



Analyse de la diversité génétique moléculaire de *Haematostaphis barteri* (Prune rouge) à l'aide des marqueurs RAPD

Bienvenue Nawan KUIGA SOUROU^{1*}, Kifouli ADEOTI², Gustave DJEDATIN³, Farid BABA- MOUSSA², Fatiou TOUKOUROU², Christine OUINSAVI¹

¹ Laboratoire d'Etudes et de Recherches Forestières (LERF), Faculté d'Agronomie, Université de Parakou, BP : 123 Parakou, Bénin

² Laboratoire de Microbiologie et des Technologies Alimentaires (LAMITA), Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, ISBA-Champ de Foire, Cotonou, Bénin

³ Faculté des Sciences et Techniques de Dassa, Université des Sciences, des Technologies, de l'Ingénierie et des Mathématiques de Abomey, BP : 2282 Abomey, Bénin

Reçu le 16 Février 2020 - Accepté le 20 Juin 2020

Analysis of genetic diversity in *Haematostaphis barteri* (Blood plum) in Benin using RAPD markers

Abstract: *Haematostaphis barteri* is a savannah species of tropical Africa that has multiple uses and plays an important socio-economic role for rural populations. It is a species from tropical Africa, ranging from Côte d'Ivoire to Sudan, passing through Ghana, Togo, Benin, Nigeria, Cameroon and Tchad. In Benin, It is a confined species along the Atacora chain in north-western and is one of the woody species facing a natural regeneration problem that could affect its genetic diversity. In this study, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular markers were used to determine the genetic structure of *Haematostaphis barteri* populations in Benin. The genetic diversity revealed from ten primers is relatively high ($h = 0.250$; $I = 0.390$; $H_T = 0.295$; $H_S = 0.245$). On the other hand, the coefficient of differentiation between subpopulations is low ($\Phi_{PT} = 0.17$; $P < 0.001$); which means that 17% of the total diversity is inter-subpopulations. The estimated gene flow is moderate ($N_m = 2,345$ migrants per generation), which implies relatively moderate seed and pollen exchange between subpopulations. In addition, three different genetic groups have been identified, with a marked differentiation of the accessions of the Boukombé group compared to the other two groups, which presupposes the existence of a genetic barrier, probably due to the Atacora chain, and a limitation in the exchange of pollen and seeds with other subpopulations. Rare alleles found in some accessions of the Boukombé genetic group could be used, if associated with interesting morphological and biochemical characters, in breeding and genetic improvement programs.

Keywords: *Haematostaphis barteri*, RAPD, genetic structure, genetic variability, subpopulations, Benin.

Résumé : *Haematostaphis barteri* est une espèce des savanes de l'Afrique tropicale qui fait objet d'usages multiples et qui joue un rôle socio-économique important pour les populations rurales. C'est une espèce d'Afrique tropicale, allant de la Côte d'Ivoire au Soudan, en passant par le Ghana, le Togo, le Bénin, le Nigéria, le Cameroun et le Tchad. Au Bénin, l'espèce est confinée le long de la chaîne de l'Atacora et fait partie des espèces ligneuses confrontées à un problème de régénération naturelle susceptible d'affecter sa diversité génétique. Dans la présente étude, des marqueurs moléculaires de type RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ont été utilisés pour déterminer la structure génétique des populations de *Haematostaphis barteri* qui existent au Bénin. La diversité génétique révélée à partir de dix amorces est relativement importante ($h = 0,250$; $H_T = 0,295$; $H_S = 0,245$). Par contre le coefficient de différenciation entre sous-populations est faible ($\Phi_{PT} = 0,17$) ; ce qui signifie que 17% de la diversité totale est inter sous-populations. Le flux de gènes estimé est modéré ($N_m = 2,345$ migrants par génération) indiquant un échange de graines et de pollens relativement modéré entre les sous-populations. En outre, trois différents groupes génétiques ont été obtenus avec une différenciation bien marquée des accessions du groupe de Boukombé par rapport aux deux autres groupes, indiquant l'existence d'une barrière génétique probablement due à la chaîne de l'Atacora et une limitation des échanges de graines et de pollens avec les autres sous-populations. Les allèles rares mis en

évidence au niveau de quelques accessions du groupe génétique de Boukombé pourraient être utilisés, s'ils sont associés à des caractères morphologiques et biochimiques intéressants, dans des programmes de sélection et d'amélioration génétique.

Mots clés: *Haematostaphis barteri*, RAPD, structure génétique, variabilité génétique, sous-populations, Bénin.

1. Introduction

Haematostaphis barteri Hook. F (Anacardiaceae), communément appelé prune rouge est l'un des fruitiers dioïques, spontanés, de l'Afrique tropicale dont l'aire de distribution s'étend de la Côte d'Ivoire au Soudan. Au Bénin, les populations de *Haematostaphis barteri* sont exclusivement présentes sur la chaîne de l'Atacora, au Nord-Ouest du département de l'Atacora, mais restent cantonnées dans trois communes frontalières, à savoir: Natitingou, Boukombé et Toucountouna (Sourou et al., 2016a ; Akoègninou et al., 2006).

Haematostaphis barteri Hook. F est une espèce alimentaire mineure qui joue un rôle socio-économique important pour les populations locales le long de la chaîne de l'Atacora au Nord-ouest Bénin, en raison de ses multiples fonctions (Sourou et al., 2016b). En effet, sur le plan nutritionnel, les fruits et les feuilles sont des sources de protéines, vitamines et d'oligoéléments (Eyog et al., 2002). La pulpe des fruits par exemple renferment les glucides (45,48%), les matières grasses brutes (17,76%), les protéines brutes (21,81%), les acides gras (14,21%), les fibres brutes (8,44%) et les éléments minéraux (2,97% ; Aremu et al., 2015). Les feuilles renferment une bonne proportion de fibre brute (33,04%), une proportion relativement moyenne en protéines (13,78 %), une quantité appréciable en hydrates de carbone, en lipide et en éléments minéraux. Les feuilles renferment tous les acides aminés en bonne proportion à l'exception de la cystéine et de la méthionine qui sont en faible proportion (Kubmarawa et al., 2009). Les graines fournissent une huile végétale comestible et riche en acides gras dont les plus abondants sont l'acide oléique (69,35%), l'acide stéarique (15,40%), l'acide éicosadiénoïque (6,92%), acide érucique (2,74%). Le taux d'insaturation de l'huile de *Haematostaphis barteri* est de 79,01% (Eromosele et Eromosele, 2002). Sur le plan médicinal, les racines, l'écorce et les feuilles de *Haematostaphis barteri* sont employés dans plusieurs pays dans le traitement de diverses maladies telles que la malaria (Asase et al., 2005), les trypanosomiasés et l'hépatite (Arbonnier, 2005), les enflures du corps (Ziblim et al., 2013).

En dépit de son importance, *Haematostaphis barteri* subit, à l'instar des autres espèces de la savane, de sérieuses menaces liées aux pressions anthropiques et aux aléas climatiques. Ceci se manifeste par le vieillissement de ses populations, caractérisées par une absence de régénération naturelle et une régression de l'effectif des individus (Medeton et al., 2017 ; Sourou et al., 2016a ; Agbogban et al., 2012 ; Arbonnier, 2002). Tout ceci, ajoutée à la forte clonalité de l'espèce (Medeton et al., 2017) pourrait affecter sa diversité génétique.

Cette situation préoccupante commande que des mesures visant à préserver l'espèce soient prises, et ceci est d'autant plus urgent que *Haematostaphis barteri* figure parmi les espèces dont la biologie et l'organisation génétique sont encore inconnues. La présente étude sur la diversité génétique moléculaire de *Haematostaphis barteri* répond à cette préoccupation. L'étude vise à obtenir des informations susceptibles de contribuer au développement d'actions de régénération, d'aménagement et d'utilisation durable de l'espèce. En effet, en plus des informations sur les aspects socio-économiques et ethnobotaniques, la structure, la variabilité morphologique, les études de diversité génétique sont d'une importance capitale car elles déterminent l'information de base requise pour l'amélioration génétique et la conservation des ressources génétiques d'une espèce.

