

Tinga Jérémy OUÉDRAOGO

**CONSTRUCTION D'UNE CARTE DE LIAISON GÉNÉTIQUE
DU NIÉBÉ (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) ET
IDENTIFICATION DE MARQUEURS AFLP LIÉS AUX GÈNES
DE RÉSISTANCE AU *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke**

**Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)**


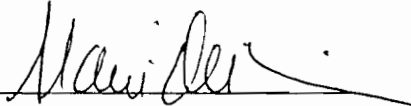

**Département de Phytologie
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC CANADA**

Avril 2001

© Tinga Jérémy Ouédraogo, 2001



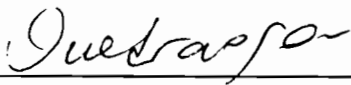
Ce 18^e jour du mois de avril ~~19~~ 2001 les personnes soussignées, en leur qualité de membres du jury de la thèse de Monsieur Tinga Jérémy Ouédraogo, ont assisté à la soutenance de cette thèse.

NOMS	UNIVERSITÉ	SIGNATURE
M. Marc Fortin	Université McGill	
M. Alain Olivier	Université Laval	
M. François Belzile	Université Laval	

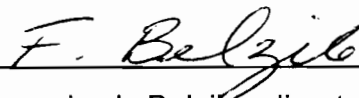

SIGNATURE DU PRÉSIDENT DE LA SOUTENANCE

RÉSUMÉ COURT

Cette étude nous a permis d'identifier des marqueurs AFLP fortement liés à des gènes conférant la résistance aux races 1 et 3 du *S. gesnerioides* chez cinq cultivars de niébé. Ces marqueurs sont liés soit en trans soit en cis au gène de résistance, permettant ainsi de déterminer le génotype d'une plante en se basant uniquement sur la présence/absence des marqueurs. Enfin, cette étude nous a permis de construire une nouvelle carte de liaison génétique du niébé. En enrichissant la carte existante de 260 marqueurs, dont 242 marqueurs AFLP, nous avons pu non seulement étendre la couverture du génome de 972 cM à 2670 cM, mais surtout couvrir une région de 586 cM que les marqueurs de la précédente carte n'avaient pas détectée. Les marqueurs de la présente carte sont répartis sur 11 groupes de liaison et comprennent dix marqueurs liés aux gènes de résistance aux races 1 et 3 de *S. gesnerioides*. Ces marqueurs sont placés sur les groupes de liaison 1 et 6. L'identification de ces marqueurs et la construction de cette carte constituent des pas importants vers l'application de la sélection assistée de marqueurs et le clonage positionnel des gènes de résistance au *S. gesnerioides* chez le niébé.



T. Jérémy Ouédraogo, étudiant



Pr. François J. Belzile, directeur de thèse

RÉSUMÉ LONG

Le *Striga gesnerioides* constitue une contrainte majeure à la production du niébé, notamment en Afrique subsaharienne. Cinq races différentes de ce parasite réparties dans plusieurs pays, ont été identifiées. Diverses variétés de niébé se sont montrées résistantes, mais aucune ne possède la résistance à l'ensemble des cinq races. Elles n'ont pas non plus, pour la plupart, de bonnes caractéristiques agronomiques. Pour assurer une lutte efficace contre la plante parasite, les sélectionneurs doivent relever le défi du pyramidage des gènes de résistance aux différentes races dans des cultivars possédant des caractères agronomiques intéressants. Pour ce faire, les récents progrès réalisés dans la technologie des marqueurs d'ADN se présentent comme une alternative pour rendre plus efficaces les méthodes conventionnelles de sélection et permettre de mieux envisager la caractérisation des gènes de résistance. Dans la perspective d'une meilleure connaissance des gènes de résistance, deux objectifs ont été visés dans la présente étude à savoir : 1) identifier des marqueurs d'ADN liés à ces gènes et 2) construire une carte de liaison génétique du niébé.

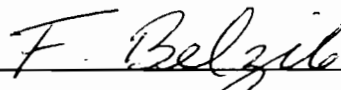
Dans le cadre de notre premier objectif, nous avons identifié plusieurs marqueurs AFLP fortement liés à des gènes conférant une résistance aux races 1 et 3 du *Striga gesnerioides*. Les gènes concernés sont présents dans des cultivars résistants à plusieurs races à la fois, notamment Gorom, IT81D-994, B301, IT82D-849 et Tvu14676. Certains de ces marqueurs sont communs aux trois gènes considérés, suggérant des relations alléliques entre eux ou l'existence de « clusters » dans le génome du niébé. Ces résultats constituent un excellent point de départ pour l'application d'un programme de sélection assistée de marqueurs.

Dans le deuxième volet de notre étude, nous avons construit une carte de liaison génétique intégrée du niébé en utilisant des marqueurs AFLP générés à partir d'une population de 94 lignées recombinantes. En plus des 181 marqueurs de la carte existante, 242 marqueurs AFLP et 18 marqueurs RFLP ont été ajoutés. La

nouvelle carte comprend 11 groupes de liaison, couvre 2670 cM et présente une densité moyenne de marqueurs de 6.4 cM/marqueur. De façon extrêmement surprenante, une très large portion continue du groupe de liaison 1, couvrant 580 cM, entièrement composée de nouveaux marqueurs AFLP, n'avait pas été détectée par les travaux de cartographie antérieurs. Sur la nouvelle carte, neuf marqueurs AFLP liés à différents gènes conférant la résistance aux races 1 et 3 du *Striga gesnerioides* ont été cartographiés sur les groupes de liaison 1 et 6. Ces deux groupes de marqueurs pourraient déterminer deux locus ou deux « clusters » de gènes de résistance à cette plante parasite. La construction de cette carte et l'identification des marqueurs liés aux gènes de résistance ouvrent des perspectives prometteuses pour la sélection assistée de marqueurs et le clonage positionnel de ces gènes.



T. Jérémy Ouédraogo, étudiant



Pr. François J. Belzile, directeur de thèse

AVANT-PROPOS

À la fin de ce programme de Doctorat et animé d'un sentiment de satisfaction pour avoir accompli cette tâche oh combien exaltante, je voudrais, du fond du cœur, exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont, par un concours quelconque, apporté leur contribution à la réalisation de mon projet de recherche.

Mes remerciements vont particulièrement à mes deux directeurs de thèse, le professeur Claude-André St-Pierre, qui a assuré cette charge du début de mon programme jusqu'à sa retraite en Septembre 2000, et le professeur François J. Belzile. Plus qu'un directeur de mes travaux, le professeur Claude-André St-Pierre a été un ami qui a su imposer à nos rapports un humanisme hors du commun. Je le remercie pour avoir cru en cette recherche et pour y avoir apporté son concours dans tous les aspects de sa réalisation. Je remercie le professeur François J. Belzile pour ses directives très éclairées, sa rigueur scientifique et pour tout le soutien constamment exprimé à mon égard.

Je remercie le professeur Michael Timko de l'University of Virginia aux États-Unis pour m'avoir accepté dans son laboratoire et m'avoir initié à la technique des AFLP.

J'aimerais dire merci au professeur Alain Olivier pour ses conseils et tout le soutien qu'il m'a apporté durant le déroulement de mon programme de recherche.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire pour le climat et l'ambiance extraordinaires de travail qu'ils entretiennent.

Je tiens à remercier le Programme Canadien des Bourses de la Francophonie pour le financement de mes études de doctorat.

Je voudrais dire ma gratitude et ma reconnaissance à mes parents qui ont encouragé cette aventure et pris soin de ma famille pendant ce très long séjour au Canada.

À mon épouse Raïssa Cornélia et à mes filles Wendy Ashley Pingdwendé et Chloé Baowendsom, je voudrais rendre un hommage particulier pour avoir accepté cette très dure épreuve de la séparation. Qu'elles trouvent en cette thèse le couronnement de leurs sacrifices inestimables.

Je remercie l'Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles du Burkina Faso pour tout le soutien apporté à mon projet.

À

-mon père Manéga Naaba Tanga

-mon épouse Raïssa Cornélia

-mes filles Wendy Ashley Pingdwendé et Chloé Baowendsom

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ COURT	I
RÉSUMÉ LONG	II
AVANT-PROPOS.....	III
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1 Le Striga.....	4
1.1.1 La spécificité des hôtes	5
1.1.2 La variabilité intra-spécifique	5
1.1.3 Les mécanismes de résistance	6
1.2 Le parasitisme du niébé par le <i>Striga gesnerioides</i>	8
1.2.1 Les sources de résistance.....	8
1.2.2 Les mécanismes de résistance	8
1.2.3 La variabilité intra-spécifique chez le <i>Striga gesnerioides</i>	10
1.2.4 La génétique et la sélection pour la résistance du niébé au <i>Striga gesnerioides</i>	11
1.2.4.1 Les modes d'hérédité de la résistance.....	11
1.2.4.2 Les relations alléliques entre les différents gènes de résistance.....	13
1.3 Les marqueurs d'ADN et l'amélioration des plantes.....	13
1.3.1 Les marqueurs génétiques.....	14

1.3.1.1 Les marqueurs morphologiques.....	14
1.3.1.2 Les marqueurs moléculaires.....	15
1.3.1.2.1 Les marqueurs biochimiques.....	15
1.3.1.2.2 Les marqueurs d'ADN.....	15
1.3.2 Les applications potentielles de la technologie de marqueurs d'ADN.....	17
1.3.2.1 Caractérisation du germoplasme.....	17
1.3.2.2 La construction des cartes de liaison génétique.....	18
1.3.2.3 Le marquage des gènes.....	19
1.3.2.4 La sélection assistée de marqueurs.....	22
1.3.2.5 Le clonage positionnel.....	24
 CHAPITRE II: Identification Of Aflp Markers Linked To Resistance Of Cowpea (<i>Vigna Unguiculata</i> (L.) Walp.) To <i>Striga Gesnerioides</i>	
	26
Résumé du manuscrit.....	28
Abstract.....	29
2.1 Introduction.....	30
2.2 Materials and methods.....	32
2.2.1 Plant material, growth conditions, and field experiments.....	32
2.2.2 DNA extraction.....	34
2.2.3 AFLP Analysis.....	35
2.2.4 Bulk design and bulked segregant analysis.....	36
2.2.5 Marker segregation, linkage analysis, and mapping.....	36
2.3 Results.....	37
2.3.1 Identification of AFLP markers linked to the <i>S. gesnerioides</i> race 1 resistance locus <i>Rsg2-1</i>	37
2.3.2 Identification of AFLP markers linked to <i>Rsg4-3</i> , a <i>S. gesnerioides</i> race 3 resistance locus.....	42
2.3.3 Placement of <i>Rsg2-1</i> and <i>Rsg4-3</i> on the cowpea genetic linkage map.....	44

2.4 Discussion.....	47
Acknowledgements.....	49
References	50
CHAPITRE III: AFLP markers linked to resistance against <i>Striga gesnerioides</i>	
race 1 in cowpea (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp).....	56
Résumé du manuscrit.....	58
Abstract.....	59
3.1 Introduction.....	60
3.2 Materials and methods.....	62
3.2.1 Plant material and growth conditions.....	62
3.2.2 Plant tissues collection and DNA extraction.....	63
3.2.3 AFLP Analysis.....	63
3.2.4 Bulked segregant analysis.....	63
3.2.5 Segregation and linkage analysis, and mapping.....	64
3.3 Results.....	64
3.3.1 Polymorphism rate and marker segregation analysis.....	64
3.3.2 Markers linked to the Gorom resistance gene.....	67
3.3.3 Identification of AFLP markers linked to the IT81D-994 resistance gene	69
3.3.4 Placement of the <i>Rsg3</i> and the <i>994-Rsg</i> loci on the cowpea genetic map .	69
3.4. Discussion.....	70
References	73

CHAPITRE IV: An Improved Genetic Linkage Map for Cowpea (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) Combining AFLP, RFLP, RAPD and Biochemical Markers and Biological Resistance Traits	77
RÉSUMÉ DU MANUSCRIT	79
ABSTRACT	80
4.1 Introduction.....	81
4.2 Material and methods	83
4.2.1 Plant material	83
4.2.2 DNA extraction.....	83
4.2.3 AFLP analysis.....	83
4.2.4 Mapping of resistance genes and resistance gene analogs.....	85
4.2.5 Marker nomenclature and segregation analysis.....	89
4.2.6 Linkage analysis and distribution of markers along the map	89
4.3 Results.....	90
4.3.1 Level of polymorphism between IT84S-2049 and 524B.....	90
4.3.2 Segregation of the markers and biological traits	93
4.3.3 The improved cowpea linkage map.....	93
4.3.4 Distribution of markers along the map.....	96
4.3.5 Genes conferring resistance to <i>Striga</i> located on LG1 and LG6.	96
4.3.6 Mapping of loci for biological resistance and other biochemical characteristics.....	97
4.4 Discussion	100
4.4.1 Polymorphism rate and segregation analysis.....	100
4.4.2 General features of the map.....	101
4.4.3 Distribution of markers along the map.....	103
4.4.4 Markers linked to <i>Striga</i> and other pathogen/pest resistance genes	103
References	105

CHAPITRE V: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	111
ANNEXE: L'UTILISATION DES MARQUEURS MOLECULAIRES EN SELECTION POUR LA RESISTANCE AU <i>STRIGA GESNERIODES</i> CHEZ LE NIEBE (<i>VIGNA UNGUICULATA</i>).....	116
Résumé.....	117
A.1 Introduction.....	118
A.2 Matériel et méthodes.....	121
A.2.1 Matériel végétal et expérimentation au champ	121
A.2.2 Extraction de l'ADN.....	122
A.2.3 Analyses BSA et AFLP	122
A.3 Resultats	123
A.3.1 Les marqueurs liés au gène de résistance à la race 1 de <i>S.</i> <i>gesnerioides</i>	123
A.3.2 Les marqueurs liés au gène de résistance à la race 3 de <i>S.</i> <i>gesnerioides</i>	126
A.3.3 Placement des marqueurs sur la carte génétique du niébé.....	126
A.4 Discussion.....	127
A.5 CONCLUSION.....	130
Bibliographie	131
LISTE COMPLÈTE DES OUVRAGES CITÉS.....	135

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau 1: Cultivars résistants et races de *S. gesnerioides* 11

Tableau 2: Modes d'hérédité de la résistance de cultivars de niébé 13

CHAPITRE II

Table 1 Parental lines and their resistance response to various races
of *Striga gesnerioides*..... 34

Table 2: Segregation ratios for resistance to *Striga gesnerioides* race 1
in two F₂ segregating populations 39

CHAPITRE III

Table 1 Segregation ratios for résistance to *Striga gesnerioides* race 1 in two F₂
segregating populations based on F₃ families 66

CHAPITRE IV

Table 1: Primer combinations used and polymorphism levels..... 89

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1: Cycle de vie du *Striga* et stades et mécanismes potentiels de résistance de l'hôte7

CHAPITRE II

Figure 1 (A, B, C): Autoradiographs showing AFLP markers linked to *Striga gesnerioides* race 1 resistance gene *Rsg2-1*. Shown are the results of AFLP analysis of DNA taken from resistant parents (RP) IT82D-849, susceptible parents (SP) Tvx3236, resistant (RB) and susceptible (SB) DNA bulks from F₂ progeny and DNA from individual homozygous resistant (RR) or susceptible (rr) F₂ progeny using different AFLP primer combinations. **A** The marker E-AAC/M-CAA₃₀₀ (indicated by arrow) linked in trans to resistance locus, amplified by primer combination E-AAC/M-CAA. **B** The marker E-ACAM-CAT₁₅₀ linked in trans and marker E-ACAM-CAT₁₄₀ (indicated by arrows) linked in cis, amplified by primer combination E-ACA/M-CAT. **C** The resistance marker E-ACT/M-CAA₅₂₄ (indicated by arrow) linked in cis to *Rsg2-1* amplified by primer combination E-ACT/M-CAA. Figure 3 Linkage map of AFLP markers E-AAC/M-CAA₃₀₀, E-ACAM-CAT_{140/150} and E-ACT/M-CAA₅₂₄ obtained with the IT82D-849 x Tvx3236 F₂ progeny41

Figure 2: Linkage map of AFLP markers E-AAC/M-CAA₃₀₀, E-ACAM-CAT_{140/150} and E-ACT/M-CAA₅₂₄ obtained with the IT82D-849 x Tvx3236 F₂ progeny..... 41

Figure 3 (A, B, C, D): Autoradiographs showing AFLP markers linked to *Striga gesnerioides* race 3 resistance gene *Rsg4-3*. Shown are the results of AFLP analysis of DNA taken from resistant parents (RP) Tvu14676, susceptible parents (SP) IT84S-2246-4, resistant (RB) and susceptible

(SB) DNA bulks from F₂ progeny and DNA from individual homozygous resistant (RR) or susceptible (rr) F₂ progeny using different AFLP primer combinations. **A** The marker E-AAC/M-CAA₃₀₀ (indicated by arrow) linked in trans to Rsg4-3 amplified by primer combination E-AAC/M-CAA. **B** The susceptibility marker E-ACA/M-CAT₁₅₀ (indicated by arrow) linked in trans to Rsg4-3 amplified by primer combination E-ACA/M-CAT. **C** The markers E-AGC/M-CAT₁₅₀ and E-AGC/M-CAT₇₀ linked in trans and the resistance marker E-AGC/M-CAT₈₀ (indicated by arrows) linked in cis to Rsg4-3 amplified by primer combination E-AGC/M-CAT. **D** The marker E-ACA/M-CAG₁₂₀ (indicated by arrow) linked in cis to Rsg4-3 amplified by primer combination E-ACA/M-CAG..... 43

Figure 4: Linkage map of AFLP markers EAAC-MCAA₃₀₀, E-ACA/M-CAT₁₅₀, and E-AGC/M-CAT₁₅₀, E-AGC/M-CAT₇₀, E-AGC/M-CAT₈₀ and E-ACA/M-CAG₁₂₀ obtained with the IT84S-2246-4 x Tvx14676 F₂ progeny. 45

Figure 5: Partial map of linkage group 1 of the cowpea genetic map showing the placement of the EAAC-MCAA₃₀₀ and E-ACA/M-CAG₁₂₀ AFLP markers. Map distances are shown in cM:..... 46

CHAPITRE III

Figure 1 Autoradiographs representing the BSA of the two populations studied. **(a)**: Marker E-AAG/M-CAA₅₀₀ linked in trans to the *Rsg3* resistance allele is present in the susceptible parent Tvx3236 (ps) and in the susceptible bulk (bs) whereas it is absent in the resistant parent Gorom (pR) and in the resistant bulk (bR). **(b)**: Markers E-AGAM-CAG₄₅₀ and E-AGAM-CAG₃₀₀ linked in cis to both the *Rsg3* and the IT81D-994 genes are present in resistant parent and bulk whereas they are absent in the susceptible parent and bulk 66

Figure 2 Linkage map of AFLP markers linked **(a)** to the Gorom resistance gene *Rsg3* and **(b)** to the IT81D-994 resistance gene *994-Rsg*. Markers E-AGAM-CAG₄₅₀ and E-AGAM-CAG₃₀₀ are common to both *Rsg3* and *994-Rsg*.....68

Figure 3 Partial linkage group 6 of the cowpea genetic linkage map.

The three markers linked to *Rsg3* and *994-Rsg* resistance genes are in bold..70

CHAPITRE IV

Figure 1 AFLP fingerprint of parental line IT84S-2049 (PA) and 524B (PB) and 37 RILs using the primer combination E-ACA/M-CAT..... 91

Figure 2 AFLP genetic linkage map of cowpea. Markers were scored from the parents (IT84S-2049 and 524B) and 94 RILs. Linkage groups length and markers number are indicated at the top. Markers linked to *Striga* resistance genes are colored in red in linkage groups 1 and 6. Distances (in cM) between adjacent markers are placed on the left. Markers and linkage groups of the Menéndez et al. (1997) map are colored and indicated at the bottom (M-LG). RGAs are bordered in red. Markers that could not be placed with a LOD 3 are listed under the linkage group they seem to be linked to. The markers not placed were AAC-CTA-3, Parthcarp AAC-CTT-10, ACA-CTA-7, ACG-CAA-10, AGG-CAT-1, R25 AAG-CTT-9.....94

Figure 3 ABC **(A)** Amplification pattern and polymorphism between the two parents IT84S-2049 (PA) and 524B (PB) amplified by the specific primers designed from the sequence of the ACT-CAA-8 maker linked to the IT (IT82D-849) resistance gene. **(B)** AFLP autoradiograph of the ACA-CAG-4 marker showing the same fragment in the *Striga* population parental lines Tv_x14676 (Tv) , IT84S-2246(22) and the polymorphism of the same band between the PA and PB. **(C)** The same fragment representing the marker AGA-CAG-1 revealed in the *Striga* resistant cultivar Gorom (G) that is

polymorphic between the PA and PB of the mapping population.....98

ANNEXE

Figure 1 Cartographie des marqueurs liés aux gènes de résistance *au S. generioides* (A) marqueurs liés au gène Rsg1 de résistance à la race 1 de *S. generioides* (B) marqueurs liés au gène Rsg4 de résistance à la race 3.....125

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN, DNA	acide désoxyribonucléique
AFLP	amplified fragment length polymorphism
bp	base pair
BSA	bulked segregant analysis
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequence
cM	centimorgan
g	gramme
IITA	International Institute of Tropical Agriculture
INERA	Institut de l'environnement et de recherches agricoles
LG	linkage group
MAS	marker-assisted selection
µg	microgramme
µl	microlitre
mg	milligramme
ml	millilitre
ng	nanogramme
PCR	polymerase chain reaction
QTL	quantitative trait loci
RAPD	random amplified polymorphism DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SCAR	sequence characterized amplified region
SSR	simple sequence repeat
STS	sequence tagged site

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les biotechnologies joueront un rôle important et constitueront un outil de plus en plus indispensable dans la lutte incessante pour produire suffisamment de quoi nourrir une population mondiale en constante croissance. Les progrès actuels vont ajouter d'autres approches qui contribueront à accroître l'efficacité de l'amélioration génétique conventionnelle et qui permettront de résoudre des problèmes environnementaux et de stabiliser la production alimentaire.

Les biotechnologies que Kumar (1999) définit comme « toute technique utilisant des organismes vivants ou des substances de ces organismes pour faire ou modifier un produit, améliorer des plantes ou des animaux ou pour développer des micro-organismes à des fins d'utilisations spécifiques » sont aujourd'hui incontournables en agriculture notamment à cause de leurs capacités à modifier les plantes, les animaux et les processus agricoles. Leurs applications en agriculture sont très variées : en culture de tissu et de cellule, elles permettent la propagation rapide des espèces végétales; en phytopathologie, il y a la détection des pathogènes basée sur l'utilisation des anticorps monoclonaux et des sondes d'acides nucléiques; en génie génétique végétal, le marquage moléculaire permet d'identifier les gènes d'intérêt agronomique, facilite leur cartographie, leur clonage et la sélection assistée de marqueurs (Persley, 1992).

L'un des principaux objectifs des sélectionneurs est de transférer un ou plusieurs caractères d'intérêt agronomique d'une source à un cultivar déficient. La méthode conventionnelle de sélection implique le croisement des individus suivi de l'identification des recombinants supérieurs. Ceci demande plusieurs générations de criblage minutieux. De plus, des caractères non désirables sont souvent liés au gène d'intérêt, empêchant la sélection de ce dernier uniquement. L'avantage des marqueurs moléculaires par rapport aux marqueurs morphologiques réside dans l'opportunité qu'offrent les premiers à identifier et à utiliser l'information sur le polymorphisme survenant naturellement au niveau de l'ADN entre les populations

(Simpson, 1999). Ces polymorphismes proviennent de petits changements dans les séquences d'ADN tels les mutations ponctuelles, les substitutions, les insertions, les translocations et les délétions des bases. Les techniques de marquage moléculaire permettent de détecter ces polymorphismes et le génotypage des individus. Elles contribuent à l'identification des marqueurs qui sont liés à des gènes d'intérêt agronomique. En outre, la détection de ces polymorphismes est indépendante des facteurs de développement, de la spécificité des tissus ou des facteurs environnementaux (Lee, 1995; Staub et al., 1996; Simpson, 1999).

Le développement des marqueurs moléculaires a conduit à l'étude très poussée et à la caractérisation au niveau génétique de plusieurs plantes comme la tomate et le maïs (Coe et Gardiner, 1994). Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) est l'une des cultures laissées pour compte dans ce domaine. Parmi les contraintes principales à sa production, le *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke, plante parasite de la famille des Scrophulariacées, cause des pertes de rendements qui atteignent 30 à 100% (Aggarwal et Ouedraogo, 1989; Muleba et al., 1997). Des nombreuses méthodes de lutte qui sont envisagées dans une stratégie de lutte intégrée, la résistance génétique variétale constitue une composante essentielle. Plusieurs cultivars résistants ont été identifiés (Singh et Emechebe, 1990a; Aggarwal, 1991; Muleba et al., 1996). Toutefois leur large utilisation est limitée par l'apparition de plusieurs races de *Striga* et les caractères agronomiques peu intéressants de la plupart de ces cultivars. Dans la recherche d'une stratégie d'intégration de l'ensemble des gènes de résistance dans des cultivars supérieurs et afin de permettre une meilleure connaissance de ces gènes et leur caractérisation, les techniques de la biotechnologie, notamment le marquage moléculaire, peuvent aider à résoudre cette contrainte que représente le *Striga* pour le niébé.

La présente étude a donc été entreprise dans le double but d'identifier des marqueurs d'ADN liés aux gènes de résistance au *Striga gesnerioides* et de construire une carte génétique du niébé.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Le *Striga*

Il y a plus de 3000 espèces d'angiospermes parasites réparties dans 17 familles des plantes à fleurs connues (Press et al., 1990). Parmi les plus importantes, on retrouve les familles des Scrophulariacées, des Orobanchacées, des Viscacées, des Loranthacées et des Convolvulacées. Le genre *Striga*, de la famille des Scrophulariacées est le plus dévastateur (Dörr, 1997). Quoiqu'on estime de 50 à 60 le nombre d'espèces de *Striga*, trois espèces parasites obligatoires sont reconnues comme étant économiquement importantes à cause des pertes de rendement qu'elles occasionnent. Ce sont le *Striga hermonthica* (Del.) Benth, le *Striga asiatica* (L.) Kuntze et le *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke. Le *S. hermonthica* est allogame alors que *S. asiatica* et *S. gesnerioides* sont autogames (Musselman et Hepper, 1986). Ces plantes parasites interagissent avec leur hôte à quatre niveaux (Press et al., 1990): il s'agit de la germination des graines de la plante parasite, de l'induction du développement de l'haustorium, du transfert de l'eau et des hydrates de carbones de l'hôte au parasite et de la réponse de l'hôte à l'infection. Tous les mécanismes physiologiques de l'interaction entre ces angiospermes parasites et leurs hôtes ne sont toutefois pas encore élucidés (Press et al., 1990; Dörr, 1997; Lane et al., 1997a, 1997b; Kim et al., 1998; Reiss et Bailey, 1998).

Le contrôle dans le temps et l'espace de la transition croissance végétative - croissance en tant que parasite est critique pour tout parasite mais essentiel pour les plantes parasites sessiles. Dans les phases de germination et de développement de l'haustorium, le parasite utilise des composés chimiques de son hôte comme éléments de reconnaissance. Le 2,6-dimethoxy-p-benzoquinone (DMBQ) a été identifié comme un signal naturel nécessaire et suffisant pour l'induction de l'haustorium chez plusieurs Scrophulariacées (Lynn et Chang, 1990; Yoder, 1997; Kim et al., 1998). Toutefois d'autres produits ont été identifiés (Visser et Dörr, 1987; Olivier, 1995, 1996). Des phénols de l'hôte seraient converties par des peroxydases en ces benzoquinones. Ces phénols oxydases ont été identifiés et les gènes codant pour eux ont été séquencés par Kim et al. (1998). Ces mêmes

auteurs rapportent que la production constitutive d'une forme d'oxygène activé, le peroxyde d'hydrogène dans le cas du *Striga*, sert d'intermédiaire dans la reconnaissance de l'hôte.

1.1.1 La spécificité des hôtes

Le genre *Striga* est parasite d'une large gamme de plantes. Le *S. hermonthica* et le *S. asiatica* parasitent les monocotylédones comme le sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), le mil (*Pennisetum typhoides* Burm. (L.) R. Br.), le maïs (*Zea mays* (L.)), le riz (*Oriza sativa*) et la canne à sucre (*Saccharum officinarum* L.). Le *S. gesnerioides* parasite des légumineuses, notamment le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) et l'indigo (*Indigofera indica*). Il parasite également le tabac (*Nicotiana tabacum*) et la patate douce (*Ipomoea batata*). La spécificité de l'hôte pourrait être basée sur la satisfaction des besoins du parasite pour la germination, l'attachement et ses exigences nutritionnelles (Ramaiah, 1987).

1.1.2 La variabilité intra-spécifique

L'existence de plusieurs races de *Striga* a été montrée chez le *S. hermonthica* (Bebawi, 1981; Obilana, 1984; Ramaiah, 1987), le *S. asiatica* (Bharathalakshmi et Jayachandra, 1984, 1986) et le *S. gesnerioides* (Parker et Polniaszek, 1990; Shawe et Ingrouille, 1993; Lane et al., 1997a, 1997b). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène. Selon Ramaiah (1984), la spécialisation résulterait de la fréquence avec laquelle un hôte est cultivé par rapport à un autre. Olivier et al. (1998) ont étudié la structure et la diversité génétique de plusieurs populations de *S. hermonthica* et ont conclu que la divergence génétique inter-populations était faible et que, par conséquent la spécialisation de l'hôte pourrait être un phénomène récent. Pour cette plante parasite, la faible spécificité pour son hôte constituerait, à court terme, une contrainte à l'introduction de nouveaux cultivars résistants, lesquels pourraient devenir sensibles au bout de quelques années.

Dans le cas du *S. gesnerioides* qui parasite des légumineuses comme le niébé, aucune étude n'a été entreprise sur la génétique de ses populations.

1.1.3 Les mécanismes de résistance

Un certain nombre de mécanismes ont été suggérés pour expliquer la résistance de la plante hôte au *Striga*. Il a été montré que les génotypes diffèrent dans la production des exsudats racinaires, stimulants chimiques requis pour la germination des graines de *Striga*. Les génotypes qui en produisent de faibles quantités se sont pour la plupart révélés résistants au champ (Ramaiah et Parker, 1982; Hess et al., 1992). Saunders (1933) relie la résistance à l'existence de barrières mécaniques qui empêcheraient l'haustorium d'envahir les cellules corticales. Maiti et al. (1984) ont trouvé dans des cultivars résistants de sorgho que l'attachement de l'haustorium était obstrué par la lignification des cellules du péricycle et l'épaississement des cellules de l'endoderme à la suite du dépôt de silice dans les racines. Des mécanismes de résistance survenant après la pénétration et l'attachement de l'haustorium ont été aussi rapportés. Il y a l'antibiose, où les stimulants nécessaires pour la germination et la formation de l'haustorium sont produits mais l'attachement de l'haustorium et le développement du parasite sont inhibés (Ramaiah, 1987 ; Doggett, 1988). Ce mécanisme pourrait s'appliquer surtout au niébé (Lane et al., 1997b). Il apparaît qu'un cultivar qui combine des gènes de résistance pour plusieurs mécanismes assurerait une résistance plus durable et plus stable. Ces mécanismes se situent à différents stades entre la germination et l'émergence de la plante parasite (Figure 1). L'exploitation judicieuse de certains de ces mécanismes peut contribuer à éliminer les stocks de graines du parasite dans le sol. C'est le cas d'une plante hôte qui produirait de grandes quantités de stimulants de germination mais pas ou très peu de stimulants inducteurs de la formation de l'haustorium.

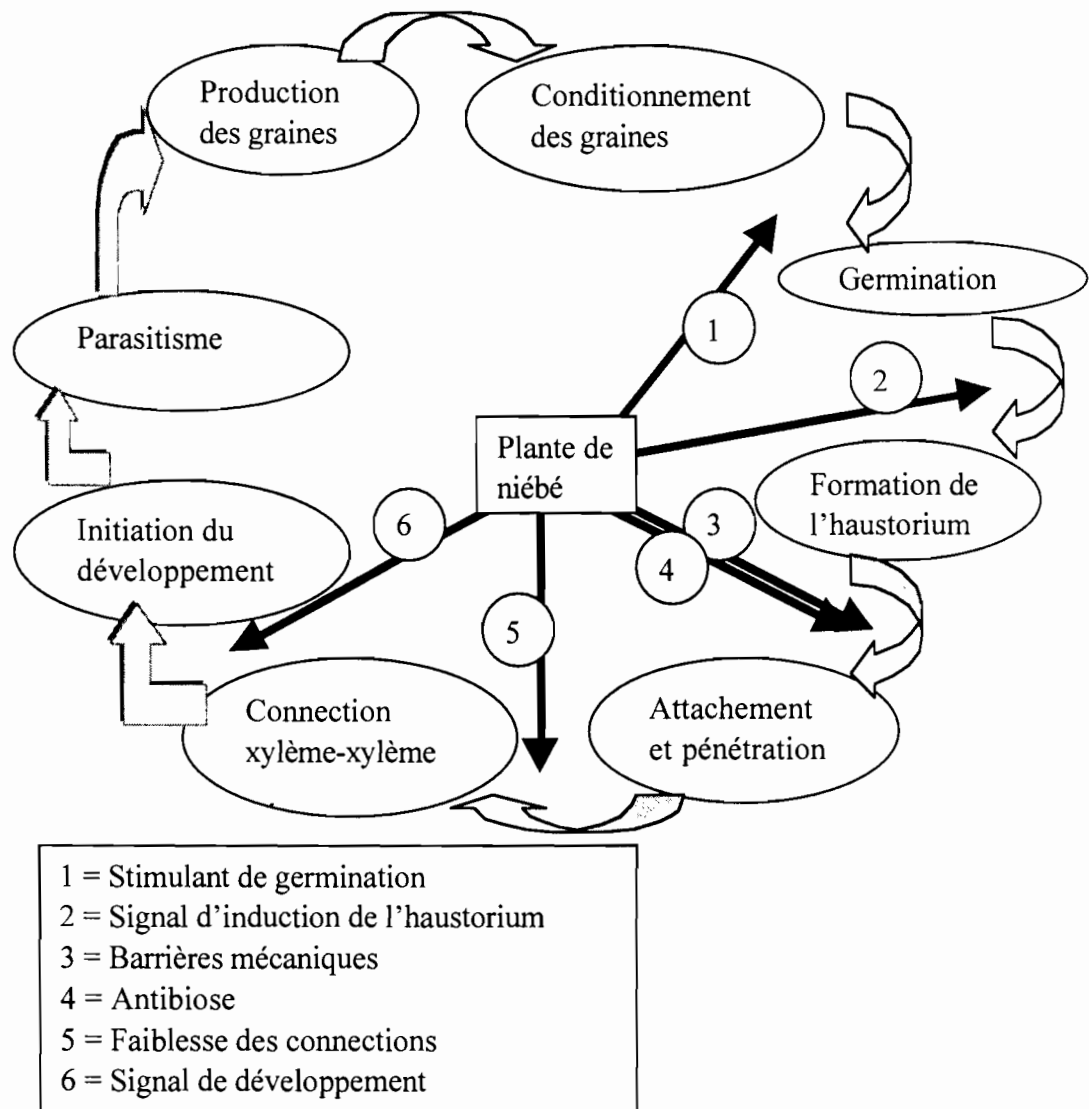


Figure 1: Cycle de vie du Striga et stades et mécanismes potentiels de résistance de l'hôte

1.2 Le parasitisme du niébé par le *Striga gesnerioides*

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) est une légumineuse importante en Afrique sub-saharienne, au Brésil et en Inde où il est cultivé dans les zones semi-arides.

Sa valeur vient de sa haute teneur en protéines. Parmi les nombreuses contraintes à sa production, le *Striga gesnerioides* est l'une des plus dévastatrices. Les pertes de

rendement que cause cette plante parasite varient de 30 à 100 % (Aggarwal et Ouedraogo, 1989; Muleba et al., 1997). Des différentes méthodes de lutte envisagées dans une perspective de lutte intégrée, la résistance génétique variétale est une composante essentielle. Les efforts des programmes d'amélioration ont essentiellement porté sur la sélection de cultivars résistants.

1.2.1 Les sources de résistance

Plusieurs sources de résistance ont été identifiées dont les plus connues et les plus utilisées dans les programmes de croisement sont présentées dans le tableau 1 (Aggarwal et al., 1984; Singh et Emechebe, 1990; Aggarwal, 1991; Lane et al., 1994; Atokple et al., 1995). En plus de l'évaluation de la résistance de ces cultivars au champ, des tests in vitro ont confirmé ce caractère (Lane et al., 1991, 1996; Moore et al., 1995). Ces tests in vitro ont consisté à répandre un nombre connu de graines de *Striga* sur les racines d'une plantule de niébé dans un plat de petri contenant un papier filtre en fibre de verre. La relation hôte parasite est ainsi plus intime, plus efficace et mieux quantifiable. Plusieurs races de *Striga* peuvent également être testées en une seule expérimentation.

