

## DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET STRUCTURE DE POPULATION DE *DIOSCOREA MACIBA* JUM & PERR. AVEC SSR\* MARQUEURS

ANDRIAMAMPANDRY Hanitra Viviane (1), Wilson KIMANI(2)

(1) FOFIFA Centre National de Recherches Appliquées au Développement Rural Madagascar

(2) BECA / ILRI Biosciences East and Central Africa / International Livestock Research Institute Nairobi Kenya

Email : hanitraviviane@gmail.com ; vivi\_hanitra@yahoo.fr

Tél : 033 12 378 21 ; 034 29 151 67

### Résumé

Le *masiba* (*Dioscorea maciba*) est une des 40 espèces d'ignames sauvages endémiques de l'île. Cette espèce possède une large distribution géographique sur le versant occidental allant du nord au sud. Un des moyens pour la préservation d'une espèce est sa conservation et sa valorisation. Pourtant, peu d'étude a été menée sur les ignames sauvages endémiques de l'île. *Dioscorea maciba* a été étudiée afin de prospecter sa diversité génétique à l'aide des marqueurs microsatellites SSR\*. La diversité génétique parmi 128 échantillons a été étudiée : la structuration des populations étudiées apparaît distincte dans le radiale phylogramme, structuration suivant l'axe Nord Sud. L'isolement géographique a fortement influencé l'évolution de ces populations ; La différenciation génétique à l'intérieur des individus est très marquée. Une proximité génétique relativement faible caractérise les populations étudiées.

### Abstract

*Dioscorea maciba* is one of 40 endemic species of wild yams on the island. This species has a wide geographic distribution on the western slope from north to south. Valuation and conservation were the ways to preserve plant's species. However, no study and research has been done about Madagascar's endemic wild yams. *Dioscorea maciba* genetic diversity using SSR microsatellite markers has been explored. The genetic diversity among 128 samples has been studied: population structuring north-south appears distinct in the radial phylogram. Geographic isolation has strongly influenced the evolution of these populations; Genetic differentiation within individuals is very marked. Relatively weak genetic proximity characterizes the populations.

### Famitinana

Ny *masiba* (*Dioscorea maciba*) dia iray amin'ireo oviala 40 karazana izay tsy fahita raha tsy eto Madagasikara. Zava-maniry mahenika ny ilany andrefan'ny Nosy izy io. Fomba fikajiana ny zava-maniry dia ny fiarovana sy fiahina azy. Mbola vitsy anefa ny asampikarohana natao amin'izy ireo. Ity asampikarohana ity dia natao mba hanadihadiana ny fahasamihafan'ny singa aratarazo nampiasana ny "SSR markers" teo amin'ny 128 santionan'ireo masiba notazana tamin'ny vondrona amin'ny faritra vitsivisty teto amin'ny Nosy. Ny valimpikarohana dia nahitana fa miavaka ireo santiona notazana tany amin'ny faritra avaratra sy atsimo, ny faha samihafana aratarazo isambondrona dia tsy misongadina loatra fa misy ny fahasamihafana ara-tarazo ao amin'ny santiona tsirairay avy.

**Mots clés :** *Dioscorea maciba*, SSR\* marqueurs, diversité génétique, structure de population, espèce

sauvage apparentée aux plantes cultivées, Madagascar.

## Introduction

Madagascar fait partie des points chauds de la biodiversité « *hotspot* » et est parmi les cinq pays à mégabiodiversité en espèces sauvages apparentées aux plantes cultivées (ESAPC). Présentes dans les écosystèmes forestiers, les ESAPC sont précieuses en alimentation et en agriculture car elles forment la principale source et réserve de gène pour les cultures vivrières. La déforestation et la destruction de leur habitat, résultant principalement de la pression anthropique, constituent leur grande menace. Afin de mettre en exergue l'importance des ESAPC et déterminer leur potentialité, le cas de *D. masiba* a été étudié. Le présent travail prospecte la diversité génétique, de *Dioscorea maciba*, une des espèces du genre *Dioscorea* les plus exploitées dans plusieurs régions de la grande île, à l'aide des marqueurs microsatellites SSR.

L'objectif de notre étude est de comprendre la structure de la diversité génétique de *Dioscorea maciba*, d'abord intra-population, ensuite, inter-population, généralement mal connue.