Pour la caractérisation génétique moléculaire et la gestion des ressources génétiques, une gamme de marqueurs moléculaires basée sur l'ADN est de nos jours disponible. Au nombre de ces marqueurs d'ADN, il y a: les Polymorphismes Simples des Nucléotides (SNP), les Répétitions de Séquences Simples non codantes (SSR ou microsatellites), le Polymorphisme de Longueur des Fragments Amplifiés (AFLP), le Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP) et l'Amplification Aléatoire d'ADN Polymorphe (RAPD). La RAPD est basée sur la technique de PCR, réaction de polymérisation en chaîne, et consiste en une amplification de segments aléatoires d'ADN par des amorces de séquences nucléotidiques arbitraires (Williams et al., 1993). Cette méthode présente de nombreux avantages. Bowditch et al. (1993) notent qu'elle requiert une faible quantité d'ADN et ne nécessite aucune connaissance préalable sur le génome concerné. De plus c'est une technique simple, rapide et relativement peu coûteuse. Compte tenu des avantages qu'ils offrent, ces marqueurs ont été utilisés pour évaluer la diversité de nombreuses espèces dont *Populus tremuloides* Michx (Yeh et al., 1995), *Vitellaria*

* Auteur Correspondant : bienvuesourou@yahoo.fr;

Tél : +22997242352

Copyright © 2020 Université de Parakou, Bénin

paradoxa C.F. Gaertn (Fontaine *et al.*, 2004), *Ivingia gabonensis* (Aubry. Lec. ex O. Rorke) Bail (Lowe *et al.*, 2000), *Vanilla planifolia* Jacks (Besse *et al.*, 2004), *Astragalus microcephalus* Willd (Mehrnia *et al.*, 2005), *Milicia excelsa* (Welw) C. C. Berg (Ouinsavi et Sokpon, 2010), *Brassica oleracea* L. var (Zhang *et al.*, 2014), *Casia tora* (Tilwari *et al.*, 2016) et *Brassica oleracea* (Illahi *et al.*, 2018).

L'objectif de cette étude est d'évaluer la variabilité génétique moléculaire intra et inter sous-populations de *Haematostaphis barteri* au Bénin à l'aide des marqueurs RAPD.

2. Matériel et méthodes

2.1. Sites et collecte du matériel végétal

Les feuilles utilisées pour cette étude ont été collectées dans trois communes du département de l'Atacora sur un total de 108 arbres de *Haematostaphis barteri* échantillonnés au hasard à travers 15 sites (villages) couvrant les quatre sous-populations identifiées sur la base des variables dendrométriques et morphologiques par Sourou *et al.* (2016a) et représentant presque toute l'aire de distribution géographique de l'espèce au Bénin (Figure 1). Le nombre d'arbres échantillonnés par site a varié en fonction de la densité de l'espèce et à l'intérieur de chaque site, une distance d'au moins 100 mètres a été observée entre deux pieds pour éviter d'échantillonner les individus étroitement parentés ou génétiquement identiques (Bekessy *et al.*, 2002). Les coordonnées géographiques des sites et de chaque arbre échantillonné ont été enregistrées à l'aide du GPS (Global Positioning System) Garmin 60.

Sur chacun des arbres de *Haematostaphis barteri* échantillonnés, 5 folioles âgées et saines ont été directement prélevées au hasard puis séchées au silica gel contenu dans des sachets bien étiquetés avant leur utilisation pour l'extraction de l'ADN.

2.2. Extraction et quantification de l'ADN

Les ADN ont été extraits des feuilles séchées de *Haematostaphis barteri* à l'aide du tampon d'extraction au MATAB (Sajida *et al.* 2010). Par échantillon, 30 mg de feuilles séchées sont broyées dans 750 µl du tampon d'extraction au MATAB (1 M Tris-HCl pH 7,5 ; 5 M NaCl ; 0,5 M EDTA pH 8 ; 0,125% Sulfite de sodium ; 1% MATAB) à l'aide d'un mortier. Le broyat est transféré dans un microtube de 2 ml puis incubé dans un bain-marie à 65 °C pendant 2 heures après avoir été bien vortexé. Le broyat est homogénéisé par des retournements successifs des microtubes 3 fois au moins au cours de l'incubation. Après avoir laissé refroidi le broyat pendant 5 mn à la température ambiante, 750 µl de chloroforme iso-amyl (24:1) sont ajoutés, puis le mélange a été soumis au vortex et centrifugé à 14000 rpm pendant 20 mn à la température ambiante. Le

surnageant liquide est récupéré puis transféré dans un nouveau tube de 1,5 ml. L'ADN a été précipité en ajoutant au surnageant un volume équivalent d'isopropanol glacial. Le mélange est centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 mn et la phase liquide est délicatement jetée. Le culot d'ADN, obtenu au fond du tube est rincé deux fois avec 300 µl d'éthanol à 70% par centrifugation (13 300 rpm pendant 15 mn). Le culot d'ADN ainsi rincé, est séché à l'étuve à 37°C puis repris dans 100 µl d'eau distillée stérile et conservé à 4°C au réfrigérateur.

La concentration en ADN des différents échantillons a été directement déterminée au Nanodrop.

2.3. Amplification de l'ADN à l'aide des marqueurs RAPD

Sur un total de 40 amorces RAPD fournies par la firme Eurogentec (Technical Data Sheet, FRANCE, Montpellier 34090), et testées sur un échantillon de 12 individus de *Haematostaphis barteri* répartis dans les quatre sous-populations, seules 10 amorces ont permis de générer un très grand nombre de bandes polymorphes et ont été donc sélectionnées et utilisées pour l'amplification PCR dans cette étude.

L'amplification a été faite avec 30-60 ng d'ADN total et dans un volume réactionnel final de 25 µl contenant un tampon d'amplification associé au MgCl₂ d'une concentration de 5x, des amorces à une concentration de 100 µM, des dNTPs à 10 mM et 5U/µl de Taq DNA polymérase. Les amplifications PCR ont été réalisées avec le thermocycleur TECHNE, 3Prime et les conditions d'amplification sont les suivantes : une première dénaturation à 94 °C pendant 4 min suivie de 40 cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases : une dénaturation à 94 °C pendant 1 min, une phase d'hybridation à la température optimale déterminée entre 32-34 °C pendant 1 min selon l'amorce et une élongation à 72 °C pendant 1 min. Enfin, une dernière étape d'élongation à 72 °C pendant 10 min est programmée et une phase de refroidissement à 4 °C.

Les fragments amplifiés lors de la PCR sont séparés par migration sur des gels d'agarose à 2 % en présence d'un marqueur de poids moléculaire (1Kb DNA Ladder). La solution de préparation des gels est composée de 2 g d'agarose, 100 ml de tampon de Tris Acetate EDTA (TAE 0,5X) pH 8.0 à laquelle on ajoute 3 µl de Bromure d'Ethidium (BET).

L'amplification a été répétée au moins deux fois, et seules les bandes reproductibles et ayant montré des profils clairs ont été considérées dans cette étude.

Deux échantillons de la sous-population de Natitngou II dont les rendements d'ADN ont été assez faibles et n'ayant révélé aucune amplification à la PCR, ont été écartés après plusieurs tentatives infructueuses d'extraction d'ADN et de PCR.