1.2.2 Les mécanismes de résistance

À la suite d'observations que nous avons personnellement faites sur des plantes inoculées en pots et au champ, confirmées par celles de Lane et al. (1995, 1997) et Atokple et al. (1995), différents mécanismes variant selon les génotypes ont été

notés. Dans tous les cas, la réaction de résistance se manifeste après la germination et

Tableau 1: Cultivars résistants et races de *S. gesnerioides*

Cultivars de niébé	Origine	Races de <i>Striga gesnerioides</i>				
		1	2	3	4	5
Gorom (Suvita-2)	Burkina Faso	R	R	S	R	S
58-57	Sénégal	R	S	S	R	R
B301	Botswana	R	R	R	S	R
IT81D-994	IITA/Nigeria	R	R	S	R	S
IT82D-849	IITA/Nigeria	R	R	R	S	R

R = résistant; S = sensible

même un début de pénétration des racines du niébé par les cellules intrusives de l'haustorium. Ces mécanismes de résistance peuvent se résumer en quatre catégories : (1) Après la germination et l'induction de l'haustorium, l'attachement de celui-ci n'est pas complété à cause d'une réaction d'hypersensibilité. Cette réaction que nous avons observée chez le cultivar Gorom (Suvita-2) infecté par le *Striga* du Burkina Faso a également été notée sur le cultivar 58-57 (Lane et al., 1993, 1997b). Une telle réaction d'hypersensibilité serait associée à la présence de phytoalexines (phaseoline, phaseollidine et phaseollinisoflavane) chez des légumineuses proches du niébé et résistantes au *Striga gesnerioides* (Lane et al., 1996). (2) L'attachement de l'haustorium est réalisé mais sa croissance est inhibée et sa taille demeure inférieure à un millimètre de diamètre. Cette réaction est caractéristique du cultivar B301. Des études ultrastructurales conduites par Reiss et al. (1995) sur ce cultivar ont montré que les connections xylème - xylème entre le *Striga* et les racines de B301 étaient très peu nombreuses comparativement à celles entre le parasite et la variété sensible. Ces connections qui assurent la canalisation de l'eau et des hydrates de carbone de l'hôte vers le parasite sont vitales pour ce dernier. L'inefficacité dans l'établissement de ces connections est donc préjudiciable au *Striga* et constitue un mécanisme de résistance efficace. (3) Les plantules de *Striga*

établissent les connections, croissent pendant quelques jours, mais meurent avant d'avoir pu émerger du sol. Ce type de réaction permet de réduire considérablement les stocks de graines de *Striga* dans le sol tout en empêchant le parasite d'en produire de nouvelles. Il a été observé chez les cultivars IT82D-849 et IT91D-994 sous infestation par le *Striga* du Burkina Faso. (4) Certains cultivars ont la capacité non pas d'empêcher la croissance du *Striga* mais plutôt de retarder son émergence. Pour ces cultivars ayant un cycle semi-maturité de 75 jours, le *Striga* germes environ 60 jours après le semis et émergera du sol seulement après la récolte. Il a en ce moment très peu de réserves pour compléter son cycle. L'importance de ce type de réaction réside surtout dans une stratégie de lutte visant à réduire le stock de semences du parasite dans le sol.

1.2.3 La variabilité intra-spécifique chez le *Striga gesnerioides*

À la suite de l'identification de Gorom (Suvita-2) et 58-57 comme résistants au *S. gesnerioides* au Burkina Faso, ces cultivars ont été testés dans d'autres pays (Mali, Niger et Nigeria). Gorom s'est montré sensible au *S. gesnerioides* du Niger et du Nigeria et résistant à celui du Mali. 58-57 était sensible dans ces trois pays (Aggarwal, 1988). Ces tests ont ainsi montré l'existence de différences dans les populations de *S. gesnerioides* dans ces différents pays. Parker et Polniaszek (1990) puis Lane et al. (1994, 1997b) confirmeront l'existence de ces différentes races en testant plusieurs populations du parasite sur des cultivars résistants. A ce jour cinq races ont été identifiées (Lane et al., 1997) qui se répartissent dans presque tous les pays au sud du Sahara. Toutefois la caractérisation faite par Lane et al. (1997b) ne concerne que quelques pays où l'on rencontre une ou plusieurs races : Benin (races 4 et 5), Burkina Faso (race 1 et 5), Cameroun (race 5), Mali (races 1 et 2), Niger (race 3), Nigeria (races 3 et 5) et Togo (race 1). Parmi les cultivars de niébé actuellement utilisés par les agriculteurs de ces régions, aucun n'est résistant à toutes les races de *S. gesnerioides* connues (Tableau 1). Toutefois, des lignées prometteuses créées par l'Institut international d'agriculture tropicale (IITA) sont en évaluation (Singh, 1999). L'existence de plusieurs races de

Striga rend plus difficile l'amélioration pour ce caractère. Pour obtenir une résistance plus durable et plus stable, il s'avère en effet indispensable de procéder au pyramidage des gènes de résistance à ces cinq races dans un seul cultivar supérieur. Un programme conventionnel de criblage avec le parasite implique l'introduction des semences des différentes races en un seul endroit, ce qui exigerait des précautions drastiques d'isolement et de quarantaines que les programmes d'amélioration des pays concernés par le *Striga* ne peuvent pas assurer.

1.2.4 La génétique et la sélection pour la résistance du niébé au *Striga gesnerioides*

Deux principaux types d'études ont été menés pour comprendre la génétique de la résistance du niébé au *S. gesnerioides* : l'étude des modes d'hérédité du caractère de résistance et la détermination des relations alléliques entre les différents gènes de résistance.

1.2.4.1 Les modes d'hérédité de la résistance

Les modes d'hérédité ont été déterminés pour les gènes de résistance que possèdent les cultivars Gorom, B301, IT81D-994 et IT82D-849. Les races de *Striga* utilisées sont dans certains cas difficiles à préciser. La race 1 a été employée au Burkina Faso pour déterminer le mode d'hérédité de la résistance chez Gorom, B301, IT81D-994 et IT82D-849 (Aggarwal et al., 1984; Ouedraogo et al., 2001). La race 2 a été utilisée dans le cas de IT82D-849, B301 et Gorom (Touré et al., 1997). Les études faites au Nigeria dans les cas de IT82D-849 et B301 ne précisent pas la race (3 ou 5) qui a été utilisée (Singh et Emechebe, 1990; Atokple et al., 1995). Notons que ces cultivars sont résistants à ces deux races. Des résultats de ces différentes investigations, il ressort que pour la plupart des cultivars et origines de *Striga*, la résistance est contrôlée par un gène dominant (voir le récapitulatif au tableau 2). Toutefois, le cas du cultivar IT82D-849 reste une exception. Les résultats

de l'étude menée par Touré et al. (1997) en utilisant les semences de *Striga* de Maradi (Niger) contredisent ceux qu'ont obtenus Atokple et al. (1995) en utilisant le *Striga* du Nigeria et le même cultivar. En effet, la résistance à la souche de *Striga* de Maradi serait contrôlée par un gène récessif chez IT82D-849. Un gène dominant serait impliqué dans la résistance de ce cultivar au *Striga* du Nigeria, du Burkina ou du Mali. La différence de race pourrait expliquer ce phénomène, de même que l'existence des divers mécanismes de résistance au *S. gesnerioides*.

**Tableau 2 Modes d'hérédité de la résistance de cultivars de niébé
au *S. gesnerioides***

Cultivars	*Race/Origine du <i>Striga</i>	Mode d'hérédité	Références
Gorom (Suvita-2)	Race 1/Burkina Faso	1 gène dominant	Aggarwal et al. (1984)
B301	Race 1/Burkina Faso	1 gène dominant	Ouédraogo et al. (2001, in press)
	Race 2/Mali	1 gène dominant	Touré et al. (1997)
	Nigeria	1 gène dominant	Singh et Emechebe (1990)
	Race 3/Niger	1 gène dominant	Touré et al. (1997)
IT82D-849	Race 1/Burkina Faso	1 gène dominant	Ouédraogo et al. (2001, in press)
	Race 2/Mali	1 gène dominant	Touré et al. (1997)
	Nigeria	1 gène dominant	Atokple et al (1995)
	Race 3/Niger	1 gène récessif	Touré et al. (1997)
IT81D-994	Race 1/Burkina Faso	1 gène dominant	Ouédraogo et al. (2001, in press)

* Il s'agit de la race ou de l'origine des semences de *Striga* utilisées dans l'étude

1.2.4.2 Les relations alléliques entre les différents gènes de résistance

Les travaux sur les relations alléliques entre les gènes de résistance ont été effectués par Atokple et al. (1995). A l'aide de populations issues des croisements Gorom x B301 et Gorom x IT82D-849, criblées sous infestation avec les semences de la race 1 de *Striga*, ils ont montré que le gène de résistance du cultivar Gorom était différent de celui de B301 et de celui de IT82D-849. En étudiant les descendants du croisement B301 x IT82D-849 sous infestation avec les semences de la race 3 de *Striga*, ces mêmes auteurs ont trouvé que ces deux cultivars avaient deux gènes différents mais probablement liés. Ils ont alors proposé les sigles Rsg_1 , Rsg_2 et Rsg_3 pour désigner les gènes de résistance des variétés B301, IT82D-849 et Gorom respectivement.

Au regard de la diversité des races, des modes d'hérédité et de la présence de plusieurs gènes de résistance, il est évident que les méthodes conventionnelles de sélection seules ne permettront pas une sélection efficace et rapide de cultivars supérieurs résistants à toutes les races de *S. gesnerioides*. Heureusement, il existe aujourd'hui plusieurs outils de biotechnologies végétales qui ont permis dans le cas d'autres cultures, de mieux comprendre les mécanismes de résistance à des pathogènes, de caractériser les gènes de résistance et de rendre plus efficaces et plus rapides le pyramidage des gènes et la sélection de variétés résistantes. Le marquage moléculaire est l'un de ces outils (Paterson et al., 1991; Lee 1995; Kumar, 1999; Simpson, 1999).

1.3 Les marqueurs d'ADN et l'amélioration des plantes

La technologie des marqueurs moléculaires a fait des progrès énormes ces deux dernières décennies. Les marqueurs d'ADN en particulier ont fourni des outils de valeur pour toutes sortes d'analyses allant des analyses phylogénétiques au clonage positionnel des gènes (Lee, 1995). Le développement de cartes de haute

densité qui a été facilité par les marqueurs basés sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a rendu possible la cartographie et la caractérisation de presque tout caractère (Simpson, 1999). La sélection assistée de marqueurs permet le « pyramidage » de plusieurs gènes de résistance aux pathogènes (Young, 1999). D'autres applications comme le « fingerprinting » des génotypes et la cartographie comparée sont des outils aujourd'hui utilisés de façon routinière (Kumar, 1999).

1.3.1 Les marqueurs génétiques

Les marqueurs génétiques sont des segments d'un chromosome qui servent de points de balise à l'analyse du génome. Les différences entre deux chromosomes peuvent être détectées de plusieurs manières (Paterson et al., 1991) : certaines par l'observation des individus (marqueurs visibles); d'autres en testant les enzymes (isozymes) et encore d'autres par l'analyse de l'ADN lui-même (marqueurs d'ADN). On distingue alors deux principaux types de marqueurs génétiques : les marqueurs morphologiques et les marqueurs moléculaires (Lee, 1995; Staub et al., 1996; Kumar, 1999). Ils sont transmis selon les lois de Mendel (Lefebvre et Chèvre, 1995). Pour être un bon marqueur génétique, tout marqueur doit avoir les caractéristiques suivantes à savoir être neutre, polymorphe, codominant, indépendant du milieu et non épistasique.

1.3.1.1 Les marqueurs morphologiques

Les marqueurs morphologiques sont en général des caractères qualitatifs qui peuvent être observés visuellement. Ils sont apparus naturellement ou des suites de mutagenèses. Les caractères morphologiques contrôlés par un seul locus peuvent servir de marqueurs génétiques à condition d'être reproductibles indépendamment des environnements. En plus de l'environnement, l'expression de ce type de marqueurs peut être influencée par des interactions épistatiques et pléiotropiques. Le nombre des marqueurs morphologiques est très limité. Ils sont généralement dominants, rendant impossible de faire la distinction entre individus homozygotes et hétérozygotes. (Lefebvre et Chèvre, 1995; Kumar, 1999).

1.3.1.2 Les marqueurs moléculaires

On distingue deux types de marqueurs moléculaires : il y a ceux dont le polymorphisme est révélé au niveau des protéines, les marqueurs biochimiques et ceux qui le révèlent au niveau de l'ADN, les marqueurs d'ADN.

1.3.1.2.1 Les marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques sont des protéines produites par l'expression de gènes et qui peuvent être séparées par électrophorèse afin d'en identifier les allèles. Les marqueurs les plus communément utilisés sont les isozymes (Vodenicharova, 1989). Les isozymes sont différentes formes d'une protéine (molécules différemment chargées). Généralement codominants, ils sont le produit de différents allèles d'un ou de plusieurs gènes. Ils ont servi à l'identification de marqueurs liés à plusieurs gènes tels les gènes de résistance au nématode (*Meloidogyne* spp) (Rick et Fobes, 1974) et à la fusariose (*Fusarium oxysporum*) (Bournival et al., 1989) chez la tomate. Toutefois, leur utilisation est limitée à cause de leur petit nombre dans les plantes cultivées et aussi parce qu'ils sont sujets à des modifications post-traductionnelles (Staub et al., 1982).

1.3.1.2.2 Les marqueurs d'ADN

Les marqueurs d'ADN peuvent être classés selon plusieurs critères. Par exemple, en prenant en compte la façon dont le polymorphisme est révélé, on distingue les marqueurs dont les polymorphismes sont basés sur l'hybridation et les marqueurs dont les polymorphismes sont révélés suite à une amplification par PCR. Du point de vue des sélectionneurs, il est peut-être plus indiqué de parler de marqueurs spécifiques de locus et codominants et de marqueurs non spécifiques de locus et dominants. Les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les microsatellites (Single Sequence Repeat, SSR) sont des marqueurs

codominants spécifiques de locus, révélés individuellement (Kumar, 1999). Les marqueurs RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990) et AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos et al., 1995) sont des marqueurs qui sont révélés en masse et développés en utilisant la PCR. Ce sont des marqueurs dominants non spécifiques de locus. Ces quatre types de marqueurs sont les plus utilisés (Simpson, 1999).

La méthode AFLP qui passe de nos jours pour la méthode la plus employée doit cette place au fait qu'elle combine la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et de polymorphisme d'amplification avec des amorces de séquences arbitraires. C'est cette combinaison enzymes de restriction/amorces qui permet de révéler le polymorphisme entre les individus.

Divers types de marqueurs basés sur la PCR peuvent être dérivés des marqueurs RFLP, SSR, RAPD ou AFLP. Ils sont issus d'amorces elles-mêmes provenant de la connaissance des séquences des marqueurs principaux. Une amorce conçue pour s'hybrider à la séquence nucléotidique des bouts d'une sonde RFLP donnera un type de marqueurs PCR qui révélera du polymorphisme à l'intérieur des produits d'amplification, les « Sequence Tagged Sites », STS. Si l'amplification ne révèle pas de polymorphisme de longueur, le produit est alors digéré à l'aide d'un ou quelques enzymes de restriction à quatre base et les fragments qui en résultent sont appelés des « Cleaved Amplified Polymorphic Sequence », CAPS (Konieczny et Ausubel, 1993). Ce type de marqueurs est plus facile d'utilisation et ne requiert pas de radioactivité.

En partant des séquences des extrémités des fragments RAPD ou AFLP, des amorces spécifiques de 24 nucléotides environ peuvent être synthétisées et utilisées pour amplifier l'ADN génomique par PCR. Il résulte de la caractérisation du produit d'amplification un type de marqueur appelé « Sequence Characterized Amplified Region », SCAR (Paran et Michelmore, 1993). Ces marqueurs sont en général codominants. Le succès de l'amplification qui dépend énormément de la température d'appariement peut ne pas révéler de polymorphisme; alors on procède à une digestion par des enzymes de restriction (Bradeen et Simon, 1998; Lahogue et al., 1998; Lu et al., 1999, 2000). Plusieurs autres types de marqueurs

existent (Kumar, 1999; Simpson, 1999). Mais quelle est la base moléculaire et la valeur relative des marqueurs d'ADN?

Les marqueurs d'ADN proviennent de plusieurs classes de mutations. La plus simple est une substitution d'un seul nucléotide qui, en éliminant un site de restriction change la longueur des fragments d'ADN détectés par la technique appropriée (RFLP par exemple). Ce polymorphisme devient alors un marqueur capable de représenter le génotype d'un individu. Dans les tests basés sur la PCR, une telle substitution dans la région d'appariement d'une amorce aura le même effet. Les autres classes sont des réarrangements qui interviennent entre deux sites de restriction ou deux sites d'appariement d'amorces et qui génèrent des marqueurs. De tels réarrangements comprennent des insertions ou des délétions d'éléments mobiles (transposons) ou des erreurs de réplication de séquences répétées en tandem (Paterson, 1996).

1.3.2 Les applications potentielles de la technologie de marqueurs d'ADN

Les principales applications des marqueurs d'ADN sont la caractérisation du germoplasme, le génotypage ou l'empreinte génétique des plantes, la construction des cartes de liaison génétique, la mise en évidence et le suivi des gènes d'intérêt, la sélection assistée de marqueurs et le clonage positionnel des gènes (Paterson et al., 1991 ; Lee, 1995 ; Lefebvre et Chèvre, 1995 ; Staub et al., 1996 ; Ribaut et Hoisington, 1998 ; Kumar, 1999 ; Simpson, 1999).

1.3.2.1 Caractérisation du germoplasme

L'application la plus simple des marqueurs d'ADN est la caractérisation et l'identification du germoplasme (Simpson, 1999). Les marqueurs d'ADN ont été très utilisés pour déterminer les empreintes génétiques des plantes. Cette caractérisation intervient à différents niveaux : -l'identification variétale où il devient possible de distinguer les lignées et de reconnaître les parents des hybrides ; -le contrôle de la pureté variétale dans lequel il s'agit de détecter des contaminations variétales de lots de semences, de hors-types pendant la croissance des plantes et

d'évaluer l'homogénéité de la variété à tout stade du programme de sélection ; -la protection variétale qui, avec l'identification permettra de détecter des contrefaçons ou des copies de cultivars.

Le puissant pouvoir de discrimination des plantes qu'offrent les marqueurs d'ADN a très souvent été utilisé pour identifier les différentes accessions d'une banque, les relations entre elles et les éventuels duplicata (Hill et al., 1996 ; Kresovich et al., 1992 ; Mohan et al., 1997).

1.3.2.2 La construction des cartes de liaison génétique

La cartographie génétique est rendue possible par le fait que le génome nucléaire des organismes supérieurs est organisé et transmis à la descendance sous forme d'unités linéaires, les chromosomes. La liaison génétique ou la co-transmission des parents aux descendants des marqueurs génétiques qui sont proches les uns des autres sur le même chromosome, permet de déterminer l'ordre des marqueurs d'ADN le long du chromosome. Pour mieux utiliser le nombre illimité de polymorphismes que révèlent les marqueurs d'ADN, il est nécessaire de connaître leur emplacement individuel dans le génome et cette localisation peut être obtenue en construisant une carte de liaison génétique. Les marqueurs d'ADN ont été intensément utilisés pour construire des cartes de liaison détaillées (Chang et Meyerowitz, 1991 ; Jung, 1992 ; Mohan et al., 1997).

La construction d'une carte génétique comprend quatre principales étapes : (1) le choix d'une population de cartographie appropriée (2) l'estimation des fréquences de recombinaison des toutes les paires de marqueurs, (3) l'établissement des groupes de liaison et l'estimation des distances cartographiques entre les marqueurs et (4) la détermination de l'ordre des marqueurs dans chaque groupe de liaison.

Les types de populations les plus couramment utilisées sont les populations issues de backcross, les populations F2 et les lignées recombinantes et les populations d'haploïdes doublés (Paterson, 1996). De nos jours plusieurs logiciels informatiques permettent de compléter les trois dernières étapes de la

cartographie. Il s'agit notamment de Linkage 1 (Suiter et al., 1983), Mapmaker (Lander et Botstein, 1986 ; Lander et al., 1987), GMendel (Echt et al., 1992), MapManager (Manly et Elliot, 1991) et JoinMap (Stam, 1993).

La carte est complète ou saturée lorsque tout point du génome est génétiquement lié au moins à un marqueur. Dans ce cas, le nombre de groupes de liaison correspond au nombre gamétique de chromosomes (Paterson, 1996).

Dans le cas du niébé ($2n = 22$), la dernière carte de liaison génétique a été construite à partir d'une population de lignées recombinantes issues du croisement entre deux variétés cultivées (Menéndez et al., 1997). Elle comprend 181 markers et intègre les marqueurs de la carte précédente faite par Fatokun et al. (1992). Ces 181 marqueurs se composent de 133 marqueurs RAPD, 19 marqueurs RFLP, 25 marqueurs AFLP, trois marqueurs morphologiques et un marqueur biochimique. Ils ont identifié 12 groupes de liaison couvrant 972 cM pour une taille du génome du niébé de 613 millions de paires de bases (Arumuganathan et Earle, 1991). Au regard de ces résultats, la carte génétique du niébé demande encore beaucoup de marqueurs pour être saturée, ce qui permettra l'identification de plusieurs marqueurs liés à des gènes d'intérêt. Les cartes génétiques, largement basées sur les marqueurs d'ADN, offrent aux biologistes et aux sélectionneurs des outils divers pour analyser le mode d'hérédité des caractères importants sur le plan agronomique, pour suivre la transmission de gènes spécifiques qui contrôlent ces caractères.

1.3.2.3 Le marquage des gènes

Certains caractères d'intérêt pour les améliorateurs sont contrôlés par des gènes uniques et dominants, tels les gènes de résistance à certains pathogènes ou ceux contrôlant la couleur. Les individus peuvent alors être séparés en classes discrètes, sur la base de leur phénotype. Par exemple, résistant/sensible, graine blanche/graine brune etc. L'avènement de la technologie des marqueurs moléculaires a permis l'élaboration de méthodologies pour localiser les gènes majeurs contrôlant ce type de caractères. Le principe est le même que celui servant

à l'élaboration des cartes génétiques. Il s'agit dans ce cas précis de trouver les marqueurs les plus proches possibles du gène, ce qui accroît les chances de leur co-transmission. L'identification des marqueurs fortement liés au gène d'intérêt permettra d'opérer la sélection en se basant sur le génotype du marqueur (Ribault et Hoisington, 1998). On peut alors tester les descendants à des stades de développement plus précoces sans avoir besoin d'attendre la croissance complète de la plante. De plus les tests d'infection seront moins fréquentes et ne seront utiles que pour s'assurer de la présence du gène. Cette méthodologie accroîtra la vitesse et l'efficacité de la sélection, mais réduira aussi le temps nécessaire pour créer un nouveau cultivar (Simpson, 1999). Dans le but de rendre cette stratégie fonctionnelle, des méthodes efficaces d'identification de marqueurs fortement liés aux gènes d'intérêt ont été développées dont les deux plus largement utilisées sont l'analyse des lignées quasi isogéniques (Young et al., 1988 ; Muehlbauer et al., 1988) et l'analyse des ségrégants en mélange (Bulked segregant analysis, BSA) (Michelmore et al., 1991). L'utilisation des lignées quasi isogéniques vient du fait que 80-90% du génome est identique pour ces lignées. Ce sont donc des lignées qui possèdent le même génotype, à l'exception d'un locus qui a fixé des allèles différents. Tout marqueur qui détecterait un polymorphisme a relativement de fortes chances d'être associé au locus qui distingue les deux lignées. Il faut toutefois relever que la création des lignées quasi isogéniques (par des backcross) est longue et peut conduire à la détection de faux-positifs (Paran et Michelmore, 1993). L'analyse des ségrégants en mélange est alors apparue comme une alternative de qualité.

La BSA est effectuée sur une population en ségrégation F_2 , F_3 ou backcross dans laquelle les ségrégants sont caractérisés pour un caractère et séparés en groupes selon leur génotype. Par exemple des plantes résistantes et des plantes sensibles à une maladie. L'ADN de chaque individu est alors extrait et un mélange (bulk) de quantité égale est effectué. Un premier bulk comprendra l'ADN d'individus homozygotes résistants et un second, l'ADN des individus homozygotes sensibles. Après l'analyse, seuls les marqueurs qui détecteront un polymorphisme entre les

deux parents et les deux bulks seront des candidats potentiellement liés au gène d'intérêt.

Pour déterminer la distance entre les marqueurs et le gène d'intérêt, ces marqueurs identifiés par l'une ou l'autre des analyses décrites ci-dessus peuvent être utilisés pour analyser l'ensemble de la population (F_2 par exemple). Plutôt que de construire une carte de liaison complète du génome, il suffit seulement de déterminer la liaison entre les marqueurs et le gène d'intérêt. Plusieurs caractères monogéniques de grande importance agronomique ont été marqués par le biais de ces stratégies (Michelmore, 1995). En analysant des lignées quasi isogéniques avec la technique RAPD (Gowda et al., 1995) ou avec la technique AFLP (Thomas et al., 1995) des marqueurs liés au gène de résistance à des maladies ont été identifiés chez le sorgho et chez la tomate. Plusieurs autres équipes ont combiné les méthodes RAPD ou AFLP avec l'analyse BSA pour identifier des marqueurs fortement liés à des gènes d'intérêt. Dans la plupart de ces cas, des populations F_2 ont été utilisées (Michelmore, 1995 ; Thomas et al., 1995 ; Young et Kelly, 1997 ; Lu et al., 1998 ; Cervera et al., 1996).

Le fait que ces marqueurs soient dominants pour la plupart ne constitue pas un obstacle majeur à leur utilisation car des marqueurs codominants comme les SCAR peuvent en être dérivés (Paran et Michelmore, 1993 ; Dax et al., 1998 ; Kelly et Miklas, 1998).

Plusieurs caractères importants sur le plan agronomique comme le rendement, la qualité, la maturité ou la résistance à des stress biotiques ou abiotiques sont contrôlés par un nombre relativement grand de loci. Chacun de ces gènes apporte une contribution positive ou négative à la valeur phénotypique finale du caractère. On appelle ces loci des Quantitative Trait Loci (QTL) et les caractères que contrôlent ces QTL ont une variation phénotypique continue d'où le terme « caractères polygéniques » qui les désignent parce que leur phénotype final est déterminé par la variation génétique dans plusieurs loci et est modifié par des effets environnementaux (Kumar, 1999). Avec l'avènement des marqueurs moléculaires, il est possible d'assigner des positions chromosomiques à des QTL individuels, de

déterminer les types et la magnitude des effets des gènes de chaque QTL et aussi de déterminer quel parent possède l'allèle positif dans chaque QTL (Paterson, 1995 ; Stuber, 1995). L'analyse des marqueurs pour l'identification des QTL a été principalement effectuée en utilisant les analyses de variance ou la cartographie par intervalle (Simpson, 1999 ; Michelmore, 1995 ; Staub et al., 1996).

Dans le cas du niébé, très peu de marqueurs liés à des gènes d'intérêt ont été identifiés. Fatokun et al. (1992) ont identifié deux régions génomiques contenant des QTL liés aux gènes contrôlant le poids des graines. Myers et al. (1996) ont rapporté l'identification d'un marqueur RFLP lié au gène de résistance au puceron (*Aphis craccivora* Koch).

1.3.2.4 La sélection assistée de marqueurs

L'une des principales utilisations directes des marqueurs d'ADN est leur emploi dans les programmes de sélection assistée de marqueurs (Marker-assisted selection, MAS). La MAS est basée sur le fait qu'il est possible d'inférer la présence d'un gène à partir de la présence d'un marqueur qui lui est fortement lié (Lee, 1995 ; Staub et al., 1996 ; Ribault et Hoisington, 1998 ; Simpson, 1999 ; Kumar, 1999). Si le marqueur et le gène sont situés loin de l'autre sur le chromosome, alors la probabilité qu'ils soient co-transmis à la descendance est très faible à cause des événements de double recombinaison. Alors, un pré-requis à l'utilisation des marqueurs dans un tel programme de sélection est qu'ils doivent absolument être fortement liés au gène d'intérêt.

Pour ne prendre que le cas de la sélection pour la résistance aux maladies et autres pathogènes, la MAS présente des avantages certains : (1) Elle constitue un excellent substitut au criblage sous infestation ou inoculation. Dans certains cas, les conditions environnementales peuvent affecter la virulence du pathogène et la réaction de la plante et rendre ainsi le criblage non fiable. De plus, certains criblages demandent beaucoup de temps ou ne peuvent être conduits que dans des environnements et localités précis et à des périodes bien déterminées. La MAS, en plus de lever ces obstacles, permet de réaliser ces tests à tous les stades

de croissance de la plante (Michelmore, 1995). (2) Dans les processus d'introgession des gènes de résistance dans des cultivars déficients, la difficulté majeure est le transfert de blocs de caractères indésirables liés aux gènes d'intérêt. La MAS, tout évitant mieux cet inconvénient, permet un retour rapide au génotype du parent récurrent dans les programmes de retro-croisement (Tanksley et al., 1989). (3) Le marquage des gènes, en rendant possible l'identification des gènes de résistance dans plusieurs accessions, favorise le déploiement et le pyramidage de ces gènes dans des cultivars supérieurs (Wolfe, 1993 ; Wolfe et al., 1992). En effet, si les gènes de résistance spécifiques à une race ont souvent une durée limitée, l'opportunité du pyramidage des gènes qu'offre la MAS rendra cette résistance plus durable et plus stable (Duvick, 1996 ; Kelly et Miklas, 1998).

Depuis quelques années, la MAS a cessé d'être l'éternelle prochaine étape attractive envisagée après l'identification des marqueurs liés aux gènes d'intérêt. Quelques résultats positifs sont rapportés. On peut citer l'intégration du transgène *Bt* dans différents génomes (Ragot et al., 1995). D'autres succès sont rapportés par les équipes de Melchinger et al., (1992), Tanksley et McCough, (1997), Eathington et al., (1997) et Mohan et al.(1997). Bien que la MAS puisse accroître l'efficacité de la sélection comparée à la sélection phénotypique, l'utilité des marqueurs d'ADN en amélioration des plantes va beaucoup dépendre du rapport coût/unité d'information (Edwards et Page, 1994). Heureusement, des outils plus performants comme les marqueurs basés sur la PCR (STS, SCAR) sont développés et réduisent les coûts de la MAS et la rendant plus attractive. Ces marqueurs dérivés, notamment les SCAR, non seulement sont plus reproductibles que les marqueurs RAPD mais sont plus efficaces pour le criblage de très grande populations. Toutes ces améliorations et celles à venir permettront d'exploiter au mieux les deux principaux avantages de la MAS à savoir le pyramidage des gènes et la combinaison rapide des résistance à de multiples pathogènes.

Avec les progrès importants réalisés dans les procédés de transformation et de transgenèse, le clonage de ces gènes en plus de leur localisation permettrait leur transfert dans des plantes déficientes par la transgenèse.

1.3.2.5 Le clonage positionnel

Contrairement à la stratégie traditionnelle de clonage, le clonage positionnel est une méthode qui permet d'isoler des gènes dont on ne connaît que le phénotype et la position sur la carte génétique (Wing et al., 1994). Avec cette stratégie, la connaissance de la biochimie ou des produits de l'expression du gène n'est plus nécessaire (Wicking, 1991 ; Paterson et Wing, 1993 ; Kumar, 1999). Les techniques de marqueurs d'ADN permettent aujourd'hui, non seulement de connaître le phénotype, mais aussi la position d'un gène d'intérêt. La première étape du clonage positionnel est la cartographie du gène. Une fois sa position déterminée à l'aide de marqueurs qui lui sont liés, cette région peut être saturée avec d'autres marqueurs de plus en plus proches (Michelmore, 1995). La deuxième étape consiste à établir les relations entre les distances génétique et physique en réalisant une carte physique à l'aide des marqueurs les plus proches du gène. La distance génétique est exprimée en centimorgan (cM) et la distance physique en paires de bases. Les fréquences de recombinaison variant le long du chromosome, les marqueurs déclarés fortement liés en termes de cM peuvent se situer en fait à des milliers ou à des millions de paires bases les uns des autres. Il est alors nécessaire, pour utiliser cette stratégie de clonage, de construire une carte physique de la région contenant le gène d'intérêt (Ganal et al., 1989; Poustka, 1990; Segal et al., 1992). La troisième étape consiste à employer la technique de la marche chromosomique en partant des marqueurs les plus proches du gène d'intérêt (Wing et al., 1994). Cette stratégie a été utilisée avec succès pour plusieurs plantes notamment pour isoler les gènes *ABI3* (Giraudat et al., 1992) et *RPM1* (Grant et al., 1995) chez *Arabidopsis thaliana* les gènes *jointless*, *PTO* et *I2* chez la tomate (Martin et al., 1993 ; Wing et al., 1994).

Au regard de ce qui précède, le développement de la technologie des marqueurs d'ADN a permis aux sélectionneurs d'utiliser une approche de génétique mendélienne pour rendre plus efficaces les programmes d'amélioration. Des marqueurs liés à des gènes d'intérêt peuvent être identifiés et cartographiés. Avec la construction de cartes de liaison génétique saturées, il est possible de localiser

ces gènes. Comme les marqueurs d'ADN peuvent donner une estimation précise des relations entre les différentes accessions du germoplasme, les sélectionneurs utiliseront cette connaissance pour échantillonner les meilleures et les utiliser dans leurs croisements. La précision de sélection qu'offre la MAS et le développement des nouveaux marqueurs plus économiques dérivés des marqueurs RAPD ou AFLP, ouvrent de nouvelles perspectives pour l'amélioration des plantes.

C'est à la lumière de ces opportunités et possibilités qui ont du reste fait leurs preuves avec d'autres plantes pour diverses contraintes liées à leur production, que nous formulons, dans le cas de la résistance du niébé au *Striga gesnerioides*, les hypothèses suivantes : l'emploi des marqueurs d'ADN peut contribuer (1) à marquer les gènes de résistance à différentes races de *S. gesnerioides* et (2) à saturer la carte de liaison génétique actuelle du niébé. Ces deux réalisations permettraient l'utilisation de ces marqueurs dans un programme de sélection assistée de marqueurs ainsi que le clonage positionnel des gènes de résistance et leur transfert par transgénèse dans des cultivars sensibles à cette plante parasite. Les principaux objectifs visés par cette étude sont :

1. Identifier des marqueurs d'ADN fortement liés aux gènes de résistance aux races 1 et 3 du *S. gesnerioides*;
2. Générer des marqueurs afin d'enrichir et de contribuer à saturer la carte de liaison génétique actuelle du niébé.

Dans le premier volet de cette étude, nous avons identifié, et ce pour la première fois, plusieurs marqueurs AFLP très fortement liés aux gènes de résistance du niébé aux races 1 et 3 du *S. gesnerioides*. Dans la deuxième partie, nous avons généré plusieurs centaines de marqueurs qui ont été placés sur la carte génétique actuelle et contribuent énormément à sa saturation prochaine. Nous rapporterons dans un dernier chapitre consacré à la discussion générale, les principaux résultats de cette étude et relaterons les opportunités et les perspectives que ces acquis offrent notamment à la phytogénétique appliquée, mais aussi à la recherche fondamentale.

**Identification of AFLP Markers Linked to Resistance of
Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to *Striga gesnerioides***

J. T. Ouédraogo^{1,2}, V. Maheshwari¹, D.K. Berner³, C.-A. St-Pierre², F. Belzile², M.P. Timko¹

1 Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903 USA,

2 Département de phytologie, Université Laval, Sainte-Foy (Québec), G1K 7P4, Canada,

3 International Institute of Tropical Agriculture, Oyo Road, Ibadan, Nigeria

CHAPITRE II

**Identification of AFLP Markers Linked to Resistance of
Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to *Striga gesnerioides***

Résumé du manuscrit

Des marqueurs moléculaires liés à la résistance du niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) au parasitisme du *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke ont été identifiés en utilisant la technique AFLP et l'analyse des ségrégants en mélange. L'analyse de ségrégation d'une population F2 issue du croisement entre le cultivar sensible Tvx3236 et le cultivar résistant IT82D-849 a montré que la résistance à la race 1 du *S. gesnerioides* du Burkina Faso était contrôlée par un seul gène dominant dénommé *Rsg2-1*. Trois marqueurs AFLP fortement liés à *Rsg2-1* ont été identifiés ; ce sont E-AAC/M-CAA₃₀₀ (2.60 cM), E-ACT/M-CAA₅₂₄ (0.90 cM) et le marqueur codominant E-ACAM-CAT_{140/150} (0.90 cM). En analysant la ségrégation du caractère de résistance dans la population F2 issue du croisement entre IT84S-2246-4 (sensible) et Tvx14676 résistant à la race 3 du *S. gesnerioides* du Nigeria, il est ressorti que cette résistance était contrôlée par un seul gène dominant dénommé *Rsg4-3*. Six marqueurs liés à ce gène de résistance ont été identifiés: E-ACAM-CAG₁₂₀ (10.1 cM), E-AGC/M-CAT₈₀ (4.1 cM), E-ACAM-CAT₁₅₀ (2.7 cM), E-AGC/M-CAT₁₅₀, EAAC-MCAA₃₀₀ (3.6 cM), et E-AGC/M-CAT₇₀ (5.1 cM). L'analyse de la ségrégation des marqueurs dans la population de lignées recombinantes issues du croisement entre les cultivars IT84S-2049 et 524B a permis de localiser ces deux marqueurs sur le groupe de liaison 1 de la carte de liaison génétique du niébé. L'identification de marqueurs AFLP liés à la résistance au *Striga* constitue un point de départ à un programme de sélection assistée de marqueurs et au clonage positionnel des gènes conférant la résistance à cette plante parasite.

Mots clé: Niébé – Marqueurs AFLP – Bulké ségrégant analyse – Résistance au *Striga* – Plantes parasites.

Abstract

AFLP and bulked segregant analysis were used to identify molecular markers linked to resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to parasitism by *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke. Segregation analysis of F₂ progeny from a cross of Tvx3236, a *Striga*-susceptible line, with IT82D-849, a resistant cultivar, showed that resistance to *S. gesnerioides* race 1 from Burkina Faso was controlled by a single dominant gene, designated *Rsg2-1*. Three AFLP markers tightly linked to *Rsg2-1* were identified: E-AAC/M-CAA₃₀₀ (2.60 cM), E-ACT/M-CAA₅₂₄ (0.90 cM), and E-ACA/M-CAT_{140/150} (0.90 cM) a codominant marker. Segregation analysis of a different F₂ population resulting from a cross of the *Striga*-susceptible line IT84S-2246-4 with Tvx14676, a *S. gesnerioides* race 3 resistant line, showed that resistance to *S. gesnerioides* race 3 was controlled also by a single dominant gene, designated *Rsg4-3*. Six AFLP markers linked to *Rsg4-3* were identified: E-ACA/M-CAG₁₂₀ (10.1 cM), E-AGC/M-CAT₈₀ (4.1 cM), E-ACA/M-CAT₁₅₀ (2.7 cM), E-AGC/M-CAT₁₅₀ and EAAC-MCAA₃₀₀ (3.6 cM), and E-AGC/M-CAT₇₀ (5.1 cM). Segregation analysis of the E-AAC/M-CAA₃₀₀ and E-ACA/M-CAG₁₂₀ markers in recombinant inbred lines derived from IT84S-2049 x 524B determined that both are located within a region at the bottom of the linkage group 1 of the cowpea genetic map. The identification of AFLP markers linked to *Striga* resistance provides a stepping stone for a marker assisted selection program and the eventual cloning and characterization of the gene(s) encoding resistance to this noxious parasitic weed.