## Matériel et méthode

Notre méthodologie de travail consiste à faire le choix des sites sur la base de certains critères, puis de faire l'échantillonnage, d'extraire l'ADN, de procéder à l'analyse moléculaire proprement dite : amplification d'ADN et génotypage et, enfin de réaliser l'analyse des données.

### Matériel végétal

Déterminée en 1909, dont le nom accepté était *Dioscorea maciba* Jum. et Perr, [2] cette igname sauvage est connue à

Madagascar sous divers noms vernaculaires selon la région comme [3] : *majola*, *ovidrazana*, *ovinala*, *bo*, *bodoa*, *ovy* (Sakalava de Menabe), *mality*, *masiba*, *malita* (Sakalava), *kasy* (Sakalava de Mahabo). Le *masiba* appartient à :

- l'embranchement : ANGIOSPERMES
- la classe MONOCOTYLEDONES
- la sous classe : MONOCOLPEE
- l'ordre : DIOSCOREALES
- la famille : DIOSCOREACEAE
- genre : *Dioscorea*
- espèce : *Dioscorea maciba* Jum. et Perr

### Choix des sites d'étude

L'aire de distribution de cette espèce s'étend entre les latitudes 12° 30' au Nord et 24° 00' au Sud et sur le versant occidental de la grande île (cf. figure n°1). Cette aire correspond à la « zone (2) écofloristique occidentale de basse altitude » décrite par Faramalala et Rajeriarison (1999). C'est une plante héliophile dont la tige lianescente nécessite la présence de n'importe quel support, inerte ou vivant pour lui servir de tuteur.

Le choix des sites a été basé sur les critères suivants :

- Domaine ou région géographique ;
- Présence de *Dioscorea maciba* dans le site ;
- Statut de conservation du site ;
- Niveau de pression de l'espèce ;
- Type d'écosystème.

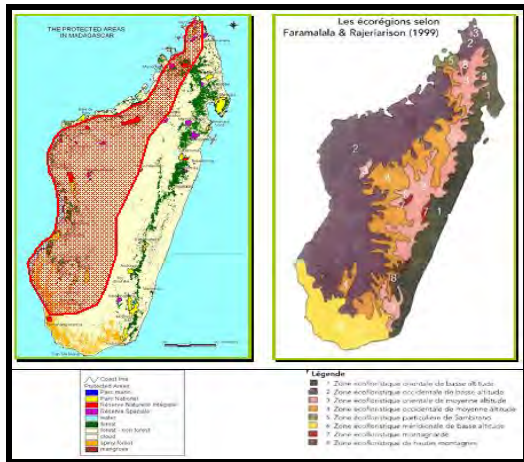


Figure 1 : à gauche en rouge carte montrant la zone d'occurrence de *D. maciba* (aire de distribution naturelle) à droite carte de la délimitation des écorégions à Madagascar établie par Faramalala et Rajeriarison (1999)

### Echantillonnage

Les sites ont été subdivisés en population, qui sont séparées par des barrières géographiques naturelles ou artificielles : route par exemple, distantes les unes des autres de plus de 2 km à vol d'oiseau. Des lots de graines matures ont été récoltés dans chaque population dont chaque lot correspond à un pied femelle. Les coordonnées géographiques sont enregistrées avec un GPS\* avec le

Tableau 1 : Caractéristique des dix marqueurs avec *D. maciba* ; (T° annelation\* obtenue après optimisation des marqueurs avec *D. maciba*)

Code	Marqueurs	Taille en pb	T° annelation*	Motif de base
M3	MT 14	42 – 169	52°C	(GTT)8
M4	MT 112	98 – 151	53°C	(CTT)8
M9	A 4	51 – 150	58°C	(CT)2 (GAA) 3GA(GAA)
M12	DIJ 0142	262 – 284	50°C	(AG)18
M15	DIJ 0222	227 – 313	50°C	(CA)13
M19	DIJ 0012	112 – 161	50°C	(AG)13
M22	DIJ 0418	51 – 90	53°C	(GT)14
M30	Dab 2C12	57 – 249	48°C	(AC)8
M32	Dpr 3B12	63 – 230	48°C	(TG)8
M43	DIJ 0443	140 - 281	53°C	(AG)17

La programmation pour l'amplification a été mise au point auprès du laboratoire du BECA/ILRI\* Nairobi Kenya. Les conditions d'amplification des ADN sont les suivantes : une première dénaturation totale de l'ADN à 95

système WGS84 en degrés, minute sexagésimale. Les lots de graines ont été stockés dans une enveloppe Kraft en milieu et température ambiants.

