diversité entre les provenances et entre les espèces (interspécifique) par les amorces 3 et 5.
- Diversité interspécifique par l'amorce 6

Il faut noter que la technique RAPD ne manque pas de difficultés comme toute autre technique. Par exemple, la contamination par un ADN étranger conduit à son amplification en plusieurs copies, ce qui peut fausser l'analyse. D'autre part, la reproductibilité des résultats nécessite le respect des conditions de manipulation et une bonne stabilité des appareils. Les exemples d'application de la technique pour l'étude de la diversité génétique des espèces sont déjà très nombreux (Hu *et al.*, 1991; Kaemmer *et al.*, 1992; Yang et Quiros, 1993; Novy *et al.*, 1994).

Ces résultats morphologiques et génétiques obtenues ici, ouvrent des perspectives intéressantes en permettant d'aborder le même sujet, soit en approfondissant certaines observations soit en l'associant à d'autres axes de recherches.

➸ L'élargissement du nombre de provenances et d'individus étudiés de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., issus de milieux environnementaux variés, pourrait expliquer le comportement phénotypique de l'espèce et permettre de calculer la distance génétique intraspécifique de Nei (Nei, 1972).

➸ Le contrôle des conditions de semis, permettrait d'agir sur l'un ou l'autre des facteurs responsables de l'amélioration de certaines caractéristiques de *V. vexillata* telles que la production de graines et de tubercules de plus grande taille.

➸ L'évaluation des caractéristiques du système racinaire de *V. vexillata* sur la nodulation, constitue aussi un aspect mal connu qui mérite pourtant de retenir l'attention.

➵ L'approfondissement de l'analyse génotypique par RAPD, permettrait de mieux comprendre le type de relation génotypique qui existe entre *Vigna vexillata* (L.) A. Rich et les autres espèces tel que *Vigna unguiculata* (L.) Walp, ce qui à son tour, permettrait de déterminer des marqueurs génétiques spécifiques à chaque espèce.

➵ Les tests de transformation génétique appliqués sur *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., *Vigna unguiculata* (L.) Walp et éventuellement sur d'autres espèces, aboutiraient à l'acquisition de nouveaux caractères à affinité alimentaire (production de tubercules, taille des graines), phytopathologique (résistance à certaines pestes), pédologique (enrichissement du sol) et autres.

➵ Les analyses de la diversité génétique par RAPD des représentants du genre *Vigna*, associées aux résultats cytogéniques (Galasso *et al.*, 1993), biochimiques (Paine D'Urzo *et al.*, 1990), isozymiques (Sonnante *et al.*, 1996) et de la RFLP (Fatokun *et al.*, 1993) contribueraient à clarifier la taxonomie et la phylogénie du genre.

BIBLIOGRAPHIE

Adam, J. G. 1963. Herbier IFAN. Echantillon N° 019195.

Allen, O. N. & Allen, E. K.1981. The *Leguminosae*: a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press. Madison.

Anonymous 1979. Root Crops. *In* Tropical legumes : Resources for the future. Ouvrage collectif. National Academy of Sciences 1979. Washington, D. C. p34-37.

Barone, A., Del Giudice, A. & Ng, N. Q. 1992. Barriers to interspecifique hybridization between *Vigna unguiculata* and *Vigna vexillata*. *Sexual Plant Reproduction*. **5** : 195-200.

Bentham, G. & Hooker, J.D. 1865. Genera Plantarum. *In* The *leguminosae*, Allen & Allen (1981).

Berhaut, J 1976. Flore illustrée du Sénégal. Dicotylédones. Tome V. Légumineuses Papilionacées. Clairafrique, Dakar.

Bernatsky, R. & Tanksley, SD. 1986. Towards a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* **112**: 887-898.

Booker, R. H. 1965. Pests of cowpea and their control in Northern Nigeria. *In* The *leguminosae*, Allen & Allen(1981).

Carrier , L. 1923. The Beginnings of Agriculture in America. *In* The *leguminosae*, Allen & Allen (1981).

