

# Contribution à l'évaluation indirecte du flux de gènes entre les populations sauvages du haricot de Lima dans la vallée centrale du Costa Rica à l'aide de marqueurs enzymatiques et microsatellites

---

Mahama OUÉDRAOGO<sup>1</sup>, Alain MAQUET<sup>2</sup>, Jean-Pierre BAUDOIN<sup>3</sup>

## Résumé

Pour évaluer le flux de gènes entre les populations sauvages du haricot de Lima dans la vallée centrale du Costa Rica, les méthodes indirectes basées sur la différenciation génétique entre les sous-populations ( $F_{ST}$ ) et les allèles privés ont été utilisées. Les génotypes ont été caractérisés à l'aide des marqueurs enzymatiques et microsatellites. Des valeurs faibles à moyennes du nombre de migrants par population et par génération ont été obtenues. Le système de reproduction de *Phaseolus lunatus* var silv. qui est à prédominance autogame et les niveaux observés de nombre de migrants pourraient expliquer l'existence d'une forte différenciation génétique entre les populations sauvages du haricot de Lima. Les sites naturels des populations sont sous l'effet d'un changement accéléré de la vocation des terres à cause de la pression démographique et de l'intensification de l'agriculture. Il importe alors de conserver *ex situ* les graines de populations les plus menacées de disparition et de constituer dans chacune des régions climatiques représentatives de la vallée centrale, des réserves génétiques abritant le maximum de grandes populations (conservation *in situ*).

**Mots-clés :** Microsatellites, enzymes, flux de gènes, méthode indirecte, conservation *in situ*, *Phaseolus lunatus*.

---

<sup>1</sup> Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) / Kamboinsé 01 BP 746 OUAGA 01 Burkina Faso.  
E-mail : mahama.ouedraogo@messrs.gov.bf

<sup>2</sup> Food and Feed Unit, Institute for reference Materials and Measurements. IRMM. DG-Joint Research Centre. European commission, Belgium.

<sup>3</sup> Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Unité de Phytotechnie Tropicale et d'Horticulture, 2 Passage Des Déportés, B 5030 Gembloux, Belgium.

# Contribution to indirect assessment of gene flow between wild populations of Lima bean from the central valley of Costa Rica using enzyme and microsatellite markers

## Summary

To assess gene flow between wild populations of Lima bean in the Central Valley of Costa Rica, the two indirect methods, based on genetic differentiation among population ( $F_{ST}$ ) and private allele were used. The genotypes of samples were characterized by using enzyme and microsatellite markers. Low to intermediate values of number of migrants per population and per generation were got. The mating system of *Phaseolus lunatus* var silv. which is predominantly self-pollinated and the observed levels of migrants can explain the being of high genetic differentiation between the wild populations of Lima bean. Furthermore, the natural habitat of wild populations is under the effect of rapid change in land use due to demographic pressure and agriculture intensification. It is important to conserve *ex situ* seeds of populations, which are more threatened of disappearing and to preserve in each climatic representative region of the Central valley, genetic reserves harbouring the highest number of large populations.

**Keywords:** Microsatellite, enzyme, gene flow, indirect method, *in situ* conservation, *Phaseolus lunatus*.

## Introduction

La connaissance de l'action des facteurs d'évolution dans les populations végétales naturelles permet l'élaboration de schémas de conservation des ressources phytogénétiques (MAXTED *et al.*, 1997). Parmi les facteurs d'évolution, le flux de gènes agit telle une force structurante ou homogénéisante en fonction de son importance. En effet, un flux réduit de gènes favorise la subdivision en sous-populations alors qu'un flux de gènes important peut non seulement tendre à rompre la structuration des populations végétales, mais aussi à maintenir une plus grande diversité génétique (SLATKIN, 1987).

*Phaseolus lunatus* L. est une légumineuse vivrière dont les populations naturelles (*Phaseolus lunatus* var *silvester*) sont constituées de plantes herbacées autogames à allogamie facultative, de croissance indéterminée et volubile. Elles sont pluriannuelles et héliophiles (BAUDOIN, 1991). Les populations sauvages du haricot de Lima sont localisées dans la vallée centrale du Costa Rica qui est une zone d'une superficie de 2 000 km<sup>2</sup> environ. Elle est délimitée par la chaîne montagneuse centrale au nord et la chaîne montagneuse de Talamanca au sud et subit une forte pression démographique de 500 habitants/km<sup>2</sup>. Les populations du haricot sont menacées par la destruction de leurs habitats naturels. En effet, l'aménagement des terrains, des caféières et la destruction des haies localisées dans les zones urbaines et agricoles, de même que le contrôle des adventices suite à l'intensification de l'agriculture contribuent ensemble pour 89,5 % des cas de disparition de populations du haricot de Lima (ROCHA *et al.*, 1997). Ces mêmes auteurs ont montré qu'il existait un taux d'extinction annuel des populations sauvages de *P. lunatus* évalué à 30 %.