### Extraction d'ADN

L'ADN génomique nucléaire total a été extrait à partir des graines. Le KIT « QuickExtract™ Seed DNA Extraction Solution » a été utilisé pour la digestion, la purification et l'extraction de l'ADN. L'extraction d'ADN a été effectuée en suivant le protocole d'extraction inséré dans le KIT.

### Amplification d'ADN

Dix marqueurs d'origines différents ont été utilisés pour l'amplification à savoir :

- DIJ 0443, DIJ 0418, DIJ 0012, DIJ 0142, DIJ 0222, tous issus de *Dioscorea japonica* ;
- Dpr 3B12, de *Dioscorea praehensilis* ;
- Dab 2C12, de *Dioscorea abyssinica* et,
- A4, MT112, MT4 tous trois de *Dioscorea alata*.

Les valeurs caractéristiques de ces marqueurs sont données dans le tableau 1.

°C pendant 3 mn, suivie de 40 cycles de succession de trois phases : dénaturation à 94 °C pendant 30s, hybridation à la température optimale déterminée entre 50-65 °C pendant 1 mn selon l'amorce et une dernière étape

d'élongation à 72 °C pendant 2 mn sont programmées ; ensuite une phase d'extension finale à 72°C pendant 30 mn, enfin, une phase de refroidissement à 4 °C. Le volume réactionnel utilisé pour chaque échantillon de 25 µl contient 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM de chaque amorce, 1U Taq50 ng.µl-1 ADN et 5 µl Tampon 1X.

## Génotypage

Le génotypage des amplifias a été réalisé au laboratoire du BECA/ILRI Nairobi Kenya. Ceci a été faite par électrophorèse automatisée avec l'appareil « ABI PRISM 377 (*Applied Biosystems*) ». Cet appareil a donné directement les tailles des allèles. Les résultats présentés sous forme d'électrophoregrammes sont ensuite transformés en valeur « *data scoring* » avec le logiciel *Genemapper* v4.1, puis représentés sous forme d'une matrice de données.

## Analyse des données

### **Mesure de la diversité intra-population**

La variabilité génétique à l'intérieur d'une population peut être mesurée [1] par le nombre moyen d'allèles par locus (A) dénommé aussi richesse allélique, l'hétérozygotie observée (H<sub>o</sub>), et théorique (H<sub>e</sub>).

Le paramètre F<sub>is</sub> de Wright [7], dénommé indice de fixation (ou coefficient de consanguinité) est aussi calculé avec le logiciel Genalex 6.5. Il reflète la différenciation des individus à l'intérieur d'une population.

### **Mesure de la diversité génétique inter-population**

La distance génétique de Nei [1] entre population est estimée à l'aide du logiciel Genalex 6.5.

### **Analyses statistiques**

L'Analyse de Variance sur les données Moléculaires (AMOVA) et l'Analyse en Composantes Principales (ACP) ont été utilisées pour les analyses statistiques. La première relève la diversité présente à chaque niveau hiérarchique : trois niveaux hiérarchiques [7] avec trois indices de fixation F<sub>st</sub>, F<sub>is</sub>, F<sub>it</sub> ont été calculés puis testés afin de déterminer si chaque composante est significativement différente de 0 ; tandis que la seconde, l'ACP permet d'estimer la part de variation génétique imputable à la structure définie.

Ces deux analyses ont été réalisées avec le logiciel Genalex 6.5. Les indices F<sub>is</sub>, F<sub>st</sub> et F<sub>it</sub> ont été calculées grâce au logiciel Genalex 6.5. Le phylogramme est réalisé avec le logiciel Darwin 5.0.