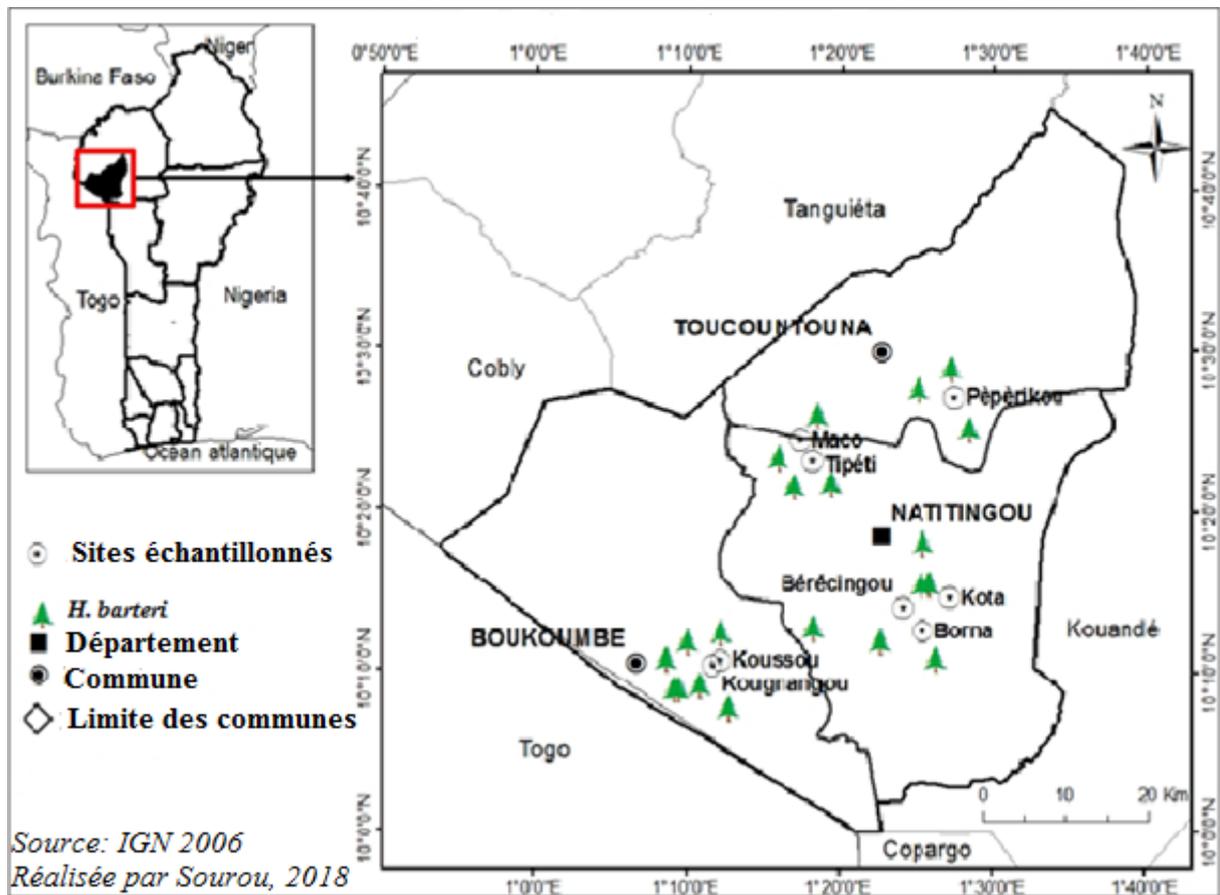


Figure 1: Répartition géographique des sites de collecte des feuilles de *Haematostaphis barteri*

Figure 1: Geographic distribution of *Haematostaphis barteri* leaves collection location

2.4 Méthodes statistiques et analyses moléculaires

Des bandes d'ADN amplifiées clairement identifiables et reproductibles ont été transformées en une matrice binaire codée comme suit : présent = 1; absent = 0

Pour décrire la diversité génétique moléculaire intra sous-populations, quatre paramètres ont été calculés. Ils ont été estimés pour chaque locus et la moyenne est prise sur tous les loci, à l'aide du logiciel GenAlEx, version 6.502 (Peakall et Smouse, 2012). Il s'agit : du pourcentage de polymorphisme (P), de la diversité génétique de Nei (h), de la fréquence d'allèles majeurs (FAM) et de la fréquence d'allèles privé (FAP ; Bączkiewicz *et al.*, 2012). Le taux de polymorphisme a été déterminé grâce à la formule suivante tirée de Kadri *et al.* (2006) :

$$P = \frac{(\text{Nombre de bandes polymorphes}) \times 100}{(\text{Nombre total de bandes étudiés})} \quad (1)$$

Une bande est dite polymorphe lorsqu'elle est présente chez certaines accessions et absente chez d'autres.

La différenciation génétique entre les sous-populations a été étudiée à l'aide des distances génétiques

impartiales de Nei (GD) et les statistiques de diversité de gènes de Nei comprenant la diversité génétique totale (H_T) et la diversité génétique à l'intérieur des populations (H_s) (Nei, 1978). Afin de déterminer le degré de différenciation génétique entre les sous-populations (Φ_{PT}), une analyse hiérarchique de variance moléculaire (AMOVA) a été effectuée à l'aide du logiciel GenAlEx 6.502 (Meirmans, 2006). Une estimation de flux de gènes (N_m) traduisant le nombre de migrants effectifs par génération d'une population à une autre a été aussi évaluée à travers la formule de Frankham *et al.* (2002) :

$$N_m = \frac{\left(\frac{1}{\Phi_{PT}}\right) - 1}{2} \quad (2)$$

La relation génétique entre sous-populations a été investiguée à travers une Analyse en Coordonnées Principales (ACoP) basée sur la distance génétique (Chakraborty et Jin, 1993), adéquate pour la comparaison de populations peu divergentes. Afin d'étudier plus en détail les relations génétiques entre les sous-populations de *Haematostaphis barteri*, une analyse bayésienne a été conduite en considérant séparément chacune des 4 sous-populations grâce au logiciel STRUCTURE

(Pritchard *et al.*, 2000). Pour cette analyse avec le logiciel STRUCTURE, le modèle avec « admixture » (le génotype d'un individu peut provenir de plusieurs populations) et l'option des fréquences alléliques indépendantes ont été choisis. Le nombre K de groupes a été varié de 1 à 8, en effectuant 10 simulations par valeur de K. Pour déterminer le nombre optimal K de groupes, la procédure définie par Evanno *et al.* (2005) a été utilisée. A terme, le logiciel STRUCTURE attribue à chaque individu sa probabilité d'appartenance à chaque population. On considère qu'une accession est assignée à un groupe quand sa probabilité d'appartenance à ce groupe est supérieure à 0,70 (Evanno *et al.*, 2005). Lorsque cette probabilité d'affectation est plus faible, les accessions sont considérées en « admixture » : le génotype provient alors de recombinaisons entre plusieurs groupes.

3. Résultats

3.1. Polymorphisme des marqueurs RAPD utilisés

Sur un total de 40 amorces RAPD testées sur un échantillon de 12 individus de *Haematostaphis barteri* répartis dans les quatre sous-populations, huit n'ont généré aucune amplification, quel que soit l'accession analysée et 20 amorces ont généré des amplifications variables avec seulement quelques-unes des accessions. Sur les 12 amorces ayant produit des bandes reproductibles et intenses, 10 ont permis de générer un très grand nombre de bandes polymorphes et ont été donc utilisées dans le reste de l'étude (Tableau 1).

Au total, 59 bandes ont été obtenues à partir des 10 amorces RAPD utilisées pour génotyper les 108 individus de *Haematostaphis barteri* échantillonnés. Le nombre de bandes varie de 2 (OPN-06) à 8 (OPF-08) avec une moyenne de 6 bandes par amorce (Tableau 1). Tous les marqueurs ont été polymorphes et le taux de

polymorphisme variant de 75% (OPF-08) à 100% (OPA-10, OPR-15), avec une moyenne de 94,83%. La figure 1 illustre bien quelques exemples de profils génomiques de 12 accessions sélectionnées au hasard dans les 4 sous-populations de *Haematostaphis barteri* et qui ont servi au screening des amorces RAPD.

3.2. Diversité génétique intra sous-population de *Haematostaphis barteri*

La fréquence d'allèles majeurs (FAM) varie de $0,818 \pm 0,017$ (sous-population de Natitingou II) à $0,831 \pm 0,017$ (sous-population de Natitingou I) avec une moyenne de $0,825 \pm 0,009$ et la fréquence des allèles privés (FAP) varie de 0 (sous-population de Natitingou I, Natitingou II) à $0,051 \pm 0,029$ (sous-population de Boukombé) avec une moyenne de $0,015 \pm 0,017$ (Sous-population Mixte ; Tableau 2).

La diversité génétique de Nei (h) varie de $0,238 \pm 0,024$ (sous-population de Boukombé) à $0,265 \pm 0,020$ (Sous-population Mixte) avec une moyenne de $0,250 \pm 0,011$. L'indice de Shannon (I) varie de $0,371 \pm 0,031$ (sous-population de Boukombé) à $0,413 \pm 0,027$ (sous-population Mixte) avec une moyenne de $0,390 \pm 0,014$.

