

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES IGNAME SAUVAGES DU SUD DE MADAGASCAR A L'AIDE DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES AFLP

Hanitra V. ANDRIAMAMPANDRY*, Cédric MARIAC**,
Pierre SIRE**, MOUSSA**, Serge TOSTAIN***

* DRFP, FOFIFA Antananarivo (Madagascar), vivi_hanitra@yahoo.fr ;

** Unité mixte de recherche Diversité et Adaptation des Plantes Cultivées (UMR DIAPC), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Niamey, Niger, cedric.mariac@ird.fr ;

*** Unité mixte de recherche Diversité et Adaptation des Plantes Cultivées (UMR DIAPC), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, serge.tostain@ird.fr

RÉSUMÉ

Classées parmi les cinq plantes sauvages apparentées aux plantes cultivées prioritaires du projet PNUE/FEM/CWR « Conservation *in situ* des parents sauvages des plantes cultivées grâce à une meilleure gestion de l'information et à des applications sur le terrain », les ignames sauvages du genre *Dioscorea* de Madagascar jouent un rôle important dans le monde rural Malgache. Aliment de soudure, elles constituent aussi une source monétaire pour les paysans. Madagascar possède une quarantaine d'espèces d'ignames sauvages réparties dans différents écosystèmes. En 2006 des travaux axés sur l'étude des ignames sauvages rencontrées dans le Sud de Madagascar ont été initiés avec pour objectifs de « développer des connaissances botanique, ethnobotanique, génétique sur les ignames sauvages et de contribuer à leur valorisation économique et conservation *in situ* ». L'article décrit les résultats d'une étude réalisée sur quatorze espèces d'ignames sauvages rencontrées et récoltées au Sud. L'analyse des ADN nucléaires avec des marqueurs AFLP (amplified fragment-length polymorphism) met en évidence 67 marqueurs moléculaires polymorphes. La richesse génétique dans le sud est donc élevée. L'étude phylogénétique a permis d'établir un arbre consensus montrant cinq groupes de parenté. Face aux changements climatiques, écologiques et socio-éco-culturelles, le rythme d'exploitation des ignames sauvages est alarmant. La présente étude fournit des éléments pour établir une stratégie de conservation « *in situ* » de ces ressources phylogénétiques.

Mots clés : *Dioscorea*, AFLP, Sud de Madagascar, relation génétique, ressources phylogénétiques.

1 ANDRIAMAMPANDRY H.V., MARIAC C., SIRE P., MOUSSA, TOSTAIN S. 2010. Mise en évidence d'une structure génétique des ignames sauvages du Sud de madagascar à l'aide des marqueurs moléculaires (AFLP). Dans : Les ignames malgaches, une ressource à préserver et à valoriser. Actes du colloque de Toliara, Madagascar, 29-31 juillet 2009. Tostain S., Rejo-Fienena F. (eds). Pp. 87-97.

1. INTRODUCTION

Madagascar compte environ quarante espèces d'ignames sauvages, soit le dixième de ce que comporte actuellement le genre *Dioscorea* dans l'ensemble du monde (JEANNODA *et al.*, 2004) toutes à tubercules comestibles cuites ou crues. Récemment, quatre espèces du genre *Dioscorea* ont été identifiées : *D. bosseri*, *D. namorokensis*, *D. sterilis* et *D. bako* (WILKIN *et al.*, 2000 ; HAIGH *et al.*, 2005 ; WEBER *et al.*, 2005 ; WILKIN *et al.*, 2005 ; WILKIN *et al.*, 2008). De nombreux travaux restent encore à faire sur la détermination botanique des ignames sauvages de Madagascar. Dans le sud, l'igname joue un rôle important dans l'alimentation des populations rurales surtout en période de soudure et constitue un complément aux céréales riz et maïs ainsi qu'au manioc et la patate douce. « *Les ignames ne constituent pas seulement une nourriture. La multiplicité et la diversité des substances actives qu'elles renferment leur confèrent des propriétés exploitées empiriquement à des fins utiles* ». (JEANNODA *et al.*, 2007). L'habitat de ces ignames sauvages est de plus en plus menacé alors qu'ils constituent un réservoir de ressources génétiques. Elles peuvent enrichir le pool génétique primaire ou secondaire des ignames cultivées bien que l'ennoblissement des ignames sauvages reste négligé par les paysans malgaches. Une meilleure connaissance de leur diversité génétique s'avère indispensable. Le questionnement de la présente étude est : Comment sont structurées génétiquement les ignames rencontrées dans le sud de Madagascar ? Cette étude vise donc les relations génétiques entre les ignames du Sud de Madagascar, afin de promouvoir un programme de recherche sur la conservation *in situ* et *ex situ*.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODE

2.1. Milieu physique

La zone d'étude se trouve dans la partie sud ouest de l'île (figure 1). C'est une zone pastorale où le feu agit chaque année, caractérisée par une longue période sèche et un faible taux de couverture forestière.

2.2. Matériel végétal

Suivant les descriptions botaniques (BURKILL et PERRIER DE LA BÂTHIE, 1950) des échantillons fertiles : graines et bulbilles de 18 populations, des 14 espèces d'ignames sauvages du Sud : *D. alatipes*, *D. angily*, *D. antaly*, *D. bemandry*, *D. bemarivensis*, *D. bulbifera*, *D. fandra*, *D. hambuka*, *D. maciba*, *D. quartiniana*, *D. sansibarensis*, *D. soso*, *D. trichantha* et une espèce non encore déterminée botaniquement, connue localement sous le nom de « *Balo* » (*D. sp Balo*), ont été collectés dans cette région (tableau 1) de 2005 à 2007. Afin de pouvoir disposer des feuilles fraîches destinées à l'extraction d'ADN, ces graines et/ou bulbilles sont ensuite plantées en serre ou mise à

2.3.2 Analyse AFLP

La méthode décrite par Vos et al (1995) a été utilisée. L'ADN total (400 ng) a été digéré avec *EcoRI* (5U) et *TruI* (5U) dans une solution de Y+/Tango (MBI Fermentas). La ligation a été réalisée avec les adaptateurs Eco RI (0,1µM) et les adaptateurs TruI (1µM) avec T4 ligase (2U, MBI Fermentas) dans leurs milieux de réaction 1 X. La préamplification a été réalisée à l'aide de la réaction de polymérisation en chaîne de 1 cycle 94°C, 3 min ; 19 cycles 94°C, 30 s ; 56°C, 30s ; 72°C, 1 min. utilisant des amorces, 200 µM dNTPs, 0.200 U de *Taq* IRD, 1 mM de MgCl₂, 0.1 µM de EPA et 0.1 µM de MPA. L'amorce EcoRI a été marqué à l'aide d'un marqueur fluorescent (IRDye 700 nm), Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Trente sept cycles d'amplifications spécifiques ont été réalisés selon le programme suivant : 92°C, 30s ; 65°C, 30s ; - 0,7°C par cycle ; 72°C, 1min pour 12 cycles, puis 94°C, 30 s ; 56°C, 30 s ; 72°C, 1 min pour 25 cycles. Le milieu de réaction est composé de 1.0µM de M-CTG, de 0.2 µM de E-ACA, de 370 µM de dNTP, de 0,2U de *Taq* IRD, 1X e tampon GoTaq et de 0,5 mM de MgCl₂. Les amplifiats ont été séparés sur un gel de polyacrylamide (6,5%) avec un séquenceur automatique Li-Cor IR2 (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). La lecture a été faite avec le logiciel Quantar (figure 2). Seules les bandes polymorphes AFLP retrouvées sur les gels ont été prises en considération et codées 0 (absence) et 1 (présence). Les données sont par la suite transformées en distance génétique avec Powermarker. Le logiciel Phylip construit à partir de ces distances un arbre consensus (Neighbor-joining) avec des valeurs de bootstrap. Les autres analyses statistiques (Analyse en composantes principales (ACP) et classification ascendante hiérarchique, CAH) sont effectuées avec les logiciels Statistica et XLSTAT.

