

Evaluation de la diversité moléculaire de quelques descendance hybrides F1 NJM x GVT de cocotier (*Cocos nucifera* L) en Côte d'Ivoire à l'aide de marqueurs microsatellites

[Assessment of molecular diversity of some F1 NJM x GVT hybrid progenies of coconut palm (*Cocos nucifera* L) in Côte d'Ivoire using SSR markers]

Koffi Eric-Blanchard Zadjéhi¹, Thiémélé Deless Edmond Fulgence¹, Daramcoum Wentoin Alimata Marie Pierre¹, Yao Saraka Didier Martial¹, Konan Konan Jean-Louis², Sié Raoul Sylvère³, and Diarrassouba Nafan¹

¹Université Peleforo Gon Coulibaly, UFR Sciences Biologiques, Département de Biochimie-Génétique, Unité Pédagogique et de Recherche (UPR) de Génétique, BP 1328 Korhogo, Côte d'Ivoire

²CNRA, Station Marc Delorme de Port-Bouët, 07 BP 13 Abidjan 07, Côte d'Ivoire

³Université Nangui-Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

Copyright © 2022 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the *Creative Commons Attribution License*, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: This study was conducted to assess the molecular diversity of eight NJM x GVT coconut palm (*Cocos nucifera* L) hybrid progenies and a BP121⁺ hybrid control using 15 microsatellite loci. The NJM x GVT hybrids are tolerant to the *Lethal yellowing* coconut disease when the control is very susceptible to the disease. As a result of this work, 86 alleles were identified at the 15 microsatellite loci with a variation of 2 to 11 alleles per locus. The intra-progeny diversity ($H_s = 0.50$) is higher than the inter-progeny diversity ($D_{ST} = 0.04$). The allelic richness of the progeny ranges from 2.07 to 3.13. The NJM x GVT progenies are molecularly different from the control PB121⁺. In sum, 63.95% of the alleles present in the NJM x GVT progenies are absent in the BP121⁺ control. Furthermore, 8.14% of the alleles present in the control are absent in the NJM x GVT hybrids. Collecting samples for further work such as QTLs identification could take these results into account. Thus, it would be wise and advantageous to sample a high number of trees per progeny than to choose several families of progenies. The allelic richness of the progenies could guide the choice of progenies. The markers comprising the private alleles detected between the PB121⁺ and NJM x GVT progenies can be used in the varietal purity tests.

KEYWORDS: Hybrid coconut palm, *Lethal yellowing*, diversity, microsatellite markers, Côte d'Ivoire.

RESUME: Cette étude a été conduite pour évaluer la diversité moléculaire de huit descendance hybrides de cocotier (*Cocos nucifera* L) NJM x GVT et un témoin hybride BP121⁺ à l'aide de 15 locus microsatellites. Les hybrides NJM x GVT sont tolérants à la maladie du jaunissement mortel du cocotier, quand le témoin est très sensible à la maladie. A l'issue de ces travaux, 86 allèles ont été identifiés aux 15 loci microsatellites avec une variation de 2 à 11 allèles par locus. La diversité intra descendance ($H_S = 0,50$) est plus élevée que la diversité inter descendance ($D_{ST} = 0,04$). La richesse allélique des descendance varie de 2,07 à 3,13. Les descendance NJM x GVT se différencient au plan moléculaire du témoin PB121⁺. En somme 63,95 % des allèles présents chez les descendance NJM x GVT sont absents chez le témoin BP121⁺. Par ailleurs 8,14 % des allèles présents chez le témoin sont absents chez les NJM x GVT. La collecte d'échantillons pour des travaux ultérieurs tels que la recherche de QTLs pourrait prendre en compte ces résultats. Ainsi, il serait judicieux et avantageux d'échantillonner un nombre élevé d'arbres par descendance que de choisir plusieurs familles de descendance. La richesse allélique des descendance pourrait guider

dans le choix des descendances. Les marqueurs comportant les allèles privés détectés entre les descendances PB121+ et NJM x GVT peuvent être utilisés dans les tests de pureté variétale.

MOTS-CLEFS: Cocotier hybride, Jaunissement mortel, diversité, marqueurs microsatellites, Côte d'Ivoire.

1. INTRODUCTION

Le cocotier (*Cocos nucifera* L.) est la 7^e source d'huile végétale dans le monde avec près de 2,1 millions de tonnes d'huile commercialisés chaque année [1]. Cette plante a été surnommée arbre de vie ou arbre aux cent usages en raison des usages multiples qui sont faits de ses produits et sous-produits. En effet, toutes les parties de l'arbre sont valorisées de manière artisanale et/ou industrielle [2]. L'importance de cette plante se justifie par sa superficie mondiale qui est d'environ 12 millions d'hectares [3].

En Côte d'Ivoire, la cocoteraie occupe environ 50.000 ha [4] dont 95% est localisée sur le littoral où elle représente la principale culture de rente pour la majorité des paysans [5]. Malgré l'importance du cocotier, sa culture connaît progressivement un déclin. La forte compétitivité des autres plantes oléagineuses telle que le palmier à huile et le soja ainsi que la faible productivité des cocoteraies pourraient en être la cause. Cependant, les fortes pressions parasitaires comme les affections dues aux phytoplasmes sont devenues des risques phytosanitaires majeurs qui limitent la nuciculture. Aujourd'hui, la cocoteraie mondiale est menacée par différents ravageurs et maladies. Parmi les maladies, le jaunissement mortel représente l'une des plus dévastatrices de la cocoteraie mondiale [3]. Cette maladie a déjà détruit des milliers d'hectares de cocoteraie dans plusieurs régions du monde telle que l'Afrique de l'Est, l'Afrique de l'Ouest, les Caraïbes et l'Amérique Centrale ([6], [7], [8]). Pour combattre cette maladie, la lutte génétique est de plus en plus préconisée [9]. La méthode de lutte génétique consiste à rechercher ou à créer des cultivars tolérants ou résistants à la maladie. A cet effet, les descendances hybrides NJM x GVT créées en Côte d'Ivoire ont été testées en zone endémique ghanéenne. A l'issue de ce test, ces descendances se sont montrées diversement tolérantes à la maladie ([10], [11]). A ce jour outre les caractéristiques agromorphologiques évaluées par [12] et [13], aucune information relative à la diversité moléculaire de ces descendances n'est disponible. La disponibilité de ces données devrait permettre une sélection et utilisation efficiente des descendances hybrides. L'objectif de ce travail est d'évaluer la diversité moléculaire des descendances hybrides NJM x GVT plantées en Côte d'Ivoire en vue d'une sélection efficace.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL

Le matériel végétal est constitué de 8 descendances hybrides NJM x GVT caractérisées par [12] et [13]. L'hybride de cocotier NJM x GOA qui est le plus vulgarisé actuellement et qui est très sensible à la maladie du jaunissement mortel a servi de témoin. Quatre individus ont été choisis par descendance (Tableau 1). Les analyses moléculaires ont été réalisées sur un total de 36 individus.

Tableau 1. Liste de descendances hybrides sélectionnées pour l'évaluation de la diversité moléculaire

Croisements étudiés	Codes	Nombre d'individus
NJM x GVT1	d1	4
NJM x GVT3	d3	4
NJM x GVT5	d5	4
NJM x GVT8	d8	4
NJM x GVT9	d9	4
NJM x GVT11	d11	4
NJM x GVT15	d15	4
NJM x GVT18	d18	4
NJM x GOA ⁺	PB121 ⁺	4
Nombre total d'individus		36

2.2. MÉTHODES

2.2.1. COLLECTE D'ÉCHANTILLONS DE FOLIOLES

Deux folioles vertes ont été collectées le matin entre 7 h et 12 h sur la jeune feuille saine de rang 2 qui donne les meilleurs résultats pour l'extraction d'ADN. Elles ont été découpées en morceaux d'environ 20 cm. A l'aide d'un stylo à bille, le numéro matricule de l'individu est marqué sur chacun des morceaux de folioles. Ils ont été ensuite séchés dans une salle dont la température est maintenue constante à 25°C pendant 7 jours avant leur transfert au laboratoire du CIRAD en France pour la conduite des étapes des analyses.

2.2.2. EXTRACTION ET DOSAGE D'ADN

Quarante milligrammes d'échantillon ont été broyés à l'aide d'un broyeur à bille de tungstène. L'extraction d'ADN a été faite selon le protocole standard utilisé habituellement au laboratoire de biologie moléculaire du CIRAD. Le tampon d'extraction d'ADN est constitué de 100mM tris pH = 8; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 1.25% SDS; PVP 40000 1% et de sulfite de sodium 1%. Le protocole d'extraction et de purification d'ADN sur membrane de silice en plaque de 96 puits utilise 20 mg de broyat. Les étapes de l'extraction comprennent la lyse des cellules végétales, la déprotéinisation à froid à l'aide d'acétate de sodium, la filtration du surnageant, la fixation sur membrane de silice, le rinçage et l'élution de l'ADN. Les échantillons d'ADN ont été dosés par spectrophotométrie et dilués à 5ng/µl.

2.2.3. RÉACTION D'AMPLIFICATION DES AMORCES MICROSATELLITES PAR PCR

L'amplification PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 10 µl contenant 25ng d'ADN, du tampon 1X (10 mM Tris-HCl au PH de 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, glycerol 0,001% v/v), 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de MgCl₂, 1 U de Taq Polymerase, 0,1 µM de l'amorce reverse (non marquée) et 0,08 µM de l'amorce forward. Selon le cas, cette dernière est déjà marquée ou porte une queue M13. Dans le dernier cas, 0,1 µM du fluorochrome est ajouté. Un total de 15 paires d'amorces microsatellites ont été utilisées dans les réactions d'amplification (Tableau 2).

Tableau 2. Liste des amorces microsatellites utilisées pour les analyses moléculaires sur les cultivars étudiés

Amorces	Motif	Amorce F	Amorce R	Température d'hybridation
CnCirA3	(GT) 15	TACGAAAGCAAGAAAACATA	AATAATGTGAAAAAGCAAAG	52°C
CnCirA9	(GT) 9 (GA) 8	AATGTTTGTGTCTTTGTGCGTGTGT	TCCTTATTTTTCTTCCCTTCTCA	52°C
CnCirB6	(GT) 4 (GT) 10 (GA) 11	GAGTGTGTGAGCCAGCAT	ATTGTTACAGTCCTTCCA	52°C
CnCirB12	(CA) 20 (GA) 15	GCTCTTCAGTCTTTCTCAA	CTGTATGCCAATTTTTCTA	52°C
CnCirC5	(TG) 9 (GA) 28	ACCAACAAAGCCAGAGC	GCAGCCACTACCTAAAAAG	52°C
CnCirC7	(GT) 7 (GA) 16	ATAGCATATGGTTTTCTT	TGCTCCAGCGTTCATCTA	52°C
CnCirC12	(CA) 15 (TA) 6	ATACCACAGGCTAACAT	AACCAGAGACATTTGAA	52°C
CnCirE2	(CT) 17 (GT) 9	TCGCTGATGAATGCTTGCT	GGGGCTGAGGGATAAACC	52°C
CnCirE10	(CA) 8 (GA) 11	TTGGGTTCCATTTCTTCTCATC	GCTCTTTAGGGTTGCTTTCTTAG	52°C
CnCirE12	(CT) 18 (GT) 9 (CT) 8	TCACGCAAAAAGATAAAAACC	ATGGAGATGGAAAGAAAGG	52°C
CnCirF2	(GT) 10 (GA) 12	GGTCTCCTCTCCCTCTTATCTA	CGACGACCCAAAAGTGAACAC	52°C
CnCirG11	(GT) 9 (GA) 9	AATATCTCCAAAATCATCGAAAG	TCATCCACACCCTCTCT	52°C
CnCirH7	(CT) 16 (CA) 13	GAGATGGCATAACACCTA	TGCTGAAGCAAAAAGAGTA	52°C
CnCirH11	(TC) 18	TCATTCAGAGGACAAAAGTT	TAAAAATTCATAAAGGTAAAA	52°C
CNZ40	(CT) 20	CTTGATTGCTATCTCAAATGG	CTGAGACCAATACCATGTGT	52°C