## Résultats et discussion

Quatre sites présentant différents types d'écosystèmes forestiers ont été choisis : le Parc National d'Ankarafantsika (PNA), la Nouvelle Aire Protégée d'Analavelona, les forêts d'Andranomena - Beroboka et la savane arborée d'Ihosy, tous de statut, de niveaux de perturbation et de protection différents. La collecte a été effectuée dans les 12 populations (cf. tableau 2), 128 lots de graines ont été récoltés. Le nombre d'échantillon par population, ainsi que le nombre de population par site n'étant pas égal, la distance entre deux individus consécutifs trouvés est aussi très variable.

Tableau 2 : Répartition des échantillons

Site	Population	Nombre d'échantillon
Analavelona	Analavelona (ANLV)	5
Andranomena-Beroboka	Andranomena (ADNM)	8
	Beroboka (BRBK)	11
Ihosy	Ihosy (IHSY)	7
Parc National d'Ankarafantsika	Ampijoroa (APJ)	8
	Andranofasika (ADFK)	22
	Andranomandevy (ADMV)	7
	Ankarafantsika (AKF)	6
	Ankijabe (AKJB)	10
	Jardin Botanique A (JBA)	14
	Jardin Botanique B (JBB)	20
	Mahatazana (MTZN)	10
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>128</b>

**Diversité intra population de *D. maciba***

**Richesse allélique**

Pour cette investigation, 10 marqueurs microsatellites SSR ont été utilisés. Sur le plan moléculaire, un total de 128 allèles a été détecté avec en moyenne 12,8 allèles par locus. Le nombre d'allèle par locus dans chaque population révélée avec les dix marqueurs est très varié, le maximum est obtenu avec le locus M43 dans AKF avec 13 allèles, et le minimum d'allèle par locus et par population est avec le locus M15 : 1 allèle, dans ADMV, IHSY et APJ.

Le nombre d'allèle moyen observé par population est de 56,25, ce qui est relativement important. Le maximum d'allèles

par population a été détecté dans JBB (jardin Botanique B du PNA) avec 77 allèles, et le minimum dans la population AKF avec 42 allèles (cf. tableau n°3). Neuf populations contiennent des allèles privés à savoir : ADFK, ADNM, APJ, ANLV, BRBK, JBA, JBB, IHSY et MTZN. La présence de ces allèles reflète la richesse allélique au sein de ces populations

Le nombre d'allèle observé par individu varie entre 11 à 19 allèles. Ceci traduit une richesse allélique au niveau de chaque individu échantillonné et une diversité génétique très importante au sein des individus.

**Hétérozygotie**

Les valeurs de l'hétérozygotie  $H_o$  et  $H_e$  se trouvent dans le tableau 3.

Tableau 3 : Valeurs  $H_o$  et  $H_e$  des 12 populations étudiées

Pop	ADFK	ADNM	ADMV	AKF	AKJB	APJ	ANLV	BRBK	JBA	JBB	IHSY	MTZN	Totale
<b>Na</b>	7,400	5,300	5,400	4,200	5,900	4,800	4,300	6,400	6,400	7,700	4,600	5,100	5,625
<b>Ne</b>	4,313	3,693	3,930	3,043	3,830	3,340	3,112	4,129	3,635	4,019	3,400	3,299	3,645
<b>A</b>	74	53	54	42	59	48	43	64	64	77	46	51	56,25
<b><math>H_o</math></b>	0,640	0,608	0,564	0,667	0,614	0,634	0,705	0,566	0,610	0,660	0,610	0,531	0,618
<b><math>H_e</math></b>	0,664	0,675	0,630	0,621	0,648	0,618	0,656	0,694	0,628	0,665	0,585	0,628	0,643
<b>Fis</b>	0,058	0,108	0,102	-0,077	0,034	-0,016	-0,047	0,164	0,033	-0,013	-0,066	0,144	0,036

$N_a$  : Nombre moyenne d'allèle par population ;  $N_e$  : Nombre moyenne d'allèle effective par population ;  $A$  : Nombre d'allèle par population ;  $F_{is}$  : Indice de fixation ;  $H_o$  : Hétérozygotie observée ;  $H_e$  : Hétérozygotie estimée.

Ces valeurs sont pour  $H_o$  comprises entre 0,531 pour MTZN et 0,705 pour ANLV, pour  $H_e$  entre 0,585 pour IHSY et 0,694 pour BRBK pour l'ensemble des loci et dans chaque population. La diversité génétique de chaque population traduite par  $H_e$  au niveau des populations est très élevée, valeur nettement supérieure à 0,600 (cf. tableau 3) correspondant ainsi à une forte diversité.