Tableau 1 : Liste des 14 espèces étudiées avec leurs sections d'après Burkill et Perrier de la Bâthie (1950). Les longitudes et latitudes en WGS 84 au format de position décimal (hddd.ddddd) ont été déterminées avec un GPS Garmin 72.

| Espèces | Nom vernaculaire | Sections | Coordonnées | | N° de collecte | Nombre de plantes | Localités |
|-------------------------|------------------|-----------------|-------------|----------|----------------|-------------------|------------------------------|
| | | | Long. Est | Lat. Sud | | | |
| <i>D. alatipes</i> | Oviala | Brachyandra | 43°86 | 23°35 | 2081 | 1 | Près de Befoly Sur la RN7 |
| | | | 43°81 | 23°41 | 2133 | 8 | |
| | | | | | 2134 | 1 | |
| <i>D. antaly</i> | Antaly | Xylinocapsa | 44°67 | 22°62 | 2154 | 19 | Andranolava |
| <i>D. bemandry</i> | Babo | Brachyandra | 43°61 | 22°53 | 2092 | 6 | Ampasikibo |
| <i>D. bemarivensis</i> | Trengitrengy | Cardiocapsa | 43°86 | 23°35 | 2084 | 1 | Près de Befoly |
| | | | 44°94 | 22°05 | 2112 | 14 | Morafeno |
| | | | 44°93 | 24°05 | 2204 | 6 | Près de Beroroha |
| <i>D. bulbifera</i> | Hofika | Opsophyton | 47°54 | 18°92 | - | 2 | Antananarivo |
| <i>D. fandra</i> | Fandra | Brachyandra | 43°87 | 23°34 | 2120 | 4 | Sur la RN7 |
| <i>D. hombuka</i> | Kato | Brachyandra | 44°33 | 22°98 | 2131 | 4 | Andranomihamiky |
| <i>D. maciba</i> | Masiba | Campanuliflorae | 46°28 | 22°30 | 2066 | 1 | Ihosal |
| | | | 43°61 | 22°60 | 2110 | 5 | Antilavabe |
| <i>D. oviala</i> | Angily | Pachycapsa | 43°61 | 22°60 | 2108 | 21 | Antilavabe |
| <i>D. quartiniana</i> | - | Lasiophyton | 44°52 | 22°26 | 2205 | 7 | Ankazoabo |
| <i>D. sansibarensis</i> | Veoveo | Macrourea | 44°50 | 23.50 | - | 2 | Bezaha |
| <i>D. soso</i> | Soso | Brachyandra | 43°93 | 23°32 | 2103 | 7 | Befoly |
| <i>D. sp</i> | Balo | Brachyandra | 43°61 | 23°10 | 2068 | 1 | Mangily |
| | | | 43°60 | 22°52 | 2087 | 7 | Ampasikibo |
| <i>D. trichantha</i> | Fisadamby | Brachyandra | 44°69 | 22°34 | 2209 | 2 | Près d'Ankazoabo |

3. RÉSULTATS

3.1 La sélection des marqueurs AFLP

Huit échantillons d'ADN de cinq espèces différentes : *D. alatipes* (« Oviala »), *D. bemarivensis* (« Trengitrengy »), *D. sp* (« Balo »), *D. antaly* (« Antaly »), *D. ovinala* (« Angily ») ont été utilisées pour tester 16 combinaisons. Seule la combinaison d'amorces **AM 7 (E-ACA / M-CTG)** a été sélectionnée pour les analyses. Les AFLP réalisées avec ce couple sur les 119 échantillons d'ADN de *Dioscorea* sp.. ont généré 69 niveaux de bande dont 67 polymorphes. Ces bandes ont été retenues pour les analyses statistiques. Le nombre total de bandes par espèce varie de 6 à 43. Le taux de polymorphisme par espèce varie de 100% à 0% (tableau 2). Un taux de polymorphisme élevé a été enregistré avec *D. ovinala*, bien que les individus soient d'une même descendance (43 bandes contre 69). Aucune bande polymorphe n'est enregistrée avec les plantes de *D. trichantha* (tableau 2).

