



**Systématique moléculaire de la sous-tribu des
Angraecinae (Vandae, Orchidaceae) : perspectives
taxonomiques et implications de la relation
plante-pollinisateur dans l'évolution des formes florales
réunionnaises**

Claire Micheneau

► **To cite this version:**

Claire Micheneau. Systématique moléculaire de la sous-tribu des Angraecinae (Vandae, Orchidaceae) : perspectives taxonomiques et implications de la relation plante-pollinisateur dans l'évolution des formes florales réunionnaises. Ecologie, Environnement. Université de la Réunion, 2005. Français. NNT : 2005lare0019 . tel-00546450

HAL Id: tel-00546450

<https://theses.hal.science/tel-00546450>

Submitted on 14 Dec 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

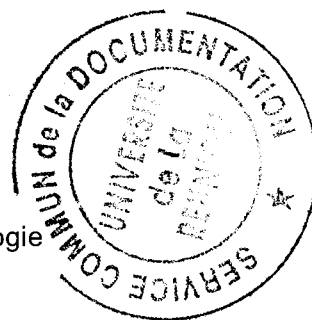


Académie de La Réunion
Unité Mixte de Recherche
CIRAD / UNIVERSITE
PEUPELEMENTS VEGETAUX ET
BIOAGRESSEURS EN MILIEU TROPICAL



THESE

Présentée à l'Université de la Réunion
pour obtenir le diplôme de Doctorat
SPECIALITE : Biologie des Populations et Ecologie
FORMATION DOCTORALE : Biologie de l'Evolution et Ecologie
ECOLE DOCTORALE : Interdisciplinaire de la Réunion



SYSTEMATIQUE MOLECULAIRE DE LA SOUS-TRIBU DES ANGRAECINAE (VANDEAE, ORCHIDACEAE) : PERSPECTIVES TAXONOMIQUES ET IMPLICATIONS DE LA RELATION PLANTE-POLLINISATEUR DANS L'EVOLUTION DES FORMES FLORALES REUNIONNAISES

Claire MICHENEAU

Soutenue le 28 novembre 2005 devant le Jury composé de :

M. Dominique STRASBERG	Professeur, Université de la Réunion	Président
M. Philippe FELDMANN	HDR, Cirad Montpellier	Rapporteur
M. Marc-André SELOSSE	Professeur, Université de Montpellier II	Rapporteur
M. Mark W. CHASE	Professeur, RBG Kew, RU	Examineur
M. Mike F. FAY	Docteur, RBG Kew, RU	Examineur
M. Thierry PAILLER	HDR, Université de la Réunion	Directeur de Thèse





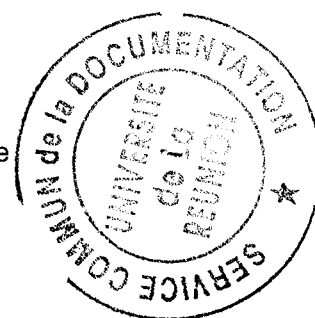
TH 283

Académie de La Réunion
Unité Mixte de Recherche
CIRAD / UNIVERSITE
**PEUPELEMENTS VEGETAUX ET
BIOAGRESSEURS EN MILIEU TROPICAL**



THESE

Présentée à l'Université de la Réunion
pour obtenir le diplôme de Doctorat
SPECIALITE : Biologie des Populations et Ecologie
FORMATION DOCTORALE : Biologie de l'Evolution et Ecologie
ECOLE DOCTORALE : Interdisciplinaire de la Réunion



SYSTEMATIQUE MOLECULAIRE DE LA SOUS-TRIBU DES ANGRAECINAE (VANDEAE, ORCHIDACEAE) : PERSPECTIVES TAXONOMIQUES ET IMPLICATIONS DE LA RELATION PLANTE-POLLINISATEUR DANS L'EVOLUTION DES FORMES FLORALES REUNIONNAISES

Claire MICHENEAU

Soutenue le 28 novembre 2005 devant le Jury composé de :

M. Dominique STRASBERG	Professeur, Université de la Réunion	Président
M. Philippe FELDMANN	HDR, Cirad Montpellier	Rapporteur
M. Marc-André SELOSSE	Professeur, Université de Montpellier II	Rapporteur
M. Mark W. CHASE	Professeur, RBG Kew, RU	Examinateur
M. Mike F. FAY	Docteur, RBG Kew, RU	Examinateur
M. Thierry PAILLER	HDR, Université de la Réunion	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Il arrive que le hasard des rencontres fasse naître de magnifiques projets. L'aventure de cette thèse en est un.

Il arrive que l'observation d'une fleur d'orchidée fasse naître une immense curiosité. La problématique de cette thèse en est le résultat.

Mais rien de tout cela ne serait arrivé sans votre aide précieuse.

Je remercie les membres du Jury qui me font l'honneur d'être juges de ce travail.

Je remercie Thierry Pailler, mon directeur de thèse de m'avoir intégrée à son équipe il y a trois ans, de m'avoir « choisie » pour ce projet de thèse passionnant et pour sa passion des orchidées qu'il partage avec tant de générosité.

This research would not have been possible without the precious collaboration of Mickael F. Fay and Mark W. Chase, to whom I address my greatest warm and sincerely thanks. There are no words to say how your kindness and your availability in my initiation to the fascinating world of DNA sequencing touched me.

Je remercie sincèrement Jean Bosser, à qui j'exprime tout mon respect et toute ma gratitude. Merci pour le temps précieux que vous m'avez accordé, pour votre gentillesse et le bonheur des instants que nous avons partagés. J'espère de tout cœur suivre vos pas.

Un grand merci à Dominique Strasberg et à toute l'équipe du laboratoire de Biologie Végétale de l'Université de La Réunion de m'avoir chaleureusement accueillie au sein de leur équipe. Petits clins d'œil à Stéphane, Claudine, Pierre, Laurence, Fabien, Pascale, Matthieu Lecorre, Christine Jacquet et Françoise Leriche, pour toutes les démarches administratives liées au déroulement de cette thèse et Carole Clain pour l'initiation à la culture *in vitro* des orchidées.

Je remercie chaleureusement Jacqueline Smadja pour son accueil enthousiaste au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments de l'Université de La Réunion au sein duquel les analyses de la composition chimique du bouquet olfactif des espèces ont été réalisées, Anne Gauvin pour son initiation à la technique de la SPME, pour sa patience, sa rigueur de travail et les précieuses corrections apportées au manuscrit.

Je remercie particulièrement Jacques Fournel pour les nuits blanches et les journées noires que je lui ai imposées, pour sa disponibilité et son aide permanentes et pour son accompagnement essentiel lors des prospections de terrain visant à l'identification des pollinisateurs, sans qui elle eut été impossible.

Mille mercis à tous ceux qui ont apporté leur contribution à ce travail : A. Brondeau et M. Escure de l'ONF, l'équipe du laboratoire de Systématique Moléculaire de Kew (Olivier, Dion, Martyn et Laura, Jim, Laszlo, Edith, Michelle), ainsi que Geoffrey Kite et Dave Roberts. Merci aux étudiants de maîtrise A. Wulff, A. Hofmann, G. Gopal, D. Sébastien, M. Bertin, J. Panurge, M. Berlincourt et E. Chabaud et un immense merci à Miki !

Ma plus grande tendresse enfin à vous qui me témoignez votre confiance et votre soutien chaque jour :

Marie-Thérèse, Harry et Maryline,
Christiane et Delphine,
Emmanuelle, Rémi et Serge,

Merci de m'accueillir avec tant de chaleur et de gentillesse. Merci pour tous ces moments partagés, pour votre réconfort inestimable. J'ai trouvé en vous ce qu'il y a de plus précieux.

Matsfrère et Marjorie, merci pour votre générosité, votre génie et votre force.

Papy, Paulette et René, à qui j'exprime toute mon estime et mon plus grand respect.

Maman et Sully, je vous dois tout.

NOTES AUX LECTEURS

Cette étude, initiée en octobre 2002, a été réalisée grâce aux financements du Conseil Régional de la Réunion (allocation régionale de formation doctorale n° 0231862) et du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (appel d'offre Ecosystèmes tropicaux). Cette thèse résulte d'une collaboration étroite entre l'UMR Cirad/Université de La Réunion « Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical » et le laboratoire de Systématique Moléculaire des Jardins Botaniques Royaux de Kew (Londres), dont les apports respectifs qu'ils soient financiers ou logistiques ont permis le déroulement des études « de terrain » menées à la Réunion et le séquençage d'ADN effectué en Angleterre.

Afin de faciliter la lecture du manuscrit, les noms d'auteurs des différents taxons ont été mentionnés dans les tableaux dans la mesure du possible.

Les différents articles publiés ou en cours de publication issus de ce travail de thèse ont été ajoutés aux annexes.

A Christian, Marie-Louise et Sonia

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

1. LES ORCHIDEES	13
2. RECONSTRUCTION PHYLOGENETIQUE ET SYSTEMATIQUE MOLECULAIRE	17
3. LA RELATION PLANTE-POLLINISATEUR	19
4. LA RELATION PLANTE-POLLINISATEUR CHEZ LES ORCHIDEES	20
5. LES ILES OCEANIQUES ET L'ARCHIPEL DES MASCAREIGNES	23
6. LES RELATIONS PLANTES-POLLINISATEURS DANS LES ILES OCEANIQUES	26
7. LE CAS PARTICULIER DE LA REUNION.....	28
8. LES ORCHIDEES DE LA REUNION	29
9. LA SOUS-TRIBU DES ANGRAECINAE	30
10. PROBLEMATIQUE, OBJECTIFS ET PLAN DE LA THESE.....	37

CHAPITRE I. TAXONOMIE ET BIOGEOGRAPHIE DES ANGRAECINAE

1. PRESENTATION DE LA SOUS-TRIBU DES ANGRAECINAE.....	43
1. 1. Classifications de la sous-tribu des Angraecinae.....	47
1. 2. Distribution géographique et endémicité.....	52
2. LA SOUS-TRIBU DES ANGRAECINAE A LA REUNION.....	54
2. 1. Description des genres et nombre d'espèces	56
3. PHYLOGENIE MOLECULAIRE DES ANGRAECINAE	64
3. 1. Introduction.....	64
3. 2. Matériels et Méthodes	72
3. 3. Résultats.....	85
3. 4. Discussion.....	91
4. BIOGEOGRAPHIE DES ANGRAECINAE	116
4. 1. Colonisation des Mascareignes et radiation sur l'archipel.....	116
4.2. Hypothèse de scénario évolutif des Angraecinae-Aerangidinae	121
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	123

CHAPITRE II. IMPLICATION DE LA RELATION PLANTE-POLLINISATEUR DANS L'EVOLUTION DES FORMES FLORALES REUNIONNAISES

1. INTRODUCTION.....	129
1. 1. Reproduction des Orchidées : état des connaissances	132
1. 2. Objectifs et plan du chapitre.....	141
2. CARACTERISATION DES SYNDROMES DE POLLINISATION	149
2. 1. Microlépidoptérophilie.....	154
2. 2. Phalénophilie et sphingophilie	157
2. 3. Conclusions	165
3. PHALENOPHILIE <i>VERSUS</i> SPHINGOPHILIE DANS LE GENRE <i>JUMELLEA</i>	167
3. 1. Matériels et méthodes	167
3. 2. Résultats	179
3. 3. Discussion	193
3. 4. Conclusions et perspectives.....	203
4. LA SECTION <i>HADRANGIS</i> DU GENRE <i>ANGRAECUM</i>	207
4. 1. Matériels et Méthodes.....	212
4. 2. Résultats	218
4. 3. Discussion	239
4. 4. Conclusions et perspectives.....	250
5. EVOLUTION DE L'INTERACTION SPHINGOPHILE APRES COLONISATION DE LA REUNION	251
5. 1. Perte de l'interaction sphingophile	253
5. 2. Maintien de la relation sphingophile	254
5. 3. Evolution de la sphingophilie vers l'ornithophile	256

CONCLUSION GENERALE – PERSPECTIVES 261

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 273

ANNEXES 297

INTRODUCTION GENERALE

1. LES ORCHIDEES

Mythifiées chez tous les peuples empreints de sentiment sacré (Berliocchi, 2000), les orchidées attisent depuis longtemps convoitise et curiosité. Pour Confucius¹, elles symbolisaient la vertu. Dans la Grèce antique et à Rome, les patriciens leur attribuaient au contraire des pouvoirs aphrodisiaques. Les Aztèques découvrirent l'orchidée qui allait donner l'un des parfums les plus populaires au monde, la vanille. L'expansion des régimes coloniaux des XVIII^e et XIX^e siècles fit des espèces exotiques de véritables objets de convoitises dans la bourgeoisie occidentale. Les « chasseurs d'orchidées » se multiplièrent, pillant forêts tropicales et équatoriales d'espèces toujours plus belles et spectaculaires, dont la plupart périssait en chemin. La maîtrise de leur culture à partir de semis initia l'ère d'un tout autre art, auquel les créateurs, parfois fanatiques, s'adonnèrent sans modération : en moins de 150 ans, plus de 100 000 hybrides furent créés !

¹ Confucius : philosophe chinois (VI^e – V^e siècles avant J.-C.).

Si les orchidées fascinent amateurs et collectionneurs, elles ont également conquis la communauté scientifique, offrant par de nombreux aspects des modèles fort intéressants dans le règne végétal. Leur capacité d'adaptation à différents milieux, la multiplicité de leurs types biologiques et de leurs formes florales, les particularités de leurs graines, de leur mode de germination associé à la flore mycorhizienne, leurs interactions aussi diverses que spectaculaires avec la faune pollinisatrice, sont autant de champs d'investigations, autant de systèmes à interpréter, autant de stimulants à l'entendement scientifique.

La famille des Orchidacées est à la fois remarquable et paradoxale : malgré un âge récent estimé à 100 millions d'années (Chase, 2001), elle représente l'une des plus grandes familles d'angiospermes (850 genres et plus de 25 000 espèces, Chase et al., 2003). Présentes sur les cinq continents et sous toutes les latitudes à l'exception des pôles et des déserts les plus arides (Dressler, 1981), les orchidées sont extrêmement nombreuses dans les zones inter-tropicales où la diversité biologique est à la fois la plus riche et la moins connue. Bien que la structure de la fleur soit conforme au schéma général des monocotylédones (Figure 1), l'appareil reproducteur permet une identification rapide de la famille grâce à la présence d'un organe caractéristique : le gynostème² ou colonne (Figures 1 et 2). Cette structure est à la base de la taxonomie des orchidées, mais étant sujette aux pressions sélectives des pollinisateurs, elle montre à la fois une grande variabilité morpho-anatomique et de nombreuses convergences (e.g. Atwood, 1986 ; Dressler, 1993 ; Borba et al., 2002). La diversité des classifications morphologiques est révélatrice de la complexité de la systématique du groupe (e.g. Schlechter, 1926 ; Dressler, 1981 ; 1993 ; Freudenstein et Rasmussen, 1999 ; Szlachetko et Rutkowski, 2000 ; Szlachetko et Margońska, 2002 ; Szlachetko, 2003).

² Gynostème : organe en forme de colonne provenant de la réunion du filet des étamines et du style du gynécée.

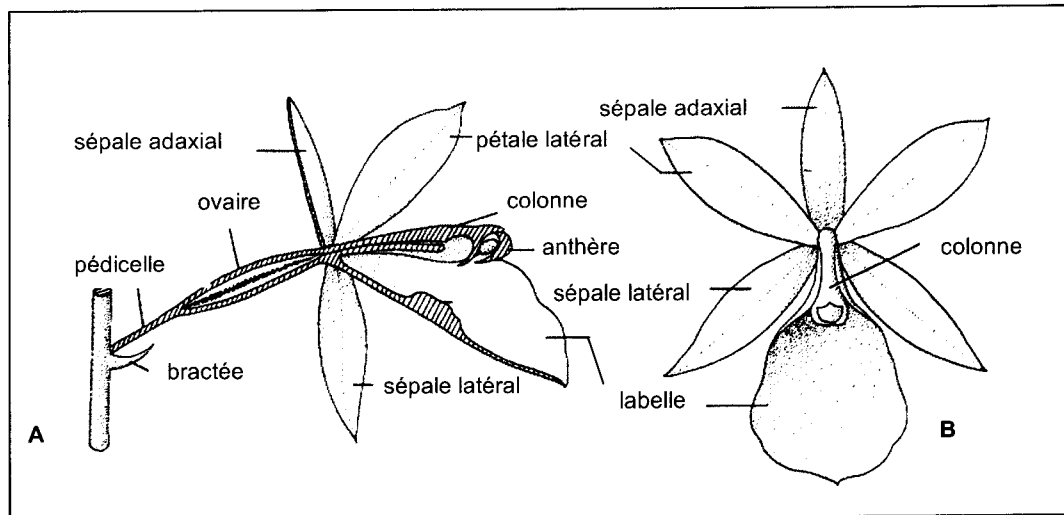


FIGURE 1. Organisation générale de la fleur d'orchidée (repris de Dressler, 1981).

A. Section longitudinale. **B.** Fleur vue de face.

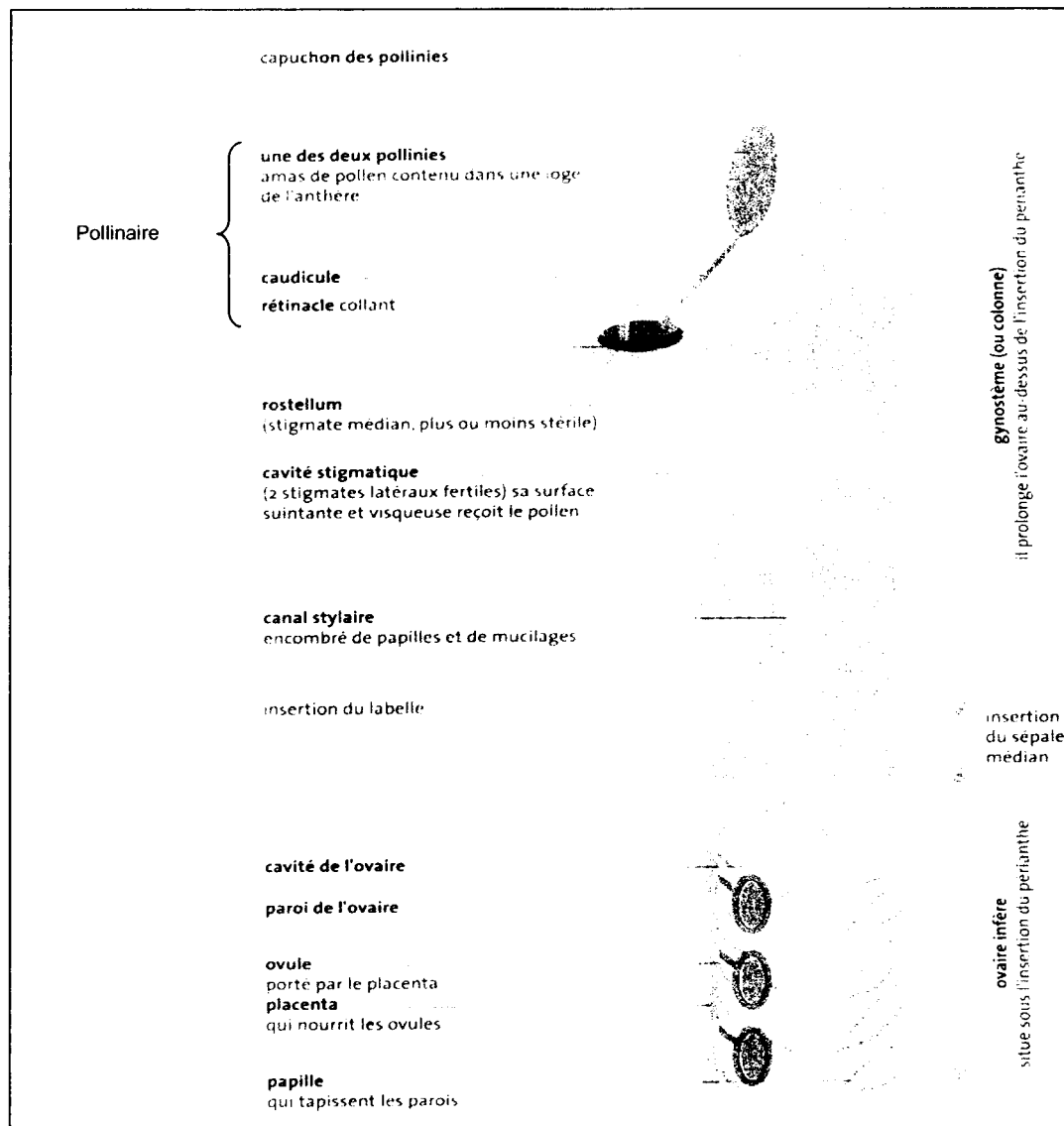


FIGURE 2. Illustration des différents organes qui constituent la colonne ou le gynostème (modifié, repris de Roguenant et al., 2005) (le rétinacle collant est aussi appelé viscidie ou viscidium ; l'ensemble des pollinies, caudicules et viscidium forment le pollinaire).