C'est dans le but d'estimer l'importance du flux de gènes entre les populations sauvages du haricot de Lima et de contribuer à leur conservation *in situ* que cette étude a été entreprise. Elle a été conduite dans le cadre d'un projet de conservation *in situ* coordonné par l'International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) et exécuté en collaboration par la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique) et l'Université du Costa Rica.

## Matériel et méthodes

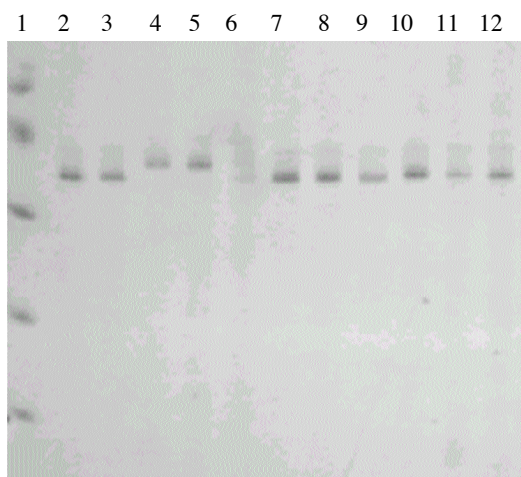
### Marqueurs enzymatiques

Vingt-huit populations sauvages de *P. lunatus* qui proviennent de la vallée centrale du Costa Rica et qui ont été collectées en 1998 ont constitué le matériel d'étude. Seules les populations qui possédaient au moins 4 individus ont été retenues. Dix graines prélevées de manière aléatoire parmi les individus de chaque population ont été analysées à l'aide des marqueurs enzymatiques.

Les procédures d'extraction des enzymes, d'électrophorèse sur gel d'amidon et de révélation des loci enzymatiques ont été mises au point au sein de l'Unité de Phytotechnie tropicale et d'Horticulture de la Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux lors de travaux antérieurs (ZORO BI *et al.*, 1999). Treize systèmes enzymatiques (Alcool déshydrogénase (ADH), Diaphorase (DIA), Endopetidase (END), Estérases (EST), Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), Glucose déshydrogénase (GDH), Glucose-6-phosphate isomérase (GPI), Leucine aminopeptidase (LAP), Malate déshydrogénase (MDH), Phosphogluconate déshydrogénase (PGDH), Phosphoglucomutase (PGM), Shikimate déshydrogénase (SKDH) et Superoxyde dismutase (SOD)) permettant de révéler 25 loci enzymatiques qui codent pour 40 allèles ont été utilisés.

### Marqueurs microsatellites

Trois cent cinquante neuf (359) individus (feuilles séchées au gel de silice durant une semaine) répartis entre neuf populations originaires de la région d'Heredia ont été amplifiés avec 10 couples d'amorces microsatellites. Les procédures d'extraction d'ADN, d'amplification des loci microsatellites, d'électrophorèse, de révélation des loci microsatellites, d'acquisition et d'analyse des images sont celles décrites dans OUÉDRAOGO *et al.*, 2005. La figure 1 montre un aperçu de profil microsatellite obtenu après amplification avec l'amorce microsatellite BM142.