Chandel, K. P. S., Arora, R. K., & Joshi, B. S. 1972. *Vigna capensis* Walp. (*Vigna vexillata* (L.) A. Rich) - an edible root legume. *In* Inheritance of Selected Traits in Accessions of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich of Australian and African Origin, James & Lawn (1991).

Chessel, D. & Hanafi, M. 1996. Analyses de la co-inertie de K nuages de points. *Revue de Statistiques Appliquées* **44**: 35-60.

Côme, D. 1977. Les obstacles à la germination. Monographies de Physiologie Végétale, collection dirigée par le Professeur P. E. Pilet. pp 162.

Dardenne, G. A., Marlier, M. & Casimir, J. 1972. Un nouvel acide aminé dans les graines de *Vigna vexillata* . *Phytochemistry*, **11**: 2567-2570.

Fatokun, C. A., D. Danesh, N.D. Young & Stewart, E.L. 1993. Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* **86**: 97-104.

Fery, R. L. (1980). Genetics of *Vigna*. *In* Inheritance of Selected Traits in Accessions of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich of Australian and African Origin, James & Lawns (1990)

Galasso, I., Pignone, D. & Perrino, P. 1993. Cytotaxonomic studies in *Vigna*. II. Heterochromatin characterization in *Vigna unguiculata* and three related wild species. *Caryologia* 4: 275-282

Gillet, J. B. 1966. Notes on *Leguminosae* (*Phaseoleae*). *In* The *leguminosae*. Allen & Allen (1981)

Guèye, M. 1982. *Vigna unguiculata* (L.) Walp en symbiose avec *Rhizobium* et *Glomus mosseae*. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard - Lyon I.

Guidet, F. 1994. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research*, **22**. (9): 1772-1773.

Guikoune, J. M. ép. Diatta. 1992. Rayonnements ionisants pour la conservation des aliments au Sénégal testés sur *Vigna unguiculata* légumineuses "Niébé" et prospectives. Th. Pharm.: Dakar: 1990; 1.

Harms, H. (1911). Über einige Leguminosen des tropischen AfriKa mit essbaren Knollen. *In* The *leguminosae*, Allen & Allen (1981).

Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A. & Nienhuis, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment lenght polymorphisms. *Theror Appl Genet* **72**: 761-769.

Hu, J. & Quiros, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* **10**: 505-511.

Irvine, F. R. 1952. Supplementary and emergency food plants of West Africa. *In* Inheritance of Selected Traits in Accessions of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich of Australian and African Origin, James & Lawn (1991).

James, A. T. & Lawn, R. J. 1991. Inheritance of Selected Traits in Accessions of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich of Australian and African Origin. *Aust. J. Bot.* **39**: 415-429.

Kresovich, S., Williams, J.G.K., McFerson, J.M., Routman, E.J. & Schaal, B.A. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genetic.* **85**: 190-192.

Maréchal, R., Mascherpa, J.M. & Stainier, F. 1978. Etude taxonomique d'un groupe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (*Papilionaceae*) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *In* Some observations on seedlings of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich (*Fabaceae)*, Vanderborght, (1989)

Marta Evans, I.; Donald Boulter; Eaglesham, A.R.J. & Dart, P. J. 1977. Protein content and protein quality of tuberous roots of some legumes determined by chemical methods. *Qual. Plant. - Pl. Fds. Hum. Nutr. XXVII*, **3-4** : 275-285.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* **106**: 283-292.

Newbury, H. J. & Ford-Lloyd, B. V. 1992. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regulation* **12**: 43-51.

Neyra M. 1992. Utilisation des techniques de PCR-RFLP et RAPD pour les études d'inoculation des légumineuses. Symposium des MIRCENs Africains sur "La biotechnologie, une stratégie de développement pour l'Afrique". Dakar, Sénégal, 30 Novembre - 5 Décembre 1992.

Noba, K., 1990. Contribution à l'étude biosystématique de trois espèces du genre *Boerhavia* L. : *B. diffusa* L., *B. erecta* L. et *B. repens* L.. Thèse de doctorat de troisième cycle de Biologie Végétale. Faculté des Sciences, Université de Dakar.