Le programme d'amplification PCR utilisé est composé de 35 cycles: dénaturation 94°C/30s, amorçage 52°C/75s, élongation 72°C/90s. La détection des fragments amplifiés par des amorces microsatellites sur ABI3500xl (Applied Biosystem) nécessite un marquage par un composé fluorescent. ABI est une machine permettant d'analyser les produits d'amplification d'une PCR et procéder aussi au séquençage d'un fragment d'ADN. Dans cette étude, les oligonucléotides utilisés comme amorce forward

étaient soit directement marqués par un fluorophore, soit non marqués mais portaient une queue universelle (M13) qui reçoit le fluorophore désiré. Les réactions d'amplification PCR de certaines amorces microsatellites sont réalisées en multiplexe en fonction de la taille des allèles et selon le marquage des amorces par l'un des 4 fluorochromes disponibles que sont FAM, NED, VIC et PET. La présence des fluorochromes sur une des deux amorces utilisées permet la détection de la région du génome ayant été amplifiée.

2.2.4. MIGRATION ET LECTURE

Après multiplexage des produits PCR, une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ dans lequel est inclus le marqueur de taille a été préparée. Les fragments de différentes longueurs sont séparés par électrophorèse dans un tube capillaire. La fluorescence est détectée par un capteur à la sortie du tube. La lecture des résultats se fait à l'aide du logiciel Genemapper version 4.1.

2.2.5. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES

2.2.5.1. ESTIMATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE AU SEIN DES DESCENDANCES HYBRIDES

La diversité intra descendance est estimée par le pourcentage de loci polymorphes au seuil de 95 %, le nombre moyen d'allèles par locus ou diversité allélique (A), l'hétérozygotie théorique (H_e) et l'hétérozygotie observée (H_o). Un locus est dit polymorphe lorsque la fréquence de l'allèle qui apparaît le plus est inférieure à 95%. Le nombre moyen d'allèles par locus est le nombre total d'allèles trouvés dans une descendance divisé par le nombre de locus.

$$A = 1/L \sum_{i=1}^L n_i$$

n_i représente le nombre d'allèles au locus i et L le nombre de locus.

L'hétérozygotie théorique ou indice de diversité génétique (H_e) est donnée par la formule de [14]. Elle représente le taux d'hétérozygotie en condition de panmixie.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^l p_i^2$$

Avec (p_i) les fréquences alléliques pour un locus donné avec n allèles. L'hétérozygotie observée (H_o) est calculée à partir de la fréquence mesurée des hétérozygotes (nombre des individus hétérozygotes divisé par le nombre total des individus de l'échantillon).

2.2.5.2. ESTIMATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ENTRE LES DESCENDANCES HYBRIDES

La diversité inter descendance est évaluée à travers la diversité génétique totale (H_T) avec ses composantes intra population (H_S) et interpopulation (D_{ST}). De même, le coefficient de différenciation génétique (G_{ST}) est déterminé selon [14].

$$H_T = 1 - \sum p_i^2 + H_S/2ns$$

$$D_{ST} = H_T - H_S$$

n est le nombre total d'individus analysés et p_i la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle du locus analysé

$$G_{ST} = D_{ST}/H_T = 1 - H_S/H_T$$

La différenciation génétique entre descendance est donnée par l'estimation des coefficients F-statistique de [15]. Les paramètres F_{ST} et F_{IS} ont été calculés. Le coefficient F_{ST} mesure l'écart global à l'équilibre panmictique dû à la structuration de la population totale en sous-groupes. Il est calculé en fonction des paramètres F_{IS} et F_{IT} (différenciation des individus par rapport au total) suivant la relation:

$$F_{ST} = 1 - \frac{1 - F_{IT}}{1 - F_{IS}}$$

$F_{ST} = 0$, il n'y a pas de différence entre les populations

$F_{ST} = 1$, traduit une forte différenciation génétique entre les populations due à la fixation de différents allèles.

Le coefficient F_{IS} mesure dans une sous population donnée l'écart entre l'hétérozygotie observée et l'hétérozygotie attendue en condition d'équilibre de Hardy-weinberg (EHW).

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

$F_{IS} = 0$, la sous population est à l'équilibre de Hardy-weinberg;

$F_{IS} > 0$, montre qu'il y a un déficit d'hétérozygotes dans la sous population;

$F_{IS} < 0$, indique que la sous population comporte un excès d'hétérozygotes.

La distance entre les descendance est évaluée par la distance génétique (D) de [14] qui calcule D en introduisant une correction pour le biais d'échantillonnage d'individus. Cette distance est couramment utilisée dans les études de diversité. Elle a été utilisée par [16] pour l'étude de la diversité de collection de cocotier de la Station de recherche Marc Delorme. La formule est la suivante:

$$D = -\ln(I) = -\ln\left(\frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}\right)$$

Avec I la similarité de Nei ou l'indice d'identité génétique. Elle indique la probabilité pour que deux allèles, l'un pris dans la population (x) et l'autre pris dans la population (y) soient identiques.

Le test d'Analyse Moléculaire de Variance (AMOVA), associé à la partition de la variabilité à l'intérieur des descendance et entre descendance a été également effectué.

2.2.6. ORGANISATION DES DESCENDANCES HYBRIDES ÉTUDIÉES

L'analyse Factorielle des Correspondances (AFC) est utilisée pour décrire la variabilité moléculaire des individus étudiés. Elle a permis d'identifier les allèles intervenant dans la variabilité des descendance hybrides en faisant la correspondance entre la distribution des allèles et celle des individus.

Les logiciels GENETIX 4.05.2 [17] et GenALEX 6.3 [18] ont été utilisés pour calculer les différents paramètres.

3. RÉSULTATS

Les données fournies par la machine sont sous forme de profil. Tous les individus caractérisés présentent deux pics correspondant aux deux allèles chez les hétérozygotes. La taille du pic est fonction de la concentration du produit d'amplification et sa position sur le graphique est fonction de la taille du fragment amplifié (Fig.1).