Canal 1 : Marqueur de poids moléculaire  
Canaux 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11 et 12: BM142143/143  
Canaux 4 et 5 : BM142148/148  
Canal 6 : BM142143/148

**Figure 1.** Profils générés par l'amorce microsatellite BM142.

## Analyse et interprétation des données

Les génotypes des 359 individus qui ont été amplifiés à l'aide de 10 amorces microsatellites ont été codifiés et exportés dans plusieurs logiciels pour l'obtention des paramètres de génétique des populations. Ainsi, les coefficients de différenciation génétique ont été obtenus avec le logiciel FSTAT ver. 2. 9. 3. 2. (GOUDET, 1995). Le nombre de migrants par génération et par population selon la méthode de SLATKIN (1985) a été obtenu à l'aide du logiciel GENEPOP ver. 3.3. (RAYMOND et ROUSSET, 1995). Ce logiciel a aussi permis de réaliser les tests d'isolement par la distance. Le test d'isolement par la distance analyse la régression de la différenciation génétique entre les couples de populations et la distance qui les sépare. Ce test a été réalisé en comparant la pente de régression obtenue, d'une part, entre la différenciation génétique ( $F_{ST}$ ) et la distance géographique et d'autre part, les pentes de régression obtenues pour mille permutations des populations (test de Mantel). Le test de Mantel permet d'évaluer l'association entre deux matrices de variables (SOKAL et ROHLF, 1998). Le logiciel d'analyse de la structure spatiale de la diversité génétique SPAGeDi ver. 0.1 (HARDY et VEKEMANS, 2002) a permis de calculer le coefficient de différenciation génétique moyen en fonction des classes de distances. La structure géographique des populations de *P. lunatus* a été analysée à l'aide du test d'isolement par la distance (WRIGHT, 1951).

## Résultats

Les estimations du nombre de migrants par génération et par population obtenues grâce aux méthodes indirectes basées sur la différenciation génétique entre les populations (WRIGHT, 1931) et les allèles privés (SLATKIN, 1985) ont été regroupées (tableau I).

**Tableau I.** Nombre de migrants par population et par génération entre les populations sauvages de *P. lunatus*.

Marqueur génétique	Nombre de migrants par population et par génération	
	$Nm_w$ <sup>1</sup>	$Nm_s$ <sup>2</sup>
Enzymatique	0,398	0,132
Microsatellite	0,471	0,057

1 : Nombre de migrants par génération et par population basé sur la différenciation génétique

2 : Nombre de migrants par génération et par population basé sur les allèles privés.

Les estimations du nombre de migrants par population et par génération ont été faites selon SLATKIN (1985) ( $Nm_s$ ) et WRIGHT (1931) ( $Nm_w$ ).

D'une part, des valeurs faibles de nombre de migrants par génération et par population (0,057 et 0,132) ont été obtenues par l'utilisation de la méthode des allèles privés pour les marqueurs enzymatiques et microsatellites et d'autre part des valeurs de nombre de migrants par génération et par population (0,398 et 0,471) ont été obtenues par l'utilisation de la méthode basée sur le coefficient de différenciation génétique pour les deux types de marqueurs. Les quatre allèles privés enzymatiques *Adh-1*<sup>116</sup>, *Gpi-1*<sup>96</sup>, *End*<sup>87</sup> et *Pgdh-1*<sup>86</sup> localisés respectivement dans les

populations E088, E114, J048 et KM12 ont permis l'obtention de la valeur de  $Nm_s = 0,132$  avec la méthode des allèles privés (tableau I).

Avec les marqueurs microsatellites, l'estimation du nombre de migrants par génération et par population par la méthode des allèles privés est de 0,057. L'allèle privé *BM149*<sup>241</sup>, localisé dans la population E076 et l'allèle privé *BM156*<sup>252</sup>, localisé dans la population E088 ont permis l'estimation du  $Nm_s$ .

Le logiciel d'analyse de la structure spatiale de la diversité génétique SPAGeDi ver. 0.1 (HARDY et VEKEMANS, 2002) a permis de montrer que la différenciation génétique moyenne augmente en fonction des classes de distance (tableau II).

**Tableau II.** Différenciation génétique ( $F_{ST}$ ) des populations en fonction des classes de distances.

Classes de distances (m)	Distance moyenne (m)	Coefficient moyen de différenciation génétique ( $F_{ST}$ )*
0 – 226	79,20	0,43
227 – 997	553,73	0,64

\* Calculé sur base des microsatellites

Le coefficient de différenciation génétique moyen dans la classe de distance 227 à 997 m (0,64) et le coefficient de différenciation génétique moyen dans la classe de distance 0 à 226 m (0,43) ne sont pas significativement différents. Le test de Mantel amène à accepter l'hypothèse nulle selon laquelle il n'y a pas d'augmentation de la différenciation génétique avec la distance géographique ( $P = 0,09$ ) au seuil  $\alpha = 0,05$ .