Oghikhe, S., Cooke, R.J. & Jackai, L.E.N. 1992. The characterization of cultivars of Cowpeas, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Vigna vexillata* Benth. by electrophoresis of seed proteins. *Trop. Agric. (Trinidad)* **70**, 2.

Paino D'Urzo, M., Pedalino, M., Grillo, S., Rao, R. & Tucci, M. 1990. Variability in major seed proteins in different *Vigna* species. *In*: Cowpea Genetic Resources, Ng, N. Q. & Monti, L. M. (Eds), IITA, Ibadan, Nigeria. pp 90-100,.

Porhill, R. M. & Raven P. H., 1981. Advances in Legume Systematics part **1.**

Programmathèque ADE version 4, 1996. Analyses multivariées et expression graphique des données environnementales: Modules 1, 4, 5, 6; Fascicules 7 - Thioulouse J., Chessel D. & Dolédec S. Institut d'Analyse des Systèmes Biologiques et Socio-économiques. Université Claude Bernard, Lyon I.

Qhobela, M. 1996. Fingerprinting of Sorghum Disease Nursey Cultivars by Amplified Polymorphic DNA Markers. *In* Drough Tolerant crops for southern Africa: proceedings of the SADC/ICRISAT Regional Sorghum and Pearl Millet Workshop, (1994). pp 211-218

Qing-Ming Yi, Wu-Go Deng, Zong-Ping Xia & Han-Hua Pang 1995. Polymorphism and genetic relatedness among wild and cultivated rice species determined by AP-PCR analysis. *Hereditas* **122**: 135-141.

Sabatier, R. 1993. Critères et contraintes pour l'ordination simultanée de K tableau. *In* Biométrie et Environnement, Lebreton J.D. & Asselain B. eds. Masson Paris, 101-121.

Siddhuraju, P., Vijayakumari, K. & Janardhanan, K. 1994. Chemical analysis and nutritional assessment of the less known pulses, *Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal and *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. *Plant Foods for Human Nutrition* **45**: 103-111.

Stanton, W.R.; Doughty, J.; Orraca-Tetteh, R. & Steele. W. 1970. Les légumineuses à grains en Afrique. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Rome.

Taubert, P. 1894. *In* The *leguminosae*, Allen & Allen (1981).

Thioulouse, J. & Chessel, D. 1993. Les analyses multi-tableaux en écologie factorielle. I- De la typologie d'état à la typologie de fonctionnement par l'analyse triadique. *Acta Œcologica, Œcologia Generalis* **4**: 463-480.

Thioulouse, J. & Lobry, J.R. 1995. Co-inertia analysis of amino-acid physico-chemical properties and protein composition with ADE package. *Computer Applications in* The *Biosciences* **11**: 321-329.

Torre, F. & Chessel, D. 1994. Co-structure de deux tableaux totalement appariés. *Revue de Statistiques Appliquées* **43**: 109-121.

Vanderborght, T. 1989. Some observations on seedlings of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich (*Fabaceae*). *Bulletin Jardin Botanique National de Belgique,* **59**: 179-187.

Verdcourt, B. 1968. The identities of *Dolichos trilobus* L. and *Dolichos trilobatus* L.. Taxon **17**: 170-173. *In* The *leguminosae,* Allen & Allen (1981).

Verdcourt, B. 1969. New combinations in *Vigna* Savi. (*Leguminosae - Papilionoïdeae*). *In* The *leguminosae,* Allen & Allen (1981).

Verdcourt, B. 1970. Studies in the *Leguminosae - Papilionoideae* 'Flora of Tropical East Africa'. *In* The *leguminosae*, Allen & Allen (1981).

Wight, W. F. 1907. The history of cowpea and its introduction into America. *In* The *leguminosae,* Allen & Allen (1981).

