

2m11.2994.2

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Étude de la phylogénie et la biogéographie
du genre *Hoya* (Asclepiadaceae) basée
sur l'analyse de séquences d'ITS**

par ANNE-MARIE LEMAY

Département de sciences biologiques
Faculté des Arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences biologiques

Mai 2002



© Anne-Marie Lemay, 2002

PH

302

454

2002

V.011

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de la phylogénie et la biogéographie du genre *Hoya*
(Asclepiadaceae) basée sur l'analyse de séquences d'ITS**

présenté par :
ANNE-MARIE LEMAY

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

M. Luc Brouillet.....président du jury
M. François-Joseph Lapointe.....directeur de recherche
M. Jean-Pierre Simon.....codirecteur
Mme Anne Bruneau.....membre du jury

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

Le genre *Hoya* (Asclepiadaceae : Asclepiadoideae : Marsdenieae) regroupe plus de 300 espèces de plantes épiphytes, lithophytes et arbustives du sud-est asiatique et d'Océanie. Ce genre est parmi les plus diversifiés de sa famille et possède une valeur ornementale considérable. Pourtant, très peu de connaissances ont été acquises jusqu'à ce jour sur sa phylogénie et sa biogéographie. Cette étude a été entreprise dans le but d'établir une première phylogénie moléculaire des espèces de *Hoya* et d'étudier la biogéographie du genre dans une perspective phylogénétique.

Les deux régions de l'espaceur transcrit interne (*internal transcribed spacer*, ITS) de l'ADN nucléaire ribosomal ont été séquencées pour 26 espèces de *Hoya* et trois espèces des genres *Ceropegia* et *Fockea*, qui ont servi de groupe externe (*outgroup*). Les séquences de nucléotides de ces régions ont ensuite été analysées à l'aide de différentes méthodes d'estimation phylogénétique. Les topologies des phylogénies obtenues suite à nos analyses sont très semblables. Les arbres sont bien résolus et la plupart des clades sont soutenus.

L'analyse des séquences d'ITS suggère que les espèces arbustives seraient d'origine plus ancienne que les espèces épiphytes ou lithophytes. Nos résultats montrent également que le genre serait probablement d'origine asiatique et que les espèces à large répartition auraient sans doute divergé antérieurement aux espèces endémiques. Selon ces résultats, nous croyons que le genre aurait colonisé l'Indonésie, les Philippines et l'Océanie par dispersion durant les glaciations du Pléistocène à la faveur de la baisse du

niveau des eaux et que, suite à cette période, l'isolement des îles causé par lehaussement du niveau de la mer aurait favorisé le processus de spéciation.

Mots clés : Asclepiadaceae, Asclepiadoideae, Marsdenieae, *Hoya*, ITS, séquences de nucléotides, phylogénie, biogéographie.

SUMMARY

The genus *Hoya* (Asclepiadaceae : Asclepiadoideae : Marsdenieae) is represented by ~300 species of epiphytes, lithophytes and shrubs, distributed throughout Southeast Asia and Oceania. It is one of the largest genera of the Asclepiadaceae and is of a great horticultural importance. However, little effort has been devoted to the studies of the phylogeny and the biogeography of the genus *Hoya*. The present work has been undertaken to reconstruct the first phylogeny of *Hoya* species using molecular data and to study the biogeography of the genus based on phylogenetic information.

DNA sequences of the internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear ribosomal DNA were obtained from 26 species of *Hoya* and three outgroups of the genera *Ceropegia* and *Fockea*. Phylogenies were estimated using different estimation methods. The tree topologies obtained from our analyses are very similar. The trees are well resolved and most of the clades are supported.

The analyses of ITS sequences suggest that shrubs species diverged earlier than epiphytic or lithophytic species. Our results also indicate that a putative origin of the genus in Asia is likely and that widespread species may probably have diverged earlier than endemic species. Based on these results, we believe that Hoyas have colonized Indonesia, the Philippines and Oceania by dispersal during the Pleistocene, when the sea level was low and that, subsequently, the rising of the sea level could have facilitated speciation events due to geographic isolation.

Key words : Asclepiadaceae, Asclepiadoideae, Marsdenieae, *Hoya*, ITS, nucleotide sequences, phylogeny, biogeography.

TABLE DES MATIÈRES

Page de titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Summary.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv

Introduction

1.1 Introduction générale.....	2
1.2 Position taxonomique.....	3
1.3 Historique taxonomique.....	5
1.4 Morphologie.....	7
1.5 Données chromosomiques.....	12
1.6 Répartition géographique et origine.....	12
1.7 Écologie.....	14
1.8 Importance horticole.....	17
1.9 Applications médicales.....	18
1.10 Objectifs de l'étude.....	18

Phylogeny and biogeography of the genus *Hoya* (Asclepiadaceae) based on ITS sequences

2.1	Introduction.....	23
2.2	Materials and methods.....	25
	2.2.1 <i>Taxon sampling</i>	25
	2.2.2 <i>Molecular methods</i>	28
	2.2.3 <i>Data analysis</i>	28
2.3	Results.....	30
	2.3.1 <i>Size and variation of ITS</i>	30
	2.3.2 <i>Phylogenetic analysis</i>	31
	2.3.3 <i>Biogeographical analysis</i>	32
2.4	Discussion.....	37
	2.4.1 <i>The ITS region</i>	37
	2.4.2 <i>Phylogenetic relationships</i>	37
	2.4.3 <i>Biogeography</i>	38
2.5	Conclusions.....	40
	Conclusion.....	41
	Références.....	44
	Annexes.....	xvi

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I Position taxonomique du genre <i>Hoya</i> à l'intérieur des angiospermes (tribu des Marsdenieae) – (classification tirée de Civeyrel 1996).....	4
Table II Species of <i>Hoya</i> and related genera included in the study with corresponding information on GenBank accession number and geographic range.....	26

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Fleur typique de *Hoya* en vue dorsale **(A)**, latérale **(B)** et en coupe médiane **(C)**. **(D)** Pollinaire. (Kleijn et Van Donkelaar 2001)..... **8**
- Figure 2.** Répartition géographique du genre *Hoya* (Good 1952)..... **13**
- Figure 3.** Schéma des trois sous-unités de l'ADN nucléaire ribosomal (18S, 5.8S et 26S) et des espaceurs transcrits internes (ITS 1 et ITS 2)..... **20**
- Figure 4. (A)** One of the five most parsimonious trees obtained from parsimony analysis of the combined ITS 1 and ITS 2 regions. **(B)** Average consensus tree estimated from the trees obtained from independent analyses of ITS 1 and ITS 2..... **33**
- Figure 5. (A)** Neighbor-joining tree based on Jukes-Cantor corrected distances from the combined ITS 1 and ITS 2 regions. **(B)** Average consensus tree estimated from the separate analyses of ITS 1 and ITS 2..... **35**

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
bp	Base pairs
CI	Consistency index
cm	Centimètre
°C	Degrés Celsius
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates
$2n$	Diploïde
KCl	Chlorure de potassium
L	Longueur
m	Mètre
m^2	Mètres au carré
$MgCl_2$	Dichlorure de magnésium
μl	Microlitre
μm	Micromètre
μM	Micromolaire
min	Minute
mM	Millimolaire
MYBP	Million years before present
ng	Nanogramme
p	Probabilité
PCR	Polymerase chain reaction

pH	Potentiel d'hydrogène
%	Pourcentage
r	Coefficient de corrélation
RI	Retention index
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris-HCl	Hydrochlorure tris (hydroxyméthyl) aminométhane

*Pour Serge, Lucille,
Nicolas et Jean-Philippe*

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à François-Joseph Lapointe, mon directeur de recherche (ou « guru »), pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (le LEMEE) et pour avoir assuré en partie le financement de cette étude. Je veux le remercier aussi de m'avoir fait constamment confiance et de m'avoir apporté des idées et des critiques constructives qui ont su m'aider à mener ce projet à terme. Son enthousiasme pour la recherche m'a permis d'évoluer dans un milieu de travail motivant. Mais c'est surtout pour son sens de l'humour et sa constante effervescence (parfois étourdissante!) que j'ai apprécié mon aventure dans son laboratoire, sans oublier les sorties et les innombrables discussions alimentées de culture « inutile »! Je suis également reconnaissante envers mon codirecteur, Jean-Pierre Simon, pour son support financier et son support moral. Ses mots d'encouragement m'ont aidé à garder confiance en moi.

Je souhaite aussi remercier mes collègues de travail, Claudine, Nathalie, Olivier, Pierre-Alexandre et Sarah, pour m'avoir assisté à différentes étapes de mon projet. Je tiens à remercier en particulier Nathalie pour avoir contribué à l'essor de mon travail en laboratoire, ainsi qu'Olivier et Pierre-Alexandre pour leur aide précieuse en statistique et en informatique. Je tiens aussi à remercier Sophie pour m'avoir initié à la biologie moléculaire à mon arrivée au LEMEE.

À l'extérieur du laboratoire, je tiens à souligner la très grande générosité de Dale Kloppenburg, l'éditeur de la revue *Fraterna* (la revue de l'*International Hoya Association*), qui a eu l'amabilité de me fournir de nombreux spécimens de plantes et qui

m'a donné l'occasion de publier des articles de vulgarisation. Je suis également reconnaissante envers Anne Bruneau, de l'Institut de recherche en biologie végétale, qui m'a permis d'utiliser son matériel, et envers Annie Archambault, une de ses étudiantes, qui n'a jamais hésité à me prêter main forte pour résoudre des problèmes techniques.

Sur un plan personnel, je souhaite remercier parents et amis qui m'ont apporté leur soutien durant toute cette aventure. Je tiens spécialement à remercier Anik, amie et ex-coloc, pour sa constante bonne humeur, son oreille attentive, ses mots d'encouragement, ses conseils judicieux et son aide précieuse en anglais. Je souhaite aussi adresser un merci spécial à mes parents pour leur soutien inconditionnel.

Enfin, je me dois de remercier le CRSNG d'avoir attribué des subventions de recherche à Jean-Pierre Simon et François-Joseph Lapointe, grâce auxquelles cette étude a pu être réalisée.

INTRODUCTION

1.1 Introduction générale

Les Asclepiadaceae comptent plus de 300 genres et près de 3000 espèces de plantes (Civeyrel 1996) à répartition essentiellement tropicale et subtropicale (Good 1952). Cette famille est la neuvième en importance chez les angiospermes pour le nombre de genres (Brummit 1992). Elle suscite l'intérêt des botanistes depuis très longtemps par la très grande diversité de ses formes biologiques (lianes, herbes, arbustes, cactiformes, épiphytes, etc.) et la spécialisation de son appareil floral et de son système de pollinisation (Brown 1831); les fleurs d'Asclepiadaceae sont les plus complexes de toutes les dicotylédones (Endress 1994). D'un point de vue économique, les Asclepiadaceae offrent de multiples applications à la médecine (Deepak 1995). Plusieurs sont également reconnues pour leurs qualités ornementales.

Les Asclepiadaceae ont été la cible de nombreuses recherches en systématique (voir Civeyrel 1996 et Endress et Stevens 2001). Plusieurs efforts ont été déployés entre autres pour tenter d'élucider la position taxonomique de cette famille par rapport à celle des Apocynaceae. Ce sujet est d'ailleurs devenu l'un des plus chauds à l'heure actuelle en systématique végétale (Endress et Stevens 2001). Depuis que les Asclepiadaceae ont été séparées des Apocynaceae de Jussieu (1789) par Robert Brown en 1810, les Asclepiadaceae ont été traitées comme une famille à part entière. Cependant, à la lumière des plus récentes études moléculaires et morphologiques (voir Endress et Stevens 2001), on assiste dans les nouveaux systèmes de classification à une renaissance des Apocynaceae s.l. (i.e. incluant les Asclepiadaceae) – (APG 1998; Endress et Bruyns 2000).

Cette nouvelle classification affecte toutefois les sous-familles utilisées, une problématique qui suscite également beaucoup d'intérêt chez les taxonomistes (Endress et Stevens 2001). En contrepartie, les Asclepiadaceae ont rarement été étudiées à des niveaux taxonomiques inférieurs (tribus, genres, espèces). Les opportunités de recherche ne manquent pourtant pas dans ce domaine (Endress et Stevens 2001). Avec plus de 300 espèces, le genre *Hoya* R. Br. représente sans contredit l'un des plus diversifiés de sa famille. Les Hoyas sont reconnus pour leur très grande valeur ornementale. Néanmoins, ils ont été longtemps négligés par les systématiciens, autant en ce qui concerne la délimitation du genre que la classification infragénérique. Jusqu'à ce jour, aucune étude phylogénétique n'a encore été publiée sur le genre *Hoya*.

Les prochaines sections seront consacrées à faire l'état des connaissances sur la taxonomie des Hoyas. Un portrait général sera ensuite présenté au sujet de leur morphologie, de leurs données chromosomiques, de leur répartition géographique et de leur origine, de leur écologie, de leur importance horticole et de leurs applications à la médecine. Les objectifs relatifs à cette étude seront exposés à la fin de l'introduction.

