

# CONTRIBUTION À LA PHYLOGÉNIE DES IGNAME MALGACHES (*DIOSCOREA* SP.) À L'AIDE DU POLYMORPHISME DE TROIS SÉQUENCES D'ADN CHLOROPLASTIQUES INTERGÉNIQUES

Serge TOSTAIN\*, Hanitra V. ANDRIAMAMPANDRY \*\*, Jean-Christophe PINTAUD\*,  
Jean-Louis PHAM\*

\* : Unité mixte de recherche DIAPC, Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Montpellier, France, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5 ; [serge.tostain@ird.fr](mailto:serge.tostain@ird.fr), [jean-christophe.pintaud@ird.fr](mailto:jean-christophe.pintaud@ird.fr), [jean-louis.pham@ird.fr](mailto:jean-louis.pham@ird.fr) ;

\*\* : Département de Recherches Forestières et Piscicoles du FOFIFA (DRFP), FOFIFA Antananarivo (Madagascar) ; [vivi\\_hanitra@yahoo.fr](mailto:vivi_hanitra@yahoo.fr)

## RÉSUMÉ

Comme dans beaucoup d'îles, la spéciation de nombreux genres animaux et végétaux a été active à Madagascar depuis sa séparation des continents africains et indiens. Parmi les monocotylédones, le genre *Dioscorea* est mal connu et de nouvelles espèces sont encore décrites dont plusieurs ont un intérêt nutritionnel et économique. La diversité des espaces intergéniques (« intergenic spacer » ou IGS) du génome chloroplastique de *Dioscorea*, récemment séquencé, a été utilisée pour des études phylogénétique. Trois IGS (*trnH - psbA*, *trnC - rpoB* et *trnD - trnT*) de 40 espèces ont été séquencés dont 15 espèces endémiques collectées dans le Sud-ouest de Madagascar (*D. alatipes*, *D. antaly*, *D. bemandry*, *D. bemarivensis*, *D. fandra*, *D. hambuka*, *D. maciba*, *D. ovinala*, *D. soso*, *D. trichantha* et *D. sp-Balo*). Les espèces *D. elephantipes* et *Trichopus sempervirens* ont été utilisées comme espèces extérieures (« outgroup »).

L'origine polyphylétique des ignames du Sud de Madagascar est confirmée. Les résultats obtenus montrent que les taxons malgaches botaniquement déterminées ou indéterminées sont regroupés à l'exception des espèces *D. antaly*, *D. nako* et *D. bemarivensis*. Les espèces *D. antaly*, *D. dumetorum*, *D. quartiniana* et *D. bulbifera* forment un groupe qui doit être confirmé par l'étude d'autres IGS. L'utilisation d'autres séquences d'IGS et de plusieurs accessions par espèces pourront en effet confirmer ces résultats préliminaires.

**Mots clés** : *Dioscorea*, Madagascar, phylogénie, IGS, chloroplaste

---

1 TOSTAIN S., ANDRIAMAMPANDRY H.V., PINTAUD J.-C., PHAM J.-L. 2010. Contribution à la phylogénie des ignames malgaches (*Dioscorea* sp.) à l'aide du polymorphisme de trois séquences d'ADN chloroplastiques intergéniques. 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. 98-107.

## INTRODUCTION

Les espèces du genre *Dioscorea* sont distribuées sur tous les continents. Madagascar, qui est la cinquième grande île avec 587 000 km<sup>2</sup>, posséderait 10% des espèces avec plus d'une quarantaine d'espèces de sept différentes sections (BURKILL et PERRIER de la BATHIE, 1950). De nouvelles espèces sont encore décrites par les botanistes dont deux en 2008, *D. bako* et *D. kimiae* (WILKIN *et al.*, 2008a ; WILKIN *et al.*, 2008b). La section *Brachyandra* Uline est la plus riche avec 13 espèces endémiques.

La diversité de deux gènes chloroplastiques connus pour leur polymorphisme, *rbcL* et *matK*, de 13 espèces dont huit communes à cette communication a été étudiée (WILKIN *et al.*, 2005). Les gènes non codant notamment ceux du génome chloroplastique, subiraient moins de contraintes sélectives et évolueraient plus vite que les gènes codant (KELCHNER, 2000). Ce sont donc des marqueurs intéressants pour des études de phylogénie au niveau spécifique (GIELLY et TABERLET, 1994). Le chromosome du chloroplaste de *D. elephantipes* a été séquencé en 2007 (HANSEN *et al.*, 2007), en particulier la courte séquence entre les gènes *psbA* et *trnH* souvent utilisée dans les études de phylogénie (ALDRICH *et al.*, 1988) ainsi que celle située entre les gènes *trnD* et *trnT* (LU *et al.*, 2001).