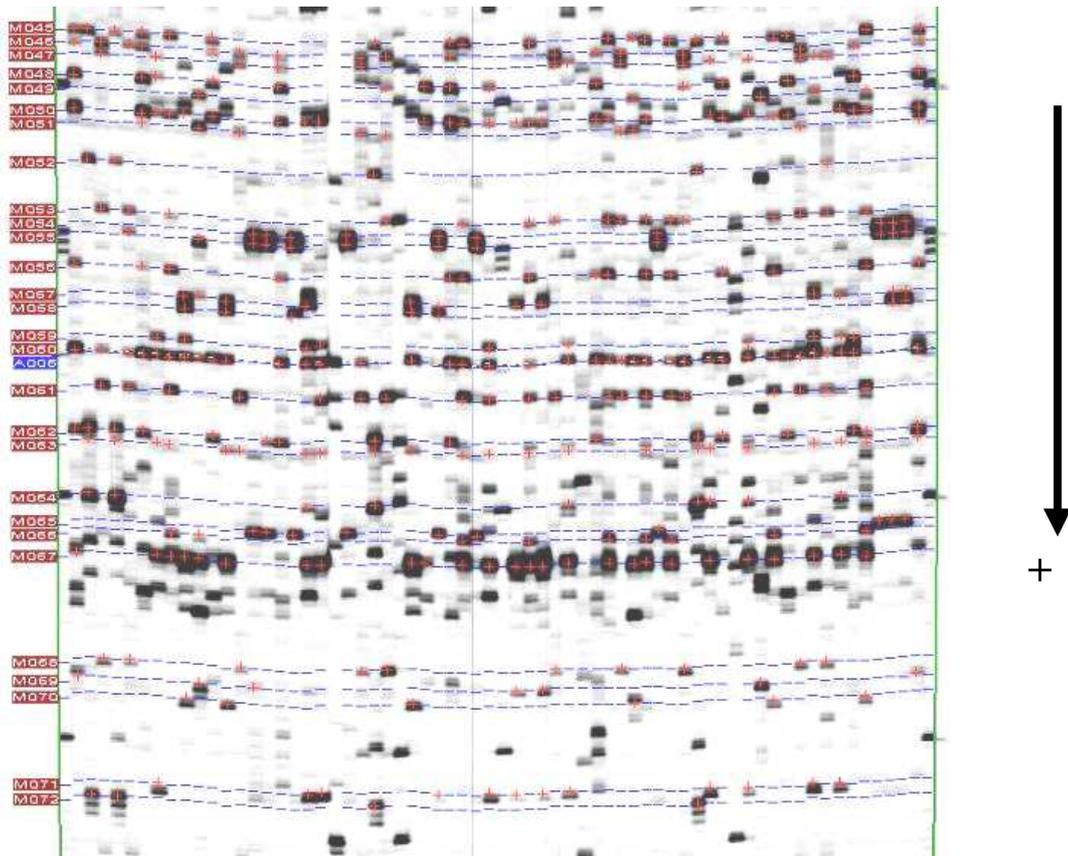


Figure 2 : Photo d'un gel de polyacrylamide avec les différentes bandes AFLP. Le gel a trié les fragments d'ADN monocaténaire suivant leur taille. L'alignement des bandes est souligné par le logiciel Quantar.

Tableau 2 : Polymorphisme des bandes AFLP par espèce.

| Espèces | Nombre de population | Total bandes | Bandes communes | Bandes polymorphes | % des bandes polymorphes |
|-------------------------|----------------------|--------------|-----------------|--------------------|--------------------------|
| <i>D. alatipes</i> | 3 | 41 | 3 | 38 | 93 |
| <i>D. antaly</i> | 1 | 32 | 3 | 29 | 91 |
| <i>D. bemandry</i> | 1 | 29 | 11 | 18 | 62 |
| <i>D. bemarivensis</i> | 2 | 40 | 5 | 35 | 87 |
| <i>D. bulbifera</i> | 1 | 6 | 1 | 5 | 83 |
| <i>D. fandra</i> | 1 | 27 | 14 | 13 | 48 |
| <i>D. hambuka</i> | 1 | 18 | 6 | 12 | 67 |
| <i>D. maciba</i> | 2 | 25 | 9 | 16 | 64 |
| <i>D. ovinala</i> | 1 | 43 | 0 | 43 | 100 |
| <i>D. quartiniana</i> | 1 | 17 | 8 | 9 | 53 |
| <i>D. sansibarensis</i> | 1 | 11 | 2 | 9 | 82 |
| <i>D. soso</i> | 1 | 31 | 11 | 20 | 64 |
| <i>D. sp balo</i> | 2 | 29 | 8 | 21 | 72 |
| <i>D. trichantha</i> | 1 | 9 | 9 | 0 | 0 |