1.2 Position taxonomique

Généralement, trois sous-familles sont reconnues chez les Asclepiadaceae (Tableau 1). Celle des Asclepiadoideae possède de quatre à cinq tribus selon les auteurs (Civeyrel et al. 1998; Endress et Bruyns 2000; Endress et Stevens 2001), alors que les Periplocoideae et les Secamonoideae n'en comptent aucune. La sous-famille des Asclepiadoideae est la plus importante, avec plus de 250 genres et 2500 espèces

(Civeyrel 1996). Le genre *Hoya* est inclus dans cette sous-famille au sein de la tribu des Marsdenieae qui comprend une trentaine de genres (Endress et Bruyins 2000). Le plus grand nombre d'espèces est retrouvé chez les genres *Hoya* R. Br. (~300 espèces) et *Marsdenia* R. Br. (~250 espèces). Les autres genres de la tribu regroupent moins de 100 espèces.

Tableau I. Position taxonomique du genre *Hoya* à l'intérieur des angiospermes (tribu des Marsdenieae) – (classification tirée de Civeyrel 1996).

Classe des Angiospermes

Sous-classe des Dicotylédones

Superordre des Asteridae

Ordre des Gentianales

Sous-ordre des Apocynineae

Famille des Asclepiadaceae

Sous famille des Periplocoideae

Sous-famille des Secamonoideae

Sous-famille des Asclepiadoideae

Tribu des Fockeeae

Tribu des **Marsdenieae**

Tribu des Stapelieae

Tribu des Asclepiadeae

Tribu des Gonolobeae

Une étude phylogénétique basée sur l'analyse de caractères moléculaires et morphologiques a été réalisée récemment par Potgieter et Albert (2001) avec 152 représentants d'Apocynaceae (incluant les Asclepiadaceae), dont une espèce de *Hoya* (*H. australis*). Les résultats de cette étude suggèrent que les genres *Dischidia* R. Br. et

Micholitzia N. E. Br. représentent les groupes frères du genre *Hoya*. Les genres *Sarcobolus* R. Br, *Absolmsia* Kuntze et *Madangia* P. I. Forst., D. J. Liddle & I. M. Liddle semblent également très apparentés aux Hoyas (Schlechter 1913; Forster et al. 1998; Omlor 1998).

1.3 Historique taxonomique

Le genre *Hoya* a été décrit en 1810 par Robert Brown, qui a choisi ce nom pour rendre hommage à son ami Thomas Hoy, chef jardinier du duc de Northumberland en Angleterre de 1788 à 1809. Malgré son dévouement à l'étude des plantes, Robert Brown est surtout connu aujourd'hui dans la communauté scientifique pour avoir découvert le mouvement brownien, défini comme étant le mouvement incessant des particules microscopiques en suspension dans un liquide dû à l'agitation moléculaire.

Le nom *Hoya* fait cependant l'objet d'une controverse (Veldkamp et al. 1995; Veldkamp et Hansen 1996). Le genre aurait pu prendre le nom de *Sperlingia*, dont l'identité est attribuée à Vahl. Les deux descriptions ont été publiées pour la première fois en 1810 mais, comme la date exacte de publication du manuscrit de Vahl n'est pas connue, le nom *Hoya* a été conservé. Les Hoyas portent le nom commun *wax plant* en anglais. Les noms *wax vine*, *wax flower* et *porcelain flower* sont également utilisés à l'occasion.

Depuis la description de la première espèce, les limites du genre n'ont jamais été clairement établies. Plus de 400 espèces de *Hoya* ont été nommées jusqu'à maintenant,

incluant d'autres genres maintenant considérés comme synonymes (*Acanthostemma* Blume, *Cathetostemma* Blume, *Centrostemma* Decne., *Cyrtoceras* Bennett, *Cystidianthus* Hassk., *Otostemma* Blume, *Physostelma* Wight, *Plocostemma* Blume, *Pterostelma* Wight, *Schollia* J. F. Jacq. et *Sperlingia* Vahl) – (Forster et al. 1998). On pense cependant que le genre ne contient pas plus de 300 espèces (Forster et al. 1998; Kleijn et Van Donkelaar 2001), considérant le fait que plusieurs d'entre elles ont été décrites à plus d'une reprise.

Le grand nombre de synonymes est probablement lié à la diversité du genre et au polymorphisme de plusieurs espèces. Une approche taxonomique régionale et les contributions de nombreux auteurs à la description d'espèces peuvent aussi avoir mené à la multiplication des synonymes (Kleijn et Van Donkelaar 2001). Les contributions majeures à la description du genre *Hoya* sont attribuées à Decaisne (1844), Hooker (1885), Schlechter (1905, 1913) et King et Gamble (1907), mais plus de 80 auteurs ont également décrit des espèces de *Hoya*. Une révision taxonomique a été publiée pour les espèces de Malaisie (Rintz 1978) et d'Australie (Forster et Liddle 1990, 1991, 1992, 1996), alors que des révisions sont en cours pour les espèces des Philippines (Kloppenburg 1991), de Papouasie (Forster et Liddle 1992, 1993; Forster et al. 1995, 1997) et des Célèbes (Kleijn et Van Donkelaar 2001). Aucune monographie complète du genre *Hoya* n'a cependant été publiée jusqu'à maintenant.

La classification du genre en différentes sections est également incomplète. En outre, la seule contribution sérieuse date de près d'un siècle (Schlechter 1913) et celle-ci

mériterait d'être révisée en profondeur (Forster et al. 1998). Kloppenburg (1994) a tenté récemment de créer de nouvelles sections en se basant sur des caractères morphologiques, mais son travail n'a pas été reconnu par la communauté scientifique (voir Veldkamp et al. 1995). Les sections qu'il a proposées ne devraient donc pas être considérées comme des groupes taxonomiques naturels.

1.4 Morphologie

Les Asclepiadaceae présentent une grande variété de formes biologiques, incluant des types feuillés classiques comme des lianes, des herbes, des arbustes et des arbres (rares), ainsi que des formes plus spécialisées comme des plantes cactiformes ou succulentes, des épiphytes, des plantes à caudex et des plantes myrmécophiles (Civeyrel 1990, 1996). Elles contiennent un latex souvent laiteux (Civeyrel 1996). Leurs feuilles sont simples et entières, généralement opposées ou verticillées, parfois succulentes ou vestigiales, et elles présentent une glande nectarifère à l'insertion du pétiole sur la feuille (fonctionnelle quand la feuille est très jeune) – (Civeyrel 1990, 1996).

L'inflorescence est terminale, axillaire ou extra-axillaire, de type cymeux ou racémeux, avec des fleurs majoritairement actinomorphes et une structure florale pentamère (5 sépales soudés ou imbriqués, 5 pétales soudés, 5 étamines, 2 carpelles, 1 stigmat) – (Civeyrel 1996). Les étamines, le stigmat et les carpelles sont partiellement soudés pour former une structure complexe, la couronne ou gynostège, qui possède cinq lobes placés en alternance avec ceux de la corolle et avec les anthères (Civeyrel 1996). L'ovaire est semi-infère à supère avec deux carpelles apocarpiques, prolongés ou non

par un style, et qui possèdent une placentation marginale et un nombre variable d'ovules anatropes (Civeyrel 1996). Chaque carpelle donne naissance à un follicule rempli de graines munies d'une aigrette plumeuse pour aider à la dispersion par le vent (Civeyrel 1996). L'albumen est présent et l'embryon est droit (Civeyrel 1996). Une fleur de *Hoya* est présentée à la Figure 1 (a-c) pour illustrer les principales structures florales. Pour une connaissance plus approfondie des fleurs d'Asclepiadaceae, de nombreuses études décrivent en détail leur morphologie (Kunze 1990; Nicholas et Baijnath 1994a, 1994b, 1995a, 1995b).

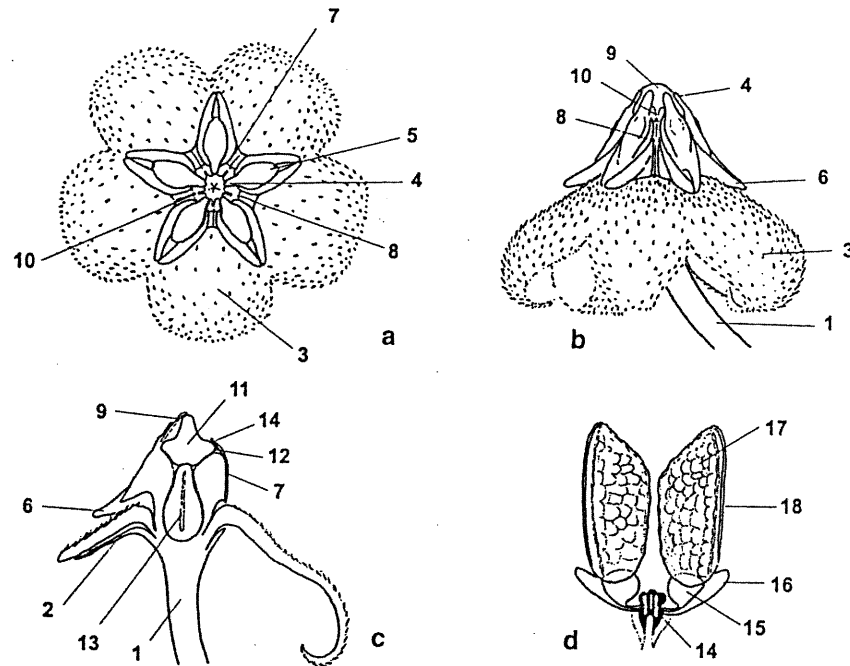


Figure 1. Fleur typique de *Hoya* en vue dorsale (A), latérale (B) et en coupe médiane (C). (D) Pollinaire. 1. Pédicelle; 2. Calice; 3. Corolle; 4. Lobe interne de la couronne; 5. Lobe externe de la couronne; 6. Prolongements de la couronne; 7. Aile de l'anthere; 8. Rail de guidage; 9. Appendice extra staminal; 10. Pollinaire; 11. Tête du stigmate; 12. Surface réceptrice du stigmate; 13. Ovaire; 14. Rétinacle; 15. Caudicule; 16. Aile du caudicule; 17. Pollinie; 18. Aile de la pollinie (Kleijn et Van Donkelaar 2001).

Le système de pollinisation des Asclepiadaceae (Brown 1831) est sans nul doute l'aspect le plus fascinant de cette famille. Le pollen est dispersé sous forme de tétrades (seulement chez certaines espèces de Periplocoideae) ou en masses compactes (les pollinies ou *pollinia*) par l'intermédiaire d'un appareil translateur (de l'anglais *translator apparatus*) d'origine stigmatique. Dans la sous-famille des Asclepiadoideae, cet appareil est composé d'un corpuscule et d'un caudicule (Civeyrel 1996). Ce dernier relie les pollinies au corpuscule et le tout forme le pollinaire ou *pollinarium* (Figure 1d). Le pollinaire est également désigné comme un *bi-pollinium* par Newton (1984) ou un *twin-pollinia* par El Ghazzar et Hamza (1973), El Ghazzar et al. (1974) et Rintz (1978).

Aucune autre famille de dicotylédones ne possède un système de pollinisation semblable. Cependant, les Orchidaceae, qui font partie des monocotylédones, sont également connues pour transférer leur pollen sous forme de pollinies vers l'insecte pollinisateur (Brown 1831). Il s'agit sans doute d'un phénomène d'évolution convergente. La morphologie et l'organisation des structures polliniques sont d'importance majeure pour la taxonomie des Asclepiadaceae. Les travaux consacrés à l'étude de la morphologie pollinique de la sous-famille des Asclepiadoideae sont nombreux (voir Tissot et Van der Ham 1994), mais le plus important reste celui de Schill et Jäkel (1978).

Le genre *Hoya* se distingue de la majorité des autres Asclepiadaceae pour s'être spécialisé en épiphytes, bien que certaines espèces puissent pousser en lithophytes (Forster et al. 1998; Kleijn et Van Donkelaar 2001). La plupart des espèces sont des

vignes qui s'enroulent en spirale autour d'un tronc ou de branches d'arbres en développant des racines sur la tige pour adhérer au substrat (Kleijn et Van Donkelaar 2001). Quelques espèces seulement ont une croissance de type arbustif avec des racines qui se développent à la base et dont le port peut être soit dressé, soit pendant lorsque l'arbuste est épiphyte (Forster et al. 1998; Kleijn et Van Donkelaar 2001).

Toutes les espèces présentent deux feuilles opposées à chaque noeud, sauf une, *H. imbricata* (cf. p.17) – (Kleijn et Van Donkelaar 2001). Elles sont pour la plupart elliptiques et acuminées, mais certaines espèces se distinguent par des feuilles de forme orbiculaire, ronde ou très allongée (Civeyrel 1990; Kleijn et Van Donkelaar 2001). Leur taille varie de 0,5 à 30 cm environ (Kleijn et Van Donkelaar 2001). Elles peuvent être glabres ou montrer divers degrés de pubescence par la présence d'un indument composé de trichomes habituellement incolores (Forster et al. 1998; Kleijn et Van Donkelaar 2001). Leur épaisseur est également très variable (Kleijn et Van Donkelaar 2001). En général, elle augmente avec l'exposition au soleil (Rintz 1978). La nervation est pennée, mais peut être difficile à déterminer pour les espèces qui possèdent des feuilles très succulentes (Kleijn et Van Donkelaar 2001). Les feuilles des épiphytes sont parfois caduques pendant la saison sèche (*H. macgillivrayi* en Australie) – (Civeyrel 1990).