L'objectif de cette communication est de présenter les premiers résultats d'une étude sur la phylogénie des principales des espèces endémiques du Sud de Madagascar à l'aide du polymorphisme de séquence de trois gènes chloroplastiques non codant *psbA-trnH*, *trnC-rpoB* et *trnD-trnT* et sur les relations entre ces espèces et des espèces d'autres régions du monde.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *1. Matériel végétal*

Seize espèces de *Dioscorea* endémiques et une espèce de *Trichopus* (= *Avetra*) du Sud de Madagascar ont été étudiées dont *D. alatipes*, *D. antaly*, *D. bemandry*, *D. bemarivensis*, *D. fandra*, *D. heteropoda*, *D. hambuka*, *D. maciba*, *D. nako*, *D. ovinala*, *D. soso*, *D. trichantha* (tableau 1). Deux espèces malgaches ne sont pas endémiques : *D. quartiniana* et *D. sansibarensis*.

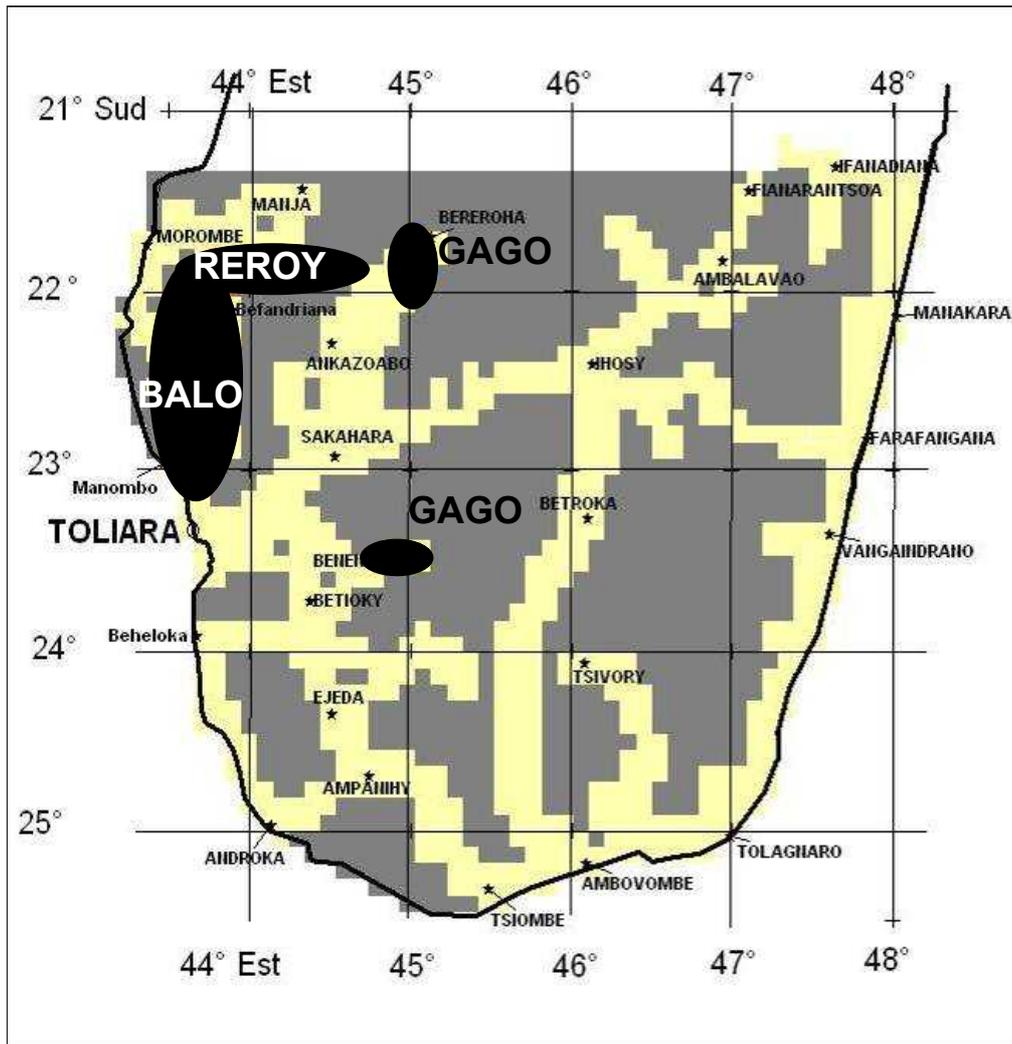


Figure 1 : Distribution géographique des quatre espèces non déterminées botaniquement (« Reroy », « Balo », « Gago » de Bereroha et « Gago » de Bénénitra). Les parties grisées représentent les zones non explorées.

Quatre ne sont pas déterminées botaniquement (désignées par leur nom vernaculaire local) dont deux sont proches morphologiquement de *D. alatipes* : *D. sp - Balo*, *D. sp - Gago* (accession Montpellier-IRD-2259), *D. sp Gago* et *D. sp Reroy* (figure 1). Elles ont été comparées avec dix espèces d’Afrique de l’Ouest, cinq d’Asie tropicale, une d’Asie tempérée (*D. opposita*), trois espèces d’Amérique du Sud, une d’Amérique du Nord (*D. villosa*) et deux espèces d’Europe, *D. communis* et *D. balcanica* (figure 2 ; tableau 1).