Key words Cowpea - AFLP markers - Bulked segregant analysis - *Striga* resistance
- parasitic plants

2.1 Introduction

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is a major food legume grown in the semi-arid regions of West and Central Africa, South America, and India. For many people in these regions it constitutes an important dietary protein source (Aggarwal 1991). Like other food crops, cowpea is attacked by a variety of pathogens, among which the parasitic flowering plant *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke is a major constraint to cowpea production. *S. gesnerioides* parasitism causes severe chlorosis, wilting, and stunting of susceptible hosts resulting in yield losses estimated in the millions of bushels annually (Aggarwal and Ouedraogo 1989; Muleba et al. 1996, 1997; Singh and Emechebe 1997). Control of the parasite by chemical and cultural treatments is difficult and expensive and, therefore, significant effort has been put into the identification of natural sources of genetic resistance within cowpea cultivars and to the selection and breeding for improved lines (Singh and Emechebe 1997).

The first *S. gesnerioides* resistant cowpea varieties identified were Suvita-2 (Gorom local) from Burkina Faso and 58-57 from Senegal (Aggarwal et al. 1984; Berner et al. 1995). Subsequently, additional sources of resistance were identified including B301, a landrace from Botswana (Singh and Emechebe 1990a), 872, a landrace from Niger, APL1, a landrace from Nigeria (Lane et al. 1997) and two breeding lines developed at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), IT81D-994 and IT82D-849 (Singh and Emechebe 1991). Although resistant in Burkina Faso, when grown in Nigeria, Suvita-2 proved to be susceptible to *S. gesnerioides* parasitism (Aggarwal et al. 1984, 1986). Parker and Polniaszek (1990) and Singh and Emechebe (1990a, 1990b) subsequently showed that differences exist in the pathogenicity of *S. gesnerioides* populations from different locations in West Africa leading to our current understanding (Table 1) that at least five different races of *S. gesnerioides* are present in West and Central Africa (Lane et al. 1997b). Well adapted, high-yielding cultivars resistant to all five races of *S. gesnerioides* are under development, but not widely available (Singh 1999). Among cultivars in use,

Suvita-2 and IT81D-994 are resistant to races 1, 2, and 4, whereas B301 and IT82D-849 are resistant to races 1, 2, 3, and 5, (Lane et al. 1994, 1997b; Muleba et al.1996).

Currently, as revealed by studies on inheritance of resistance, evidence exists for three independent dominant resistance genes to *S. gesnerioides* (designated as *Rsg1*, *Rsg2*, and *Rsg3*) in varieties B301, IT82D-849, and Suvita-2, respectively (Atokple et al. 1995; Singh and Emechebe 1990a, 1996; Touré et al. 1997). Although good sources of resistance, cowpeas such as B301 and 58-57, have poor seed and agronomic qualities (Atokple et al. 1995; Lane et al. 1997a). Using traditional breeding and selection methods, attempts to create commercially acceptable cultivars, free of undesirable genetic traits and resistant to all five races of *S. gesnerioides* have not yet been successful. Using backcross breeding methods, several generations of backcrossing, taking up to seven or more field seasons, may be necessary to obtain lines carrying the desired character.

The use of DNA marker systems, such as random-amplified polymorphic DNAs (RAPDs) (Williams et al., 1990), amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) (Vos et al., 1995), and simple sequence repeat (SSRs) (Akkaya, et al., 1992) has contributed greatly to the development of genetic linkage maps for many important crop species, including cowpea (Fatokun et al. 1992, 1993, 1997; Young et al.1992; Myers et al. 1996; Menendez et al. 1997). In combination with the bulked segregant analysis (BSA) (Michelmore et al. 1991), the use of RAPDs, AFLPs, and SSRs made possible to rapidly identify molecular markers within plant genomes linked to agronomically important genes (Lee 1995; Kelly and Miklas 1998; Young 1999). The development and use of molecular marker technologies has also facilitated the subsequent cloning and characterization of disease, insect and pest resistance genes from a variety of plant species (Hammond-Kosack and Jones 1997; Ronald 1998; Meyers et al. 1999). These studies have led to a greater understanding of the basis for plant-pathogen interactions and the process of plant disease resistance. Here we report the identification of AFLP markers linked to two loci conferring

race-specific resistance to *S. gesnerioides*. The potential for use of these markers in a marker-assisted selection (MAS) program (Knapp 1998; Simpson 1999; Young 1999) is also discussed.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Plant material, growth conditions, and field experiments

The plant populations used in this study and their resistance/susceptibility phenotypes are presented in Table 1. Suvita-2 (Gorom local) is an improved cultivar from Burkina Faso. B301 and Tvu14676 (B203) are cultivars from Botswana. Tvx3236, IT81D-994, IT82D-849, and IT84S-2246 are breeding lines developed at IITA. IT84S-2049 and 524B were provided by A.E. Hall (University of California, Riverside). IT84S-2049, is an IITA breeding line, reported to have multiple disease and pest resistance (Menéndez et al. 1997), and is genetically similar to the *S. gesnerioides* susceptible line IT84S-2246. Cultivar 524B is a California black-eye type developed by A.E. Hall from a cross between cultivars CB5 and CB3 which encompass the genetic variability in cowpea in California. The resistance reaction of 524B to *S. gesnerioides* had not previously been tested.

The four resistant cultivars, Suvita-2, B301, IT81D-994 and IT82D-849 were crossed with the susceptible cultivar Tvx3236 to produce F_1 hybrids. Four F_2 segregating populations were generated by self-fertilizing the F_1 individuals. Parental, F_1 , and F_2 individuals from the four populations were grown in the field under *S. gesnerioides* infestation at the Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) research station in Kamboinse, Burkina Faso. The F_2 progenies from each population were planted in rows, with the distance between rows being 1.5 m and approximately 1.5 m separating the individual plants. Emergence of *S. gesnerioides* was scored every two days starting 3 weeks after planting, and continuing until complete senescence of the plant (120 days after planting). Plants were pulled out of the

Table 1 Parental lines and their resistance response to various races of *S. gesnerioides*

Cowpea cultivar /landrace/ line	<i>Striga gesnerioides</i> races				
	1	2	3	4	5
Tvx3236	S	S	S	S	S
Suvita 2	R	R	S	R	S
B301	R	R	R	S	R
IT81D-994	R	R	S	R	ND*
IT82D-849	R	R	R	S	R
IT84S-2246-4	S	S	S	S	S
Tvx14676	ND	ND	R	ND	ND
IT84S-2049	ND	ND	ND	ND	ND
524B	ND	ND	ND	ND	ND

* Not determined

ground and their roots checked for attached and pre-emergent *S. gesnerioides* seedlings. Plants allowing parasite attachment, development and emergence were classified as susceptible. Those free of infection or showing minimal levels of *S. gesnerioides* attachment and no emerged seedlings were deemed as resistant.

In order to determine the genotypes of the F_2 plants, 25 F_3 seeds of each individual F_2 plant were grown under *S. gesnerioides* infestation and monitored as indicated above for the F_2 plants. A sample of one hundred fifty individuals was formed from each of the segregating F_2 populations.

In a separate experiment, the parents and 150 F_3 lines obtained from F_2 plants of a cross between Tvx14676 (resistant) and IT84S-2246 (susceptible) were grown under *S. gesnerioides* race 3 infestation in a field in Bakura, Nigeria. The parents and F_3 lines were planted in five replications of a randomized complete block design. Each field plot (replication) consisted of two 5-m-long rows spaced 1.5 m apart. Within-row plant spacing was 30 cm, and this allowed planting 32 F_3 progeny from a single F_2 plant per plot. Nine weeks after planting each plot, containing a single F_3 line or parent line, was evaluated for *S. gesnerioides* reaction. The mean number of surviving plants and plants with emerged *S. gesnerioides* (averaged over five replications) were determined for each parent and F_3 line. The inheritance of resistance in a given cross was determined by comparing observed to expected phenotypic ratios and testing the significance of the difference by Chi square analysis.

2.2.2 DNA extraction

Total genomic DNA was isolated from leaf tissues of individual plants using the method of Varadarajan and Prakash (1991). Prior to DNA isolation of plants produced in Burkina Faso, the tissues were dessicated following the procedure of Chase and Hills (1991) and the dried samples were kept at 4°C. The DNA concentration in samples was measured spectrophotometrically at A260 using a

Varian DMS200 spectrophotometer. Concentrated DNA samples were maintained in ethanol at 4°C and as necessary for AFLP analysis, working solutions (100 ng/μl) were prepared in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) as needed. Dilute solutions were maintained at -20° C. Due to leaf material deterioration leading to poor DNA quality, a final sample of 116 individuals was kept for AFLP analysis for the population characterized with race 1 of *S. gesnerioides*.

2.2.3 AFLP Analysis

Sixteen pairwise combinations of [γ -³²P]-ATP labeled (New England Nuclear Life Sciences Products, Boston, MA) *EcoRI* and *MseI* primers were used in AFLP analysis to screen for the degree of polymorphism between resistant and susceptible parents used to generate the five cowpea populations. Based on these studies, IT82D-849 and Tvx3236 were determined to contain the highest degree of genetic polymorphism among populations screened with race 1 and the IT82D-849 x Tvx3236 cross was chosen for further detailed analysis along with the IT84S-2246-4 x Tvx14676 cross representing race 3 resistance. Eventually, 40 *EcoRI* and *MseI* primer combinations were tested with progeny from the IT82D-849 x Tvx3236 and IT84S-2246-4 x Tvx14676 crosses and scored in bulked samples and F₂ individuals (as described below). AFLP analysis was performed essentially as described by Vos et al. (1995) using the AFLPTM Analysis System I AFLP Starter Primer Kit (Gibco BRL-Life Technologies, Inc., Gathersburg, Md., USA) with minor modifications. Each reaction used 500 ng rather than 250 ng of genomic DNA, and the recommended dilutions used after the ligation of the adapters (1:10) and following the pre-amplification reaction (1:50) were cut in half.

2.2.4 Bulk design and bulked segregant analysis

Bulked segregant analysis was carried out essentially as described by Michelmore et al. (1991). Homozygous-resistant and homozygous-susceptible bulks were prepared from F_2 individuals by pooling aliquots containing equivalent amounts of total DNA (approximately 10 μ g) from each of 12 resistant and 12 susceptible F_2 . Following analysis of the various bulks for the presence or absence of the various AFLP markers, individual F_2 progeny within each bulk were analyzed to determine linkage as described below.

2.2.5 Marker segregation, linkage analysis, and mapping

Chi-square tests were performed in order to examine the goodness-of-fit between the expected Mendelian ratio for the F_2 (3:1; resistant:susceptible) populations and the segregation data for the AFLP markers and the resistance/susceptibility trait. The segregation of AFLP markers and linkage analysis was performed on 116 F_2 individuals from the IT82D-849 x Tv3236 population and 150 F_2 individuals from the IT84S-2246-4 x Tv14676 population. Linkage analysis between the AFLP markers and the *S. gesnerioides* resistance loci was performed using MAPMAKER 3.0 (Lander et al. 1987). The "group" command was used to determine linkage groups, pairwise comparisons and grouping of markers. A LOD score of 3.0 or above and a maximum recombination frequency of 30% were specified. To determine the most likely order within a linkage group, the "compare" command was used based on the multi-point linkage data. The Kosambi mapping function (Kosambi 1944) was used to convert recombination frequency into map distances in centimorgans (cM).

In order to place the AFLP markers identified in this study on the existing map of the cowpea genome (Menéndez et al. 1997), the *EcoRI* and *MseI* primer combinations giving rise to the polymorphic band in the IT82D-849 x Tv3236 or the IT84S-2246-4 x Tv14676 population, were tested on the parents and 88 recombinant inbreds resulting from a cross between IT84S-2049 and 524B used to create a genetic

linkage map of 181 markers. Markers were placed on the map using MAPMAKER 3.0b based on the conditions previously described by Menéndez et al. (1997).

2.3 Results

2.3.1 Identification of AFLP markers linked to the *S. gesnerioides* race 1 resistance locus *Rsg2-1*

Analysis of the F₂ individuals showed that resistance to *S. gesnerioides* race 1 is inherited as a single dominant trait in all four populations involving the resistant lines Gorom, B301, IT81D-994 and IT82D-849 (Table 2). Examination of the level of polymorphism between each pair of parental lines (Tvx3236 x Gorom, Tvx3236 x B301, Tvx3236 x IT81D-994 and Tvx3236 x IT82D-849) available in this study using AFLP analysis and 16 combinations of *EcoRI* and *MseI* primers determined that Tvx3236 x IT82D-849 had the highest level of polymorphism (data not shown). This population was used to identify molecular markers linked to *Rsg2*. Homozygous-resistant and homozygous-susceptible bulks (each containing pooled DNA from 12 F₂ individuals) were tested together with the two parental lines using a total of 40 selective AFLP primer combinations. The number of fragments amplified with each primer combination ranged from 58 to 102, with a mean number of informative markers being approximately 80. The greatest number of detectable fragments (92 to 102) were produced with the *MseI*+3 primers M-CAA, M-CAT and M-CTT, combined with any of the eight *EcoRI*+3 primers tested. The number of polymorphic bands between the two parents ranged from 15 to 21, with a mean number of 18 depending on the primer pair used. The size of the fragments varied between 75 bp and 600 bp.

Table 2 Segregation ratios for resistance to *Striga gesnerioides* race 1 and race 3

Population	Population/ Genotype	Plants	Ratio	Chi square	P value
¹ Tvx3236 x Gorom	F2 R- rr	116 33	3:1	0.57	0.40-0.50
¹ Tvx3236 x B301	F2 R- rr	224 68	3:1	0.40	0.60-0.70
¹ Tvx3236 x IT81D-994	F2 R- rr	164 49	3:1	0.40	0.60-0.70
¹ Tvx3236 x IT82D-849	F2 R- rr	212 62	3:1	0.90	0.30-0.40
³ IT84S-2246-4 x Tvx14676	F2 R- rr	111 39	3:1	0.138	0.70-0.80

Three primer combinations detected a polymorphism between the parental lines and the resistant and susceptible bulks. Markers linked in cis as well as markers linked in trans relative to the resistance (R) allele were identified. Those linked in cis were present only in resistant whereas those linked in trans were present only in susceptible individuals. Primer combination E-AAC/M-CAA revealed an approximately 300 bp product present in Tvx3236 (the susceptible parent) and in the susceptible bulks. This marker, linked in trans to the R allele was designated EAAC-MCAA₃₀₀. It was found to be absent in all 24 resistant F₂ individuals comprising the two resistant bulks and present in all 24 susceptible individuals comprising the two susceptible bulks (Fig 1A). Primer combination E-ACA/M-CAT detected a codominant marker which we have designated as E-ACAM-CAT_{140/150} (Fig 1B). It was represented by two fragment : one E-ACA/M-CAT₁₅₀ (150 bp) linked in trans with the R allele of *Rsg2* and present in susceptible individuals, and another, E-ACAM-CAT₁₄₀ (140 bp) linked in cis, shown by resistant plants. Heterozygotes presented the two fragments. Finally, primer combination E-ACT/M-CAA amplified a 524 bp fragment which was linked in cis to the R allele of *Rsg2* and which segregated with resistance in the bulks and F₂ individuals (Fig 1C). This marker was designated E-ACT/M-CAA₅₂₄.

To determine the degree of linkage between the three AFLP markers and *Rsg2*, 116 F₂ individuals from the Tvx3236 x IT82D-849 cross were analyzed using the three primer combinations described above. The E-AAC/M-CAA₃₀₀ and E-ACT/M-CAA₅₂₄ markers were dominant and segregated according to a 3:1 ratio, whereas the E-ACAM-CAT_{140/150} marker segregated in the expected 1:2:1 fashion. The linkage analysis performed by Mapmaker showed that all markers belonged to the same linkage group. All markers were placed on the linkage group following the best order shown in fig. 2. Based on recombination frequency, the map distances between the AFLP markers and the *Rsg2* locus were determined to be 2.56 cM for E-AAC/M-CAA₃₀₀ and 0.90 cM for E-ACAM-CAT_{140/150} and E-ACT/M-CAA₅₂₄. The gene locus is flanked by the markers E-ACT/M-CAA₅₂₄ on one side and E-ACAM-CAT_{140/150} and E-AAC/M-CAA₃₀₀ on the other side, all three spanning a total

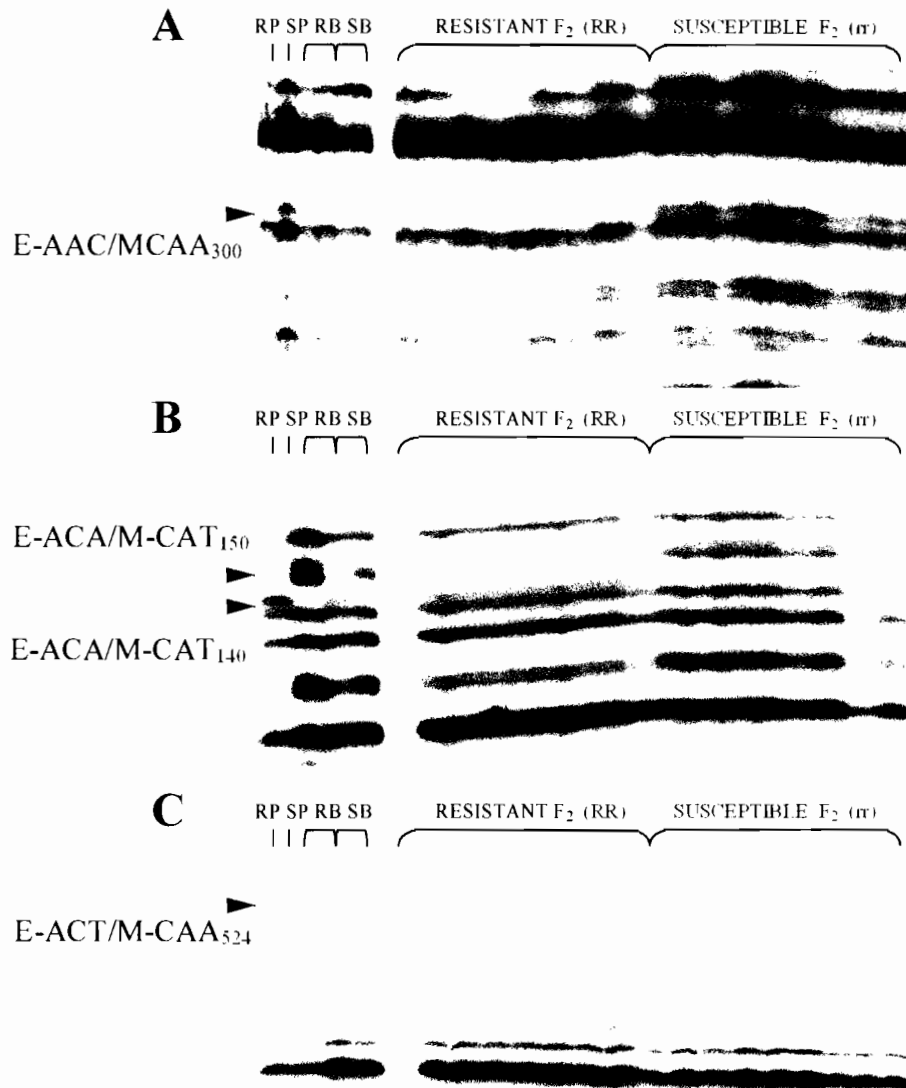


Fig. 1A, B,C Autoradiographs showing AFLP markers linked to *Striga gesnerioides* race 1 resistance gene *Rsg2-1*. Shown are the results of AFLP analysis of DNA taken from resistant parents (RP) IT82D-849, susceptible parents (SP) Tvx 3236, resistant (RB) and susceptible (SB) DNA bulks from F₂ progeny and DNA from individual homozygous resistant (RR) or susceptible (rr) F₂ progeny using different AFLP primer combinations. **A** The marker E-AAC/M-CAA₃₀₀ (indicated by arrow) linked in trans to resistance locus, amplified by primer combination E-AAC/M-CAA. **B** The marker E-ACA/M-CAT₁₅₀ linked in trans and marker E-ACA/M-CAT₁₄₀ (indicated by arrows) linked in cis, amplified by primer combination E-ACA/M-CAT. **C** The resistance marker E-ACT/M-CAA₅₂₄ (indicated by arrow) linked in cis to *Rsg2-1* amplified by primer combination E-ACT/M-CAA.

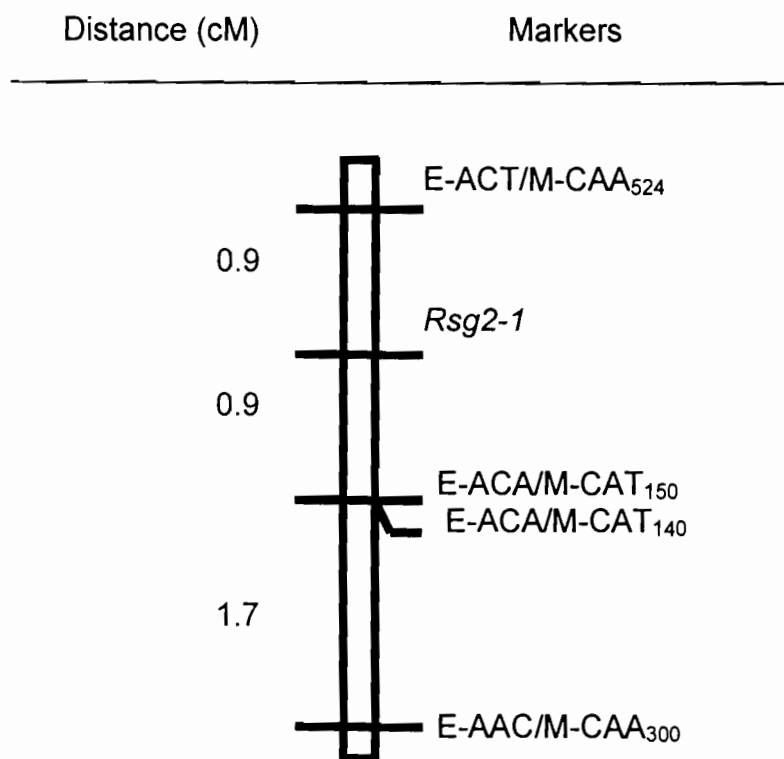


Fig. 2 Linkage map of AFLP markers E-AAC/M-CAA₃₀₀, E-ACA/M-CAT_{140/150} and E-ACT/M-CAA₅₂₄ obtained with the IT82D-849 x Tvx 3236 F₂ progeny.

distance of 3.5 cM (Fig 2). These data indicate that all three markers are tightly linked to the *S. gesnerioides* race 1 resistance locus, *Rsg2*. We suggest the designation of *Rsg2-1* for this locus to refer to its resistance to the *S. gesnerioides* race 1.

2.3.2 Identification of AFLP markers linked to *Rsg4-3*, a *S. gesnerioides* race 3 resistance locus.

Analysis of F₂ plants from a cross involving the *S. gesnerioides* susceptible line IT84S-2246-4 and the resistant line Tv_x14676 showed that resistance to *S. gesnerioides* race 3 from Nigeria was inherited as a single dominant trait (Table 2). The resistance gene present in Tv_u14676 has been designated as *Rsg4-3*, although at the present time no data exists indicating whether or not this locus is the same or different from *Rsg1*, *Rsg2*, or *Rsg3*.

Using the same approach described above for the identification of molecular markers linked to *Rsg2-1*, AFLP analysis was performed on parental DNA and bulked pools of DNA from F₂ plants from the IT84S-2246-4 x Tv_x14676 cross. As shown in Figure 3, linkage of six different markers to the resistance locus was identified. Two markers, E-AAC/M-CAA₃₀₀ and E-ACAM-CAT₁₅₀, were derived from primer combinations found effective in the analysis of the Tv_x3236 x IT82D-849 cross (Figs 3A, 3B). These two markers were linked in trans to both *Rsg2-1* and *Rsg4-3*. The primer combination E-AGC/M-CAT yielded three additional markers for the *Rsg4-3* locus: two of these, E-AGC/M-CAT₁₅₀ (150bp) and E-AGC/M-CAT₇₀ (70bp) were linked in trans with the R allele and the third one, E-AGC/M-CAT₈₀ (80bp), was linked in cis (Fig 3C). The last marker identified, E-ACAM-CAG₁₂₀ (120bp) was obtained with the primer combination E-ACAM-CAG. It was present in the resistant parent (Tv_u14676) and the resistant bulk but absent in the susceptible parent (IT84S-2246-4) and the susceptible bulk (Figure 3D).

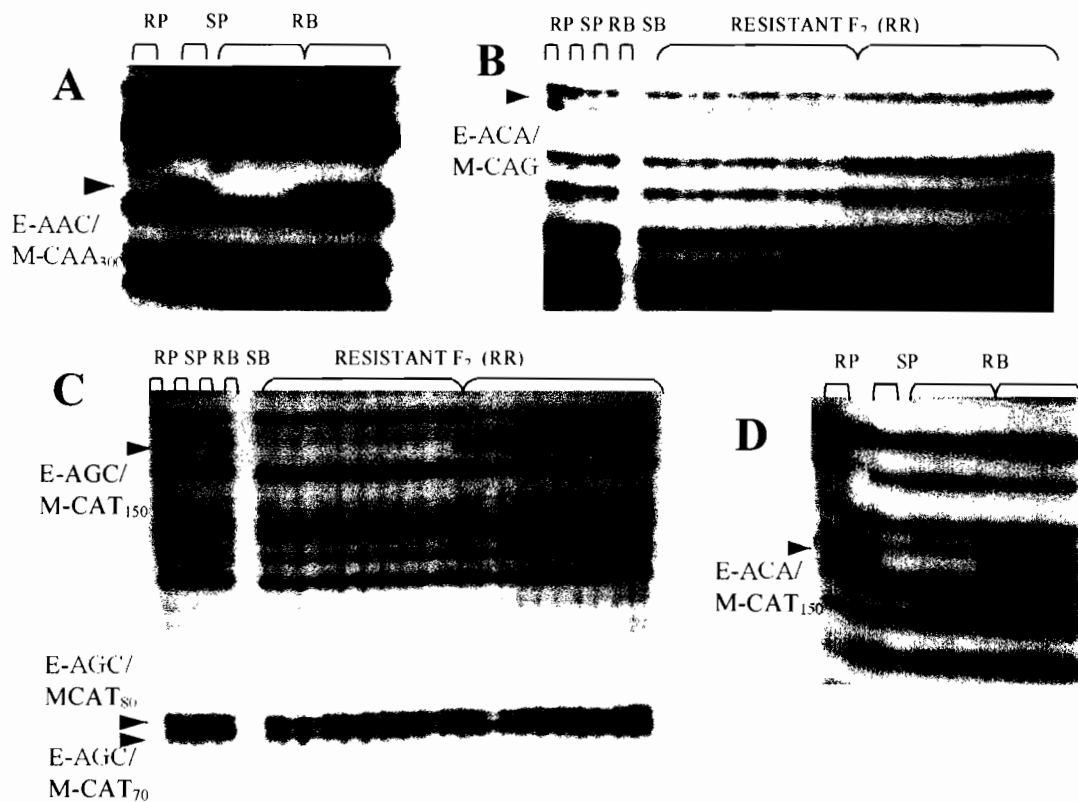


Fig. 3A, B, C, D Autoradiographs showing AFLP markers linked to *Striga gesnerioides* race 3 resistance gene *Rsg4-3*. Shown are the results of AFLP analysis of DNA taken from resistant parents (RP) Tvu14676, susceptible parents (SP) IT84S-2246-4, resistant (RB) and susceptible (SB) DNA bulks from F₂ progeny and DNA from individual homozygous resistant (RR) or susceptible (rr) F₂ progeny using different AFLP primer combinations. **A** The marker E-AAC/M-CAA₃₀₀ (indicated by arrow) linked in trans to *Rsg4-3* amplified by primer combination E-AAC/M-CAA. **B** The susceptibility marker E-ACA/M-CAT₁₅₀ (indicated by arrow) linked in trans to *Rsg4-3* amplified by primer combination E-ACA/M-CAT. **C** The markers E-AGC/M-CAT₁₅₀ and E-AGC/M-CAT₇₀ linked in trans and the resistance marker E-AGC/M-CAT₈₀ (indicated by arrows) linked in cis to *Rsg4-3* amplified by primer combination E-AGC/M-CAT. **D** The marker E-ACA/M-CAG₁₂₀ (indicated by arrow) linked in cis to *Rsg4-3* amplified by primer combination E-ACA/M-CAG.

Linkage analysis showed that the six markers were linked to *Rsg4-3* and mapped over a region spanning 15.2 cM (Fig 4). They belonged to the same linkage group and the best order is presented in figure 3. Based on the recombination frequency, the distance between each marker and the *Rsg4-3* locus is as follows: 10.1 cM for E-ACA/M-CAG₁₂₀, 4.1 cM for E-AGC/M-CAT₈₀, 2.7 cM for E-ACA/M-CAT₁₅₀, 3.6 cM for E-AGC/M-CAT₁₅₀ and EAAC-MCAA₃₀₀, and 5.1 cM for E-AGC/M-CAT₇₀.

2.3.3 Placement of *Rsg2-1* and *Rsg4-3* on the cowpea genetic linkage map

A genetic linkage map for cowpea was constructed by Menéndez et al. (1997) using a F8 recombinant inbred population derived from a cross between IT84S-2049 and 524B, breeding lines developed in Nigeria and California, respectively. IT84S-2049 and IT84S-2246-4 are independent selections derived from a common parental line. In order to place *Rsg2-1* and *Rsg4-3* on the cowpea genetic map, primer combinations detecting polymorphisms in our two mapping populations were used to analyze IT84S-2049 and 524B. The E-AAC/M-CAA₃₀₀ and E-ACA/M-CAG₁₂₀ markers were found to be polymorphic between the two parents, with the markers being present in IT84S-2049 and absent in 524B. By analyzing the segregation of the E-AAC/M-CAA₃₀₀ and E-ACA/M-CAG₁₂₀ markers in 88 individuals of the mapping population, these markers were mapped to the bottom of linkage group 1 (Fig 5). The two markers are approximately 17.5 cM apart, with E-ACA/M-CAG₁₂₀ flanked by markers OZ13b (1.3 cM) and OE9 (2.4 cM) and E-AAC/M-CAA₃₀₀ flanked by OE16 (1.7 cM) and OI2b (6.6 cM).

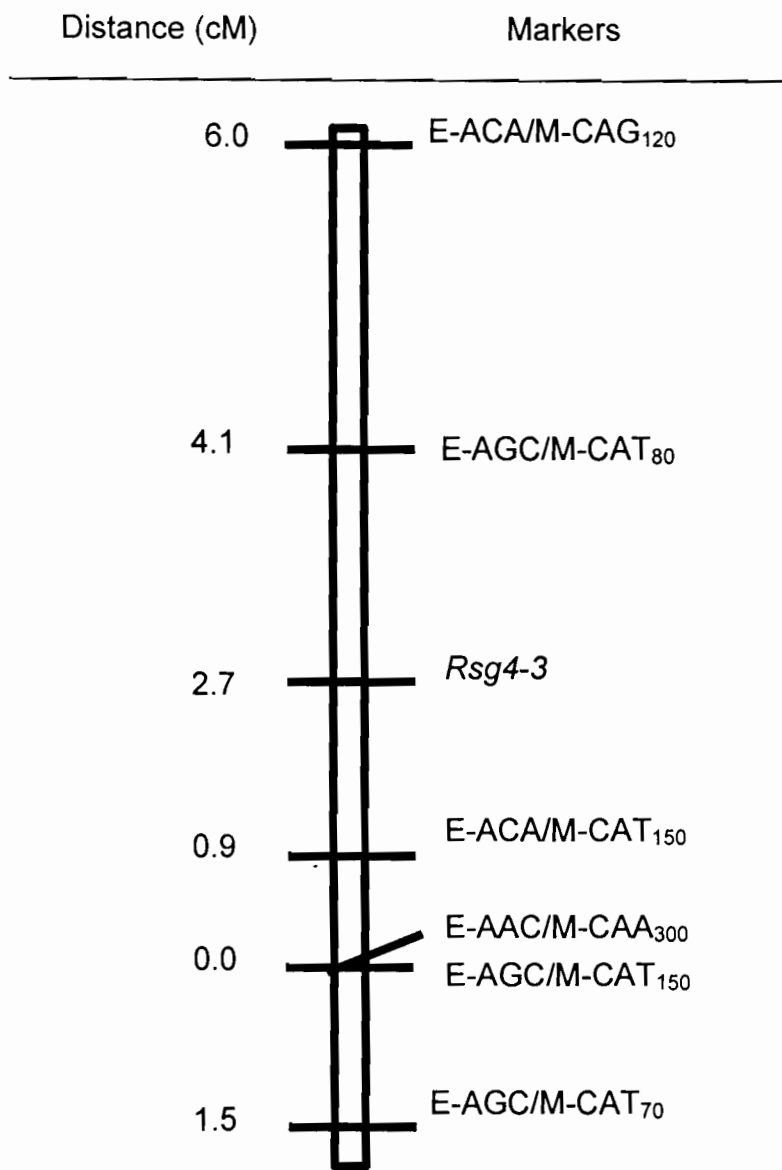


Fig. 4 Linkage map of AFLP markers EAAC-MCAA₃₀₀, E-ACA/M-CAT₁₅₀, and E-AGC/M-CAT₁₅₀, E-AGC/M-CAT₇₀, E-AGC/M-CAT₈₀ and E-ACA/M-CAG₁₂₀ obtained with the IT84S-2246-4 x Tvu 14676 F₂ progeny.

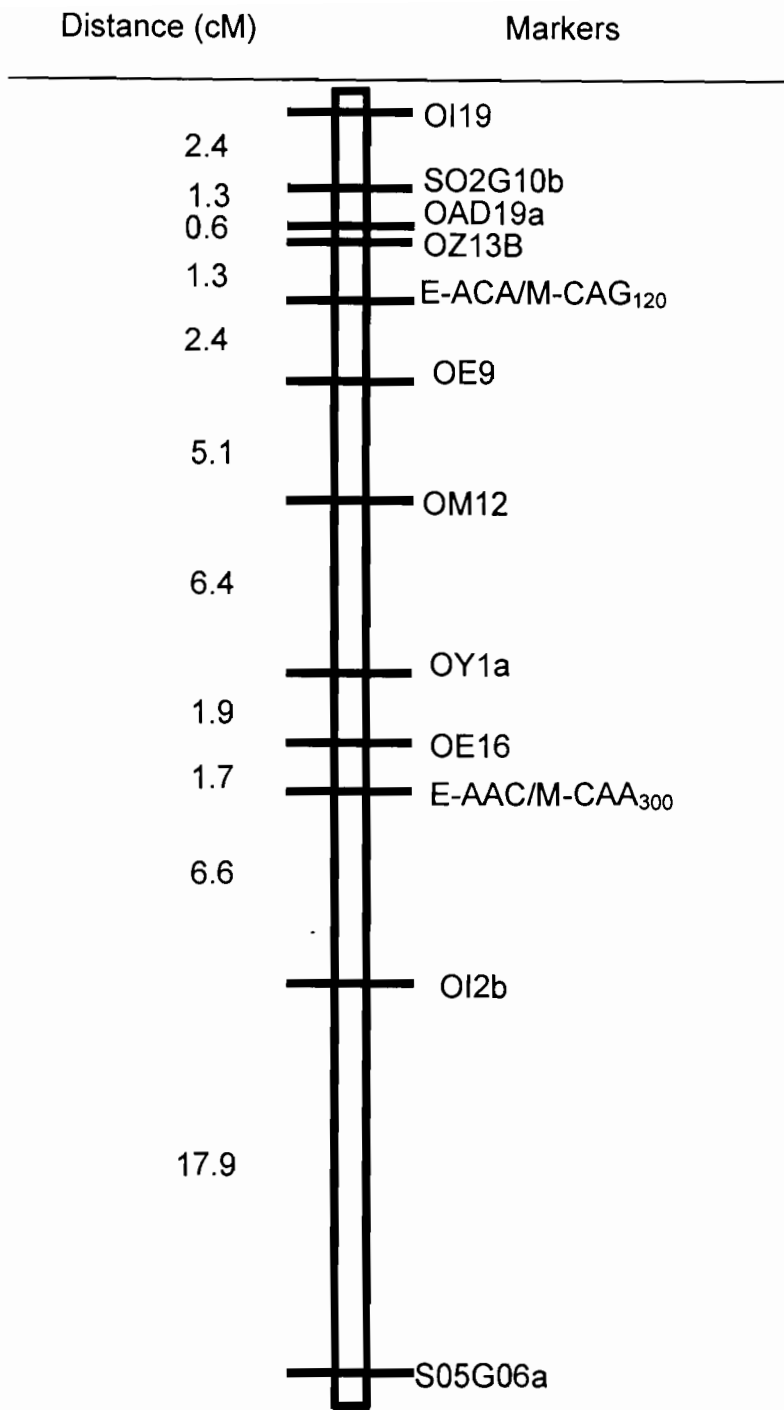


Fig. 5 Partial map of linkage group 1 of the cowpea genetic map showing the placement of the E-AAC-MCAA₃₀₀ and E-ACA/M-CAG₁₂₀ AFLP markers. Map distances are shown in cM.