Les fleurs sont disposées en ombelle sur un pédoncule inflorescentiel en position axillaire. Le pédoncule persiste entre deux floraisons (Kleijn et Van Donkelaar 2001). On distingue trois types d'ombelles : (1) plate ou concave à géotropisme positif; (2) convexe à géotropisme positif; et (3) convexe à géotropisme négatif (Rintz 1978). Le

nombre de fleurs par ombelle varie selon les espèces (Rintz 1978; Kleijn et Van Donkelaar 2001).

Le calice est petit et peut montrer divers degrés de pubescence (Rintz 1978; Forster et al. 1998). Ses lobes sont de forme lancéolée, ovée ou obovée. La corolle possède des lobes de forme aussi variable que ceux du calice et qui sont fusionnés à différents degrés selon les espèces (Forster et al. 1998). La face interne des lobes est généralement succulente et couverte d'un indument, parfois hirsute, et est souvent brillante; la face externe est généralement glabre (Rintz 1978; Forster et al. 1998). La corolle exhibe une variété impressionnante de couleurs, souvent très vives. La couronne possède cinq lobes séparés qui sont variables en forme, en taille et en couleur (Forster et al. 1998). Ces lobes sont invertis sur le bord externe; selon Forster et al. (1998), il s'agit du caractère qui distingue le mieux le genre *Hoya* des autres Asclepiadaceae. La morphologie de la corolle et de la couronne sont des caractères importants pour distinguer les espèces de *Hoya* (Rintz 1978; Forster et al. 1998; Kleijn et Van Donkelaar 2001).

La structure des pollinaires est également utile pour différencier les espèces. Rintz (1978) a décrit quatre types de pollinaires chez le genre *Hoya*, bien qu'il puisse en exister davantage (Forster et al. 1998) : (1) pollinies ailées; (2) pollinies et caudicules ailés; (3) aucune aile et caudicules longs; et (4) aucune aile et caudicules courts. Les ailes sont des appendices extra-polliniques qui interviennent dans la germination des pollinies en s'ouvrant pour former un passage aux tubes polliniques (Civeyrel 1996).

1.5 Données chromosomiques

Le nombre de chromosomes d'une quarantaine d'espèces de *Hoya* est connu (Nakamura et Yuasa 1978; Nakamura 1991, 1992, 1993; Albers et Meve 2001). Leur nombre chromosomique est $2n=22$, comme la plupart des Asclepiadaceae étudiées jusqu'ici (voir Albers et Meve 2001). Des exceptions à ce nombre ont cependant été trouvées chez *H. carnosa* (Nakamura et Yuasa 1978; Nakamura 1991).

Ce genre de données a rarement été utilisé dans la sous-famille des Asclepiadoideae pour résoudre des relations phylogénétiques à cause de la dominance d'un nombre chromosomique $2n=22$ et de la petite taille des chromosomes (Albers et Meve 2001). Les Asclepiadoideae posséderaient en moyenne les plus petits chromosomes de la famille (Albers et Meve 2001). On observe aussi une tendance à la réduction de la taille des chromosomes à l'intérieur des Marsdenieae (Albers et Meve 2001). Les genres primitifs *Marsdenia* R. Br. et *Telosma* Coville (Omlor 1998) ont des chromosomes plus grands (1.4 μm en moyenne) que ceux du genre *Hoya* (0.91 μm en moyenne), qui possède des caractères dérivés, comme une croissance épiphytisque, des feuilles succulentes, du latex clair et des pollinies ailées (Albers et Meve 2001).

1.6 Répartition géographique et origine

Le genre *Hoya* est réparti en Asie du Sud-Est et en Océanie, plus précisément des Ghates occidentales (Inde), à l'ouest, jusqu'à l'archipel des Samoa, à l'est, et de Kyushu (Japon), au nord, jusqu'en Australie, au sud, où les espèces sont surtout localisées sur les côtes humides du Cap York (Figure 2). On observe des centres de diversité importants

en Malaisie, en Indonésie, en Nouvelle-Guinée et aux Philippines (Forster et al. 1998; Kleijn et Van Donkelaar 2001).

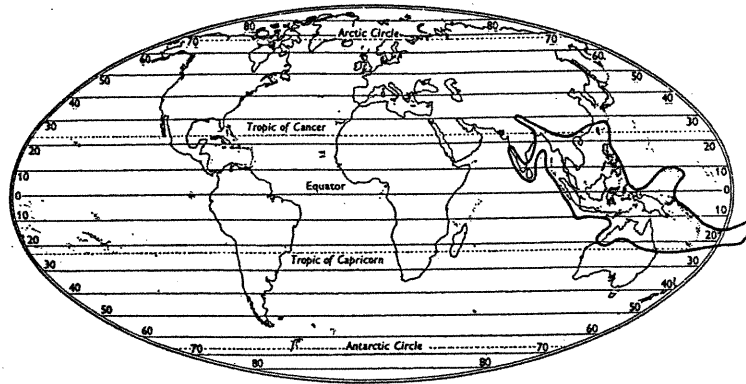


Figure 2. Répartition géographique du genre *Hoya* (Good 1952).

Comparativement à une douzaine de genres apparentés qui se répartissent en Asie et en Afrique (Good 1952), les Hoyas ne possèdent aucun représentant sur le continent africain. Selon Civeyrel (1990), c'est en Inde que l'origine du genre *Hoya* devrait être recherchée, due à la collision de ce sous-continent avec l'Asie il y a 50 millions d'années (Windley 1988). Ceci pourrait expliquer pourquoi ce groupe est exclusivement distribué en Asie et en Océanie.

Il est possible que le genre ait envahi le sud-est asiatique au Pléistocène, période durant laquelle on nota des fluctuations du niveau de la mer et des températures ainsi que des variations pluviométriques causées par une alternance de périodes glaciaires et de réchauffements (Morley et Flenley 1987; Heaney 1991). L'assèchement du plateau

continental durant les périodes glaciaires aurait permis de relier plusieurs îles de l'archipel indonésien (Morley et Flenley 1987), donnant ainsi la possibilité aux plantes de coloniser cette région.

Suite au Pléistocène, l'isolement des îles causé par lehaussement du niveau de la mer aurait favorisé le processus de spéciation. Les taux d'endémisme retrouvés en Malaisie, en Indonésie, en Nouvelle-Guinée et aux Philippines suggèrent effectivement que les événements de dispersion à grande échelle ont été rares. Les graines de *Hoya* sont munies d'une aigrette plumeuse qui leur permettent d'être transportées sur de longues distances, voire des centaines de kilomètres. Pourtant, lorsqu'elles réussissent à atteindre des îles voisines, il leur faut trouver le même type de pollinisateur, un environnement équivalent et, surtout, des représentants de la même espèce pour pouvoir se reproduire. Des données paléontologiques permettraient sans doute de mieux expliquer l'origine du genre *Hoya*, mais, malheureusement, il semble qu'aucun fossile n'ait encore été découvert pour ce groupe. De plus, les fossiles sont extrêmement rares chez les autres Asclepiadaceae (Civeyrel 1990).

1.7 Écologie

On retrouve les Hoyas principalement dans les forêts tropicales, où ils poussent pour la plupart entre 0 et 800 m, sur les arbres proche des côtes, des lacs et des rivières (Kleijn et Van Donkelaar 2001). Ils colonisent habituellement les branches primaires et secondaires et atteignent rarement la cime des arbres, probablement trop sèche pour eux (Rintz 1978; Kleijn et Van Donkelaar 2001). Les épiphytes peuvent également se

développer sur des arbustes ou au sol lorsqu'il est suffisamment riche en matières organiques (Civeyrel 1990; Forster et al. 1998). Les taxons lithophytes se rencontrent habituellement sur les collines calcaires et à l'occasion sur d'autres types de formation rocheuse (Kleijn et Van Donkelaar 2001).

Il n'est pas rare de trouver plus d'une espèce sur le même arbre, ni de rencontrer une demi-douzaine d'espèces sur un transect de 100 m le long d'une rivière ou sur une surface de 100 m² au sommet d'une colline calcaire (Rintz 1978). Dans les mangroves de Nouvelle-Guinée, les Hoyas sont parfois associés à d'autres épiphytes spécialisés, comme certaines espèces des genres *Dischidia* R. Br. (Asclepiadaceae) ou *Myrmecodia* Jack (Rubiaceae) – (Civeyrel 1990).

Quelques espèces sont restreintes à des altitudes plus élevées que 800 m. La limite maximale du genre atteint environ 1200 à 2000 m selon les régions (voir Kleijn et Van Donkelaar 2001). À ces altitudes, les Hoyas sont dispersés à travers la forêt et peuvent vivre sur des substrats très variés. Par exemple, plusieurs espèces peuvent se développer autant sur des branches couvertes de mousse que dans des crevasses rocheuses dénudées (Kleijn et Van Donkelaar 2001).

Une caractéristique écologique importante de plusieurs espèces de *Hoya* épiphytes concerne leur association avec des colonies de fourmis. La nature des relations varie selon les espèces, mais on peut distinguer quatre grandes catégories (Kleijn et Van Donkelaar 2001). (1) La relation la plus répandue implique des espèces de *Hoya* qui

poussent directement sur des nids de fourmis. Ces nids sont construits à partir de débris organiques, ce qui procure un milieu de croissance favorable pour les graines de *Hoya*. Celles-ci sont dispersées par le vent et récoltées par les fourmis qui les transportent jusqu'à leur nid. Pour cette raison, ces nids ont reçu l'appellation de jardins de fourmis (*ant gardens* en anglais). Plusieurs espèces de *Hoya* ont été observées en association avec des nids de fourmis : *H. brevialata*, *H. elliptica*, *H. lacunosa*, *H. parvifolia*, *H. picta*, *H. pubera* et *H. pusilla* (Rintz 1978; Kleijn et Van Donkelaar 2001). Comme les caractéristiques écologiques de plusieurs Hoyas ne sont pas connues, il est attendu que d'autres espèces seraient impliquées dans ce genre de relation (Kleijn et Van Donkelaar 2001).

(2) Le deuxième type d'association a été retrouvé chez seulement deux espèces des Célèbes : *H. myrmecopa* et *H. pallilimba*. Ces plantes développent leurs racines dans les cavités de troncs et de branches où logent des fourmis. Ces insectes amènent des graines de *Hoya* dans leur nid où elles peuvent germer.

Les deux autres catégories se rapportent à des espèces qui ont une adaptation de leurs feuilles procurant un abri pour les fourmis. (3) Dans un cas, les espèces présentent un dimorphisme foliaire. En plus de posséder des feuilles normales, elles développent des structures myrmécophiles ou *myrmecodomatia*. Ces structures consistent environ en cinq paires de feuilles voûtées, dont les marges s'appuient contre le tronc d'arbre de façon à produire des chambres. Un vaste réseau de racines se développe à l'intérieur de ces cavités où les fourmis déposent du matériel organique. Ce type de relation est

uniquement connu chez deux espèces : *H. darwinii* et *H. mitrata*. (4) Dans l'autre cas, toutes les feuilles de la plante sont spécialisées. Ce type de relation a été retrouvé uniquement chez *H. imbricata*, la seule espèce du genre à développer une seule feuille mature par noeud. Ses feuilles de forme orbiculaire avec une courbure convexe se chevauchent et leurs marges s'appuient contre l'écorce du tronc ou des branches. Les racines se développent uniquement sous les feuilles. Il est probable que *H. imbricata* bénéficie du matériel organique amassé par les fourmis et que, de son côté, elle procure à ses occupants un abri et de la nourriture sous forme de nectar, comme c'est le cas pour le genre *Dischidia* R. Br., chez qui ce type de spécialisation est plus commun (Rintz 1980).

1.8 Importance horticole

Les Hoyas jouissent d'une grande popularité auprès des horticulteurs amateurs. En plus d'être faciles à cultiver, ils sont reconnus pour avoir les plus belles fleurs de leur famille. Leurs fleurs délicates et lustrées sont comparables à de la porcelaine, un phénomène unique parmi les Asclepiadaceae. Ils offrent en plus une variété impressionnante de couleurs. À ce jour, plus de 200 espèces sont disponibles sur le marché (Forster et al. 1998).

Cet intérêt pour la culture des Hoyas a commencé à prendre de l'importance à la fin des années 1970 avec le travail de Rintz (1978) sur les Hoyas Malaises, la fondation de l'*Hoya Society International* en 1978 aux États-Unis et la publication trimestrielle de la revue *Hoyan* (Forster et al. 1998). En 1988, une autre association a pris son envol, la

Hoya Society, West Coast, dont le nom a par la suite changé pour l'*International Hoya Association* (IHA). Celle-ci publie la revue *Fraterna* quatre fois par année. En plus, l'IHA est associée à deux groupes de discussion, soient le *San Diego Hoya Group* (San Diego, Californie, États-Unis), dont le nom a changé récemment pour le *San Diego Exotic Plant and Hoya Group*, et le *Svenska Hoya Säl Sakapet* (Borlänge, Suède). Ces associations s'adressent aux horticulteurs de tous les niveaux. Elles fournissent de l'information autant sur la culture des Hoyas que sur leur identification.