3.1. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE INTRA DESCENDANCE

En somme, 86 allèles sont identifiés aux 15 loci microsatellites (Tableau 3). Le nombre d'allèles varie de 2 au locus CnCirE10 à 11 au locus CnCirC5. Une moyenne de 5,73 allèles par locus est observée. Le témoin PB121⁺ et la descendance d8 avec 31 allèles enregistrent les valeurs les plus faibles. Les descendance hybrides PB121⁺ et d8 comportent 36,05 % des allèles trouvés sur l'ensemble des descendance analysés. La descendance hybride d9 comporte plus d'allèles (47) que les autres. Ce qui représente 54,65 % du total des allèles.

Toutes les descendance étudiées sont polymorphes à tous les loci. En effet chez 73,33 % à 93, 33% des loci, la fréquence de l'allèle le plus fréquent n'a pas atteint le seuil de 95 % (Tableau 4). Le nombre moyen d'allèles dans chaque descendance varie de 2,07 (d8 et le témoin) à 3,13 (d9). L'hétérozygotie observée fluctue entre 0,69 pour la descendance d5 et 0,93 pour le témoin PB121⁺. La valeur de l'hétérozygotie attendue varie de 0,48 à 0,58 respectivement chez les descendance d18 et d9.

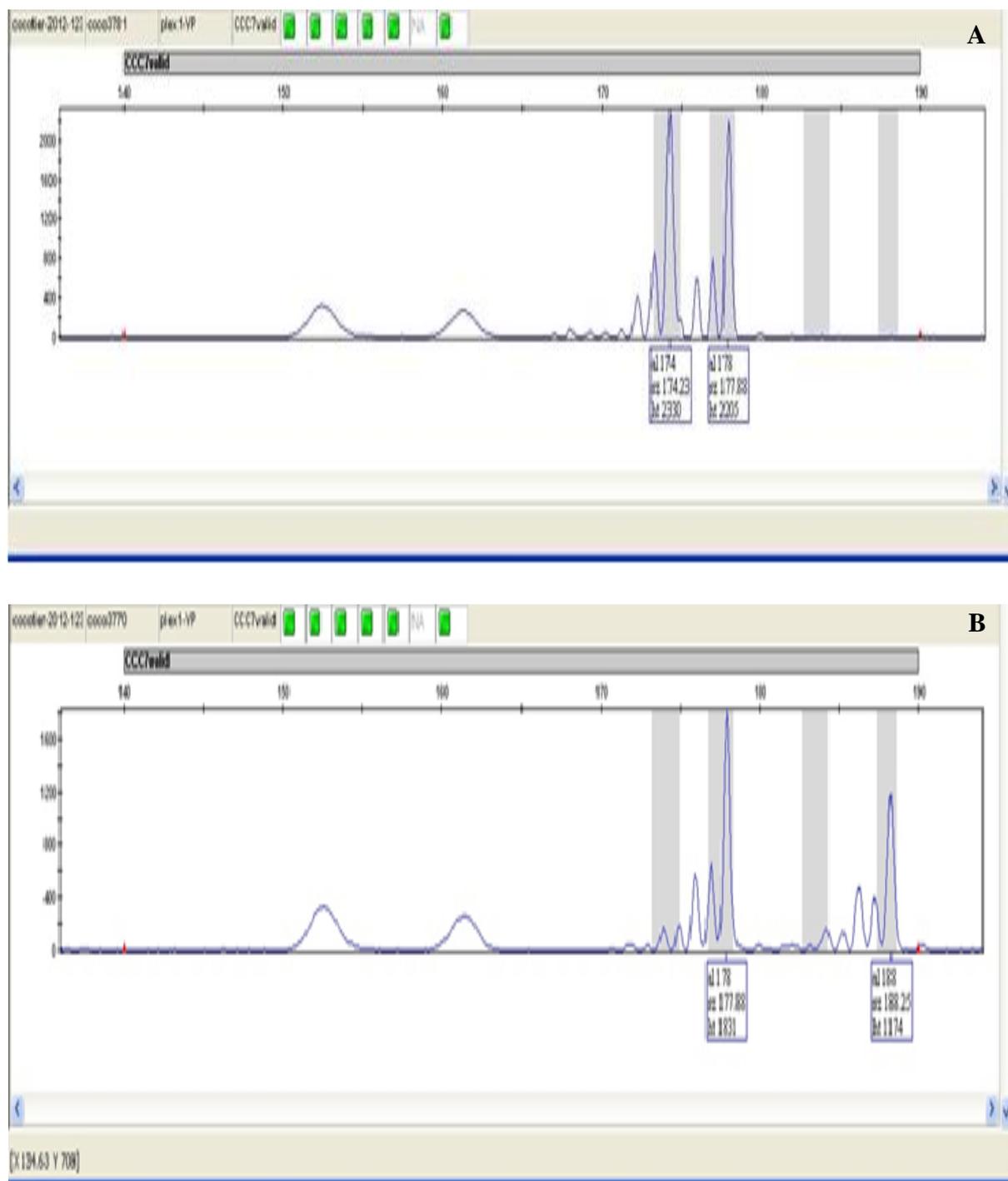


Fig. 1. Exemple de profils d'individus caractérisés

A-Profil d'un individu d8 avec le locus CnCirC7

B- Profil d'un individu d9 avec le locus CnCirC7

Tableau 3. Nombre d'allèles par locus chez les descendance hybrides de cocotier analysées