2.4 Discussion

Five races of *S. gesnerioides* are known to exist in West and Central Africa that are capable of parasitizing cowpea. Although resistance to parasitism by *S. gesnerioides* is known to exist in some selected breeding lines and commercially grown cultivars of cowpea (Berner et al. 1995), well adapted, high-yielding cultivars resistant to all five races of *S. gesnerioides* are still not available to most farmers. Inheritance studies have found evidence for at least three independent dominant genes, designated as *Rsg1*, *Rsg2*, and *Rsg3*, capable of conferring resistance to *S. gesnerioides*, (Atokple et al. 1995; Singh and Emechebe 1996; Touré et al. 1997).

Segregation analysis of the F₂ progenies of the four different populations of susceptible x resistant cowpea crosses used in the present study showed that a single dominant gene conferred resistance to the *S. gesnerioides* race 1 from Burkina Faso in all four populations. This finding confirms the earlier work of Aggarwal et al. (1984) and is consistent with field studies carried out at IITA (IITA/SAFGRAD 1987) and the "Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles" (INERA-Proteagineux 1987) in Burkina Faso demonstrating race 1 resistance in cultivars Gorom local (Suvita-2) and B301. Our studies extend these earlier findings, demonstrating that cultivars IT81D-994 and IT82D-849 also contain a single dominant locus conferring *S. gesnerioides* race 1 resistance. On-going allelism tests will determine the relationship between the gene in IT81D-994 and *Rsg1*, *Rsg2*, and *Rsg3* and between *Rsg1* and *Rsg2* against *Striga* race 1. No previous work involving a cross between B301 (*Rsg1*) and IT82D-849 (*Rsg2*) was made to test their allelic relationship as far as *S. gesnerioides* race 1 is concerned. This work will involve *Rsg4-3* (Tvx14676).

Using a combined strategy of AFLP analysis and bulked segregant analysis, we were able to identify three molecular markers tightly linked to the *Rsg2-1* locus conferring *S. gesnerioides* race 1 resistance from Burkina Faso and six markers linked to the *Rsg4-3* locus conferring *S. gesnerioides* race 3 resistance from Nigeria.

They were able to identify resistant or susceptible individuals based on their presence. Of the various markers identified, two markers, E-AAC/M-CAA₃₀₀ and E-ACAM-CAT₁₅₀, were linked to both *Rsg2-1* and *Rsg4-3*, suggesting that some clustering of resistance genes for *Striga* occurs within the cowpea genome. The existence of complex resistance loci, displaying either a multiallelic structure or clustering with each allele or gene leading to a different specificity, is now well documented in the literature (see Pryor and Ellis 1993; Michelmore and Meyers 1998; Ronald 1998). The clustering of resistance genes effective against unrelated pathogens has also been described (Polzin et al. 1994; Witsenboer et al. 1995; Ronald 1998; Ashfield et al. 1998). It has also been suggested that the clustering of resistance genes may facilitate the generation of new specificities through gene duplication and mutation, and that unequal crossing-over during recombination and/or gene conversion has contributed to resistance gene evolution (Hammond-Kosack and Jones 1997; Jones and Jones 1997; Michelmore and Meyers 1998). Thus, based on our findings, it is not unreasonable to assume that resistance genes for *S. gesnerioides* may be clustered within the cowpea genome. If this were the case, one might predict that some or all of the markers identified here will be immediately useful in the analysis of other populations of cowpea segregating for other race-specific resistance to *S. gesnerioides*. Equally intriguing is the possibility that loci conferring resistance to other parasitic plants might also be located within this cluster, since it is known that in addition to resistance to *S. gesnerioides*, B301 carries duplicate dominant genes for resistance to *Alectra vogelii* (Benth.), distinct from *Rsg1* (Singh and Emechebe 1996).

At the present time the molecular basis for resistance in host plants to parasitism by *Striga* or any other parasitic angiosperm is not known. The placement of the E-AAC/M-CAA₃₀₀ and E-ACAM-CAG₁₂₀ markers on the existing genetic linkage map for cowpea developed by Menendez et al. (1997) opens up the possibility for eventually cloning and characterizing *S. gesnerioides* resistance genes by using one or more of the currently available methods for map-based cloning (Kumar 1999; Simpson 1999). Based on their recombination frequency and degree of linkage to

either *Rsg2-1* or *Rsg4-3*, the markers identified in this study would appear highly suitable for use in a marker assisted breeding program (Ribaut and Hoisington 1998; Kumar 1999) to introgress resistance genes to *Striga* race 1 or race 3 into promising breeding lines. To this end we are currently attempting to make these markers more informative tools by transforming them into sequence characterized amplified regions (SCAR) (Paran and Michelmore 1993). Given the recent report by Lu et al. (2000) on the development of SCAR markers linked to the *Or5* gene conferring resistance to broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in sunflower, it is likely that we will soon know whether mechanisms for resistance to these noxious weeds follow the same paradigms recognized for other plant-pathogen interactions, or whether plants have developed unique methods for warding off attack from other plant species.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Rockefeller Foundation (RF 95037 #7) and International Institute of Tropical Agriculture (Subcontract No. 4043) awarded to MPT. JTO was supported by funds from the Programme Canadien des bourses de la Francophonie and the Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) of Burkina Faso. We are deeply indebted to Dr. Paul Gepts for help with the placement of markers for *Striga* resistance on the existing cowpea linkage map and to Dr. Anthony Hall for his encouragement and providing the recombinant inbred lines for mapping.

References

- Aggarwal VD (1991) Research on cowpea-*Striga* resistance at IITA. In: Kim SK (ed) Combating *Striga* in Africa, Proceedings of the International Workshop Organized by IITA, ICRISAT, and IDRC. Ibadan, IITA, Nigeria 22-24 August 1988. pp. 90-95
- Aggarwal VD, Ouédraogo JT (1989) Estimation of cowpea yield loss from *S. gesnerioides* infestation. *Tropical Agric* 66 : 91-92
- Aggarwal VD, Haley SD, Brockman FE (1986) Present status of breeding cowpea for resistance to *Striga* at IITA. In: ter Borb SJ (ed) Proceeding of a Workshop on Biology and Control of *Orobanche*, LHVPO, Wageningen, pp. 176-180
- Aggarwal VD, Muleba N, Drabo I, Souma J, Mbewe M (1984) Inheritance of *Striga gesnerioides* resistance in cowpea. In: Parker C, Musselman LJ, Polhill RM, Wilson AK (eds) Proceedings of the 3rd International Symposium on Parasitic Weeds, Aleppo, Syria 7-11 May 1984. ICARDA, Aleppo. pp 143-147
- Akkaya MS, Bagwhatt AA, Cregan PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132 : 1131-1139
- Anonymous (1987) IITA/SAFGRAD (International Institute of Tropical Agriculture/ Semi-Arid Food and Grain Research and Development) 1987 Annual Report Cowpea Breeding, Ouagadougou, Burkina Faso. pp. c13 - c18
- Anonymous (1987) INERA (Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles) Rapport annuel-Proteagineux-Sélection niébé. Ouagadougou, Burkina Faso., pp 17-22
- Ashfield T, Keen NT, Buzzell RI, Innes RW (1995) Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic, or closely linked, at the *Rpg1* locus. *Genetics* 141 :1597-1604
- Atokple IDK, Singh BB, Emechebe AM (1995) Genetics of resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. *J Heredity* 86 : 45-49
- Berner DK, Kling JG, Singh BB (1995) *Striga* research and control. *Plant Disease* 79 : 652-660

- Bradeen JM, Simon (1998) Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor Appl Genet* 97 : 960-967
- Chase MW, Hills HH (1991) Silica gel: An ideal material for preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40 : 215-220
- Emechebe AM, Singh BB, Leleji OI, Atokple IDK, Adu JK (1991) Cowpea-*Striga* problems and research in Nigeria. In: Kim SK (ed) *Combating Striga in Africa*, Proceedings of the International Workshop Organized by IITA, ICRISAT, and IDRC. Ibadan, IITA, Nigeria 22-24 August 1988. pp. 18-28
- Fatokun CA, Danesh D, Menancio-Hautea D, Young ND (1993) A linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) based on DNA markers. In: O'Brien JS (ed.) *A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms*, Genetic maps. 1992. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 6.256-6.258
- Fatokun CA, Menancio-Hautea DI, Danesh D, Young ND (1992) Evidence for orthologous seed weight genes in cowpea and mung bean based on RFLP mapping. *Genetics* 132 : 841-846
- Fatokun CA, Young, ND, Myers GO (1997) Molecular markers and genome mapping in cowpea. In: Singh BB, Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN (eds) *Advance in Cowpea Research*, Sayce Publishing, Devon, UK. pp. 352-360
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997) Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48 : 575-607
- Jones DA, Jones JDG (1997) The role of leucine-rich repeat protein in plant defences. *Adv Bot Res* 24 :89-167
- Kelly JD, Miklas PN (1998) The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Molecular breeding : new strategies in plant improvement* 4 (1): 1-11
- Knapp S (1998) Marker-Assisted Selection as a strategy for increasing the probability of selecting superior genotypes. *Crop Sci* . 38 : 1164-1174
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics* 12 : 172-175

- Kumar LS (1999) DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Adv* 17 : 143-182
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181
- Lane JA, Moore THM, Child DV, Cardwell KF, Singh BB, Bailey JA (1994) Virulence characteristics of a new race of the parasitic angiosperm *Striga gesnerioides* from southern Benin on cowpea (*Vigna unguiculata*). *Euphytica* 72 : 183-188
- Lane JA, Child DV, Reiss GC, Entcheva V, Bailey JA (1997a) Crop resistance to parasitic plants. In: Crute IR, Holub EB, Burdon JJ (eds) *The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions*, CABInternational, Wallingford, Oxon, UK. pp. 81-97
- Lane JA, Moore THM, Child DV, Bailey JA (1997b) Variation in virulence of *Striga gesnerioides* on cowpea: new sources of resistance. In: Singh BB, Mohan R, Dashiell KE, Jackai LEN (eds), *Advances in Cowpea Research*. Chapter 19, IITA-JIRCAS, Ibadan, Nigeria. pp. 225-230
- Lee M (1995) DNA markers and plant breeding programs. *Adv Agron* 55 : 265-344.
- Lu YH, Melero-Vera JM, García-Tejada, Blanchard P (2000) Development of SCAR markers linked to the gene *Or5* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower. *Theor Appl Genet* 100 : 625-632
- Lu Z-X, Sossey-Alaoui K, Reighard GL, Baird Wm V, Abbott AG (1999) Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to each rootstock breeding. *Theor Appl Genet* 99 : 115-122
- Menéndez CM, Hall AE, Gepts P (1997) A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theor Appl Genet* 95 : 1210-1217
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnam S, Sobral BW, Young ND (1999) Plant disease resistance genes encode members of an

- ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* 20 : 317-332
- Michelmore RW, Meyers BC (1998) Clusters of resistance genes evolve by divergent selection and a birth and death process. *Genome Res* 8 : 1113-1130
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 9828-9832
- Muleba N, Ouédraogo JT, Drabo, I (1996) Yield stability in relation to *Striga* resistance in cowpea production in West and Central Africa. *African Crop Science Journal* 4 : 29-40
- Muleba N, Ouédraogo JT, Tignegre J B (1997) Cowpea yield losses attributed to *Striga* infestations. *J.Agric. Sci. Cambridge* 129 : 43-48
- Myers GO, Fatokun CA, Young ND (1996) RFLP mapping of an aphid resistance gene in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Euphytica* 91 : 181-187
- Paran I, Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85 : 985-993
- Parker C, Polniaszek TI (1990) Parasitism of cowpea by *Striga gesnerioides*: variation in virulence and discovery of a new source of host resistance. *Annals Appl Biol* 116 : 305-311
- Polzin KM, Lohnes DG, Nickell CD, Shoemaker RC (1994) Integration of *Rps2*, *Rmd*, and *Rj2* into linkage group J of the soybean molecular map. *J Hered* 85 : 300-303
- Pryor T, Ellis J (1993) The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. *Adv Plant Pathol* 10 :281-305
- Ribaut J-M, Hoisington D (1998) Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci* 3 :236-239
- Ronald PC (1998) Resistance gene evolution. *Curr Opin Biol* 1 : 294-298
- Shan X, Blake TK, Talbert LE (1999) Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor Appl Genet* 98 : 1072-1078

- Simpson J (1999) Molecular markers for crop improvement. In: Paredes-Lopez O (ed). *Molecular Biotechnology for Plant Food Production*. Lancaster, PA, USA pp. 275-301
- Singh BB (1999) *Striga* resistant cowpeas. *The Haustorium* 34: 4-5.
- Singh BB, Emechebe AM (1990a) Inheritance of *Striga* resistance in cowpea genotype B301. *Crop Sci* 30 :879-881
- Singh BB, Emechebe AM (1990b) Combined resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. *Agron Abstr* 109-110
- Singh BB, Emechebe AM (1991) Breeding for resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. In: Ransom JK, Musselman LJ, Woesham AD, Parker C (eds) *Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds*. Nairobi, Kenya, 24-30 June 1991. CIMMYT. pp 303-305
- Singh BB, Emechebe AM (1996) Advances in research on cowpea *Striga* and *Alectra*. In: Quin FM (ed) *Second World Cowpea Conference*, IITA, Ibadan.
- Singh BB, Emechebe AM (1997) Advances in research on cowpea *Striga* and *Alectra*. In: Singh BB, Mohan R, Dashiell KE, Jackai LEN (eds), *Advances in Cowpea Research*. Chapter 18, IITA-JIRCAS, Ibadan, Nigeria. pp. 215-224
- Touré M, Olivier A, Ntare BR, Lane JA, St-Pierre C-A (1997) Inheritance of resistance to *Striga gesnerioides* biotypes from Mali and Niger in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Euphytica* 94 :273-278
- Varadarajan GS, Prakash CS (1991) A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Mol Biol Reporter* 9 : 6-12
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23 : 4407-4414
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 : 6531-6535

- Witsenboer H, Kesseli RV, Fortin MG, Stanghellini M, Michelmore RW (1995) Sources and genetic structure of a cluster of genes for resistance to three pathogens in lettuce. *Theor Appl Genet* 91 : 178-188
- Young ND (1999) A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol. Breed* 5 : 505-510
- Young ND, Fatokun CA, Menancio-Hautea D, Danesh D (1992) RFLP mapping in cowpea. In: Thottappilly G, Monti GL, Mohan Raj DR, Moore AW (eds) *Biotechnology, Enhancing Research on Tropical Crops in Africa*. CTA/IITA, Ibadan, Nigeria. pp. 237-246

CHAPITRE III

**AFLP markers linked to resistance against *Striga gesnerioides* race 1 in cowpea
(*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**

**AFLP markers linked to resistance against *Striga gesnerioides* race 1 in cowpea
(*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**

Jeremy T. Ouédraogo^{1,2*}, Jean-Baptiste Tignegre¹, Michael P. Timko³, & François J. Belzile²

1 Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso.

2 Département de Phytologie, Université Laval, Québec, G1K 7P4, Canada.

3 Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia 22903, USA.

Résumé du manuscrit

Nous avons identifié des marqueurs AFLP liés à deux gènes de résistance à la race 1 de *Striga gesnerioides* en utilisant les méthodes de l'analyse de ségrégants en mélange et du polymorphisme de longueur des fragments amplifiés. Sept marqueurs liés au gène *Rsg3* de résistance du cultivar Gorom ont été identifiés à la suite de l'analyse de la population F_2 issue du croisement entre ce cultivar et le cultivar sensible Tvx3236. Les distances entre ces marqueurs et le *Rsg3* variaient de 2.5 cM à 9.9 cM avec deux marqueurs E-AGAM-CTA₄₆₀ et E-AGAM-CAG₃₀₀ flanquant *Rsg3* à 2.5 cM et à 2.6 cM respectivement. L'analyse de la population F_2 issue du croisement entre Tvx3236 et le cultivar résistant IT81D-994 a permis d'identifier cinq marqueurs liés au gène de résistance (*994-Rsg*) ségrégeant dans cette population. Deux de ces marqueurs, E-AGAM-CAG₃₀₀ et E-AGAM-CAG₄₅₀ sont également liés à *Rsg3*. Les marqueurs les plus proches flanquant le gène de résistance de IT81D-994 sont E-AAG/M-AAC₄₅₀ à 2.1 cM et E-AAG/M-AAC₁₅₀ à 2.0 cM. Ceci pourrait laisser supposer l'existence de complexes de gènes de résistance dans le génome du niébé ou celle de relations alléliques entre ces gènes. Trois marqueurs, dont les deux communs à *Rsg3* et *994-Rsg* et le marqueur E-AAG/M-CTT₃₀₀ liés à *Rsg3* ont été situés sur le groupe de liaison 6 de la récente carte de liaison génétique intégrée du niébé. Les marqueurs les plus proches des gènes de résistance seront utilisés dans un programme de sélection assistée de marqueurs ou dans des travaux de clonage positionnel de ces gènes.

Mots clé : Niébé – Marqueurs AFLP – Résistance au *Striga* – Bulked segregant analysis

Abstract

Amplified fragment length polymorphism analysis (AFLP) was used in combination with bulked segregant analysis (BSA) to identify molecular markers linked to two cowpea (*Vigna unguiculata* L.) genes conferring resistance to *Striga gesnerioides* race 1. Following AFLP analysis of an F₂ population derived from a cross between the resistant cultivar Gorom and the susceptible cultivar Txv 3236, seven AFLP markers were identified that are linked to *Rsg3*, the gene conferring race 1 resistance in Gorom. The distances between these markers and *Rsg3* ranged from 9.9 cM to 2.5 cM, with two markers E-AGAM-CTA₄₆₀ and E-AGAM-CAG₃₀₀ flanking *Rsg3* at 2.5 cM and 2.6 cM respectively. Analysis of a second F₂ population derived from the cross between Txv 3236 and the resistant cultivar IT81D-994 identified five markers linked to the race 1 resistance gene *994-Rsg* present in this cultivar. Two of the markers, E-AGAM-CAG₃₀₀ and E-AGAM-CAG₄₅₀, were also linked to *Rsg3*. The two markers showing the tightest linkage to resistance in IT81D-994 were E-AAG/M-AAC₄₅₀ and E-AAG/M-AAC₁₅₀ at 2.1 cM and 2.0 cM, respectively. The identification of molecular markers in common between the two sources of race 1 resistance suggests that either *Striga* resistance genes are clustered in these plants or that these are allelic. Mapping of the resistance loci within the cowpea genome revealed that three markers specific to *Rsg3* and/or *994-Rsg* are located on linkage group 6.

Key words: Cowpea-AFLP markers-*Striga* resistance-Bulked segregant analysis

3.1 Introduction

The parasitic plant *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke, of the family of Scrophulariaceae, causes considerable damage to cowpea in semiarid regions of Africa. On susceptible cultivars, yield losses can reach 100% [6, 22]. Research conducted by the International Institute of Tropical Agriculture (IITA) in collaboration with the Semi-Arid Food and Grain Research and Development Project and the Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles of Burkina Faso led to the identification of local cultivars exhibiting varying degrees of resistance to *Striga* parasitism [1, 2]. The differential expression of resistance by the cultivar Gorom (Suvita-2) when grown in Burkina Faso, Niger and Nigeria, indicates that there are different races of *S. gesnerioides* across West Africa [27]. In fact, five races of the parasite have now been identified based upon host-parasite interactions in the field [15]. Currently, none of the four most widely grown resistant cowpea varieties has resistance to all five races. Of these four cultivars, B301 (a line originating from Botswana) and IT82D-849 (a breeding line from IITA) are resistant to races 1, 2, 3, and 5 whereas Gorom and IT81D-994 (a breeding line from IITA) are resistant to races 1, 2 and 4 [15].

Previous studies of the inheritance of resistance to *S. gesnerioides* showed that a single dominant gene controls resistance in cultivars Gorom [2], B301, and IT82D-849 [4, 32]. Tests for allelism conducted by Atokple et al. [8] indicated that the resistance present in B301, IT82D-849 and Gorom is conferred by distinct genes designated *Rsg1*, *Rsg2* and *Rsg3*, respectively. We have also recently reported evidence supporting the presence of a single dominant gene for resistance to *S. gesnerioides* race 1 in B301, IT82D-849 and IT81D-994 [24]. Although cowpea cultivars such as B301 and IT82D-849 provide a good source of resistance for breeders, these cultivars have poor seed and agronomic qualities. Using traditional breeding and selection practices, attempts to create commercially acceptable cultivars free of undesirable genetic traits and resistant to all five races of *S. gesnerioides* have yet to be successful. These traditional methods of cowpea improvement are also very time consuming, with several generations of

backcrossing, taking up to seven or more field seasons, being necessary to obtain lines carrying the desired character or characters.

The use of DNA marker systems, such as random-amplified polymorphic DNAs (RAPDs) [37], amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) [35], and simple sequence repeats (SSRs) [3] has contributed greatly to the development of genetic linkage maps for many important crop species, including cowpea [7, 36]. In combination with the bulked segregant analysis (BSA) [20], the use of RAPDs, AFLPs, and SSRs has made it possible to rapidly identify molecular linked to agronomically important genes [16, 38]. The development and use of molecular marker technologies has also facilitated the subsequent cloning and characterization of disease, insect and pest resistance genes from a variety of plant species [10, 19]. These studies have led to a greater understanding of the basis for plant-pathogen interactions and the process of plant disease resistance [13, 29, 38]. We have previously reported the identification of AFLP markers linked to resistance genes to *S. gesnerioides* races 1 and 3 in cultivars B301, IT82D-849 and Tvu 14676 [24]. As noted above, genetic analysis indicates that the *S. gesnerioides* race 1 resistance in Gorom is conferred by a gene different from that present in B301 or IT82D-849. Moreover, no information is available on the allelic relationships between the resistance genes *Rsg1*, *Rsg2* and *Rsg3* and the race 1 resistance gene(s) present in IT81D-994 (referred to as *994-Rsg* in this work). In the present study, we report the identification of seven markers linked to *Rsg3* and five others linked to *994-Rsg*. Two of the markers identified are in common between the two genes and three have been mapped on the same linkage group of the cowpea genetic map. The potential for use of these markers in a marker-assisted selection program and for the map-based cloning of resistance genes for *S. gesnerioides* in cowpea are discussed.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Plant material and growth conditions

Two F_2 populations were developed and used in this study. These populations were generated by crossing the *Striga*-susceptible cultivar Tvx 3236 with the *Striga*-resistant cultivars Gorom and IT81D-994. Gorom (also known as Suvita-2) is an improved cultivar from Burkina Faso reported to be resistant to *S. gesnerioides* races 1, 2 and 4. IT81D-994 is a breeding line developed at IITA and reported to be resistant to races 1, 2 and 4. Tvx3236 is a breeding line used at the IITA and known to be susceptible to all races of *S. gesnerioides* in West Africa.

F_1 hybrids derived from crosses of Tvx 3236 x Gorom and Tvx 3236 x IT81D-994 were self-fertilized to generate F_2 populations segregating for the resistance phenotype. To test for their the resistance response, parental, F_1 , and F_2 individuals from the two populations were grown in the field under *S. gesnerioides* race 1 infestation at the Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) research station in Kamboinse, Burkina Faso. The F_2 plants from each population were grown in rows spaced by 1.5 m with approximately 1.5 m separating the individual plants. Emergence of *S. gesnerioides* was scored every two days starting 3 weeks after planting and scoring continued until complete senescence of the plant (approximately 120 days after planting for Gorom and 150 days for the late maturing IT81D-994). Plants were pulled from the ground and their roots examined for attached and pre-emergent *S. gesnerioides* seedlings. Plants allowing parasite attachment, development and emergence were classified as susceptible. Those free of infection or showing minimal levels of *S. gesnerioides* attachment and no emerged seedlings were deemed as resistant.

In order to determine the genotypes of the F_2 plants, 25 F_3 plants of each individual F_2 were grown under *S. gesnerioides* infestation and monitored as indicated above for the F_2 plants. A sample of one hundred fifty individuals was formed from each of the segregating F_2 populations.

3.2.2 Plant tissues collection and DNA extraction

Two to three grams of leaf tissue were collected from the selected F_2 plants and immediately desiccated following the procedure of Chase and Hills [5]. The dried tissue samples were kept at 4° C until use. Total genomic DNA was isolated from leaf tissues of individual plants using the method of Varadarajan and Prakash [34]. The DNA concentration in samples was measured spectrophotometrically at A260 using a Varian DMS200 spectrophotometer. Concentrated DNA samples were maintained in ethanol at 4° C and, as necessary for AFLP analysis, working solutions ($100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) were prepared in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Dilute solutions were maintained at -20° C. Due to leaf material deterioration leading to poor DNA quality, a final sample of 75 individuals was kept for AFLP analysis.

3.2.3 AFLP Analysis

AFLP analysis was performed essentially as described by Ouedraogo et al. [24] using the AFLPTM Analysis System I AFLP Starter Primer Kit (Gibco BRL-Life Technologies, Inc., Gathersburg, Md., USA). Sixty *EcoRI* and *MseI* primer combinations were tested with progeny from the two crosses and scored in bulked samples and F_2 individuals (as described below).

3.2.4 Bulk segregant analysis

Bulk segregant analysis was carried out essentially as described by Michelmore et al. [20]. Homozygous-resistant and homozygous-susceptible bulks were prepared from F_2 individuals by pooling aliquots containing equivalent amounts of total DNA (approximately 10 μg) from each of 12 resistant and 12 susceptible F_2 . Following analysis of the various bulks for the presence or absence of the various AFLP markers, individual F_2 progeny within each bulk were analyzed to determine linkage as described below.

3.2.5 Marker segregation, linkage analysis, and mapping.

In order to determine the inheritance of the resistance to *S. gesnerioides* race 1 in Gorom and IT81D-994, chi-square tests were performed on the two F₃ populations. The segregation of AFLP markers and linkage analysis was performed on 75 F₂ individuals from each population. Linkage analysis between the AFLP markers and the *S. gesnerioides* resistance loci was performed using MAPMAKER 2.0 [14]. The "group" command was used to determine linkage groups, pair wise comparisons and grouping of markers. A LOD score of 6.0 and a maximum recombination frequency of 30% were specified. To determine the most likely order within a linkage group, the "compare" command was used based on the multi-point linkage data confirming the "order" command based on three-point linkage data with the above cited linkage criteria. The Kosambi [12] mapping function was used to convert recombination frequency into map distances in centimorgans (cM).

In order to place the AFLP markers identified in this study on the cowpea genetic map [25], the *EcoRI* and *MseI* primer combinations giving rise to polymorphic bands in the test populations (i.e., Gorom x Tvx3236 and IT81D-994 x Tvx 3236) were tested for their ability to detect a polymorphism in the parents (IT84S-2049 and 524B). In the cases where the polymorphism was reproduced, the segregation of this marker was scored in the mapping population of 94 recombinant inbred lines (RILs) [18].

3.3 Results

3.3.1 Polymorphism rate and marker segregation analysis

To develop molecular markers linked to the resistance genes present in Gorom and IT81D-994, two F₂ mapping populations were produced by crossing each of the resistant parents with a susceptible line (Tvx 3236). To accurately genotype F₂ individuals with respect to their resistance/susceptibility to *Striga*, progeny tests were performed on F₃ plants. A summary of the segregation data for *Striga* resistance is presented in Table 1. In both cases, *Striga* resistance segregated as a single

dominant mendelian trait.

Table 1 Segregation ratios for resistance to *Striga gesnerioides* race 1 in two F₂ populations based on the segregation of F₃ families.

Populations	Genotype	F ₂ Plants	Ratio	Chi square	P value
Tvx3236 x Gorom	RR	23	1:2:1	8.7	0.975-0.990
	Rr	60			
	rr	33			
Tvx3236 x IT81D-994	RR	40	1:2:1	5.7	0.925-0.950
	Rr	124			
	rr	49			

Based on the progeny tests, bulks of 12 homozygous resistant or homozygous susceptible plants were prepared in view of bulked segregant analysis (BSA). A total of 60 primer combinations was used to test parents and bulks for the two populations. These produced amplified DNA fragments ranging in size from 70 to 600 bp. Between 60-102 distinguishable bands were observed after selective amplification with each primer combination. On average, 15 to 35 of these fragments proved polymorphic, indicating a relatively high rate of polymorphism between the parents of these crosses. Out of a total of 150 polymorphic bands, seven were found to be potentially linked to the *Rsg3* resistance gene in the Tvx 3236 x Gorom cross as they showed a presence/absence phenotype in the resistant and susceptible bulks (Figure 1a and 1b). Similarly, in the Tvx 3236 x IT81D-994 cross, five markers also showed up differentially in the two bulks. As two of the markers potentially linked to the *Rsg3* gene (Tvx 3236 x Gorom) were apparently identical to two of the markers segregating with the 994-*Rsg* gene in the Tvx 3236 x IT81D-994 cross, this suggested that these genes were either allelic or mapped close to one another.

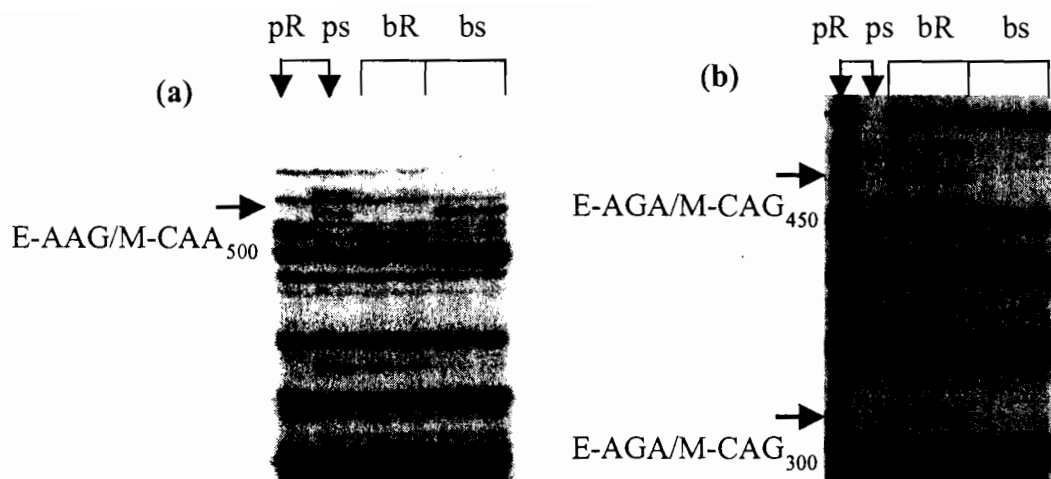


Figure 1a,b. Autoradiographs representing the BSA of the two populations studied.

(a): Marker E-AAG/M-CAA₅₀₀ linked in trans to the *Rsg3* resistance allele is present in the susceptible parent Tvx 3236 (ps) and in the susceptible bulk (bs) whereas it is absent in the resistant parent Gorom (pR) and in the resistant bulk (bR). The PCR performed with pooled DNA were loaded in duplicate adjacent wells. (b): Markers E-AGA/M-CAG₄₅₀ and E-AGA/M-CAG₃₀₀ linked in cis to both the *Rsg3* and *994-Rsg* genes are present in resistant parent and bulk whereas they are absent in the susceptible parent and bulk. The PCR performed with pooled DNA were loaded in triplicate adjacent wells.

3.3.2 Markers linked to the Gorom *Rsg3* resistance gene

A total of seven markers, derived from six different selective primer combinations, were identified as linked to the resistance locus, *Rsg3*, present in Gorom. Primer combinations E-AAG + M-CTT, E-AAG + M-AAC, E-AAC + M-CAA, E-AGA + M-CTA, E-ACA + M-CTA, (where E and M refer to EcoRI and MseI, respectively, and AAG, CTT, etc. refer to the selective nucleotides within the primer), each revealed one AFLP marker (AAG/M-CTT₃₀₀, E-AAG/M-AAC₅₀₀, E-AAC/M-CAA₄₀₀, E-AGA/M-CTA₄₆₀, and E-ACA/M-CTA₃₀₀) with a size of approximately 300, 500, 400, 460, and 300 bp, respectively. (In these studies, AFLP markers were named using the EcoRI/MseI primer combination sequence followed by their molecular weight in bp). The primer combination E-AGA + M-CAG detected two polymorphic fragments, E-AGAM-CAG₄₅₀ and E-AGAM-CAG₃₀₀, with sizes of 450 bp and 300 bp, respectively. Markers E-AAG/M-AAC₅₀₀, E-AAC/M-CAA₄₀₀ and E-ACA/M-CTA₃₀₀ were linked in *trans* to *Rsg3*, whereas the other three markers were linked in *cis* to the resistance allele.

To determine how tightly the seven AFLP markers are linked to *Rsg3*, 75 F₂ individuals from the Tx 3236 x Gorom cross were analyzed using the six primer combinations described above. All seven markers were dominant and segregated according to a 3:1 ratio. Linkage analysis performed using MAPMAKER 2.0 [14] showed that all of the markers belonged to the same linkage group and could be placed in the order shown in Figure 2a. Based on recombination frequency, the map distances between the AFLP markers and the *Rsg3* locus were determined to be 9.4 cM for E-AAG/M-AAC₅₀₀, 6.9 cM for E-AAC/M-CAA₄₀₀, 2.5 cM for E-AGA/M-CTA₄₆₀, 2.6 cM for E-AGA/M-CAG₃₀₀, 4.3 cM for E-AGA/M-CAG₄₅₀, 6.0 cM for E-ACA/M-CTA₃₀₀ and 9.9 cM for E-AAG/M-CTT₃₀₀. The *Rsg3* locus, flanked by markers E-AGA/M-CTA₄₆₀ on one side and E-AGA/M-CAG₃₀₀ on the other side, is located within a region which spans a total distance of 5.1 cM (Figure 2a).

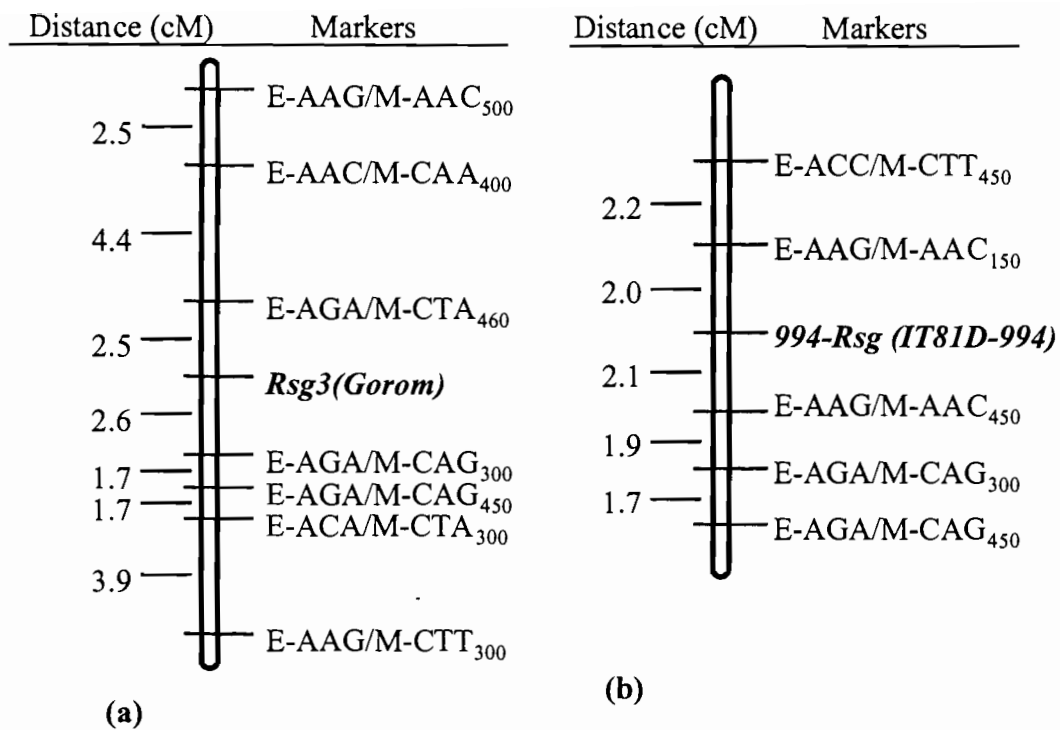


Figure 2a,b. Linkage map of AFLP markers linked (a) to the Gorom resistance gene *Rsg3* and (b) to the IT81D-994 resistance gene *994-Rsg*. Markers E-AGA/M-CAG₄₅₀ and E-AGA/M-CAG₃₀₀ are common to both *Rsg3* and *994-Rsg*.

3.3.3 Identification of AFLP markers linked to the IT81D-994 resistance gene

Five markers resulting from the use of three primer combinations were linked to the *994-Rsg* gene conferring resistance to *S. gesnerioides* race 1. They were E-AGAM-CAG₄₅₀, E-AGAM-CAG₃₀₀, E-AAG/M-AAC₄₅₀, E-AAG/M-AAC₁₅₀, and E-ACC/M-CTT₄₅₀ and were all linked in cis to the resistant allele. The five primer combinations were used to perform an AFLP analysis of the entire F₂ population of 75 individuals. Linkage analysis revealed that all the markers formed a single linkage group (Figure 2b). All five markers showed close linkage with *994-Rsg*: E-AGAM-CAG₄₅₀ at 5.7 cM, E-AGAM-CAG₃₀₀ at 4.0 cM, E-AAG/M-AAC₄₅₀ at 2.1 cM, E-AAG/M-AAC₁₅₀ at 2.0 cM and E-ACC/M-CTT₄₅₀, at 4.2 cM far from *994-Rsg*.

Interestingly, the primer combination E-AGAM-CAG produced two markers E-AGAM-CAG₄₅₀ and E-AGAM-CAG₃₀₀, that appear to be common to both mapping populations. When run side by side, these markers migrate in identical fashion in both resistant parents (data not shown) and they map 1.7 cM apart in both linkage groups (Figures 2a and 2b). These observations suggest that these markers correspond to homologous loci in the two resistant parents.