L'estimation de la diversité génétique de Nei a révélé une diversité génétique totale de $H_T = 0,295 \pm 0,020$ et l'estimation de la variation génétique intra sous-population est de $H_S = 0,245 \pm 0,011$ (Tableau 3).

3.3. Différenciation génétique inter sous-populations de *Haematostaphis barteri*

La différenciation génétique entre sous-populations a été estimée à $\Phi_{PT} = 0,170$ (Tableau 3). Cela signifie que 17% de la variabilité génétique totale est inter sous-populations. Toutefois, lorsqu'on considère les paires de sous-populations, les valeurs les plus élevées du coefficient de différenciation ($\Phi_{PT} = 0,93$ et $\Phi_{PT} = 0,227$) ont été notées avec les paires de sous-populations de Boukombé (Tableau 4).

Tableau 1: Nombre de bandes et pourcentage de polymorphisme révélé par les marqueurs RAPD utilisés

Table 1: Number of bands and percent polymorphism revealed by RAPD primers

Nom des Amorces	Séquence Nucléotidique des amorces	Nombre total de Bandes	Nombre de bandes polymorphes	Pourcentage de Polymorphisme
OPA-10	GTG-ATC-GCA-G	5	5	100
OPE-18	GGA-CTG-CAG-A	6	6	100
OPF-08	GGG-ATA-TCG-G	8	6	75
OPG-14	GGA-TGA-GAC-C	5	5	100
OPI-06	AAG-GCG-GCA-G	6	6	100
OPL-01	GGC-ATG-ACC-T	5	4	80
OPL-12	GGG-CGG-TAC-T	7	7	100
OPN-06	GAG-ACG-CAC-A	2	2	100
OPO-07	CAG-CAC-TGA-C	7	7	100
OPR-15	GGA-CAA-CGA-G	7	7	100
	Moyenne	5,8	5,5	94,83

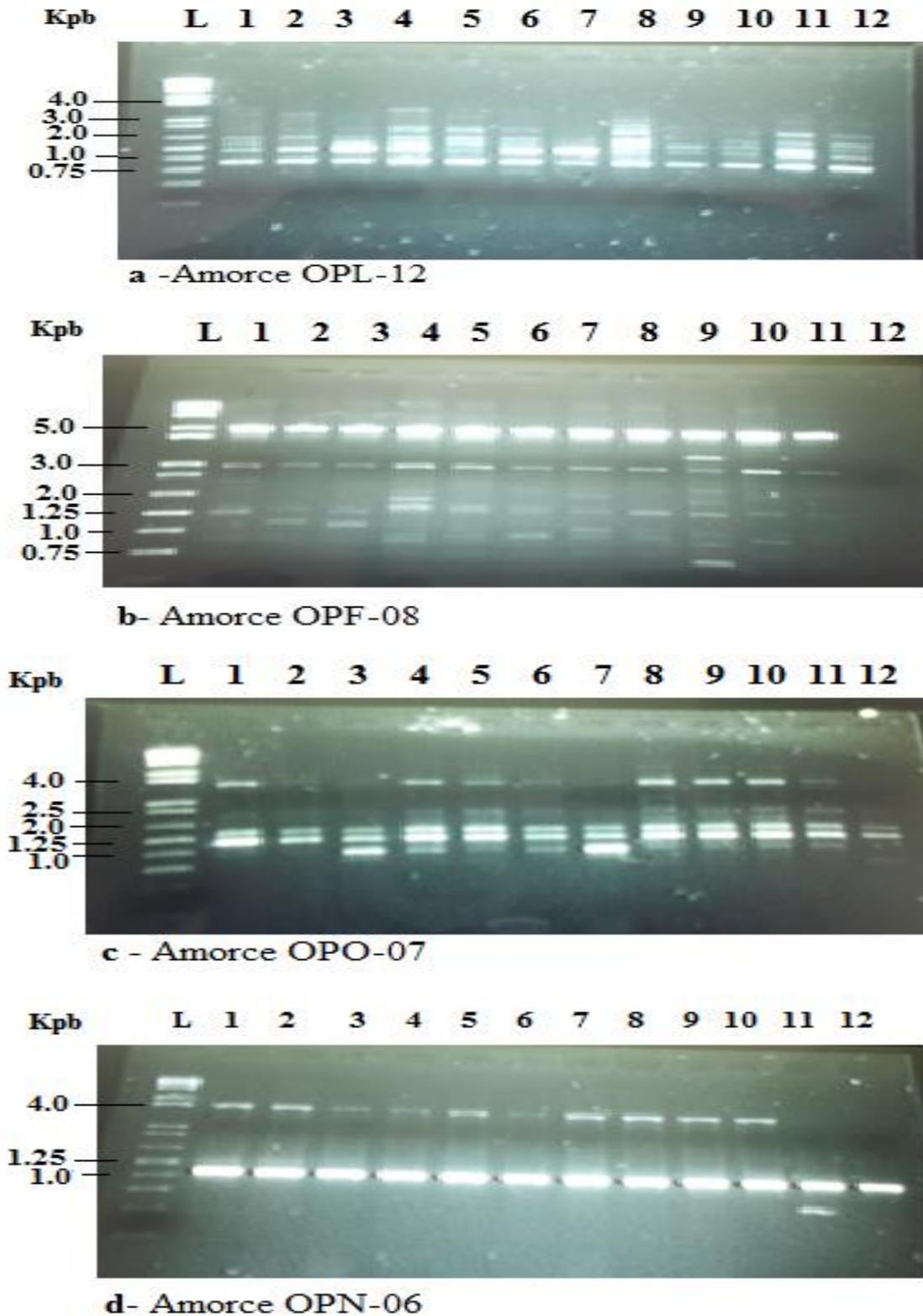


Figure 2 (a, b, c, d) : Exemple de polymorphisme d'ADN génomique de 12 individus des quatre sous-populations de *Haematostaphis barteri* détecté par des marqueurs RAPD (L : marqueur de poids moléculaire « Ladder », 1 à 12 : différents échantillons d'ADN utilisés).

Figure 2 (a, b, c, d): Genomic DNA amplification profile of 12 individuals from the four subpopulations of *Haematostaphis barteri* detected with RAPD markers (L = Molecular weight markers: 1 Kb DNA Ladder, 1 to 12 = different DNA samples).

Tableau 2: Résumé des Statistiques de la Diversité Génétique de quatre sous-populations de *Haematostaphis barteri*.

Table 2. Summary of genetic variation statistics in four *Haematostaphis barteri* subpopulations

Sous-populations	Nombre d'arbres	MAF (\pm SE)	PAF (\pm SE)	I (\pm SE)	h (\pm SE)
Natitingou I	23	0,831 (\pm 0,017)	0	0,383 (\pm 0,029)	0,246 (\pm 0,021)
Natitingou II	30	0,818 (\pm 0,017)	0	0,391 (\pm 0,028)	0,250 (\pm 0,021)
Mixte	23	0,829 (\pm 0,017)	0,017 (\pm 0,015)	0,413 (\pm 0,027)	0,265 (\pm 0,020)
Boukombé	32	0,824 (\pm 0,021)	0,051 (\pm 0,029)	0,371 (\pm 0,031)	0,238 (\pm 0,024)
Moyenne (\pm SE)		0,825 (\pm 0,009)	0,017 (\pm 0,012)	0,390 (\pm 0,014)	0,250 (\pm 0,011)

h= diversité génétique de Nei, J= Indice de Shannon, PAF= Fréquence d'allèles privés, MAF= Fréquence d'allèles majeurs, SE= erreur type

h = Nei's genetic diversity, I = Shannon index, MAF = Major Allele Frequency, PAF = Private Allele Frequency, SE = Standard Error

Tableau 3: Statistiques de la diversité génétique de Nei (1973) et différenciation génétique inter sous-populations via AMOVA.

Table 3. Statistics of the genetic diversity of Nei (1973) and genetic differentiation between subpopulations via AMOVA

Paramètres	Données haplotypes			
	H _T	H _S	Φ_{PT}	N _m
Différenciation génétique inter populations via AMOVA	0,295 \pm 0,020	0,245 \pm 0,011	0,170***	2,435

H_T= Diversité génétique totale ; H_S= Diversité génétique intra sous-populations ; Φ_{PT} = Coefficient de différenciation entre populations ; N_m= Flux de gènes ; *** = significatif au seuil de 0,1%

H_T = Total genetic diversity, H_S = Genetic diversity within subpopulations; Φ_{PT} = Genetic differentiation among subpopulations; N_m = Estimate of gene flow; *** = Significant distinction at the level of 0.1%.