Les espèces étudiées ont été comparées soit avec *D. elephantipes* (L’Hér.) Engl., section Testudinaria soit avec *T. sempervirens* (espèces externes).

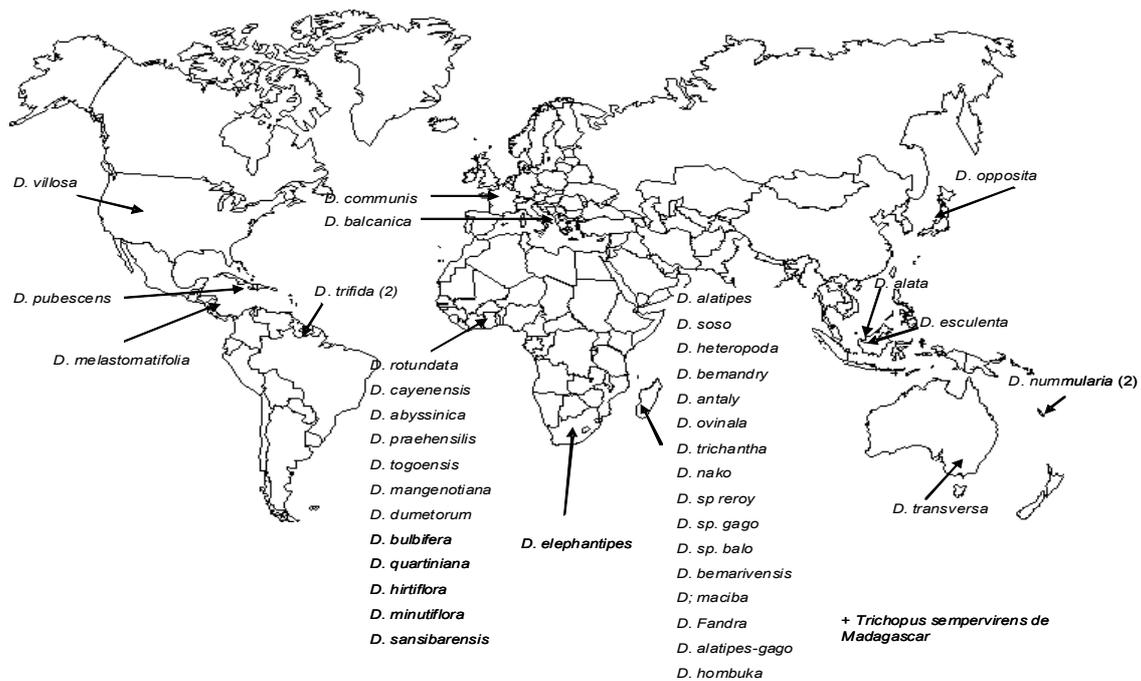
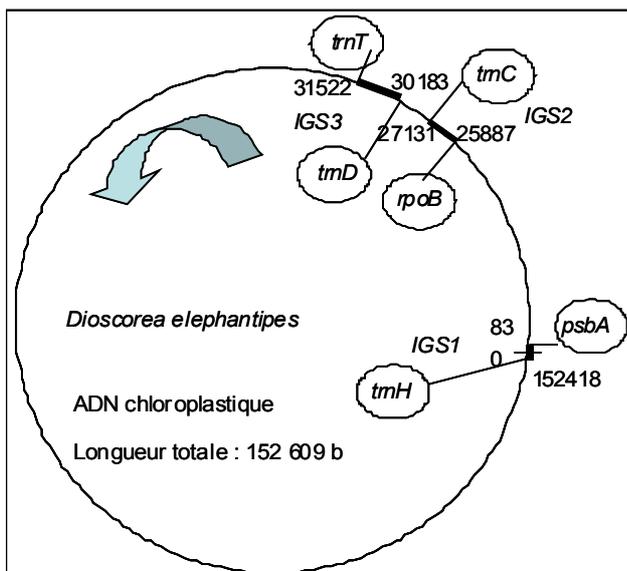


Figure 2 : Répartition géographique des espèces étudiées.



3b

3a

Figures 3. 3a -Position des six gènes encadrant les trois espaces intergéniques sélectionnés (IGS) sur la carte du génome chloroplastique de *Dioscorea* (HANSEN, *et al.* 2007). 3b-Exemple de séquence consensus (IGS1 de *D. villosa*).

Tableau 1 : Liste des 42 accessions étudiées par ordre alphabétique (40 espèces).