Dans les populations AKF, ANLV, APJ et IHSY,  $H_o$  est supérieur à  $H_e$ , impliquant une augmentation d'hétérozygotie. Cette "augmentation" d'hétérozygotie s'accompagne évidemment d'une "diminution" correspondante de la fréquence des homozygotes. Par contre dans les 8 populations restantes, une réduction de l'hétérozygotie a été constatée. Aucun équilibre de H-W n'a été enregistré.

Pour l'ensemble des populations, l'hétérozygotie observée est de 0,618 qui est inférieur à l'hétérozygotie estimée qui est de 0,643. L'écart négatif entre les  $H_o$  et  $H_e$  s'explique par une faible structuration en population de *D. maciba*. Par contre les valeurs de  $N_a$  par population supérieures à  $N_e$  révèlent une importante diversité à l'intérieure de chaque population.

La diversité génétique de chaque population traduite par  $H_e$  au niveau de la population globale est très élevée, valeur nettement supérieure à 0,643 (cf. tableau 3),

correspondant ainsi à une forte diversité intra population.

### **Indice de fixation $F_{is}$**

La valeur de l'indice  $F_{is}$  de chaque population détectée avec les dix loci varient entre (-0,077) et 0,164. Dans cinq populations l'indice de fixation  $F_{is}$  est négatif (cf. tableau n°3) ce qui indique un excès d'hétérozygotie au sein des loci. Par contre sept populations présentent des  $F_{is}$  positifs compris entre 0,033 et 0,164. Ces indices positifs traduisent un déficit en hétérozygotie.

L'indice de fixation moyenne pour la population globale est de 0,036 indiquant un déficit en hétérozygotie relativement faible.

### **Diversité entre population**

#### **Diversité définie par la distance génétique de $N_{ei}$**

La distance génétique de  $N_{ei}$ , détectée entre les paires de population se trouve dans le tableau n°4. Elle varie entre 0,071 à 0,439 (tableau 4). Cet intervalle de valeur correspond à une différenciation génétique faible à moyenne, traduisant aussi une proximité génétique entre les populations.



Tableau 4 : Matrice de distance génétique de Nei entre paire de population avec 999 permutations les chiffres grisés correspondent aux distances de Nei entre les populations du PNA

Population	ADFK	ADNM	ADMV	AKF	AKJB	APJ	ANLV	BRBK	JBA	JBB	IHSY	MTZN
ADFK	0,000											
ADNM	0,284	0,000										
ADMV	0,139	0,189	0,000									
AKF	0,224	0,235	0,206	0,000								
AKJB	0,072	0,258	0,117	0,224	0,000							
APJ	0,128	0,344	0,210	0,210	0,136	0,000						
ANLV	0,360	0,269	0,262	0,292	0,311	0,439	0,000					
BRBK	0,258	0,184	0,147	0,251	0,202	0,268	0,245	0,000				
JBA	0,079	0,335	0,167	0,207	0,119	0,105	0,424	0,273	0,000			
JBB	0,072	0,272	0,136	0,194	0,081	0,081	0,359	0,212	0,071	0,000		
IHSY	0,187	0,245	0,217	0,256	0,197	0,264	0,339	0,221	0,208	0,204	0,000	
MTZN	0,143	0,260	0,189	0,212	0,173	0,236	0,393	0,225	0,153	0,175	0,218	0,000

En ce qui concerne la structuration de la diversité génétique au sein du PNA, la matrice de distance génétique de Nei entre les populations montre des valeurs comprises entre 0,071 et 0,236.

F-Statistiques	Valeur	Probabilité
Fst	0,033	0,001
Fis	0,151	0,001
Fit	0,179	0,001

**Les indices de fixation de Wright : Fis, Fit et Fst (pour l'ensemble des populations)**

L'indice de fixation de Wright correspond à Fst qui mesure la diminution de l'hétérozygotie d'une population par rapport à l'ensemble des populations, provoquée par la dérive génétique. Dans cette étude, Fst est égal à 0,033 pour l'ensemble des populations, ceci indique une différenciation peu importante des populations par rapport à l'ensemble, statistiquement cette valeur est hautement significative (P=0,001). Les douze populations sont faiblement différenciées génétiquement dont la différenciation moyenne entre les populations est de l'ordre de 3,3%.