Locus	d1	d3	d5	d8	d9	d11	d15	d18	PB121 ⁺	Total/locus
CnCirA3	3	2	2	2	2	3	3	3	2	4
CnCirA9	3	3	3	2	3	3	2	3	2	5
CnCirB6	3	4	4	2	5	3	2	4	2	7
CnCirB12	4	3	3	3	3	4	4	5	2	7
CnCirC5	5	3	2	2	4	6	4	4	2	11
CnCirC7	3	3	2	2	3	3	3	2	2	4
CnCirC12	3	3	2	2	4	2	3	4	2	6
CnCirE2	2	2	2	1	2	2	2	1	3	6
CnCirE10	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
CnCirE12	1	1	2	1	2	2	2	1	2	3
CnCirF2	3	3	2	2	4	3	4	4	2	7
CnCirG11	3	2	2	3	3	3	3	3	3	6
CnCirH7	2	4	3	2	3	3	3	3	2	5
CnCirH11	3	3	3	3	4	3	3	1	1	5
CN40	4	3	3	3	4	3	3	5	2	8
Total/descendance	43	40	36	31	47	44	42	44	31	86
%	50	46,51	41,86	36,05	54,65	51,16	48,84	51,16	36,05	100

Tableau 4. Indice de diversité intra descendance chez les cocotiers analysés

Individus	P (0,95)	Ho	He	A
d1	86,67	0,65 ± 0,35	0,51 ± 0,25	2,87 ± 1,06 ab
d3	86,67	0,70 ± 0,37	0,53 ± 0,25	2,67 ± 0,90 ab
d5	93,33	0,69 ± 0,32	0,56 ± 0,23	2,4 ± 0,74 ab
d8	80	0,80 ± 0,41	0,49 ± 0,26	2,07 ± 0,70 bc
d9	93,33	0,77 ± 0,33	0,58 ± 0,23	3,13 ± 1,06 a
d11	93,33	0,67 ± 0,36	0,52 ± 0,24	2,93 ± 1,10 ab
d15	93,33	0,77 ± 0,27	0,57 ± 0,19	2,8 ± 0,86 ab
d18	73,33	0,62 ± 0,42	0,48 ± 0,32	2,93 ± 1,44 a
PB121 ⁺	93,33	0,93 ± 0,26	0,55 ± 0,16	2,07 ± 0,46 c

He: hétérozygotie attendue

Ho: hétérozygotie observée

P (0,95): pourcentage de loci polymorphes

A: Nombre moyen d'allèles par locus ou richesse allélique (Les valeurs avec les mêmes lettres sont statistiquement identiques au seuil de 5 % selon le test de Newman Keuls)

3.2. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE INTER DESCENDANCE

La valeur de la diversité génétique totale (H_T) varie de 0,1 à 0,68 respectivement pour les loci CnCirE10 et CN40 avec une valeur moyenne de 0,54 (Tableau 5). La diversité intra population (0,50) est plus élevée que la diversité inter population (0,04). Ces deux indices varient de 0,06 à 0,67 pour H_S et de 0,03 à 0,06 pour D_{ST} . Le coefficient de différenciation génique est généralement faible pour tous les loci. Il a une valeur moyenne de 0,11 variant entre 0,04 (pour les loci CnCirA3 et CnCirB12) et 0,47 (pour le locus CnCirE10). Les valeurs de F_{IS} après 1000 rééchantillonnages avec remise des individus avec la totalité des locus, pour chaque descendance, sont négatives (Tableau 6). Ces valeurs varient de -0,94 (PB121⁺) à -0,30 (d1) avec une valeur moyenne de -0,48. La différenciation entre les descendance est très faible, la valeur du F_{ST} est de 0,09. Le résultat de l'AMOVA montre que 72 % de la variabilité génétique totale sur l'ensemble des loci est expliquée par des différences au sein des descendance et 28 % par des différences entre les descendance (Tableau 7).

Tableau 5. Indice de diversité inter descendance des cocotiers étudiés

Locus	H_o	H_T	H_s	D_{ST}	G_{ST}
CnCirA3	0,82	0,57	0,54	0,03	0,04
CnCirA9	0,92	0,61	0,58	0,03	0,06
CnCirB6	0,81	0,63	0,58	0,05	0,08
CnCirB12	0,96	0,7	0,67	0,03	0,04
CnCirC5	1	0,7	0,65	0,05	0,07
CnCirC7	0,97	0,62	0,57	0,05	0,08
CnCirC12	0,82	0,61	0,55	0,06	0,09
CnCirE2	0,34	0,31	0,28	0,03	0,1
CnCirE10	0,11	0,1	0,06	0,04	0,47
CnCirE12	0,29	0,26	0,2	0,06	0,22
CnCirF2	0,81	0,61	0,56	0,05	0,09
CnCirG11	0,74	0,57	0,54	0,03	0,06
CnCirH7	0,83	0,61	0,56	0,05	0,09
CnCirH11	0,57	0,49	0,46	0,03	0,07
CN40	0,97	0,68	0,65	0,03	0,05
Moyenne	0,73	0,54	0,50	0,04	0,11

H_o =hétérozygotie observée, H_T =diversité génique totale, H_s = diversité intrapopulation, D_{ST} =diversité interpopulation, G_{ST} =coefficient de différenciation génique

Tableau 6. FIS par descendance et par locus chez les cocotiers étudiés

Locus	d1	d3	d5	d8	d9	d11	d15	d18	PB121 ⁺
CnCirA3	-0,29	-0,5	-0,33	-1	-0,5	-0,6	-0,29	-0,29	-1
CnCirA9	-0,29	-0,5	-0,5	-1	-0,29	-0,6	-1	-0,29	-1
CnCirB6	-0,09	-0,41	-0,2	-1	-0,33	-0,09	-0,2	-0,2	-1
CnCirB12	-0,41	-0,5	0,11	-0,6	-0,5	-0,41	-0,41	-0,33	-1
CnCirC5	-0,33	-0,6	-1	-1	-0,41	-0,14	-0,41	-0,41	-1
CnCirC7	-0,6	-0,6	-1	-1	-0,6	-0,29	-0,5	-1	-1
CnCirC12	-0,5	-0,29	-0,33	-1	-0,41	0	-0,29	-0,41	-1
CnCirE2	0	0	0	-	0	0	-0,5	-	-0,5
CnCirE10	-	-	-	-	-	-	-	-	-1
CnCirE12	-	-	0	-	0	0	-0,5	-	-1
CnCirF2	-0,29	-0,09	0	-1	-0,2	-0,6	-0,41	-0,41	-1
CnCirG11	-0,09	-0,2	-0,33	-0,5	-0,6	-0,09	-0,6	-0,09	-0,6
CnCirH7	-0,5	-0,41	-0,5	-1	-0,5	-0,09	-0,29	-0,09	-1
CnCirH11	-0,09	-0,29	0,11	-0,6	-0,2	-0,6	-0,09	-	-
CN40	-0,41	-0,5	-0,5	-0,6	-0,41	-0,6	-0,29	-0,33	-1
Moyenne	-0,29923	-0,3762	-0,3193	-0,8583	-0,3536	-0,2936	-0,4129	-0,35	-0,9357