1.9 Applications médicinales

Les applications des Asclepiadaceae à la médecine sont nombreuses (Deepak 1995). Cette famille a d'ailleurs été nommée d'après le genre *Asclepias*, tiré d'Asclépios, le dieu grec de la médecine, du fait des propriétés médicinales de ce groupe de plantes. Au sein du genre *Hoya*, au moins trois espèces sont connues pour avoir des propriétés médicinales. *Hoya australis* est utilisé aux Îles Samoa pour traiter les lésions internes, les maux de gorge, les enflures, la pneumonie, la constipation, l'inflammation, la fièvre et la filariose. On trouve également un usage pour *H. upoluensis* dans la médecine samoane pour traiter les enflures. À Sabah (Bornéo), *H. coronaria* est connu pour soigner les pancréatites et réduire les enflures.

1.10 Objectifs de l'étude

Face à une connaissance aussi réduite de la systématique du genre *Hoya*, il est clair que ce groupe a un besoin urgent d'être étudié. Ce travail a été entrepris pour tenter d'élucider les relations phylogénétiques à l'intérieur du genre *Hoya*. Étant donné le très

grand nombre d'espèces représentées dans ce groupe, il aurait été irréalisable de reconstruire la phylogénie complète du genre dans le cadre de ce travail. Au total, 26 espèces ont été échantillonnées. La sélection des taxons s'est basée sur la disponibilité des spécimens et sur leur répartition géographique.

Pour atteindre ce premier objectif, nous avons choisi d'utiliser des caractères moléculaires. Les deux sources principales d'information phylogénétique utilisées en systématique moléculaire des plantes proviennent de l'ADN chloroplastique (Olmstead et Palmer 1994) et de l'ADN nucléaire ribosomal (Knaak et al. 1990; Hamby et Zimmer 1992). Le génome mitochondrial est très peu utilisé (Palmer 1992). Chez les plantes, son faible taux d'évolution (Wolfe et al. 1987) limite son application aux études phylogénétiques.

Dans le cadre de ce projet, une analyse préliminaire a été effectuée avec l'intron *trnL* du génome chloroplastique. Cette région non codante a montré son utilité pour résoudre les relations phylogénétiques entre différentes espèces, mais le niveau de divergence entre les séquences peut varier selon les genres (Gielly et Taberlet 1994). À l'intérieur du genre *Hoya*, le niveau de variation de cette région s'est avéré insuffisant pour distinguer certaines espèces (Annexe 2).

Par contre, il a été démontré que l'espaceur transcrit interne (*internal transcribed spacer*, ITS) de l'ADN nucléaire ribosomal (Figure 3) évoluait de deux à trois fois plus rapidement que l'intron *trnL* (Gielly et Taberlet 1996). Le séquençage d'ITS a été utilisé

fréquemment pour des études au niveau interspécifique (voir Baldwin et al. 1995). Cette région se présente en plusieurs copies dans le génome nucléaire (Rogers et Bendich 1987), ce qui facilite sa détection et son amplification. De plus, l'ITS présente l'avantage de pouvoir être séquencé directement, c'est-à-dire sans avoir recours au clonage, en raison de l'uniformité de ses paralogues (Hillis et al. 1991). Ce marqueur moléculaire a donc été sélectionné pour résoudre les relations phylogénétiques entre espèces du genre *Hoya*.

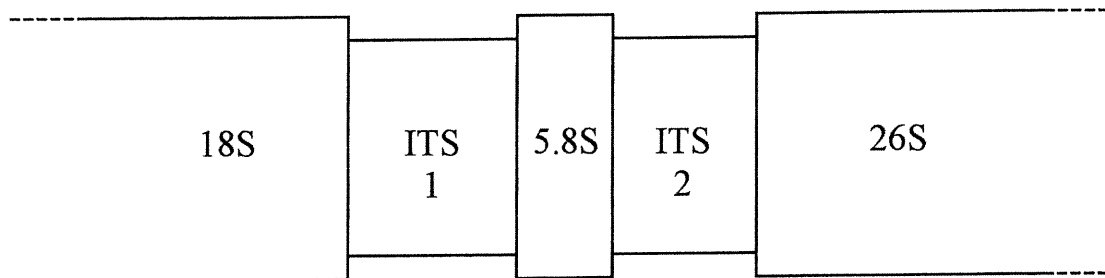


Figure 3. Schéma des trois sous-unités de l'ADN nucléaire ribosomal (18S, 5.8S et 26S) et des espaceurs transcrits internes ITS 1 et ITS 2.

Parallèlement à ce premier objectif, l'information phylogénétique extraite des séquences d'ITS fut aussi utilisée pour interpréter la biogéographie du genre *Hoya*. Le haut taux d'endémisme retrouvé au sein de ce groupe offre un système favorable à ce genre de considération. La répartition géographique des espèces à l'étude fut comparée aux distances génétiques dans le but de tester si les espèces sympatriques sont génétiquement semblables. Une attention particulière fut accordée à la position phylogénétique des espèces cosmopolites, dans l'hypothèse où celles-ci pourraient représenter des taxons primitifs.

La prochaine section de ce mémoire présente, sous forme d'article, les résultats obtenus suite à l'analyse phylogénétique des séquences d'ITS et propose une interprétation de ces résultats. À la suite de cet article, une conclusion discute de façon générale l'issue de ce travail et suggère des perspectives de recherches qui pourraient s'inscrire dans le prolongement de ce projet.

**PHYLOGENY AND BIOGEOGRAPHY OF THE
GENUS *HOYA* (ASCLEPIADACEAE)
BASED ON ITS SEQUENCES**

2.1 Introduction

The genus *Hoya* R. Br. is composed of approximately 300 species (Forster et al. 1998; Kleijn and Van Donkelaar 2001), making it one of the largest genera of the Asclepiadaceae (Asclepiadoideae: Marsdenieae). It is distributed throughout Southeast Asia, North Australia and Pacific islands (Good 1952), with main centers of species diversity in Indonesia, Malaysia, New Guinea and the Philippines (Forster et al. 1998; Kleijn and Van Donkelaar 2001). Hoyas are primarily growing as epiphytes in lowland rainforests along rivers, lakes and sea shores, although some species may occur as lithophytes on rock outcrops (Forster et al. 1998; Kleijn and Van Donkelaar 2001). Most species are twining vines that produce adventitious roots with which they adhere to their substrate, but some species grow as erect or pendulous, non-twining shrubs (Forster et al. 1998; Kleijn and Van Donkelaar 2001). They typically exhibit two opposite leaves at each node, and these leaves can be herbaceous to extremely succulent (Kleijn and Van Donkelaar 2001). The flowers are arranged in umbels positioned on peduncles at the nodes (Kleijn and Van Donkelaar 2001).

Hoyas are very popular among horticultural hobbyists, especially for their attractive and colorful star-shaped flowers, that look like porcelain. About 200 species are currently available on the market (Forster et al. 1998). However, despite their horticultural importance, Hoyas have been much neglected by systematists.

Since the original description of the genus *Hoya* (Brown 1810), the characters defining the group have never been clearly identified. Nearly 400 names have been

published in this genus which probably does not contain more than 300 species (Forster et al. 1998; Kleijn and Van Donkelaar 2001), including some yet to be discovered. Previous revisions have been proposed only for the Peninsular Malaysian (Rintz 1978) and Australian species (Forster and Liddle 1990, 1991, 1992, 1996), but some revisions are underway for the Philippines (Kloppenburg 1991), Papuasias (Forster and Liddle 1992, 1993; Forster et al. 1995, 1997), and Sulawesi (Kleijn and Van Donkelaar 2001). To date, no complete monographic treatment has been published on the genus *Hoya*.

At the infrageneric level, the classification of the genus into sections is far from being satisfactory. The first serious contribution, made by Schlechter (1913), is now outdated (Forster et al. 1998). An attempt was recently made by Kloppenburg (1994) to create new sections based on morphology. However, the sections that he proposed should not be regarded as effective combinations, because his manuscript is not a valid publication (see Veldkamp et al. 1995). Several phylogenetic analyses have been conducted on Asclepiadaceae, based on morphological and molecular characters (e.g. Endress and Albert 1995; Sennblad and Bremer 1996; Civeyrel et al. 1998; Potgieter and Albert 2001), but to date, no extensive phylogenetic study has been published on *Hoyas* alone. It is clear that taxonomic and phylogenetic studies are badly needed to clarify the infrageneric classification of the genus *Hoya*.

Sequences of the internal transcribed spacers (ITS 1 and ITS 2) of the nuclear ribosomal DNA have proven to be useful to resolve phylogenetic relationships below the generic level in several angiosperm groups (e.g. Baldwin et al. 1995; Yuan et al. 1996;

Jeandroz et al. 1997). The numerous copies of ITS regions in the nuclear genome of plants (Rogers and Bendich 1987) make it easy to detect and amplify. Additionally, the uniformity of ITS paralogues attributed to a rapid concerted evolution (e.g. Hillis et al. 1991) allows for direct sequencing of PCR products (e.g. Baldwin 1992; Soltis et al. 1996).

The present work has been undertaken to study the phylogeny of the genus *Hoya*. ITS sequences were used to estimate the relationships among 26 species of *Hoya* and three outgroups. A combined analysis of the ITS 1 and ITS 2 regions was conducted, in addition to separate analyses, using parsimony and neighbor-joining algorithms. The molecular sequences were further used to test and discuss specific distribution hypotheses.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Taxon sampling

Leaf samples from 26 Hoyas and three outgroup species obtained from cultivated plants were used in the present study (Table 2). Ingroup selection was carried out according to the species availability, while trying to maximize the geographic range covered. In order to compare phylogenetic patterns with biogeography, we selected a large number of species endemic to a single island or country (17) and a lower proportion of widespread species (9). Representatives of the genera *Ceropegia* L. and *Fockea* Endl. were chosen as outgroups from related tribes, based on recent phylogenetic studies (Sennblad and Bremer 1996; Potgieter and Albert 2001).

Table II. Species of *Hoya* and related genera included in the study with corresponding information on GenBank accession number and geographic range.

Species ^a	GenBank accession no. ITS 1 / ITS 2	Geographic range ^b
<i>Hoya australis</i> R. Br. ex Traill ^c	AF506122 / AF506151	AUS, BOU, FIJ, SAM, SOL, TON, VAN
<i>Hoya bella</i> Hook.	AF506123 / AF506152	BUR
<i>Hoya bilobata</i> Schltr.	AF506124 / AF506153	PHIL
<i>Hoya cardiophylla</i> Ridl.	AF506125 / AF506154	PHIL
<i>Hoya carnososa</i> R. Br.	AF506126 / AF506155	CHI, HK, JAP, TAI, VIET
<i>Hoya cinnamomifolia</i> Hook. ^c	AF506127 / AF506156	JAV
<i>Hoya crassipes</i> Turcz.	AF506128 / AF506157	JAV
<i>Hoya cumingiana</i> Decne.	AF506129 / AF506158	JAV, PHIL
<i>Hoya curtisii</i> King & Gamble	AF506130 / AF506159	PM
<i>Hoya diversifolia</i> Blume	AF506131 / AF506160	BOR, BUR, CAM, JAV, LAO, MOL, PM, SUM, THA, VIET
<i>Hoya finlaysonii</i> Wight	AF506132 / AF506161	BOR, JAV, PM, SUM, THA
<i>Hoya glabra</i> Schltr.	AF506133 / AF506162	BOR
<i>Hoya kerrii</i> Craib	AF506134 / AF506163	LAO, THA, VIET
<i>Hoya leucorhoda</i> Schltr.	AF506135 / AF506164	NG
<i>Hoya limoniaca</i> S. Moore	AF506136 / AF506165	NC
<i>Hoya loheri</i> Kloppenb. ^c	AF506137 / AF506166	PHIL
<i>Hoya merrillii</i> Schltr.	AF506138 / AF506167	PHIL
<i>Hoya multiflora</i> Blume	AF506139 / AF506168	BOR, BUR, CAM, CHI, JAV, LAO, MOL, PHIL, PM, SUL, SUM, SUN, THA, VIET
<i>Hoya neo-ebudica</i> Guillaumin	AF506140 / AF506169	VAN
<i>Hoya nicholsoniae</i> F. Muell.	AF506141 / AF506170	AUS
<i>Hoya obovata</i> Decne.	AF506142 / AF506171	JAV, LAO, THA, VIET
<i>Hoya pentaplebia</i> Merr. ^c	AF506143 / AF506172	PHIL
<i>Hoya polystachia</i> Blume	AF506144 / AF506173	BOR, JAV, PM, SUM, THA
<i>Hoya pubera</i> Blume	AF506145 / AF506174	JAV
<i>Hoya verticillata</i> (Vahl) G. Don ^d	AF506146 / AF506175	BAN, BOR, BUR, CAM, IND, JAV, LAO, PM, SUL, SUM, THA, VIET
<i>Hoya vitellinoides</i> Bakh.	AF506147 / AF506176	JAV
<i>Ceropegia helicoides</i> E. A. Bruce & Bally	AF506149 / AF506177	
<i>Ceropegia radicans</i> Schltr.	AF506150 / AF506178	
<i>Fockea tugelensis</i> N. E. Br. ^c	AF506148 / AF506179	

^a Leaf samples were obtained from plants cultivated by D. Kloppenburg (6427 N. Fruit Ave, Fresno CA 93711, USA) and Lauray of Salisbury (432 Undermountain Road, Rt 41, Salisbury CT 06068-1102, USA).