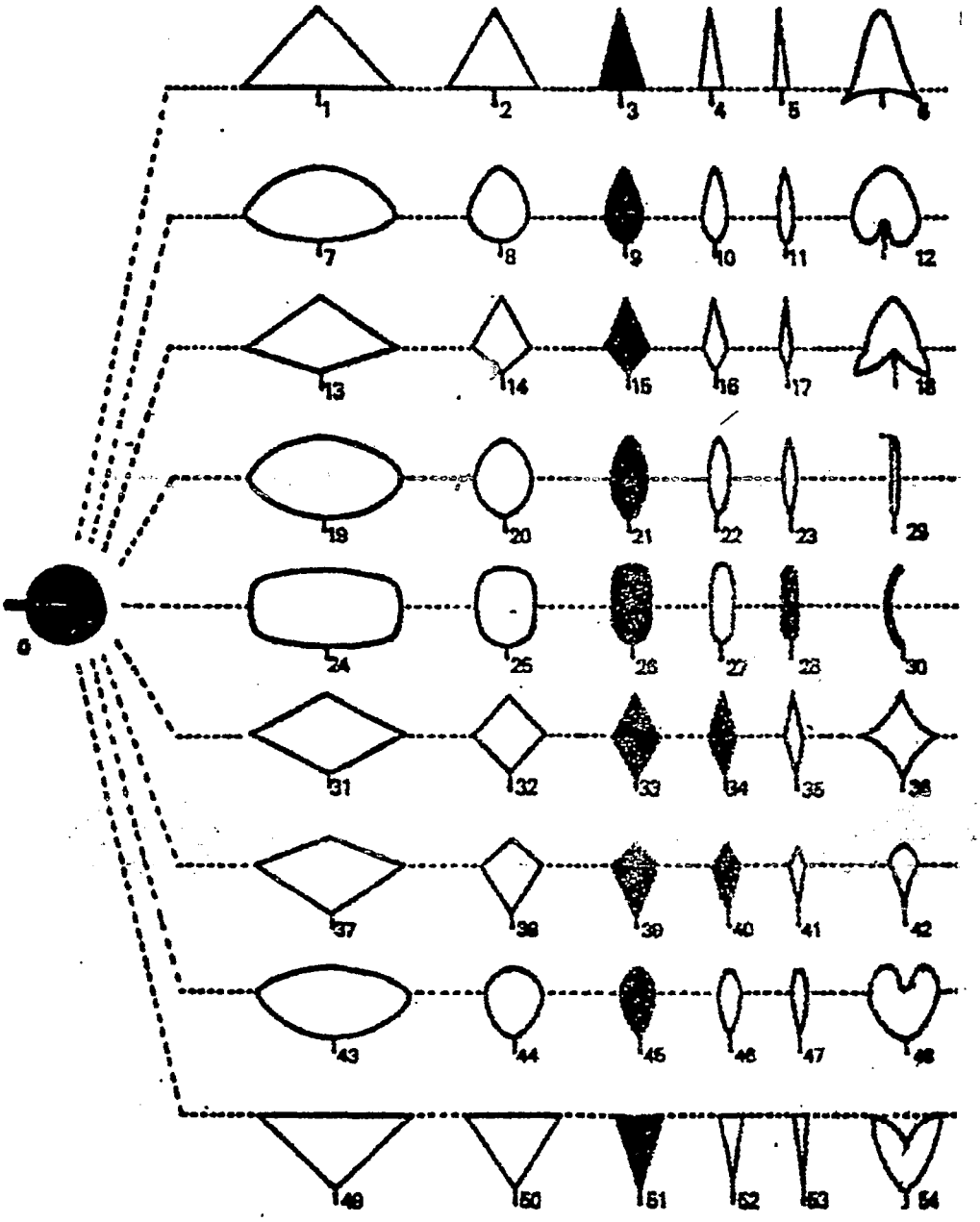
Williams, J. G. K., Kubelik, A. K., Livak, K. J., Rafalski. J. A. & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.

Yoccoz, N. G. 1993. Morphométrie et analyses multidimensionnelles. Une revue des méthodes séparant taille et forme. *In* Biométrie et Environnement, Lebreton J.D. & Asselain B. eds. Masson, Paris, 73-99.

ANNEXES

Annexe 1: Les différentes formes du limbe selon Merlier, H. et Montégut, J. (1982) cités par Noba, K. (1990).