$F_{IS} = -0,47835$, $F_{ST} = 0,09040$

Tableau 7. Analyse Moléculaire de Variance associé à la partition de la variabilité à l'intérieure des descendance et entre descendance des cocotiers étudiés

Source de variation	ddl	Somme des carrés	Composantes de la variance	% de la variabilité totale	Signification (P-value)
Inter descendance	8	77,026	1,479	28%	0,001
Intra descendance	26	100,917	3,881	72%	

La distance génétique entre le témoin PB 121⁺ et les huit descendance hybrides NJM x GVT varie de 0,31 (avec d15) à 0,53 (avec d8) (Tableau 8). La distance génétique entre les six autres descendance hybrides et le témoin sont intermédiaires. Elles sont de 0,35 (avec d18); 0,38 (avec d3); 0,39 (avec d1); 0,43 (avec d9) et 0,48 (avec d5). Entre les descendance NJM x GVT, les distance génétique sont plus faibles. Elles varient en effet, de 0,06 (d1- d3; d1-d9) à 0,25 (d15-d8). Les distance génétique entre la descendance d15 et les autres descendance sont relativement grandes. Elle est de 0,12 entre d15 et d1 et d11. Entre d15 et les descendance d1, d3, d18, d9 et d8; elles sont respectivement de 0,14; 0,15; 0,16; 0,18 et 0,25.

Tableau 8. Distance génétique de NEI entre les descendance étudiées

	PB121+	d11	d18	d15	d1	d3	d9	d8	d5
PB121+	0								
d11	0,41	0							
d18	0,35	0,09	0						
d15	0,31	0,12	0,15	0					
d1	0,39	0,08	0,05	0,12	0				
d3	0,38	0,07	0,08	0,14	0,06	0			
d9	0,43	0,10	0,07	0,16	0,06	0,07	0		
d8	0,53	0,14	0,13	0,25	0,16	0,10	0,07	0	
d5	0,48	0,11	0,12	0,18	0,13	0,05	0,08	0,09	0

NB: Les valeurs en gras sont les distance génétique les plus élevées.

3.3. ORGANISATION DES DESCendance HYBRIDES

L'Analyse Factorielle des Correspondance (AFC) structure les individus en deux grands groupe composés d'une part du témoin PB121⁺ et d'autre part des descendance hybrides NJM x GVT (Fig. 2). Les descendance NJM x GVT peuvent être scindées en deux sous-groupe. Une partie regroupant les descendant d15 et l'autre les descendance d1, d3, d5, d8, d9, d11, d18. Les allèles sont aussi structurés de la même manière (Fig. 3). Les individus composant la descendance témoin PB121⁺ sont caractérisés par les allèles CnCirH7_129, CnCirF2_196 et CnCirE12_190. De même, les allèles CnCirC5_101, CnCirG11_196, CnCirC5_105, CnCirB6_200, CnCirE12_182 et CnCirH11_169 permettent aux descendance d15 de se différencier des autres. Le tableau 9 indique que 55 allèles (soit 63,95 % des allèles) absents chez le témoin PB121⁺ sont présents chez au moins un individu NJM x GVT et 7 allèles (soit 8,14 % des allèles) présents chez le témoin sont absents chez les NJM x GVT. Vingt-quatre allèles (27,91 % des allèles) présents chez le témoin sont présents chez au moins un individu NJM x GVT.

Tableau 9. Allèles privés et identiques chez les descendance hybrides de cocotiers étudiées

Variétés de cocotiers	Nombre d'allèles privés	Pourcentage d'allèles privés	Nombre d'allèles identiques	Pourcentage d'allèles identiques
NJM x GVT	55	63,95 %	24	27,91 %
NJM x GOA ⁺	7	8,14 %		

4. DISCUSSION

Tous les marqueurs ont été polymorphes. Toutefois, le polymorphisme moléculaire a varié selon la descendance. De telles observations ont été faites par [16] en évaluant la diversité moléculaire de la collection internationale de cocotiers en Côte d'Ivoire avec les mêmes marqueurs microsatellites. Le polymorphisme des marqueurs microsatellites a été observé par plusieurs autres auteurs chez le cocotier [19] et le cacaoyer [20]. Les microsatellites (SSR) sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétra- nucléotides répétés en tandem. Le polymorphisme de type SSR repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite [21] et [22].

Les valeurs négatives du Fis indiquent un excès d'hétérozygotes chez les descendance étudiés. Le croisement entre deux individus génétiquement différents que sont les cocotiers Nains et les Grands ([23], [24]) est à l'origine de ce fait. Cela expliquerait aussi le taux d'hétérozygotie assez élevé qui a été obtenu. Toutefois, la variabilité au sein des descendance a été plus élevée que celle entre les descendance. Tous les individus hybrides évalués ont pour géniteur femelle le Nain Jaune Malaisie (NJM). Les travaux de [16] ont montré une faible diversité au sein des populations de nain avec 1,67 allèle par population. En effet, comme la plupart des cocotiers Nains, le NJM est peu diversifié à cause de son système de reproduction prédominé par l'autogamie [25]. Les différences moléculaires entre les individus composant les descendance hybrides sont vraisemblablement dues à l'apport d'allèles nouveaux par les géniteurs mâles que sont les cocotiers Grands GOA et GVT. A l'opposé des nains, les cocotiers Grands ont une forte diversité moléculaire et sont très hétérogènes ([26], [27]). Les travaux de [16] ont montré que les populations de cocotier Grand GOA et GVT ont une plus forte richesse allélique que la population NJM.