3.3.4 Placement of the *Rsg3* and the *994-Rsg* resistance loci on the cowpea genetic map

An improved genetic linkage map for cowpea spanning approximately 2600 cM has recently been constructed in our laboratory using an F₉ recombinant inbred population derived from crossing IT84S-2049 and 524B [25]. Using this new map as our basis, we attempted to place *Rsg3* and *994-Rsg* within one of the 11 defined linkage groups. Of the 10 AFLP markers linked to either *Rsg3* or *994-Rsg*, only three proved polymorphic between the two parental lines of the mapping population, IT84S-2049 and 524B. Of these three, two (E-AGAM-CAG₄₅₀ and E-AGAM-CAG₃₀₀) were common to both *Rsg3* and *994-Rsg* and the third (E-AAG/M-CTT₃₀₀) was unique to *Rsg3*. These markers were mapped using a population of 94 RILs derived from

the cross between IT84S-2049 and 524B and all were located on linkage group 6 of the integrated linkage map (Figure 3). The distances between these markers were well conserved. Indeed, comparing distances between markers in figures 2 and 3, one observes that the distance between E-AAGM-CTT₃₀₀ and E-AGAM-CAG₄₅₀ is 5.6 cM on the Tvx 3236 x Gorom map and 4.7 cM on the IT84S-2049 x 524B map. Similarly, the distance between E-AGAM-CAG₄₅₀ and E-AGAM-CAG₃₀₀ is 1.7 cM on both the Tvx 3236 x Gorom and Tvx 3236 x IT81D-994 maps whereas it is 2.2 cM on the IT84S-2049 x 524B map.

3.4. Discussion

Previous studies from our laboratory employing AFLP analysis in combination with BSA led to the identification of AFLP markers linked to resistance genes to *S. gesnerioides* races 1 and 3 in cultivars B301, IT82D-849 and Tvu 14676 [24]. Here, we have extended those studies and identified several new molecular markers linked to *S. gesnerioides* race 1 resistance in the cultivars Gorom and IT81D-994. Our results are significant for several reasons. First, our data clearly establish that the *S. gesnerioides* race 1 resistance identified in cultivars B301, IT82D-849 and Tvu 14676 is conditioned by genes distinct from those present in Gorom and IT81D-994. *S. gesnerioides* race 1 resistance genes present in cultivars B301, IT82D-849 and Tvu 14676 are located on LG2, whereas race 1 resistance genes present in Gorom and IT81D-994 map to LG 6. Furthermore, our work has identified molecular markers capable of distinguishing between these two race 1 resistance loci.

The existence of complex resistance loci, displaying either a multiallelic structure or clustering with each allele or gene leading to a different specificity, is now well documented in the literature [21, 28, 30]. Our results also show that the genes conferring race-specific resistance to *Striga* are clustered in the cowpea genome. For example, both *Rsg3* (race 1 resistance in Gorom) and the race 1 resistance locus in IT81D-994 map near each other on the same linkage group and are linked to common AFLP markers (e.g., E-AGAM-CAG₄₅₀ and E-AGAM-CAG₃₀₀). In addition, we have previously reported that genes conferring resistance to *S. gesnerioides* race 1 and race 3 present in cultivars B301, IT82D-849 and Tvu 14676 mapped to the

Partial LG6

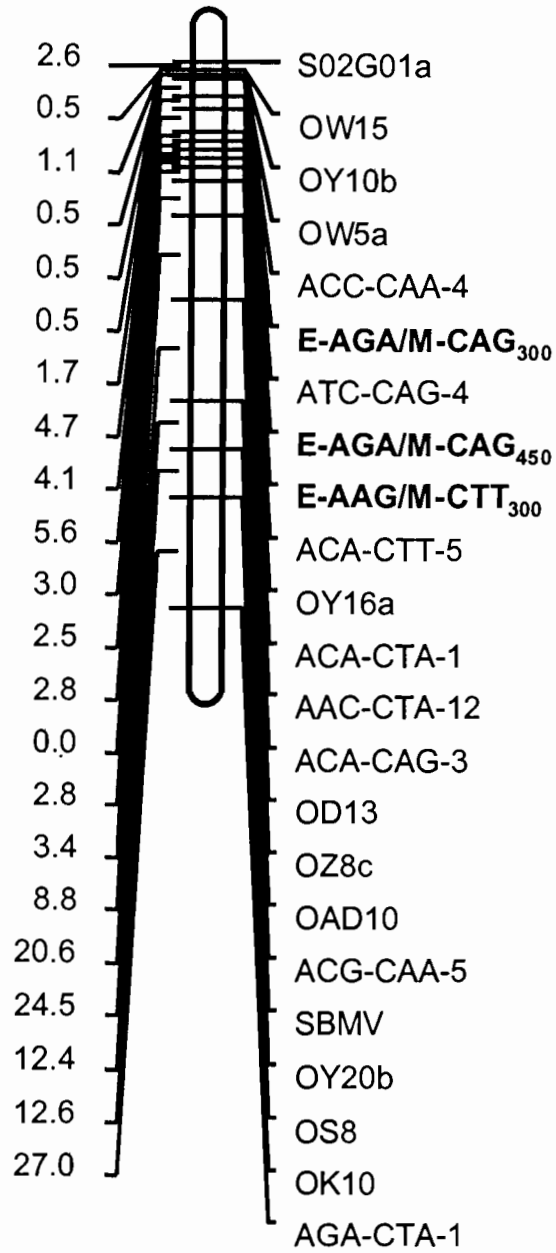


Figure 3. Partial linkage group 6 of the cowpea genetic linkage map. Markers linked to *Rsg3* and *994-Rsg* Striga resistance genes are in bold characters.

same linkage group [24]. In these studies, three AFLP markers linked to the *Rsg2-1* locus, conferring resistance to *S. gesnerioides* race 1 from Burkina Faso and six markers linked to the *Rsg4-3* locus conferring resistance to *S. gesnerioides* race 3 from Nigeria, were mapped to the same region of LG-2. Of the various markers identified, two markers, E-AAC/M-CAA₃₀₀ and E-ACAM-CAT₁₅₀, were linked to both *Rsg2-1* and *Rsg4-3*.

To date no information is available on the location of resistance genes for *S. gesnerioides* races 2, 4, and 5. It is also necessary to perform allelism studies between the different resistance genes, since they react differentially to the five *S. gesnerioides* races. It is not unreasonable to suggest that, if race-specific resistance genes for *S. gesnerioides* are clustered within the cowpea genome, some or all of the markers identified here and in our previous work will be immediately useful in the analysis of other populations of cowpea segregating for resistance to these *S. gesnerioides* races. Equally intriguing is the possibility that loci conferring resistance to other parasitic plants might also be located within this cluster, since it is known that in addition to resistance to *S. gesnerioides*, cultivars such as B301 carry duplicate dominant genes for resistance to *Alectra vogelii* (Benth.), distinct from *Rsg1* [33]. At the present time the molecular basis for resistance in host plants to parasitism by *Striga* or any other parasitic angiosperm is not known. The identification of markers linked to *Striga* resistance and their placement on the cowpea genetic map facilitates numerous future endeavors, including the development of SCARs or CAPs [17, 26] suitable for use in MAS programs [13, 29, 38] aimed at rapid germplasm improvement and the cloning and characterization of *S. gesnerioides* resistance genes using one or more of the currently available methods for map-based cloning [5, 13]. The studies described here represent the first step towards realizing these goals and to the improvement of cowpea for a needy African population.

References

1. Aggarwal VD: Research on cowpea-*Striga* resistance at IITA. In: Kim SK (ed) Combating *Striga* in Africa, Proceedings of the International Workshop Organized by IITA, ICRISAT, and IDRC. pp. 90-95 Ibadan, IITA, Nigeria (1991).
2. Aggarwal VD, Muleba N, Drabo I, Souma J, Mbewe M: Inheritance of *Striga gesnerioides* resistance in cowpea. In: Parker C, Musselman LJ, Polhill RM, Wilson AK (eds) Proceedings of the 3rd International Symposium on Parasitic Weeds. pp 143-147. Aleppo, Syria ICARDA, Aleppo. (1984).
3. Akkaya MS, Bagwhatt AA, Cregan PB: Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132 : 1131-1139 (1992).
4. Atokple IDK, Singh BB, Emechebe AM: Genetics of resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. *J Heredity* 86 : 45-49 (1995).
5. Chase MW, Hills HH: Silica gel: An ideal material for preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40 : 215-220 (1991).
6. Emechebe AM, Singh, BB, Leleji OI, Atokple IDK, Adu JK: Cowpea-*Striga* problems and research in Nigeria. In: Kim SK (ed) Combating *Striga* in Africa, Proceedings of the International Workshop Organized by IITA, ICRISAT, and IDRC pp. 18-28.. Ibadan, IITA, Nigeria. (1991).
7. Fatokun CA, Danesh D, Menancio-Hautea, DI, Young ND: A linkage map for cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp] based on DNA markers (2n = 22). In: O'Brien, JS (ed) Genetic maps 1992. A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms pp 6256-6258. Cold Spring Harbor, New York. (1993).
8. Fatokun CA, Menancio-Hautea DI, Danesh D, Young ND: Evidence for orthologous seed weight genes in cowpea and mung bean based on RFLP mapping. *Genetics* 132 : 841-846 (1992).
9. Fatokun .A, Young ND, Myers GO: Molecular markers and genome mapping in cowpea. In: Singh BB, Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN (eds). *Advances in Cowpea Research*. pp 352-360. Sayce Publishing, Devon, UK. (1997).
10. Hammond-Kosack KE, Jones JDG: Plant disease resistance genes. *Annu*

- Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48 : 575-607 (1997).
11. Kelly JD, Miklas PN: The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Molecular breeding : new strategies in plant improvement* 4 (1): 1-11 (1998).
 12. Kosambi DD: The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics* 12 : 172-175 (1944).
 13. Kumar LS: DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Adv* 17 : 143-182 (1999).
 14. Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M, Lincoln SE, Newburg L: MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181 (1987).
 15. Lane JA, Child DV, Reiss GC, Entcheva V, Bailey JA: Crop resistance to parasitic plants. In: Crute IR, Holub EB, Burdon JJ (eds) *The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions* pp. 81-97. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. (1997).
 16. Lee M: DNA markers and plant breeding programs. *Adv Agron* 55: 265-344 (1995).
 17. Lu YH, Melero-Vera JM, García-Tejada, Blanchard P: Development of SCAR markers linked to the gene *Or5* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower. *Theor Appl Genet* 100 : 625-632 (2000).
 18. Menéndez CM, Hall AE, Gepts P: A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theor Appl Genet* 95 : 1210-1217 (1997).
 19. Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnam S, Sobral BW, Young ND: Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* 20 : 317-332 (1999).
 20. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV: Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to

- Proc Natl Acad Sci USA 88 : 9828-9832 (1991).
21. Michelmore RW, Meyers BC: Clusters of resistance genes evolve by divergent selection and a birth and death process. *Genome Res* 8 : 1113-1130 (1998).
 22. Muleba N, Ouedraogo JT, Tignegre JB: Cowpea yield losses attributed to *Striga* infestations. *J. Agric. Sci. Cambridge* 129 : 43-48 (1997).
 23. Myers GO, Fatokun CA, Young ND: RFLP mapping of an aphid resistance gene in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Euphytica* 91 : 181-187 (1996).
 24. Ouedraogo JT, Maheshwari V, Berner DK., St-Pierre C-A., Belzile F, Timko MP. 2001. Identification of AFLP Markers Linked to Resistance of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to *Striga gesnerioides*. *Theor. Appl. Genet.* 102:1029-1036.
 25. Ouedraogo JT, Gowda B, Jean M, Gepts P, Timko MP, Belzile FJ. 2002. An improved genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP and RAPD markers. *Genome* 45 (1): 175-188.
 26. Paran I, Michelmore RW: Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85 : 985-993 (1993).
 27. Parker C, Polniaszek TI: Parasitism of cowpea by *Striga gesnerioides*: variation in virulence and discovery of a new source of host resistance. *Annals Appl Biol* 116 : 305-311 (1990).
 28. Pryor T, Ellis J : The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. *Adv Plant Pathol* 10 : 281-305 (1993).
 29. Ribaut J-M, Hoisington D: Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci* 3 :236-239 (1998).
 30. Ronald, PC: Resistance gene evolution. *Curr Opin Biol* 1 : 294-298 (1998).
 31. Simpson J: Molecular markers for crop improvement. In Paredes-Lopez O (ed). *Molecular Biotechnology for Plant Food Production* pp 275-301.. Lancaster, PA, USA (1999).
 32. Singh BB, Emechebe AM: Inheritance of *Striga* resistance in cowpea genotype B301. *Crop Sci* 30 :879-881 (1990).

33. Singh BB, Emechebe AM: Advances in research on cowpea *Striga* and *Alectra*. In: Singh BB, Mohan R, Dashiell KE, Jackai LEN (eds), Advances in Cowpea Research pp. 215-224. IITA-JIRCAS, Ibadan, Nigeria. (1997).
34. Varadarajan GS, Prakash CS: A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. Plant Mol Biol Reporter 9 : 6-12 (1991).
35. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23 : 4407-4414 (1995).
36. Waugh R, Bonar N, Baird E, Thomas B, Graner A, Hayes P, Powell W: Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. Mol. Gen. Genet. 255: 311-321 (1997).
37. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18 : 6531-6535 (1990).
38. Young ND: A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. Mol. Breed 5 : 505-51 (1999).
39. Young ND, Fatokun CA, Menancio-Hautea D, Danesh D: RFLP mapping in cowpea. In: Thottappilly G, Monti GL, Mohan Raj DR, Moore AW (eds) Biotechnology, Enhancing Research on Tropical Crops in Africa pp. 237-246. CTA/IITA, Ibadan, Nigeria. (1992).

CHAPITRE IV

An Improved Genetic Linkage Map for Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)
Combining AFLP, RFLP, RAPD and Biochemical Markers and Biological Resistance
Traits

An Improved Genetic Linkage Map for Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Combining AFLP, RFLP, RAPD and Biochemical Markers and Biological Resistance Traits

J.T. Ouédraogo^{1,2*}, B.S. Gowda³, M. Jean², T.J. Close⁴, J.D. Ehlers⁴, A.E. Hall⁴, A.G. Gillaspie⁵, P.A. Roberts⁶, A.M. Ismail⁷, G. Bruening⁸, P. Gepts⁸, M.P. Timko^{3*}, F.J. Belzile^{2*}

¹ Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), 01BP476
Ouagadougou 01, Burkina Faso.

² Département de Phytologie, Université Laval, Québec, G1K 7P4, Canada.

³ Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia 22903, USA.

⁴ Department of Botany & Plant Sciences, University of California, Riverside, CA
952521-0124, USA.

⁵ Plant Genetics Conservation Unit, USDA –ARS, Griffin, GA 30223-1797, USA.

⁶ Department of Nematology, University of California, Riverside, CA 92521-0124 USA.

⁷ Crop, Soil and Water Science Division, IRRI, DAPO 7777, Metro Manila, The
Philippines.

⁸ Department of Agronomy and Range Science, University of California, Davis, CA
95616-8515, USA.

Résumé du manuscrit

Nous avons construit une carte de liaison génétique du niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp) en analysant la ségrégation de plusieurs types de marqueurs d'ADN, de marqueurs biochimiques et de caractères de résistance dans une population de lignées recombinantes issues du croisement entre IT84S-2049 et 524B. La ségrégation de 242 nouveaux marqueurs AFLP et 18 marqueurs liés à des gènes ou des analogues de gènes de résistance combinés aux 181 marqueurs RAPD, RFLP, AFLP et biochimiques précédemment cartographiés par Menéndez et al. (1997) a permis de construire une carte de liaison génétique intégrée du niébé. La nouvelle carte comporte 11 groupes de liaison couvrant une distance totale de 2670 cM, avec une distance moyenne de 6,43 cM entre les marqueurs. De façon très surprenante, une large portion continue du groupe de liaison 1 qui n'avait pas été couverte par la carte précédente a été détectée. Cette région s'étend sur près de 580 cM et comprend uniquement des nouveaux marqueurs AFLP (54 au total). En plus de la construction de la nouvelle carte, plusieurs gènes de résistance ou analogues de gènes de résistance ont été situés sur la carte. Parmi ceux-ci, on retrouve la résistance aux races 1 et 3 du *Striga gesnerioides*, la résistance à plusieurs virus (CPMV, CPSMV, B1CMV, SBMV) ainsi qu'au flétrissement fusarien et à la galle des racines. Ces marqueurs seront utiles au développement des outils pour la sélection assistée de marqueurs chez le niébé de même que pour le clonage positionnel des différents gènes de résistance.

Mots clé : Niébé – AFLP – RAPD – analogues de gènes de résistance – carte de

Abstract

An improved genetic linkage map has been constructed for cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) based on the segregation of various DNA markers, biochemical and biological resistance traits in an F₉ recombinant inbred population of 94 individuals derived from the cross between IT84S-2049 and 524B. A set of 242 AFLP markers and molecular markers linked to 18 biological resistance traits, resistance genes, and resistance gene analogs (RGAs) were scored for segregation within the parental and recombinant inbred lines (RILs) and these data used along with the 181 RAPD, RFLP, AFLP, and biochemical markers previously mapped by Menéndez et al. (1997) to construct an integrated linkage map for cowpea. The new genetic map of cowpea consists of 11 linkage groups spanning a total of 2670 cM, with an average distance of 6.43 cM between markers. Astonishingly, a large and contiguous portion of linkage group 1 undetected in previous mapping work was discovered. This region spanning about 580 cM and is composed entirely of AFLP markers (54 in total). In addition to the construction of a new map, molecular markers associated with various biological resistance/tolerance traits, resistance genes, and RGAs were also placed on the map including markers for resistance to *Striga gesnerioides* races 1 and 3, CPMV, CPSMV, B1CMV, SBMV, *Fusarium* wilt, and root-knot nematodes. These markers will be useful for the development of tools for marker-assisted selection in cowpea breeding, as well as for subsequent map-based cloning of the various resistance genes.

Key words: Cowpea, AFLP, RAPD, resistance gene analogs, genetic linkage map.

4.1 Introduction

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) is an important pulse crop in many areas of the world. In semi-arid West and Central Africa, it is consumed as a pulse and/or pot herb where it supplements the daily diet of cereals, root and tuber foods with good quality protein, rich in lysine, an essential amino acid deficient in cereal grains (Bressani 1985). Cowpea forage is also used to feed livestock in the Sahel and Sudan Savannah regions.

Cowpea belongs to the genus *Vigna savi*. (subgenus *Vigna* sect. *Catiang*) in the Phaseoleae (Maréchal et al. 1978). From a cytogenetic viewpoint, relatively little is known about *Vigna* species (Saccardo et al. 1997). The few studies on the subject have reported a chromosome number of $2n = 22$ for *Vigna unguiculata* (Barone and Saccardo 1990; Pignone 1990; Saccardo et al. 1997). Barone and Saccardo (1990) described the karyotype of cowpea as being composed of one very long chromosome, one very small chromosome, while the remaining nine chromosomes were allocated to three groups of intermediate size. On the other hand, Pignone et al. (1990) described 11 chromosome pairs falling into three size groups: five long, five medium and one short.

The size of the cowpea genome has been estimated at 613×10^6 bp (Arumuganathan and Earle 1991). However, the total recombination length is still unknown. Two linkage maps for cowpea have been previously published. The first map to be constructed was based mainly on the segregation of restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers in the progeny of a cross between an improved cultivar and a putative wild progenitor type (*Vigna unguiculata* ssp. *dekindtiana*) (Fatokun et al. 1993). The map consisted of a total of 92 markers placed in eight linkage groups that spanned a total genetic distance of 684 cM. Subsequently, a second map was constructed based on the segregation of various molecular markers and biochemical traits in an F_9 recombinant inbred population derived from the cross between two cultivated genotypes IT84S-2049 and 524B. The

map contained 181 markers, mostly consisting of randomly amplified polymorphic DNAs (RAPDs), that were assigned to 12 linkage groups covering a total of 972 cM (Menéndez et al. 1997). Using cultivated varieties for this mapping has the advantage of a higher utility in cowpea breeding programs because it identifies markers within the cultivated gene pool.

High-resolution genetic maps provide breeders with powerful tools for analyzing the inheritance of genes of interest, for monitoring the transmission of specific genes or genomic regions from parents to progeny, and for map-based cloning of those genes (Kumar 1999; Simpson 1999). Moreover, the DNA markers present in these maps can often be used in marker-assisted selection strategies capable of increasing breeding efficiency and overcome some limitations of conventional breeding methods (Young 1999). Unfortunately, given the low number of markers utilized in their construction, neither of the previous genetic maps generated for cowpea offered a particularly high resolution or utility for breeders.

Recently, we identified AFLP markers tightly linked to different race-specific *Striga gesnerioides* resistance genes in cowpea (Ouédraogo et al. 2001). In the course of this work, we identified selective primer combinations which proved highly polymorphic between the two cultivars originally utilized by Menéndez et al. (1997) in their mapping work. Using 27 selective primer combinations, we were able to generate 242 new markers in this mapping population and to place them on an improved map. In addition to these markers, we mapped resistance/tolerance traits for several of the major pathogens/pests known to constrain cowpea production and we located a number of resistance gene analogs of yet undetermined biological function (Gowda et al. 2000). The result is a more extensive map that comprises 11 linkage groups that identifies the location of genes of importance to cowpea production world-wide.

4.2 Material and methods

4.2.1 Plant material

The F₈ population consisting of 94 recombinant inbred lines (RIL) developed from a cross between the two breeding lines, IT84S-2049 and 524B, was previously described by Menéndez et al. (1997). This population was used to construct the initial genetic linkage map in cowpea.

4.2.2 DNA extraction

Total genomic DNA was isolated from 2-3 g of leaf according to the method of Varadarajan and Prakash (1991) and the DNA concentration of samples was measured spectrophotometrically at A_{260} using a Varian DMS200 spectrophotometer. Concentrated DNA samples were maintained in ethanol at 4 °C and used as necessary for AFLP analysis. Working solutions (100 ng/μl) were prepared in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Dilute solutions were maintained at -20 °C.

4.2.3 AFLP analysis

AFLP analysis was performed essentially as described by Vos et al. (1995) using the AFLP™ Analysis System I AFLP Starter Primer Kit (Gibco BRL- Life Technologies, Inc., Gathersburg, Md., USA) with minor modifications: each reaction used 500 ng rather than 250 ng of genomic DNA; the recommended dilutions used after the ligation of the adapters (1:10) and following the pre-amplification reaction (1:50) were cut in half. Sixty-four *EcoRI/MseI* selective primer combinations were tested for their ability to detect polymorphisms in the two parental lines of the mapping population, IT84S-2049 and 524B. Selective primers are designated by

their restriction site (E-*EcoRI*; M-*MseI*) and the number and nature of the additional nucleotides (e.g., E-AAC, M-CTC, etc.) Those combinations which generated at least eight polymorphic fragments were subsequently chosen for use in the analysis of the RILs. In addition, primer combinations which yielded polymorphic markers linked to *S. gesnerioides* resistance genes (see Ouedraogo et al., in press) were also included in the analysis of parental lines and RILs derived from the IT84S-2049 X 524B cross.

One of the markers linked the *Striga* resistance loci, E-ACT/M-CAA₅₂₄, that we intend to convert into a sequence characterized amplified region (SCAR), was used in PCR-based amplification reactions to analyze segregation in the mapping population. Based on the previous identification of AFLP E-ACT/M-CAA₅₂₄ marker (Ouedraogo et al., in press), the fragment was isolated from the polyacrylamide gel according to the procedure described by (Lu et al 1999). Four microliters of the DNA recovered were used to re-amplify the AFLP fragment using a standard PCR protocol made of a 40- μ L reaction under the following conditions: 35 cycles of 94°C for 30 s; 50°C for 30 s; 72°C for 1 mn; 72°C for 10 mn and 4°C hold). The primers were the unlabeled selective E-ACT/M-CAA combination using 0.2 μ g/40 μ L reaction. The PCR product was electrophoresed on a 2% agarose gel to compare the size of the band with that estimated from the AFLP gel. The 40 μ L were loaded in 4 wells. The bands excised from the agarose gel with a clean blade and the DNA purified using the protocol described by Sambrook et al. (1989). The purified DNA was cloned as described by Bradeen and Simon (1998). Three different colonies were sequenced on an ABI 373 automated sequencer (Applied Biosystems, Inc) using a Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) as recommended by the manufacturer. The same sequence of 524 bp was obtained from the three samples. Based on that sequence, two specific primers of 24 bases in length were designed and synthesized by Gibco BRL- Life Technologies, Inc., Gathersburg, Md., USA. Sequences of these two primers were 5'-AATTCACCTTATGACTGAGCTATAT-3' -as the forward primer- and 5'-TAACAAAATTGATTTGTTTGGTT-3' -as the reverse one-. They were used to screen the segregation of the marker in the mapping population. Amplification was

performed in a total volume of 25 μL containing 5 μL genomic DNA (500 ng) template, 0.5 μM of each primer, 1.5 U of *Taq* DNA polymerase (Promega), 2.5 μL of the corresponding *Taq* 10x buffer, 200 μM dNTP nucleotides. The PCR was carried out as described above.

4.2.4 Mapping of resistance genes and resistance gene analogs.

Resistance gene analogs. Genomic DNA fragments encoding various resistance gene analogs (RGAs) were isolated and characterized as described by Gowda et al (2000). Location of these RGAs on the cowpea genomic map was carried out by RFLP analysis. In these experiments, 10 μg aliquots of genomic DNA isolated from IT84S-2049, 524B, and the 94 RILs (Menéndez et al. 1997) were digested with either *EcoRI*, *EcoRV* or *HindIII*. Restriction digestion products were separated on 0.8% agarose gels in 1 X TAE buffer and then transferred to NytranPlus membranes (Schliecher and Schuell, Keene, NH) by alkaline capillary transfer (Sambrook et al. 1989). The blots were hybridized with [^{32}P]-dCTP-labeled hybridization probes prepared from the inserts of the various RGA clones. Prehybridization, hybridization, washing and autoradiography of the membranes were done according to Gowda et al. (1996, 1999). The polymorphic fragments between the two parental lines were analyzed for their segregation using the RILs.

RLRR3-4T and RLRR3-4B correspond to RGAs detected by PCR amplification of genomic DNA using primer pairs based on conserved regions within the leucine rich repeat of the *Arabidopsis thaliana* *RPS2* gene that confers resistance to *Pseudomonas syringae* as described by Chen et al. (1998). Segregation of the polymorphic fragment recognized between the two lines was analyzed in the RILs.

Viral resistance traits. Blackeye cowpea mosaic potyvirus (BICMV) is a seedborne pathogen of cowpea that occurs more or less worldwide (Hampton et al. 1997). One of the parental lines, IT84S-2049, has been shown to be immune to at least 7 geographically and pathogenically diverse isolates of BICMV, whereas the other

parental line, 524B, was susceptible to BICMV and exhibited systemic viral multiplication as detected by ELISA (Bashir and Hampton, 1996). (Note in this earlier work the authors miss-identified IT84S-2049 as being IT 80S-2049).

Four seeds of each of the 94 RILs, two parental lines, and Coronet (susceptible control) were sown in pots and the plants were grown in an insect-free greenhouse. When the unifoliolate leaves were fully expanded they were mechanically inoculated with an extract from BICMV-infected leaves of cowpea in 0.025 M phosphate buffer (pH 7.2) containing diatomaceous earth as an abrasive. One week later the first trifoliolate leaf of the plants was mechanically inoculated using the same method. When the third trifoliolate leaf was fully expanded, samples were collected from it for ELISA analysis using the direct antigen-coated-enzyme-linked immunosorbent assay described by Gillaspie et al. (1995). Plants were also examined for visual symptoms. The ELISA assay indicated viral multiplication occurred in Coronet, parental line 524B and 35 of the RILs but not in parental line IT84S-2049 and 59 of the RILs. Viral disease symptoms were observed on inoculated leaves of Coronet and 43 of the 59 RILs that also exhibited systemic viral multiplication but no symptoms were detected on IT84S-2049, the other RILs or 524B. Mapping was based on the presence or absence of systemic viral multiplication as indicated by the ELISA assay.

To map resistance to Southern bean mosaic sobemovirus (SBMV), parental lines and RILs were screened for systemic virus multiplication and symptoms with mechanical inoculation as described for BICMV but with Early Ramshorn as a susceptible control. The ELISA assay indicated viral multiplication occurred in Early Ramshorn, parental line 524B and 46 of the RILs but not in IT84S-2049 and 48 of the RILs. Viral disease symptoms were observed on inoculated leaves of Early Ramshorn, 524B and 37 of the RILs including 4 that did not show systemic viral multiplication. Mapping was based on the presence or absence of systemic viral multiplication as indicated by the ELISA assay.

Stocks of Cowpea mosaic virus (CPMV) and Cowpea severe mosaic virus (CPSMV) virions were CsCl gradient-purified and were inoculated to seedling primary leaves at 2 µg/ml. IT84S-2049, considered the resistant parent, developed pinpoint red necrotic lesions after inoculation of CPMV and no symptoms after inoculation of CPSMV. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) failed to detect either virus in non-inoculated parts of IT84S-2049 plants. On 524B, both viruses induced lesions, necrotic for CPSMV and, for CPMV, chlorotic lesions followed by systemic spread. CPMV-induced symptoms on each RIL was characteristic of one or the other parental type, and resistance was scored visually. ELISA for CPSMV confirmed visually scored resistance and susceptibility.

Fusarium resistance. Parental line 524B has resistance to race 3 of Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphylum* (E. F. Smith) W. C. Snyder & H. N. Hansen), whereas, IT84S-2049 is susceptible. The resistance of 524B was most likely inherited from California Blackeye No.3, CB3, (Rigert and Foster 1987). Twelve replicate plants of each of the parental lines and six replicate plants of each of the RILs and CB3 and CB5 as resistant and susceptible controls, respectively, were inoculated with race 3 of Fusarium wilt. A seedling root clip/dip inoculation procedure was used as described by Rigert and Foster (1987). Seedlings and plants were grown in a glasshouse at 30/20°C maximum/minimum daily air temperatures. Three weeks after inoculation, plants were scored as being resistant (appeared healthy) or susceptible (dead or dying with brown discoloration of the vascular tissue). Parental line 524B, 39 of the RILs and CB3 were scored as being resistant, whereas parental line IT84S-2049, 53 of the RILs and CB5 were scored as being susceptible to the disease and these scores were used for mapping.

Nematode resistance. Parental line IT84S-2049 has stronger resistance to several root-knot nematodes (through the presence of the Rk^2 allele) than parental line 524B, which probably inherited its resistance (through the presence of the Rk allele) from one of its parents, CB5 (Roberts et al. 1997). Fifteen replicate plants of each of the parental lines and 4 replicate plants of each RIL were screened for their

nematode resistance using the growth-pouch technique of Omwega et al. (1988). At 10 to 14 days after germination, individual root systems were inoculated with about 1500 second-stage juveniles of an *Rk*-virulent race of *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. At 30 days after inoculation, each pouch was infused with an egg-mass-selective dye (75 mg/L erioglaucine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and kept flooded with the dye overnight. In the morning the dye was drained and the number of egg masses was determined visually using an illuminated 10x magnifier. Parental line IT84S-2049 had 48 egg masses per root system, whereas parental line 524B had 153 egg masses per root system. Forty seven of the RILs had an average number of egg masses per root system that was less than the parental mean, and were designated resistant, whereas 47 of the RILs had an average number of egg masses per root system that was greater than the parental mean, and were designated as being susceptible. These resistant/susceptible scores were used for mapping.

Dehydrin protein in seed. The presence of a specific dehydrin protein (DHN1) in cowpea seed has been associated with chilling tolerance at emergence (Ismail et al. 1997, 1999). Seed of parental line 524B contain DHN1 which probably was inherited from its parent, CB3, and which was not present in parental line IT84S-2049. The parental lines and RILs had been screened for the presence of DHN1 using a western blot analysis by Ismail et al. (1997) and mapped by Menéndez et al. (1997). The gene encoding DHN1 has been identified and designated *Dhn1* (Ismail et al. 1999). The RILs were assayed by PCR using oligonucleotides that were specific for the *Dhn1* gene as described by Ismail et al. (1999). The PCR analysis of the RILs for the presence of *Dhn1* provided the same classification as had been obtained with the western blot for the presence of the protein, DHN1, except for 5 RILs that had been scored positive for *Dhn1* but negative for DHN1. After closer examination, these 5 RILs were found not to be negative but to have a fainter band than all other RILs scored positive and were re-scored as positive for DHN1, thereby providing 100% agreement. Mapping was based on these slightly modified assignments of RILs based on the combined DHN1 and *Dhn1* classification with 38 RILs containing

DHN1 in the seed and yielding a higher MW PCR product and 41 RILs not containing the seed protein and yielding a lower MW PCR product.

4.2.5 Marker nomenclature and segregation analysis

Different sized AFLP fragments detected by the same selective primer (e.g., E-AAC / M-CTC) were numbered consecutively beginning with 1, with the number 1 being used for the marker with the highest molecular weight. Segregation of each marker was checked using a chi-square test for goodness of fit to the expected 1:1 ratio.

4.2.6 Linkage analysis and distribution of markers along the map

Linkage analysis was performed on the entire set of markers made up by the marker data set defined in Menéndez et al. (1997) and the new markers we identified. The software program MAPMAKER 2.0 for Macintosh (Lander et al. 1987) was used to assemble the map. The following conditions were employed. To create linkage groups, LOD scores were decreased stepwise from six to three and the maximum recombination fraction was set to 30%. To determine the most likely order within a linkage group, the "compare" command was used based on the multi-point linkage data with the above cited linkage criteria. The Kosambi mapping function (Kosambi 1944) was used to convert recombination frequency into map distances in centimorgans (cM). To confirm the results, this procedure was repeated after removal of markers showing a segregation distortion to generate a framework map. The skewed markers were then placed using the "try" command. In order to determine if the markers were randomly distributed within a linkage group, a chi-square test for goodness of fit was used as described by Rouppe et al. (1997a).

4.3 Results

4.3.1 Level of polymorphism between IT84S-2049 and 524B

Sixty-four *EcoRI/MseI* selective primer combinations were tested for their ability to detect polymorphism between the two parental lines of our mapping population, IT84S-2049 and 524B. Of these 64 combinations, 27 detected 8 or more polymorphic bands between the parental profiles (Fig. 1). A total of 2274 fragments were amplified using the 27 primer combinations, with the number of bands detected per primer combination ranging from 61 to 112 (mean number of fragments per primer combination equal to 84) (Table 1). Of the 2274 bands visualized, 279 (12.3%) were polymorphic between the parental lines, with an average of 10.3 polymorphic fragments amplified per primer combination (range of 8 to 18 polymorphic fragments amplified). Seven primer combinations detected particularly high numbers of polymorphism (Table 1). These were as follows: E-AGA/M-CTC (14%), E-AAC/M-CTT, E-AAG/M-CTT, and E-AGAM-CTA (16%), E-AAG/M-CTC and E-ATC/M-CTA (17%) and E-AAC/M-CTA (20%). Not all of the polymorphic fragments were used in the construction of the map since some AFLP markers were discarded mainly due to difficulties in scoring the mapping population. In total, 242 markers were mapped and in 62.8% of the cases (152/242) it was the IT84S-2049 allele that produced an amplification product.

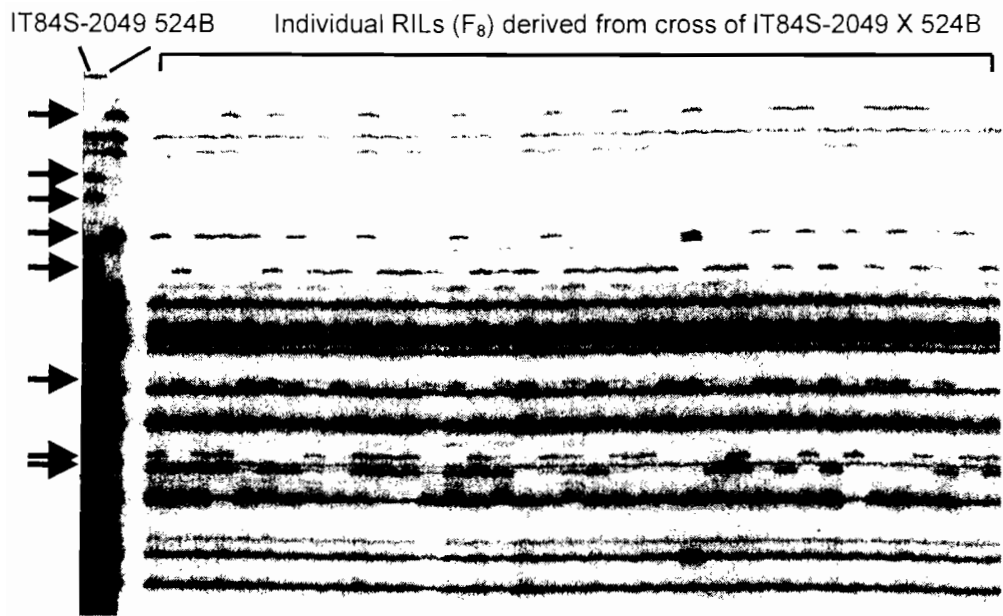


Fig. 1. AFLP fingerprint of parental line IT84S-2049 and 524B and 37 RILs using the primer combination E-ACAM-CAT.