Largeur/longueur: 2/1 1/1 1/2 1/5 1/10



Légende:

Série Triangulaire

1. Triangulaire; aplati
2. Triangulaire; large
3. Triangulaire (type)
4. Triangulaire; lancéolé
5. Triangulaire; linéaire
6. Hasté (forme dérivée)

Série Ovale

7. Ovale; aplani
8. Ovale; arrondi
9. Ovale (type)
10. Ovale; lancéolé
11. Ovale; linéaire
12. Cordiforme ((forme dérivée)

Série Ovale Losangique

13. Ovale losangique; aplani
14. Ovale losangique; large
15. Ovale losangique (type)
16. Ovale losangique; lancéolé
17. Ovale losangique; linéaire
18. Sagitté (forme dérivée)

Série Elliptique

19. Elliptique; aplani
20. Elliptique; arrondi
21. Elliptique (type)
22. Elliptique; lancéolé
23. Elliptique; linéaire (forme dérivée)

Série Oblongue

24. Oblong; aplani
25. Oblong; arrondi
26. Oblong; (type)
27. Oblong; lancéolé
28. Oblong; linéaire = linéaire (type
29. Filiforme (forme extrême)
30. En allène (forme dérivée)

Série Losangique

31. Losangique; aplani
32. Losangique; large
33. Losangique (type)
34. Losangique; lancéolé = lancéolé (type)
35. Lancéolé; linéaire
36. Forme dérivée ?

Série Obovale Losangique

37. Obovale losangique; aplani
38. Obovale losangique; large
39. Obovale (type)
40. Obovale; lancéolé = oblancéolé (type)
41. Oblancéolé; linéaire
42. Spatulé (forme dérivée)

Série Obovale

43. Obovale; aplani
44. Obovale; arrondi
45. Obovale (type)
46. Obovale; lancéolé
47. Obovale; linéaire
48. Obcordé (forme dérivée)

Série Obtriangulaire

49. Obtriangulaire; aplani
50. Obtriangulaire; large
51. Obtriangulaire (type)
52. Obtriangulaire; lancéolé
53. Obtriangulaire; linéaire
54. Obtriangulaire; bursiforme (forme dérivée)