3.2 L'analyse multivariée. Structuration en groupes

3.2.1 L'analyse en composantes principales (ACP)

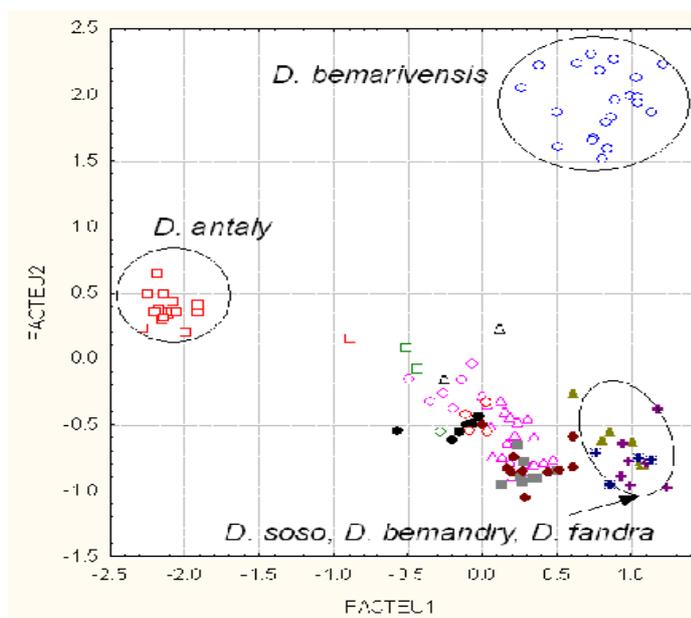


Figure 3 : Axes 1 et 2 de l'analyse en composantes principales de la diversité des bandes AFLP par Statistica.

L'analyse en composantes principales distinguent 4 grands groupes (figure 3) : *D. antaly* (figure 4), *D. bemarivensis* (figure 5), *D. fandra*, *D. soso*, *D. bemandry* (figure 6) et les autres espèces dont *D. alatipes* (figure 7). Ces dernières ont des tubercules à chair blanche, ont un bon goût et ne nécessitent pas de traitements particuliers (simple cuisson). Leurs lianes ont des feuilles simples avec un nombre de nervures supérieur ou égale à sept.



Figure 4 : *D. antaly* (photos Tostain S.)



Figure 5 : *D. bemarivensis* (photos Tostain S.).



Figure 6 : *D. bemandry* (photo Damson S.).



Figure 7 : *D. alatipes* (photos Tostain S.)

3.2.2 La classification ascendante hiérarchisée (CAH)

La CAH effectuée avec l'ensemble des niveaux de bande AFLP par le logiciel XLSTAT montre une structuration de la diversité entre les quatorze espèces étudiées. Quatre groupes ont été identifiés (figure 8) :

- le premier groupe, **G I**, est formé par des individus appartenant à *D. antaly* classée dans la section *Xylinocapsa*. Cette espèce possède un tubercule ramifié (figure 2) et pousse dans des sols alluvionnaires.

Le tubercule a un goût astringent et n'est consommé qu'en période de disette, après détoxification. C'est la seule espèce toxique malgache (JEANNODA et al., 2004).

- le deuxième groupe, **G II**, contient les individus appartenant à *D. bemarivensis* endémique de la section *Cardiocapsa*. La section *Cardiocapsa* a une espèce aux Seychelles et quatre espèces à Madagascar dont *Trengitrengy*, caractérisée par de nombreux tubercules arrondis, des feuilles composées, des fruits ronds et une aile entourant la graine.

- le troisième groupe, **G III**, est formé par des individus appartenant à deux espèces non endémiques, *D. quartiniana* de la section *Lasiophyton* et *D. bulbifera* de la section *Opsophyton*.

- le dernier groupe, **G IV**, regroupe des individus appartenant à *D. sansibarensis*, *D. ovinala* et *D. maciba* (endémiques). *D. sansibarensis* de la section *Macrourea* est une espèce commune à bulbille très toxique et amère. Le tubercule est aussi très toxique mais parfois consommé après une longue préparation.

3.3 Relation phylogénétique entre les ignames sauvages de Madagascar

L'agencement des branches de l'arbre de consensus non enraciné permet d'identifier trois groupes (figure 9). L'arbre de Neighbor-Joining met en évidence l'affinité de *D. sansibarensis* au groupe des autres espèces non malgaches ainsi que *D. antaly*. *D. antaly* aurait des origines polyphylétiques

(WILKIN *et al.*, 2005). Dans cette analyse, *D. bemarivensis* ne se sépare pas des autres ignames malgaches contrairement à la CAH et l'ACP. Elle n'aurait pas de liaison de parenté avec les autres espèces sauvages paléotropicales à feuilles composées (WILKIN et CADDICK, 2000).