Tableau 4: Coefficient de différenciation et flux de gènes entre les sous-populations de *Haematostaphis barteri*.

Table 4. Coefficient of genetic differentiation and gene flow between subpopulations of *Haematostaphis barteri*

Sous-populations (Φ_{PT} - N _m)	Natitingou I	Sous-population Mixte	Natitingou II	Boukombé
Natitingou I	****	4,148	2,681	1,207
Sous-population Mixte	0,108	****	8,288	1,701
Natitingou II	0,157	0,057	****	3,313
Boukombé	0,293	0,227	0,131	****

Φ_{PT} = Coefficient de différenciation entre populations (en dessous de la diagonale) ; N_m= Flux de gènes (au-dessus de la diagonale) ; **** = diagonale séparant les valeurs de Φ_{PT} et de N_m.

Φ_{PT} = Coefficient of differentiation between populations (below the diagonal) ; N_m = Gene flow (above the diagonal) ; **** = Diagonal separating Φ_{PT} and N_m values.

Tableau 5: Distances génétiques impartiales et les identités génétiques de Néi entre les sous-populations de *Haematostaphis barteri*.

Table 5: Nei's genetic identity and Genetic distance among subpopulations of *Haematostaphis barteri*

Sous-populations (GD-GID)	Natitingou I	Natitingou II	Sous-population Mixte	Boukombé
Natitingou I	****	0,923	0,941	0,851
Natitingou II	0,080	****	0,965	0,939
Sous-population Mixte	0,060	0,036	****	0,886
Boukombé	0,162	0,063	0,121	****

GD=Distances génétiques impartiales de Néi (en dessous de la diagonale) ; GID= Identités génétiques de Néi (en dessus de la diagonale) ; **** = diagonale séparant les valeurs de Φ_{PT} et de N_m

GD = genetic distance (below diagonal); GID = Néi's genetic diversity (above diagonal); **** = Diagonal separating Φ_{PT} and N_m values.

Le flux de gène estimé à partir de Φ_{PT} (Hartl, 2000 ; Frankham *et al.* 2002) est égale à $N_m = 2,435$, ce qui montre qu'environ 3 migrants passent d'une sous-population à l'autre au cours d'une génération (Tableau 4). Cependant, lorsqu'on considère les paires de sous-populations, les valeurs les plus faibles du nombre de migrants par génération ($N_m = 1,207$ et $N_m = 1,701$) ont été notées avec les paires de sous-population de Boukombé (Tableau 4). La distance génétique (GD) déterminée par paire de sous-populations a variée de 0,036 à 0,162 (Tableau 5). Les plus grandes distances génétiques ont été notées au niveau des paires de sous-population de Boukombé : GD = 0,162 pour la paire sous-population de Boukombé - sous-population de Natitingou I et GD = 0,121 pour la paire sous-population de Boukombé - Sous-population Mixte. Par contre, la plus faible distance génétique a été observée entre la Sous-population Mixte et celle de Natitingou II (GD = 0,036 ; Tableau 5).

3.4. Structure génétique de *Haematostaphis barteri*

L'analyse en Coordonnées Principales (PCoA) réalisée à partir des distances génétiques entre les paires d'individus de l'ensemble des 04 sous-populations explique, sur les 2 premiers axes, 38,50% de la variance totale. On distingue 03 groupes génétiques nettement constitués et un ensemble d'individus intermédiaires répartis en 02 autres groupes GI 1 et GI 2 ; Figure 3). L'axe 1 sépare nettement le groupe 1 des groupes 2 et 3, et l'axe 2 sépare nettement le groupe 3 du groupe 1. Le même axe (axe 2) sépare également le groupe intermédiaire 1 du groupe intermédiaire 2. Le groupe génétique 2 peut être divisé en deux sous-groupes dont l'un est négativement corrélé avec l'axe 1 et, l'autre positivement corrélé avec l'axe 2.

La procédure d'Evanno (2005), qui permet d'évaluer le nombre probable K de groupes en se basant sur le ΔK , montre que la structure génétique la plus représentative est obtenue pour $K=2$ ($\Delta K=87$), $K=2$ ($\Delta K=370$), $K=3$ ($\Delta K=85$) et $K=3$ ($\Delta K=203,33$) respectivement pour les Sous-population Mixte, Natitingou II, Natitingou I et Boukombé (Tableau 6). En considérant l'ensemble des sous-populations comme une seule population, le nombre de groupes $K=3$ a été choisi comme définissant le mieux la structure génétique de *Haematostaphis barteri*, sur la base du paramètre ΔK d'Evanno.

Avec ce modèle, les groupes obtenus sont les suivants (Figure 4)

- le groupe 1 « en rouge » (52 accessions), est principalement composé de la quasi-totalité (87%) des accessions de la sous-population de Natitingou II, de la moitié des accessions de la sous-population de Natitingou I, de la moitié des accessions de la Sous-population Mixte et de quelques accessions (15%) de la sous-population de Boukombé.

- Le groupe 2 « en vert » (15 accessions), rassemble environ le quart des accessions de la Sous-population Mixte et quelques accessions provenant des trois autres sous-populations (9% des accessions de la Sous-population de Natitingou I et de celle de la Sous-population de Boukombé et 13% des accessions de la Sous-population de Natitingou II).

- Le groupe 3 « en bleu » (23 accessions), est constitué exclusivement des accessions des sous-populations de Boukombé (57%) et de celles de la sous-population de Natitingou I (43,5%).

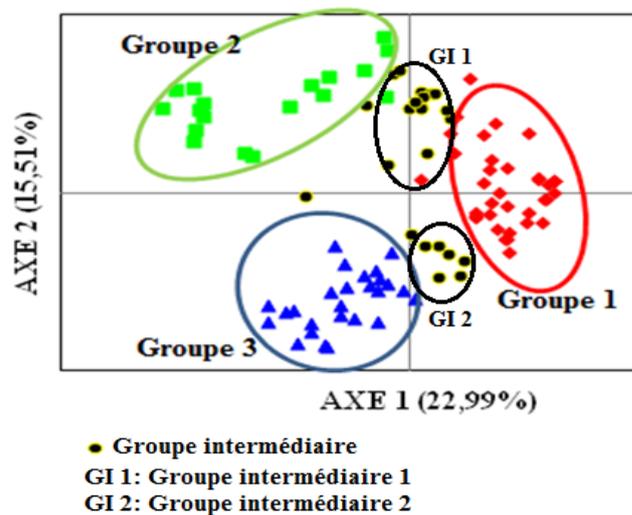


Figure 3: Représentation graphique de la structure génétique de *Haematostaphis barteri* sur les axes 1 et 2 de l'Analyse en Coordonnées Principales.

Figure 3: Graphical representation of the genetic structure of *Haematostaphis barteri* on axes 1 and 2 of the Principal Coordinate Analysis.

Au total, 90 accessions sur 108 sont clairement assignées, affectées à des groupes (probabilité d'assignation supérieure à 0,70). Les 18 accessions restantes sont en « admixture », c'est-à-dire dont le génotype provient de la recombinaison entre les 3 groupes génétiques clairement constitués. On note 34% d'accessions en « admixture » (11/32) pour la sous-population de Boukombé, 26% d'accessions en « admixture » (06/23) pour la population Mixte, 04% d'accessions en « admixture » (01/23) pour la sous-population de Natitingou I et 00% d'accessions en « admixture » (0/30) pour la sous-population de Natitingou II. Le groupe intermédiaire 1 est essentiellement composé des individus intermédiaires, génétiquement plus proches des groupes 1 et 2 que du groupe 3, alors que le groupe intermédiaire 2 est principalement composé des individus intermédiaires génétiquement plus proches des groupes 1 et 3 que du groupe 2.

Tableau 6: Evolution du nombre K de groupes en fonction de delta K.

Table 6. Evolution of the number K of groups according to delta K.