Table 1. Primer combinations used and polymorphism levels

Primer combinations	Visible fragments	Polymorphic markers	Polymorphism percentage	Mappe d markers	Origin of amplicon	
					IT84S-2409	524B
E-AAC/M-CAA	102	8	8	5	2	3
E-AAC/M-CTA	92	18	20	17	10	7
E-AAC/M-CTT	76	13	16	12	8	4
E-AAG/M-CAA	98	13	13	12	8	4
E-AAG/M-CTA	70	8	11	5	5	0
E-AAG/M-CTC	76	13	17	14	7	7
E-AAG/M-CTT	102	16	16	11	7	4
E-ACA/M-CAA	112	13	11	13	9	4
E-ACA/M-CAG	79	8	10	4	2	2
E-ACA/M-CAT	94	10	11	8	4	4
E-ACA/M-CTA	74	9	12	8	4	4
E-ACA/M-CTT	90	8	9	7	6	1
E-ACC/M-CAA	88	8	9	5	1	4
E-ACG/M-CAA	91	11	12	10	6	4
E-ACG/M-CTT	82	8	10	5	2	3
E-ACT/M-CAA	89	8	9	9	6	3
E-ACT/M-CTC	78	8	10	8	4	4
E-AGG/M-CAT	81	8	10	4	3	1
E-AGG/M-CTT	79	8	10	7	5	2
E-AGA/M-CAG	66	8	12	6	4	2
E-AGA/M-CTA	97	16	16	16	11	5
E-AGA/M-CTC	78	11	14	11	10	1
E-AGT/M-CAA	96	12	13	12	6	6
E-ATC/M-CAA	87	8	9	8	8	0
E-ATC/M-CAG	66	8	12	6	3	3
E-ATC/M-CTA	70	12	17	12	7	5
E-ATG/M-CAC	61	8	13	7	4	3
Total	2274	279	-	242	152	90
Mean	84.2	10.3	12.2	8.9	5.6	3.3
Range	61-102	8-18	8-20	4-17	-	-

4.3.2 Segregation of the markers and biological traits

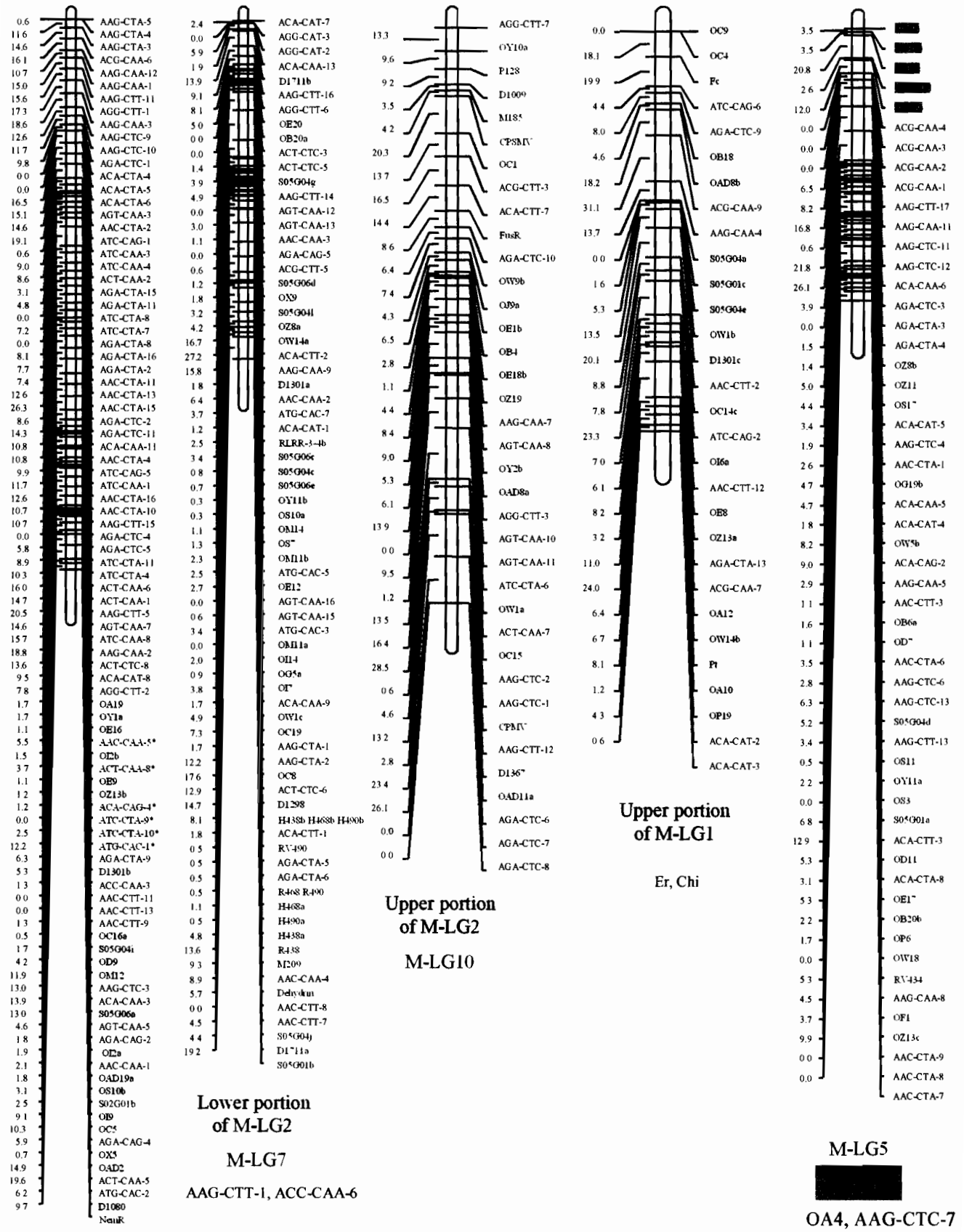
A chi-square test was performed on the entire set of the 259 new markers to verify their segregation ratios. Of the 259 markers, 49 (20.2%) deviated from the expected 1:1 ratio ($P \leq 0.05$). In 80% of these cases, the allele that was over-represented originated from the 524B parent and in the remaining 20% of cases transmission of the IT84S-2049 allele was favoured. A chi-square test performed on the data for the segregation of the various biological traits revealed that only BICMV deviated from the expected 1:1 ratio ($P < 0.05$)

4.3.3 The improved cowpea linkage map.

Fig. 2 shows the improved genetic linkage map for cowpea which integrates the new AFLP marker analysis, the previous mapping data, and markers for various agronomically important traits. A total of 440 markers are included in the map, of which 181 are drawn from the previous map (Menéndez et al. 1997) and 259 (242 AFLP and 17 RFLP) are derived from this study. Of the total number of markers included, approximately 98% (432/440) could be assigned to one of 11 linkage groups (LG) that together span 2670 cM. Of these 432 markers, 21 are linked to a specific LG based on two-point linkage data, but had LOD values of marker orders below 2.0 based on three-point data. Eight markers could not be placed on the map because they failed to show significant linkage to any of the 11 linkage groups at a LOD score of three.

An extraordinary variation in the size of the linkage groups is observed (Fig. 2). The largest linkage group, LG1, consists of 94 markers and spans 771 cM. At the other end of the extreme is LG11, composed of only 3 markers spanning 19 cM. Overall, the LGs could be classified into four arbitrary size classes: greater than 300 cM (LG1); 200-300 cM (LG2, LG3, LG4, LG5 and LG6); 100-200 cM (LG7 and LG8); and less than 100 cM (LG9, LG10 and LG11). As the total genetic distance (2670 cM) represents the cumulative distance between the 412 markers assigned to a linkage

LG1 (771 cM, 94 markers) LG2 (330 cM, 73 markers) LG3 (328 cM, 38 markers) LG4 (285 cM, 30 markers) LG5 (266 cM, 55 markers)



Upper portion of M-LG1

Er, Chi

Upper portion of M-LG2

M-LG10

Lower portion of M-LG2

M-LG7

AAG-CTT-1, ACC-CAA-6

M-LG5

OA4, AAG-CTC-7
AAG-CTC-8

Lower portion of M-LG1

AAG-CAA-10, AGG-CAT-4, ACG-CAA-8
AAC-CTA-5, ACA-CAA-2, AAC-CTT-4, ACT-CTC-1

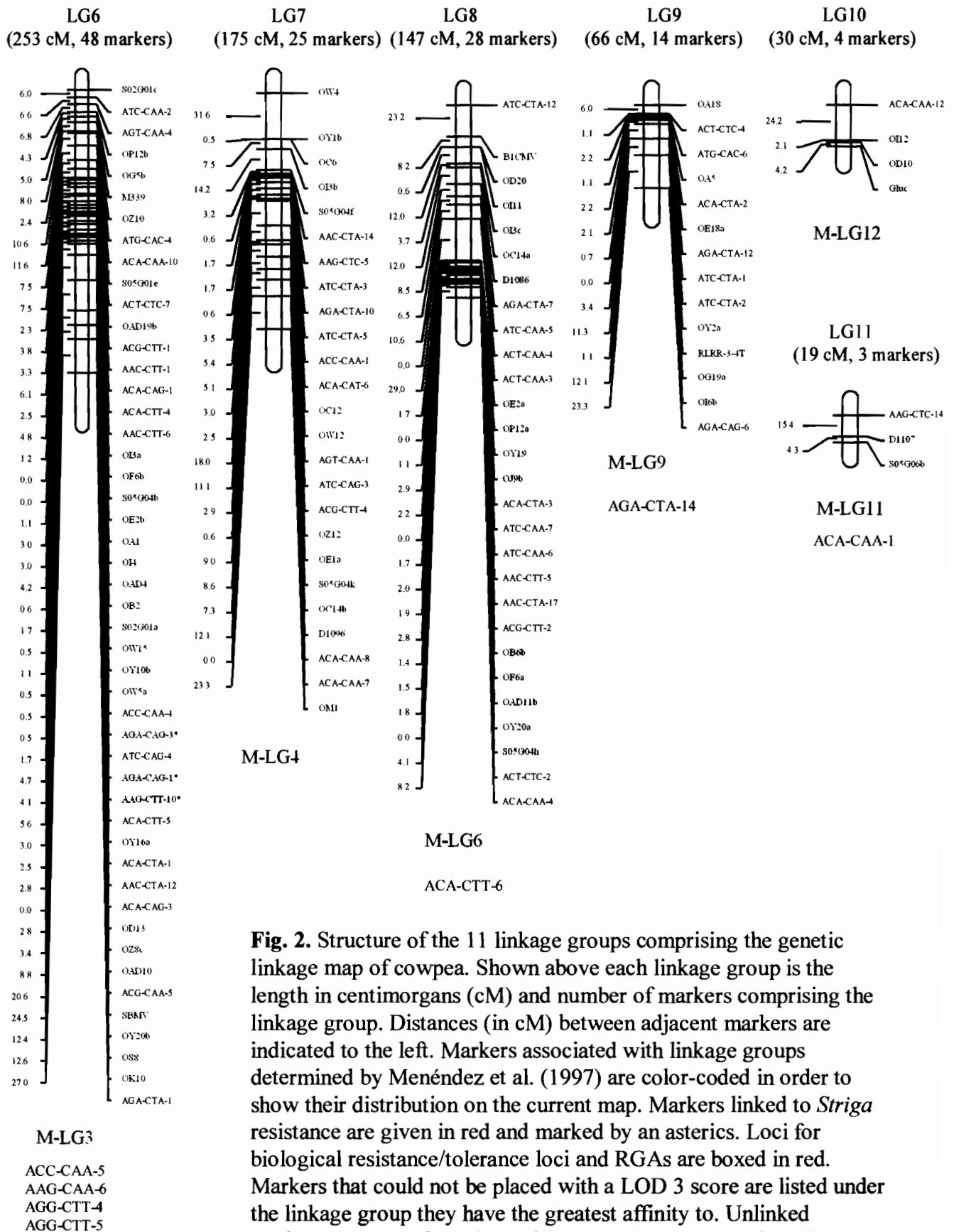


Fig. 2. Structure of the 11 linkage groups comprising the genetic linkage map of cowpea. Shown above each linkage group is the length in centimorgans (cM) and number of markers comprising the linkage group. Distances (in cM) between adjacent markers are indicated to the left. Markers associated with linkage groups determined by Menéndez et al. (1997) are color-coded in order to show their distribution on the current map. Markers linked to *Striga* resistance are given in red and marked by an asterics. Loci for biological resistance/tolerance loci and RGAs are boxed in red. Markers that could not be placed with a LOD 3 score are listed under the linkage group they have the greatest affinity to. Unlinked markers are AAC-CTA-3, Parthcarp, AAC-CTT-10, ACA-CTA-7, ACG-CAA-10, AGG-CAT-1, R25, AAG-CTT-9.

group, the average marker density is calculated to be 6.43 cM. Sixty-seven of 412 (or 18.4%) of the markers were so tightly linked that no recombinants were observed among the 94 RILs, while only nine of 412 (or 2.1%) of the markers are separated by more than 25 cM. Only two pairs of markers show distances of greater than 30 cM (LG4 and LG7 at 31.1 and 31.6 cM, respectively).

4.3.4 Distribution of markers along the map

The distribution of markers within the linkage groups was not random. The chi-square test for goodness of fit showed that all of the LGs contained an interval in which the number of markers found was significantly higher than expected assuming a random distribution (at $P \leq 0.05$). There is a tendency for marker clustering mainly at two levels. First, there is a tendency for clustering of markers of the same type. This can be seen by comparing those derived by AFLP analysis versus RFLP or RAPD analysis. Second, within the AFLP markers, those generated by amplification reactions using selective primers with a particular combination of selective specific bases (e.g., *EcoRI* primers with CCA or CCT as their selective bases) tend to cluster. The first level of clustering is best illustrated in LG1, whereas the second level of clustering is evident in LG3 (Fig. 2).

4.3.5 Genes conferring resistance to *Striga* located on LG1 and LG6.

We have previously reported the identification of a number of AFLP markers linked to genes conferring resistance to race 1 or 3 of the parasitic weed *Striga gesnerioides* (Ouédraogo et al. 2001; Ouédraogo et al., manuscript in preparation). In order to locate the *Striga* resistance genes on the integrated cowpea genetic map, we tested the corresponding primer pairs on the parents of the mapping population (IT84S-2049 and 524B) to see if some or all of the markers could be used on this set of parents. Nine of the 48 primer combinations tested revealed a polymorphism identical to that observed between the parents of the populations segregating for

resistance to *Striga* thereby allowing us to place these markers on the map (Fig. 3). Six of these markers (AAC-CAA-5, ACT-CAA-8, ATC-CTA-9, ATC-CTA-10, ACA-CAG-4 and ATG-CAC-1) mapped to the lower portion of LG1. These markers are linked to the *S. gesnerioides* race 1 and race 3 resistance genes found in the resistant cowpea lines B301, IT82D-849 and Tvu 14676 (Ouédraogo et al. 2001). Three other markers linked to *Striga* resistance genes (AGA-CAG-1, AGA-CAG-3, and AAG-CTT-10) mapped to LG6. These markers are linked to the *S. gesnerioides* race 1 resistance genes found in cultivars Gorom and IT81D-994 (Ouédraogo et al., manuscript in preparation).

4.3.6 Mapping of loci for biological resistance and other biochemical characteristics.

Like other food crops, cowpea is attacked by a variety of microbial, viral, and fungal pathogens and host for a number of insect pests. In addition to placing loci for *Striga* resistance on the map, we were able to place loci for several other major cowpea pathogens. Blackeye cowpea mosaic potyvirus (BICMV) and Southern bean mosaic sobemovirus (SBMV) are seedborne viruses that are distributed throughout the cowpea-producing regions of the world (Hampton et al. 1997). IT84S-2049 is reported to be immune to at least 7 geographically and pathogenically diverse isolates of BICMV, whereas 524B, was susceptible. B1CMV resistance mapped to the top of LG8, whereas SBMV resistance mapped to LG6. SBMV resistance was well separated from the *Striga* race 1 resistance gene also located on this linkage group. Cowpea mosaic virus (CPMV) and cowpea severe mosaic virus (CPSMV) are also significant pathogens of cowpea. Interestingly, resistance genes for CPMV and CPSMV mapped to LG3, but were located well separated at the bottom and top of the linkage group, respectively. CPSMV resistance mapped near to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphylum* (E. F. Smith) W. C. Snyder & H. N. Hansen) resistance. Fusarium wilt has worldwide distribution and causes a major disease problem for cowpea, especially in irrigated areas such as California (Hall et al. 1997). The distance between the two loci is quite large thus giving no indication of

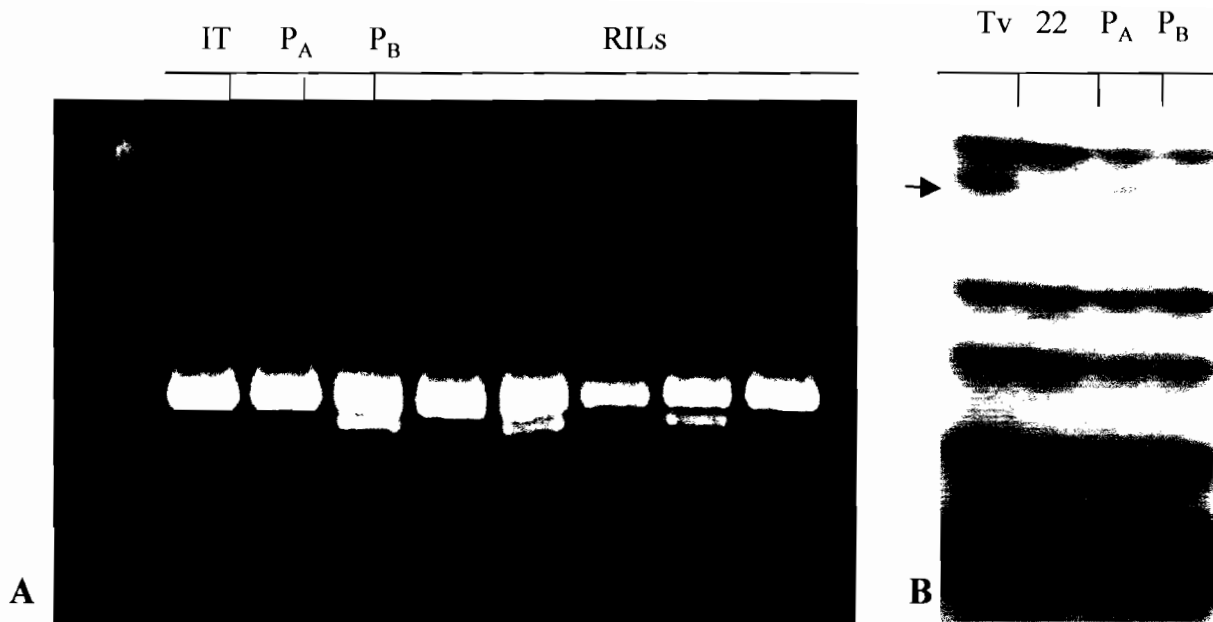


Fig. 3ABC

(A) Amplification pattern and polymorphism between the two parents IT84S-2049 (P_A) and 524B (P_B) amplified by the specific primers designed from the sequence of the ACT-CAA-8 maker linked to the IT (IT82D-849) resistance gene. (B) AFLP autoradiograph of the ACA-CAG-4 marker showing the same fragment in the *Striga* population parental lines Tvu 14676 (Tv) , IT84S-2246(22) and the polymorphism of the same band between the P_A and P_B. (C) The same fragment representing the marker AGA-CAG-1 revealed in the *Striga* resistant cultivar Gorom (G) that is polymorphic between the P_A and P_B of the mapping population.

clustering of resistance genes. Plant parasitic root-knot nematodes have a worldwide distribution, can severely damage cowpea and many other crop species and the development of resistant cultivars is the major solution to this problem (Hall et al. 1997). Resistance to several root-knot nematodes (through the presence of the RK^2 /*Rk* alleles) mapped to the bottom of LG1.

We have previously reported the characterization of resistance gene analogs (RGAs) from cowpea bearing similarity to resistance genes from various plant species containing conserved nucleotide-binding site (NBS) and leucine rich repeat (LRR) motifs (Gowda et al., 2000). Although the biological function of these RGAs is unknown, we have been able to place markers associated with several of the classes onto the map in order to determine if they are located near any biological resistance/tolerance function already characterized in cowpea. RFLP markers associated with RGA438, RGA490, and RGA468 are located at the bottom of LG3. On the map H468a, H438a, and H490a correspond to a polymorphic HindIII fragment detected by all three probes and H438b/H468b/H490b corresponds to a different second polymorphic HindIII fragment detected by all three RGA probes (i.e., H468, H438, and H490). R468/490 refers to a polymorphic EcoRI fragment detected by both RGA468 and RGA490, R438 to a polymorphic EcoRI fragment detected by RGA438, and RV490 refers to a polymorphic EcoRV fragment detected only by RGA490.

Two other RGAs were also placed on the map. RLRR3-4T and RLRR3-4B correspond to RGAs detected by PCR amplification of genomic DNA using primer pairs based on conserved regions within the leucine rich repeat of the *Arabidopsis thaliana* *RPS2* gene that confers resistance to *Pseudomonas syringae* as described by Chen et al. (1998). Markers associated with RLRR3-4T and RLRR3-4B mapped to LG9 and LG3, respectively.

Clustering of markers associated with these three RGAs is not surprising since RGA438, RGA468 and RGA490 identified similar hybridization patterns within the genomic digests of cowpea DNA and appear to be members of a multigene

family (Gowda et al. 2000). In contrast, RV434, detected as a polymorphic EcoRV fragment by hybridization with RGA434, is located on LG5. RGA434 hybridized to a subfamily of sequences distinct from those recognized by RGA438, RGA490, and RGA468. In neither case were the RGAs associated with a locus for a known disease or pest resistance/tolerance phenotype.

Among the biochemical traits placed on the map is a specific dehydrin protein (DHN1) in cowpea seed. DHN1 has been associated with chilling tolerance at emergence (Ismail et al. 1997, 1999). In the present map, dehydrin mapped to LG2, whereas in the previous map (Menéndez et al. 1997) this marker was located on LG7.

4.4 Discussion

4.4.1 Polymorphism rate and segregation analysis

In previous attempts to generate a comprehensive genetic map for cowpea, both RAPD and RFLP analysis were employed, with only a very limited analysis carried out using AFLPs (Menéndez et al. 1997). In these earlier studies, AFLPs were not found to be more effective in detecting polymorphisms than RAPDs with approximately 12% of the primers tested revealing polymorphisms. With more extensive analysis, we have found that AFLP analysis can be effective depending on the nature of the selective primer combinations used in the analysis. Consistent with the earlier report of Menéndez et al. (1997), most primer combinations detected polymorphisms at approximately 12% of the loci. However, with several primer combinations, we were able to detect polymorphisms at levels of between 14% and 20%. Clearly, the determining factor in the efficiency of the AFLP technique as applied to cowpea is the selection of the primer combination.

As expected for a RIL population, most of the AFLP markers analyzed segregated with the predicted 1:1 ratio. Nevertheless, 20% of the markers presented a distorted

segregation. This is less than the value reported for RILs ($39.4 \pm 2.5\%$) by Xu et al. (1997) who examined 53 different populations with known number of distortedly segregating markers. Higher percentages of distortion were observed with interspecific populations. Menancio-Hautea et al. (1993) and Ky et al. (2000) reported segregation distortions of 22% and 30% in cowpea and coffee, respectively. The reasons for this distortion phenomenon remain unclear, although some researchers have suggested that it may be due in part to aberrant pollination and fertilization (Zamir and Tadmor 1986; Foolad et al. 1996), to sampling error or low population size (Lu et al. 1998). Another possible explanation for the observed high rate of skewed markers is the higher number of meioses experienced by RILs as compared to the two meioses leading from F_1 to the F_2 (Winter et al. 2000). Marker distortion can lead to the joining of two distantly linked markers or LGs and to an erroneous estimation of the physical distance between the gene of interest and the markers located next to it. This could create difficulties in map-based cloning (Michelmore et al. 1991; Winter et al. 2000).

4.4.2 General features of the map

The current genetic linkage map of cowpea includes 412 markers on 11 linkage groups spanning a total of 2670 cM, rendering it the most extensive map for cowpea available to-date. The previous map, based on the same population of RILs, covered 972 cM (Menéndez et al. 1997). For some applications of genomic mapping such as map-based cloning, both precise gene order and high resolution of the linkage map are needed (Boehnke, 1994). Such a map can be obtained by constructing a framework map which is a map made up of loci with interval support of at least LOD 3 (Liu, 1998). The average distance between markers is 6.5 cM. As the physical size of the cowpea genome is estimated to be 613×10^6 bp, 1 cM would relate to 229 kb on average. This is less than the 360 kb for chickpea (Winter et al. 2000) or the 750 kb/cM for the high-density map of tomato (Tanksley et al. 1992).

A new genomic region was detected and covered following the addition of the new

AFLP markers to linkage map. LG1 contains a 580 cM region that was not covered by the markers used in the construction of the previous map. The RAPD primers used in the previous mapping work were probably not efficient enough to detect polymorphisms within that genomic region. AFLP analysis is very sensitive to polymorphism in the genome, with as little as 1-bp length differences in relatively short DNA fragments (50-1000 kb) being detectable (Qi et al. 1998). Although AFLP analysis was used to generate markers during construction of the previous map, the primer combinations employed failed to detect a significant number of polymorphism and only 25 AFLP markers were obtained.

Besides increasing the genome coverage, many features of the previous map were changed. LG1 of the Menéndez et al. (1997) map was split, forming two new linkage groups designated LG1 and LG4. The former LG2 gave rise to LG2 and LG3. The new linkage groups LG2 and LG3 were formed by a portion of former LG2, and a combination of former LG10 and LG7, respectively. The new LG5 came from the joining of former linkage groups LG5 and LG8. Linkage groups LG6 to LG11 on the new map correspond to LG3, LG4, LG6, LG9, LG12 and LG11, respectively, on the Menéndez et al. (1997) map (Fig. 2). In the new genetic map, these previously recognized linkage groups were simply expanded in size by the addition of new markers. The interval distance of the new map remained 6.4 cM, similar to that of the map prepared by Menéndez et al. (1997), despite the substantial increase in the number of markers incorporated.

Comparison of the present results with those of Menéndez et al. (1997) suggests that using a wide range of primer combinations is of paramount importance to achieve sufficient genome coverage with AFLP markers, especially in light of the tendency AFLP markers have to cluster in certain regions of the genome (see below). It is the increased coverage that has allowed us to identify an additional, previously unmapped region of the genome and to link previously unlinked linkage groups.

4.4.3 Distribution of markers along the map

The new AFLP markers generated in this study contributed to the construction of all 11 LGs and they were well integrated with the RFLP and RAPD markers defined in previous studies. However, the distribution of the AFLP markers within the map was not random. As reported by Young et al. (1999), AFLP markers derived from the combination of the *EcoRI* + *MseI* selective primers are expected to form clusters in some specific genomic regions. Winter et al. (2000) also reported the clustering of AFLP markers in the chickpea genomic map, mainly in the centromeric regions. Qi et al. (1998) similarly reported an extreme non-uniform distribution of AFLP markers and a strong clustering of markers around the putative centromere in barley. Marker clustering seems to be more pronounced for AFLPs compared to RFLPs. The main reason for this clustering may be the higher sensitivity of the AFLP technique. There are a large number of repetitive sequences in the centromeric regions of the large genome of plants such as barley. The AFLP technique can detect small variations created by a 1-bp deletion or insertion in these repetitive sequences. The RFLP method will likely fail to detect such a variation (Qi et al. 1998).

4.4.4 Markers linked to *Striga* and other pathogen/pest resistance genes

A direct application of genetic linkage maps has been in tagging genes of economic importance with molecular markers (Kumar 1999). Besides the genes controlling chilling tolerance and seed weight mapped using the same population (Menéndez et al. 1997), we report for the first time the mapping of AFLP markers linked to resistance genes to *Striga gesnerioides*. Since these markers were previously identified using parental lines different from those of the mapping population one could question the homology of the fragments observed in two gels and two genotypes. The assumption that AFLP products that show the same mobility in gels are very likely homologous and locus specific has been supported by Rouppe van der Voort et al. (1997a, 1998) who sequenced comigrating amplification products in potato. Analyzing 733 AFLP markers from 5 genotypes, 195 were assumed to be

allelic because (1) they were generated with identical AFLP primer combinations, (2) they showed an identical electrophoretic mobility, (3) targeted the same genomic regions and (4) had identical nucleotide sequences. Waugh et al. (1997) used a genetic approach to estimate the location of a given marker relative to a number of others in three different segregating populations. These researchers found that 81 co-migrating AFLP markers, segregating in more than one population, mapped to similar loci on the three barley genetic maps. Similarly Qi et al. (1998) analyzed 38 co-migrating AFLP markers segregating in two populations and showed that they mapped to the same locus. These studies addressed the question of size vs. homology and showed that AFLP products of identical size in different individuals could be considered to identify homologous genetic loci.

Several resistance genes of interest were mapped using a strategy of co-migrating AFLP markers (Roupe van der Voort et al. 1997b; Winter et al. 2000). The markers we mapped were identified using lines different from the parental lines of the current mapping population. Those identified as linked to the resistance genes present in cultivars B301, Tvu 14676 and IT82D-849 mapped onto the LG1 whereas those revealed based on the cowpea lines Gorom (Suvita-2) and IT81D-994 mapped on the LG6. Resistance genes in each of these two groups of cultivars could be allelic or closely linked. These two genomic regions could be two clusters of resistance genes to different races of *Striga gesnerioides*. Clustering of resistance genes for different races of a pathogen has been reported in several plants including legumes (Kanazin et al. 1996; Yu et al. 1996; Michelmore 1996; Hammond-Kosack and Jones 1997). Identification and mapping of these markers linked to different resistance genes to two major *Striga gesnerioides* races (1 and 3) open ways to their usage in marker-assisted selection and map-based cloning.

In conclusion, we have constructed a new genetic linkage map of the cowpea genome covering 2670 cM and containing 11 LGs. Markers linked to key biological resistance/tolerance traits have been mapped, including those conferring resistance to two different races of *S. gesnerioides*, root-knot nematodes, and several viral and

fungal pathogens of cowpea. The creation of this improved map should facilitate the placement of other genes of agronomic importance characterized in this mapping population on this map.

References

- Arumuganathan, K., and Earle, E. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* **9**: 208-218.
- Barone, A., and Saccardo, F. 1990. Pachytene morphology of cowpea chromosomes. *In Cowpea genetic resources. Edited by Ng, N. Q., and Monti, L.M.* IITA Ibadan, Nigeria. pp 137-143
- Bashir, M., and Hampton, R. O. 1996. Identification of cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars and lines immune to variants of blackeye cowpea mosaic potyvirus. *Plant Pathology* **45**: 984-989.
- Boehnke, M. 1994. Limits of resolution of genetic linkage studies: implications for the positional cloning of human disease genes. *Am. J. Hum. Genet.* **55**: 379-390.
- Bressani, R. 1985. Nutritive value of cowpea. *In Cowpea Research, Production and Utilization. Edited by S. R. Singh and K.O. Rachie.* John Willey & Sons Chister, New York, Toronto, Singapore. pp 353-359.
- Bradeen, J.M. and Simon, P.W. 1998. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y-2 locus to a simple, codominant PCR-based marker form. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 960-967.
- Chen, X.M., Line, R.F., and Leung, H. 1998. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 345-355.
- Fatokun C.A., Danesh, D., Menancio-Hautea, D.I., and Young, N.D. 1993. A linkage map for cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp] based on DNA markers (2n = 22). *In Genetic maps 1992. A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms. Edited by O'Brien, J.S.* Cold Spring Harbor, New York. pp 6256-6258.
- Foolad, M.R., Arulsekar, S., Becerra, V., and Bliss, F.A. 1995. A genetic linkage map of

- Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 262-269.
- Gillaspie, A. G., Hopkins, M. S., Pinnow, D. L., and Hampton, R. O. 1995. Seedborne viruses in preintroduction cowpea seed lots and establishment of virus-free accessions. *Plant Disease* **79**: 388-391.
- Gowda, B., Sar, M., Mu, X., Cidlowski, J., and Welbourne, T. 1996. Coordinate modulation of glucocorticoid receptor and glutaminase gene expression in LLCPK1F+ Cells. *Am J Physiol* **270**: C825-C831.
- Gowda, B.S., Riopel, J.L., and Timko. M.P. 1999. NRSA1: a resistance gene homolog expressed in roots of nonhost plants following parasitism by *Striga asiatica* (witchweed). *Plant J.* **20**:217-230.
- Gowda, B.S., Miller, J.L., Rubin , S.S. , Sharma , D.R. , and M.P. Timko. 2000. Isolation, sequencing and mapping of resistance-gene analogs from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *In: Advances in Cowpea Research, Proceedings of the World Cowpea Research Conference III, Edited by Singh, B. B., Fatokun, C., and Dashiell, K. E., IITA Ibadan, Nigeria.* Pp. In press.
- Hall, A. E., Singh, B. B., and Ehlers, J. D. 1997. Cowpea breeding. *Plant Breeding Reviews* **15**: 215-274.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997) Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48** : 575-607
- Hampton, R. O., Thottappilly, G., and Rossel, H. W. 1997. Viral diseases of cowpea and their control by resistance-conferring genes. *In Advances in cowpea research. Edited by Singh, B. B., Mohan Raj, D. R., Dashiell, K. E., and Jackai, L. E. N., IITA Ibadan, Nigeria.* pp159-175.
- Ismail, A. M., Hall, A. E., and Close, T. J. 1997. Chilling tolerance during emergence of cowpea associated with a dehydrin and slow electrolyte leakage. *Crop Sci.* **37**: 1270-1277.
- Ismail, A. M., Hall, A. E., and Close, T. J. 1999. Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **96**: 13566-13570.
- Kanazin, V., Marek, L.F., and Shoemaker, R.C. 1996. Resistance gene analogs are

- conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11746-11750.
- Ky, C.-L., Barre, P., Lorieux, M., Trouslot, P., Akaffou, S., Louarn, J., Charrier, A., Hamon, S., and Noirot, M. 2000. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). *Theor. Appl. Genet.* **101** (4): 669-676.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics.* **12**: 172-175.
- Kumar, L.S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Adv.* **17**: 143-182.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M., Lincoln, S.E., and Newburg, L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, **1**: 174-181.
- Liu, B.-H. 1998. *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press. Boca Raton New York. p 295.
- Lu, Z.X., Sisinski, B., Reighard, G.L., Baird, W.V., and Abbott, A.G. 1998. Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers linked to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome*, **41**: 199-207.
- Lu, Z-X., Sossey-Alaoui, K., Reighard, G.L., Baird, WmV., and Abbott, A.G. 1999. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. *Theor Appl Genet* **99** : 115-122
- Maréchal, R., Macherpa, J.M., and Stainer, F. 1978. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base des données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* (Conservatoire et jardin botanique, Geneva, Switzerland), **28** : 1-273.
- Menancio-Hautea, D.I., Fatokun C.A., Kumar, L., Danesh, D., and Young, N.D. 1993. Comparative genome analysis of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walpers) using RFLP mapping data. *Theor. Appl.*

- Theor. Appl. Genet. **95** : 1210-1217.
- Michelmore, R.W. 1996. Flood warning-resistance genes unleashed. *Nature Genet.* **14**: 376-378.
- Michelmore, R.W., Paran, I., Kessel, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 9828-9832
- Omwega, C. O., Thomason, I. J., and Roberts, P. A. 1988. A non destructive technique for screening bean germ plasm for resistance to *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease* **72**: 970-972.
- Ouédraogo, J.T., Maheshwari, V., Berner, D.K., St-Pierre, C.-A., Belzile, F., Timko, M.P. 2001. Identification of AFLP markers linked to resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to *Striga gesnerioides*. *Theor. Appl. Genet.* 102:1029-1036.
- Pignone, D., Cifarelli, S., and Perrino, P. 1990. Chromosome identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *In Cowpea genetic resources. Edited by* Ng, N. Q., and Monti, L.M. IITA Ibadan, Nigeria. pp 144-150.
- Qi, X., Stam, P., and Lindhout, P. 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 376-384.
- Rigert, K. S., and Foster, K. W. 1987. Inheritance of resistance to two races of *Fusarium* wilt in three cowpea cultivars. *Crop Sci.* **27**: 220-224.
- Roberts, P. A., Ehlers, J. D., Hall, A. E., and Matthews, W. C. 1997. Characterization of new resistance to root-knot nematodes in cowpea. *In Advances in cowpea research. Edited by* Singh, B. B., Mohan Raj, D. R., Dashiell, K. E., and Jackai, L. E. N., IITA Ibadan, Nigeria. Pp 207-214.
- Roupe van der Voort, J.N.A., van Zandvoort, P., van Eck, H.J., Folkertsma, R.T., Hutten, R.C.B., Draaistra, J., Gommers, F.J., Jacobsen, E., Helder, J., and Bakker, J. 1997a. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* **255**: 438-447.
- Roupe van der Voort, J.N.A., Wolters, P., Folkertsma, R.T., Hutten, R.C.B., van

- genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* **255**: 438-447.
- Roupe van der Voort, J.N.A., Wolters, P., Folkertsma, R.T., Hutten, R.C.B., van Zandvoort, P., Vinke, H., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Jacobsen, E., Janssen, R., and Bakker, J. 1997b. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 874-880.
- Roupe van der Voort, J.N.A., P., van Eck, H.J., Draaistra, J., van Zandvoort, Jacobsen, E., and Bakker, J. 1998. An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Mol. Breeding* **4**: 73-77.
- Saccardo, F., Del Giudice, A., and Galasso, I. 1997. Cytogenetics of cowpea. *In Biotechnology: Enhancing research on tropical crops in Africa. Edited by Thottappilly, G., Monti, L.M., Mohan Raj, D.R., and Moore, A.W.* CTA and IITA p.89-98.
- Simpson, J. 1999. Molecular markers for crop improvement. *In Molecular Biotechnology for Plant Food Production. Edited by Paredes-Lopez, O.* Lancaster, PA, USA pp 275-301.
- Tanksley, S.D., Ganal, M.W., Prince, J.P., De Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Paterson, A.H., Pineda, O., Roder, M.S., Wing, R.A., Wu, W., and Young, N.D. 1992. High density molecular linkage maps of tomato and potato genomes. *Genetics* **132**: 1141-1160.
- Varadarajan, G.S., and Prakash, C.S. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **9** : 6-12.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- Waugh, R., Bonar, N., Baird, E., Thomas, B., Graner, A., Hayes, P., and Powell, W. 1997. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* **255**: 311-321.
- Winter, P., Benko-Iseppon, A.-M., Hüttel, B., Ratnaparkhe, M., Tullu, A., Sonnante, G.,

- Pfaff, T., Tekeoglu, M., Santra, D., Sant, V.J., Rajesh, P.N., Kahl, G., and Muehlbauer, F.J. 2000. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for *fusarium* wilt races 4 and 5. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 1155-1163.
- Xu, Y., Zhu, L., Xiao, J., Huang, N., and McCouch, S.R. 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* **253**: 535-545.
- Young, N.D. 1999. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol. Breed.* **5**: 505-510.
- Young, W.P., Schupp, J.M., and Keim, P. 1999. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 785-790.
- Yu, Y.G., Buss, G.R., and Saghai Maroof, M.A. 1996. Isolation of a superfamily of candidate resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11751-11756.
- Zamir, D., and Tadmor, Y. 1986. Unequal segregation of nuclear genes in plants. *Bot. Gaz.* **147**: 355-358.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Comme nous l'avons souligné dans le chapitre I, cinq races de *Striga gesnerioides* réparties dans plusieurs pays africains, notamment, constituent une contrainte majeure à la production du niébé. Même si des cultivars résistant à chacune de ces races ont été identifiés, ces derniers n'ont ni les qualités agronomiques recherchées, ni la résistance à toutes les races. Les difficultés du criblage avec les semences de toutes les races en un même lieu et le laborieux processus de croisement en vue de transférer efficacement les gènes de résistance aux cinq races dans des cultivars supérieurs ne permettent pas de résoudre la contrainte que représente le *Striga* à l'aide de méthodes conventionnelles de sélection uniquement. En outre, même si une carte génétique du niébé existe, celle-ci présente peu de marqueurs et très peu de gènes d'importance agronomique y sont localisés.