Bien que le nombre de bande AFLP obtenu chez *D. alatipes* et chez *D. sp (Balo)* soit différent, 41 bandes polymorphes pour le premier contre 29 pour le second (tableau 2), ces deux espèces semblent être génétiquement très proche. Il est probable que *D. sp (Balo)* appartienne à la section *Brachyandra* Unline comme *D. alatipes*.

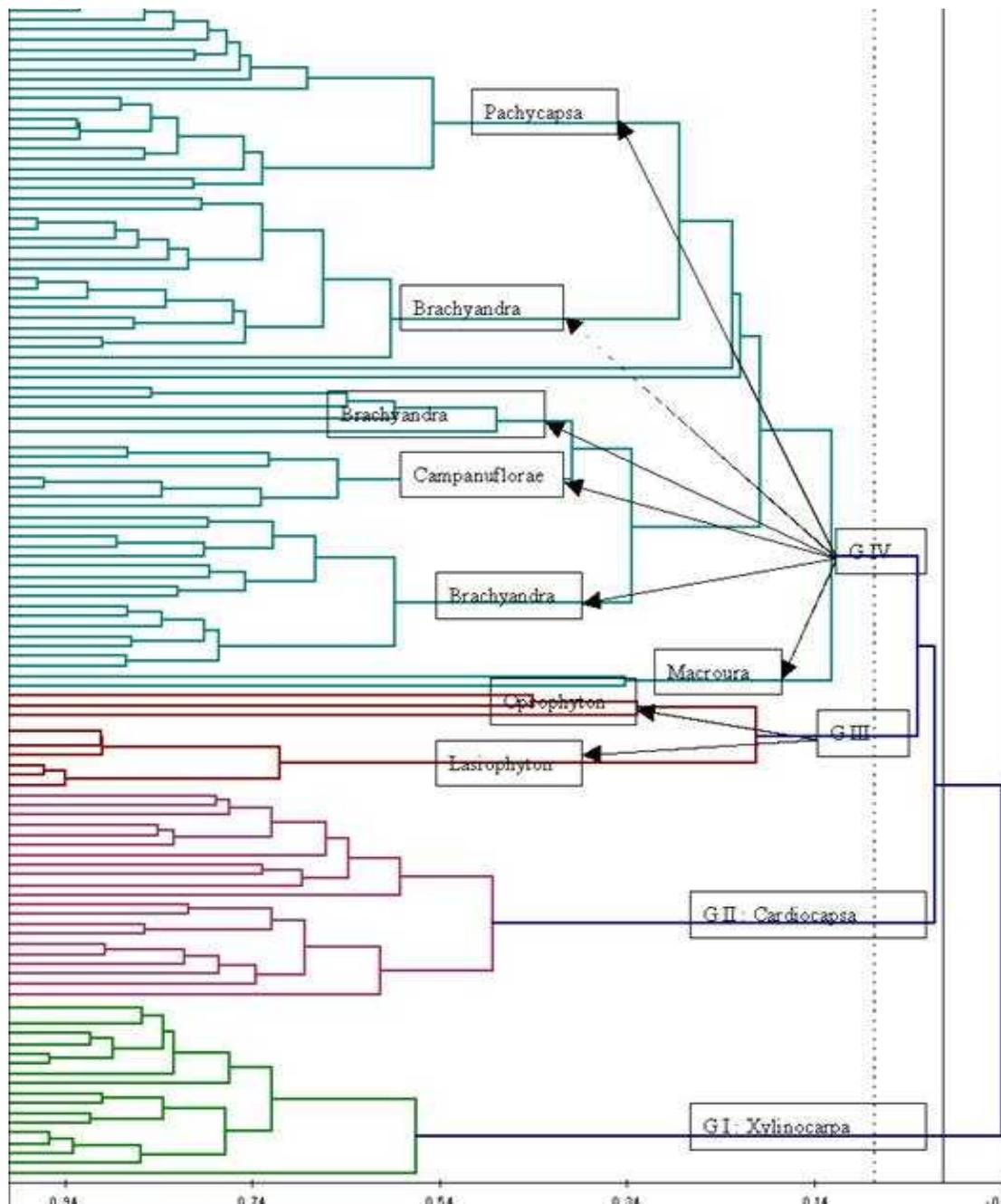


Figure 8 : Classification ascendante hiérarchique, CAH, des 119 plantes de 14 espèces (logiciel XLSTAT).