^b AUS=Australia; BAN=Bangladesh; BOR=Borneo; BOU=Bougainville; BUR=Burma; CAM=Cambodia; CHI=China; FIJ=Fiji; HK=Hong Kong; IND=India; JAP=Japan; JAV=Java; LAO=Laos; MOL=Moluccas; NC=New Caledonia; NG=New Guinea; PM=Peninsular Malaysia; PHIL=Philippines; SAM=Samoa; SOL=Solomon; SUL=Sulawesi; SUM=Sumatra; SUN=Sunda; TAI=Taiwan; THA=Thailand; TON=Tonga; VAN=Vanuatu; VIET=Vietnam.

^c The ITS 1 region was amplified using the ITS 5 and ITS 2 primers (White et al. 1990); all other species were amplified using the ITS 2 and 17 SE (Sun et al. 1994) primers.

^d According to Veldkamp et al. (1995), *H. verticillata* (Vahl) G. Don is the correct name for *H. parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight.

2.2.2 Molecular methods

Total DNA was isolated from fresh, frozen or silica gel-dried leaves using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc.). The ITS 1 region was amplified in six species using the ITS 5 and ITS 2 primers (White et al. 1990), whereas all other species were amplified using the ITS 2 and 17 SE (Sun et al. 1994) primers (Table 2). The ITS 2 region was amplified using the ITS 3 and ITS 4 primers (White et al. 1990) for all species. The PCR reactions contained 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 2.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 50 mM KCl, 0.05 mM of each dNTP, 0.2 to 0.4 μM of each primer, 1.25 units of *Taq* DNA Polymerase and 90-120 ng of template DNA in a 50 μl total volume. The thermocycling profile started with 94°C for 3 min, followed by 35 iterations of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min. A final extension step at 72°C for 7 min completed the amplification. PCR products were purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc.) and used directly for the cycle sequencing reactions. Sequencing was performed with the BigDye terminator chemistry (PE Applied Biosystems) and samples were run on an ABI 310 automated sequencer.

2.2.3 Data analysis

Sequences were aligned using the program Clustal X (Thompson et al. 1997) with further visual adjustments to minimize the number of gaps. Sequence boundaries of ITS 1 and ITS 2 were determined by comparing their sequence alignments to other Asclepiadaceae sequences obtained from GenBank (the aligned ITS matrices are available upon request from the authors).

Phylogenies were estimated in a total-evidence framework from the combined ITS 1 and ITS 2 sequences using both the Fitch parsimony (assuming unordered character states) and the neighbor-joining (NJ: Saitou and Nei 1987) methods implemented in PAUP* version 4 (Swofford 1999). The parsimony analysis was conducted using the branch-and-bound algorithm (Hendy and Penny 1982). Bootstrap support values (Felsenstein 1985) were calculated from 1000 replicates submitted to a heuristic algorithm with tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping and maxtrees set to 1000. The NJ method was applied to Jukes-Cantor corrected distances (Jukes and Cantor 1969), with collapsed negative branch lengths. Bootstrap support values of the NJ tree were also determined from 1000 replicates.

In addition to the total-evidence analysis, separate trees were independently estimated from ITS 1 and ITS 2 sequences using the same methods as described above. The resulting phylogenies were then combined using the average consensus procedure (Lapointe and Cucumel 1997), which takes branch length into account. In cases of multiple parsimonious trees, an average consensus of those phylogenies was computed prior to combining the results of separate analyses.

Topological congruence was assessed by comparing trees derived from combined and separate analyses. Similarly, trees obtained with parsimony or NJ were compared topologically. Bootstrap support was accounted for in these comparisons by collapsing all weakly-supported nodes (i.e. with bootstrap value smaller than 50%) in the corresponding trees (see Levasseur and Lapointe 2001).

To determine the relationships between phylogenetic patterns and biogeography, species groups were compared with respect to their distribution ranges. A Mantel test (1967) was computed to correlate genetic distances among pairs of species to a matrix of geographical proximities; that matrix was assembled from a binary table containing information about the presence of each species in different regions using the Sørensen's coefficient (1948). It was further converted to distances by subtracting similarity values from one. All computations were made with the R Package version 4.0 d5 (Casgrain and Legendre 2001).

2.3 Results

2.3.1 Size and variation of ITS

Within the genus *Hoya*, the length of ITS 1 ranged from 241 to 252 bp. Its length was 240, 245 and 255 bp for *Ceropegia radicans*, *Ceropegia helicoides* and *Fockea tugelensis* respectively. The length of ITS 2 varied from 229 to 235 bp among *Hoya* species, while a length of 214 bp was obtained for *C. radicans*, 213 bp for *C. helicoides* and 227 bp for *F. tugelensis*. All sequences are available from GenBank (Table 2). The sequence alignment produced 266 and 242 sites for ITS 1 and ITS 2 respectively. Of these aligned positions, five sites were excluded from the ITS 2 region because of alignment ambiguity. A total of 277 variable sites from the combined sequences were thus used for phylogenetic analysis, including 170 informative ones (85 in each region). For the genus *Hoya* alone, 129 sites were variable and 79 were phylogenetically informative (43 for ITS 1 and 36 for ITS 2). Pairwise sequence divergence were determined for the combined ITS 1 and ITS 2 regions using the Jukes-Cantor model of

sequence evolution. Within *Hoya*, divergence values ranged from 0.2 to 11.1% (mean: 5.8%). The sequence divergence between outgroups and *Hoya* species ranged from 36 to 50% (mean: 42%).

2.3.2 Phylogenetic analysis

The parsimony analysis of the combined sequences produced five equally parsimonious trees (L=496; CI=0.740; RI=0.737). One of these phylogenies is presented in Fig. 4a with corresponding bootstrap values. A single clade was unresolved in that tree, as well as in the other four equally parsimonious topologies. The five trees differed topologically from one another with respect to the resolution of the *H. multiflora* clade and the placement of *H. pubera* and *H. carnososa*.

Separate analyses of the two regions produced a pair of equally parsimonious trees for ITS 1 (L=274; CI=0,752; RI=0,766) and four trees, representing two distinct islands, in the case of ITS 2 (L=212; CI=0,759; RI=0,745). Average consensus trees were thus independently estimated from ITS 1 trees and from ITS 2 trees. The consensus resulting from the further combination of those two consensus trees is shown in Fig. 4b. That consensus tree is topologically congruent with the total-evidence tree (Fig. 4a), except for the *H. multiflora* clade and the relative position of *H. carnososa* and *H. pubera*. When weakly-supported nodes were collapsed in the total-evidence tree, a single topological discrepancy was found within the *H. multiflora* clade.

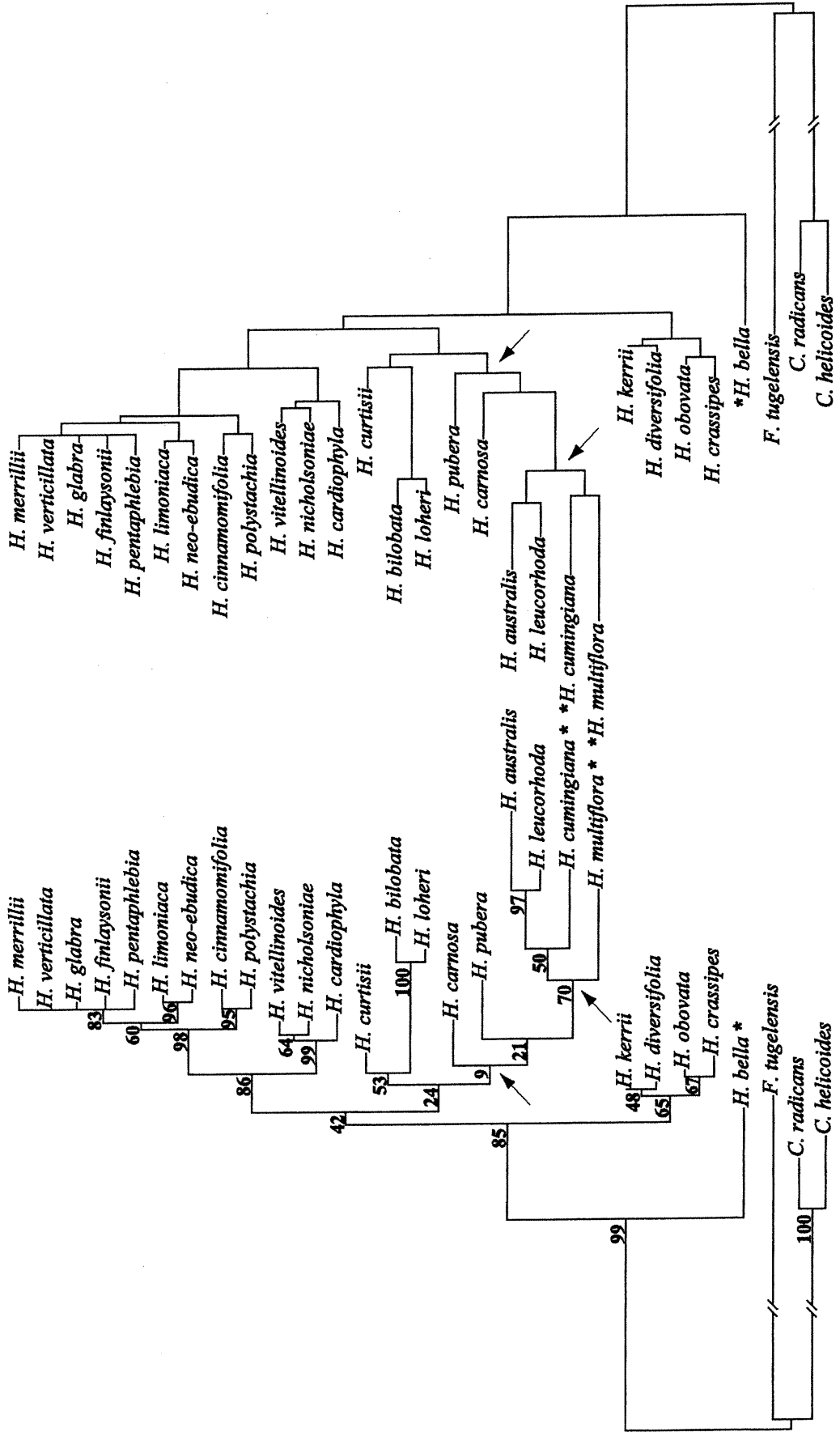
The NJ tree resulting from the total-evidence analysis is shown in Fig. 5a with corresponding bootstrap values. The average consensus tree estimated from separate analyses of ITS 1 and ITS 2 regions is depicted in Fig. 5b. The topologies of these two trees only differ by the resolution of the *H. pentaplebia* and *H. pubera* clades. When weakly-supported nodes were collapsed in the total-evidence tree, the trees became perfectly compatible.

The topologies of the total-evidence trees obtained with parsimony (Fig. 4a) and NJ (Fig. 5a) were somewhat different. Topological incompatibilities involved the *H. multiflora*, *H. kerrii* and *H. obovata* clades. The corresponding consensus trees (Figs. 4b and 5b) were even less congruent. Discrepancies involved the same group of species, in addition to the position of *H. curtisii*, *H. pubera* and *H. carnososa*.

2.3.3 Biogeographical analysis

The mapping of geographical distribution onto the phylogenetic trees did not provide much information about biogeographical affinities among the species included in this study. The Mantel test revealed that the species distribution range was not significantly correlated with the genetic distances computed from combined distances ($r=0.066$, $p=0.215$, 999 permutations).

Figure 4. (A) One of the five most parsimonious trees obtained from parsimony analysis of the combined ITS 1 and ITS 2 regions. Numbers above branches indicate bootstrap support values from 1000 replicates. **(B)** Average consensus tree estimated from the trees obtained from independent analyses of ITS 1 and ITS 2. The arrows indicate the topological discrepancies between the two trees and asterisks designate shrubs species.