## Discussion

Les marqueurs enzymatiques et microsatellites ont permis la caractérisation des génotypes d'individus qui proviennent de populations sauvages du haricot de Lima originaires de la vallée centrale du Costa Rica. Quel que soit le type de marqueur (enzymatique ou microsatellite), l'utilisation de la méthode des allèles privés de SLATKIN (1985) avec des échantillons dont le nombre d'individus par population est hétérogène conduit à une sous-estimation du  $Nm$ . En effet, l'utilisation idéale requiert l'analyse de tous les individus de chaque population et à défaut au moins du même nombre d'individus par population (SLATKIN, 1985). En outre les simulations montrent que l'utilisation de 10 loci et de 20 allèles privés offrent une bonne estimation du  $Nm_s$  (SLATKIN, 1985). En effet, Une valeur plus élevée du nombre de migrants par population et par génération ( $Nm_s = 0,507$ ) a été obtenue par MASUMBUKO (1999) chez des populations sauvages du haricot originaires de la vallée centrale du Costa Rica en utilisant la méthode des allèles privés (SLATKIN, 1985). Ce dernier résultat s'explique par la présence de trois allèles privés enzymatiques : *Gpi-1*<sup>96</sup> (populations G021 et G012), *Pgdh-2*<sup>119</sup> (population J055) et *fEst-2*<sup>110</sup> (population E086) et surtout par un échantillon constitué de 42 populations sauvages du haricot de Lima dont chacune est composée de dix individus. Ce qui satisfait partiellement aux conditions émises. Par contre, dans l'étude de ZORO BI (1999), les allèles privés enzymatiques

*Gpi-1*<sup>96</sup> (population E114), *Pgdh-1*<sup>86</sup> (KM12) et l'allèle *fEst-2*<sup>110</sup> (population 088) ont été utilisés pour 29 populations sauvages de *P. lunatus* originaires de la même vallée centrale du Costa Rica. Mais cet échantillon est caractérisé par une forte hétérogénéité de la taille des populations (3 à 334 individus par population). Cela s'est traduit par une sous-estimation du nombre de migrants par population et par génération ( $Nm_s = 0,017$ ). La différence entre les estimations du  $Nm_s$  tant avec les marqueurs enzymatiques qu'avec les marqueurs microsatellites s'explique par l'hétérogénéité du nombre d'individus par population et par la faiblesse du nombre d'allèles privés.

Les deux types de marqueurs génétiques ont montré des niveaux similaires de nombre de migrants par population et par génération (0,398 et 0,471) par l'utilisation de la méthode basée sur le coefficient de différenciation génétique (tableau I).

Chez les populations sauvages de *P. lunatus* dans la vallée centrale du Costa Rica, des niveaux faibles à moyens de nombre de migrants par génération et par population ont été observés. Ces résultats s'expliquent par le fait que les marqueurs enzymatiques et microsatellites ont révélé le même niveau de différenciation génétique. Les valeurs de nombre de migrants par génération et par population obtenues par l'utilisation des deux méthodes indirectes (différenciation génétique ( $F_{ST}$ ) et allèles privés) sont en accord avec les résultats de l'étude comparative de trois méthodes indirectes d'estimation du flux de gènes : différenciation génétique ( $F_{ST}$ ), allèles privés et maximum de vraisemblance (SLATKIN et BARTON, 1989). Ces auteurs ont montré que pour des populations naturelles subdivisées et dans lesquelles les hypothèses qui sous-tendent la population « idéale » n'étaient pas nécessairement satisfaites, la méthode de détermination du nombre de migrants par génération et par population basée sur la différenciation génétique ( $F_{ST}$ ) offrait une meilleure estimation.