N°	Espèces	Sections botaniques	Origines	Localisation	Latitude	Longitude
1	<i>D. abyssinica</i> Hochst. & Knuth	Enantiophyllum Uline	1853	Gorobani, Bénin	10°23 N	2°32 E
2	<i>D. alata</i> L.	Enantiophyllum Uline	Ovy toko (bulbille)	Mangotroka, près Antanimieva, Madagascar	22°17 S	43°84 E
3	<i>D. alataipes</i> Burk. & Perr.	Brachyandra Uline	2133	Andatabo près Toliara, Madagascar	23°41 S	43°81 E
4	<i>D. sp var. Balo</i>	Brachyandra Uline	2087	RN9, Ampasikibo	22°52 S	43°60 E

N°	Espèces	Sections botaniques	Origines	Localisation	Latitude	Longitude
5	<i>D. antaly</i> Jum. & Perr.	Xylinocapsa Burkill et Perrier	2154	Andranolava, Madagascar	22°62 S	44°67 E
6	<i>D. balcanica</i> Kosanin		266	CIRAD (Quarantaine)	CIRAD	
7	<i>D. bemandry</i> Jum. & Perr.	Brachyandra Uline	2092	Ampasikibo, Madagascar	22°53 S	43°61 E
8	<i>D. bemarivensis</i> Jum. & H. Perr.	Cardiocapsa Uline.	2112	collines Namaboaha, Madagascar	22°61 S	43°63 E
9	<i>D. bulbifera</i> L.	Opsophyton Uline		Antananarivo Madagascar	18°93 S	47°53
10	<i>D. cayenensis</i> Lamark	Enantiophyllum Uline	2790	IRD (F. Engelman)		
11	<i>D. communis</i> L. *		312	CIRAD (Quarantaine)	CIRAD (D. Filloux)	
12	<i>D. dumetorum</i> (Kunth) Pax	Lasiophyton Uline	bulbille	Bénin	Bénin	
13	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Combilium Prain & Burkill	52	IRD (M. Bousalem)-	Togo	
14	<i>D. fandra</i> Jum. & H. Perr.	Brachyandra Uline	2120	près de Toliara, Madagascar	23°35 S	43°87 E
15	<i>D. heteropoda</i> Baker	Brachyandra Uline	2346	Parc National, cascade Andringitra, Madagascar	22°13 S	46°89 E
16	<i>D. hirtiflora</i> Benth.	Asterotricha	Adja Ouéré	Adja Ouéré, Bénin	6°95 N	2°57 E
17	<i>D. hombuka</i> H. Perr.	Brachyandra Uline	2131	Andaromihamiky, Madagascar	22°98 S	44°33 E
18	<i>D. maciba</i> Jum. & H. Perr.	Campanuliflorae Burkill et Perrier	2110	Antivalabe, Madagascar	22°60 S	43°61 E
19	<i>D. mangelotiana</i> Miège	Enantiophyllum Uline	194_MG-10	Côte d'Ivoire	Fac des sciences	
20	<i>D. melastomatifolia</i> Uline ex Prain et Burk.		368	CIRAD (Ph. Vernier)	Guyane française	
21	<i>D. minutiflora</i> Engl.	Enantiophyllum Uline	MI 1	Brunoy, CNRS	AH 5123 (Hladik)	
22	<i>D. nako</i> H. Perr.	Brachyandra Uline	2340	Près d'Ampanihy, Madagascar	24°52 S	44°62 E
23	<i>D. nummularia</i> Lam.	Enantiophyllum Uline	MW3_206	CARFV (V. Lebot)	Vanouatou	
24	<i>D. nummularia</i> Lam.	Enantiophyllum Uline	Rull_331	CARFV (V. Lebot)	Vanouatou	
25	<i>D. opposita</i> Thunb.		265	CIRAD (Ph. Vernier)	France	
26	<i>D. ovinata</i> Baker	Pachycapsa Burkill et Perrier	2108	RN 9, Antivalabe	22°60 S	43°61 E
27	<i>D. praehensilis</i> Benth.	Enantiophyllum Uline	1630	Ammazoumé, Bénin	7°49 N	1°81 E
28	<i>D. praehensilis</i> Benth.	Enantiophyllum Uline	AN7	Gban**, Bénin		
29	<i>D. pubescens</i> Poiret		367	CIRAD (Ph. Vernier)	Guyane française	
30	<i>D. quartiniana</i> A. Rich.	Lasiophyton Uline	2205	Ankazoabo, Madagascar	22°26 S	44°53 E
31	<i>D. rotundata</i> Poir.	Enantiophyllum Uline	Var. Manfobor	Bénin		
32	<i>D. sansibarensis</i> Pax	Macrourea Burkill	bulbille	Madagascar		
33	<i>D. soso</i> Jum. & H. Perr.	Brachyandra Uline	2103	Befoly	23°32 S	43°93 E
34	<i>Dioscorea sp. var. Reroy</i>		2361	Ambiky, Madagascar	21°88 S	43°89 E
35	<i>Dioscorea sp. Gago</i>		2316	Forêt Vathara, Madagascar	21°82 S	44°90 E
36	<i>D. togoensis</i> R. Knuth	Enantiophyllum Uline	TG05	Côte d'Ivoire, Lamto	-	-
37	<i>D. transversa</i> R. Br.		322_TV-01	Nouvelle Calédonie	marché Nouméa	
38	<i>Trichopus sempervirens</i> H. Perr. ***	Trichopodacée	2341	Kianjavato, Madagascar	21°38 S	47°87 E
39	<i>D. trichantha</i> Baker	Brachyandra Uline	2212-2	Forêt Ravinda	22°34 S	44°69 E
40	<i>D. trifida</i> L.	Macrogynodium	345T	Guyane ?		
41	<i>D. trifida</i> L.	Macrogynodium	D75	Cuba ?		
42	<i>D. villosa</i> L.		267 CIRAD	Quarantaine CIRAD	CIRAD	

\* Synonyme de *Tamus communis* (CADDICK *et al.*, 2000) ; \*\* : les Gbans sont des variétés cultivées dans les jardins au Sud du Bénin ; \*\*\*synonyme d'*Avetra sempervirens* H. Perr. (CADDICK *et al.*, 2002).