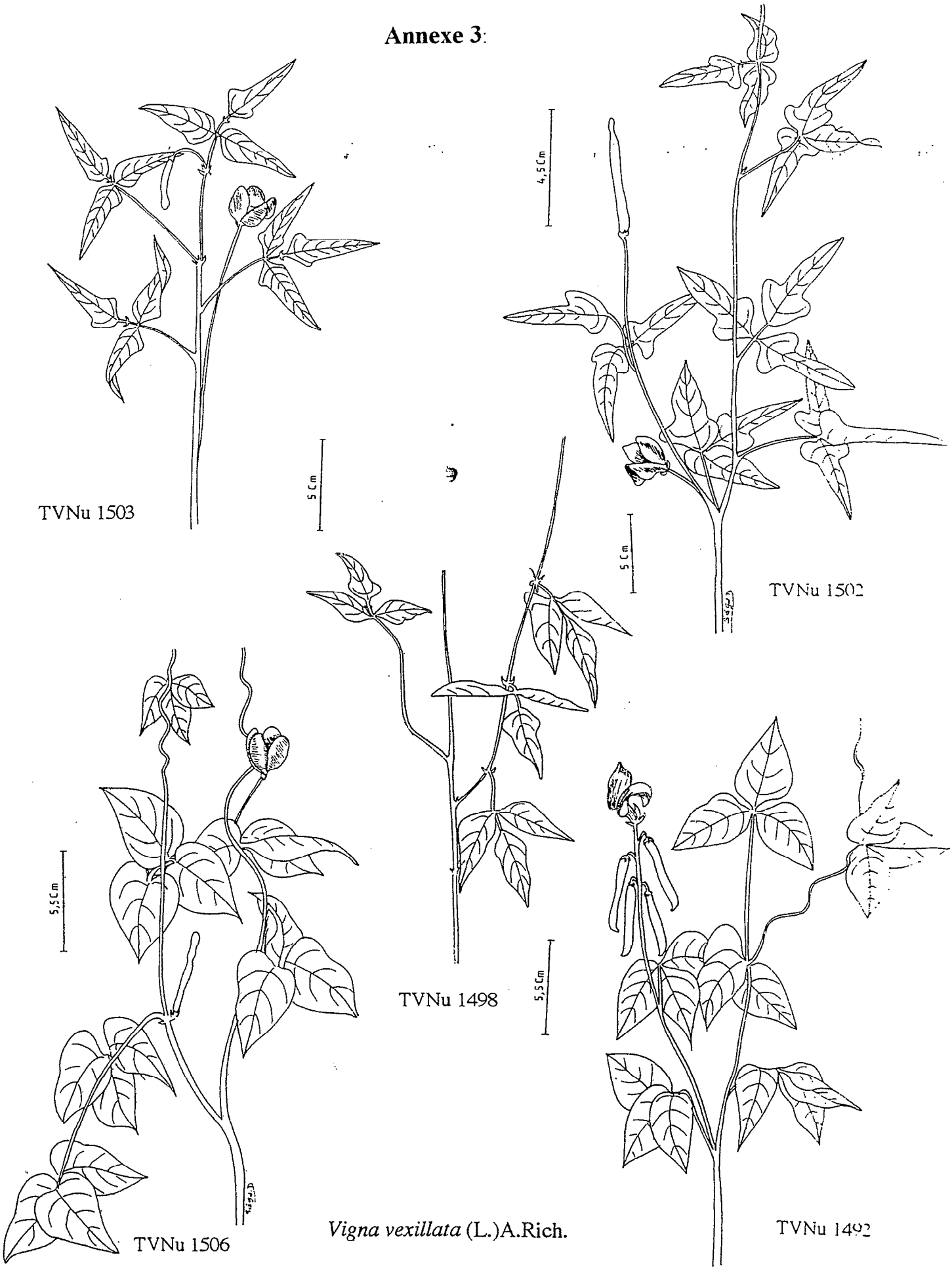
Aplani : rapport 2/1 Large ou arrondi : rapport peu différent de 1/1
Type : rapport ½ Lancéolé : rapport 1/5 Linéaire : rapport 1/10

Annexe 2: Tableaux de données n°11 sur la morphométrie et n°19 sur la récolte.

PLANT	OM2	AM2	OL2	AL2	OM3	AM3	OL3	AL3	OM4	AM4	OL4	AL4	OM5	AM5	OL5	AL5	HYP	EPI
1	4,5	1,6	4,6	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	2
2	2,8	1	2,8	1	4,6	1,6	4,6	1,6	8	2,3	6,4	2,2	5	2,8	4,5	2,8	1,5	3
3	2,3	0,9	2,3	0,9	1,7	0,6	1,7	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
4	5	2,5	5	2,5	3,5	1,5	3,5	1,5	4	2	4,1	1,75	3	2,4	3	2,1	1,5	5
5	4	2,5	4	2,5	4,2	1,5	3,85	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	4
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	5
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5,8
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,7	3,5
11	3,4	1,1	3,5	1,1	4,5	1,5	4,5	1,5	3,8	1,3	3,6	1,35	2,5	2	2,8	1,7	1	4
12	3,2	1,4	3,35	1,4	5	2,1	4,8	2,2	7,4	3	6,75	3	0	1,8	0	1,5	0	2,5
13	4	1,3	4,2	1,3	5,8	2,2	5,6	2,2	5,8	2	5,7	2,15	0	0	0	0	0,9	6
14	4,5	2	4,5	2	5	1,4	4,25	1,4	6,8	2,2	6	2,5	3,2	2	2,75	1,5	0,9	3
15	3,7	1,2	3,7	1,2	2	0,7	2	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
16	5	2,5	5	2,5	7,5	3	6,35	3,15	2,5	1	2,5	1	0	2	0	0	1,6	3
17	4,5	2	4,7	2	7,2	3,2	7	3,4	2,5	0	3	0	0	1,2	0	1	2	3
18	4,5	1,6	4,5	1,75	7,5	2,8	7	3	3,5	1,5	3,3	1,25	0	0	0	0	1,5	3
19	3,8	1,5	3,8	1,5	7	3	6,4	3,2	5	2,4	4,9	2,5	2,5	3,5	2,8	3,5	1,3	5
20	3,5	1,8	3,75	1,8	5,4	2,5	4,25	2,3	3,8	1	3,4	1,5	0	0	0	0	1,2	4,5
21	1,5	1	4,1	2	3,5	2	2,5	1,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5
23	4,3	2	3,9	1,7	3,5	1,5	3	1,35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,5
24	3,8	1,8	3,1	1,55	3,5	1,7	2,75	1,35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,5
25	3,4	1,4	2,95	1,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4