L'analyse des distances génétiques entre les descendance a montré que les descendance NJM x GVT sont génétiquement proches les unes des autres. Ce résultat ne reflète pas la diversité phénotypique relative à la couleur des noix des cocotiers GVT, décrits par [28]. Par ailleurs, le mode de reproduction par allogamie préférentielle des GVT devrait conduire à une forte diversité et par conséquent une différenciation génétique entre leurs descendants. Les géniteurs GVT utilisés dans cet essai seraient donc génétiquement proches.

Toutes les descendance NJM x GVT sont génétiquement distinctes du témoin PB 121+ qui est le croisement entre le Nain Jaune de Malaisie (NJM) et le Grand Ouest Africain amélioré (GOA+). Une telle différence génétique pourrait être aisément attribuée à la différence entre le GVT et le GOA. Le GVT est un cocotier grand du Pacifique sud quand le GOA un cocotier Grand de l'Afrique de l'Ouest ([28], [29]). Des différences génétiques des cocotiers grands de ces deux zones du monde ont été observées auparavant par [23] et [26]. Cette différence génétique entre le PB121+ et les descendance NJM x GVT pourrait être la base de la sensibilité et tolérance respective des individus de ces variétés de cocotier créés sur la Station Marc Delorme et testées au Ghana contre la maladie du jaunissement mortel [30]. Les travaux de [31] ont montré une diversité moléculaire au sein des accessions de cocotiers résistants au jaunissement mortel.

L'AFC a révélé la présence d'allèles privés entre les descendance hybrides NJM x GVT et PB121+. Ces différences génétiques seraient dues à la présence de 63,95 % des allèles chez les descendance NJM x GVT et absent chez le témoin. Par ailleurs 8,14 % des allèles présents chez le témoin ont été absents chez les NJM x GVT. Les similitudes observées entre le témoin et les hybrides NJM x GVT ont été due à 27,91 % des allèles présents simultanément chez les deux groupes. Les allèles privés qui proviendraient probablement des géniteurs mâles GVT et GOA, ont permis de différencier les hybrides NJM x GVT du témoin PB 121+.

5. CONCLUSION

La diversité moléculaire des descendance hybrides PB121+ et NJM x GVT a été réalisée avec 15 amorces microsatellites. Au total de 86 allèles ont été identifiés aux 15 loci microsatellites avec une variation de deux à 11 allèles par locus. La diversité intra descendance ($H_S = 0,50$) est plus élevée que la diversité inter descendance ($D_{ST} = 0,04$). La collecte d'échantillons pour des travaux ultérieurs tels que la recherche de QTLs pourrait prendre en compte ces résultats. Ainsi, il serait judicieux et

avantageux d'échantillonner un nombre élevé d'arbres par descendance que de choisir plusieurs familles de descendance. La richesse allélique des descendance qui a varié de 2,07 à 3,13 pourrait guider dans le choix des descendance. Le d9 avec 3,13 allèles en moyenne par locus aura plus de chance d'être sélectionné que le d8 qui en a 2,07. Les descendance NJM x GVT se différencient au plan moléculaire du témoin PB121+. Les marqueurs comportant les allèles privés détectés entre les descendance PB121+ et NJM x GVT peuvent être utilisés dans les tests de pureté variétale.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements à la Division Amélioration génétique du cocotier de la station Marc Delorme de Côte d'Ivoire qui héberge la collection internationale de cocotier pour l'Afrique et l'Océan Indien pour sa contribution significative pour la collecte des données. Nos remerciements vont aussi à l'endroit de Virginie POMIES, technicienne au laboratoire de biologie moléculaire du CIRAD pour les travaux d'analyses moléculaires et pour les échanges fructueux.