## 2. Méthodes

### 2.1 Espaceurs

Le génome chloroplastique de *D. elephantipes* (L'Hér.) Engler a été séquencé en 2007 et ses principales caractéristiques déterminées - cf. NCBI - NC009601 (HANSEN *et al.*, 2007). Sa taille est de 152 609 bases avec 59,6% de séquences codantes et 61,1% d'A-T. Trois espaceurs intergéniques ont été sélectionnés (tableau 2) : *trnH-psbA* (IGS1), *trnC-rpoB* (IGS2) et *trnD-trnT* (IGS3) (SHAW *et al.*, 2005). L'IGS3 contient deux petits gènes, *trnY* et *trnE*. Les séquences des espaceurs intergéniques de *Dioscorea elephantipes* sont : IGS1 (274 bases) entre les bases 152419 et 152609 plus entre les bases 1 et 82 ; IGS2 (1245 bases) entre les bases 25887 et 27131 ; et IGS3 (1339 bases) entre les bases 30183 et 31522 (figures 3). Les six amorces ont été réalisées par Eurogentec (France).

Tableau 2 : Caractéristiques des trois espaceurs intergéniques (IGS) chloroplastiques (HANSEN *et al.*, 2007).

Noms des cpIGS	R (5' - 3')	% GC	L (5' - 3')	% GC
	R - <i>trnH</i>		L - <i>psbA</i>	
IGS1 <i>trnH - psbA</i>	CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	56	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	41
	R - <i>trnC</i>		L - <i>rpoB</i>	
IGS2 <i>trnC - rpoB</i>	CACCCRGATTYGAAGTGGGG	60	CKACAAAAYCCYTCAATTG	40
	R - <i>trnD</i>		L - <i>trnT</i>	
IGS3 <i>trnD - trnT</i>	ACCAATTGAACTACAATCCC	40	CTACCACTGAGTTAAAAGGG	45

### 2.2 Techniques

Les extractions des ADN totaux ont été réalisées avec des feuilles de plantes cultivées en serre ou de plantes cultivées en tubes de culture *in vitro* (une plante par accession). Les dosages ont été réalisés avec un doseur d'ADN spectrophotomètre « Mini drop » a permis d'avoir une concentration de 5ng/μl d'ADN. Les amplifications spécifiques des IGS chloroplastiques ont été faites avec un thermocycleur Biometra dans 25 μl de tampon contenant 25 ng d'ADN, 200 μM de dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,40 μM des amorces R et L et 0,03 U/μl de la *Taq polymérase* Promega (M 3175). Différentes températures et temps d'« annealing » ont été utilisés pour les trois IGS (tableau 3)

Tableau 3 : Conditions des réactions d'amplification (PCR). La température de préchauffage est de 80°C pendant 5 minutes et le nombre de cycles d'amplification est de 35. Pour l'IGS3 de *D. balcanica* et *D. villosa* la température d'annealing est de 53°C pendant 60 secondes.

IGS	T° et temps de dénaturation	T° et temps d'annealing	T° et temps d'élongation	T° et temps de l'élongation finale
IGS1 trnH - psbA	96°C ; 1 mn	53°C ; 30 s	72°C ; 60 s	72°C ; 10 mn
IGS2 trnC - rpoB	94°C ; 1 mn	57°C ; 60 s	72°C ; 90 s	72°C ; 5 mn
IGS3 trnD - trnT	96°C ; 1 mn	54°C ; 45 s	72°C ; 90 s	72°C ; 5 mn

La purification des produits des PCR a été réalisée avec des nano billes de métal en kit (« Ampure Agencourt kit » suivant leur protocole). Avec un spectrophotomètre Nanodrop, la concentration des produits PCR purifiés a été ramenée à 10 ng/ µl nécessaires au séquençage par Eurofins MWG GmbH. Deux séquençages, un avec l'amorce R et un deuxième avec l'amorce L, ont été réalisés pour les trois IGS, bien que pour l'IGS 1 de petite taille ce ne serait pas nécessaire (SHAW et al., 2005).

### 2.3 Analyses et séquences consensus

Le logiciel Geneious 4.5 a établi les séquences consensus des séquences obtenus avec les deux amorces, R et L pour les trois IGS. Après alignement, l'analyse de parcimonie a permis de construire des arbres phylogénétiques consensus (logiciels PAUPou Phylogenetic Analysis Using Parsimony et Macclade) pour une astringence de 50% et 100 bootstraps ou de 100%. (parcimonie « stricte »).