Les espèces *D. bemandry* et *D. soso* présentent une différence génétique sur l'arbre de Neighbor-joining (figure 9) bien qu'étant dans un même groupe.

Il existe une grande homologie anatomique entre ces deux espèces (RAJAONAH, 2004). *D. soso* serait plus proche de *D. fandra* que de *D. bemandry* (figure 9). Pourtant *D. fandra* se trouve sur des sols calcaires tandis que *D. soso* se trouve sur des sols plutôt sableux (TOSTAIN, 2009). La forme des feuilles les différencient également.

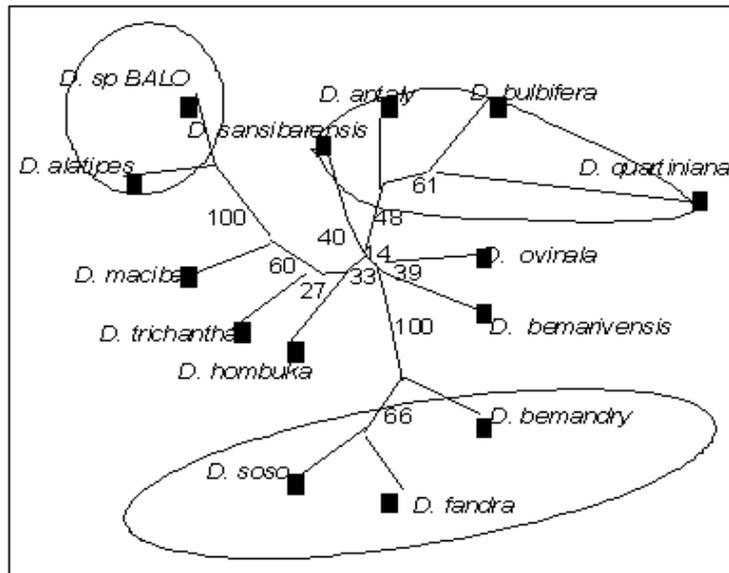


Figure 9 : Arbre de parcimonie non enraciné (méthode du « Neighbor- Joining »). Les chiffres représentent les pourcentages des branches observées après 100 analyses indépendantes (méthode du « bootstrap »).

CONCLUSION

Les résultats obtenus sont préliminaires. D'autres études sont nécessaires avec de nouveaux marqueurs AFLP et microsatellites pour les confirmer. Les AFLP, par leur nombre important de bandes sont des marqueurs intéressants. Un seul couple d'amorces AFLP n'évalue en principe, qu'un faible potentiel génétique. Malgré tout, on arrive à identifier des groupes et à établir une structure génétique des ignames sauvages rencontrées dans le sud de Madagascar. Plusieurs couples d'amorces, avec encore plus de bandes, seraient utiles pour étudier les relations entre populations d'espèces différentes et pour confirmer la grande diversité morphologique des ignames malgaches. *Balo* semble être un écotype de *D. alatipes* adaptée aux sols sableux. Concernant *D. soso* et *D. bemandry* ces deux espèces sont génétiquement différentes mais se trouvent dans un même groupe avec *D. fandra*.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée en septembre et octobre 2007 au cours d'un stage aux Centres de l'Institut de Recherche pour le Développement à Montpellier et à Niamey (Bourse de Formation Continue,

IRD) dans le cadre du programme « Oviata du sud de Madagascar » du FOFIFA, l'Université de Toliara et l'IRD. Nous tenons à remercier M. Couderc, C. Mariac, Y. Vigouroux, G. Bezançon, P. Sire, et Moussa.

BIBLIOGRAPHIE

ALBERTINI E., PORCEDDU A., MARCONI G., BARCACCIA G., PALLOTTINI L., FALCINELLI M. 2003. Microsatellite – AFLP for genetic mapping of complex polyploids. *Genome* 46: 824-832.