2. RECONSTRUCTION PHYLOGENETIQUE ET SYSTEMATIQUE MOLECULAIRE

Les travaux de Charles Darwin puis ceux de Noël Bernard marquèrent une étape fondamentale dans la connaissance de la pollinisation et de la fécondation des espèces (Darwin, 1862) et de leurs mécanismes de germination (Bernard, 1904). Plus tard, les développements conjoints de la cladistique et de la systématique moléculaire permirent l'étude phylogénétique de la famille (e.g. Freudenstein et Rassmussen, 1999 ; Chase et al., 1994 ; Cameron et al., 1999 ; Chase et al., 2003 ; Freudenstein et al., 2004).

Le concept de phylogénie est né de la pensée évolutionniste du XIX^e siècle, dont J. B. Lamarck (1809), E. Haeckel (1866) et C. Darwin (1877) furent les précurseurs. Le terme phylogénie fut d'ailleurs inventé par E. Haeckel (1866) dont l'étymologie signifie « production de tribus » (Darlu et Tassy, 1993). En français, la phylogénèse pourrait lui correspondre, tant la démarche phylogénétique vise à identifier l'histoire et les processus évolutifs qui ont donné naissance à la diversification des êtres vivants, à partir de la première forme de vie apparue sur Terre, il y a près de 3,4 milliards d'années. La production d'arbres phylogénétiques, schémas hypothétiques des relations de parenté entre les espèces, est aujourd'hui une discipline incontournable des sciences de l'évolution. Les premières phylogénies moléculaires, basées sur des séquences protéiques, furent publiées au milieu des années soixante (Zuckerkandl et Pauling, 1965 ; Fitch et Margoliash, 1967) ; elles initièrent une nouvelle ère dans l'histoire de la systématique phylogénétique. Depuis, les progrès technologiques de la biologie moléculaire ont permis l'essor du séquençage d'ADN (acide désoxyribonucléique). L'outil moléculaire au service de la reconstruction phylogénétique fait désormais partie intégrante de la biologie moderne, apportant une nouvelle dimension à la connaissance biologique du vivant, un regain de popularité à la systématique et une nouvelle dynamique aux sciences de l'évolution, jouissant du prestige

des technologies les plus avancées. Mais, au-delà des procédés, la vraie modernité se situe certainement dans la révolution que les études phylogénétiques ont apportée à notre connaissance du vivant, bouleversée « dans des proportions inconnues depuis cent cinquante ans » (Lecointre et Le Guyader, 2001). Chez les orchidées notamment, l'outil moléculaire a montré son efficacité pour résoudre les problèmes systématiques complexes liés à la convergence évolutive des espèces au sein de la famille (e.g. Cameron et al., 1999 ; van den Berg et al., 2005).

Outre son implication taxonomique, la construction de phylogénies moléculaires constitue un outil fondamental pour expliquer, comprendre et dater (horloge moléculaire, e.g. Soltis et al., 1999, 2000 ; Wikström et al., 2001) les phénomènes de spéciation et de radiation adaptative des espèces, qu'ils soient liés à la biogéographie, l'écologie ou la biologie reproductive des organismes. La cartographie des traits morphologiques sur un support de phylogénie moléculaire est une méthode efficace pour expliquer les patrons de radiations adaptatives (e.g. Mickevitch et Weller, 1990 ; Armbruster, 1992, 1993 ; Bruneau, 1997 ; Johnson et al., 1998a). Elle offre le recul souvent nécessaire à la compréhension de l'évolution des caractères (états apomorphes³ et plésiomorphes⁴) et à l'identification des homoplasies⁵. Pour l'évolution des interactions plantes-pollinisateurs, le recul évolutif apporté par la phylogénie est important, car peu de données fossiles existent (Johnson et al., 1998a).

³ Apomorphe : se dit d'un caractère dérivé.

⁴ Plésiomorphe : se dit d'un caractère ancestral.

⁵ Homoplasies : caractères analogues non issus d'une ascendance commune (synonyme de convergences ou évolutions parallèles).

3. LA RELATION PLANTE-POLLINISATEUR

Les biologistes sont conscients depuis longtemps de l'importance des interactions interspécifiques dans la détermination des processus évolutifs. L'idée que les diverses formes florales reflètent la spécialisation à différents groupes de pollinisateurs naquit avec Kölreuter (1761) et Sprengel (1793) et fut largement admise par la suite (e.g. Darwin, 1862 ; Baker, 1963 ; van der Pijl et Dodson, 1966 ; Stebbins, 1970; Fægri et van der Pijl, 1979 ; Wyatt, 1983 ; Johnson et Steiner 2000 ; Fenster et al., 2004). Les forces évolutives associées aux pollinisateurs ont donc joué un rôle majeur dans la diversification des angiospermes et des orchidées en particulier (e.g. Raven, 1979 ; Armbruster, 1992, 1993 ; Grant, 1993, 1994 ; Bruneau, 1997 ; Armbruster et Baldwin, 1998 ; Johnson et al., 1998a ; Goldblatt et al. 2000, 2001, 2002 ; Wilson et al. 2004 ; Manning et Goldblatt, 2005). Cependant, S. Johnson et al. (1998a) constatent que très peu d'études ont été réalisées sur l'implication des changements des systèmes de pollinisation dans la radiation adaptative d'un genre ou d'une famille. Selon eux, ceci n'est pas dû à la pauvreté des exemples mais à la tendance des biologistes à focaliser leurs recherches sur la pollinisation d'une espèce en particulier sans perspective comparative du groupe auquel elle appartient. En ce sens, la construction phylogénétique permet à la fois l'étude d'un groupe en son entier et la vision évolutive nécessaire à la compréhension des processus de diversification des espèces.

Deux espèces en interaction peuvent donc avoir une influence réciproque considérable au niveau de leur dynamique écologique et évolutive. La spécialisation qui en résulte s'exprime chez la fleur par l'apparition de caractères hautement adaptés aux types de pollinisateurs nécessaires à sa fécondation : plus attractifs pour le pollinisateur, ces caractères sont sélectionnés car ils représentent un gain en termes de succès reproducteur pour la plante. L'ensemble de ces traits floraux inclut le type de récompense (nectar,

pollen...), la couleur, l'odeur et la forme de la fleur. Ils définissent le syndrome de pollinisation de l'espèce (van der Pijl et Dodson, 1966 ; Fægri et van der Pijl, 1979 ; Wyatt, 1983 ; Proctor et al., 1996). Le syndrome de pollinisation permet donc de déduire le groupe de pollinisateurs associés à l'espèce. Cependant, la multiplicité des formes florales et la diversité des interactions plantes-pollinisateurs complexifient ce schéma simpliste. De nombreux contre-exemples ont montré que l'identification des syndromes de pollinisation n'est pas toujours corrélée avec celle des pollinisateurs effectifs (e.g. Ollerton, 1998 ; Johnson, 1992 ; Johnson et Bond, 1994). De plus, différents groupes de pollinisateurs peuvent exercer des pressions de sélection convergentes et de nombreuses espèces ont un système de pollinisation généraliste, incluant divers pollinisateurs (Waser et al., 1996 ; Ollerton, 1996, 1998, Oleson et al., 2002 ; Fenster et al., 2004).

4. LA RELATION PLANTE-POLLINISATEUR CHEZ LES ORCHIDÉES

Loin d'être généralistes, les systèmes de pollinisation des orchidées sont parmi les plus spécialisés du règne végétal (Tremblay, 1992; Johnson et Steiner, 2000; Tremblay et al., 2005) ; environ 60% des espèces ont seulement un seul pollinisateur identifié (Tremblay, 1992). Cette spécialisation maximise l'efficacité de la pollinisation (Nilsson, 1992), mais rend les orchidées bien plus dépendantes de leurs pollinisateurs que le contraire (Nilsson, 1992 ; Roberts, 2003). Bien que ce ne soit pas toujours le cas (e.g. Lehnebach et Robertson, 2004), les systèmes de pollinisation des espèces épiphytes sont souvent plus spécialisés que ceux des orchidées terrestres ; les pressions sélectives des pollinisateurs étant souvent plus conséquentes sur les populations de petites tailles ou lorsque les individus sont très dispersés, comme les épiphytes, que sur les espèces

terrestres dont les populations sont plus denses (hypothèse de *la dispersion-specialization*, Ackerman, 1986a), Les interactions orchidées-pollinisateurs n'ont cessé d'intriguer les biologistes (Darwin, 1862 ; van der Pijl et Dodson, 1966 ; van der Cingel, 2001 ; Tremblay et al., 2005), au niveau notamment de leurs conséquences évolutives sur l'extraordinaire diversification de la famille. Si la spéciation par sélection naturelle des caractères liés à la pollinisation a très tôt été envisagée comme principale source de diversification (Darwin, 1877), R. Tremblay et al. suggèrent cependant que l'action simultanée de la dérive génétique ne doit pas être sous-estimée (*Drift-selection model*, Tremblay et al., 2005). La sélection naturelle est un processus par lequel la fréquence des génotypes d'une population n'est pas déterminée de façon aléatoire, mais par la transmission à leur descendance du patrimoine génétique des individus les plus aptes à survivre dans un environnement donné. La sélection suit un processus déterministe, la dérive, un processus stochastique : en dehors de toute pression de sélection, la dérive génétique (évolution des fréquences alléliques au sein d'une population) est déterminée par le hasard des croisements entre individus dont les génotypes fluctuent de façon aléatoire au fil des générations. Tandis que la sélection naturelle est favorisée dans les populations de grande taille autorisant un flux de gènes constants entre individus et par conséquent des changements génétiques graduels, la dérive génétique est d'autant plus forte que les tailles des populations sont réduites et le flux de gènes entre elles peu conséquent. Chez les orchidées en particulier, du fait de la forte limitation qu'exercent les pollinisateurs sur le succès reproducteur des espèces (peu d'individus fructifères), le flux de gènes entre les populations est limité dans l'espace et le temps ; les tailles effectives des populations participant à la descendance et la perpétuation des espèces sont réduites, faisant de la dérive génétique une force évolutive importante dans l'évolution de la famille (Tremblay et al., 2005).

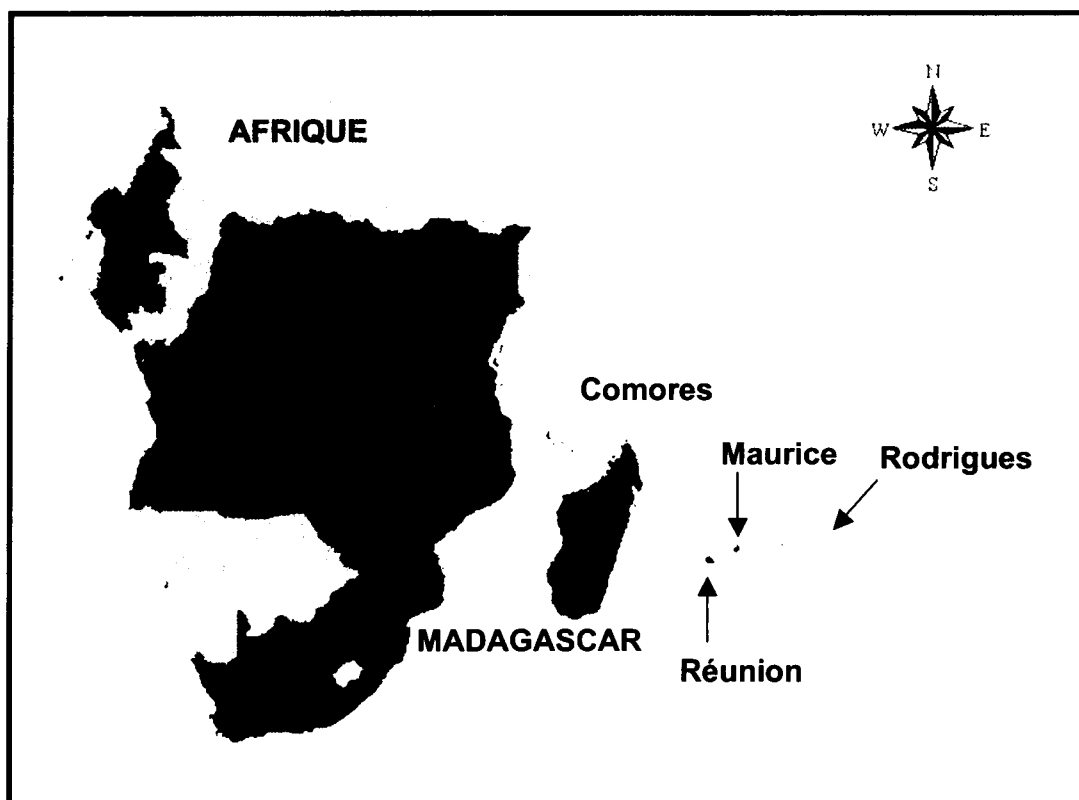


FIGURE 3. Situation géographique des trois îles des Mascareignes (Réunion, Maurice, Rodrigues) dans l'Océan Indien.

5. LES ILES OCEANIQUES ET L'ARCHIPEL DES MASCAREIGNES

Les îles océaniques (Hawaii, Galápagos, Mascareignes...) n'ont jamais été reliées à une masse continentale. Elles se distinguent par leur origine volcanique dépourvue de passé biologique, contrairement aux îles continentales (Madagascar, Angleterre...) qui ont hérité du patrimoine des terres dont elles se sont détachées.

Situé dans le bassin ouest de l'Océan Indien, l'archipel des Mascareignes regroupe trois îles océaniques, La Réunion, Maurice et Rodrigues, distantes respectivement de 800, 1000 et 1500 km des côtes Est de Madagascar (Figure 3). Tandis que La Réunion (2500 km²) et l'île Maurice (1800 km²) sont issues d'un point chaud (hot spot) (McDougall et Chamalaun, 1969), il y a environ 8 millions d'années pour Maurice et moins de trois millions pour La Réunion (McDougall et Chamalaun, 1969 ; McDougall, 1971), l'origine de Rodrigues (110 km²) est expliquée par une zone de fracture, résultant de la jonction des trois dorsales de l'Océan Indien (Bonneville et al., 1988). Longtemps considérée comme la plus jeune des trois îles (McDougall et Compston, 1965), Rodrigues serait en fait la formation la plus ancienne de l'archipel.

La Réunion se distingue par un relief découpé dominé par deux massifs volcaniques, dont un est encore actif (Piton de La Fournaise, 2619 m). Le Piton des Neiges, dont l'activité a cessé il y a environ 10 000 années, représente le point culminant de l'Océan Indien s'élevant à 3070 m (le plus haut sommet de Maurice atteint 823 m et celui de Rodrigues 400 m, pour comparaison). Associée à sa topographie complexe, la diversité des microclimats a favorisé la formation de communautés végétales d'autant plus diverses que spécifiques de l'île (Figure 4). Avec l'arrivée des premiers colons il y a environ 400 ans, les habitats naturels du littoral et les zones de basses altitudes ont été les premiers touchés par le développement humain et en grande partie détruits (Figure 4). La

végétation de l'intérieur des terres, moins accessible, a mieux résisté aux activités anthropiques. Environ 30% des écosystèmes primaires de l'île ont été préservés (Strasberg et al., in press). Pour comparaison, plus de 99% des zones de végétation naturelle ont été détruits sur l'île Maurice (Guého, 1988 cité par Strasberg, 1994). La Réunion appartient avec Madagascar et l'ensemble des îles de la zone sud-ouest de l'Océan Indien à l'un des 34 « *hotspot* » de la biodiversité mondiale (Myers al., 2000 ; <http://www.conservation.org>).

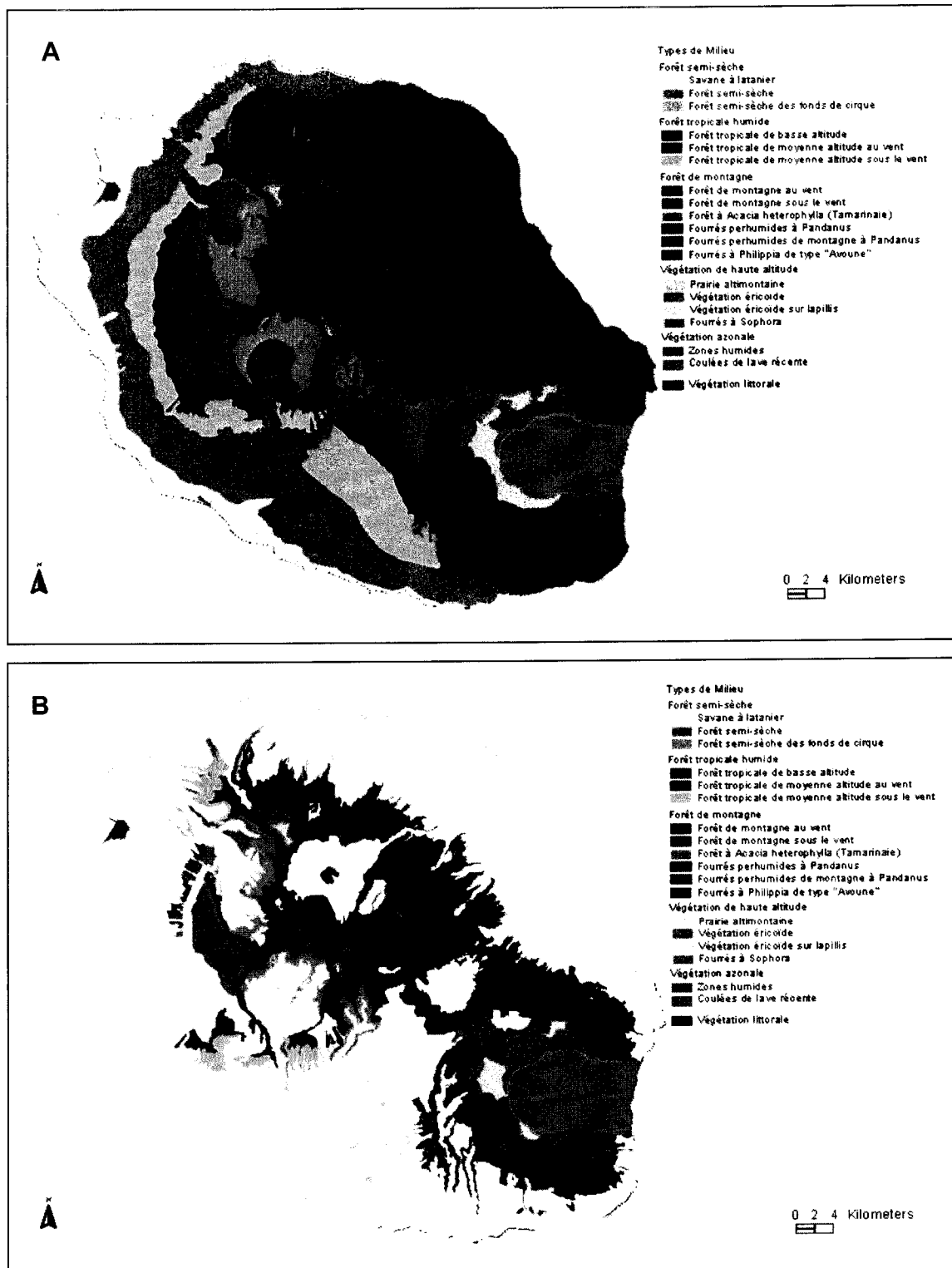


FIGURE 4. Carte des différents types de végétation de La Réunion. **A.** Avant l'arrivée de l'homme sur l'île. **B.** Aujourd'hui (repris de Strasberg et al., in press) (les orchidées sont présentes dans tous les milieux).