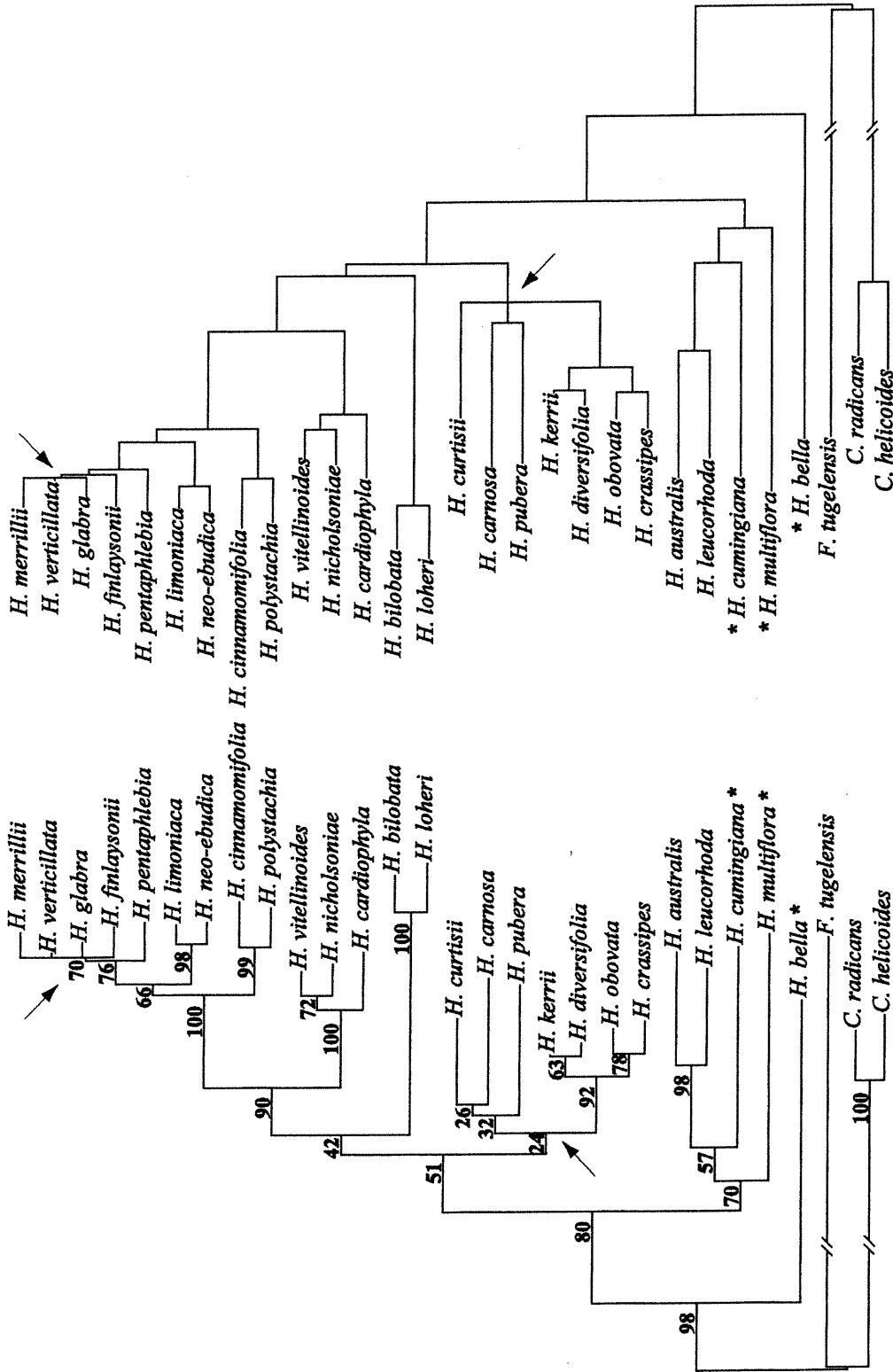


— 5 changes

A

B

Figure 5. (A) Neighbor-joining tree based on Jukes-Cantor corrected distances from the combined ITS 1 and ITS 2 regions. Numbers above branches indicate bootstrap support values from 1000 replicates. **(B)** Average consensus tree estimated from the separate analyses of ITS 1 and ITS 2. The arrows indicate the topological discrepancies between the two phylogenies. In figure B, these arrows also correspond to negative branch lengths set to zero for representation. Asterisks designate shrubs species.



0.01 substitution/site

A

B

2.4 Discussion

2.4.1 The ITS region

The sizes of ITS 1 and ITS 2 sequences lie within the range of those reported previously for other angiosperm families (see Baldwin et al. 1995). For all taxa surveyed in the present study, the ITS 1 region was longer than the ITS 2; this is consistent with the sequences available from other species of Asclepiadaceae (Jackson et al. 1999; Meve and Liede 2001). Furthermore, the pairwise sequence divergence and the number of informative sites retrieved among *Hoya* species are comparable to those observed in other plant genera (e.g. Bayer et al. 1996; Kelly 1998).

2.4.2 Phylogenetic relationships

The high degree of topological congruence obtained by comparing total-evidence and consensus trees was not surprising. It has been shown that when branch lengths are taken into account when combining trees, total-evidence and consensus trees seldom differ (Lapointe et al. 1999; Levasseur and Lapointe 2001). In contrast, when a topological consensus method, such as the strict consensus (Sokal and Rohlf 1981), was used to combine the separate trees obtained from ITS 1 and ITS 2 sequences, more than half of the clades were unresolved (tree not shown).

Several clades were supported by the various analyses and include (1) the *H. pentaphlebia* clade; (2) the *H. cardiophyla* clade; (3) the *H. limoniaca* and *H. neoebudica* clade; (4) the *H. cinnamomifolia* and *H. polystachia* clade; (5) the *H. bilobata* and *H. loheri* clade; (6) the *H. australis*, *H. leucorhoda*, *H. cumingiana* and

H. multiflora clade; as well as (7) the *H. kerrii*, *H. diversifolia*, *H. obovata* and *H. crassipes* clade. Moreover, the clades 1, 2, 3 and 4 were always associated together in the total-evidence and consensus trees regardless of the method considered.

Other phylogenetic relationships were generally weakly supported and this lack of support is likely due to short internodes relative to the lengths of terminal branches. For instance, the various positions of *H. pubera*, *H. carnososa* and *H. curtisii* in the different trees can be explained by the short branches, as shown by the low bootstrap support. Additional taxa could be used to improve such results, but stronger relationships could also be obtained by considering more characters (e.g. Graybeal 1998; Bremer et al. 1999).

2.4.3 Biogeography

Although the Mantel test revealed that the species distribution range was not significantly correlated with the genetic distances, a low sequence divergence (varying from 0.2 to 1.7%) was obtained between several combinations of species with overlapping or identical distributions: (1) *H. merrillii* and *H. pentaplebia* (Philippines); (2) *H. bilobata* and *H. loheri* (Philippines); (3) *H. finlaysonii*, *H. glabra* and *H. verticillata* (Borneo); (4) *H. polystachia* and *H. cinnamomifolia* (Java); (5) *H. kerrii*, *H. diversifolia* and *H. obovata* (Laos, Thailand and Vietnam); and (6) *H. diversifolia*, *H. obovata* and *H. crassipes* (Java). These values suggest that such groups may have diverged recently, independently from other geographical groups. Nevertheless, some species groups (e.g. *H. limoniaca* and *H. neo-ebudica*) with distinct distribution ranges

(New Caledonia and Vanuatu respectively) also exhibited low sequence divergences (0.6%).

Surprisingly, the sequence divergence between the two species pairs from the Philippines (*H. merrillii* and *H. pentaphlebia* vs. *H. bilobata* and *H. loheri*) was relatively high (7.2%) compared to the divergence obtained among all *Hoya* species (5.8%). *Hoya cardiophylla*, also from the Philippines, exhibited a sequence divergence of 4.4% with the *H. merrillii* group and 6.9% with the *H. bilobata* group. Accordingly, this species was positioned between the two groups in our phylogenies. The species from Java (*H. cinnamomifolia*, *H. crassipes*, *H. pubera* and *H. vitellinoides*) were even more dispersed in the phylogenetic trees. Given these results, it is likely that the flora of the Philippines and Java may have multiple origins. In the case of Java, this interpretation is consistent with the hypothesis of Van Steenis (1972), saying that the mountain flora of Java reflects both Asian and Australian origins.

In all analyses, *H. bella* was located at the base of the *Hoya* clade. This species grows as an epiphytic shrub with a non-twining and pendulous habit. Other shrubs species considered were the non-twining and erect *H. multiflora* and *H. cumingiana*. A high average sequence divergence was observed between these shrubs species and other species of *Hoya* (9.8% for *H. bella*, 8.0% for *H. multiflora* and 7.7% for *H. cumingiana*). We therefore propose that shrubs could represent the primitive type in the genus *Hoya*. An expanded sampling including other shrubs species would be needed, however, to test this assertion.

According to the basal position of *H. bella*, a species from Burma, the origin of the genus could have occurred on the Asian continent with further expansion into Indonesia, the Philippines and Oceania. Based on sequence divergence values, species widely distributed in the Indonesian archipelago (*H. multiflora*: 8.0%) and Oceania (*H. australis*: 7.7%) appear to have diverged earlier than endemic species (e.g. *H. vitellinoides*: 5.0%; *H. glabra*: 4.6%). We believe that Hoyas probably colonized these regions by dispersal, when many islands of the archipelago were connected during the Pleistocene (Morley and Flenley 1987); subsequently, the higher sea levels could have facilitated speciation events due to geographic isolation.

2.5 Conclusions

ITS sequences have proven to be useful for resolving phylogenetic relationships among species of *Hoya*. Only few topological discrepancies were observed between the trees obtained with different methods of phylogenetic analysis and by comparing total-evidence and consensus trees. However, we believe that additional information would lead to a better resolution of the problematic basal relationships. A putative origin of the genus *Hoya* on the Asian continent, followed by a dispersion to Indonesia, the Philippines and Oceania during the Pleistocene glaciations is likely, but other hypotheses could be tested with more extensive sampling. Including other species of shrubs, suspected to represent the primitive type in the genus, could also provide valuable insight about the origin and diversification of Hoyas.

CONCLUSION

Les séquences d'ITS ont permis d'établir de façon claire les relations phylogénétiques entre les 26 espèces de *Hoya* sélectionnées pour ce projet. Cette étude constitue sans aucun doute une étape importante dans l'avancement des connaissances sur la systématique de ce genre. En effet, la phylogénie que nous proposons est la première à traiter exclusivement du genre *Hoya*. La congruence topologique des arbres générés à l'aide des différentes méthodes d'estimation vient appuyer nos conclusions phylogénétiques. Néanmoins, d'autres caractères et/ou taxons seront nécessaires pour mieux définir les relations ancestrales. L'utilisation de caractères morphologiques, combiné avec d'autres séquences d'ADN, permettrait probablement d'atteindre cet objectif. Dans le futur, il serait souhaitable aussi d'inclure à l'étude des genres plus apparentés au genre *Hoya* que les genres *Ceropegia* et *Fockea*, comme des espèces de *Dischidia*, afin de tester si le genre *Hoya* est monophylétique.

L'information contenue dans les séquences d'ITS a permis d'émettre des hypothèses quant à l'origine et la diversification du genre *Hoya*. Il semble probable que celui-ci origine de l'Asie et qu'il ait colonisé progressivement l'Indonésie, les Philippines et l'Océanie durant le Pléistocène. Les données moléculaires suggèrent également que des colonisations multiples soient responsables de la diversité des espèces retrouvées aux Philippines et à Java. Les arbustes représentent probablement la forme primitive de ce groupe. Afin de tester les hypothèses proposées dans cette étude, un échantillonnage incluant des espèces endémiques provenant de toutes les régions et d'autres espèces arbustives sera nécessaire.

En plus des analyses déjà proposées, il est impératif qu'une monographie complète et qu'une classification en sections du genre *Hoya* soient réalisées. Les recherches doivent aussi se poursuivre sur le terrain, puisqu'il reste probablement plusieurs espèces encore à découvrir. Face à la destruction massive de la forêt asiatique, plusieurs espèces sont menacées d'extinction ou ont probablement déjà disparu (Forster et al 1998; Kleijn et Van Donkelaar 2001). Il est temps d'envisager sérieusement une étude approfondie de la systématique du genre *Hoya*. Une meilleure connaissance des relations phylogénétiques entre espèces permettrait de mieux comprendre l'histoire biogéographique de l'Asie du Sud-Est et de l'Océanie.

RÉFÉRENCES

- Albers F., Meve U. (2001)** A karyological survey of Asclepiadoideae, Periplocoideae, and Secamonoideae, and evolutionary considerations within Apocynaceae s.l. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 88: 624-656.
- APG (1998)** An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 85: 531-553.
- Baldwin B. G. (1992)** Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in Plants: an example from the Compositae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 3-16.
- Baldwin B. G., Sanderson M. J., Porter J. M., Wojciechowski M. F., Campbell C. S., Donoghue M. J. (1995)** The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Bayer R. J., Soltis D. E., Soltis P. S. (1996)** Phylogenetic inferences in *Antennaria* (Asteraceae: Gnaphalieae: Cassiniinae) based on sequences from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Am. J. Bot.* 83: 516-527.
- Bremer B., Jansen R. K., Oxelman B., Backlund M., Lantz H., Kim K.-J. (1999)** More characters or more taxa for a robust phylogeny – case study from the coffee family (Rubiaceae). *Syst. Biol.* 48: 413-435.
- Brown R. (1810)** *Prodromus Florae Novae Hollandiae et Insulae van Diemen*. London. Reprinted in C. G. D. Nees von Esenbeck (ed., 1827), *Robert Brown's vermischte botanische Schriften* 3, issued 1828 as a separate work, Nuremberg.
- Brown R. (1831)** On the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadeae. *Trans. Linn. Soc. Bot. London* 16: 685-745.

- Brummit R. K. (1992)** Vascular plant families and genera. Royal Botanical Garden, Kew.
- Casgrain P., Legendre P. (2001)** The R Package for multivariate and spatial analysis, version 4.0 d5 user's manual. Département de sciences biologiques, Université de Montréal. <http://www.fas.umontreal.ca/BIOL/legendre>.
- Civeyrel L. (1990)** Recherche bibliographique sur la systématique et la répartition du genre *Hoya* (Asclepiadaceae). Mémoire de pré-initiation à la recherche, Université de Montpellier, France.
- Civeyrel L. (1996)** Phylogénie des Asclepiadaceae: approche palynologique et moléculaire. PhD Thesis, Université de Montpellier, France.
- Civeyrel L., Le Thomas A., Ferguson K., Chase M. W. (1998)** Critical reexamination of palynological characters used to delimit Asclepiadaceae in comparison to the molecular phylogeny obtained from plastid *matK* sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9: 517-527.
- Decaisne J. (1844)** Asclepiadaceae. In: De Candolle A. P. (ed.) *Prodromus Systematis Naturalis*, 8: 490-665.
- Deepak D. (1995)** Phytochemistry of Indian Asclepiadaceae. In: Kiew R. (ed.) *The taxonomy and phytochemistry of the Asclepiadaceae in tropical Asia*. Universiti Pertanian Malaysia and Botany 2000 Asia, pp. 33-44.
- El-Ghazzar A., Hamza M. K. (1973)** Morphology of the twin pollinia of Asclepiadaceae. *Pollen et Spores* 15: 459-470.
- El-Ghazzar A., Hamza M. K., Badawi A. A. (1974)** Pollen morphology and taxonomy of Asclepiadaceae. *Pollen et Spores* 16: 227-238.