BURKILL I.H., PERRIER DE LA BATHIE H. 1950. 44ème famille : Dioscoréacées (Dioscoreaceae) In: Flore de Madagascar et des Comores (Plantes vasculaires). H. Humbert (Ed.), Typographie Firmin-Didot, Paris, France. Pp. 1-78.

CADDICK L.R., RUDALL P.J., WILKIN P., HEDDERSON T.A.J., CHASE M.W. 2002. Phylogenetics of Dioscoreales based on combined analyses of morphological and molecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 138: 123–144.

De VIENNE D. 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA, Paris. 200 p.

HAIGH A., WILKIN P., RAKOTNASOLO F. 2005. A new species of *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae) from western Madagascar and its distribution and conservation status. *Kew Bulletin* 60: 273–281.

JEANNODA V., JEANNODA V.H., HLADICK A., HLADICK C.M. 2004. Les ignames de Madagascar. Diversité, utilisations et perceptions. *Hommes & Plantes* 47 : 10-23.

JEANNODA V.H., RAZANAMPARANY J.L., RAJAONAH M.T., MONNEUSE M.O., HLADIK A., HLADIK C.M. 2007. Les ignames (*Dioscorea* spp.) de Madagascar : espèces endémiques et formes introduites ; diversité, perception, valeur nutritionnelle et systèmes de gestion durable. *Rev. Ecol. (Terre Vie)* 62 : 191-207.

MIGNOUNA H.D., MANK R.A., ELLIS T.H.N., VAN DEN BOSCH N., ASIEDU R., NG S. Y.C., PELEMAN J. 2002. A genetic linkage map of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) based on AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 105: 716-725.

RAJAONAH M.T. 2004 Études biologique, anatomique et ethnobotanique des espèces de *Dioscorea* (Dioscoreaceae) dans la région de Menabe. Mémoire de DEA Écologie Végétale, Faculté des Sciences, Antananarivo. 115 p.

SCARCELLI N. 2005. Structure et dynamique de la diversité d'une plante cultivée à multiplication végétative : le cas des ignames au Bénin (*Dioscorea* sp.). PhD, Université Montpellier II. 180 p.

SCHOLS P., WILKIN P., FURNESS C.A., HUYSMANS S., SMETS E. 2005. Pollen evolution

in yams (*Dioscorea*: Dioscoreaceae). Systematic Botany 30: 750–758.

TAMIRU M., BECKER H.C., MAASS B.L. 2007. Genetic Diversity in yam germplasm from Ethiopia and their relatedness to the main cultivated *Dioscorea* species assessed by AFLP markers. Crop Science 47: 1744-1753.

TOSTAIN S. 2009. La biodiversité à Madagascar. Les ignames sauvages du sud. Université de Toliara-IRD.124 p.

TOSTAIN S., AGBANGLA C., DAÏNOU O. 2002. Les ignames *Dioscorea abyssinica* et *D. praehensilis* en Afrique de l'Ouest. Diversité génétique estimée par des marqueurs AFLP. Annales des Sciences Agronomique du Bénin 3 : 1-20.

VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., LEE T. VAN DE, HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.

WEBER O., WILKIN P., RAKOTONASOLO F. 2005. A new species of edible yam (*Dioscorea* L.) from western Madagascar. Kew Bulletin 60: 283–291.

WILKIN P., CADDICK L. 2000. Palaeotropical compound leaved yams (*Dioscorea*, Dioscoreaceae): monophyly and relationship. Monocots : systematics and evolution symposium, Sydney 1998. Pp 497-504.

WILKIN P., CADDICK L., FOSTER C., SCHOLS P. 2000. A new species of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) from Eastern Madagascar and its pollen morphology. Kew Bulletin 55: 427–434.

WILKIN P., SCHOLS P., CHASE M.W., CHAYAMARIT K., FURNESS C.A., HUYSMANS S., RAKOTONASOLO F., SMETS E., THAPYAI C. 2005. A plastid gene phylogeny of the yam genus, *Dioscorea*: Roots, Fruits and Madagascar. Systematic Botany 30: 736–749.

WILKIN P., RAJAONAH M.T., JEANNODA V.H, HLADIK A., JEANNODA V., HLADIK C.M. 2008. An endangered new species of edible yam (*Dioscorea*, Dioscoreaceae) from Western Madagascar and its conservation. Kew Bulletin 63: 113–120.