6. LES RELATIONS PLANTES-POLLINISATEURS DANS LES ILES OCEANIQUES

Dès leurs premières explorations, les naturalistes ont pris conscience de la spécificité des espèces animales et végétales insulaires et des potentialités que ces espaces originaux offraient pour la connaissance biologique du vivant. De son voyage aux îles Galápagos, C. Darwin élaborera la théorie de l'évolution par la sélection naturelle, véritable révolution dans un XIX^e siècle occidental encore fortement imprégné de l'idéologie chrétienne (Darwin, 1859). Le développement de la connaissance des systèmes insulaires (Mac Arthur et Wilson, 1967), les nombreuses études menées à Hawaii (Carlquist, 1974) et aux Galápagos (Darwin, 1859 ; McMullen, 1987) ont permis de mettre en évidence les particularités des espèces insulaires. Ces dernières sont en effet morphologiquement différentes de leurs homologues continentales, présentant un haut degré de spéciation (endémisme élevé) et de spectaculaires adaptations (Carlquist, 1974 ; Adersen, 1995 ; Baldwin, 1998 ; Oleson et al., 1998 ; Lindqvist et Albert, 2002). Le gigantisme du Dodo de l'île Maurice, *Raphus cucullatus*, aujourd'hui éteint, est l'exemple typique. Ces adaptations sont liées aux fortes contraintes génétiques et écologiques succédant la colonisation de l'île. Du fait de leur petite taille (réduite à un seul individu dans le cas extrême), les populations fondatrices sont plus sensibles aux nouvelles pressions de sélection du milieu (Mayr, 1963). Ces pressions reflètent les conditions environnementales et climatiques de l'île, les ressources et niches écologiques disponibles et les communautés déjà existantes (faune pollinisatrice, degrés de compétition, de prédation, de parasitisme...) (Eliasson, 1995). La diversification *in situ* dans l'île, à partir d'un ancêtre commun, illustre parfaitement le phénomène de radiations adaptatives (e.g. Darwin, 1859 ; Stebbins, 1970 ; Witter et Carr, 1988 ; Schluter et McPhail, 1993 ; Radtkey, 1996). Sur une île océanique, la composition de la faune pollinisatrice fut

empiriquement perçue comme le facteur déterminant l'évolution des systèmes de pollinisation et/ou des systèmes et des modes de reproduction chez les espèces insulaires (Baker, 1955; 1967; Stebbins, 1970 ; Carlquist, 1974; Barrett et Shore, 1987; McMullen, 1987; Barrett et al., 1989; Barrett, 1996; Schultz et Ganders, 1996). Du fait de la difficulté de colonisation à longue distance, l'entomofaune est typiquement moins riche sur les îles que sur les continents (Mac Arthur et Wilson, 1967). Certains groupes d'insectes sont parfois complètement absents ou très peu représentés (Carlquist, 1974; Woodell, 1979; McMullen, 1987; Barrett, 1996; Anderson et al., 2001). C'est le cas d'Hawaïi, par exemple, où seulement 15% des familles d'insectes connues sont présentes sur l'archipel (Howarth et Mull, 1992, cité par Barrett, 1996). Les flores insulaires sont typiquement représentées par des espèces à petites fleurs blanches ou vertes (Carlquist, 1974 ; Barrett, 1996 ; Anderson et al., 2001) dont les systèmes de pollinisation sont généralistes (e.g. Barrett, 1996 ; Anderson et al., 2001 ; Oleson et al., 2002 ; Lehnbach et Robertson, 2004) et qui reflètent des interactions avec l'entomofaune locale très peu spécialisées. La pollinisation est également souvent moins efficace sur les îles que sur le continent (e.g. Feinsinger et al., 1982 ; Barrett, 1996 ; Anderson et al., 2001). La faible densité d'insectes dans les îles océaniques aurait également favorisé la mise en place de systèmes de pollinisation anémophiles⁶ (Carlquist, 1974 ; Barrett, 1996 ; Anderson et al., 2001) ou ornithophiles⁷ (Feinsinger et al., 1982; Anderson et al., 2001; Anderson, 2003; Bernardello et al., 2004; Dupont et al., 2004), tous deux caractéristiques des syndromes de pollinisation des flores insulaires.

⁶ Pollinisation par le vent.

⁷ Pollinisation par les oiseaux.

7. LE CAS PARTICULIER DE LA REUNION

La Réunion admet par de nombreux aspects plusieurs exceptions à la tendance globale observée au sein des systèmes insulaires. Les études menées sur la biologie florale des espèces indigènes ont montré que les interactions plantes-pollinisateurs sont relativement bien représentées sur l'île : au moins 52% des espèces requièrent l'aide d'un animal vecteur pour être fécondées (Pailler, 2004). Elles incluent les nombreuses espèces dioïques⁸ (Humeau, 1999 ; Humeau et al., 1999a,b), hétérostyles⁹ (Thompson et al., 1996; Pailler, 1997; Pailler et Thompson, 1997; Pailler et al., 1998b), les *Ficus*, ou les orchidées allogames (Pailler, communication personnelle). Le taux d'espèces dioïques de La Réunion (18% Pailler, données non publiées) est parmi le plus important des milieux insulaires. La présence d'espèces hétérostyles est un autre caractère remarquable pour une île océanique : le polymorphisme floral est souvent absent chez les espèces insulaires. La Réunion se distingue donc par la diversité des interactions plantes-pollinisateurs remarquablement maintenues et son entomofaune d'une richesse peu commune pour une île océanique. Parmi les lépidoptères indigènes, 15 espèces diurnes et près de 450 espèces nocturnes, dont 13 Sphingidés (Guillermet et Guillermet, 1986) ont été recensés. Comparativement, seuls six Sphingidés ont été identifiés à Hawaii (Howarth et Mull, 1992, cité par Barrett, 1996) et aucun en Nouvelle Zélande (Carlquist, 1980). Les hyménoptères et diptères indigènes n'ont pas encore été recensés de manière exhaustive à La Réunion, mais les premiers inventaires suggèrent également que la diversité spécifique est élevée chez ces deux groupes de pollinisateurs reconnus (Pailler, 2004). Enfin, et peut-être paradoxalement, la richesse spécifique de l'entomofaune pollinisatrice est couplée à un fort taux d'espèces ornithophiles. *Zosterops borbonicus* et *Z. oliveaceus* (Passériformes,

⁸ Dioécie : système de reproduction chez lequel les individus sont mâles ou femelles (Boullard, 1998).

⁹ Hétérostylie : polymorphisme de la longueur du style et des anthères femelles (Boullard, 1998).

Zostéropidés), « z'oiseaux lunettes » ont été identifiés comme pollinisateurs de plus de 20 espèces indigènes (Gill, 1971 ; T. Pailler, communication personnelle). *Hypsipetes borbonicus*, « merle péi » (Passériformes, Pycnonotidés) visite également les fleurs de plusieurs espèces indigènes (T. Pailler, communication personnelle).

8. LES ORCHIDEES DE LA REUNION

L'île de La Réunion compte environ 500 espèces d'angiospermes indigènes (Bossier et al., 1976-) dont plus de 20% sont des orchidées. Elles constituent le groupe le plus représenté sur l'île. Réparties dans une trentaine de genres dont deux endémiques (*Bonnieria*, endémique de la Réunion ; *Arnottia*, endémique de la Réunion et de Maurice), les orchidées réunionnaises sont estimées à 138 espèces (Roberts, 2001). Plus de 25% sont endémiques de l'île, pour comparaison, ce taux est de 43% à Rodrigues (7 espèces) et de 9% à Maurice (93 espèces) (Roberts, 2001). Cependant, la dernière révision des orchidées réunionnaises date du XIX^e siècle (de Cordemoy, 1895, 1899) ; le nombre d'espèces reste donc une estimation, certainement surestimée. Le volume de la flore de Mascareignes consacré à la famille des Orchidacées (Bossier et al., 1976-) est actuellement en cours de préparation sous la tutelle de J. Bossier du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. Les espèces sont en majorité clairement identifiées et ne posent pas de problèmes taxonomiques particuliers. En revanche, les épithètes spécifiques de certains taxons notamment des genres *Cynorkis*, *Benthamia*, *Liparis* et *Habenaria* demandent confirmation, voire détermination, tout comme celles des petites espèces à fleurs vertes du genre *Angraecum*.

La richesse spécifique de la flore « orchidécenne » réunionnaise s'accompagne d'une large répartition de la famille sur l'île. Bien qu'extrêmement nombreuses entre 400 et 800 m, les orchidées ont également colonisé les zones de végétation les plus hautes de l'île, les zones sèches de l'ouest comme les forêts humides de l'est, si bien que les espèces sont présentes dans tous les biotopes de la Réunion de 0 à 2400 m d'altitude. La répartition des espèces sur l'île est fortement liée au gradient altitudinal et au mode de vie terrestre, géophyte ou épiphyte des espèces ; les zones les plus hautes étant caractérisées par un petit nombre d'espèces principalement terrestres ou géophytes, à l'image des flores des zones tempérées. Au-dessous de 1800 m d'altitude, les espèces épiphytes sont alors plus fréquentes, principalement représentées par les genres *Bulbophyllum* (Ti karambol), *Angraecum*, *Jumellea* et *Aeranthès*.

9. LA SOUS-TRIBU DES ANGRAECINAE

Ces trois derniers genres appartiennent à la sous-tribu des Angraecinae. La sous-tribu, présente dans la zone sud-ouest de l'Océan Indien et en Amérique du sud, s'est principalement diversifiée à Madagascar (environ 240 espèces). Elle inclut sept genres et une cinquantaine d'espèces à La Réunion (environ 40% des orchidées réunionnaises). Les Angraecinae se distinguent par leur mode de vie généralement épiphyte, leur croissance de type monopodial et leurs fleurs blanches ou vertes, nectarifères, dont l'éperon est souvent proéminent. Parmi elles, et parmi toutes les orchidées réunionnaises, le genre le plus riche en nombre d'espèces est le genre *Angraecum*.

Les espèces malgaches du genre *Angraecum* à l'instar de « l'étoile de Madagascar », *Angraecum sesquipedale*, ont joui du prestige de l'attention particulière de C. Darwin, dont l'étude a révélé leur intérêt à la communauté scientifique, mais aussi à l'imaginaire collectif (Darwin, 1962). C. Darwin fut en effet intrigué par le développement de l'éperon¹⁰ pouvant dépasser 30 cm. Il prédit alors qu'un sphinx géant à la trompe suffisamment longue pour atteindre le nectar situé au fond de l'éperon devait exister dans les forêts de Madagascar. Lui seul aurait la morphologie requise pour assurer la pollinisation des incroyables fleurs de l'orchidée. Le génie de C. Darwin avait vu juste : le sphinx fut découvert 41 années plus tard, baptisé en sa mémoire *Xanthopan morgani* var. *praedicta* (Rothschild et Jordan, 1903). Toutefois, la pollinisation de l'orchidée par le sphinx ne fut décrite pour la première fois que 135 ans après les observations de C. Darwin (Wasserthal, 1997) !

Les études conduites depuis sur la pollinisation des orchidées angraecoïdes¹¹ malgaches à long éperon (Nilsson et al., 1985, 1987; Nilsson et Rabakonandrianina, 1988 ; Wasserthal, 1997) ont mis en évidence les particularités des systèmes de pollinisation, fortement asymétriques (*sensus* Ashworth et al., 2004) : tandis que l'orchidée n'admet qu'un seul (Nilsson et al., 1985, 1987; Wasserthal, 1997) ou rarement deux pollinisateurs (Nilsson et Rabakonandrianina, 1988), les sphinx au contraire visitent en général plusieurs espèces d'orchidées. Pour C. Darwin (1862), bien qu'il n'ait pas eu connaissance du pollinisateur d'*Angraecum sesquipedale*, l'adéquation morphologique entre la longueur du proboscis et celle de l'éperon était le résultat d'interactions réciproques interspécifiques illustrant parfaitement le phénomène de coévolution : le développement du proboscis est

¹⁰ Eperon : prolongement fin de l'un des pétales (le labelle chez les orchidées) contenant le nectar (Boullard, 1988).

¹¹ Angraecoïde est le terme utilisé pour désigner les orchidées des sous-tribus des Angraecinae et des Aerangidinae.

sélectionné car il confère un avantage nutritionnel au sphinx (meilleure exploitation du nectar contenu dans l'éperon) ; le développement de l'éperon est conjointement sélectionné car il confère un meilleur succès reproducteur à l'orchidée. Ce processus coévolutif, aussi appelé « *Coevolutionary race* » est illustré Figure 5a. L. A. Nilsson démontra par la suite montré le bien-fondé du raisonnement de C. Darwin, en prouvant expérimentalement que les individus de *Platanthera sp.* qui possédaient les éperons les plus longs avaient effectivement un meilleur succès reproducteur (Nilsson, 1988). Ainsi, la relation entre les sphinx à longues trompes et les orchidées à long éperon de Madagascar était l'exemple par excellence d'une coévolution entre espèces.

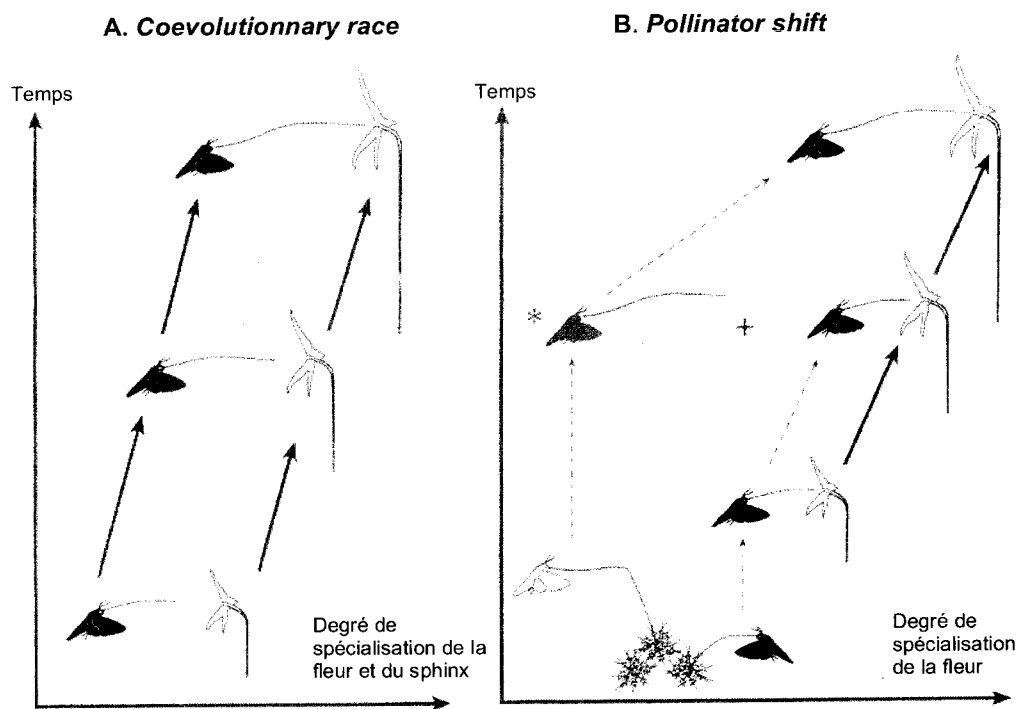


FIGURE 5. Comparaison des modèles de coévolution (A) et de changement de pollinisateurs (B) (transformé d'après Wasserthal, 1997).

Cependant, L. T. Wasserthal proposa une alternative à la pensée de C. Darwin (Wasserthal, 1997). Malgré le développement itératif de la longueur de l'éperon des orchidées, malgré l'allongement parallèle, également convergent de la taille de la trompe des sphinx, les pressions sélectives réciproques associées à la relation plante-pollinisateur seraient en fait unidirectionnelles, imposées par les sphinx. L. T. Wasserthal suggéra ainsi que si l'avantage reproductif avait été démontré pour l'orchidée, aucun avantage nutritionnel n'avait été prouvé pour le sphinx. Pour expliquer le gigantisme des éperons, il prôna l'hypothèse de l'évolution par un changement de pollinisateurs, ou encore « *Pollinator shift* », illustré Figure 5b. Pour L. T. Wasserthal, les sphinx à longue trompe existaient bien avant l'apparition des orchidées, qui se seraient donc adaptées à leurs pollinisateurs sans qu'il y ait de coévolution. Selon lui, le déterminisme du développement du proboscis serait associé aux mécanismes de défense contre les prédateurs lors du butinage. Sur son site d'étude, les sphinx n'étaient d'ailleurs pas dépendant du nectar des orchidées pour leur survie. L. A. Nilsson admit par la suite que le développement du proboscis n'était pas déterminé par la compétition pour l'accès au nectar entre les sphinx (Nilsson, 1992). C. Darwin, L. A. Nilsson, et L. T. Wasserthal s'entendent toutefois sur le fait que la taille de l'éperon est positivement sélectionnée car elle assure un meilleur succès reproducteur aux espèces. La sélection pour la longueur de l'éperon a également été vérifiée chez d'autres espèces d'orchidées (e.g. Inoue, 1986 ; Johnson et Steiner, 1997 ; Johnson et al., 1998a ; Ellis et Johnson, 1999), bien que ce ne soit pas toujours le cas (e.g. Maad, 2000 ; Luyt et Johnson, 2001).

Les orchidées angraecoïdes des régions malgaches ont donc été très tôt associées au syndrome de pollinisation sphingophile. Les espèces qui définissent ce syndrome exhibent typiquement des fleurs dont l'épéron filiforme, supérieur à 5 cm en longueur, contient un nectar riche en sucre. D'un blanc pur, les fleurs produisent une odeur puissante au crépuscule aux notes florales du jasmin (van der Pijl et Dodson, 1966). Les sphinx qui leur sont associés possèdent un long proboscis. Ils butinent les fleurs à la tombée de la nuit, les localisent à longue distance par l'odeur qu'elles émettent et à courte distance par leur couleur (van der Pijl et Dodson, 1966 ; Nilsson, 1992). Ils visitent les fleurs afin de collecter le nectar qu'elles contiennent ; ce faisant ils en assurent la pollinisation (Encadré 1).

ENCADRE 1. PROCESSUS DE POLLINISATION (PRELEVEMENT ET DEPOT DE POLLINIES)
D'ANGRAECUM SESQUIPEDALE SELON C. DARWIN (1862, PP. 194-195).