- Endress M. E., Albert V. A. (1995)** A morphological cladistic study of Apocynaceae: trends in character evolution within a broadened familial circumscription. *Am. J. Bot.* 82 (6, Abstracts): 127.
- Endress M. E., Bruyns P. V. (2000)** A revised classification of the Apocynaceae s.l. *Bot. Rev.* 66: 1-56.
- Endress M. E., Stevens W. D. (2001)** The renaissance of the Apocynaceae s.l.: recent advances in systematics, phylogeny, and evolution: introduction. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 88: 517-522.
- Endress P. K. (1994)** Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge.
- Felsenstein J. (1985)** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Forster P. I., Liddle D. J. (1990)** *Hoya* R. Br. (Asclepiadaceae) in Australia: an alternative classification. *Austrobaileya* 3: 301-307.
- Forster P. I., Liddle D. J. (1991)** Variation in *Hoya australis* R. Br. ex Traill (Asclepiadaceae). *Austrobaileya* 3: 541-547.
- Forster P. I., Liddle D. J. (1992)** Taxonomic studies on the genus *Hoya* R. Br. (Asclepiadaceae) in Papuaasia, 1-5. *Austrobaileya* 3: 627-641.
- Forster P. I., Liddle D. J. (1993)** Taxonomic studies on the genus *Hoya* R. Br. (Asclepiadaceae: Marsdenieae) in Papuaasia, 6. *Austrobaileya* 4: 51-55.
- Forster P. I., Liddle D. J. (1996)** *Hoya* (Asclepiadaceae). In: Wilson A. (ed.) *Flora of Australia*. CSIRO Publications, Melbourne, 28: 231-237.

- Forster P. I., Liddle D. J., Liddle I. M. (1995)** Taxonomic studies on the genus *Hoya* R. Br. (Asclepiadaceae: Marsdenieae) in Papuaasia, 7. *Austrobaileya* 4: 401-406.
- Forster P. I., Liddle D. J., Liddle I. M. (1997)** *Madangia inflata* (Asclepiadaceae: Marsdenieae), a new genus and species from Papua New Guinea. *Austrobaileya* 5: 53-57.
- Forster P. I., Liddle D. J., Liddle I. M. (1998)** Diversity in the genus *Hoya* (Asclepiadaceae–Marsdenieae). *Aloe* 35: 44-48.
- Gielly L., Taberlet P. (1994)** The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Mol. Biol. Evol.* 11: 769-777.
- Gielly L., Taberlet P. (1996)** A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast *trnL*^(UAA) intron sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 120: 57-75.
- Good R. (1952)** An atlas of the Asclepiadaceae. *New Phytol.* 51: 198-209.
- Graybeal A. (1998)** Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Syst. Biol.* 47: 9-17.
- Hamby R. K., Zimmer E. A. (1992)** Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In: Soltis P. S., Soltis D. E., Doyle J. J. (eds.) *Molecular systematics of plants*. Chapman and Hall, New York, New York, pp. 50-91.
- Heaney L. R. (1991)** A synopsis of climatic and vegetational change in Southeast Asia. *Climatic Change* 19: 53-61.
- Hendy M. D., Penny D. (1982)** Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Math. Biosci.* 59: 277-290.
- Hillis D. M., Moritz C., Porter C. A., Baker R. J. (1991)** Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* 251: 308-310.

- Hooker, J. D. (1885)** Asclepiadeae. In: Hooker J. D. (ed.) Flora of British India Vol. 4. Lovell Reeve & Co., London, pp. 1-78.
- Jackson R. B., Moore L. A., Hoffmann W. A., Pockman W. T., Linder C. R. (1999)** Ecosystem rooting depth determined with caves and DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11387-11392.
- Jeandroz S., Roy A., Bousquet J. (1997)** Phylogeny and phylogeography of the circumpolar *Fraxinus* (Oleaceae) based on internal transcribed spacer sequence of nuclear ribosomal DNA. Mol. Phylogenet. Evol. 7: 241-251.
- Jukes T. H., Cantor C. R. (1969)** Evolution of protein molecules. In: Munro H. N. (ed.) Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, New York, pp. 21-132.
- Jussieu A. L. de (1789)** Genera Plantarum. Herissant, Paris.
- Kelly L. M. (1998)** Phylogenetic relationships in *Asarum* (Aristolochiaceae) based on morphology and ITS sequences. Am. J. Bot. 85: 1454-1467.
- King G., Gamble J. S. (1907)** Materials for a Flora of the Malayan Peninsula No. 16-19. J. & Proc. Asiat. Soc. Bengal 74: 387-625.
- Kleijn D., Van Donkelaar R. (2001)** Notes on the taxonomy and ecology of the genus *Hoya* (Asclepiadaceae) in central Sulawesi. Blumea 46: 457-483.
- Kloppenburg D. (1991)** Philippine *Hoya* species. Orca Publishing, Medford, Oregon.
- Kloppenburg D. (1994)** *Hoya* sections: a complete study with modifications and additions. D. Kloppenburg private publication, Fresno, California.
- Knaak C., Hamby R. K., Arnold M. L., Leblanc M. D., Chapman R. L., Zimmer E. A. (1990)** Ribosomal DNA variation and its use in plant biosystematics. In:

- Kawano S. (ed.) Biological approaches and evolutionary trends in plants. Academic Press, London, pp. 135-158.
- Kunze H. (1990)** Morphology and evolution of the corona in Asclepiadaceae and related families. Trop. Subtrop. Pflanzenwelt 75: 1-51.
- Lapointe F.-J., Cucumel G. (1997)** The average consensus procedure: combination of weighted trees containing identical or overlapping sets of taxa. Syst. Biol. 46: 306-312.
- Lapointe F.-J., Kirsch J. A. W., Hutcheon J. M. (1999)** Total evidence, consensus, and bat phylogeny: a distance-based approach. Mol. Phylogenet. Evol. 11: 55-66.
- Levasseur C., Lapointe F.-J. (2001)** War and peace in phylogenetics: a rejoinder on total evidence and consensus. Syst. Biol. 50: 881-891.
- Mantel N. (1967)** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.
- Meve U., Liede S. (2001)** Reconsideration of the status of *Lavrania*, *Larryleachia* and *Notechidnopsis* (Asclepiadoideae–Ceropegieae). S. Afr. J. Bot. 67: 161-168.
- Morley R. J., Flenley J. R. (1987)** Late Ceinozoic vegetational and environmental changes in the Malay archipelago. In: Whitmore T. C. (ed.) Biogeographical evolution of the Malay archipelago. Clarendon Press, Oxford, pp. 50-59.
- Nakamura T. (1991)** The cytological studies of triploid *Hoya carnosa* (Asclepiadaceae). Chromosome Infor. Serv. 51: 3-5.
- Nakamura T. (1992)** Cytological studies on 13 species of genus *Hoya* (Asclepiadaceae) in Malay Peninsula. Chromosome Infor. Serv. 53: 16-19.

- Nakamura T. (1993)** Cytological studies on 6 species of the genus *Hoya* (Asclepiadaceae) in Viti Levu Island, Fiji. *Chromosome Infor. Serv.* 55: 25-27.
- Nakamura T., Yuasa H. (1978)** The cytological studies in family Asclepiadaceae IV. Chromosome numbers and karyotypes in genus *Hoya*. *La Kromosomo* II – 11-12: 318-326. [In Japanese, with English summary, p.326]
- Newton L. E. (1984)** Terminology of structures associated with pollinia of the Asclepiadaceae. *Taxon* 33: 619-621.
- Nicholas A., Baijnath H. (1994a)** The structure of the Asclepiadaceae flower. *Pl. Life* 10: 18-20.
- Nicholas A., Baijnath H. (1994b)** The structure of the Asclepiadaceae flower, part II – the sterile whorls. *Pl. Life* 11: 16-20.
- Nicholas A., Baijnath H. (1995a)** The structure of the Asclepiadaceae flower, part III – the androecial whorl. *Pl. Life* 12: 19-24.
- Nicholas A., Baijnath H. (1995b)** The structure of the Asclepiadaceae flower, part IV – the asclepiad corona. *Pl. Life* 13: 21-26.
- Olmstead R. G., Palmer J. D. (1994)** Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *Am. J. Bot.* 81: 1205-1224.
- Omlor R. (1998)** Generische revision der Marsdenieae (Asclepiadaceae). PhD Thesis, Universität Kaiserslautern, Germany.
- Palmer J. D. (1992)** Comparison of chloroplast and mitochondrial genome evolution in plants. In: Herrmann R. G. (ed.) *Cell organelles*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 99-133.

- Potgieter K., Albert V. A. (2001)** Phylogenetic relationships within Apocynaceae s.l. based on *trnL* intron and *trnL-F* spacer sequences and propagule characters. *Ann. Missouri Bot. Garden* 88: 523-549.
- Rintz R. E. (1978)** The Peninsular Malaysian species of *Hoya*. *Malayan Nat. J.* 30: 467-522.
- Rintz R. E. (1980)** The Peninsular Malayan species of *Dischidia* (Asclepiadaceae). *Blumea* 26: 81-126.
- Rogers S. O., Bendich A. J. (1987)** Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9: 509-520.
- Saitou N., Nei M. (1987)** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Schill R., Jäkel U. (1978)** Beitrag zur Kenntnis der Asclepiadaceen-Pollinarien. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 22: 7-122.
- Schlechter R. (1905)** Asclepiadaceae. In: Schumann K. & Lauterbach K. (eds.) *Nachträge zur Flora der Deutschen Schutzgebiete in der Südsee*. Gebrüder Bornträger, Leipzig, pp.353-369.
- Schlechter R. (1913)** Die Asclepiadaceen von Deutsch-Neu-Guinea. *Bot. Jahrb. Syst.* 50: 81-164.
- Sennblad B., Bremer B. (1996)** The familial and subfamilial relationships of Apocynaceae and Asclepiadaceae evaluated with *rbcL* data. *Plant Syst. Evol.* 202: 153-175.
- Sokal R. R., Rohlf F. J. (1981)** Taxonomic congruence in the Leptopodomorpha re-examined. *Syst. Zool.* 30: 309-325.

- Soltis D. E., Johnson L. A., Looney C. (1996)** Discordance between ITS and chloroplast topologies in the *Boykinia* group (Saxifragaceae). *Syst. Bot.* 21: 169-185.
- Sørensen T. (1948)** A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analysis of the vegetation on Danish commons. *Biol. Skr.* 5: 1-34.
- Sun Y., Skinner D. Z., Liang G. H., Hulbert S. H. (1994)** Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 89: 26-32.
- Swofford D. L. (1999)** PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony and other methods, version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. (1997)** The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Tissot C., Van der Ham R. W. J. M. (1994)** Septième index bibliographique sur la morphologie des pollens d'Angiospermes. Travaux de la section scientifique et technique, Inst. Français de Pondichéry, France.
- Van Steenis C. G. G. J. (1972)** The mountain flora of Java. E. J. Brill Ltd, Leiden.
- Veldkamp R., Van Donkelaar R., Kloppenburg R. D. (1995)** The identity of *Sperlingia* Vahl (Asclepiadaceae). *Blumea* 40: 429-438.
- Veldkamp J. F., Hansen B. (1996)** New combinations under *Hoya verticillata* (Asclepiadaceae) and a bibliographical note on *Sperlingia*. *Blumea* 41: 439-442.

- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California, pp. 315-322.
- Windley B. F. (1988)** Tectonic framework of the Himalaya, Karakorum and Tibet, and problems of their evolution. Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 326: 3-16.
- Wolfe K. H., Li W.-H., Sharp P. M. (1987)** Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9054-9058.
- Yuan Y.-M., Küpfer P., Doyle J. J. (1996)** Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. Am. J. Bot. 83: 641-652.

ANNEXES

Annexe 1. Alignement des séquences d'ITS 1 et ITS 2 pour les espèces de *Hoya*, de *Fockea* et de *Ceropegia* à l'étude. Les sites invariables sont indiqués par des astérisques. Les flèches indiquent les positions qui ont été éliminées des analyses.