Le récent développement de la technologie des marqueurs d'ADN, notamment la technique AFLP (« Amplified fragment length polymorphism »), permet d'améliorer l'efficacité du transfert des gènes d'intérêt par la sélection assistée de marqueurs à la suite du marquage de ces gènes. Elle permet également de générer des marqueurs utilisables pour construire des cartes génétiques de plus en plus saturées. Ces cartes sur lesquelles peuvent être situés des gènes d'intérêt constituent des bases pour le clonage et la caractérisation des ces derniers.

La présente étude a été initiée dans le cadre général d'une meilleure connaissance de la résistance au *Striga* chez le niébé et avait deux objectifs principaux. Il s'agissait, dans un premier temps, d'identifier des marqueurs AFLP liés aux gènes de résistance aux races 1 et 3 du *Striga gesnerioides* et, dans un deuxième temps,

de construire une carte de liaison génétique du niébé à l'aide de marqueurs générés par la technique AFLP.

Les races 1 et 3 étant les plus répandues et celles sur lesquelles la plupart des études ont porté (cf chapitre I), le focus a été mis sur ces deux races dans le cadre de cette étude, en utilisant les cultivars résistants également les plus employés dans les programmes d'amélioration.

Les résultats présentés dans les chapitres II et III et en annexe ont montré que le premier objectif de la présente étude a été atteint. En combinant les méthodes AFLP et BSA, nous avons identifié plusieurs marqueurs liés, dont certains fortement (≤ 1 cM), aux gènes de résistance à la race 1 du *Striga gesnerioides* chez 4 cultivars B301, IT82D-849, Gorom et IT81D-994, et au gène de résistance à la race 3 chez le cultivar Tvx14676. Bien que la plupart des marqueurs soient spécifiques à chaque cultivar résistant utilisé pour les identifier, deux d'entre eux, E-AAC/M-CAA₃₀₀ et E-ACA/M-CAT₁₅₀, sont liés aux gènes de résistance de chacun des cultivars B301, IT82D-849 et Tvx14676. Deux autres, E-AGAM-CAG₃₀₀ et E-AGAM-CAG₄₅₀, sont liés aux gènes conférant la résistance au *Striga* chez les cultivars Gorom et IT81D-994. Il n'existe pas d'information sur les relations alléliques entre les gènes de résistance à la race 1 de B301 et IT82D-849. L'étude d'allélisme entre ces gènes concernant la race 3, effectuée par Atokple et al. (1995) a montré que ces derniers seraient alléliques ou fortement liés. L'allélisme entre le gène de Tvx14676 et ceux des deux autres cultivars n'a pas été étudié. Le fait que ces trois cultivars partagent certains marqueurs laisse toutefois supposer que leurs gènes sont localisés dans un même complexe de gènes de résistance ou qu'ils sont en fait des allèles pour un même locus. Cette assertion vaut pour les gènes des cultivars Gorom et IT81D-994, dont les relations alléliques ne sont pas non plus connues. Plusieurs auteurs ont déjà rapporté de tels cas de complexes de gènes de résistance où chaque gène exprime une spécificité différente (Pryor et Ellis, 1993 ; Michelmore et Meyers, 1998 ; Ronald, 1998). Ashfield *et al.* (1995) et Ronald (1998) ont également montré que de tels complexes de gènes de résistance pouvaient être efficaces contre différents

types d'agents pathogènes. D'après nos résultats, le génome du niébé pourrait contenir des complexes de gènes de résistance comprenant plusieurs gènes de résistance à plusieurs races de *S. gesnerioides*.

Deux des principales utilisations des marqueurs d'ADN liés à des gènes d'importance agronomique sont leur emploi dans un programme de sélection assistée de marqueurs (MAS) et le clonage positionnel de ces gènes (Kumar, 1999; Young, 1999). Avec les possibilités qu'offrent les marqueurs codominants tels que les SCAR en termes de facilité d'utilisation et d'efficacité pour cribler de nombreuses descendance, les marqueurs AFLP pourraient être convertis et intégrés dans un programme de MAS.

Le quatrième chapitre de cette thèse montre que notre deuxième objectif a également été atteint. En effet, avec un choix judicieux de combinaisons d'amorces, nous avons pu générer environ 250 marqueurs AFLP (dont 10 sont liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides*) qui nous ont servi à construire une nouvelle carte génétique du niébé. L'intégration de ces nouveaux marqueurs à la carte de Menéndez et al. (1997) a permis de construire une carte plus étendue couvrant 2658 cM. Les marqueurs sont répartis sur 11 groupes de liaison avec une distance de 6.43 cM entre marqueurs adjacents. En dépit de la croissance de la couverture du génome, la résolution de la carte n'a pas été améliorée. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cela : la distribution des marqueurs le long du génome et la distribution des crossing-over. Une des caractéristiques principales de la nouvelle carte est la détection d'une région de plus de 500 cM qui n'avait pas été couverte par les marqueurs de la carte de Menéndez et al. (1997). De plus, neuf marqueurs AFLP liés à différents gènes de résistance aux races 1 et 3 du *Striga gesnerioides* ont été cartographiés sur les groupes de liaison 1 et 6. Sept marqueurs identifiés à partir de populations issues des croisements B301 x Tv3236, IT82D-849 x Tv3236 et Tv14676 x IT84S-2246 ont été localisés sur le groupe de liaison 1, alors que les trois autres, identifiés à partir de populations issues des croisements Gorom x Tv3236 et IT81D-994 x Tv3236, ont été placés sur le groupe 6. Ces deux régions

pourraient constituer deux « clusters » de gènes de résistance au *S. gesnerioides*.

En conclusion, ces travaux qui rapportent l'identification et la cartographie de marqueurs liés aux gènes de résistance à plusieurs races de *S. gesnerioides* constituent une percée importante dans la connaissance de ces gènes et aidera dans la recherche de la compréhension des mécanismes de l'interaction entre le niébé et cette plante parasite. La construction de la nouvelle carte de liaison génétique intégrée basée sur les marqueurs AFLP constitue un pas très important vers une carte saturée de cette plante.

Toutefois des questions importantes restent posées, ouvrant des perspectives de recherches futures pour assurer une caractérisation complète des gènes de résistance au *S. gesnerioides*. En effet, à partir des présents résultats les travaux suivants sont et/ou peuvent être entrepris :

- 1- La conversion de certains marqueurs en SCAR afin de disposer de marqueurs spécifiques de locus, codominants, pour mener un programme de sélection assistée de marqueurs plus efficace. Nous avons entrepris cette conversion avec le marqueur E-ACT/M-CAA₅₂₄, l'un des marqueurs situés sur le groupe de liaison 1 de la carte génétique intégrée du niébé. Les phases de clonage, séquençage et construction des amorces spécifiques sont achevées. Le développement du SCAR sera poursuivi ultérieurement.
- 2- Le clonage positionnel des gènes de résistance. Basé essentiellement sur la connaissance du phénotype et de la position du gène sur une carte génétique, le clonage positionnel a connu un essor considérable avec le développement des systèmes de marquage moléculaire. L'identification et la cartographie des marqueurs liés aux gènes de résistance au *Striga gesnerioides* va sans doute accélérer le clonage de ces derniers. Des projets dans ce sens sont mis en route dans les universités américaines de Davis en Californie et de Virginie. Une fois le clonage réalisé, le déploiement des gènes de résistance aux différentes races pourra se faire par voie de transgénèse. Cette technique est très bien maîtrisée en

ce qui concerne le niébé à l'Institut international d'agriculture tropicale basée au Nigeria, lequel dessert les pays producteurs de niébé et les centres de recherches sur cette culture.

- 3- Les tests de l'allélisme entre les différents gènes de résistance et ce pour chacune des races de *S. gesnerioides*, et l'étude de la variabilité génétique dans les 5 races devront être menés afin de faciliter la caractérisation des gènes de résistance et de mieux comprendre les interactions entre le niébé et cette plante parasite qu'est le *Striga*.

ANNEXE

**L'UTILISATION DES MARQUEURS MOLECULAIRES EN SELECTION POUR LA
RESISTANCE AU *STRIGA GESNERIODES* CHEZ LE NIEBE (*VIGNA
UNGUICULATA*)**

JT. Ouédraogo^{1,2}, A. Olivier², MP. Dubé², C. Dabiré¹, CA. St-Pierre², MP. Timko³, FJ. Belzile².

1 Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), 01 BP 476
Ouagadougou 01, Burkina Faso.

2 Département de Phytologie, Université Laval, Québec, G1K 7P4, Canada.

3 Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia 22903, USA.

Accepté pour publication dans les actes du colloque " Biotechnologies végétales:
Améliorations des plantes et sécurité alimentaire" de l'AUPELF-UREF (3-8 Juillet
2000)

Résumé

Le *Striga gesnerioides* constitue l'une des contraintes majeures à la production du niébé (*Vigna unguiculata*), principale légumineuse à graines en Afrique subsaharienne. Les résultats d'études antérieures ont permis la création de plusieurs variétés résistantes à des races spécifiques de *S. gesnerioides* (cinq races ont été identifiées). L'introgession des gènes conférant une résistance à toutes les races dans un même cultivar reste cependant un objectif difficile à atteindre par les méthodes conventionnelles de sélection. Aussi, dans le but d'associer la sélection assistée de marqueurs aux méthodes traditionnelles de création variétale, nous avons initié le présent projet de recherche dont l'objectif est l'identification de marqueurs liés aux gènes de résistance aux races 1 et 3 du *S. gesnerioides* chez le niébé. Les méthodes BSA et AFLP ont été combinées pour identifier des marqueurs liés aux gènes de résistance à chacune des races. Cinq marqueurs fortement liés au gène de résistance à la race 1 ont été identifiés. Trois de ces marqueurs sont liés à l'allèle de sensibilité et deux à l'allèle de résistance. Cinq marqueurs liés à la résistance ou à la sensibilité à la race 3 ont également été trouvés. L'un de ces marqueurs, lié à la résistance aux deux races de *S. gesnerioides*, a été situé dans le premier groupe de liaison de la carte génétique du niébé. Les travaux en cours visent à transformer ces marqueurs en SCAR, plus efficaces pour un programme de sélection assistée de marqueurs pour la résistance au *S. gesnerioides*.

MOTS CLES

Marqueurs d'ADN, AFLP, Gènes de résistance, Sélection assistée de marqueurs (MAS)

A.1 Introduction

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), une légumineuse alimentaire, est la source de protéine végétale la plus importante pour les populations d'Afrique subsaharienne. Une des principales contraintes à sa production est la plante parasite *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke, qui cause des pertes de rendement de 30 à 100 % aux variétés sensibles (Aggarwal et Ouédraogo, 1989; Muleba *et al.*, 1997). Pour lutter contre cette mauvaise herbe, plusieurs méthodes ont été expérimentées. L'utilisation de cultivars résistants s'est avérée la plus efficace. Des cultivars résistants ont été identifiés (Aggarwal, 1991; Singh et Emechebe, 1990): Gorom (ou Suvita-2) originaire du Burkina Faso, B301 du Botswana, 58-57 du Sénégal, TN121-80 du Niger, IT81D-994 et IT82D-849 de l'IITA au Nigeria. Malheureusement, l'exploitation de cultivars résistants est limitée par l'existence de plusieurs races physiologiques de striga répertoriées à travers l'Afrique de l'Ouest. Cinq biotypes ou races de *S. gesnerioides* ont été identifiés suite aux résultats des évaluations des cultivars mentionnés plus haut dans plusieurs localités de plusieurs pays. Ainsi, on retrouve la race 1 au Burkina Faso, au Mali, au Togo et au Nigeria; la race 2 au Mali; la race 3 au Niger et au Nigeria; la race 4 au Bénin; et la race 5 au Burkina Faso, au Bénin, au Nigeria et au Cameroun. Aucun des cultivars cités plus haut n'est résistant à toutes les races. Gorom, par exemple, est résistant aux races 1, 2 et 4; B301 est résistant aux races 1, 2, 3 et 5 (Lane *et al.*, 1997).

Des différentes études réalisées pour élucider les modes d'hérédité de la résistance, il ressort, notamment pour les cultivars résistants Gorom, B301 et IT82D-849, que la résistance à une race particulière est contrôlée par un gène dominant (Aggarwal *et al.*, 1984; Singh et Emechebe, 1990; Atokple *et al.*, 1995; Touré *et al.*, 1997). Atokple *et al.* (1995) ont toutefois montré que le gène de résistance à la race 1 du cultivar Gorom est différent de celui de B301 et de celui de IT82D-849. Ces gènes sont désignés par les sigles Rsg1 pour B301, Rsg2 pour IT82D-849 et Rsg3 pour Gorom.

Un des principaux objectifs des sélectionneurs est d'améliorer les cultivars existants, qui manquent d'une ou de plusieurs caractéristiques désirées, en les croisant avec des lignées qui possèdent ces caractéristiques. Dans les schémas conventionnels de sélection, cette opération implique le croisement des génomes entiers, suivi de la sélection des meilleurs recombinants parmi les nombreux produits en ségrégation. Une telle procédure est très longue et laborieuse. Elle demande plusieurs croisements, plusieurs générations et une minutieuse sélection phénotypique. De plus, la liaison étroite entre les loci d'intérêt et des caractères indésirables rend ardue la réussite de ces schémas de sélection.

Avec l'avènement de la technologie des marqueurs d'ADN, plusieurs types de marqueurs et de nouvelles stratégies de sélection sont maintenant à la disposition des améliorateurs et des généticiens. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs systèmes de marqueurs d'ADN ont été mis au point (Kumar, 1999). On peut citer entre autres la méthode de l'ADN polymorphe amplifié au hasard (Random-Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (Williams *et al.*, 1990), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (Botstein *et al.*, 1980), et le polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) (Vos *et al.*, 1995). Ces techniques ont grandement contribué à l'établissement de cartes génétiques de liaison pour plusieurs cultures importantes, dont le niébé (Fatokun *et al.*, 1993, 1997; Menendez *et al.*, 1997). En combinaison avec l'analyse de ségréants en mélange (Bulk Segregant Analysis, BSA), une méthode développée par Michelmore *et al.* (1991), l'utilisation des RAPD et des AFLP a rendu possible l'identification rapide de marqueurs moléculaires liés à des gènes d'importance agronomique (Kelly et Miklas, 1998; Kumar, 1999; Michelmore, 1995; Simpson, 1999; Staub *et al.*, 1996). En outre, le développement et l'utilisation de la technologie de marqueurs moléculaires a facilité le clonage et la caractérisation de gènes de résistance (Ronald, 1998; Meyers *et al.*, 1999), conduisant à une meilleure compréhension des interactions plantes-pathogènes.

Une fois un marqueur fortement lié à un gène d'intérêt trouvé, la sélection se fait sur la base des génotypes des marqueurs. Ceci permet de tester les descendants à un

stade de développement très précoce, sans avoir besoin de les faire croître jusqu'à maturité. Les criblages sous infestation peuvent être utilisés moins fréquemment. De tels tests doivent toutefois être effectués à certaines étapes afin de s'assurer de la présence et de l'efficacité du gène d'intérêt. Michelmore (1995) a souligné quelques avantages, pour le sélectionneur, de la sélection assistée de marqueurs (Marker-Assisted Selection, MAS) en tant que substitut au criblage pour la résistance aux pathogènes: l'accélération du retour au génotype du parent récurrent dans les programmes de backcross, le transfert réduit de gènes indésirables liés au gène d'intérêt et la possibilité de sélectionner pour des «Quantitative Trait Loci» (QTL) de résistance. Cette méthodologie permet également le pyramidage de plusieurs gènes de résistance pour obtenir la résistance à plusieurs types de pathogènes (Kelly et Miklas, 1998; Kumar, 1999). L'identification de marqueurs fortement liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* et leur incorporation dans un programme de sélection assistée de marqueurs accroîtrait donc sans doute l'efficacité avec laquelle le germoplasme pourrait être évalué pour la résistance à ce parasite. L'identification de tels marqueurs procurerait également un point de départ pour le clonage et la caractérisation des gènes codant pour la résistance à cette plante.

Parmi les méthodes qui peuvent être utilisées pour ce faire, on retrouve la méthode AFLP, qui passe pour être la plus puissante des techniques d'identification de polymorphismes entre les individus. Celle-ci donne toutefois des marqueurs dominants, donc pas très convenables pour les programmes de sélection. Cette faiblesse est heureusement contrecarrée par les techniques de conversion de ces marqueurs en SCAR «Sequence-Characterized Amplified Region». Les SCAR sont des fragments génomiques amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques obtenues après séquençage des produits RAPD ou AFLP. Ils constituent des marqueurs qui ont l'avantage d'être codominants et peu onéreux (Paran et Michelmore, 1993; Lu *et al.*, 1999, 2000; Shan *et al.*, 1999), et donc plus propices à un programme de sélection.

En employant les méthodes conventionnelles de sélection, les tentatives de création de cultivars exempts de caractères génétiques indésirables et résistants

aux cinq races de *striga* n'ont pas été couronnées de succès. Dans un tel contexte, le développement de marqueurs moléculaires liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* apparaît comme étant impérative en vue de faciliter les efforts de sélection.

Les objectifs de la présente recherche étaient d'identifier les marqueurs AFLP liés aux gènes de résistance aux races 1 et 3 de *S. gesnerioides* et d'envisager leur utilisation dans un programme de sélection assistée de marqueurs. Nous rapportons ici l'identification de huit marqueurs fortement liés aux gènes de résistance aux races 1 et 3 de *S. gesnerioides*. Leur transformation éventuelle en SCAR et leur utilisation dans un programme de sélection assistée de marqueurs sont également discutées.

A.2 Matériel et méthodes

A.2.1 Matériel végétal et expérimentation au champ

Le matériel végétal utilisé comprend deux cultivars résistants et deux sensibles au *S. gesnerioides*. B301, originaire du Botswana, est résistant aux races 1, 2, 3 et 5 du *Striga*. Tvx14676, un cultivar mis au point par l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA) au Nigeria, est résistant à la race 3. Sa réaction aux autres races n'a pas été testée. Tvx3236 et IT84S-2246-4, deux lignées développées par l'IITA, sont sensibles aux cinq races de *Striga*.

Un croisement a été effectué entre Tvx3236 et B301 et un autre a été fait entre IT84S-2246-4 et Tvx14676. Les individus F_1 ont été avancés en F_2 par autofécondation. La réaction des parents et des individus F_1 et F_2 de chaque population a été testée sur des parcelles infestées de *Striga* de la race 1 à la station de recherche de Kamboinsé, au Burkina Faso, et de *Striga* de la race 3 à l'IITA à Ibadan, au Nigeria. L'émergence du *Striga* a été notée tous les deux jours à partir de 3 semaines après le semis et ce jusqu'à la sénescence complète des plantes (120 jours après le semis). Les plantes ont ensuite été déterrées afin de vérifier

l'attachement de plants de *Striga* sur les racines. Les plantes qui ont montré l'attachement, le développement et l'émergence du *Striga* ont été considérées comme sensibles. Les plantes indemnes et celles qui ont présenté peu de *Striga* attachés aux racines et n'ont pas permis l'émergence du *Striga* ont été classées comme résistantes. Environ cent cinquante individus F_2 ont été observés pour chaque population. Dans le but de déterminer précisément le génotype de chacun des individus F_2 de chaque population, une famille F_3 de 25 individus (récoltés sur chaque plante F_2) a été testée sous infestation de *Striga*.

A.2.2 Extraction de l'ADN

L'ADN génomique total de 140 individus F_2 de chaque population a été extrait à partir de 2 g de feuille selon la méthode décrite par Varadarajan et Prakash (1991). Après en avoir déterminé la concentration au spectrophotomètre, les solutions stock d'ADN ont été maintenues à 4 °C. Les solutions de travail sont diluées dans du tampon TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) jusqu'à une concentration de 100 ng/ μ l et conservées à -20 °C.

A.2.3 Analyses BSA et AFLP

Les bulks de la BSA ont été constitués selon la méthode décrite par Michelmore *et al.* (1991). Quatre bulks de douze individus ont été formés pour chaque population, soit deux bulks composés d'individus F_2 homozygotes résistants et deux bulks composés d'individus F_2 homozygotes sensibles. Pour l'analyse AFLP, la méthode décrite par Vos *et al.* (1995) a été suivie en utilisant la trousse de la compagnie Gibco BRL-Life Technologies, Inc., Gathersburg, Md., USA (AFLP™ Analysis System I AFLP Starter Primer Kit).

Afin d'identifier les marqueurs liés, 64 paires d'amorces EcoRI/MseI ont été testées sur les parents et les bulks des deux populations. Les marqueurs candidats ont été examinés sur l'ensemble des individus F_2 d'une population et les données obtenues ont été soumises à une analyse à l'aide du logiciel Mapmaker 3.0 (Lander *et al.*, 1987). La cartographie a été faite en employant un rapport de maximum de vraisemblance (LOD) de 3.0 et en utilisant la fonction de cartographie de Kosambi (Kosambi, 1944) pour convertir les fréquences de recombinaison en distance cartographique (cM).

Dans le but de situer les marqueurs liés aux gènes de résistance au *Striga* sur la carte génétique du niébé développée par Menendez *et al.* (1997), les paires d'amorces ayant révélé les marqueurs ont été employées pour tester les parents IT84S-2049 et 524B, puis les 88 individus de la population de cartographie. Les marqueurs polymorphes entre les deux parents de cette population ont alors été situés sur la carte en utilisant le logiciel Mapmaker 3.0, tel que décrit par Menendez *et al.* (1997).

A.3 Resultats

A.3.1 Les marqueurs liés au gène de résistance à la race 1 de *S. gesnerioides*

Dans le but d'identifier les marqueurs liés au gène de résistance à la race 1 de *S. gesnerioides*, deux bulks d'individus homozygotes résistants et deux bulks d'individus homozygotes sensibles de la population issue du croisement Txv3236 x B301 ont été testés avec 64 paires d'amorces sélectives. Le nombre de fragments générés par paire d'amorce variait de 58 à 112. Le nombre moyen de polymorphismes entre les deux parents était de 15 et variait en fonction de la paire d'amorce. La taille des fragments allait de 65 à 700 paires de bases.

Quatre paires d'amorces EcorI/MseI ont détecté des polymorphismes entre le parent résistant et le parent sensible, d'une part, et entre les bulks résistants et sensibles, d'autre part. La combinaison d'amorce E-AAC/M-CAA (paire d'amorce 1-1) a révélé un produit d'environ 300 pb présent chez le parent sensible et les bulks d'individus sensibles, mais absent chez le parent et les bulks d'individus résistants. Ce marqueur lié à l'allèle de sensibilité est désigné 11S. Deux autres marqueurs liés à la sensibilité ont été identifiés. Il s'agit des marqueurs 34S et 111S révélés avec les paires d'amorces E-ACAM-CAT (paire 3-4) et E-ATC/M-CAA (paire 11-1), respectivement. Le marqueur 34S est un produit de 130 pb, alors que le marqueur 111S a une taille d'environ 300 pb. Les paires d'amorces E-ACC/M-CAA (paire 4-1) et 11-1 ont pour leur part permis d'identifier deux marqueurs liés à la résistance, 41R (600 pb) et 111R (350 pb). Ces deux marqueurs étaient présents chez le parent résistant et les bulks d'individus résistants mais absents chez le parent sensible et les bulks d'individus sensibles.

Afin de déterminer le degré de liaison entre les marqueurs et le gène de résistance, tous les individus F_2 ont été testés pour la présence ou l'absence des marqueurs 11S, 34S, 41R, 111R et 111S en utilisant les paires d'amorces ayant révélé ces derniers. Tous ces marqueurs se sont montrés dominants avec un rapport de ségrégation de 3:1. L'analyse de liaison et la cartographie réalisée à l'aide du logiciel Mapmaker 3.0 a montré que les cinq marqueurs appartenaient au même groupe de liaison. Les distances cartographiques entre les marqueurs et le locus de résistance Rsg1 du cultivar B301 sont de 1.7 cM pour 11S, 2.6 cM pour 34S, 3.6 cM pour 41R, et 0.9 cM pour 111R et 111S (Fig.1A). Ces marqueurs couvrent une distance totale de 6.2 cM.

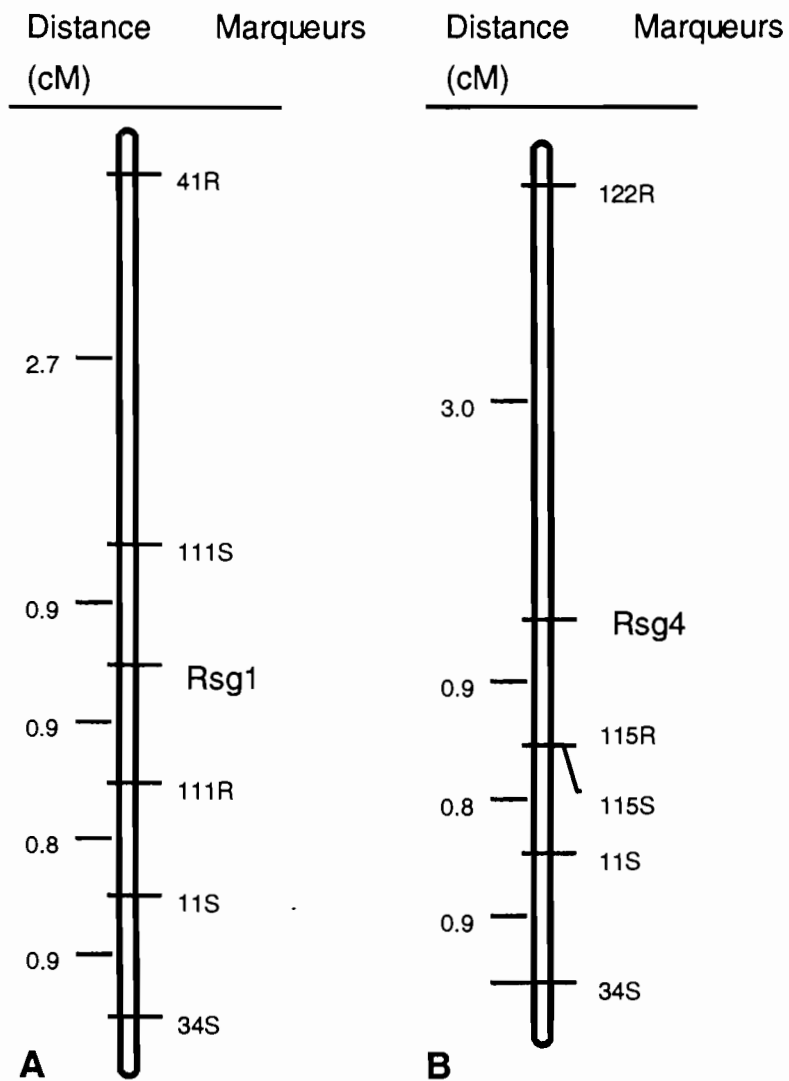


Figure 1. Cartographie des marqueurs liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides*.
 A: marqueurs liés au gène Rsg1 de résistance du cultivar B301 à la race 1 de *S. gesnerioides*
 B: marqueurs liés au gène Rsg4-3 de résistance du cultivar Tvu 14676 à la race 3 de *S. gesnerioides*

A.3.2 Les marqueurs liés au gène de résistance à la race 3 de *S. gesnerioides*

En procédant de la même manière que celle décrite pour identifier les marqueurs liés au gène de résistance à la race 1, 64 paires d'amorces ont été testées sur les parents et les bulks d'individus issus du croisement entre IT84S-2246-4 et Tvx14676 afin de trouver des marqueurs liés au gène de résistance à la race 3 de *S. gesnerioides*.

Quatre combinaisons ont mené à l'identification de cinq marqueurs dont trois liés à la sensibilité et deux à la résistance. Ainsi, les paires d'amorces E-AAC/M-CAA et E-ACAM-CAT ont révélé les marqueurs 11S et 34S comme étant liés au gène de résistance à la race 3 de *S. gesnerioides*. Le troisième marqueur de sensibilité, 115S (200 pb), a été identifié à l'aide de la paire d'amorce E-ATC/M-CTA (paire 11-5). Les deux marqueurs de résistance 115R (210 pb) et 122R (600 pb) ont été identifiés avec les amorces E-ATC/M-CTA et E-ATG/M-CAC (paire 12-2). Tous ces marqueurs sont dominants, montrent une ségrégation mendélienne (3:1) et appartiennent au même groupe de liaison. Les distances entre ces marqueurs et le locus de résistance à la race 3 de *S. gesnerioides* du cultivar de niébé Tvx14676 sont de 1.7 cM pour 11S, 2.6 cM pour 34S, 0.9 cM pour 115R et 115S et 3.0 cM pour 122R (Fig. 1B). Ces marqueurs couvrent une distance totale de 5.6 cM.

A.3.3 Placement des marqueurs sur la carte génétique du niébé

En vue de situer les marqueurs sur la carte génétique du niébé développée par Menendez et al. (1997), les paires d'amorces ayant permis de les révéler ont été testées sur les deux parents (524B et IT84S-2049) de la population de cartographie. Les amorces qui ont montré un polymorphisme entre ces deux parents ont ensuite été testées sur 88 lignées recombinantes fixées de cette population. Ainsi, les paires 11, 111, 115 et 122 ont montré un polymorphisme entre les parents 524B et IT84S-2049. A ce jour, seule la paire d'amorce 11 (E-AAC/M-CAA) a été employée

sur l'ensemble de la population de cartographie et le marqueur 11S a ainsi été placé au bas du premier groupe de liaison de la carte génétique du niébé.

A.4 Discussion

Des cinq races de *S. gesnerioides* identifiées à ce jour en Afrique de l'Ouest et du Centre, les races 1 et 3 sont les plus répandues. Les tentatives pour incorporer dans un même cultivar des caractères agronomiques intéressants et les gènes de résistance aux cinq races n'ont pas encore donné de résultats satisfaisants. En combinant les méthodes d'analyse de ségrégants en mélange (BSA) et AFLP, nous avons pu identifier cinq marqueurs liés au gène de résistance Rsg1, lequel confère la résistance à la race 1 de *S. gesnerioides* chez le cultivar B301 et 5 marqueurs liés au gène de résistance Rsg4 à la race 3 de *S. gesnerioides* chez le cultivar Tvx14676. Deux de ces marqueurs, 11S et 34S, sont liés aux deux gènes de résistance. Ceci laisse supposer que ces deux gènes sont localisés dans un même complexe de gènes de résistance ou qu'ils sont en fait des allèles pour un même locus. Plusieurs auteurs ont déjà rapporté de tels cas de complexes de gènes de résistance où chaque gène exprime une spécificité différente (Pryor et Ellis, 1993; Michelmore et Meyers, 1998; Ronald, 1998). Ronald (1998) et Ashfield *et al.* (1995) ont également montré que de tels complexes de gènes de résistance pouvaient être efficaces contre différents types de pathogènes. D'après nos résultats, le génome du niébé pourrait contenir un complexe de gènes de résistance comprenant plusieurs gènes de résistance à plusieurs races de *S. gesnerioides*. Certains des marqueurs identifiés pourraient donc être utilisés pour analyser d'autres populations en ségrégation pour leur résistance à d'autres races de *S. gesnerioides*. C'est le cas de la race 2 que l'on retrouve essentiellement au Mali, de la race 4, existant au Bénin et de la race 5, retrouvée au Burkina Faso, au Niger, au Nigeria et au Cameroun (Lane *et al.*, 1997).

Nos marqueurs sont soit liés à l'allèle de sensibilité, soit liés à l'allèle de résistance. Quoique dominants, ceux liés à l'allèle de résistance sont aussi efficaces que des marqueurs codominants dans un programme de backcross. Ils peuvent permettre de déterminer la présence ou l'absence de l'allèle de résistance. Pour les deux gènes considérés, Rsg1 et Rsg4, des marqueurs flanquants ont été identifiés. En outre, la possibilité de localiser plusieurs marqueurs liés aux gènes de résistance aux différentes races de *S. gesnerioides* devrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de résistance et ouvrir la voie au clonage de ces gènes. L'identification de ces marqueurs ouvre donc plusieurs perspectives pour la lutte contre cette plante parasite.

Ce type de marqueurs est particulièrement efficace dans un programme de sélection assistée de marqueurs (MAS) (Eathington *et al.*, 1997; Michelmore, 1995; Staub *et al.*, 1996; Tanksley et McCouch, 1997). Basée sur le concept de l'inférence du génotype de l'individu à partir de celui du marqueur, la MAS a pour principal critère la liaison étroite entre le marqueur et le gène d'intérêt. Avec des marqueurs flanquants, il faut une double recombinaison (événement rare) entre le gène et les deux marqueurs pour sélectionner un faux positif (c'est-à-dire prendre une plante sensible pour une résistante). Pour rendre la MAS plus facile et moins coûteuse, nous travaillons à la transformation des marqueurs AFLP en marqueurs SCAR. Ces marqueurs sont révélés par une simple amplification PCR et une électrophorèse sur gel d'agarose. Pour les laboratoires des pays en développement dans lesquels l'utilisation des techniques faisant appel à la radioactivité est exclue, ces marqueurs SCAR sont une solution de premier choix. Ils ont en outre l'avantage d'être codominants, donc permettent de distinguer les individus homozygotes résistants des hétérozygotes et des homozygotes sensibles.

Les marqueurs d'ADN ont été utilisés pour le développement de cartes de liaison génétique détaillées chez plusieurs plantes (Chang et Meyerowitz, 1991 ; Jung, 1992 ; Mohan *et al.*, 1997). Pour utiliser les innombrables polymorphismes (révélés

par les marqueurs AFLP) comme des marqueurs génétiques, il est nécessaire de connaître leur localisation dans le génome du niébé. Une carte intégrant plusieurs types de marqueurs a été produite par Menéndez *et al.* (1997). Ces marqueurs peuvent alors servir à repérer des gènes d'intérêt agronomique (Mohan *et al.*, 1997; Kumar, 1999). En vue de contribuer à la saturation de cette carte qui contient 181 marqueurs dont 25 AFLP, nous allons placer environ 250 marqueurs AFLP parmi lesquels une dizaine sont liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* identifiés à partir de cinq cultivars résistants.

Une des perspectives les plus importantes qu'offrent nos marqueurs liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* est le clonage de ces gènes. La méthode conventionnelle de clonage exige une connaissance préalable des caractéristiques biochimiques du gène ou de ses produits, de son ARNm etc. Le clonage basé sur la carte génétique, ou clonage positionnel, ne requiert la connaissance préalable ni du gène ni de ses produits. Cette stratégie nécessite seulement que l'on connaisse la localisation chromosomique du gène dont l'identification de marqueurs liés constitue la première étape (Young, 1990 ; Wicking et Williamson, 1991; Collins, 1992). Certains des marqueurs liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* que nous avons identifiés seront situés sur la carte génétique du niébé développée par Menéndez *et al.* (1997). Ils serviront alors de point de départ au clonage du ou des gènes de résistance au *S. gesnerioides*. Ce travail sera effectué dans le cadre d'une collaboration entre l'Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) du Burkina Faso, l'Université de Virginie aux Etats-Unis et l'Université Laval au Canada. Le clonage ouvrira la voie au transfert par transgénèse de ces gènes de résistance dans des cultivars sensibles mais d'excellente valeur agronomique. La transformation du niébé est de nos jours une procédure de routine selon les travaux effectués par exemple à l'IITA.

Si beaucoup d'efforts ont été consacrés à la recherche sur les gènes de résistance du niébé, très peu a par contre été entrepris pour mieux connaître la génétique de la plante parasite elle-même. La connaissance des variations intraspécifiques reste à approfondir. Les différentes populations devront être mieux caractérisées. Les cinq

différentes races n'ont fait l'objet d'études, ni du point de vue de la structure des différentes populations ni du point de vue de la diversité génétique. Des études antérieures conduites par Olivier *et al.* (1998) ont permis de mieux caractériser plusieurs populations de *Striga hermonthica*, parasite de plusieurs cultures céréalières (sorgho, mil, maïs, riz et canne à sucre). Un projet est maintenant en voie de réalisation dans le but de mieux caractériser les différentes races de *S. gesnerioides*.