« ... et on saurait douter, je crois, qu'un gros papillon ne soit contraint d'agir ainsi, c'est-à-dire, de dérouler complètement sa trompe en l'engageant dans l'échancrure du rostellum [d'*Angraecum sesquipedale*], de manière à atteindre l'extrémité du nectaire, puis de la retirer chargées de pollinies [...] Maintenant, qu'un papillon engage sa trompe, portant des pollinies fixées près de sa base, dans l'orifice du nectaire, et probablement les masses polliniques seront d'abord introduites au-dessous du rostellum ; puis quand, dans un dernier effort, l'insecte fera passer sa trompe dans l'échancrure de ce dernier organe, elles seront presque nécessairement déposées sur le stigmate, crête étroite qui s'avance au-dessous du rostellum [...] Si l'*Angraecum*, dans les forêts malgaches de son pays natal sécrète plus de nectar que les vigoureuses plantes que m'a envoyées M. Bateman, de telle sorte que son nectaire soit rempli, de petits papillons peuvent en prendre part, mais sans aucun avantage pour la plante. Les pollinies ne seront pas enlevées jusqu'à ce qu'un très gros papillon, muni d'une trompe merveilleusement longue, ait essayé d'aspirer la dernière goutte. Si l'espèce de ces grands papillons venait à s'éteindre à Madagascar, assurément, il en serait de même pour l'*Angraecum* »

10. PROBLEMATIQUE, OBJECTIFS ET PLAN DE LA THESE

T. Cadet (1977) a mis en évidence l'origine principalement malgache de la flore réunionnaise. La richesse spécifique des Angraecinae de Madagascar a été expliquée, comme nous l'avons vu, par la sélection directionnelle à long terme des différents traits associés à la pollinisation (longueur de l'éperon, production d'odeur et de nectar) permettant à la plante de s'assurer les services d'un pollinisateur souvent unique, relations archaïques qui ont persisté dans l'environnement stable et isolé de Madagascar (Nilsson et al., 1985). Une telle spécialisation rend la plante entièrement dépendante de son unique pollinisateur. En présence du partenaire lors de la colonisation des îles, il est fort probable que la relation interspécifique soit maintenue. La présence du protagoniste de la pollinisation facilite alors l'établissement des individus pionniers dans le nouveau milieu. En absence du partenaire, au contraire, l'adaptation à la faune pollinisatrice locale ou l'évolution vers d'autres systèmes et/ou modes de reproduction semblent les seules solutions permettant le maintien des populations par reproduction sexuée. La perte de l'interaction avec le pollinisateur spécifique entraîne soit (1) le relâchement des différentes pressions sélectives, soit (2) un changement des forces sélectives exercées par les pollinisateurs insulaires, pouvant alors conduire à l'évolution de nouveaux traits floraux. A la Réunion, la sous-tribu des Angraecinae est extrêmement intéressante : elle présente à la fois des espèces typiquement sphingophiles à l'image des espèces malgaches et trois espèces dont la morphologie des fleurs (blanches, éperon court et large) semble tout à fait originale dans la sous-tribu : *Angraecum bracteosum*, *A. cadetii* et *A. striatum* qui forment la section *Hadrangis* endémique des Mascareignes. Le nombre important d'espèces de la sous-tribu à la Réunion ainsi que la diversité des formes florales offrent l'opportunité d'étudier plus en détail les Angraecinae réunionnaises : les souches ancestrales des Angraecinae réunionnaises ont-elle vraiment une origine malgache ? Quelles en étaient les

formes florales ? L'établissement des Angraecinae à La Réunion fut-il liée à plusieurs événements de colonisation ou les espèces se sont-elles diversifiées *in situ* dans l'archipel ? Quelle est l'implication de la relation plante-pollinisateur dans les processus de radiation s'ils existent ? Quelle fut l'évolution de la relation orchidées-sphinx suite à la colonisation de la Réunion : maintien, perte, évolution vers de nouvelles interactions ?

Les îles océaniques ont bénéficié et bénéficient encore de l'attention particulière des biologistes. Les écosystèmes insulaires, du fait de leur origine récente et connue, de leur isolement géographique (peu d'échanges avec le continent) et de leur taille réduite constituent des modèles de choix pour étudier l'impact du milieu sur la direction évolutive des formes florales. Lorsqu'elles sont analysées à la lumière de leurs homologues continentales, les espèces insulaires représentent des « organismes-clés » dans l'étude de l'évolution et de la spéciation des végétaux (e.g. Crawford et Stuessy, 1997). Les phylogénies moléculaires des plantes insulaires ont donc été intensivement publiées ces dernières années apportant de nouvelles connaissances sur les processus de colonisation et de radiation des espèces *in situ* dans les îles (Macaronésie : e.g. Kim et al., 1996 ; Panero et al., 1999 ; Francisco-Ortega et al., 2001, 2002 ; Juan Fernandez : e.g. Crawford et al., 1998 ; Galápagos : e.g. Schilling et al., 1994 ; Hawaii : e.g., Baldwin et al., 1991 ; Pax et al., 1997 ; Baldwin, 1998 ; Baldwin et Sanderson, 1998 ; Givnish, 1998 ; Kim et al., 1998 ; Raz et al., 1998 ; Vargas et al., 1998 ; Ballard et Sytsma, 2000 ; Lowrey et al., 2001 ; Lindqvist et Albert, 2002). En revanche, très peu d'études ont été menées jusqu'à présent sur la flore des Mascareignes. Les rares cas se situent dans l'étude globale de la systématique d'une famille ou d'un genre, où les espèces de l'archipel représentent un échantillon restreint (e.g. Molvray et al., 1999 ; Andreasen et Bremer, 2000 ; Bayer et al.,

2000 ; Wilson et al., 2001 ; Malcomber, 2002 ; Pelser et al., 2002 ; Howarth et al., 2003 ; Graham et Barrett, 2004 ; Alejandro et al., 2005).

La reconstruction phylogénétique offre le recul évolutif nécessaire à la compréhension des événements de colonisation et des relations de parenté entre les taxons. L'utilisation de caractères moléculaires est particulièrement adéquate lorsque les phénomènes de convergence associés aux pressions sélectives des pollinisateurs sont importants, comme chez les orchidées en général et chez les Angraecinae en particulier (Garay, 1973). L'outil moléculaire vise à également à offrir de nouvelles perspectives à la systématique du groupe, complément que nous espérons utile à l'étude morphologique en cours au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.

Cette étude se situe à l'interface de la systématique moléculaire, de la biologie reproductive et de la biologie évolutive.

Le premier objectif était d'investir la systématique moléculaire de la sous-tribu des Angraecinae afin d'en dégager les principales conclusions taxonomiques dans le contexte local de la préparation du volume des Orchidacées de la flore des Mascareignes et dans le contexte plus général de l'investigation phylogénétique de la famille.

Mais, le support phylogénétique vise également, couplé à l'étude de la biologie reproductive des espèces, à mieux comprendre l'implication des systèmes de pollinisation dans l'écologie et l'évolution des formes florales des espèces réunionnaises.

Elle s'articule donc autour de deux grandes parties : le premier chapitre est consacré à la systématique et à la biogéographie des Angraecinae de l'île, le second à la présentation de la biologie florale des espèces, en insistant particulièrement sur les espèces typiquement sphingophiles et sur les systèmes de pollinisation spécifiques de La Réunion.

CHAPITRE I

TAXONOMIE ET BIOGEOGRAPHIE DE LA SOUS-TRIBU DES ANGRAECINAE

« Je rencontrai encore sur l'arête un magnifique angrec que j'ai trouvé depuis en plusieurs endroits. La blancheur et les dimensions de ses fleurs, l'odeur suave qu'elles répandent, la rendent l'une des plus intéressantes espèces de son genre ; je l'appellerai angrec couleur d'ivoire. »

J.-B. Bory de Saint Vincent, 1804 (référence à *Angraecum eburneum*).

1. PRESENTATION DE LA SOUS-TRIBU DES ANGRAECINAE

La richesse spécifique de la famille des Orchidaceae Adans.¹² liée à l'importante variabilité morphologique des espèces ont rendu d'autant plus complexe le travail des taxonomistes. Néanmoins, jusqu'à l'avènement de la biologie moléculaire, la classification morpho-anatomique de référence était celle de R. Dressler, basée essentiellement sur la position et le nombre des étamines fertiles (Dressler, 1981, 1993). Les Orchidaceae y étaient alors divisées en 5 sous-familles : les Apostasioideae Rchb.f. (2 genres, 2 ou 3 étamines fertiles), les Cypripedioideae Lindl. (5 genres, 2 étamines fertiles), les Spiranthoideae Dress. (une centaine de genres, une seule étamine fertile, anthère dressée et acrotonique¹³), les Orchidoideae Dress. (également une centaine de genres, une seule étamine fertile, anthère dressée et basitonique¹⁴) et les Epidendroideae Lindl. (la plus importante sous-famille, environ 600 genres, regroupant toutes les autres espèces dont l'anthère est courbée à sub-dressée et à une seule étamine fertile) (un rappel des terminologies utilisées dans la taxonomie de la famille des Orchidaceae est présenté Tableau 1).

¹² Les abréviations des noms d'auteurs correspondent à celles de « *International Plant Names Index* » (<http://www.ipni.org/index.html>)

¹³ Acrotonique : le rostellum (lobe stérile de l'un des trois stigmates qui sépare l'anthère de la surface stigmatique fertile) ou les viscidies (structures visqueuses et adhérente située sur le rostellum, permettant la fixation des pollinies sur les pollinisateurs) sont associés avec l'apex de l'anthère (Dressler, 1993).

¹⁴ Basitonique : le rostellum ou les viscidies sont associés avec la base de l'anthère (Dressler, 1993).

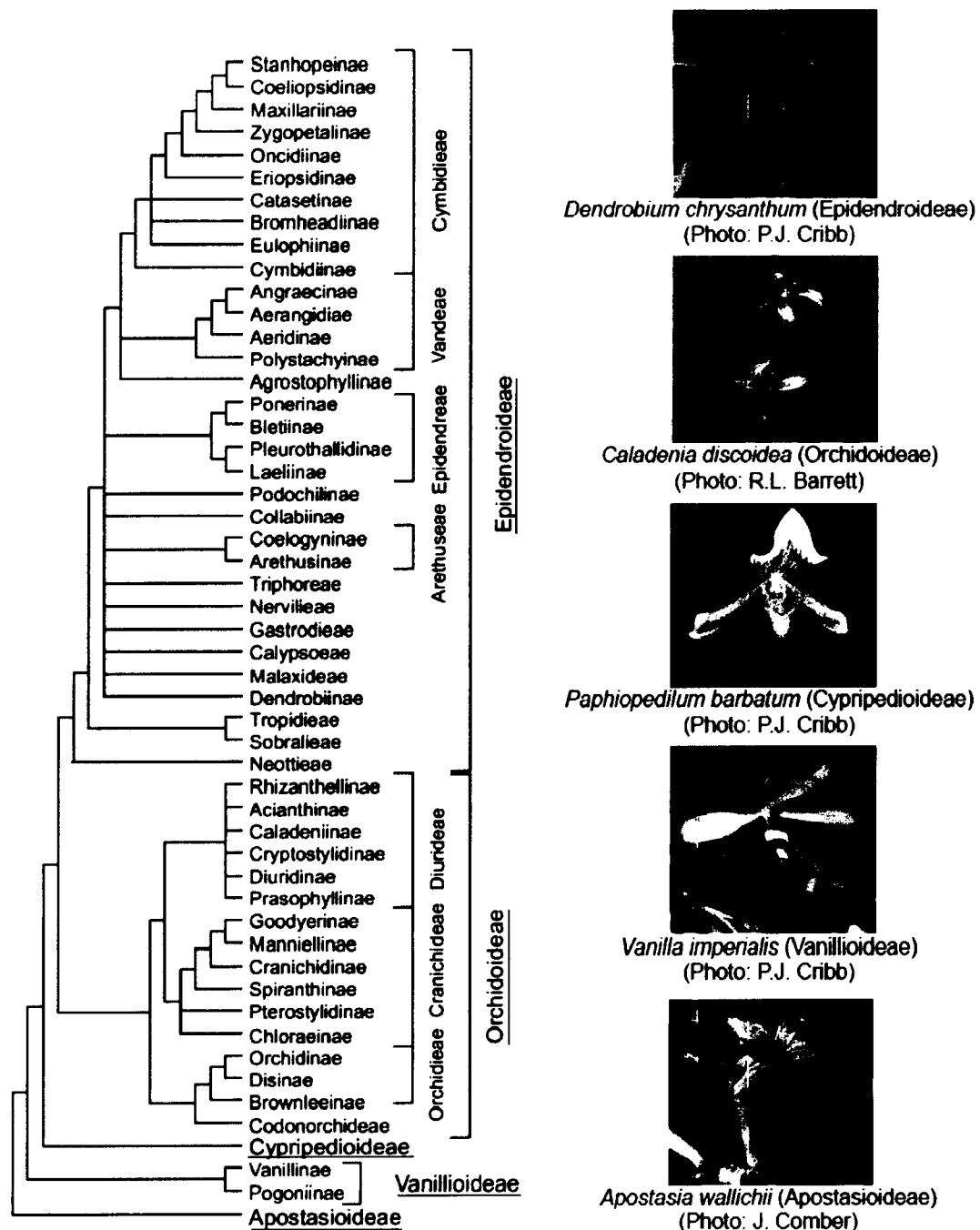


FIGURE 6. Arbre phylogénétique de la famille des Orchidaceae issu de la synthèse des données moléculaires (arbre phylogénétique et photos repris de Chase et al., 2003).

TABLEAU 1. Terminologies latines selon le rang taxonomique (d'après le code international de nomenclature botanique de Saint Louis (1999), Chap. III, sect. 2). Exemple de la classification d'*Angraecum striatum* Thou.

Rangs taxonomiques	Terminologies latines
Famille	Orchidaceae
Sous-famille	Epidendroideae
Tribu	Vandaeae
Sous-tribu	Angraecinae
Genre	<i>Angraecum</i>
Section	<i>Hadrangis</i>
Espèce	<i>Angraecum striatum</i> Thou.

La parution de la classification révisée de R. Dressler en 1993 fut accompagnée la même année de la publication de la première phylogénie moléculaire, basée sur le séquençage du gène chloroplastique *ndhF* (Neyland et Urbatsch, 1993), marquant le début d'intenses recherches sur la phylogénie de la famille à partir de séquences d'ADN (e.g. Chase et al., 1994 ; Cameron et al., 1999 ; Cameron et Chase, 2000 ; Molvray et al., 2000 ; Freudenstein et Chase, 2001 ; Chase et al., 2003 ; Freudenstein et al., 2004). Dix années après celle de R. Dressler, M. W. Chase et al. proposent une nouvelle classification des orchidées basée sur la synthèse des différentes phylogénies moléculaires, classification de référence pour cette étude (Chase et al., 2003). De la classification de R. Dressler de 1993, la sous-famille des *Spiranthoideae* a été incluse dans celle des *Orchidoideae* ; le groupe des vanillioïodes a été élevé au rang de sous-famille (Chase et al. 2003). Les 5 sous-familles actuellement valides pour la famille sont donc : les *Apostasioideae*, les *Cypripedioideae*, les *Vanilloideae*, les *Orchidoideae*, et les *Epidendroideae* (Chase et al. 2003) (Figure 6).

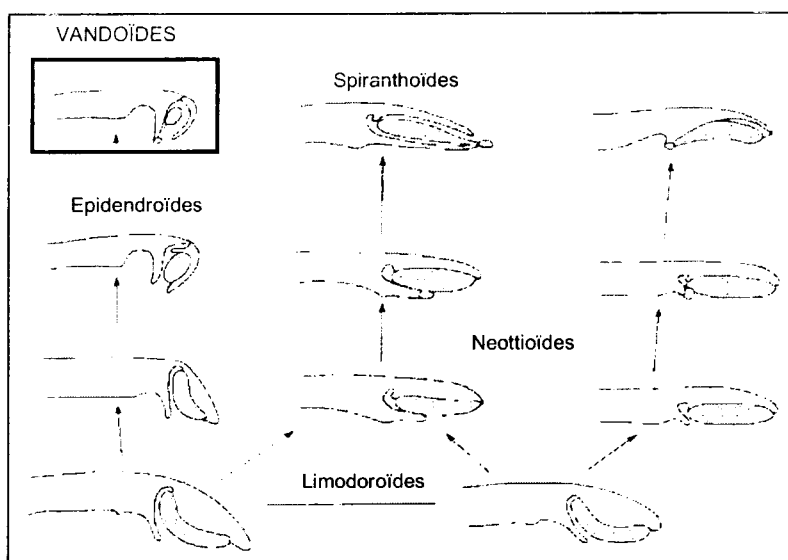


FIGURE 7. Evolution de la colonne dans la famille des Orchidaceae. (repris de Dressler, 1993).

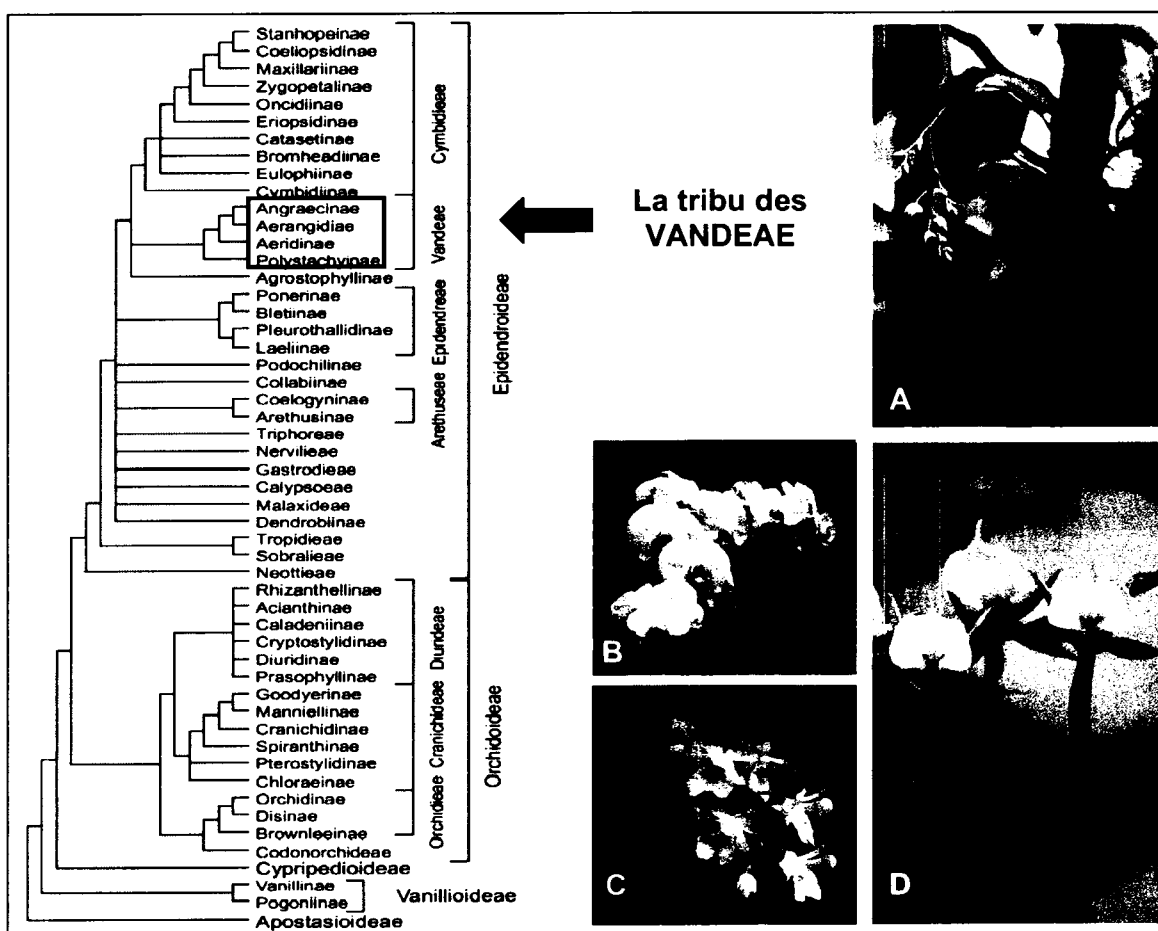


FIGURE 8. Position de la tribu des Vandeae dans l'arbre phylogénétique de la famille des Orchidaceae (repris de Chase et al., 2003). **A. Les Polystachyinae** (*Polystachya mauritiana*) (Photo : T. Pailler). **B. Les Aeridinae** (*Phalaenopsis sp.*) (Photo : S. Filiao). **C. Les Aerangidinae** (*Beclardia macrostachya*) (Photo : T. Pailler). **D. Les ANGRAECINAE** (*Angraecum eburneum*) (Photo : T. Pailler).