K	Reps	Delta K			
		Sous-population Natitingou I	Sous-population Natitingou II	Sous-population Mixte	Sous-population Boukombé
1	10	—	—	—	—
2	10	8,579896	369,717128	86,870285	0,957309
3	10	85,061509	171,1631	2,605585	203,333816
4	10	64,227671	8,717255	7,660238	58,603729
5	10	1,909251	0,315674	0,525729	0,631278
6	10	3,339149	0,431156	2,771314	0,335034
7	10	0,341137	0,059145	0,258789	0,801624
8	10	—	—	—	—

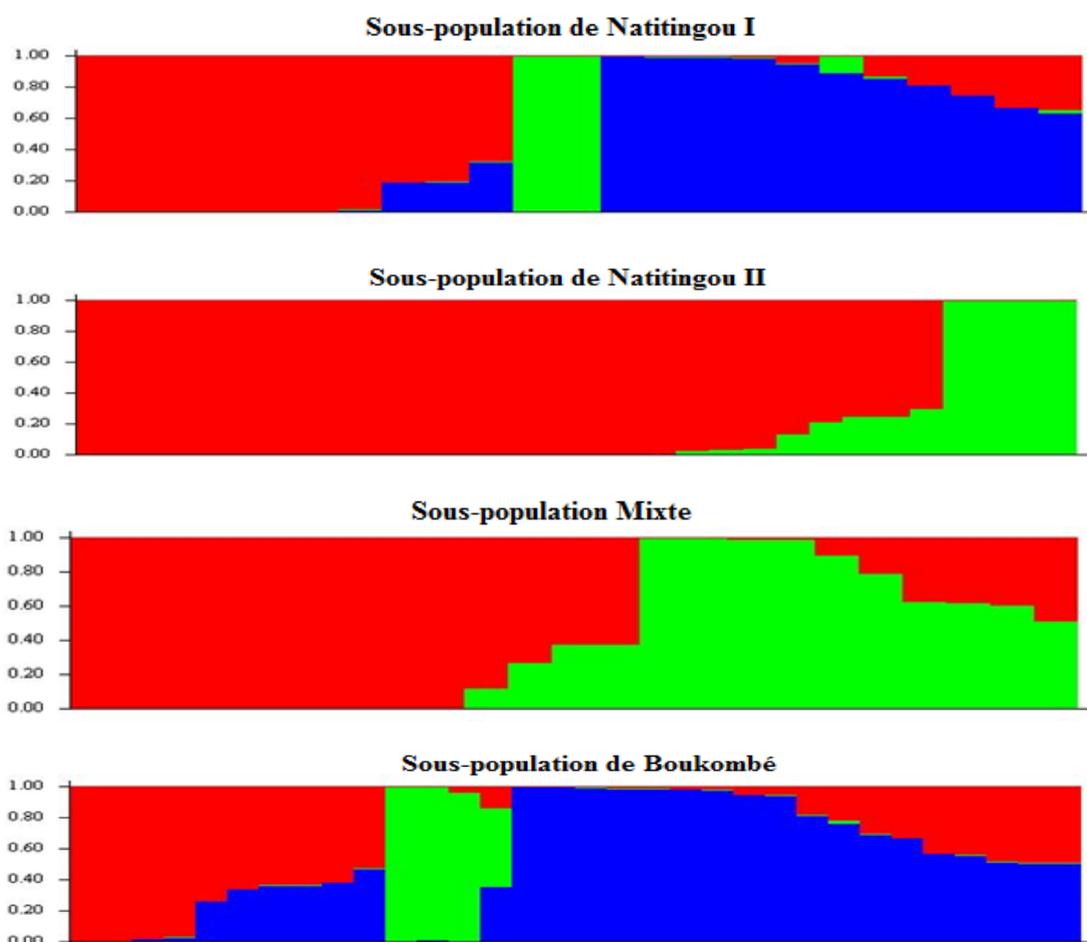


Figure 4: Structure génétique de *Haematostaphis barteri* obtenue sur la base de l'analyse bayésienne avec le logiciel STRUCTURE (Chaque accession est représentée par une ligne verticale segmentée en 3 parties colorées. Une partie correspond à un groupe d'appartenance déterminé rouge = groupe 1, vert = groupe 2 et bleu = groupe 3 ; les accessions dont les probabilités d'appartenance sont inférieures à 0,70 ne sont pas assignées à un groupe).

Figure 4: Genetic structure of *Haematostaphis barteri* obtained on the basis of Bayesian analysis with STRUCTURE software. (Each accession is represented by a vertical line segmented into 3 colored parts. A part corresponds to a given group of membership red = group 1, green = group 2 and blue = group 3; accessions whose probabilities of belonging are less than 0.70 are not assigned to a group).

Les 3 groupes génétiques ne correspondent pas exactement aux 4 morphogroupes (sous-populations) de départ. Cependant, le groupe 3 coïncide bien avec le morphogroupe de Boukombé.

Par ailleurs, les paires du groupe génétique 3 (Tableau 7), ont montré les fortes valeurs de Φ_{PT} et les faibles valeurs de N_m .

4. Discussion

Les marqueurs dominants ont fait l'objet d'une large utilisation pour des études de variabilité génétique et d'identification de variétés de plusieurs espèces (Aga *et al.*, 2005). Cependant, ils manquent de précision et de reproductibilité. Dans cette étude, la reproductibilité à été assurée par la répétition des amplifications d'au moins deux fois, et seules les bandes reproductibles et ayant montré des profils clairs ont été sélectionnées pour les analyses. Au total, 59 bandes reproductibles

dont 56 bandes polymorphes ont été obtenues soit 94,83% de polymorphisme à partir de 10 amorces RAPD sélectionnées. Ce résultat traduit l'efficacité des marqueurs RAPD utilisés pour l'étude de la diversité génétique des sous-populations de *Haematostaphis barteri*. Sur un total de 26 amorces testées, 10 (soit 38,46%) se sont révélées exploitables. Le pourcentage d'amorces utiles engendrant des profils interprétables pour l'analyse de la diversité génétique semble être dépendant de l'espèce, de l'adaptabilité des amorces à l'espèce étudiée et des conditions expérimentales. En effet, des pourcentages variés ont été obtenus par différents auteurs sur d'autres espèces forestières tropicales mais avec des amorces différentes: 66% d'amorces chez *Prunus africana* (Dawson et Powell, 1999), 50% chez *Ivringia gabonensis* (Lowe *et al.*, 2000), 35% chez *Vitellaria paradoxa* (Fontaine *et al.*, 2004) et 28% chez *Gliricidia sepium* (Dawson *et al.*, 1995) générant un polymorphisme interprétable.

Tableau 7 : Coefficient de différenciation et flux de gènes entre les trois groupes génétiques de *Haematostaphis barteri*

Table 7: Coefficient of differentiation and gene flow between the three genetic groups of *Haematostaphis barteri*

Groupes génétiques (Φ_{PT} , N_m)	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3 (sous-population Boukombé)
Groupe 1	****	1,150	0,962
Groupe 2	0,465	****	0,360
Groupe 3 (sous-population Boukombé)	0,509	0,735	****

Φ_{PT} = Coefficient de différenciation entre populations (en dessous de la diagonale) ; N_m = Flux de gènes (en dessus de la diagonale) ; **** = diagonale séparant les valeurs de Φ_{PT} et de N_m

Φ_{PT} = Genetic differentiation among genetics groups (above diagonal); N_m = Estimate of gene flow (below diagonal); **** = Diagonal separating Φ_{PT} and N_m values

Sur la base de ces marqueurs RAPD, la diversité génétique de *Haematostaphis barteri* ($h = 0,250$) est relativement importante. Ce résultat est en contradiction avec le mode de reproduction clonal préférentiel de l'espèce. En effet, l'inventaire des jeunes plants effectué par Medeton et al (2017) a révélé que *Haematostaphis barteri* est une espèce clonale dont 56 % environ de la régénération était issue de souche, 44 % issue de racines et 0 % de brin franc de pied durant toute la période d'inventaire. Cette clonalité préférentielle de l'espèce devrait induire une faible diversité génétique au sein des populations et entre les populations (Medeton et al., 2017).