Taxon/Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0				
<i>H. obovata</i>	C	A	A	G	A	-	G	G	C	G	C	T	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. crassipes</i>	C	A	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. cumingiana</i>	C	G	A	G	A	-	G	G	C	A	C	T	C	C	G	A	A	T	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. carnosa</i>	C	G	A	G	A	-	G	G	C	A	C	T	C	C	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C		
<i>H. diversifolia</i>	C	A	A	G	A	-	G	G	C	G	C	T	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. pubera</i>	C	G	A	G	-	-	G	G	C	C	T	C	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. kerrii</i>	C	A	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. pentaplebia</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. merrillii</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. verticillata</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. finlaysonii</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. glabra</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. limoniaca</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. neo-ebudica</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. cinnamomifolia</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	T	C	T	N	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. polystachia</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. cardiophylla</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	T	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. nicholsoniae</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. vitellinooides</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	C	T	C	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. australis</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	A	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. leucorhoda</i>	T	G	A	G	A	-	G	G	C	A	C	T	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. bella</i>	C	A	A	G	G	-	G	G	C	G	C	C	T	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. multiflora</i>	C	G	A	G	A	-	G	G	C	G	C	C	T	C	T	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	
<i>H. curtisii</i>	C	G	A	T	A	-	G	G	C	G	C	C	T	C	C	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. loheri</i>	-	-	A	G	A	-	G	G	C	G	C	C	T	C	T	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>H. bilobata</i>	-	-	A	G	A	-	G	G	C	G	C	C	T	C	N	G	A	A	C	A	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>F. tugelensis</i>	C	A	A	G	-	-	G	C	T	C	C	A	T	T	A	A	A	A	C	A	T	G	C	A	N	T	G	C	G	T	C	G	C	C
<i>C. helicoides</i>	T	A	A	A	A	A	G	G	T	C	T	C	G	C	A	A	A	C	C	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	T
<i>C. radicans</i>	C	A	A	A	A	-	G	G	T	-	N	T	C	C	A	A	A	A	C	C	T	G	C	A	T	C	G	C	G	T	C	G	C	N

Annexe 2. Alignement des séquences de l'intron *trnL* pour les espèces de *Hoya*, de *Dischidia*, de *Fockea* et de *Ceropegia* utilisées pour une étude préliminaire réalisée dans le cadre de ce projet. Les sites invariables sont indiqués par des astérisques.

Taxon/Position	1	2	3	4	5	6	7
<i>H. curtisii</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>H. leucorhoda</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>H. pubera</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>H. pubicalyx</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>H. phyllura</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>H. finlaysonii</i>	N	N	N	N	N	N	N
<i>H. carnosa</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>H. picta</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>D. imbricata</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>C. radicans</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>F. crispa</i>	T	A	A	G	A	G	G
<i>F. tugelensis</i>	T	A	A	G	A	G	G

Annexe 3. Distances génétiques des régions ITS 1 et ITS 2 corrigées selon le modèle de Jukes-Cantor pour les espèces de *Hoya*, de *Fockea* et de *Ceropegia* à l'étude.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>H. obovata</i>	-									
2 <i>H. crassipes</i>	0.00847	-								
3 <i>H. cumingiana</i>	0.06156	0.06811	-							
4 <i>H. carnosa</i>	0.04339	0.04547	0.05620	-						
5 <i>H. diversifolia</i>	0.01062	0.01705	0.06305	0.02984	-					
6 <i>H. pubera</i>	0.04238	0.04216	0.06672	0.03927	0.03067	-				
7 <i>H. kerrii</i>	0.00635	0.01277	0.06298	0.03411	0.00210	0.03281	-			
8 <i>H. pentaphlebia</i>	0.05706	0.05694	0.08614	0.06777	0.05425	0.06250	0.05201	-		
9 <i>H. merrillii</i>	0.05464	0.05663	0.08363	0.06530	0.05184	0.06467	0.04960	0.01052	-	
10 <i>H. verticillata</i>	0.05008	0.05207	0.07891	0.06073	0.04734	0.05997	0.04512	0.00629	0.00419	-
11 <i>H. finlaysonii</i>	0.05481	0.05680	0.08382	0.06549	0.05201	0.06487	0.04978	0.01052	0.00841	0.00419
12 <i>H. glabra</i>	0.05232	0.05432	0.08123	0.06299	0.04956	0.06226	0.04734	0.00839	0.00629	0.00209
13 <i>H. limoniaca</i>	0.05461	0.05660	0.08357	0.06526	0.05179	0.06461	0.04956	0.01691	0.01687	0.01261
14 <i>H. neo-ebudica</i>	0.05234	0.05432	0.08590	0.06299	0.04757	0.06694	0.04734	0.01907	0.01900	0.01473
15 <i>H. cinnamomifolia</i>	0.05701	0.05899	0.08841	0.06327	0.05411	0.06946	0.05189	0.02562	0.02344	0.01909
16 <i>H. polystachia</i>	0.05692	0.05891	0.08360	0.06534	0.05400	0.06461	0.05177	0.02553	0.02334	0.01901
17 <i>H. cardiophylla</i>	0.04590	0.04582	0.08153	0.05860	0.04519	0.05563	0.04297	0.04309	0.04528	0.04077
18 <i>H. nicholsoniae</i>	0.04355	0.04347	0.08126	0.05620	0.04287	0.05319	0.04069	0.04076	0.04289	0.03844
19 <i>H. vitellinoides</i>	0.03908	0.03902	0.08132	0.05622	0.03848	0.05324	0.03632	0.04079	0.04294	0.03847
20 <i>H. australis</i>	0.07056	0.06810	0.06520	0.06753	0.07459	0.07155	0.07212	0.08157	0.08138	0.07671
21 <i>H. leucorhoda</i>	0.06133	0.05892	0.05166	0.06299	0.06541	0.06696	0.06302	0.08159	0.08138	0.07671
22 <i>H. bella</i>	0.08465	0.08656	0.09514	0.08582	0.08127	0.09018	0.07885	0.10503	0.09772	0.09763
23 <i>H. multiflora</i>	0.07777	0.07965	0.06739	0.06749	0.06985	0.06944	0.06750	0.07914	0.08131	0.07660
24 <i>H. curtisii</i>	0.03223	0.03659	0.06745	0.03195	0.02765	0.03490	0.02544	0.06091	0.05846	0.05392
25 <i>H. loheri</i>	0.05998	0.05962	0.09620	0.06818	0.05912	0.06987	0.05458	0.07317	0.07077	0.06607
26 <i>H. bilobata</i>	0.05786	0.06004	0.09188	0.06609	0.05703	0.06523	0.05251	0.07087	0.07316	0.06844
27 <i>F. tugelensis</i>	0.45325	0.44805	0.50129	0.47704	0.44915	0.47125	0.44849	0.45407	0.44998	0.44848
28 <i>C. helicoides</i>	0.39176	0.39112	0.39859	0.40645	0.39588	0.38508	0.39635	0.40536	0.39460	0.40421
29 <i>C. radicans</i>	0.38012	0.37481	0.37800	0.38309	0.38016	0.36652	0.38388	0.39391	0.38571	0.39308

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
11 <i>H. finlaysonii</i>	-									
12 <i>H. glabra</i>	0.00629	-								
13 <i>H. limoniaca</i>	0.01690	0.01473	-							
14 <i>H. neo-ebudica</i>	0.01903	0.01685	0.00628	-						
15 <i>H. cinnamomifolia</i>	0.02345	0.02126	0.02342	0.02556	-					
16 <i>H. polystachia</i>	0.02336	0.02118	0.02333	0.02548	0.01261	-				
17 <i>H. cardiophylla</i>	0.04318	0.04076	0.04523	0.04747	0.04756	0.04745	-			
18 <i>H. nicholsoniae</i>	0.04081	0.04065	0.04286	0.04507	0.04516	0.04506	0.01480	-		
19 <i>H. vitellinoides</i>	0.04084	0.04068	0.04289	0.04510	0.04520	0.04508	0.01482	0.00838	-	
20 <i>H. australis</i>	0.08159	0.07902	0.08134	0.08366	0.08392	0.07918	0.07459	0.07895	0.07897	-
21 <i>H. leucorhoda</i>	0.07927	0.07902	0.08134	0.08366	0.08619	0.08142	0.07458	0.07433	0.06978	0.03192
22 <i>H. bella</i>	0.10265	0.10001	0.10719	0.10960	0.10991	0.10979	0.10279	0.09527	0.09768	0.10238
23 <i>H. multiflora</i>	0.08145	0.07892	0.08125	0.08125	0.08616	0.08363	0.08610	0.08587	0.08593	0.07896
24 <i>H. curtisii</i>	0.05866	0.05617	0.05843	0.05619	0.06078	0.06067	0.05182	0.04501	0.04502	0.06977
25 <i>H. loheri</i>	0.07088	0.06835	0.06841	0.07076	0.07340	0.07321	0.07138	0.06865	0.06868	0.09391
26 <i>H. bilobata</i>	0.07327	0.07073	0.07078	0.07314	0.07577	0.07333	0.06664	0.05938	0.06399	0.09663
27 <i>F. tugelensis</i>	0.44593	0.44860	0.46072	0.45675	0.44356	0.44638	0.46895	0.47302	0.46625	0.48114
28 <i>C. hellicoides</i>	0.40937	0.40385	0.40900	0.40503	0.41967	0.41804	0.39641	0.39862	0.39277	0.38248
29 <i>C. radicans</i>	0.39880	0.39287	0.39359	0.38952	0.41159	0.41009	0.39094	0.39328	0.38998	0.35912
21 <i>H. leucorhoda</i>	-									
22 <i>H. bella</i>	0.10237	-								
23 <i>H. multiflora</i>	0.06745	0.10949	-							
24 <i>H. curtisii</i>	0.06520	0.08621	0.06517	-						
25 <i>H. loheri</i>	0.09633	0.11106	0.09637	0.04786	-					
26 <i>H. bilobata</i>	0.09657	0.10620	0.10159	0.05029	0.01278	-				
27 <i>F. tugelensis</i>	0.48478	0.48459	0.47559	0.47343	0.49052	0.47699	-			
28 <i>C. hellicoides</i>	0.38192	0.38136	0.40248	0.39545	0.42275	0.40750	0.64212	-		
29 <i>C. radicans</i>	0.37388	0.36483	0.38195	0.37191	0.40636	0.40345	0.63460	0.09468	-	

Annexe 4. Distances géographiques pour les espèces de *Hoya* à l'étude. Les distances ont été calculées à partir d'une matrice binaire de patrons de répartition des espèces.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>H. australis</i>	-													
2 <i>H. bella</i>	1.00	-												
3 <i>H. bilobata</i>	1.00	1.00	-											
4 <i>H. cardiophylla</i>	1.00	1.00	0.00	-										
5 <i>H. carnosa</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	-									
6 <i>H. cinnamomifolia</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-								
7 <i>H. crassipes</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.33	-							
8 <i>H. cumingiana</i>	1.00	1.00	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	-						
9 <i>H. curtisii</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-					
10 <i>H. diversifolia</i>	1.00	0.82	1.00	1.00	0.87	0.82	0.82	0.83	0.82	-				
11 <i>H. finlaysonii</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	0.67	0.71	0.67	0.33	-			
12 <i>H. glabra</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.82	0.67	-		
13 <i>H. kerrii</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00	0.54	0.75	1.00	-	
14 <i>H. leucorhoda</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-
15 <i>H. limoniaca</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
16 <i>H. loheri</i>	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
17 <i>H. merrillii</i>	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
18 <i>H. multiflora</i>	1.00	0.87	0.87	0.87	0.79	0.87	0.87	0.75	0.87	0.17	0.47	0.87	0.65	1.00
19 <i>H. neo-ebudica</i>	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
20 <i>H. nicholsoniae</i>	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
21 <i>H. obovata</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	0.78	0.60	0.60	0.67	1.00	0.43	0.56	1.00	0.14	1.00
22 <i>H. pentaphlebia</i>	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
23 <i>H. polystachia</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	0.67	0.71	0.67	0.33	0.00	0.67	0.75	1.00
24 <i>H. pubera</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.33	1.00	0.82	0.67	1.00	1.00	1.00
25 <i>H. verticillata</i>	1.00	0.85	1.00	1.00	0.88	0.85	0.85	0.86	0.85	0.18	0.41	0.85	0.60	1.00
26 <i>H. vitellinooides</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.33	1.00	0.82	0.67	1.00	1.00	1.00

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
15 <i>H. limoniaca</i>	-											
16 <i>H. loheri</i>	1.00	-										
17 <i>H. merrillii</i>	1.00	0.00	-									
18 <i>H. multiflora</i>	1.00	0.87	0.87	-								
19 <i>H. neo-ebudica</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	-							
20 <i>H. nicholsoniae</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-						
21 <i>H. obovata</i>	1.00	1.00	1.00	0.56	1.00	1.00	-					
22 <i>H. pentaphlebia</i>	1.00	0.00	0.00	0.87	1.00	1.00	1.00	-				
23 <i>H. polystachia</i>	1.00	1.00	1.00	0.47	1.00	1.00	0.56	1.00	-			
24 <i>H. pubera</i>	1.00	1.00	1.00	0.87	1.00	1.00	0.60	1.00	0.67	-		
25 <i>H. verticillata</i>	1.00	1.00	1.00	0.23	1.00	1.00	0.50	1.00	0.41	0.85	-	
26 <i>H. vitellinoides</i>	1.00	1.00	1.00	0.87	1.00	1.00	0.60	1.00	0.67	0.00	0.85	-

« Un voyageur s'égare dans un coin perdu de Haute-Provence. Il rencontre Elzear Bouffier, un berger solitaire qui patiemment, en secret, reboise la montagne en semant des glands. Les années passent. Le pays désertique se transforme en terre promise... »

L'homme qui plantait des arbres

Un film de Frédéric Back