1. 1. Classifications de la sous-tribu des Angraecinae

S'inscrivant dans la lignée des Epidendroideae supérieures, les orchidées « vandoïdes », c'est-à-dire les Cymbidieae et les Vandeae *sensus* Chase et al. (2003) se sont principalement diversifiées dans l'ancien monde, il y a 20 à 25 millions d'années (M. Chase, communication personnelle). Historiquement, la complexité de la colonne des espèces de ce groupe (Figure 7) a conduit les botanistes à les classer parmi les orchidées les « plus évoluées », c'est-à-dire les mieux adaptées à la pollinisation. La morphologie du pollinaire est notamment caractérisée par la présence de structures bien différenciées, comme les viscidies ou les stipes¹⁵, et un nombre réduit de pollinies (2 ou 4), tous deux interprétés comme des caractères dérivés dans l'évolution de la famille (e.g. Dressler, 1993 ; Freudenstein et Rasmussen, 1999 ; Freudenstein et al., 2002).

La tribu des Vandeae inclut plus de 2200 espèces, réparties en quatre sous-tribus : les Polystachyinae, les Aeridinae, les Aerangidinae et les Angraecinae (Figure 8). Les Polystachyinae (environ 230 espèces) ont une distribution pantropicale, mais sont principalement représentées en Afrique et en Amérique. Elle se distinguent des trois autres sous-tribus par (1) leur croissance de type sympodial, pouvant former des pseudo-bulbes (Dressler, 1981) et (2) des fleurs à 4 pollinies. Les Aeridinae, Aerangidinae et Angraecinae en revanche représentent le seul groupe dans lequel toutes les espèces ont une croissance de type monopodial (Figure 9) (Dressler, 1981). Tandis que les Aeridinae (environ 1300 espèces) sont principalement présentes en Asie, ne comptant que deux représentants en Afrique, *Acampe pachyglossa* et *Taeniophyllum coxii* récemment découverte à Maurice (Roberts et al., 2004), les sous-tribus des Aerangidinae (environ 300 espèces) et des Angraecinae (env. 400 espèces) comptent parmi les plus grands groupes de la région afro-

¹⁵ Stipes : utilisé pour parler de caudicules particuliers (notamment chez les Vandeae), dont l'origine cellulaire n'est pas dérivée de l'anthère (Dressler, 1993).

malache (Afrique, Madagascar, Comores, Seychelles, Mascareignes). Les Angraecinae ont cependant colonisé une partie du continent sud-américain, où environ 70 espèces ont été inventoriées ; une espèce (*Angraecum zeylanicum* Lindl.) est également présente au Sri Lanka. Outre cette distinction géographique, les Aeridinae se distinguent des Aerangidinae et des Angraecinae par la présence d'espèces à 2 ou 4 pollinies (strictement 2 chez les Aerangidinae et les Angraecinae) et par l'éperon qui est souvent bien moins proéminent (Dressler, 1993). La discrimination entre les Aerangidinae et les Angraecinae semble plus complexe. Historiquement, R. Schlechter fut le premier à diviser les orchidées « angraecoïdes » selon deux groupes, les Aerangidinae et les Angraecinae (Schlechter, 1926). Il reconnaît dans le premier groupe toutes les espèces dont le rostellum est allongé, entier ou bifide. Par opposition, il inclut dans son deuxième groupe toutes les espèces ne présentant pas ce caractère. En 1966, V. S. Summerhayes complète la définition de R. Schlechter, en incluant le nombre basique de chromosomes comme caractère distinctif des deux groupes, qu'il élève alors aux rangs de sous-tribus (Summerhayes, 1966). Ainsi, les Angraecinae sont représentatives des espèces dont le nombre basique de chromosomes est de $x = 19^{16}$ et les Aerangidinae de $x = 25$. Si les travaux de K. Jones sont en accord avec les définitions de V. S. Summerhayes (Jones, 1967), J. C. Arends et F. M. van der Laan après avoir échantillonné un plus grand nombre d'espèces, montrent clairement que le nombre de chromosomes n'est pas un caractère fiable pour discriminer les deux sous-tribus (Arends et van der Laan, 1983, 1986). Le seul genre *Angraecum*, par exemple, contient des espèces qui ont un nombre basique de chromosomes identique à celui de certaines espèces incluses parmi les Aerangidinae (*Angraecum* : $x = 19, 21, 23, 24, 25$; Aerangidinae : $x = 21, 23, 24, 25, 26, 27$).

¹⁶ Dans la suite du manuscrit, x désigne le nombre basique de chromosomes, soit le nombre de paires de chromosomes homologues.

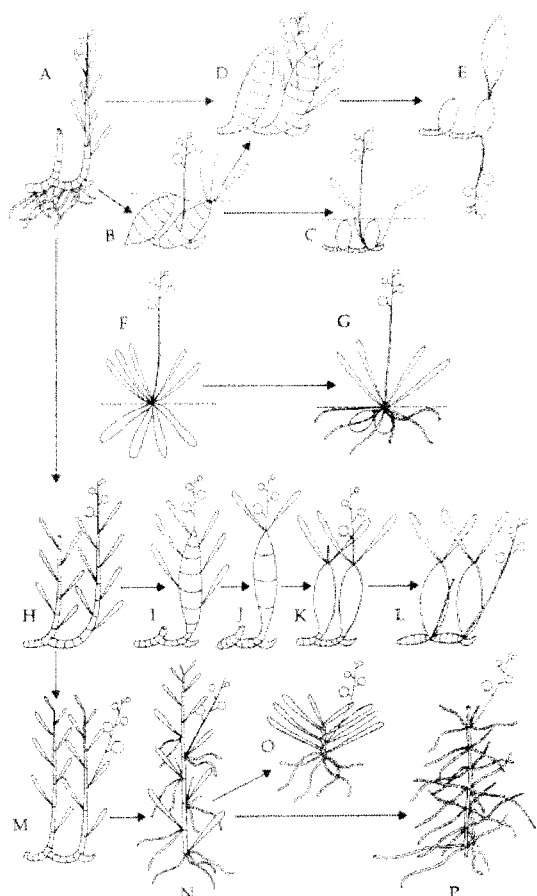


FIGURE 9. Evolution du type de croissance dans la famille des Orchidaceae. (D'après Dressler, 1993).

N à P : développement de type **monopodial**, caractéristique de celui des espèces des trois sous-tribus, Angraecinae, Aerangidinae et Aeridinae (**O**). **P :** Formes aphyllées dont les racines sont chlorophylliennes.

A noter : le développement de l'inflorescence des espèces dont la croissance est monopodiale est latérale, caractère également dérivé dans la famille des Orchidaceae.

TABLEAU 2. Les différentes définitions de la sous-tribu des Angraecinae par auteur et par année.

	Schlechter (1926)	Dressler (1981)	Dressler (1993)	Chase et al. (2003)
<i>Aeranthès</i>	x (<i>Bathiera</i>)	x	x	x
<i>Ambrella</i>		x	x	x
<i>Angraecum</i>	x	x	x	x
<i>Bonniera</i>	x	x	x	x
<i>Calypstrochilum</i>			x	x
<i>Campylocentrum</i>	x	x	x	x
<i>Cryptopus</i>	x	x	x	x
<i>Dendrophylax</i>	x	x	x	x
<i>Harrisella</i>	x	x	x	x
<i>Jumellea</i>	x	x	x	x
<i>Lemurella</i>		x	x	x
<i>Lemurorchis</i>			x	x
<i>Listrostachys</i>			x	x
<i>Neobathiera</i>		x	x	x
<i>Oeonia</i>	x	x	x	x
<i>Oeoniella</i>	x	x	x	x
<i>Ossiculum</i>			x	x
<i>Perrierella</i>		x	x	
<i>Polyradicion</i>	x (<i>Polyrrhiza</i>)	x	x	
<i>Sobennikoffia</i>		x	x	x

De nombreuses délimitations ont été proposées pour la sous-tribu (Tableau 2). Initialement, R. Schlechter en 1926 reconnut 11 genres dans les Angraecinae (Schlechter, 1926). R. Dressler en 1981 y ajouta cinq genres malgaches : quatre initialement décrits par R. Schlechter mais qu'il n'avait pas inclus parmi les Angraecinae (*Sobennikoffia*, *Neobathiera*, *Perrierella* et *Lemurella*) et le genre *Ambrella*, décrit depuis par H. Perrier de la Bâthie en 1934. En 1986, J. C. Arends et F. M. van der Lann proposèrent de diviser les deux sous-tribus (i.e. Angraecinae et Aerangidinae) en 4 groupes, selon le nombre basique de chromosomes associé à la forme du rostellum. Les groupes 1 et 2 de ces auteurs incluent les espèces ayant un rostellum non allongé : $x = 19$ pour les espèces du groupe 1 (*Cryptopus*, *Oeoniella*, *Jumellea* et une partie des *Angraecum*) et $x = 21, 23, 24$ ou 25 pour les espèces du groupe 2 (*Angraecum* uniquement africains). Les groupes 3 et 4, au contraire, incluent les espèces au rostellum allongé : $x = 17$ ou 18 pour le groupe 3 (*Ossiculum* et *Calypstrochilum*) et $x = 21$ à 27 pour le groupe 4 (les Aerangidinae). En tenant compte de ces travaux cytologiques, R. Dressler en 1993 proposa 20 genres pour la sous-tribu, incluant les genres *Listrostachys*, *Calypstrochilum* et *Lemurorchis*, initialement placés dans les Aerangidinae et le genre *Ossiculum* nouvellement décrit (Cribb et van der Laan, 1986). Enfin, en 2003, M. W. Chase et al., réduisirent les Angraecinae à 18 genres : les genres *Perrierella* et *Polyradicion* étant respectivement synonymes d'*Oeonia* et de *Dendrophylax*. Depuis la classification de Chase et al. (2003), le genre *Harrisella* a été placé en synonymie du genre *Campylocentrum* (Carlswald et al., 2003). Le nombre actuel de genres dans la sous-tribu est donc de 17 : *Aeranthus*, *Ambrella*, *Angraecum*, *Bonniera*, *Campylocentrum*, *Calypstrochilum*, *Cryptopus*, *Dendrophylax*, *Jumellea*, *Lemurella*, *Lemurorchis*, *Listrostachys*, *Neobathiera*, *Oeonia*, *Oeoniella*, *Ossiculum* et *Sobennikoffia* (Tableau 3).

TABLEAU 3. Les Angraecinae: nombre d'espèces et répartition géographique. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre d'espèces endémiques (Afri: Afrique ; Mada: Madagascar ; Masc: Mascareignes ; Com: Comores ; Sey: Seychelles ; SL: Sri Lanka ; AmS: Amérique du Sud ; Sp/Ge: Nombre total d'espèces par genre).

Genres ^a	Afri ^b	Mada ^c	Masc ^d	Com ^c	Sey ^c	SL ^b	SAm ^e	Sp/Ge
<i>Aeranthus</i> Lindl. (1824)	2 (2)	40 (35)	5 (2)	3	0	0	0	44
<i>Ambrella</i> H.Perrier (1934)	0	1 (1)	0	0	0	0	0	1
<i>Angraecum</i> Bory (1804)	47 (45)	138 (128)	30 (23)	10 (3)	4	1	0	209
<i>Bonnieria</i> Cordem. (1899)	0	0	2 (2)	0	0	0	0	2
<i>Calypstrochilum</i> Kraenzl. (1895)	2 (2)	0	0	0	0	0	0	2
<i>Cryptopus</i> Lindl. (1824)	0	3 (2)	1	0	0	0	0	3
<i>Jumellea</i> Schltr. (1914)	2 (2)	42 (41)	9 (9)	6 (5)	0	0	0	58
<i>Lemurella</i> Schltr. (1925)	0	4 (4)	0	0	0	0	0	4
<i>Lemurorchis</i> Kraenzl. (1893)	0	1 (1)	0	0	0	0	0	1
<i>Listrostachys</i> Rchb.f (1852)	1 (1)	0	0	0	0	0	0	1
<i>Neobathiera</i> Schltr. (1925)	0	5 (5)	0	0	0	0	0	5
<i>Oeonia</i> Lindl. (1824)	0	4 (2)	2	0	0	0	0	4
<i>Oeoniella</i> Schltr. (1918)	0	1	2 (1)	1	1	0	0	2
<i>Ossiculum</i> P.J.Cribb & Laan (1986)	1 (1)	0	0	0	0	0	0	1
<i>Sobennikoffia</i> Schltr. (1925)	0	4 (4)	0	0	0	0	0	4
<i>Campylocentrum</i> Benth. (1881)	0	0	0	0	0	0	55 (55)	55
<i>Dendrophylax</i> Rchb.f. (1861)	0	0	0	0	0	0	14 (14)	14
<i>Harrisella</i> Fawc. & Rendle (1909)	Synonyme de <i>Dendrophylax</i> (Carlswald et al., 2003)							
Total	55 (53)	243 (223)	51 (37)	20 (8)	5	1	69 (69)	410
% Endémisme	96.4	91.8	72.5	40	0	0	100	95.1

^a Chase et al., 2003 ; ^b la Croix et la Croix, 1997 ; ^c du Puy et al., 1999 et Hermans et Cribb, 2005 ; ^d Liste approximative (voir § 1.2.3) ; ^e Carlswald et al., 2003.

1. 2. Distribution géographique et endémicité

Parmi les 17 genres que compte la sous-tribu, 15 sont représentés dans la zone afro-malgache et deux sur le continent américain (Tableau 3). Dans la zone afro-malgache, les trois genres les plus importants en nombre d'espèces sont de loin les genres *Angraecum*, *Jumellea* et *Aeranthus* (Tableau 3, Figure 10A-B). Toutefois, quatre genres sont endémiques de Madagascar, trois d'Afrique et un seul de la Réunion (Tableau 3). La sous-tribu a connu une intense diversification à Madagascar où 243 espèces (92% d'endémiques) ont été inventoriées, tandis qu'uniquement 53 espèces ont été recensées en Afrique (96% d'endémiques), 51 aux Mascareignes (72% d'endémiques), 20 aux Comores (40% d'endémiques) et 5 aux Seychelles (20% d'endémiques) (Tableau 3 et Figure 10C-D). La distribution géographique des Angraecinae de la zone sud-ouest de l'Océan Indien présente plusieurs points intéressants : malgré la proximité de l'Afrique et de Madagascar, ces deux zones, qui présentent un taux d'endémisme fort (> 90%), n'ont que deux espèces en commun, *Angraecum calceolus* et *A. eburneum* (mais les sous-espèces sont différentes). Parmi les trois archipels de la zone, celui des Mascareignes est de loin, le plus spécifiquement riche. Le nombre d'espèces estimées aux Mascareignes est pratiquement égal à celui de tout le continent africain (Tableau 3, Figure 10D). Les Mascareignes partagent avec l'Afrique les deux espèces très cosmopolites, *A. calceolus* et *A. eburneum* (mais les sous-espèces sont différentes), et avec Madagascar un total de 14 espèces (soit 29% des Angraecinae de l'archipel ou 6% des Angraecinae de Madagascar).

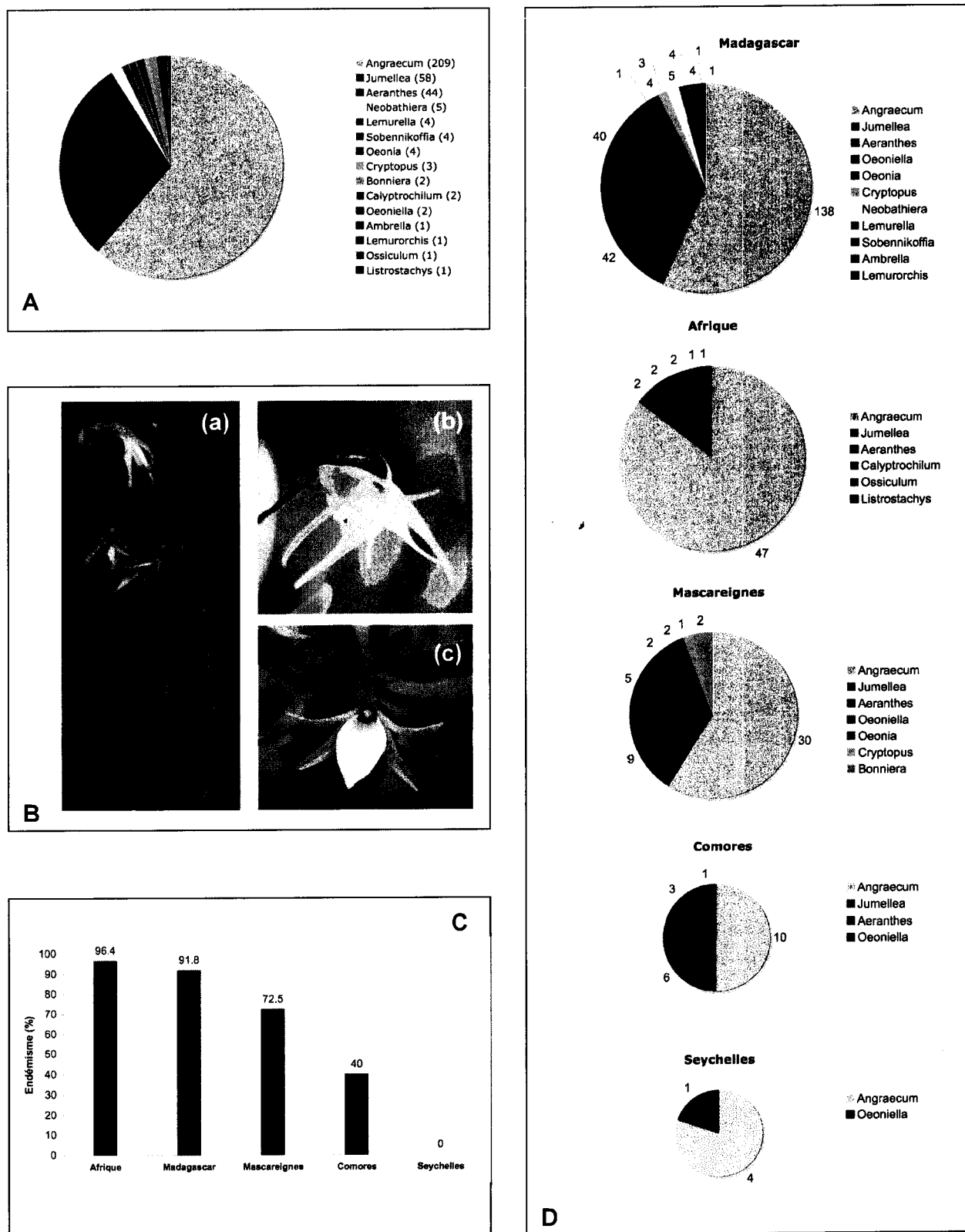


FIGURE 10. Les Angraecinae de la région afro-malgache. **A.** Nombre d'espèces par genre. **B.** Illustration des trois principaux genres (a) *Jumellea stenophylla* (Photo O. Morin), (b) *Angraecum liliodorum* (Photo T. Pailler), (c) *Aeranthes arachnites* (Photo A. Rapini). **C.** Taux d'endémisme par zone géographique. **D.** Nombre d'espèces par genre et par zone géographique (Références : voir Tableau 3).

2. LA SOUS-TRIBU DES ANGRAECINAE A LA REUNION

L'inventaire de la flore réunionnaise s'intensifia avec l'expansion coloniale des XVIII^e et XIX^e siècles via le passage aux Mascareignes d'explorateurs et naturalistes dont les noms marquèrent la connaissance botanique de l'île. Parmi eux, J.-B. G. Bory de St Vincent (1778-1846), A. du Petit-Thouars (1758-1831), C. Frappier (1853-1895) et J. de Cordemoy (1835-1911) s'intéressèrent particulièrement aux Orchidacées. Deux flores furent publiées, celle d'A. du Petit-Thouars en 1822 et celle de J. de Cordemoy en 1895 et 1899. Cette dernière fut principalement basée sur les échantillons de C. Frappier, dont l'herbier est malheureusement très mal conservé. Depuis, l'œuvre de T. Cadet (1937-1987), et les nombreuses récoltes de T. Pailler participent de la révision de la famille en cours par J. Bosser. La liste des espèces que nous proposons dans cette étude pour la sous-tribu des Angraecinae est donc approximative. Elaborée avec l'aide précieuse de T. Pailler, elle représente, pour les espèces réunionnaises, toutes celles que nous avons inventoriées sur l'île. Par précautions, pour toutes les espèces dont la validité taxonomique n'est pas clairement établie, notamment les espèces à petites fleurs vertes du genre *Angraecum*, un numéro de récolte ainsi qu'un échantillon de référence¹⁷ leur ont été attribués.