## RÉSULTATS

Les résultats de séquençages sont en cours d'analyses statistiques. Dans cette communication, seuls des résultats partiels sont exposés : une analyse sur les 40 espèces de *Dioscorea* pour un seul marqueur IGS (genre *Trichopus* – *Avetra* comme groupe externe et une analyse sur 19 espèces pour les trois IGS (espèce *D. elephantipes* comme groupe externe). Cela permet d'avoir quelques indications sur la phylogénie des ignames endémiques du Sud malgache.

### 1. Analyse de 40 espèces

L'analyse des trois IGS sur l'ensemble des 40 espèces donne une première idée des relations phylogénétiques (figure 4). Les espèces européenne et américaine du Nord (*D. balcanica* et *D. villosa*), américaine du Sud (*D. pubescens* et *D. melastomatifolia* sauf *D. trifida* dont l'origine doit être vérifiée), les espèces *D. communis* (ex *Tamus communis*) et *D. elephantipes* sont distinctes d'un grand groupe comprenant un sous-groupe de quatorze espèces d'ignames malgaches endémiques. *D. antaly* ne peut pas être distinguée des espèces *D. dumetorum*, *D. quartiniana* et *D. bulbifera*. Parmi les

espèces malgaches, on distingue *D. nako*. Les espèces *D. fandra*, *D. bemandry* et *D. soso* très proches, ainsi que *D. hambuka* et *D. maciba*, *D. sp Gago*-*D. alatipes*-*D. sp Balo*, et *D. heteropoda* - *D. sp Reroy*. Les structures en râteau du dendrogramme indiquent l'absence de précision de l'analyse du polymorphisme des séquences avec trois espaceurs intergéniques.