En ne tenant compte que du système de reproduction (autogamie et allogamie), les estimations du nombre de migrants par population et par génération chez la forme sauvage de *P. lunatus* tant avec les marqueurs enzymatiques qu'avec les marqueurs microsatellites sont faibles comme celles obtenues chez d'autres espèces autogames telles que *Vicia tetrasperma* :  $Nm_s = 0,440$  et  $Nm_w = 1,900$  (HUTH et HUTH, 2001) et *Arctomecon humilis* Coville :  $Nm_w = 1,900$  (ALLPHIN et al., 1998). Par contre, les valeurs obtenues chez les espèces autogames avec les deux méthodes indirectes sont différentes et faibles en comparaison avec celles observées chez les espèces allogames *Pinus taeda* L. :  $Nm_s = 1,870$  et  $Nm_w = 5,90$  (AL-RABAB'AH et WILLIAMS, 2002) et *Hibiscus moscheutos* L. :  $Nm_w = 3,12-8,08$  (KUDOH et WHIGHAM, 1997). Par ailleurs, les niveaux de nombre de migrants par génération et par population obtenus chez *P. lunatus* var *silvester* corroborent les conclusions d'investigations antérieures sur plusieurs facteurs en rapport avec le flux de gènes : (i) la distance maximale de dispersion des grains de pollen par *Apis mellifera*, le principal pollinisateur des populations du haricot de Lima est de 5,5 m (HARDY et al., 1997) ; (ii) la gravité entraîne une dispersion maximale des graines de 2,5 m tandis que la croissance végétative des plantes entraîne une dispersion des fleurs de 6,5 m (JANART, 1996) et (iii) l'allofécondation déterminée par ZORO BI (1999) grâce aux marqueurs enzymatiques est de 10 %.

La conséquence de telles valeurs de nombre de migrants par population et par génération entre les populations sauvages et de caractéristiques biologiques de la plante ou des populations est de contribuer à une forte différenciation génétique entre les populations et ce d'autant plus qu'il doit exister en leur sein une forte dérive génétique compte tenu du nombre réduit d'individus par



population. En effet, 70 % des populations comportent moins de 5 plantes et seulement 15 % possèdent plus de 50 plantes (DEGREEF *et al.*, 1997). Toutefois, les effets différenciateurs de niveaux faibles à moyens de nombre de migrants par population et par génération entre les populations sauvages du haricot de Lima et d'une forte dérive génétique en leur sein peuvent être temporisés par l'apport d'allèles nouveaux qui proviendraient d'individus issus de la réserve en graines du sol. L'existence d'une très grande divergence génétique entre les populations sauvages de *P. lunatus* et d'un niveau de migrants par population faible à moyen entre elles suggère que la population pourrait servir de base pour une conservation *in situ*.

L'absence de structure génétique pourrait s'expliquer par le fait que la méthode utilisant la différenciation génétique ( $F_{ST}$ ) n'est pas sensible aux faibles variations dans la fréquence des gènes (SORK *et al.*, 1999) ou à l'origine des populations étudiées, toutes restreintes à la vallée centrale du Costa Rica. Compte tenu du fait que l'habitat naturel des populations sauvages du haricot de Lima subit une forte pression démographique et une intensification de l'agriculture, il importe de mener une conservation *ex situ* couplée avec une conservation *in situ*.

## Conclusion

Les populations sauvages du haricot de Lima dans la vallée centrale du Costa Rica, les plus menacées de disparition devront faire l'objet de collecte de graines pour une conservation *ex situ*. Puis, dans chacune des régions climatiques représentatives de la vallée centrale, des réserves génétiques qui abritent le maximum de grandes populations devraient être constituées pour une conservation *in situ*. Dans ces sites protégés en concertation avec les habitants et les autorités administratives, on pourrait introduire des populations menacées, originaires de la même zone climatique. L'introduction de ces populations et leur maintien *in situ* contribueront à la préservation de l'intégrité génétique et à la capacité d'adaptation de la forme sauvage du haricot de Lima dans son écosystème.

Une étude sur la diversité et la structure génétique de la réserve en graines du sol fournirait des indications précieuses sur son rôle de réserve génétique. De plus, une mesure directe du flux de gènes complémentaire à l'estimation indirecte du flux de gènes pourrait être menée grâce à une analyse de parenté en utilisant les marqueurs microsatellites puisque des feuilles (génotype maternel) et des graines (descendance) sont disponibles pour plusieurs individus.

## Remerciements

Les auteurs remercient le Pr Oscar Rocha et son équipe de l'*Escuela de Biología* de l'Université du Costa Rica qui ont efficacement collaboré à la collecte des échantillons de *P. lunatus* et la Communauté Française de Belgique pour avoir pourvu à la bourse de voyage. Ils adressent leurs remerciements à la Direction Générale de la Coopération au Développement (DGCD) de la Belgique et au Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (CNRST) du Burkina Faso qui ont assuré le financement de la formation. Le premier auteur réitère ses remerciements au Pr G. Konaté de l'Institut de l'environnement et de recherches agricoles du Burkina Faso pour ses commentaires, suggestions et critiques du manuscrit.