¹⁷ Planches d'herbier ou conservation des individus dans l'éthanol à 70 %. Les échantillons de référence sont déposés à l'Herbier Universitaire de La Réunion.

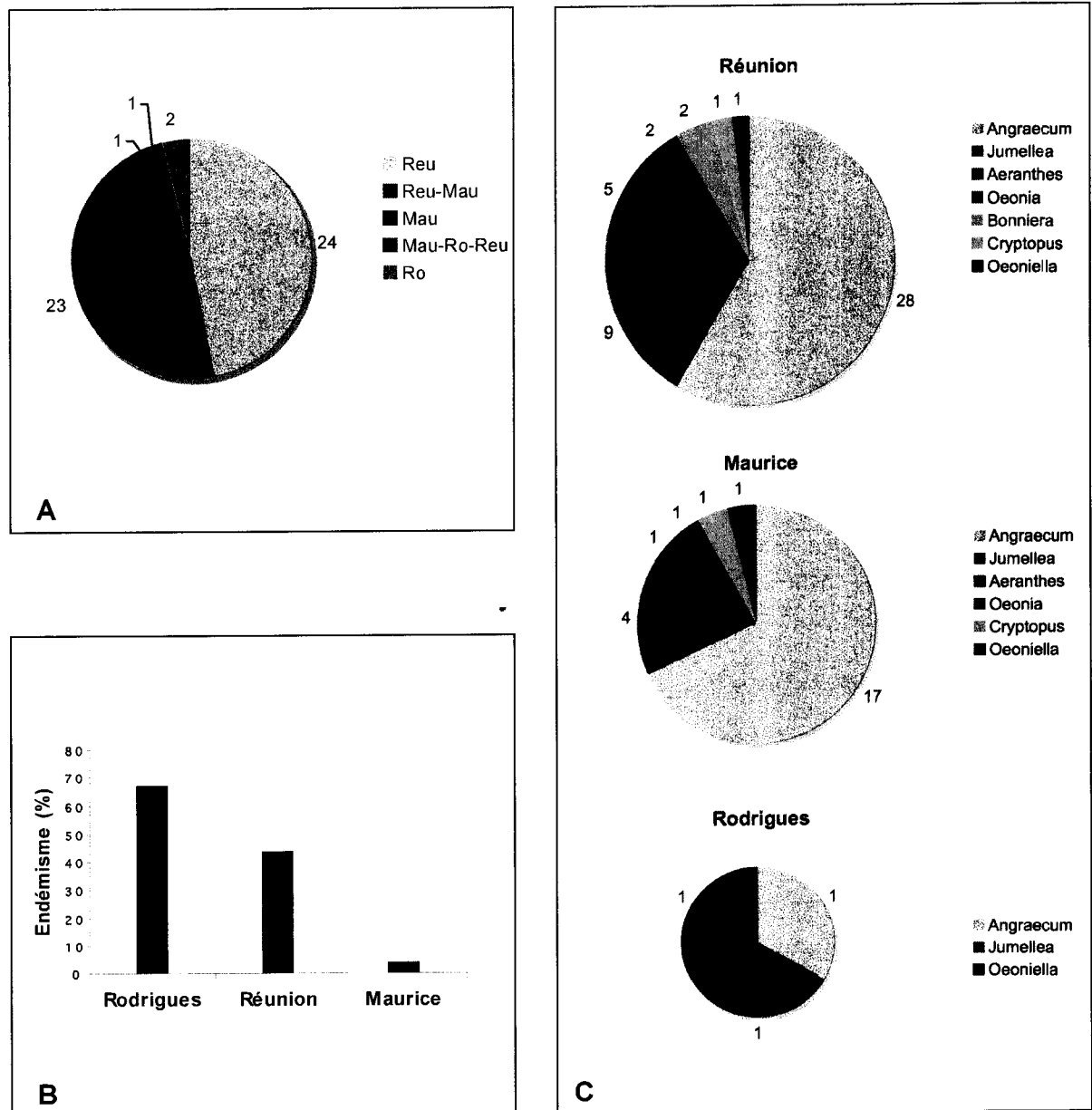


FIGURE 11. Les Angraecinae sur les trois îles des Mascareignes. **A.** Répartition des espèces (Reu : Réunion ; Mau : Maurice ; Ro : Rodrigues). **B.** Taux d'endémisme. **C.** Nombre d'espèces par genre et par île (Références : voir Annexe 1).

2. 1. Description des genres et nombre d'espèces

D'une richesse exceptionnelle, l'île de La Réunion est des trois îles des Mascareignes celle qui compte le plus grand nombre d'espèces : la sous-tribu des Angraecinae y est représentée par 7 genres et 48 espèces (28 sont endémiques). 25 espèces sont présentes sur l'île Maurice (1 endémique) et seulement 3 espèces sont connues à Rodrigues (2 endémiques) (Figure 11). Sur les 25 espèces de Maurice, 24 sont également présentes à la Réunion. En revanche, l'île Rodrigues, bien qu'elle soit caractérisée par très peu d'espèces, compte un fort taux d'endémisme : une seule espèce de l'île, *J. recta*, est également présente à La Réunion et à Maurice. La liste approximative des espèces présentes aux Mascareignes est consultable en Annexe 1. Une brève description des genres présents à La Réunion est présentée dans les paragraphes suivants, appuyant principalement sur leurs autapomorphies¹⁸ respectives. La clé dichotomique permettant leur identification rapide est présentée Figure 12.

2. 1. 1. Le genre *Angraecum* (Bory de Saint Vincent, 1804)

Patriarche des Angraecinae, le genre *Angraecum* a été établi par J.-B. Bory de Saint Vincent en 1804, dans les publications de son voyage à Madagascar et aux Mascareignes. Il y décrit *Angraecum eburneum*, du Malais latinisé *Angrec*, alors utilisé pour nommer les orchidées épiphytes vandoïdes asiatiques. Ce genre est le plus important en nombre d'espèces de la sous-tribu (environ 210 espèces), avec également la plus large distribution géographique ; il s'étend d'est en ouest, des Mascareignes à l'Afrique occidentale, avec une espèce présente au Sri Lanka. Les caractères qui permettent la distinction des *Angraecum* parmi les Angraecinae sont peu nombreux, principalement liés à l'anatomie de

¹⁸ Autapomorphie : caractère dérivé issu d'une ascendance commune mais non partagé avec d'autres taxons.

la colonne, sans pied et sans extensions. Le rostellum est divisé en deux lobes plus ou moins arrondis (aussi appelés auricules).

1 . Colonne avec pied.....	Aeranthus.
1'. Colonne sans pied	2.
2 . Colonne prolongée à la base par 2 « bras » horizontaux,.....	Jumellea.
sépales et pétales latéraux soudés à la colonne.....	3.
2'. Colonne sans prolongements antérieurs.....	4.
3 . Labelle entier.....	5.
3'. Labelle lobé.....	Angraecum.
4 . Labelle souvent bien différencié, s'invaginant toujours en éperon.....	Bonniera.
4'. Labelle pétaloïde. Eperon réduit ou absent.....	Oeoniella.
5 . Labelle trilobé.....	6.
5'. Labelle à 4 ou 5 lobes.....	Cryptopus.
6 . Pétales lobés.....	Oeonia.
6'. Pétales entiers.....	

FIGURE 12. Clé d'identification des genres présents aux Mascareignes (modifié, d'après Perrier de la Bâthie, 1941).

La diversité spécifique, considérable dans le genre *Angraecum*, est à l'origine des nombreuses difficultés que les botanistes ont rencontrées pour le classer et le définir. Certains de ceux qui ont eu le courage de s'y atteler (e.g. Summerhayes, 1958 ; Garay, 1973 ; Stewart, 1980) insistent souvent sur les problèmes taxonomiques que pose ce grand genre, tour à tour scindé ou unifié (de Cordemoy, 1899 ; Schlechter, 1914). La dernière grande révision du genre date de 1973 où L. Garay le divise en 19 sections et 206 espèces sur la base des travaux de J. de Cordemoy (1899), R. Schlechter (1914 ; 1918 ; 1925), H. Perrier de la Bâthie (1941) et V. S. Summerhayes (1958), bien que ses propres observations le conduisent à créer de nouvelles sections. Cependant, les épithètes spécifiques correspondant aux espèces des Mascareignes ont été largement surestimées par L. Garay, qui inclut dans sa liste de nombreux synonymes. Les *Angraecum* malgaches et africains ont été largement inventoriés et étudiés (e.g. la Croix et la Croix, 1997 ; du Puy et al., 1999). Ceux des Mascareignes en revanche sont bien moins connus ; pour certains d'entre eux, confusions et difficultés persistent. Après confrontation des espèces reconnues *in situ* à celles de la littérature, nous avons recensé 29 *Angraecum* pour les Mascareignes, dont 27 à La Réunion (Annexe 1). Les espèces réunionnaises, dont environ 40% sont endémiques de l'île, se répartissent dans 13 sections dont une, la section *Hadrangis*, est endémique des Mascareignes (Tableau 4).

TABLEAU 4. Le genre *Angraecum*. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'espèces à large répartition (Afri: Afrique ; Mada: Madagascar ; Masc: Mascareignes ; Com: Comores ; Sey: Seychelles ; Sp/Section : nombre d'espèces par section).

Sections ^a	Afri ^b	Mada ^c	Masc ^d	Com ^c	Sey ^{c,e}	Sp/Section
<i>Acaulia</i> Garay (1973)	-	6	-	-	-	6
<i>Afrangraecum</i> Summerh. (1958)	9	-	-	-	-	9
<i>Angraecoides</i> (Cordem.) Garay (1973)	7	9	2	-	-	18
<i>Angraecum</i>	1 (1)	9 (2)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	9
<i>Arachnangraecum</i> Schltr. (1925)	5	12 (1)	2 (1)	2	-	20
<i>Boryangraecum</i> Schltr. (1925)	3	10	-	1	-	14
<i>Chlorangraecum</i> Schltr. (1925)	-	3	-	-	-	3
<i>Conchoglossum</i> Schltr. (1918)	5	4	-	-	-	9
<i>Dolabrifolia</i> (Pfitz) Garay (1973)	4	-	-	-	-	4
<i>Filangis</i> Garay (1973)	-	6 (1)	1	1 (1)	-	7
<i>Gomphocentrum</i> (Benth.) Garay (1973)	2 (1)	16 (3)	6 (3)	2 (2)	3 (3)	20
<i>Hadrangis</i> Schltr. (1918)	-	-	3	-	-	3
<i>Humblotiengraecum</i> Schltr. (1925)	-	6 (1)	-	1 (1)	-	6
<i>Lemurangis</i> Garay (1973)	1	5	3	-	-	9
<i>Lepervancha</i> (Cordem.) Schltr. (1918)	-	5	1	-	-	6
<i>Nana</i> (Cordem.) Garay (1973)	4	8	2	-	-	14
<i>Pectinaria</i> (Benth.) Schltr. (1918)	4	4 (1)	2 (1)	1 (1)	-	9
<i>Perrierangraecum</i> Schltr. (1925)	2	25	4	-	-	31
<i>Pseudojumellea</i> Schltr. (1918)	-	3 (1)	2 (1)	-	-	4
Section indéterminée	-	7	1	-	-	8
Total	47 (2)	138 (10)	30 (7)	10 (7)	4 (4)	209 (10)
% endémiques	95.7	92.8	76.7	30	0	95.2

^a Garay (1973) ; ^b la Croix et la Croix, 1997 ; ^c du Puy et al., 1999 et Hermans et Cribb, 2005 ; ^d parmi les espèces réunionnaises peu étudiées, nous avons inclus *Angraecum* aff *patens* dans la section *Gomphocentrum* ; *Angraecum* sp. TP110 dans la section *Nana* et *Angraecum* sp. TP125 dans la section *Lemurangis* ; ^e incluant une espèce également présente au Sri Lanka.

2. 1. 2. Les genres *Aeranthès*, *Cryptopus* et *Oeonia* (Lindley, 1824)

Les genres *Aeranthès*, *Cryptopus* et *Oeonia* furent établis par J. Lindley en 1824, tous trois sur la base d'échantillons de Thouars. *Aeranthès*, du grec *aêr* (air) et *anthos* (fleur) fut composé sur les deux espèces *Dendrobium arachnithes* Thou. et *Angraecum sesquipedale* Thou., renommées respectivement *Aeranthès arachnitis* (Thou.) Lindl. et *Aeranthès sesquipedalis* (Thou.) Lindl. Le genre regroupe une quarantaine d'espèces principalement présentes à Madagascar et ses îles voisines (Mascareignes et Comores), avec deux espèces inventoriées tardivement en Afrique. Au cours de cette thèse, la découverte de l'espèce malgache *Aeranthès adenododa* H. Perrier dans le sud-est de l'île augmente à cinq le nombre d'espèces présentes à la Réunion (2 sont endémiques, soit 40%) (Fournel et al., 2005) (Annexe 1). Le groupe des *Aeranthès* est constitué de plantes aux fleurs hyalines, de couleur verte ou rarement blanche, à inflorescences grêles, souvent pendantes. La colonne est prolongée par un pied caractéristique rejoignant l'orifice de l'éperon.

Cryptopus, du grec *kruptos* (caché) et *pous* (pied), fut établi d'après *Angraecum elatum* Thou., aujourd'hui *Cryptopus elatus* (Thou.) Lindl. *Oeonia* (étymologie incertaine) fut créé à partir d'*Epidendrum volucris* Thou. que J. Lindley renomma *Oeonia aubertii* Lindl., nom toutefois illégitime selon le code international de nomenclature botanique. L'échantillon de J. Lindley correspondait en effet à la même espèce que celle décrite par A. du Petit Thouars : le nom spécifique devait donc être conservé. Cette « fraude » n'échappa pas à C. Sprengel (1826) qui redonna à l'espèce l'épithète spécifique de Thouars. Le nom valide est donc *Oeonia volucris* (Thou.) Spreng.

Les genres *Cryptopus* et *Oeonia* sont morphologiquement très proches (Perrier de La Bâthie, 1941 ; Bossier, 1969). Ils se singularisent par leur labelle profondément

découpé. Les pétales sont plus ou moins lobés chez les espèces du genre *Cryptopus*, tandis qu'ils sont entiers chez celles du genre *Oeonia*.

Ces deux genres (3 espèces pour *Cryptopus* ; 4 pour *Oeonia*) sont uniquement présents à Madagascar et aux Mascareignes, comptant respectivement 1 et 2 espèces à la Réunion, toutes indigènes (Annexe 1). A la Réunion, les espèces sont aussi rares que remarquables. La vénusté des fleurs de *Cryptopus elatus* (Liane Camaron) lui a valu un braconnage forcené. Outre le pillage des individus, son habitat (milieux secs, de basse altitude) est lui aussi menacé.

2. 1. 3. Le genre *Bonniera* (Cordemoy, 1899)

Ce petit genre dont les deux espèces sont endémiques de la Réunion fut établi par J. de Cordemoy en 1899 en l'honneur de Gaston Bonnier (1853-1922), célèbre botaniste français. Extrêmement rares, les fleurs de ces deux espèces ont en commun l'aspect pétaloïde de leur labelle et l'absence d'éperon. R. Schlechter fut le premier à rapprocher les *Bonniera* du complexe spécifique composé d'*A. germinyanum* Hook.f., *A. arachnithes* Schltr. et *A. conchoglossum* Schltr (Schlechter, 1925). L. Garay conclut que *Bonniera corrugata* Cordem. était très certainement une forme pélorique¹⁹ d'*Angraecum conchoglossum* (nommé à l'époque *A. ramosum*) (Garay, 1973). Récemment, J. Hermans et P. Cribb ont confirmé les observations de L. Garay. Selon eux, *Bonniera appendiculata* Cordem. serait également une forme pélorique, mais d'*Angraecum arachnithes* (Hermans et Cribb, 2005).

¹⁹ Pélorique : forme anormale chez laquelle le labelle est similaire aux autres pétales (ou vis-versa) (Dressler, 1993).

2. 1. 4. Le genre *Jumellea* (Schlechter, 1914)

En 1914, R. Schlechter créa le genre *Jumellea* en l'honneur du botaniste français Henri Jumel (1866-1935) spécialiste de la flore malgache. Il y inclut un groupe d'espèces, autrefois placées parmi les *Angraecum*. Bien que les espèces du genre *Jumellea* soient effectivement proches de celles des *Angraecum*, ce genre forme un groupe d'espèces homogènes, caractérisées par une inflorescence uniflore (excepté *J. humbertii* H. Perrier dont l'inflorescence peut porter deux fleurs, Perrier de la Bâthie, 1941), des fleurs blanches, odorantes en général, et muni d'un fin éperon. Le labelle contrairement aux *Angraecum* n'enveloppe pas la base de la colonne. Cette dernière est dilatée à la base en deux bras parallèles soudés aux sépales latéraux (eux-même joints) et aux pétales, ce qui donne l'aspect particulier de la fleur, dont le sépale médian est dressé en arrière, tandis que les autres pièces florales sont dirigées en avant.

La répartition du genre *Jumellea* est identique à celle du genre *Aeranthus* : les espèces sont majoritairement présentes à Madagascar, aux Comores et aux Mascareignes ; deux sont connues en Afrique. Il compte une soixantaine d'espèces, dont 9 sont estimées aux Mascareignes, toutes endémiques (Annexe 1). A La Réunion, le genre *Jumellea* est célèbre, à l'instar du Faham (*Jumellea fragrans*) dont les feuilles sont abondamment utilisés dans les préparations de rhum arrangé. Tout comme la Liane Camaron (*Cryptopus elatus*), le Faham est victime de braconnage.

2. 1. 5. Le genre *Oeoniella* (Schlechter, 1915)

Oeoniella fut également établi par R. Schlechter en 1915, sur l'*Epidendrum polystachys* d'A. du Petit Thouars, en diminutif du genre *Oeonia*. S'il est vrai que ces deux genres sont proches (port et morphologie des fleurs similaires), *Oeoniella* se distingue par son labelle trilobé en cornet et ses fleurs non tachetées de rouge. Le genre compte 2

espèces, l'une est très cosmopolite (*Oeoniellea polystachys* (Thou.) Schltr.), tandis qu'*Oeoniella aphrodite* (Balf.f. & S. Moore) Schltr., est l'une des trois orchidées endémiques de l'île Rodrigues (Annexe 1).

3. PHYLOGENIE MOLECULAIRE DES ANGRAECINAE

Cette étude a été entièrement réalisée au laboratoire de systématique moléculaire « Jodrell » du Jardin Botanique Royal de Kew (Londres), sous les directions de M. W. Chase et M. F. Fay. L'article concernant les résultats obtenus est en cours de finition.

3. 1. Introduction

En systématique, la reconstruction phylogénétique permet la reconnaissance de groupes naturels (monophylétiques²⁰). Perçu par Willi Hennig comme le "système de référence général" (Darlu et Tassy, 1993), la systématique phylogénétique se rapproche intuitivement des classifications naturelles chères à l'entendement humain. Dès Aristote (324-322 av. J.-C.) en effet et depuis que les naturalistes observent le monde, ils n'ont cessé de rechercher l'ordre de l'arrangement des êtres vivants, de classer les organismes, persuadés que la Nature est ordonnée de façon hiérarchique. La production de classifications fut extrêmement féconde notamment aux XVIII^e et XIX^e siècles ; Linné, la famille de Jussieu, Lamarck, Cuvier ou Adanson en furent les principaux acteurs, étudiant tous les systèmes possibles, regorgeant de liberté et d'imagination. Néanmoins, la complexité de la tâche fit perdre la tête à plus d'un : Adanson mourut fou sans même avoir achever son système. Le « phylocode », système dont les délimitations taxonomiques sont basées sur les différents nœuds de l'arbre phylogénétique initié par Donoghue, Cantino et de Queiroz en 1998, en est à ses balbutiements, mais les modifications de la classification des êtres vivants apportées par la connaissance phylogénétique tendent à se vulgariser

²⁰ Ensemble de taxons partageant la ou les même(s) synapomorphie(s) (synapomorphie : caractère dérivé et hérité d'une ascendance commune, partagé par deux ou plusieurs taxons).

grâce, notamment, à la production d'ouvrages visant à leur diffusion auprès du grand public (Lecointre et Le Guyader, 2001).