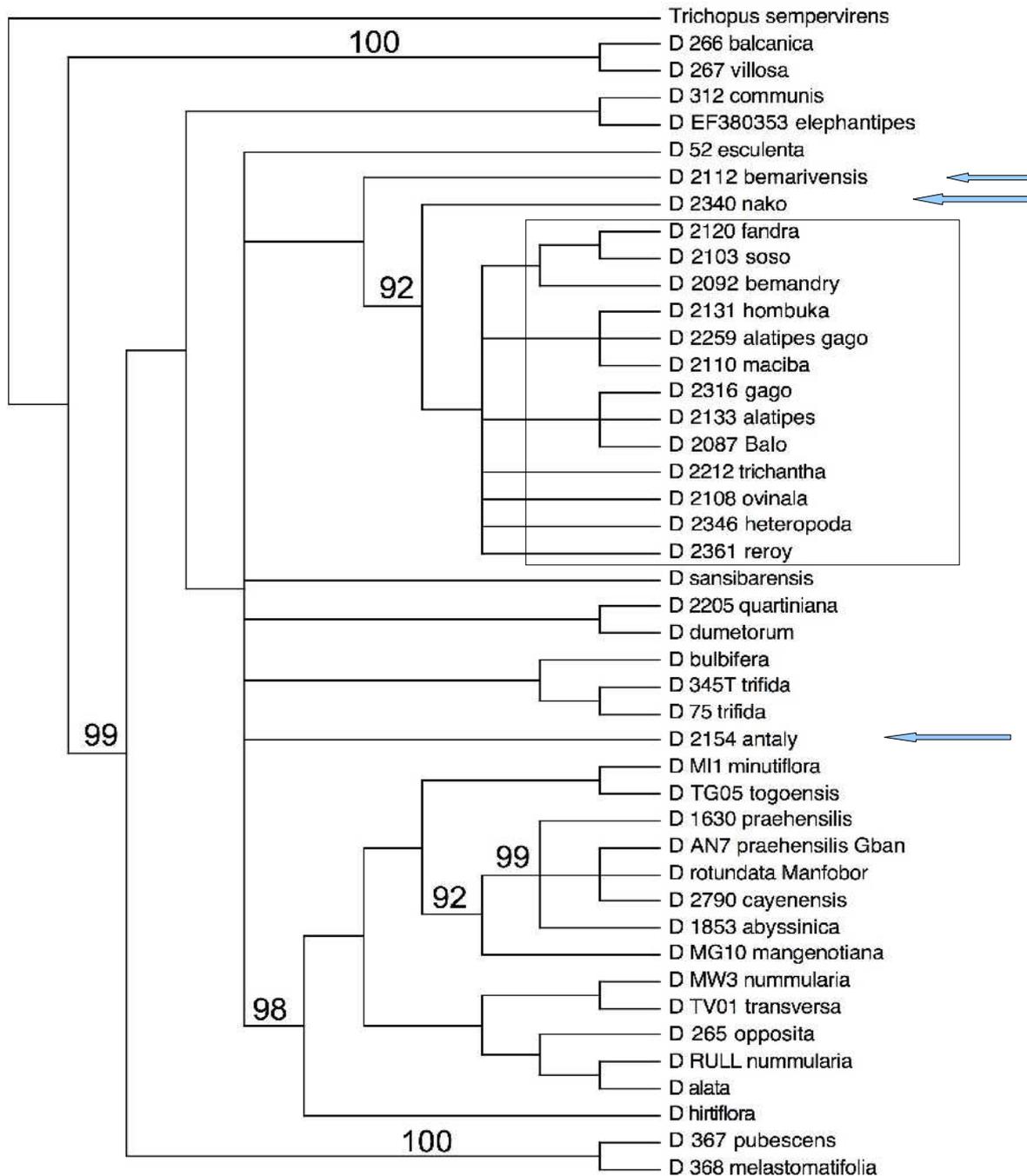


Figure 4 : Arbre phylogénétique d'une parcimonie stricte (« maximum parcimony ») sur les séquences consensus de trois IGS. Le genre *Trichopus* est l'élément externe L'encadré signale les 13 ignames endémiques du Sud de Madagascar (« Mascarodioscorea »). Les flèches signalent les trois espèces endémiques malgaches qui se distinguent des autres espèces. Les chiffres indiquent les valeurs de bootstrap.

## 2. Analyse de 11 espèces malgaches avec les trois espaceurs

L'analyse faite sur onze espèces endémiques avec les 3 espaceurs montre un regroupement important de neuf espèces (figure 5). L'espèce *Balo*, observée au Nord de Toliara, est encore très proche de *D. alatipes*. Les espèces *D. soso* et *D. fandra* sont également proches ainsi que *D. maciba* et *D. hambuka*. L'espèce *D. bemarivensis* serait plus proche de ce groupe d'espèces que de *D. antaly*. Cette dernière espèce ne serait pas très différente des espèces des sections Lasiophyton (*D. dumetorum*) et Opsophyton (*D. bulbifera*). Les espèces de la section Enantiophyllum sont bien regroupées.

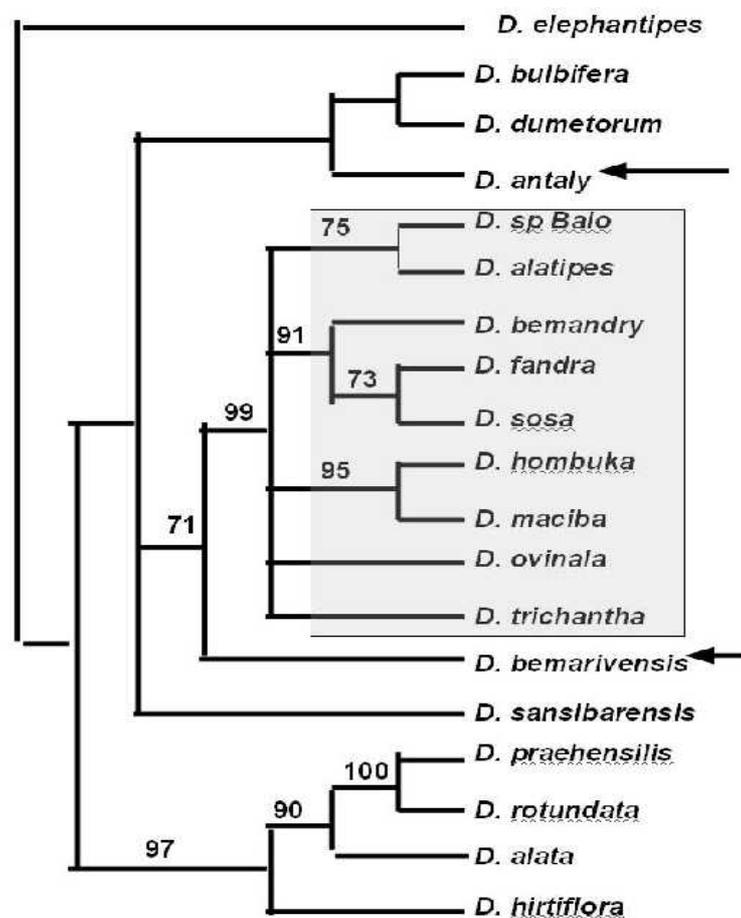


Figure 5 : Arbre phylogénétique de parcimonie stricte des séquences consensus de trois IGS chloroplastiques de 19 espèces (onze malgaches du Sud sans *D. nako*). *D. elephantipes* est utilisée comme élément externe. Sur les branches, les valeurs de bootstraps ont été signalées. L'encadré signale un important groupe d'ignames endémiques. Les flèches signalent les deux espèces endémiques différentes des autres.