PLANT	NGS	OGS	AGS	NGR	OGR	AGR	EGR	PFT	HUM	PRO	LIP	CEN
1	7	4,61	0,33	19	0,49	0,29	0,22	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
2	4	5,63	0,37	14	0,57	0,32	0,27	16,49	53,2	4,66	3,0	2,10
3	3	3,87	0,30	7	0,41	0,25	0,18	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
4	2	4,75	0,42	5	0,53	0,33	0,25	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
5	3	6,43	0,40	12	0,57	0,31	0,26	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
6	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
7	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
8	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	9,11	63,3	4,60	2,2	0,00
9	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	13,76	59,4	5,71	0,7	3,49
10	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
11	1	9,40	0,60	11	0,55	0,31	0,26	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
12	1	5,40	0,35	4	0,49	0,26	0,19	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
13	3	6,77	0,40	16	0,53	0,29	0,24	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
14	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	25,62	55,1	2,31	1,7	2,72
15	2	6,15	0,42	12	0,54	0,31	0,24	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
16	16	7,89	0,34	185	0,41	0,27	0,22	7,32	61,0	5,08	2,1	3,12
17	22	7,98	0,33	233	0,42	0,30	0,23	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
18	5	6,58	0,35	38	0,41	0,27	0,21	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
19	14	7,95	0,35	139	0,46	0,30	0,25	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
20	6	8,75	0,37	79	0,44	0,29	0,23	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
21	18	3,04	0,34	101	0,44	0,27	0,21	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
22	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
23	11	3,06	0,32	55	0,44	0,28	0,21	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
24	10	2,93	0,31	46	0,42	0,27	0,21	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
25	9	2,69	0,33	40	0,46	0,30	0,23	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00

Annexe 3:



Vigna vexillata (L.)A.Rich.

Résumé

Titre: Contribution à la caractérisation de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. à l'aide de marqueurs morpho-physiologiques (Biométrie) et génétiques (RAPD).

Nom du candidat: Hassna Founoune

Nature du mémoire: D.E.A. de Biologie Végétale

L'étude morpho-physiologique et génétique de cinq provenances de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich.: TVNu 1503, 1498, 1502, 1506 et 1492 a fourni un ensemble d'informations se rapportant à: i) la morphologie descriptive, ii) la composition chimique des tubercules comestibles produits par la plante (teneur en eau, protéines, lipides, éléments minéraux et cellulose), iii) l'étude de la diversité génétique par la technique d'amplification aléatoire des fragments d'ADN (RAPD).

Les résultats chiffrés de l'étude morphologique et de la composition chimique des tubercules ont servi, dans le même temps, grâce aux techniques statistiques d'Analyse en Composantes Principales (ACP), à retenir 19 variables (parmi les 30 étudiées) pour la structuration de la population en 6 groupes d'individus. Avec l'amplification de l'ADN par RAPD, il a été possible de définir pour chacune des 6 amorces choisies, un niveau précis d'utilisation dans l'analyse de la diversité génétique chez *Vigna vexillata* (inter ou intra-spécifique). Ces résultats constituent un premier jalon dans la recherche de l'identification et de la caractérisation de marqueurs spécifiques susceptibles de discriminer et/ou de confirmer les relations génétiques entre les deux espèces *Vigna unguiculata* et *Vigna vexillata*.

Mots clés: *Vigna vexillata* (L.) A. Rich., marqueurs morpho-physiologiques, ACP, analyse de co-inertie, analyse RAPD.