Chez les orchidées notamment, l'outil moléculaire a montré son efficacité pour résoudre les problèmes systématiques complexes liés à la biologie reproductive des espèces et à leurs interactions spécifiques avec la faune pollinisatrice. La distinction entre les Neottioideae et les Epidendroideae, par exemple, est restée longtemps problématique et sujette à controverse sur la seule base des caractères anatomiques de la colonne (Dressler 1981 ; 1990a,b ; 1993 ; Szlachetko et Rutkowski, 2000). Le groupe des vanilloïdes présente des caractères reproductifs proches de ceux des epidendroïdes, mais les caractères végétatifs sont très différents (Chase et al., 2003). Pour ces groupes (e.g. Chase et al., 1994 ; Neyland et Urbatsch, 1996 ; Cameron et al., 1999), mais aussi pour l'ensemble des rangs hiérarchiques reconnus dans la famille, le séquençage d'ADN a permis une véritable révolution de la systématique de la famille (Chase et al., 2003). Sous la direction de M. W. Chase (RBG Kew²¹) depuis une dizaine d'années, l'accumulation de données moléculaires est aujourd'hui considérable (e.g. Chase et al. 1994 ; Neyland et Urbatsch, 1996 ; Bateman et al., 1997 ; Chase et Palmer, 1997 ; Pridgeon et al., 1997 ; Pridgeon et Chase, 1998 ; Cameron et al. 1999 ; Douzery et al., 1999 ; Cameron et Chase, 2000 ; Whitten et al., 2000 ; van den Berg et al., 2000 ; Freudenstein et Chase, 2001 ; Goldman et al., 2001 ; Kores et al., 2001 ; Pridgeon et al., 2001 ; Sosa et al., 2001 ; Williams et al., 2001 ; Bateman et al. 2003 ; Salazar et al., 2003 ; Cameron, 2004 ; Freudenstein et al., 2004 ; Cameron, 2005 ; Chase, 2005 ; Chase et al., 2005 ; van den Berg et al., 2005). Cette intense production de phylogénies moléculaires s'inscrit dans le cadre de la publication des volumes de *Genera Orchidacearum* (Pridgeon et al., 1999 ; 2001 ; 2003), ouvrages de référence sur la taxonomie des orchidées.

²¹ RBG Kew : « *Royal Botanical Gardens, Kew* », abréviation utilisée dans la suite du manuscrit pour désigner les Jardins Botaniques Royaux de Kew (Londres, Angleterre).

La problématique phylogénétique est fondée sur le postulat de « descendance avec modification » (Darlu et Tassy, 1993). Elle inclut donc les notions paradoxales d'hérédité et d'évolution. Le travail du phylogénéticien consiste à déterminer les caractères hérités d'un ancêtre commun (homologies) et d'en comprendre la séquence évolutive, en d'autres termes, de distinguer les caractères ancestraux (ou plésiomorphes) des caractères dérivés (apomorphes). L'objectif étant d'identifier les synapomorphies car elles seules indiquent une étroite parenté entre les espèces ; elles permettent la reconnaissance des groupes monophylétiques.

Cependant, la reconstruction phylogénétique se limite à la formulation d'hypothèses, car s'il est possible de déduire les relations de parenté entre les espèces à partir de leur observation, le passé macro-évolutif des organismes vivant actuellement ne sera jamais accessible ! L'hypothèse évolutive dépend donc de l'observation du phylogénéticien : elle est déterminée par les caractères observés et par la méthode de leur analyse.

L'anatomie comparée et la paléontologie peuvent fournir une source directe d'observation des transformations des caractères de l'état plésiomorphe vers l'état apomorphe (voir Darlu et Tassy, 1993 pour références complémentaires). Néanmoins, la reconstruction phylogénétique est de plus en plus basée sur l'étude de caractères moléculaires : structure des protéines, de l'ARN (acide ribonucléique) et notamment de l'ADN (acide désoxyribonucléique). Toutefois, qu'ils soient morphologiques ou moléculaires, le choix des caractères est d'autant plus complexe qu'il est déterminant. Les caractères morphologiques ne nous renvoient bien souvent que les similitudes et les ressemblances entre les taxons (homologies et homoplasies confondues). L'établissement d'hypothèses d'homologie peut être complexe selon les groupes étudiés (chez les orchidées

notamment), voire impossible à des niveaux taxonomiques élevés pour lesquels la divergence entre les caractères morpho-anatomiques est trop conséquente. De même, l'identification du sens des transformations n'est jamais évidente ; les notions d'apomorphie et de plésiomorphie restent relatives et dépendent du référentiel taxonomique. Les choix des caractères et de leur orientation dépendent du phylogénéticien, dont la subjectivité dans l'analyse peut être source de confusions ou de critiques. L'objectivité de l'auteur par rapport aux caractères moléculaires pourrait donner davantage crédit à l'analyse inférée. Impartialité toutefois relative puisque l'alignement des séquences est le plus souvent manuel. Les données moléculaires ont néanmoins l'avantage de produire un grand nombre de caractères, puisque chaque base nucléotidique de la séquence d'ADN, par exemple, représente un caractère à cinq états : A, T, G, C, délétion/insertion (Lecointre et le Guyader, 2001). Contrairement aux caractères morphologiques, le domaine d'investigation des gènes permet la reconstruction phylogénétique entre espèces qui peuvent avoir énormément divergées (entre 50 et 100 millions d'années, Lecointre et le Guyader, 2001). La production de plus en plus massive de séquences nucléotidiques a permis d'évaluer empiriquement la vitesse d'évolution des marqueurs phylogénétiques les plus fréquemment utilisés (e.g. Palmer, 1991 ; Johnson et Soltis, 1995 ; Baldwin et al. 1995 ; Palmer et al., 1998 ; Soltis et al., 1998, 2000). Ainsi, pour résoudre les problèmes phylogénétiques au niveau spécifique ou générique chez les angiospermes, l'espaceur interne transcrit *ITS* de l'ADN ribosomal nucléaire est parmi les régions intensivement séquencées (e.g. Baldwin et al., 1995 ; Soltis et al., 1998).

Les régions non codantes du génome chloroplastique (introns et espaceurs intergéniques) sont également apparues comme la source de prédilection pour la reconstruction phylogénétique (Taberlet et al., 1991). Le génome chloroplastique a la particularité d'être plus sensible à la dérive génétique que le génome nucléaire (Birky et al., 1989) du fait de

sa petite taille (entre 120 à 220 Kb²²) et de son hérédité uniparentale (généralement maternelle chez les angiospermes, Corriveau et Coleman, 1988). Les introns et espaceurs intergéniques sont situés en général entre les gènes *trn* codant pour les ARN de transfert. Leur taux de mutation est plus élevé que celui des régions codantes car ils ne subissent pas ou peu de contraintes fonctionnelles (Palmer, 1991 ; Taberlet et al., 1991). Par exemple, le taux de variabilité dans ces régions est trois fois plus important que celui du gène chloroplastique *rbcL* (codant pour la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase) dont le séquençage est utilisé mais au niveau familial chez les plantes à fleurs (e.g. Chase et al., 1993 ; Clegg, 1993 ; Palmer et al., 1988 ; Cameron et al., 1999 ; APG, 1998, 2003). Enfin, la région *matK*, composée du gène *matK* lui-même (codant pour une maturase) et d'un intron situé entre deux gènes *trnK* (codant pour l'ARN de transfert de la lysine, Johnson et Soltis, 1995) a elle aussi connu l'engouement des systématiciens du fait de son évolution rapide (Wolfe, 1991) (e.g. Johnson et Soltis, 1994, 1995 ; Olmstead et Palmer, 1994 ; Hilu et Liang, 1997 ; Soltis et Soltis, 1998 ; Carlswald et al., 2003 ; Hilu et al., 2003, et beaucoup d'autres).

D'abord intuitive, la reconstruction phylogénétique s'est formalisée avec le développement de méthodes d'analyses comparatives basées sur des algorithmes informatisés. Différentes approches existent, reposant sur des concepts différents. Les plus courantes sont la cladistique et les méthodes probabilistes (maximum de vraisemblance ou bayésienne).

Les bases du cladisme sont fondées de deux principes : parcimonie et évolution indépendante des caractères. Selon le principe de parcimonie, l'arbre le plus plausible est celui qui compte le minimum de transformations de caractères (Darlu et Tassy, 1993). La

²² Kb : Kilo paires de bases.

méthode cladistique ne cherche pas à mesurer la ressemblance globale entre les caractères, mais à les analyser de façon individuelle et simultanée. L'arbre inféré, le cladogramme, ou si on y ajoute une hypothèse évolutive, l'arbre phylogénétique rend compte de la congruence des caractères et de la maximisation de l'homologie. La recherche de l'arbre le plus court repose sur des algorithmes de calcul permettant un examen simultané des caractères, tous sont basés sur le critère de parcimonie. La cladistique est d'ailleurs également connue sous le nom d'analyse de parcimonie.

Les méthodes probabilistes, maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*) et bayésiennes, au contraire de la cladistique, sont basées sur la confrontation des données avec les modalités de transformation des caractères estimées *a priori*. Ces méthodes sont adéquates pour l'analyse des données moléculaires pour lesquelles il est possible d'estimer un modèle d'évolution. Pour les caractères morphologiques, il est quasiment impossible de construire un modèle évolutif car leur probabilité de transformations sont inconnues.

L'application des méthodes bayésiennes à la reconstruction phylogénétique est relativement récente (Yang et Rannala, 1997 ; Huelsenbeck et al., 2001) mais elles sont déjà très exploitées (e.g. Estoup et Clegg, 2003 ; van den Berg et al., 2005). Tandis que la méthode de vraisemblance repose sur la probabilité d'observer les données D suivant un modèle théorique T , soit $P(D|T)$, le principe de l'inférence bayésienne est de rechercher quelle est la probabilité pour que le modèle théorique T soit correct suivant les données D , soit $P(T|D)$.

Cette probabilité $P(T|D)$, aussi appelée probabilité postérieure est calculée selon la formule de Bayes :

$P(T D) = \frac{P(T) \times P(D T)}{P(D)}$	Avec : $P(T D)$: probabilité postérieure, $P(T)$: distributions <i>a priori</i> des paramètres du modèle, $P(D T)$: vraisemblance de D sachant T, $P(D)$: facteur de normalisation (pour permettre l'obtention d'une distribution s'intégrant à 1).
--	---

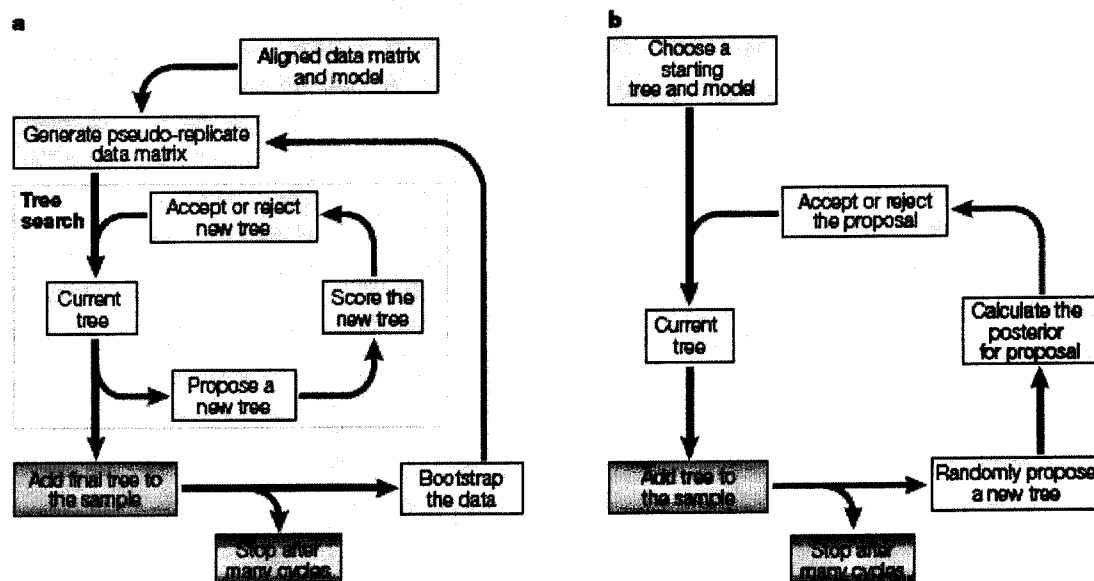
Les méthodes bayésiennes permettent donc de calculer la distribution *a posteriori* d'une topologie (probabilité postérieure) à partir de la vraisemblance des données et d'une distribution *a priori* des paramètres du modèle (Holder et Lewis, 2003). En phylogénie, la formule de Bayes n'est pas directement applicable, car la valeur du facteur de normalisation est trop conséquente. Les probabilités postérieures sont donc estimées à l'aide d'algorithmes de Monte Carlo par chaînes de Markov (MCMC) (Metropolis et al., 1953 ; Hastings, 1970 pour le développement de l'algorithme et Mau et al., 1999 pour son application aux méthodes bayésiennes dans l'inférence phylogénétique), qui permettent le calcul des probabilités postérieures pour des jeux de données complexes, telles les matrices de séquences ADN. La production d'arbres est simultanée au calcul des probabilités postérieures (qui donnent le support des branches), contrairement aux procédures de parcimonie ou de maximum de vraisemblance pour lesquelles la robustesse des arbres est généralement calculée par des méthodes de Jackknife (Farris et al., 1996) ou de Bootstrap (Elfron, 1979 ; Felsenstein, 1985) (Encadré 2).

ENCADRE 2. BOOTSTRAP (PARCIMONIE, MAXIMUM DE VRAISEMBLANCE) VERSUS MONTE CARLO PAR CHAINES DE MARKOV (METHODES BAYESIENNES)
(repris de Holder et Lewis, 2003).

The number of times a particular group of sequences occurs in the trees from this sample can be used as a measure of how strongly the data supports that group. The bootstrapping approach (a) involves the generation of pseudo-replicate data sets by re-sampling with replacement the sites in the original data matrix. When optimality-criterion methods are used, a tree search (green box) is performed for each data set, and the resulting tree is added to the final collection of trees. A wide variety of tree-search strategies have been developed, but most are variants of the same basic strategy. An initial tree is chosen, either randomly or as the result of an algorithm — such as neighbour joining (NJ) or stepwise addition. Changes to this tree are proposed; the type of move can be selected randomly or the search can involve trying every possible variant of a particular type of move (TABLE 2; REF 6). The new tree is scored and possibly accepted. Some search strategies are strict hill-climbers — they never accept moves that result in lower scores; others (genetic algorithms⁴⁴⁻⁴⁶ or simulated annealing⁴⁷) occasionally accept worse trees in an attempt to explore the tree space more fully. Making searching more accurate and faster is an active area of research^{46,48}. For methods that use a tree-building algorithm, such as NJ, bootstrapping involves the application of the algorithm to each of the pseudo-replicate data sets instead of the tree-searching procedure.

The Markov chain Monte Carlo (MCMC) methodology (b) is similar to the tree-searching algorithm, but the rules are stricter. From an initial tree, a new tree is proposed. The moves that change the tree must involve a random choice that satisfies several conditions^{49,44}. The MCMC algorithm also specifies the rules for when to accept or reject a tree.

Note that MCMC yields a much larger sample of trees in the same computational time, because it produces one tree for every proposal cycle versus one tree per tree search (which assesses numerous alternative trees) in the traditional approach. However, the sample of trees produced by MCMC is highly auto-correlated. As a result, millions of cycles through MCMC are usually required, whereas many fewer (of the order of 1,000) bootstrap replicates are sufficient for most problems.



Objectifs de l'étude

Bien qu'une étude sur la phylogénie moléculaire ait été menée sur les Angraecinae néotropicales, notamment sur les espèces aphylls du continent américain (Carlswald et al., 2003), les relations phylogénétiques de l'ensemble des Angraecinae, incluant les espèces de la zone afro-malgache n'ont pas encore été étudiées à partir de données moléculaires. L'étude phylogénétique du groupe n'a pas non plus été envisagée à partir de caractères morphologiques.

L'objectif de ce travail était donc de déterminer à partir de caractères moléculaires et par des méthodes cladistiques et probabilistes (bayésiennes) les liens de parenté tissés entre les taxons (genres et espèces) au niveau sous-tribal des Angraecinae : (1) la sous-tribu est-elle monophylétique au sein des Vandaeae ? (2) Quelles sont les relations phylogénétiques entre les genres, quant est-il de la monophylie du genre endémique *Bonnieria*, du grand genre *Angraecum* et de ses différentes sections ?

3. 2. Matériels et Méthodes

3. 2. 1. Choix des marqueurs phylogénétiques

Le choix des régions à séquencer s'est d'abord porté vers celles initialement utilisées par Carlswald et al. (2003) dans leur travail portant sur les Angraecinae néotropicales, c'est-à-dire parmi les régions chloroplastiques, la région *trnL-F* (intron *trnL* et l'espaceur intergénique *trnL-F*, Taberlet et al. 1991) et la région *matK* (Johnson et Soltis, 1994, 1995) et parmi l'ADN ribosomal nucléaire l'espaceur interne transcrit *ITS* (Baldwin et al. 1995). Si Carlswald et al. (2003) ont facilement séquencé la région des *ITS* chez les Angraecinae du nouveau continent, chez la majorité des espèces de la zone afro-malgaches, il nous a été très difficile de le faire. N'ayant pas la possibilité de séquencer les *ITS*, une batterie d'amorces de différentes régions nucléaires en cours d'expérimentation

au RBG Kew ont été testées (*PKR 717F* / *PKR 969R* ; *RPB2 int. 23F* / *RPB2 int. 23F* ; Glutamine synthétase *687F* / *995R*), mais sans aucun succès. Le choix d'une troisième région du génome chloroplastique s'est donc imposé. Parmi celles que nous avons testées, l'intron *rps16* (Oxelman et al., 1997) s'est avéré être le locus offrant la plus grande facilité d'amplification et la plus grande variabilité chez les *Angraecinae*.

3. 2 .2. Choix des extra-groupes

Les extra-groupes ont été choisis parmi les espèces du genre *Polystachya*, la sous-tribu des *Polystachyinae* étant le groupe frère du reste des *Vandae* (i.e. *Aeridinae*, *Aerangidinae*, *Angraecinae*) (Chase et al., 2003 ; Freudenstein et al., 2004).

3. 2. 3. Matériel végétal

Pour chacune des espèces de la Réunion, des fragments de feuilles ont été récoltés et stockés dans du silica gel (Chase et Hills, 1991) avant l'extraction de l'ADN. L'identification des espèces a été associée à un spécimen de référence (planche d'herbier ou fleurs conservées dans l'éthanol à 70%), spécimens déposés à l'Herbier Universitaire de la Réunion. Les ADN des espèces malgaches, comoriennes et africaines ont soit été extraits à partir de plantes en culture au Jardin Botanique Royal de Kew (RBG Kew), soit ils étaient déjà disponibles dans la banque d'ADN du RBG Kew, à l'exception d'*Angraecum teres* (B. Khayota, National Museums of Kenya), *A. sacciferum* (banque d'ADN, Kirstenbosh Research Center, Cape Town) et *Jumellea anjouanensis* (J.-N. Labat, Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris). La liste des espèces séquencées, ainsi que les récolteurs et la localisation des échantillons de référence sont présentés Tableau 5.

TABLEAU 5. Liste des espèces séquencées, récolteurs et localités des échantillons de références (les abréviations des noms d'herbier sont disponibles sur <http://sciweb.nybg.org/science2/indexHerbariorum.asp>).