## DISCUSSION-CONCLUSION

Madagascar possède un grand nombre d'espèces d'ignames sauvages comestibles notamment à l'Ouest (JEANNODA et al., 2007) et au Sud-Ouest (CHEBAN et al., 2009). Le séquençage du génome chloroplastique d'une espèce du genre *Dioscorea* (*D. elephantipes*) ouvre des perspectives

intéressantes pour l'étude de la phylogénie entre genres différents avec l'utilisation d'éléments extérieurs ou hors groupes (par exemple *Trichopus sempervirens*, espèce malgache hermaphrodite sans tubercule et avec une liane à enroulement dextre). L'étude de deux gènes codant, *rbcL* et *matK* (WILKIN *et al.*, 2005) a montré la présence d'un groupe d'ignames malgaches endémiques proches génétiquement : *D. ovinala* – *D. soso*, *D. trichantha*-*D. alatipes*-*D. karatana*-*D. maciba*-*D. namorenkensis*, *D. fandra* puis d'un autre groupe : *D. arcuatinervis*-*D. tanalarum* et *D. bemarivensis* (espèces sœurs à la suite d'une radiation relativement récente avec adaptation à des milieux écologiques arides ou humides et à des changements de la morphologie des fleurs et des fruits). L'espèce *D. antaly*, proche des espèces *D. dumetorum*-*D. hispida* et *D. bulbifera* serait d'origine polyphylétique. Le regroupement des espèces sœurs permettrait de réduire le nombre de section de la Flore de Madagascar.

Les résultats obtenus avec 3 IGS montrent quatre lignages parmi les espèces du Sud : 1) *D. antaly*, 2) *D. bemarivensis*, 3) *D. nako* et 4) le reste des espèces issues de l'éclatement en plusieurs sous espèces d'une espèce ancestrale.

Ils confirment l'origine polyphylétique des ignames endémiques malgaches. L'analyse du polymorphisme de très nombreux IGS, zones non codantes du génome chloroplastique conservant de multiples mutations, devrait lever les incertitudes quant à l'origine des ignames endémiques malgaches depuis la séparation de l'île du continent africain. L'étude de ces marqueurs dans plusieurs populations de chaque espèce doit estimer la diversité intraspécifique de ces espaceurs. Pour continuer l'étude de la phylogénie des ignames notamment malgaches, il est néanmoins nécessaire :

- d'étudier l'héritabilité du chromosome chloroplastique (est-il hérité uniquement par la mère ou est-il hérité par les deux parents ?),
- de comparer les relations phylogénétiques établies à l'aide de marqueurs chloroplastiques et celles établies à l'aide de marqueurs nucléaires (séquences d'IGS nucléaires par exemple),
- d'étendre les études à toutes les espèces malgaches, en particulier les espèces du Sud-est (*D. karatana*, *D. madecassa*, *D. tanalarum*, *D. sp Vorozy*) et celles du Centre et Nord de l'île.

## REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée au cours d'un stage au Centre de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD-France) à Montpellier de Andriamampandry Hanitra en septembre et octobre 2008 (Bourse de Formation Continue, BFC). Nous remercions D. Filloux, Ph. Vernier du CIRAD et F. Engelmann de l'IRD pour nous avoir fourni certaines accessions.

## BIBLIOGRAPHIE

**ALDRICHT J., CRNHEEY B.W., MERLIN E., CHRISTOPHERSON L.** 1988. The role of insertion/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Current Genetics* 14: 137-146.

**BURKILL I.H., PERRIER DE LA BÂTHIE H.** 1950. 44e famille. Dioscoréacées (Dioscoreaceae). Dans : Flore de Madagascar et des Comores (Plantes vasculaires). H. Humbert (ed.). Typographie Firmin-Didot et Cie Paris, France. Pp. 1-78.

**CADDICK L.R., RUDALL P.J., WILKIN P., CHASE M.W.** 2000. Yams and their allies: systematics of Dioscoreales. In: *Monocots systematics and evolution*. K.L. Wilson and D.A. Morrisson (Eds). CSIRO, Melbourne. Pp. 475-487.

**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.

**GIELLY L., TABERLET P.** 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* 2: 52-64.

**HANSEN DR, DASTIDAR SG, CAI ZQ, PENAFLORE C, KUEHL JV, BOORE JL, JANSEN RK.** 2007. Phylogenetic and evolutionary implications of complete chloroplast genome sequences of four early-diverging angiosperms: *Buxus* (Buxaceae), *Chloranthus* (Chloranthaceae), *Dioscorea* (Dioscoreaceae), and *Illicium* (Schisandraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 547-563.

**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.

**KELCHNER S.A.** 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 87: 482-498.

**LU S.-Y., PENG C.I., CHENG Y.P., HONG K.-H., CHIANG T.-Y.** 2001. Chloroplast DNA phylogeography of *Cunninghamia kinishii* (Cupressaceae), an endemic conifer of Taiwan. *Genome* 44: 797-807.

**SHAW J., LICKEY E.B., BECK J.T., FARMER S.B. et al.** 2005. The tortoise and the hare II:

relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.

**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.L., HLADIK C.M.** 2008a. An endangered new species of edible yam (*Dioscorea*, Dioscoreaceae) from Western Madagascar and its conservation: *Kew Bulletin*. 63: 113–120.

**WILKIN P., ANDRIANANTENAINA W. P., JEANNODA V. AND HLADIK A.** 2008b. The species of *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae) from Madagascar with campanulate tori, including a new species from Eastern Madagascar. *Kew Bulletin* 63: 583-600.