Cette relative importante diversité génétique de *Haematostaphis barteri* en dépit de son mode de reproduction clonal, pourrait être expliquée par le mode de reproduction allogame noté également chez *Haematostaphis barteri*. En général, les espèces allogames présentent une plus grande diversité génétique que les espèces autogames, résultat prédit par la théorie neutre de l'évolution sur la base du fait qu'un individu allogame (et diploïde) peut stocker à chaque locus deux allèles de

deux parents différents, tandis qu'un individu issu d'une autofécondation peut hériter facilement deux copies d'un même allèle du même parent (David *et al.*, 2006). En d'autres termes, c'est la taille du réservoir utilisé pour stocker l'information allélique qui apparaît déterminante pour expliquer le niveau de diversité d'une espèce. Cela laisse penser donc que les sous-populations de *Haematostaphis barteri*, bien qu'ayant une aire de répartition réduite au Bénin, ont atteint une taille génétique efficace. La valeur de la diversité génétique intra-sous-population ($H_s = 0,245$) de *Haematostaphis barteri* obtenue est relativement importante et reste bien comprise dans les limites (0,103 et 0,266) attendues pour les plantes allogames (Hamrick et Godt, 1997). Cependant, elle est plus importante que celle rapportée sur les populations de *Milicia excelsa* au Bénin (0,168), en Côte d'Ivoire (0,054) et au Sierra Leone (0,122) (Ouinsavi, 2006 ; Khamuja *et al.*, 2005). Mais, elle est plus faible que celle notée sur les populations d'iroko des forêts humides et sèches du Ghana (0,405) (Khamuja *et al.*, 2005). Ce résultat relativement important de la diversité génétique intra sous-populations

pourrait être lié à la migration non moins importante notée entre les paires de sous-populations de l'espèce ($N_m > 2$ migrants par génération). En effet, la migration augmente le niveau de diversité génétique au niveau intra-population en apportant de nouveaux allèles qui peuvent contribuer à augmenter le taux d'hétérozygotes dès la génération suivante (Mush et Valadon, 2004 ; Office National des Forêts, 2004). La diversité génétique totale (H_T) de *Haematostaphis barteri* est relativement importante. Elle est largement supérieure à celle rapportée pour les plantes ayant un mécanisme de pollinisation entomophile (0,167-0,182) et les espèces d'arbres tropicaux à faible aire de répartition géographique (0,150 ; Hamrick & Godt, 1989 ; Loveless & Hamrick, 1984).

Le coefficient de différenciation entre sous-populations de *Haematostaphis barteri* est faible ($\Phi_{PT} = 0,17$), indiquant que 17% de la diversité génétique totale est inter sous-populations. En considérant les caractéristiques bioécologiques de l'espèce (espèce tropicale, aire de répartition réduite, allogamie, pollinisation entomophile), on s'attend à ce qu'elle présente un coefficient de différenciation plus élevé que celui obtenu. En effet, Hamrick et al (1992) ont montré que pour un même niveau de diversité total, les espèces ligneuses endémiques présentent une différenciation plus de 4 fois supérieure à celle des espèces à aire de répartition plus large. Toutefois, les mêmes auteurs précisent que les caractéristiques bioécologiques des arbres n'expliquent qu'en partie la différenciation entre populations. La valeur relativement faible du coefficient de différenciation pourrait s'expliquer par le fait que les 4 sous-populations de *Haematostaphis barteri* seraient relativement proches génétiquement, probablement en raison de la forte clonalité de l'espèce (Medeton et al., 2017). Cette explication est soutenue par le flux de gènes entre sous-populations relativement modérée, allant de 2 à 8 migrants par génération. En effet, contrairement au niveau intra-population, la migration limitée, au niveau inter-population, la divergence génétique entre populations et s'oppose à l'adaptation locale et à la dérive génétique par l'apport d'allèles nouveaux (Mush et Valadon, 2004). Par ailleurs, lorsqu'on considère les paires de sous-populations, les valeurs les plus élevées du coefficient de différenciation et les plus faibles valeurs du nombre de migrants par génération ont été notées avec les paires de sous-populations de Boukombé. Ce résultat permet de penser à une différenciation relativement bien marquée de la sous-population de Boukombé par rapport aux autres sous-populations.

L'analyse en coordonnées principales et l'analyse bayésienne ont réparti les accessions des 4 sous-populations de *Haematostaphis barteri* en 3 groupes génétiques distincts, dont deux groupes hétérogènes, constitués d'un mélange d'accessions provenant de chacune des quatre sous-populations et un groupe plus

homogène constitué presque exclusivement des accessions de la sous-population de Boukombé. Ce résultat vient renforcer l'idée de la relative différenciation de la sous-population de Boukombé par rapport aux autres. Cette explication est d'ailleurs soutenue par une fréquence d'allèles privés non nulle au niveau de quelques individus du groupe de Boukombé. Ce qui suggérerait l'existence d'une barrière génétique déterminée probablement par la chaîne de l'Atacora, limitant la dispersion des grains de pollens et des graines entre le groupe génétique de Boukombé et les autres groupes. Des résultats similaires, mettant en jeu des barrières génétiques dans la structuration des populations d'iroko au Bénin, ont été obtenus par Ouinsavi (2006).

5. Conclusion

L'étude de la diversité génétique de *Haematostaphis barteri* a une diversité génétique intra sous-population relativement importante. De même, la valeur du coefficient de différenciation entre les sous-populations est relativement faible, et le flux de gènes estimé est relativement modéré, indiquant un échange modéré de pollens et de graines entre les sous-populations. En outre, trois différents groupes génétiques semblent se distinguer, dont le groupe génétique 3, composé exclusivement des individus de la sous-population de Boukombé. Ce résultat suggère donc que les caractéristiques morphologiques que présentent les arbres de la sous-population de Boukombé ont beaucoup plus un fondement génétique que les autres sous-populations. De plus, il a été noté une différenciation plus ou moins marquée des accessions du groupe de Boukombé par rapport à celles des deux autres groupes génétiques, ce qui suppose l'existence d'une barrière génétique probablement due à la chaîne de l'Atacora et limitant les échanges de pollens et de graines avec les autres sous-populations. La mise en évidence d'allèles privés au niveau de quelques accessions du groupe génétique de Boukombé pourrait servir, s'ils sont associés à des caractères morphologiques et biochimiques intéressants, à la création de programmes de sélection et d'amélioration génétique.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements et nos hommages vont au regretté professeur Nestor SOKPON qui nous a inspiré et aidé à rédiger le protocole de ce travail de recherche avant son décès. Il nous a également mis en partenariat avec le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du professeur Ambaliou SANNI et le laboratoire de microbiologie et technologie alimentaire du professeur Fatiou TOUKOUROU, où les analyses génétiques ont été effectuées.

CONFLIT D'INTERET

Les auteurs n'ont déclaré aucun conflit d'intérêt.