REFERENCES

- [1] Cnuced, 2016. Conférence des Nations Unies sur le Commerce Et le Développement. Noix de coco, un profil de produit de base par INFOCOMM Fonds de la CNUCED pour l'information sur les marchés des produits de base agricoles. 12 p, Website: unctad.org/commodities.
- [2] Bourdeix R., Konan J.L. and N'cho Y.P. Cocotier, guide des variétés traditionnelles et améliorées. Co-production CIRAD /CNRA, édition diversiflora; Montpellier (France), 58p, 2005.
- [3] VAN DER VOSSSEN, H.A.M., and CHIPUNGAHELO, G.S.E. Cocos nucifera L. In: van der Vossen, H.A.M. & Mkamillo, G.S. (Editeurs). PROTA 14: Vegetable oils/Oléagineux. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Pays Bas, 2007.
- [4] Konan J.L., Allou K., N'goran A., Diarrassouba L., and Ballo K. Bien cultiver le cocotier en Côte d'Ivoire. Fiche technique sur le cocotier. CNRA, Côte d'Ivoire: Direction des programmes de Recherche et de l'Appui au Développement; 4p, 2006.
- [5] R. R. A. Assa, J.L. Konan, J. Nemlin, A. Prades, N. Agbo, and R.S Sie. Diagnostic de la cocoteraie paysanne du littoral ivoirien. Sciences et nature 3 (2): 113-120, 2006.
- [6] Dollet M., Jannot C., Baudouin L., and Cirad J. O. Le cocotier en Afrique et la maladie du jaunissement mortel OCL 16 (2): 74-75, 2009.
- [7] J.L. Konan, K. Allou, H. Atta Diallo, D. Saraka Yao, B. Koua, N. Kouassi, R. Benabid, R. Michelutti, J. Scott, Y. Arocha-Rosete. First report on the molecular identification of the phytoplasma associated with a lethal yellowing-type disease of coconut palms in Côte d'Ivoire. New Disease Reports 28, 3, 2013.
- [8] W.A. M. P. Daramcoum, K. J-L. Konan, S. D. M. Yao., A. R. Yaima, E-B. Z. Koffi, K. Yoboue, K. Mo. Kouassi, C. G. Kouadjo, E. Koffi E, K. K.K.G. Koffi and A. S-P N'guetta. Molecular diagnosis of phytoplasma transmission from zygotic embryos to in vitro regenerated plants of coconut palm (*Cocos nucifera* L.). African Journal of Biotechnology 17 (27): 862-869, 2018.
- [9] Oropeza C., Escamilla J.A., Mora G., Zizumbo D. and Harrison N.A. Coconut lethal yellowing. In Coconut genetic resources, edited by Batugal p., Ramanatha Rao V., et Olivier J, IPGRI, Selangor Darul Ehsan (Malaisie), pp: 349-363, 2005.
- [10] Dery S.K., Owusu Nipah J., Andoh-mensah E., Nuertey B.N., Nkansah Poku J., Arthur R. and Philippe R. On-farm evaluation of the coconut hybrid, Malayan yellow dwarf x Vanuatu tall for tolerance to the lethal yellowing disease of coconut in Ghana Cord, 21 (1): 50-56, 2005.
- [11] F. Bonnot, G. Danyo, R. Philippe, S. Dery and A. Ransford. Preliminary results on epidemiology of Coconut Lethal Yellowing in Ghana. Oléagineux, Corps Gras, Lipides 16 (2): 116-122, 2009.
- [12] EB. Z. Koffi, K. J. L. Konan, A. E. Issali, T. T. Lekadou, R. Bourdeix, K. Allou and I. A. Zoro bi. Evaluation de la diversité agromorphologique des descendance hybrides de cocotier (*Cocos nucifera* L.) Nain Jaune Malaisie x Grand Vanuatu en Côte d'Ivoire. International Journal of Biological and Chemical Sciences 7 (2): 507-522, 2013.
- [13] EB. Z. Koffi, K. J. L. Konan, R. S. Si., S. D-M. Yao, K. Yoboue, N.Y. Konan, A. E. Issali., T. T. Lekadou, K. Allou. Assessment of the agronomic performance of Malayan Yellow Dwarf x Vanuatu Tall coconut (*Cocos nucifera* L.) hybrid variety tolerant to lethal yellowing disease of Ghana in Côte d'Ivoire. Journal of Research in Biology 4 (6): 1427-1440, 2014.
- [14] M. Nei. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from z small number of individuals. Genetics 89: 583-590, 1978.
- [15] B.S Weir and C.C. Cockerham. Estimating F-statitics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370, 1984.
- [16] Konan K.J.N. Evaluation de la diversité agromorphologique et moléculaire de la collection internationale de cocotier (*Cocos nucifera* L.) en Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat unique, Université de Cocody Abidjan (Côte d'Ivoire), 130p, 2008.

- [17] Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. and Bonhomme F. Genetix version 4.05. Logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Montpellier, France: Laboratoire de Génome, Population, Interactions, Université de Montpellier II. 2001.
- [18] Peakall R. and Smouse P.E. GENALEX: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research; version 6.1. Canberra, Australia: Australian National University. www.anu.edu.au/BoZo/GenALEX/, 2001.
- [19] L. Perera, J.R. Russell, J. Provan and W. Powell. Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. *Euphytica* 122: 381–389, 2001.
- [20] Pokou N.N.D. Etude de la diversité des populations de la sélection récurrente réciproque du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et de quelques populations cultivées en milieu paysan en Côte d'Ivoire à l'aide de marqueurs microsatellites. Thèse de doctorat de l'Université de Cocody, Abidjan (Côte d'Ivoire). 139p, 2008.
- [21] B. Najimi, S. EL Jaafari, M. Jlibene and J.M. Jacquemin. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnologie, Agronomie Société et Environnement* 7 (1): 17–35, 2003.
- [22] Mhiri C., Grandbastien M.A. La génomique en biologie végétale, chapitre 19.C. Éléments transposables et analyse de la biodiversité végétale. Editeurs Morot- Gaudry et JF Briat. Editions INRA, Paris, pp: 377-401, 2004.
- [23] L. Perera, J.R. Russell, J. Provan and W. Powell. Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers *Euphytica* 132: 121-128, 2003.
- [24] R. Manimekalai and P. Nagarajan. Interrelationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using RAPD technique. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1137–1144, 2006.
- [25] Bourdeix R. and Othman A. Malayan Yellow Dwarf (MYD). In: Batugal P, Bourdeix R, Olivier JT, George MLC, editors. Catalogue of Conserved Coconut Germplasm. International, Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania, Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia, pp: 160-161, 2010.
- [26] K.J.N Konan, J.L. Konan, K.E. Koffi, P. Lebrun and A. Sangare. Coconut Microsatellite gene diversity analysis technology transfer to Côte d'Ivoire. *Biotechnology* 6 (3): 383-388, 2007a.
- [27] K.J.N. Konan, K.E. Koffi, K.J.L. Konan and K.E. Konan. Microsatellite gene diversity within Philippines dwarf coconut palm (*Cocos nucifera* L.) resources at Port- Bouët, Côte d'Ivoire. *Scientific Research and Essays* 6 (28), pp. 5986-5992, 2011.
- [28] Bourdeix R., Konan J.L. and Labouisse J.P. Vanuatu Tall (VTT). In: Batugal P, Bourdeix R, Olivier JT, George MLC, editors. Catalogue of Conserved Coconut Germplasm. International, Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania, Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia, pp: 292-293, 2010.
- [29] M. Sankaran, V. Damodaran, D. R. Singh, I. Jai Sankar and B.A. Jerard. Characterization and diversity assessment in coconut collections of Pacific Ocean Islands and Nicobar Islands. *African Journal of Biotechnology* 11 (97), 16320-16329, 2012.
- [30] R.N. Quaiacoe, S.K. Dery, R. Philippe, L. Baudouin, J.O. Nipah, J. Nkansah-Poku, R. Arthur, D. Dare, E.N. Yankey, F. Pilet and M. Dollet. Resistance screening trials on coconut varieties to Cape Saint Paul Wilt Disease in Ghana. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 16 (2): 132-136, 2009.
- [31] K.J.N. Konan, K.E. Koffi, J.L. Konan, P. Lbrun, S.K. Dery and A. Sangare. Microsatellite gene diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions resistant to lethal yellowing disease. *African journal of biotechnology* 6 (4): 341-347, 2007b.