Cette valeur détermine qu'une grande part, 97,7% de la variabilité génétique totale est expliquée par la variation intra population de l'espèce. Cette valeur donne aussi une indication sur l'importance de flux de gène migratoire entre les populations : un flux migratoire peu important entre les populations.

Le Fis estime l'importance du déficit en hétérozygotie dans chaque population. Il est de l'ordre de 0,151 ceci signifie qu'un déficit d'hétérozygotes de 15,5% au niveau des populations prises isolément. Cette valeur donne aussi une information sur le degré de la consanguinité à l'intérieur de la population et Fit égal à 0,179 signifie qu'une réduction d'hétérozygote de 17,9% a été estimée dans l'ensemble des populations.

**Structure génétique des populations**

L'analyse moléculaire de variance à trois critères hiérarchiques : individu, intra-

Tableau 5 : Indices de fixation de Wright calculées avec Genalex 6.5

population et inter-population, montre que les trois sources de variation sont hautement significatives ( $p = 0,001$ ) et que, la variation moléculaire se répartit de façon pratiquement inégale entre les trois niveaux et qui sont

respectivement 82, 15 et 3% (tableau 6). La variation moléculaire calculée avec AMOVA entre les populations est relativement faible de l'ordre de 3%.

Tableau 6 : Résultats AMOVA au seuil de 0.1%

Source de variation	ddl	SS	MS	Variance	%
Entre sous population	11	71,477	6,498	0,118	3%
Intra sous population	116	467,476	4,030	0,529	15%
Intra individu	128	380,500	2,973	2,973	82%
<b>Totale</b>	<b>255</b>	<b>919,453</b>		<b>3,620</b>	<b>100%</b>

ddl : degré de liberté; SS : Somme des carrés; MS : écart type; % : variation

La différenciation intra-population (ou entre individu) est peu marquée, de l'ordre de 15% et une grande variation moléculaire à l'intérieur de chaque individu a été enregistrée : 82%.

groupes. Une séparation suivant l'axe 1 a été constatée (cf. figure 2). Les individus des populations du Sud se distinguent ceux du Nord, plus précisément du PNA.

L'Analyse avec ACP permet de visualiser la séparation des individus analysés en deux

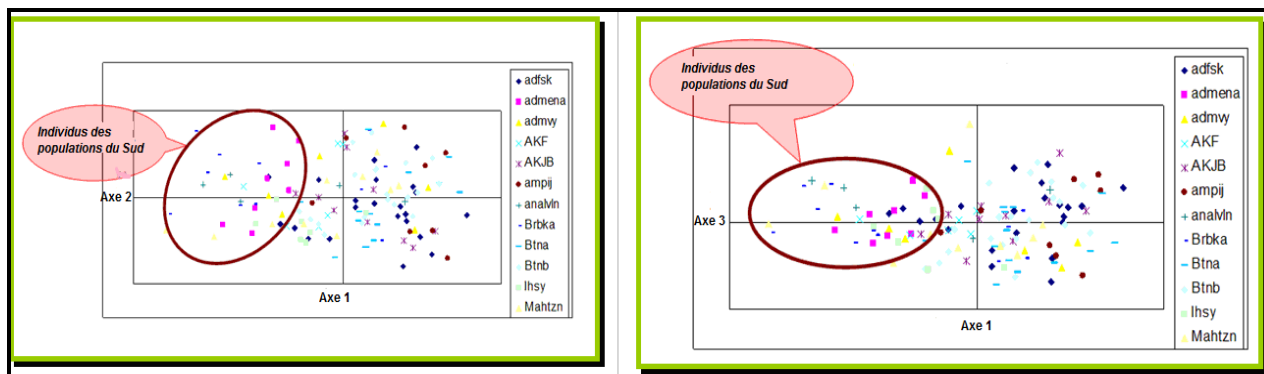


Figure 2 : Projection des individus sur le plan défini par les axes 1 et 2 (à gauche) ; 1 et 3 (à droite).