## Références citées

- ALLPHIN L., WINDHAM M.D. et HARPER K.T., 1998.** Genetic diversity and gene flow in the endangered bear poppy, *Arctomecon humilis* (Papaveraceae). *American Journal of Botany*, (85): 1251-1261.
- AL-RABAB'AH M.A. et WILLIAMS C.G., 2002.** Population dynamics of *Pinus taeda* L. based on nuclear microsatellites. *Forest Ecology Management*, (163): 263-271.
- BAUDOIN J.-P., 1991.** La culture et l'amélioration de la légumineuse alimentaire *Phaseolus lunatus* L. en zones tropicales. Faculté universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgium and Centre Technique Agricole, Wageningen, The Netherlands, 191 p.
- DEGREEF J., BAUDOIN J.-P. et ROCHA O.J., 1997.** Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation. 2. *Demography of wild Lima populations in the Central Valley of Costa Rica. Genetic Resources and Crop Evolution*, (44): 429-438.
- GOUDET J., 1995.** Fstat (ver 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, (86): 485-486.
- HARDY O. et VEKEMANS X., 2002.** SPAGeDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, (2): 618-620.
- HARDY O.J., DUBOIS S., ZORO BI I. et BAUDOIN J.-P., 1997.** Gene dispersal and its consequences on the genetic structure of wild populations of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) au Costa Rica. *Plant Genetic Resources Newsletter*, (109): 1-6.
- HUTH M.K. et HUTH H.W., 2001.** Genetic diversity and population structure of wild lentil tare. *Crop Science*, (41): 1940-1946.
- JANART F., 1996.** Impact du développement végétatif et de la dispersion des graines sur le flux génique au sein des populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. dans la vallée centrale du Costa Rica. Travail de Fin d'Etude. Faculté Universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgique 76 p.
- KUDOH H. et WHIGHAM D.F., 1997.** Microgeographic genetic structure and gene flow in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae). *American Journal of Botany*, (84): 1285-1293.
- MASUMBUKO B., 1999.** Etude du flux génique et de la distribution spatiale des gènes chez les populations sauvages du haricot de Lima, *Phaseolus lunatus* L., originaires de la vallée centrale du Costa Rica. Travail de fin d'études. Faculté Universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgique 67 p.
- MAXTED N., FORD-LLOYD B.V. et HAWKES J.G., 1997.** Plant genetic conservation. The *in situ* approach. Chapman & Hall, London, England, 451 p.
- OUÉDRAOGO M., MAQUET A. et BAUDOIN J.-P., 2005.** Etude comparative de la diversité et de la structure génétique de populations sauvages de *Phaseolus lunatus* à l'aide des marqueurs enzymatiques et microsatellite dans la vallée centrale du Costa Rica à l'aide des marqueurs enzymatiques et microsatellites. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2005 9 (3), 195-205.
- RAYMOND R. et ROUSSET F., 1995.** GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, (86): 248-249.
- ROCHA O.J., MACAYA G. et BAUDOIN J.-P., 1997.** Causes of local extinction and recolonization, determined by 3 years of monitoring wild populations of *Phaseolus lunatus* L. in the Central Valley of Costa Rica. *Plant Genetic Resources Newsletter*, (112): 44-48.
- SLATKIN M., 1985.** Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, (16): 393-430.
- SLATKIN M., 1987.** Gene and geographic structure of natural populations. *Science*, (236): 787-792.
- SLATKIN M. et BARTON N.H., 1989.** A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, (43): 1349-1368.



**SOKAL R.R. et ROHLF F.J., 1998.** Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. W. H. Feeman and Company, State University of New York, 887 p.

**SORK V.L., NASON J., CAMPBELL D.R. et FERNANDEZ J.F., 1999.** Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Tree*, (14): 219-224.

**WRIGHT S., 1931.** Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, (16): 97-159.

**WRIGHT S., 1951.** The genetical structure of population. *Annals of Eugenetics*, (15): 325-354.

**ZORO BI I., 1999.** Variabilité génétique des populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. dans la vallée centrale du Costa Rica et ses implications dans la mise au point d'une stratégie de conservation *in situ*. Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique 194 p.

**ZORO BI I., MAQUET A., WATHELET B. et BAUDOIN J.-P., 1999.** Genetic control of isozymes in the primary gene pool *Phaseolus lunatus* L. *Biotechnologie Agronomie Société Environnement*, (3): 10-27.