A.5 CONCLUSION

En utilisant les techniques AFLP et BSA, plusieurs marqueurs fortement liés aux gènes de résistance aux races 1 et 3 de *S. gesnerioides* ont été identifiés. Ces marqueurs seront transformés en SCAR afin d'être utilisés dans un programme de sélection assistée de marqueurs. Un de ces marqueurs a été situé sur le premier groupe de liaison de la carte génétique du niébé et constitue de ce fait un point de départ pour le clonage des gènes de résistance. La réalisation de ce clonage conduira au transfert par transgénèse de la résistance aux cultivars d'intérêt agronomique, mais sensibles au *S. gesnerioides*. Enfin, des études sur les différentes races de *S. gesnerioides* permettront une meilleure compréhension des modes d'action et d'évolution du parasite et amélioreront les méthodes de lutte.

Bibliographie

- Aggarwal VD 1991 Research on cowpea-*Striga* resistance at IITA. *In* Combating *Striga* in Africa, Proceedings of the International Workshop Organized by IITA, ICRISAT, and IDRC. Kim SK ed. IITA, Ibadan, Nigeria 22-24 August 1988. pp 90-95
- Aggarwal VD, Ouédraogo JT 1989 Estimation of cowpea yield loss from *S. gesnerioides* infestation. *Tropical Agric* 66 : 91-92
- Aggarwal VD, Muleba N, Drabo I, Souma J, Mbewe M 1984 Inheritance of *Striga gesnerioides* resistance in cowpea. *In* Proceedings of the 3rd International Symposium on Parasitic Weeds. Parker C, Musselman LJ, Polhill RM, Wilson AK eds. ICARDA, Aleppo, Syria 7-11 May 1984. pp 143-147
- Ashfield T, Keen NT, Buzzell RI, Innes RW 1995 Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic, or closely linked, at the *Rpg1* locus. *Genetics* 141 : 1597-1604
- Atokple IDK, Singh BB, Emechebe AM 1995 Genetics of resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. *J Heredity* 86 : 45-49
- Botstein D, White RL, Skolnik M, Davis RW 1980 Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Human Genet* 32 : 314-331
- Chang C, Meyerowitz EM 1991 Plant genome studies, restriction fragment length polymorphism and chromosome mapping information. *Curr opin Genet Dev* 1(1) : 112-118
- Collins FS 1992 Positional cloning, let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1 : 3-6
- Eathington SR, Dudley JW, Rufener GK II 1997 Usefulness of marker-QTL associations in early generation selection. *Crop Sci* 37 : 1686-1693

- Fatokun CA, Danesh D, Menancio-Hautea D, Young ND 1993 A linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) based on DNA markers. *In* A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms, Genetic maps. O'Brien JS ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp 6.256-6.258
- Fatokun CA, Young, ND, Myers GO 1997 Molecular markers and genome mapping in cowpea. *In* Advances in Cowpea Research. Singh BB, Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN eds. Sayce Publishing, Devon, UK. pp 352-360
- Jung C 1992 Utilization of RFLP markers in plant breeding. *Adv Mol Genet* 5 : 101-117
- Kelly JD, Miklas PN 1998 The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Mol Breed* 4 : 1-11
- Kosambi DD 1944 The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugenics* 12 : 172-175
- Kumar LS 1999 DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Adv* 17 : 143-182
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M, Lincoln SE, Newburg L 1987 MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181
- Lane JA, Child DV, Reiss GC, Entcheva V, Bailey JA 1997 Crop resistance to parasitic plants. *In* The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions. Crute IR, Holub EB, Burdon JJ eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. pp 81-97
- Lu YH, Melero-Vera JM, García-Tejada, Blanchard P 2000 Development of SCAR markers linked to the gene *Or5* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower. *Theor Appl Genet* 100 : 625-632
- Lu Z-X, Sossey-Alaoui K, Reighard GL, Baird WmV, Abbott AG 1999 Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode

- resistance, and its application to peach rootstock breeding. *Theor Appl Genet* 99 : 115-122
- Menéndez CM, Hall AE, Gepts P 1997 A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theor Appl Genet* 95 : 1210-1217
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnam S, Sobral BW, Young ND 1999 Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* 20 : 317-332
- Michelmore RW 1995 Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes *Annu Rev Phytopathol* 15 : 393-427
- Michelmore RW, Meyers BC 1998 Clusters of resistance genes evolve by divergent selection and a birth and death process. *Genome Res* 8 : 1113-1130
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV 1991 Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 9828-9832
- Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M, Bhatia CR, Sasaki T 1997 Genome, mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol breed* 392 : 87-103
- Muleba N, Ouédraogo JT, Tignegre JB 1997 Cowpea yield losses attributed to *Striga* infestations. *J Agric Sci Cambridge* 129 : 43-48
- Olivier A, Glaszmann JC, Lanaud C, Leroux GD 1998 Population structure, genetic diversity and host specificity of the parasitic weed *Striga hermonthica* (*Scrophulariaceae*) in Sahel. *PI Syst Evol* 209 : 33-45
- Paran I, Michelmore RW 1993 Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85 : 985-993
- Pryor T, Ellis J 1993 The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. *Adv Plant Pathol* 10 : 281-305

- Ronald PC 1998 Resistance gene evolution. *Curr Opin Biol* 1 : 294-298
- Shan X, Blake TK, Talbert LE 1999 Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor Appl Genet* 98 : 1072-1078
- Simpson J 1999 Molecular markers for crop improvement. *In* *Molecular Biotechnology for Plant Food Production*. Paredes-Lopez O ed. Lancaster, PA, USA pp 275-301
- Singh BB, Emechebe AM 1990 Inheritance of *Striga* resistance in cowpea genotype B301. *Crop Sci* 30 : 879-881
- Staub JE, Serquen FC, Gupta M 1996 Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience* 31(5) : 729-741
- Tanksley SD, McCouch SR 1997 Seed banks and molecular maps : unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277 : 1063-1066
- Touré M, Olivier A, Ntare BR, Lane JA, St-Pierre C-A 1997 Inheritance of resistance to *Striga gesnerioides* biotypes from Mali and Niger in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Euphytica* 94 : 273-278
- Varadarajan GS, Prakash CS 1991 A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Mol Biol Reporter* 9 : 6-12
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23 : 4407-4414
- Wicking E, Williamson B 1991 From linked marker to gene. *Trends Genet* 7 : 288-293
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 : 6531-6535
- Young ND 1990 Potential applications of map-based cloning to plant pathology. *Physiol Mol Plant Pathol* 37 : 81-94

LISTE COMPLÈTE DES OUVRAGES CITÉS

- Aggarwal, V.D., Haley, S.D. 1988. Breeding for drought and *Striga* resistance in cowpea. In: Menyonga JM, Bezuneh T, Youdeowei A (eds). Food grain production in semi-arid Africa p. 307-319, Trowbridge, UK: OAU/STRC - SAFGRAD/Redwood Burn Ltd.
- Aggarwal, V.D. 1991. Research on cowpea-*Striga* resistance at IITA. In Combating *Striga* in Africa, Proceedings of the International Workshop Organized by IITA, ICRISAT, and IDRC. Kim SK ed. IITA, Ibadan, Nigeria 22-24 August 1988. p. 90-95.
- Aggarwal, V.D., and Ouédraogo, J.T. 1989. Estimation of cowpea yield loss from *S. gesnerioides* infestation. Tropical Agric. 66 : 91-92.
- Aggarwal, V.D., Haley, S.D., and Brockman, F.E. 1986. Present status of breeding cowpea for resistance to *Striga* at IITA. In: ter Borb SJ (ed) Proceeding of a Workshop on Biology and Control of *Orobanche*, LHVPO, Wageningen, p. 176-180.
- Aggarwal, V.D., Muleba, N., Drabo, I., Souma, J., and Mbewe, M. 1984. Inheritance of *Striga gesnerioides* resistance in cowpea. In Proceedings of the 3rd International Symposium on Parasitic Weeds. Parker C, Musselman LJ, Polhill RM, Wilson AK eds. ICARDA, Aleppo, Syria 7-11 May 1984. pp 143-147.
- Akkaya, M.S., Bagwhatt, A.A., and Cregan, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics 132 : 1131-1139
- Anonymous 1987. IITA/SAFGRAD (International Institute of Tropical Agriculture/ Semi-Arid Food and Grain Research and Development) 1987 Annual Report Cowpea Breeding, Ouagadougou, Burkina Faso. p. c13 - c18.
- Anonymous 1987. INERA (Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles) Rapport annuel-Proteagineux-Sélection niébé. Ouagadougou, Burkina Faso., p. 17-22.
- Arumuganathan, K., and Earle, E. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol. Biol. Rep. 9: 208-218.
- Ashfield, T., Keen, N.T., Buzzell, R.I., and Innes, R.W. 1995. Soybean resistance

- genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic, or closely linked, at the *Rpg1* locus. *Genetics* 141 : 1597-1604.
- Atokple, I.D.K., Singh, B.B., and Emechebe, A.M. 1995. Genetics of resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. *J. Heredity* 86: 45-49.
- Barone, A., and Saccardo, F. 1990. Pachytene morphology of cowpea chromosomes. *In Cowpea genetic resources. Edited by Ng, N. Q., and Monti, L.M.* IITA Ibadan, Nigeria. p. 137-143.
- Bashir, M., and Hampton, R. O. 1996. Identification of cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars and lines immune to variants of blackeye cowpea mosaic potyvirus. *Plant Pathology* 45: 984-989.
- Berner, D.K., Kling, J.G., and Singh, B.B. 1995. *Striga* research and control. *Plant Disease* 79 : 652-660.
- Bharathalakshmi, and Jayachandra. 1984. Studies on the germination of some indian collections of *Striga asiatica* (L.) Kuntze. In: Parker C, Musselman LJ, Polhill RM, Wilson AK (eds) *Int. Symp. Parasit. Weeds*, 3e, Aleppo, p. 108-117.
- Boehnke, M. 1994. Limits of resolution of genetic linkage studies: implications for the positional cloning of human disease genes. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 379-390.
- Botstein, D, White, R.L., Skolnik, M., and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Human. Genet.* 32 : 314-331.
- Bournival, B.L., Scott, J.W., Vallejos, C.E. 1989. An isozyme marker for resistance to race 3 of *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 78 : 489-494.
- Bradeen, J.M., and Simon, P.W. 1998. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y_2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor. Appl. Genet.* 97: 960-967.
- Bressani, R. 1985. Nutritive value of cowpea. *In Cowpea Research, Production and Utilization. Edited by S. R. Singh and K.O. Rachie.* John Willey & Sons Chister, New York, Toronto, Singapore. p. 353-359.
- Cervera, M.T., Gusmão, J., Steenackers, M., Peleman, J., Storme, V., Vanden Broeck, A., Van Montagu, M., Boerjan, W. 1996. *Theor. Appl. Genet.* 93 : 733-737.

- Chang, C., and Meyerowitz, E.M. 1991. Plant genome studies, restriction fragment length polymorphism and chromosome mapping information. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1(1) : 112-118.
- Chase, M.W., and Hills, H.H. 1991. Silica gel: An ideal material for preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40 : 215-220.
- Chen, X.M., Line, R.F., and Leung, H. 1998. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 97: 345-355.
- Coe EH, Gardiner JM (1994) RFLP maps of maize. In: Phillips RL, Vasil IK (eds). DNA based markers in plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Collins, F.S. 1992. Positional cloning, let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1 : 3-6.
- Dax, E., Livneh, O., Aliskevicius, E., Edelbaum, O., Kedar, N., Gavish, N., Milo. J., Geffen, F., Blumenthal, A., Rabinowich, H.D., Sela, I. 1998. A SCAR marker linked to the ToMV resistance gene, *Tm2*, in tomato. *Euphytica* 101 : 73-77.
- Doggett, H. 1988. Sorghum. Tropical agriculture Series. 2nd ed. Longman Scientific and Technical – CRDI, New York.
- Dörr, I. 1997. How *Striga* Parasitizes its host: a TEM and SEM Study. *Ann. Bot.* 79: 463-472.
- Duvick, D.N. 1996. Plant breeding, an evolutionary concept. *Crop Sci.* 36 : 539-548.
- Eathington, S.R., Dudley, J.W., and Rufener, G.K II. 1997. Usefulness of marker-QTL associations in early generation selection. *Crop Sci.* 37 : 1686-1693.
- Echt, C. Knapp, S., Liu, B.H. 1992. Genome mapping with non-inbred crosses using Gmendel 2.0. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 66 : 27-29.
- Edwards, M.D., and Page, N.J. 1994. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. *Theor. Appl. Genet.* 88 : 376-382.
- Emechebe, A.M., Singh, B.B., Leleji, O.I., Atokple, I.D.K., and Adu, J.K. 1991. Cowpea-*Striga* problems and research in Nigeria. In: Kim SK (ed) Combating *Striga* in Africa, Proceedings of the International Workshop Organized by IITA, ICRISAT, and IDRC. Ibadan, IITA, Nigeria 22-24 August 1988. p. 18-28.
- Fatokun C.A., Danesh, D., Menancio-Hautea, D.I., and Young, N.D. 1993. A linkage

- map for cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp] based on DNA markers ($2n = 22$). *In Genetic maps 1992. A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms. Edited by O'Brien, J.S. Cold Spring Harbor, New York. p. 6256-6258.*
- Fatokun, C.A., Menancio-Hautea, D.I., Danesh, D., and Young, N.D. 1992. Evidence for orthologous seed weight genes in cowpea and mung bean based on RFLP mapping. *Genetics* 132 : 841-846.
- Fatokun, C.A., Young, N.D., and Myers, G.O. 1997. Molecular markers and genome mapping in cowpea. *In Advances in Cowpea Research. Singh BB, Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN eds. Sayce Publishing, Devon, UK. p. 352-360.*
- Foolad, M.R., Arulsekar, S., Becerra, V., and Bliss, F.A. 1995. A genetic linkage map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet.* 91: 262-269.
- Ganal, M.W., Young, N.D., Tanksley, S.D. 1989. Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the *Tm-2a* region of chromosome 9 in tomato. *Mol. Gen. Genet.* 215 : 395-400.
- Gillaspie, A. G., Hopkins, M. S., Pinnow, D. L., and Hampton, R. O. 1995. Seedborne viruses in preintroduction cowpea seed lots and establishment of virus-free accessions. *Plant Disease* 79: 388-391.
- Gowda, P.S.B., Xu, G.W., Frederiksen, R.A., Magill, C.W. 1995. DNA markers for downy mildew resistance genes in sorghum. *Genome* 38 : 823-826.
- Gowda, B., Sar, M., Mu, X., Cidlowski, J., and Welbourne, T. 1996. Coordinate modulation of glucocorticoid receptor and glutaminase gene expression in LLCPK1F+ Cells. *Am J Physiol* 270: C825-C831.
- Gowda, B., Sar, M., Mu, X., Cidlowski, J., and Welbourne, T. 1996. Coordinate modulation of glucocorticoid receptor and glutaminase gene expression in LLCPK1F+ Cells. *Am J Physiol* 270: C825-C831.
- Gowda, B.S., Miller, J.L., Rubin , S.S. , Sharma , D.R. , and M.P. Timko. Isolation, sequencing and linkage mapping of resistance-gene analogs from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Genome* (submitted).
- Gowda, B.S., Miller, J.L., Rubin , S.S. , Sharma , D.R. , and M.P. Timko. 2000.

- Isolation, sequencing and mapping of resistance-gene analogs from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *In: Advances in Cowpea Research, Proceedings of the World Cowpea Research Conference III, Edited by Singh, B. B., Fatokun, C., and Dashiell, K. E., IITA Ibadan, Nigeria.* p. In press.
- Gowda, B.S., Riopel, J.L., and Timko. M.P. 1999. NRSA1: a resistance gene homolog expressed in roots of nonhost plants following parasitism by *Striga asiatica* (witchweed). *Plant J.* 20:217-230.
- Hall, A. E., Singh, B. B., and Ehlers, J. D. 1997. Cowpea breeding. *Plant Breeding Reviews* 15: 215-274.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. 1997. Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48 : 575-607.
- Hampton, R. O., Thottappilly, G., and Rossel, H. W. 1997. Viral diseases of cowpea and their control by resistance-conferring genes. *In Advances in cowpea research. Edited by Singh, B. B., Mohan Raj, D. R., Dashiell, K. E., and Jackai, L. E. N., IITA Ibadan, Nigeria.* p.159-175.
- Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A., and Nienhuis, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 72: 761-769.
- Hess, D.E., Ejeta, G., and Butler, L.G. 1992. Selecting sorghum genotypes expressing a quantitative biosynthetic trait that confers resistance to *Striga*. *Phytochemistry (Oxford)* 31: 493-497.
- Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, R., and Michelmore, R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* sp. *Theor. Appl. Genet.* 93 : 1202-1210.
- Ismail, A. M., Hall, A. E., and Close, T. J. 1997. Chilling tolerance during emergence of cowpea associated with a dehydrin and slow electrolyte leakage. *Crop Sci.* 37: 1270-1277.
- Ismail, A. M., Hall, A. E., and Close, T. J. 1999. Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 96: 13566-13570.
- Jones, D.A., and Jones, J.D.G. 1997. The role of leucine-rich repeat protein in plant

- defences. *Adv. Bot. Res.* 24 :89-167.
- Jung, C. 1992. Utilization of RFLP markers in plant breeding. *Adv. Mol. Genet.* 5 : 101-117.
- Kanazin, V., Marek, L.F., and Shoemaker, R.C. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11746-11750.
- Kelly, J.D., and Miklas, P.N. 1998. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Mol Breed* 4 : 1-11.
- Kim, D., Kocz, R., Boone, L., Keyes, W.J., Lynn, D.G. 1998. On becoming a parasite: evaluating the role of wall oxidases in parasitic plant development. *Chem. Biol.* 5: 103-117.
- Knapp, S. 1998. Marker-Assisted Selection as a strategy for increasing the probability of selecting superior genotypes. *Crop Sci.* 38 : 1164-1174.
- Konieczyn, A., and Ausubel, F.M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4 : 403-410.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics.* 12: 172-175.
- Kresovich, S., Williams, J.G.K., McFerson, J.R., Routman, E.J., and Schaal, B.A. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 190-196.
- Kumar, L.S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Adv.* 17: 143-182.
- Ky, C.-L., Barre, P., Lorieux, M., Trouslot, P., Akaffou, S., Louarn, J., Charrier, A., Hamon, S., and Noirot, M. 2000. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). *Theor. Appl. Genet.* 101 (4): 669-676.
- Lahogue, F., This, P., and Bouquet, A. 1998. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 97 : 950-959.
- Lander, E.S., and Botstein. 1986. Mapping Mendelian factors underlying quantitative

- traits in humans: New method using a complex RFLP linkage map. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51 : 49-62.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M., Lincoln, S.E., and Newburg, L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1: 174-181.
- Lane, J.A., Butler, R.C., Terry, P.J., Bailey, J.A. 1993 Resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke, a parasitic angiosperm. *The New Phytol.* 125: 495-512.
- Lane, J.A., Child, D.V., Reiss, G.C., Entcheva, V., and Bailey, J.A. 1997a. Crop resistance to parasitic plants. In: Crute IR, et al. (eds) *The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions*, CABInternational, UK. p. 81-97.
- Lane, J.A., Moore, T.H.M., Child, and Bailey, J.A. 1997b. Variation in virulence of *Striga gesnerioides* on cowpea: new sources of resistance. In: Singh BB, Mohan R, Dashiell KE, Jackai LEN (eds), *Advances in Cowpea Research*. Chapter 19, IITA-JIRCAS, Ibadan, Nigeria. p. 225-230.
- Lane, J.A., Moore, T.H.M., Child, D.V., Cardwell, K.F., Singh, B.B., and Bailey, J.A. 1994. Virulence characteristics of a new race of the parasitic angiosperm *Striga gesnerioides* from southern Benin on cowpea. *Euphytica* 72 : 183-188.
- Lee, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Adv Agron* 55 : 265-344.
- Lefebvre, V., and Chèvre, A.M. 1995. Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. *Agronomie* 15: 3-19.
- Liu, B.-H. 1998. *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press. Boca Raton New York. p 295.
- Lu, Y.H., Melero-Vera, J.M., García-Tejada, and Blanchard, P. 2000. Development of SCAR markers linked to the gene *Or5* conferring resistance to broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in sunflower. *Theor Appl Genet* 100 : 625-632.
- Lu, Z.X., Sisinski, B., Reighard, G.L., Baird, W.V., and Abbott, A.G. 1998. Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers linked to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome*, 41: 199-207.
- Lu, Z-X., Sossey-Alaoui, K., Reighard, G.L., Baird, Wm.V., and Abbott, A.G. 1999.

- Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to each rootstock breeding. *Theor Appl Genet* 99 : 115-122.
- Lynn, D.G., Chang, M. 1990. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 497-526.
- Mago, R., Nair, S., and Mohan, M. 1999. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theor Appl Genet* 99: 50-57.
- Maiti, R.K., Ramaiah, K.V., Bisen, S.S., and Chidley, V.L. 1984. A comparative study of the haustorial development of *Striga asiatica* (L.) Kuntze on sorghum cultivars. *Ann. Bot.* 54: 447-457.
- Manly, K.F., and Elliot, R.W. 1991. MapManager, a microcomputer program for analysis of data from recombinant inbred strains. *Mammalian Genome* 1: 123-126.
- Maréchal, R., Macherpa, J.M., and Stainer, F. 1978. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base des données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* (Conservatoire et jardin botanique, Geneva, Switzerland), 28 : 1-273.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., and Tanksley, S.D. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262 : 1432-1436.
- Menancio-Hautea, D.I., Fatokun C.A., Kumar, L., Danesh, D., and Young, N.D. 1993. Comparative genome analysis of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walpers) using RFLP mapping data. *Theor. Appl. Genet.* 86: 797-810.
- Menéndez, C.M., Hal, I. A.E., and Gepts, P. 1997. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1210-1217.
- Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnam, S., Sobral, B.W., and Young, N.D. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding

- superfamily. *Plant. J.* 20 : 317-332.
- Michelmore, R.W. 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annu.Rev. Phytopathol.* 15 : 393-427.
- Michelmore, R.W. 1996. Flood warning-resistance genes unleashed. *Nature Genet.* 14: 376-378.
- Michelmore, R.W., and Meyers, B.C. 1998. Clusters of resistance genes evolve by divergent selection and a birth and death process. *Genome Res* 8 : 1113-1130.
- Michelmore, R.W., Paran, I., and Kessel, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 9828-9832.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R., and Sasaki, T. 1997. Genome, mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol breed* 392 : 87-103.
- Moore, T.H.M., Lane, J.A., Cild, D.V., Arnold, G.M, Bailey, J.A., and Hoffmann, G. 1995. New sources of resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) to *Striga gesnerioides*, a parasitic angiosperm. *Euphytica* 84: 165-174.
- Muehlbauer, G.J., Specht, J.E., Thomas-Compton, M.A., Staswick, P.E., and Bernard, R.L. 1988. Near-isogenic lines, a potential resource in the integration of conventional and molecular marker linkage maps. *Crop Sci* 28 : 729-735.
- ⊘ Muleba, N., Ouédraogo, J.T., and Drabo, I. 1996. Yield stability in relation to *Striga* resistance in cowpea production in West and Central Africa. *African Crop Sci J* 4 : 29-40.
- ⊗ Muleba, N., Ouédraogo, J.T., and Tignegre, J.B. 1997. Cowpea yield losses attributed to *Striga* infestations. *J Agric Sci Cambridge* 129 : 43-48.
- Musselman, L.J., and Hepper, F.N. 1986. The witchweeds (*Striga*, Scrophulariaceae) of the Sudan Republic. *Kew. Bull.* 41: 250.
- Myers, G.O., Fatokun, C.A., and Young, N.D. 1996. RFLP mapping of an aphid resistance gene in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Euphytica* 91 : 181-187.
- Olivier, A. 1995. Le *Striga*, mauvaise herbe parasite des céréales africaines: biologie

- Myers, G.O., Fatokun, C.A., and Young, N.D. 1996. RFLP mapping of an aphid resistance gene in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Euphytica* 91 : 181-187.
- Olivier, A. 1995. Le Striga, mauvaise herbe parasite des céréales africaines: biologie et méthodes de lutte. *Agronomie* 15 : 517-525.
- Olivier, A. 1996. La relation entre le Striga hermonthica et ses hôtes : une synthèse. *Can. J. Bot.* 74: 1119-1137.
- Olivier, A., Glaszmann, J.C., Lanaud, C., and Leroux, G.D. 1998. Population structure, genetic diversity and host specificity of the parasitic weed *Striga hermonthica* (*Scrophulariaceae*) in Sahel. *PI Syst Evol* 209 : 33-45.
- Omwega, C. O., Thomason, I. J., and Roberts, P. A. 1988. A non destructive technique for screening bean germ plasm for resistance to *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease* 72: 970-972.
- Ouédraogo, J.T., Gowda, B.S., Jean, M., Close, T.J., Ehler, J.D., Hall, A.E., Gillaspie, A.G., Roberts, P.A., Ismail, A.M., Bruening, G., Gepts, P., Timko, M.P., and Belzile F.J. 2002. An Improved Genetic Linkage Map for Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Combining AFLP, RFLP, RAPD and Biochemical Markers. *Genome* 45(1): 175-188.
- Ouédraogo, J.T., Maheshwari, V., Berner, D.K., St-Pierre, C.-A., Belzile, F., and Timko, M.P. 2001. Identification of AFLP Markers Linked to Resistance of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to *Striga gesnerioides*. *Theor. Appl. Genet.* 102:1029-1036.
- Paran, I., and Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85 : 985-993.
- Parker, C., and Polniaszek, T.I. 1990. Parasitism of cowpea by *Striga gesnerioides*: variation in virulence and discovery of a new source of host resistance. *Annals Appl Biol* 116 : 305-311.
- Paterson, A.H. 1995. Molecular dissection of quantitative traits: Progress and prospects. *Genome research* 5 : 321-333.
- Paterson, A.H. 1996. Genome mapping in plants. *Biotechnology Intelligence Unit. Academic Press London UK* p. 23-39.

- Thottappilly, G., Monti, L.M., Mohan Raj, A.W., and Moore, A.W. (eds). Biotechnology: Enhancing Research on Tropical Crops in Africa. Ibadan, Nigeria: CTA/IITA co-publication. p. 11-19.
- Pignone, D., Cifarelli, S., and Perrino, P. 1990. Chromosome identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In Cowpea genetic resources. Edited by Ng, N. Q., and Monti, L.M. IITA Ibadan, Nigeria. p. 144-150.
- Polzin, K.M., Lohnes, D.G., Nickell, C.D., and Shoemaker, R.C. 1994. Integration of *Rps2*, *Rmd*, and *Rj2* into linkage group J of the soybean molecular map. J. Hered. 85 : 300-303.
- Poustka, A. 1990. Physical mapping by PFGE. In: Birren B, Lai E (eds). Methods. A companion to methods in enzymology. Academic Press: Harcourt Brace Jovanovich 1 : 204-211.
- Press, M.C., Graves, J.D., and Stewart, G.R. 1990. Physiology of the interaction of angiosperms parasites and their higher plant hosts. Plant Cell Environ. 13: 91-104.
- Pryor T., and Ellis, J. 1993. The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. Adv. Plant Pathol. 10 : 281-305.
- Qi, X., Stam, P., and Lindhout, P. 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. Theor. Appl. Genet. 96: 376-384.
- Ragot, M., Biasioli, M., Delbut, M.F., Dell'Orgo, A., Malgarini, L., Thevenin, P., Vernoy, J., Vivant, J., Zimmermann, R., and Gay, G. 1995. Marker-assisted backcrossing: a practical example. In. Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires. INRA, Paris, p. 45-56.
- Ramaiah, K.V. 1984. Physiological specialization of *Striga hermonthica* and crop specificity. In: Parker C, Musselman LJ, Polhill RM, Wilson AK (eds) Int. Symp. Parasit. Weeds, 3e, Aleppo, p. 58-65.
- Ramaiah, K.V. 1987. Breeding cereal grains for resistance witchweed. In: Musselman LJ (ed). Parasitic weeds in agriculture. Vol. 1. Striga. CRC Press Inc., Boca Raton p. 227-242.
- Ramaiah, K.V., and Parker, C. 1982. Striga and other weeds in sorghum and millet.

- In: Kim SK (ed). Sorghum in the eighties. Proceedings of the International Symposium on sorghum, Patancheru, 2-7 Nov. 1981, ICRISAT, p. 291-302.
- Reiss, G.C., and Bailey, J.A. 1998. *Striga gesnerioides* Parasitizing Cowpea: Development of Infection Structures and Mechanisms of Penetration. *Ann. Bot.* 81: 431-440.
- Reiss, G.C., Lane, J.A., Pring, R.J., Bailey, J.A. 1995. *Striga gesnerioides*: mechanismss of infection and resistance. *Aspects of Applied Biology* 42: 301-306.
- Ribaut, J-M., and Hoisington, D. 1998). Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci.* 3 :236-239.
- Rick, C.M., Fobes, J.F. 1974. Association of an allozyme with nematode resistance. *Rep. Tomato Genet. Coop.* 24 : 25.
- Rigert, K. S., and Foster, K. W. 1987. Inheritance of resistance to two races of *Fusarium* wilt in three cowpea cultivars. *Crop Sci.* 27: 220-224.
- Roberts, P. A., Ehlers, J. D., Hall, A. E., and Matthews, W. C. 1997. Characterization of new resistance to root-knot nematodes in cowpea. *In Advances in cowpea research. Edited by Singh, B. B., Mohan Raj, D. R., Dashiell, K. E., and Jackai, L. E. N., IITA Ibadan, Nigeria.* p. 207-214.
- Ronald, P.C. 1998. Resistance gene evolution. *Curr. Opin. Biol.* 1 : 294-298.
- Roupe van der Voort, J.N.A., P., van Eck, H.J., Draaistra, J., van Zandvoort, Jacobsen, E., and Bakker, J. 1998. An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Mol. Breeding* 4: 73-77.
- Roupe van der Voort, J.N.A., van Zandvoort, P., van Eck, H.J., Folkertsma, R.T., Hutten, R.C.B., Draaistra, J., Gommers, F.J., Jacobsen, E., Helder, J., and Bakker, J. 1997a. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* 255: 438-447.
- Roupe van der Voort, J.N.A., Wolters, P., Folkertsma, R.T., Hutten, R.C.B., van Zandvoort, P., Vinke, H., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Jacobsen, E., Janssen, R., and Bakker, J. 1997b. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 874-880.

- Saccardo, F., Del Giudice, A., and Galasso, I. 1997. Cytogenetics of cowpea. *In* Biotechnology: Enhancing research on tropical crops in Africa. *Edited by* Thottappilly, G., Monti, L.M., Mohan Raj, D.R., and Moore, A.W. CTA and IITA p.89-98.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Harbor, New York.
- Saunders, A.R. 1933. Studies in phanerogamic parasitism with particular reference to *Striga lutea* Lour. Sci. Bull. S. Afr Dep. 128: 1-56.
- Segal, G., Sarfatti, M., Schaffer, M.A., Ori, N., Zamir, D., and Fluhr, R. 1992. Correlation of genetic and physical structure in the region surrounding the I2 *Fusarium oxysporum* resistance locus in tomato. Mol. Gen. Genet. 231 : 179-185.
- Shan, X., Blake, T.K., and Talbert, L.E. 1999. Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. Theor. Appl. Genet. 98 : 1072-1078.
- Shawe, K.G., and Ingrouille, M.J. 1993. Isoenzyme analysis demonstrates host selection of parasite pathotypes in the association between cowpea and *Striga gesnerioides*. Brighton Prot. Conf.-Weeds, p. 919-924.
- Simpson, J. 1999. Molecular markers for crop improvement. In: Paredes-Lopez, O. (ed). Molecular Biotechnology for Plant Food Production. Lancaster, PA, USA pp 275-301.
- Singh, B.B. 1999. *Striga* resistant cowpeas. The Haustorium 34: 4-5.
- Singh, B.B., and Emechebe, A.M. 1990a. Inheritance of *Striga* resistance in cowpea genotype B301. Crop Sci. 30 :879-881.
- Singh, B.B., and Emechebe, A.M. 1990b. Combined resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. Agron. Abstr. 109-110.
- Singh, B.B., and Emechebe, A.M. 1991. Breeding for resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. In: Ransom JK, Musselman LJ, Woesham AD, Parker C (eds) Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds. Nairobi, Kenya, 24-30 June 1991. CIMMYT. p. 303-305.
- Singh, B.B., and Emechebe, A.M. 1996. Advances in research on cowpea *Striga* and *Alectra*. In: Quin FM (ed) Second World Cowpea Conference, IITA, Ibadan.

- Singh, B.B., and Emechebe, A.M. 1997. Advances in research on cowpea *Striga* and *Alectra*. In: Singh BB, Mohan R, Dashiell KE, Jackai LEN (eds), Advances in Cowpea Research. Chapter 18, IITA-JIRCAS, Ibadan, Nigeria. p. 215-224.
- Stam, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. Plant J. 3 : 739-744.
- Staub, J.E., Kuhns, L.J., May, B., and Grun, P. 1982. Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. J .Amer. Soc. Hort. Sci. 107 : 405-408.
- Staub, J.E., Serquen, F.C., and Gupta, M. 1996. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. HortScience 31(5) : 729-741.
- Stuber, C.W. 1995. Mapping and manipulating quantitative traits in maize. Trends Genet. 11 : 477-481.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., and Bonierbale, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding, new tools for an old science. Bio/Technol. 7 : 257-264.
- Tanksley, S.D., and McCouch, S.R. 1997. Seed banks and molecular maps : unlocking genetic potential from the wild. Science 277 : 1063-1066.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Prince, J.P., De Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Paterson, A.H., Pineda, O., Roder, M.S., Wing, R.A., Wu, W., and Young, N.D. 1992. High density molecular linkage maps of tomato and potato genomes. Genetics 132: 1141-1160.
- Thomas, C.M., Vos, P, and Zabeau, M. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fluvum*. The Plant Journal 8(5) : 785-794.
- Touré, M., Olivier, A., Ntare, B.R., Lane, J.A., and St-Pierre, C-A. 1997. Inheritance of resistance to *Striga gesnerioides* biotypes from Mali and Niger in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Euphytica 94 : 273-278.
- Varadarajan, G.S., and Prakash, C.S. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. Plant. Mol. Biol. Reporter 9 : 6-12.
- Visser, J., and Dörr, I. 1987. The haustorium. In: Musselman LJ (ed). Parasitic weeds

- in agriculture. Vol. 1 Striga. Boca Raton. Florida: CRC Press Inc., 91-106.
- Vodenicharova, M. 1989. Use of proteins as molecular-genetic markers in plants. *Genet. Sel.* 22 : 269-277.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Waugh, R., Bonar, N., Baird, E., Thomas, B., Graner, A., Hayes, P., and Powell, W. 1997. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* 255: 311-321.
- Wicking, E., and Williamson, B. 1991. From linked marker to gene. *Trends Genet.* 7 : 288-293.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 : 6531-6535.
- Wing, R.A., Zhang, H-B., and Tanksley, S.D. 1994. Map-based cloning in crop plants. Tomato as a model system: I. Genetic and physical mapping of *jointless*. *Mol. Gen. Genet.* 242 : 681-688.
- Winter, P., Benko-Iseppon, A.-M., Hüttel, B., Ratnaparkhe, M., Tullu, A., Sonnante, G., Pfaff, T., Tekeoglu, M., Santra, D., Sant, V.J., Rajesh, P.N., Kahl, G., and Muehlbauer, F.J. 2000. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for *fusarium* wilt races 4 and 5. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1155-1163.
- Witsenboer, H., Kesseli, R.V., Fortin, M.G., Stanghellini, M., and Michelmore, R.W. 1995. Sources and genetic structure of a cluster of genes for resistance to three pathogens in lettuce. *Theor Appl Genet* 91 : 178-188
- Wolfe, M.S. 1993. Can the strategic use of disease resistant hosts protect their inherent durability. In: Jacobs T, Parlevliet JE (eds) *Durability of disease resistance*. Dordrecht: Kluwer p. 83-96.
- Wolfe, M.S., Brandle, U., Koller, B., Limpert, E., McDermott, J.M. 1992. Barley mildew in Europe: population biology and host resistance. In: Johnson R, Jellis GJ

- (eds). Breeding for disease resistance. *Euphytica*. Dordrecht: Kluwer. Vol. 63:125-139.
- Xu, Y., Zhu, L., Xiao, J., Huang, N., and McCouch, S.R. 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 253: 535-545.
- Yoder, J.I. 1997. A species-specific recognition system directs haustorium development in the parasitic plant *Triphysaria* (Scrophulariaceae). *Planta* 202: 407-413.
- Young, N.D., Fatokun, C.A., Menancio-Hautea, D., and Danesh, D. 1992. RFLP mapping in cowpea. In:Thottappilly, G., Monti, G.L., Mohan Raj, D.R., Moore, A.W. (eds) *Biotechnology, Enhancing Research on Tropical Crops in Africa*. CTA/IITA, Ibadan, Nigeria. p. 237-246.
- Young, N.D., Kelly, J.D. 1997. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. *Crop Sci.* 37 : 940-946.
- Young, N.D., Zamir, D., Ganai, M.W., and Tanksley, S.D. 1988. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. *Genetics* 120 : 579-585.
- Young, N.D. 1990. Potential applications of map-based cloning to plant pathology. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 37 : 81-94.
- Young, N.D. 1999. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol. Breed.* 5: 505-510.
- Young, N.D., Fatokun, C.A., Menancio-Hautea, D., and Danesh, D. 1992. RFLP mapping in cowpea. In:Thottappilly G, Monti GL, Mohan Raj DR, Moore AW (eds) *Biotechnology, Enhancing Research onTropical Crops in Africa*. CTA/IITA, Ibadan, Nigeria. p. 237-246.
- Young, W.P., Schupp, J.M., and Keim, P. 1999. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theor. Appl. Genet.* 99: 785-790.
- Yu, Y.G., Buss, G.R., and Saghai Maroof, M.A. 1996. Isolation of a superfamily of candidate resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11751-11756.

Zamir, D., and Tadmor, Y. 1986. Unequal segregation of nuclear genes in plants. Bot. Gaz. 147: 355-358.