Les individus des populations sont donc regroupés selon la région d'origine. Le tableau n°7 nous montre la contribution des trois premiers axes à l'inertie totale. La première composante principale explique 25,83% de la variation totale, la deuxième 21,59% et la troisième 17,05%. Les deux plans factoriels (1 et 2) expliquant 47,42% et (1 et 3) expliquant 42,88% de la variance totale montrent clairement les deux groupes génétiques révélés par la méthode UPGMA

(Figure 3). L'axe 1 est positivement corrélé aux composantes « régions ».

Tableau 7 : Contribution des axes ACP dans la variation

Axes	1	2	3	axe 1 et 3
%	25,83	21,59	17,05	
Cum %	25,83	47,42	64,47	42,88

Des résultats similaires ont été obtenus avec la radiale phylogramme établie



avec Darwin.5 : la séparation en deux groupes a été mise en évidence. L'examen du radiale phylogramme de la totalité des populations (Figure 3) permet de distinguer deux groupes principaux. Le regroupement des individus se fait en relation avec l'origine géographique. Le premier groupe contient les individus des populations de la région du Sud.

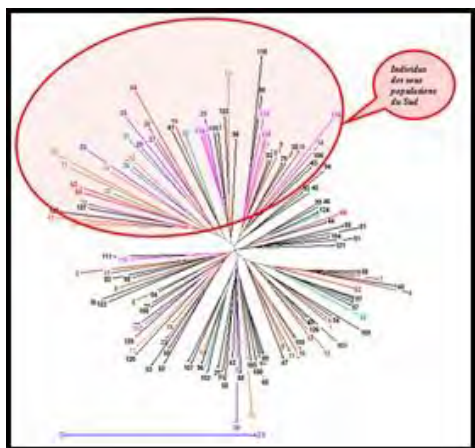


Figure n°3 : Radiale phylogramme

Le deuxième groupe comporte les individus de la région du nord c'est-à-dire du PNA. Cette répartition peut être expliquée par l'existence d'un isolement géographique et d'une base génétique différente entre les différentes populations du Nord et du Sud.

## Conclusion

Les 10 marqueurs microsatellites SSR utilisés se sont révélés discriminants dont trois de ces marqueurs sont des marqueurs d'igname cultivée *Dioscorea alata*. 128 allèles ont été découverts. Ces marqueurs nous ont permis d'identifier un très haut niveau de diversité moléculaire et génétique du *masiba*. La diversité génétique au sein de la population du *masiba* a été analysée à deux niveaux : la variabilité intra-population et la variabilité inter-population. Entre population la différenciation génétique est faible, la majorité de la diversité génétique pour cette espèce réside

certainement au niveau des individus. Les populations sont proches génétiquement. Cependant, on détermine une distribution selon un gradient Nord / Sud de la diversité moléculaire. Cette diversité moléculaire est structurée suivant l'agressivité climatique. Une différenciation génétique extrêmement faible sur le plan moléculaire a été observée au sein des populations notamment dans le PNA. *Dioscorea maciba* est dotée d'une large base génétique et d'une importante diversité moléculaire. Elle constitue sûrement une espèce potentielle et prometteuse dans l'amélioration génétique des ignames cultivées.

## Bibliographie

- Nei, M., Maruyama T. & Chakraborty R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evol.* **29**:1-10.
- Perrier de la Bâthie H. (1925). Ignames cultivées ou sauvages de Madagascar. *Rev. Bot. App. et Agr.* Col. 5 : 417-422.
- Rakotondratsima H. M., (2008). Etudes ethnobotaniques, biologiques et ecogeographiques des *Dioscorea spp* sauvages d'Ankarafantsika en vue de leur conservation, mémoire de DEA en Biologie et Ecologie Végétales, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, 136p.
- 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.
- Tostain S., Scarcelli N., Brottier P., Marchand J.-L., Pham J.-L. and Noyer J.-L., (2005). Development of DNA microsatellite markers in tropical yam (*Dioscorea sp.*).
- Tostain S., Agbangla C., Scarcelli N., Cédric M., Ogoubi D., Berthaud J. and Pham J.-L. (2007). "Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers". *PI Gen Res : Characterization and Utilization* **5**(2); 71-81.
- Wright S., (1978). "Variability within and among natural population". *Evol. and gen. of pop.* 4. University of Chicago Press.