REFERENCES

- Aga E., Bekele E., Bryngelsson T. 2005. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea Arabica* L.) populations from Ethiopia, *Genetica* 124, 213-221.
- Agbogon A., Tozo K., Wala K., Batawila K., Dourma M. et Akpagana K. 2012. Abondance et structure des populations d'un fruitier spontané : *Haemostaphis barteri* Hook. F. dans deux sites rocheux en région soudanienne au Togo. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 6(6): 604-6048. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v6i6.31>.
- Akoègninou A., Adjakidje V., Essou J. P., Sinsin B., Yedomonhan H., Van Der Brug W.J., et al. 2006. Flore analytique du Bénin. Backhuys Publishers : Cotonou & Wageningen, 1034 p.
- Arbonnier M. 2002. Arbres arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. CIRAD-MNHN, 2è ed., 573 p.
- Aremu O.M., Oko J.O., Ibrahim H., Basu K.S., Andrew C., Ortutu S. C. 2015. Compositional evaluation of pulp and seed of Blood Plum (*Haemostaphis barteri*), a wild tree found in Taraba State, Nigeria. *Advances in Life Science and Technology*, 33:9-17. ISSN 2224-7181 (Paper) ISSN 2225-062X Bączkiewicz A. 2012. Genetic diversity of leafy liverwort species (Jungermanniidae, Marchantiophyta) in Poland: Regional genetic differentiation of leafy liverworts. *Biodiv. Res. Conserv.* 27: 55-76, 2012. DOI 10.2478/v10119-012-0023-4
- Asase A., Oteng-yeboah A., Odamttan T., Simmonds M. 2005. Ethnobotanical study of some Ghanaian anti-malarial plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(2): 273-279. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.020>.
- Bączkiewicz A. 2012. Genetic diversity of leafy liverwort species (Jungermanniidae, Marchantiophyta) in Poland: Regional genetic differentiation of leafy liverworts. *Biodiv. Res. Conserv.* 27: 55-76, 2012. DOI 10.2478/v10119-012-0023-4
- Bekessy S. A., Allnutt T. R., Premoli A. C., Lara A., Ennos R. A., Burgman M. A., Cortes M and Newton A. C. 2002. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity*, 88 : 243-249. DOI: 10.1038/sj/hdy/6800033.
- Besse P., Da Silva D., Bory S., Grisoni M., Le Bellec F., Duval M. F. 2004. RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationship with *V. tahitensis* and *V. ponpona*, *Plant Science* 167: 379-385.
- Bowditch B. M., Albright D. G., Williams J. G. K. & Braun M. J. 1993. Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers in Comparative Genome Studies. *Methods in Enzymology* 224: 294-309.
- Chakraborty R., Jin L. 1993. A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances: 153-175. In: Chakraborty R., Epplen T., Jeffreys A. J. (éds.), *DNA fingerprinting: State of the Science*, Birkhäuser Verlag, Basel.
- David J., Loudet O., Glaszmann J. C. 2006. Le regard de la génomique sur la diversité naturelle des plantes cultivées : contribution Dossier BIOFUTUR n°266 « Génome et diversité chez les plantes cultivées ». pp. 22-27.
- Dawson K. I, Simons J. A, Waugh R, Powell W. 1995. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. *Heredity*, 74: 10-18; DOI:10.1038/hdy.1995.2
- Dawson K. I, Powell W. 1999. Genetic variation in the Afromontane tree *Prunus africana*, an endangered medicinal species. *Molecular Ecology*, 8(1): 151-156. doi: 10.1046/j.1365-294X.1999.00518.x
- Eromosele C.O., Eromosele I.C. 2002. Fatty acid compositions of seed oils of *Haemostaphis barteri* and *Ximenia americana*. *Bioresource Technology*, 82(3): 303-304. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00179-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00179-1).
- Eyog Matig, Gaoué O.G., Dossou B. 2002. Réseau «Espèces Ligneuses Alimentaires». Compte rendu de la première réunion du Réseau tenue 11-13 décembre 2000 au CNSF Ouagadougou, Burkina Faso 241: Institut International des Ressources Phytogénétiques.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14 (8) : 2611-2620.
- Frankham, R, Ballou D. J and Briscoe A. D. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press: Cambridge.

- Fontaine C, Lovett P. N, Sanou H, Maley J and Bouvet J. M. 2004. Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity* 93: 639–648. doi:10.1038/sj.hdy.6800591
- Hamrick J. I., Godt J. W. 1997. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Sci.* 37:26–3
- Hamrick K. J. L.), Godt M. J., Sherman-Broy S. L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6: 95-124.
- Hamrick K. J. L., Godt M. J. 1989. Allozyme diversity in plant species: 43-63. In: Plant population Press, Sunderland, Massachusetts.
- Illahi A., Mardatillah I., Nasri P. E., Mansyurdin D. I. R. 2018. Genetic Variation in Local Cultivar of Singgalang Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) Using RAPD Marker. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 6(8): 579-584
- Kadri K., Snoussi., M'barek B. et Abdallah B. A. 2006. Application de marqueurs moléculaires pour l'analyse de la diversité génétique chez l'amandier (*Prunus dulcis* Mill.). *Cahiers Agricultures* 15(2) :195-202
- Khanuja S. P. S., Shasany A. K., Pawar A., Lal R. K., Darokar M. P., Naqvi A. A. et al. 2005. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon Spreng* (Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 171–186
- Kubmarawa D., Adnenyang I.F.H., Magomy A.M. 2009. Proximate composition and amino acid profile of two non-conventional leafy vegetables (*Hibiscus cannabinus* and *Haematostaphis barteri*). *African Journal of Food Science*, 3(9): 233-236. DOI: <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Loveless M. D. and Hamrick J. L. 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95 DOI: 10.1146/annurev.es.15.110184.000433
- Lowe A. J., Gillies A. C. M., Wilson J., Dawson I. K. 2000. Conservation genetic of bush mango from central/west Africa: Implication from random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology* 9, 831-841.
- Medeton B., Biaou S. S. H., Ewedje E, Natta A. K. 2017. Potentiel semencier et contraintes à la régénération par graines de *Haematostaphis barteri*, espèce fruitière autochtone au Nord-Ouest Bénin. *Ann. UP, Série Sci. Nat. Agron.* 7(1) : 98-103.
- Mehrnia M., Zarre S., Sokhan-Sanj A. 2005. Intra-and inter-specific relationship within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. *Biochemistry Systematic and Ecology* 33: 149-158.
- Meirmans, P. G. 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 60, 2399-2402.
- Mush B., Valadon A. 2004. A propos de génétique des populations : contribution de Rendez Vous Techniques de l'Office National des Forêts, hors-série n°1 « Diversité génétique des arbres forestiers ». pp. 6 – 15.
- Nei M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70(12): 3321-3323
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Center for Demographic and Population Genetics*, 89: 583-590
- Office National des Forêts. Direction technique. 2004. Diversité génétique des arbres forestiers : un enjeu de gestion ordinaire. Rendez-vous technique de l'ONF, hors-série n°1. 130p
- Ouinsavi C.A. N. 2006. Gestion durable des populations reliques d'Iroko au Bénin : Caractérisation structurale, variabilité morphologique et génétique, et stratégies de conservation. Thèse de Doctorat (PhD), Aménagement et Gestion des Ressources Naturelles (AGRN), Faculté des Sciences Agronomiques (FSA), Université d'Abomey-Calavi (UAC), 152p.
- Ouinsavi C. and Sokpon N. 2010. Spatial structure of genetic variation of *Milicia excelsa* population in Benin revealed by random amplified polymorphic DNA markers. *Annales de l'Université de Parakou, Série: Sciences Naturelles et agronomie*: 1-19.
- Peakall, R and Smouse, P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2) : 945-959.
- Sajida B, Mohmummad U. D, Ghulam S. N, Imtiaz A. K, Mazher H. N, Fateh C. O, Umeed A. B. 2010. Molecular marker assisted selection for drought tolerant wheat genotypes. *Pak. J. Bot.*, 42(4): 2443-2452.

- Sourou B.N, Ouinsavi C.A.I.N. and Sokpon N. 2016a. Ecological Structure and Fruit Production of Blood Plum (*Haematostaphis barteri* Hook. F) Subpopulations in Benin. *International Journal of Plant & Soil Science* **9**(2): 1-12. DOI: 10.9734/IJPSS/2016/22059.
- Sourou B.N., Yabi J., Ouinsavi C.I.A.N. et Sokpon N. 2016b. Importance socio-économique de la prune rouge (*Haematostaphis barteri* Hook F.) au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 10(1): 326-343
- Tilwari A, Chauhan D, Sharma R, Sigh R. 2016. Assessment of genetic variations among medicinal plant *Casia tora* from different geographic regions of central India using RAPD marker. *Med. Aromat.Plant*, 5(6):2-7. doi: 10.4172/2167-0412.1000276
- Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A. & Tingey S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 18: 704-740.
- Yeh F. C., Chong D. K. X., Yang R. C. 1995. RAPD variation within and among natural populations of Trembling Aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *Heredity* 86(6):454-460.
- Zhang J, Zhang L G. 2014. Evaluation of genetic diversity in Chinese kale (*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* Bailey) using RAPD amplified polymorphic DNA and sequence-related amplified polymorphism markers. *Gen Mol Res.* 13(2):3567-3576.
- Ziblim A.I., Timothy A.K., Deo-Anyi J.E. 2013. Exploitation and use of medicinal plants, Northern Region, Ghana. *Journal of Medicinal Plants Research.* **7**(27): 1984-1993. DOI: 10.5897/JMPR12.489.