Taxons ^a	Echantillons de référence ^b	Distribution ^c
VANDEAE Lindl.		
AERANGIDINAE Summerh.		
<i>Aerangis biloba</i> (Lindl.) Schltr.	Chase 15215 (K)	Af
<i>Aerangis ellisii</i> (B. S. Williams) Schltr.	Chase 15080 (K)	Mada
<i>Aerangis macrocentra</i> (Schltr.) Schltr.	Hermans 779 (K)	Mada
<i>Aerangis</i> sp. 1	LivColl. TP (REU)	Reu
<i>Aerangis</i> sp. 2	LivColl. 1998-2723 (K)	Mada
<i>Angraecopsis parviflora</i> (Thou.) Schltr.	Hermans 4363 (Personnel)	Af, Mada, Mau, Reu
<i>Beclardia macrostachya</i> (Thou.) A. Rich.	Fournel 276 (REU)	Mada, Mau, Reu
<i>Chamaeangis vesicata</i> (Lindl.) Schltr.	Chase 14646 (K)	Af
<i>Solenangis aphylla</i> (Thou.) Summerh.	Hermans 2389 (K)	Af, Mada, Mau, Reu
AERIDINAE Pfitzer		
<i>Aerides odoratum</i> Reinw. ex Blume	Chase 15081 (K)	Asie tropicale
<i>Phalaenopsis cornu-cervi</i> Blume & Rchb.f.	Chase O-1356 (K)	Philippines
<i>Phalaenopsis lueddemanniana</i> Rchb.f.	Chase 15803 (K)	Asie du Sud-est
ANGRAECINAE Summerh.		
AERANTHES Lindl.		
<i>Aeranthus adenopoda</i> H. Perrier	Fournel 83 (REU)	Mada, Reu
<i>Aeranthus arachnites</i> (Thou.) Lindl.	Fournel 126 (REU)	Mau, Reu
<i>Aeranthus caudata</i> Rolfe	LivColl. 1996-1914 (K)	Mada, Co, Reu
<i>Aeranthus grandiflora</i> Lindl.	LivColl. 1975-2574 (K)	Mada, Co
<i>Aeranthus henrici</i> Schltr.	LivColl. 1990-952 (K)	Mada
<i>Aeranthus longipes</i> Schltr.	LivColl. 1998-2718 (K)	Mada
<i>Aeranthus moratii</i> Bosser	Chase 17918 (K)	Mada
<i>Aeranthus neoperrieri</i> Toill.-Gen., Urs. & Bosser	LivColl. 1998-2721 (K)	Mada
<i>Aeranthus peyrotii</i> Bosser	LivColl. 1995-4110 (K)	Mada
<i>Aeranthus ramosa</i> Rolfe	Hermans 113 (K)	Mada
<i>Aeranthus virginialis</i> D. L. Roberts	LivColl. 1991-1049 (K)	Co
<i>Aeranthus strangulatus</i> Frapp. ex Cordem.	Pailler, Micheneau 100 (REU)	Reu
<i>Aeranthus tenella</i> var. <i>borbonica</i> Bosser	Pailler 137 (REU)	Mau, Reu
ANGRAECUM Bory		
Sect. ANGRAECOIDES (Cordem.) Garay		
<i>Angraecum chevalieri</i> Summerh. ^d	Carlsward 208 (FLAS)	Af
<i>Angraecum aff chevalieri</i> Summerh. ^e	LivColl. 1987-2562 (K)	Af
<i>Angraecum cultrifolium</i> Summerh.	Carlsward 298 (FLAS)	Af
<i>Angraecum obversifolium</i> Frapp. ex Cordem	Micheneau, Pailler 8 (REU)	Mau, Reu
<i>Angraecum pingue</i> Frapp. ex Cordem.	LivColl. TP (REU)	Mau, Reu
<i>Angraecum sedifolium</i> Schltr.	Hermans 3802 (K)	Mada
Sect. ANGRAECUM		
<i>Angraecum ebumeum</i> Bory	LivColl. 1965-23109 (K)	Co, Mada, Mau, Reu, Sey
<i>A. ebumeum</i> subsp. <i>superbum</i> (Thou.) H.Per.	LivColl. 1977-5418 (K)	Mada, Sey
<i>A. ebumeum</i> subsp. <i>xerophilum</i> H. Perrier	LivColl. 1996-1902 (K)	Mada
<i>A. aff ebumeum</i> var. <i>longicalcar</i> Bosser	LivColl. 2002-2622 (K)	Mada
<i>Angraecum florulentum</i> Rchb.f.	LivColl. 1993-201 (K)	Co, Mada
<i>Angraecum sesquipedale</i> Thouars	LivColl. 1996-1897 (K)	Mada
<i>Angraecum aff sororium</i> Schltr.	LivColl. 1996-1988 (K)	Mada
Sect. ARACHNANGRAECUM Schltr.		
<i>Angraecum birrimense</i> Rolfe	LivColl. 1981-4968 (K)	Af
<i>Angraecum aff eichlerianum</i> Kraenzl.	LivColl. 2004-700 (K)	Af
<i>Angraecum expansum</i> Thouars	Micheneau 2 (REU)	Mau, Reu
<i>Angraecum aff germinyanum</i> Hook.f.	LivColl. 2004-1393 (K)	Co
<i>Angraecum arachnites</i>	Hermans 4241 (K)	Mada
<i>Angraecum conchoglossum</i>	Micheneau 5 (REU)	Mada, Reu
<i>Angraecum infundibulare</i> Lindl.	LivColl. 1977-304 (K)	Af
<i>Angraecum linearifolium</i> Garay	Hermans 3528 (K)	Mada
<i>Angraecum scottianum</i> Rchb.f.	LivColl. 2004-65 (K)	Co
<i>Angraecum teretifolium</i> Ridl.	LivColl. 1997-6501 (K)	Mada

TABLEAU 5. Suite.

Sect. BORYANGRAECUM Schltr.		
<i>Angraecum teres</i> Summerh.	Bytebier 673 (EA)	Af
<i>Angraecum sacciferum</i> Lindl.	Bytebier 1635 (EA)	Af
Sect. CHLORANGRAECUM Schltr.		
<i>Angraecum chloranthum</i> Schltr.	Hermans 4248.1 (K)	Mada
Sect. DOLABRIFOLIA (Pfitz) Garay		
<i>Angraecum aporoides</i> Summerh.	LivColl. 1987-2562 (K)	Af
<i>Angraecum distichum</i> Lindl.	LivColl. 1981-4991 (K)	Af
Sect. FILANGIS Garay		
<i>Angraecum cornigerum</i> Cordem.	Pailler 176 (REU)	Reu
Sect. GOMPHOCENTRUM (Benth.) Garay		
<i>Angraecum calceolus</i> Thou.	Pailler 177 (REU)	Af, Co, Mada, Mau, Reu, Sey
<i>Angraecum caulescens</i> Thou.	Pailler 97 (REU)	Mada, Mau, Reu
<i>Angraecum aff. maheense</i> Schltr.	LivColl. 2002-2619 (K)	Sey
<i>Angraecum multiflorum</i> Thou.	Pailler 154 (REU)	Mada, Mau, Reu, Sey
<i>Angraecum patens</i> Frapp. ex Cordem.	Pailler 168 (REU)	Reu
Sect. HADRANGIS Schltr.		
<i>Angraecum bracteosum</i> Balf.f. & S.Moore	Micheneau 7 (REU)	Reu
<i>Angraecum bracteosum</i> x <i>A. striatum</i>	Micheneau 3 (REU)	Reu
<i>Angraecum cadetii</i> Bosser 1	Micheneau, Pailler 9 (REU)	Mau, Reu
<i>Angraecum cadetti</i> 2	Pailler 157	Mau, Reu
<i>Angraecum striatum</i> Thouars	Micheneau 4 (REU)	Reu
Sect. HUMBLOTIANGRAECUM Schltr.		
<i>Angraecum clareae</i> Herm., la Croix & Cribb	Hermans 3788 (K)	Mada
<i>Angraecum aff. leonis</i> Veitch	LivColl. 2004-65 (K)	Co, Mada
<i>Angraecum magdalenae</i> Schltr. & H. Perrier	LivColl. 1995-4077 (K)	Mada
Sect. LEMURANGIS Garay		
<i>Angraecum costatum</i> Frapp. ex Cordem.	Pailler, Micheneau 174 (REU)	Reu
<i>Angraecum</i> sp. TP125	Pailler 12 (REU)	Reu
Sect. LEPERVANCHA (Cordem.) Schltr.		
<i>Angraecum caricifolium</i> H. Perrier	LivColl. 1995-4114 (K)	Mada
<i>Angraecum tenuifolium</i> Frapp. ex Cordem.	Pailler 116 (REU)	Reu
<i>Angraecum tenuispica</i> Schltr.	LivColl. 1997-6497 (K)	Mada
Sect. NANA (Cordem.) Garay		
<i>Angraecum minutum</i> Frapp. ex Cordem. 1	No voucher ^f	Reu
<i>Angraecum minutum</i> 2	Pailler, Micheneau 81 (REU)	Reu
<i>Angraecum</i> sp. TP114 aff <i>A. parvulum</i>	Pailler 114 (P)	Reu
<i>Angraecum</i> sp. TP110	Pailler 110 (REU)	Reu
Sect. PECTINARIA (Benth.) Schltr.		
<i>Angraecum doratophyllum</i> Summerh.	LivColl. 2003-2958 (K)	Af
<i>Angraecum hermanni</i> (Cordem.) Schltr.	LivColl. TP (REU)	Reu
<i>Angraecum pectinatum</i> Thou.	LivColl. 2001-3980 (K)	Co, Mada, Mau, Reu
<i>Angraecum subulatum</i> Lindl.	LivColl. 2002-3442 (K)	Af
Sect. PERRIERANGRAECUM Schltr.		
<i>Angraecum borbonicum</i> Bosser	Micheneau 1 (REU)	Reu
<i>Angraecum cucullatum</i> Thouars	Pailler 108 (REU)	Mau, Reu
<i>Angraecum didieri</i> (Baill. Ex Finnet) Schltr.	LivColl. 1995-4109 (K)	Mada
<i>Angraecum liliodorum</i> Frapp. ex Cordem.	LivColl. TP (REU)	Mau (?), Reu
<i>Angraecum obesum</i> H. Perrier	Hermans 2407 (K)	Mada
<i>Angraecum pseudodidieri</i> H. Perrier	LivColl. 1993-3541 (K)	Mada
<i>Angraecum rutenbergianum</i> Kraenzl.	LivColl. 2004-36 (K)	Mada
Sect. PSEUDOJUMELLEA Schltr.		
<i>Angraecum ramosum</i> Thoua.	Pailler, Micheneau 73	Mau, Reu
<i>Angraecum mauritianum</i> Frapp. ex Cordem.	LivColl. TP (REU)	Mau, Reu, Mada
Section inconnue		
<i>Angraecum</i> sp. TP84	Pailler 84 (REU)	Reu
BONNIERA Cordem.		
<i>Bonniera appendiculata</i> Cordem.	Pailler 107 (REU)	Reu
<i>Bonniera corrugata</i> Cordem.	Pailler 106 (REU)	Reu

TABLEAU 5. Suite et fin.

CAMPYLOCENTRUM Benth.		
<i>Campylocentrum fasciola</i> (Lindl.) Cogn. ^d	Carlsward 185 (FLAS)	Am
<i>Campylocentrum jamaicense</i> Benth. ex Rolfe ^d	Witten 1934 (FLAS)	Am
<i>Campylocentrum lansbergii</i> (Rchb.f.) Schltr. ^d	Carlsward 272 (FLAS)	Am
<i>Campylocentrum micranthum</i> (Lindl.) Rolfe ^d	Carlsward 180 (FLAS)	Am
<i>Campylocentrum pachyrrhizum</i> (Rchb.f.) Rolfe ^d	Ackerman s.n. (UPRRP)	Am
<i>Campylocentrum poeppigii</i> (Rchb.f.) Rolfe ^d	Carnevali 4507 (CICY)	Am
CRYPTOPUS Lindl.		
<i>Cryptopus elatus</i> Lindl. subsp. <i>dissectus</i> Bosser	Micheneau 6 (REU)	Mada, Mau, Reu
<i>Cryptopus paniculatus</i> H. Perrier	Hermans 5392 (K)	Mada
DENDROPHYLAX Rchb.f.		
<i>Dendrophylax barrettiae</i> Fawc. & Rendle ^d	Carlsward 199 (FLAS)	Am
<i>Dendrophylax fawcettii</i> Rolfe ^d	Whitten 1939 (FLAS)	Am
<i>Dendrophylax filiformis</i> (Sw.) Carl. & Whitt. ^d	Whitten 1842 (FLAS)	Am
<i>Dendrophylax funalis</i> (Sw.) Benth. ex Rolfe ^d	Carlsward 302 (FLAS)	Am
<i>Dendrophylax funalis</i> (Sw.) Benth. ex Rolfe ^e	No data (K)	Am
<i>Dendrophylax porrectus</i> (Rchb.f.) Carl. & Whitt. ^{d 1}	Carlsward 329 (FLAS)	Am
<i>Dendrophylax porrectus</i> ^{d 2}	Carlsward 184 (FLAS)	Am
<i>Dendrophylax sallei</i> (Rchb.f.) Benth. ex Rolfe ^d	Whitten 1945 (JDSB)	Am
<i>Dendrophylax varius</i> (Gmel.) Urb. ^d	Whitten 1960 (JDSB)	Am
JUMELLEA Schltr.		
<i>Jumellea aff recta</i> (Thou.) Schltr. (Mada)	LivColl. 1975-4447 (K)	Mada
<i>Jumellea amplifolia</i> Schltr.	LivColl. 1981-2753 (K)	Mada
<i>Jumellea anjouanensis</i> (Finet) H. Perrier	Bryonnaud 62 (P)	Co
<i>Jumellea arborescens</i> H. Perrier	LivColl. 1981-2756 (K)	Mada
<i>Jumellea brachycentra</i> Schltr.	LivColl. 2001-2432 (K)	Mada
<i>Jumellea densesfoliata</i> Senghas	Hermans 2809 (K)	Mada
<i>Jumellea aff divaricata</i> (Frapp.) Schltr.	LivColl. TP (REU)	Reu
<i>Jumellea aff exilis</i> (Cordem.) Schltr.	Pailler 25 (REU)	Reu
<i>Jumellea filicomoides</i> (De Wild.) Schltr.	LivColl. 1984-1315 (K)	Af
<i>Jumellea fragrans</i> 1 (Thouars) Schltr.	Fournel 90 (REU)	Mau, Reu
<i>Jumellea fragrans</i> 2	Fournel 92 (REU)	Mau, Reu
<i>Jumellea fragrans</i> 3	Micheneau, Pailler 10 (REU)	Mau, Reu
<i>Jumellea gracilipes</i> Schltr.	LivColl. 1996-1959 (K)	Mada
<i>Jumellea linearipetala</i> H. Perrier	LivColl. 1997-6502 (K)	Mada
<i>Jumellea maxillarioides</i> (Ridl.) Schltr.	LivColl. 2001-2433 (K)	Mada
<i>Jumellea papangensis</i> H. Perrier	LivColl. 2002-2096 (K)	Mada
<i>Jumellea recta</i> (Thou.) Schltr. (Réunion)	Fournel 114 (REU)	Mau, Ro, Reu
<i>Jumellea aff rossii</i> Senghas	Fournel 9 (REU)	Reu
<i>Jumellea sagittata</i> H. Perrier	Chase 15221 (K)	Mada
<i>Jumellea stenophylla</i> (Frapp. ex Cordem.) Schltr.	Pailler, Micheneau 92 (REU)	Reu
<i>Jumellea aff stipitata</i> (Frapp.) Schltr.	LivColl. TP (REU)	Reu
<i>Jumellea triquetra</i> (Thouars) Schltr.	Micheneau, Pailler 11 (REU)	Mau, Reu
<i>Jumellea triquetra aff neglecta</i> (Frapp.) Schltr.	Fournel 85 (REU)	Reu
OEONIA Lindl.		
<i>Oeonia aff rosea</i> Rolfe 1	LivColl. 2004-718 (K)	Mada, Reu
<i>Oeonia rosea</i> 2	Hermans 3222 (K)	Mada, Reu
EXTRA-GROUPES		
<i>Polystachya fulvilabia</i> Schltr.	Chase 17862 (K)	Af
<i>Polystachya henrici</i> Schltr.	Chase 17856 (K)	Mada
<i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay & H. R. Sweet	Pailler 170 (REU)	Tropiques
<i>Polystachya melliodora</i> Cribb	Chase 17923 (K)	Af

^a Nous avons utilisé "aff" pour les espèces du RBG Kew dont l'identité n'a pas été pleinement vérifiée ou pour les espèces des Mascareignes dont les noms demandent à être confirmés ou déterminés.

^b LivColl.: collection vivante.

^c Af: Afrique, Am: Amérique, Co: Comores, Mada: Madagascar, Mau: Maurice, Ro: Rodrigues, Reu: Réunion, Sey: Seychelles.

^d Espèces séquencées par Carlsward et al. (2003), uniquement présentes dans les matrices *trnL-F* et *matK*.

^e Espèces uniquement présentes dans la matrice *rps16*.

^f L'écho, Route des Plaines, 17/06/03, Réunion.

3. 2. 3. Extraction de l'ADN

L'ADN total a été extrait à partir de fragments de feuilles frais ou secs. Le protocole d'extraction au CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) de Doyle et Doyle (1987) a été suivi. Les protéines ont été éliminées par le SEVAG (Chloroforme/Alcool d'iso-amyl, 24:1) ; l'ADN a été précipité dans l'éthanol, puis purifié par ultracentrifugation sur un gradient de bromure d'éthidium et de chlorure de césium.

3. 2. 4. Amplification en chaîne par polymérase (PCR : Polymerase Chain Reaction)

Les amorces utilisées pour amplifier les différents locus sont présentées Tableau 6, les mélanges réactionnels Tableau 7. L'amplification de l'ADN a été effectuée dans un thermocycleur Gene Amp 9700 PCR system (ABI : Applied Biosystems, Warrington, Chesire, RU), programmé spécifiquement pour chaque locus (Tableau 8).

TABLEAU 6 : Locus, séquences des amorces et programmes d'amplification correspondants.

Locus	Amorces	Séquences des amorces	Références
<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL-c</i>	5' CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3'	Taberlet et al., 1991
	<i>trnL-d</i>	5' GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC 3'	Taberlet et al., 1991
	<i>trnL-e</i>	5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3'	Taberlet et al., 1991
	<i>trnL-f</i>	5' ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG 3'	Taberlet et al., 1991
<i>rps16</i>	<i>rps16-1F</i>	5' CAC GGG TCG CCC AAC TCG TTC CG 3'	Oxelman et al., 1997
	<i>rps16-2R</i>	5' TCG GGA TCG AAC ATC AAT TGC AAC 3'	Oxelman et al., 1997
<i>trnK-matK</i>	<i>matK-1326F</i>	5' TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T 3'	Cuénoud et al., 2002
	<i>matK-390R</i>	5' CGA TCT ATT CATT CAA TAT TTC-3'	Cuénoud et al., 2002
	<i>matK-19F</i>	5' CGT TCT GAC CAT ATT GCA CTA TG 3'	Molvray et al., 2000
	<i>trnK-2R</i>	5' AAC TAG TCG GAT GGA GTA G 3'	Johnson et Soltis, 1994

TABLEAU 7 : Mélanges réactionnels utilisés pour l'amplification par PCR.

Produits (volumes en µl)	<i>trnL-F / matK</i>	<i>rps16</i>
Green PCR Master Mix ^a (0.5 mM MgCl ₂)	-	42.5 à 45.5
Eau bidistillée déminéralisée	29.2 à 37.2	-
10x Buffer	5	-
MgCl ₂ (50mM)	6	-
dNPT (10 mM)	1	-
BSA (0.4%)	1.5	1.5
Amorces Forward et Reverse (100 ng/mL)	0.5	0.5
Taq Polymérase (5u/µL)	0.3	-
Extrait d'ADN total (concentration variable)	1 à 5	2 à 5
Volume total de la réaction	50	50

^a ABGene, Epsom, Surrey, RU.

TABLEAU 8 : Programmations de température utilisées pour l'amplification par PCR.

	<i>trnL-F / rps16</i>		<i>matK</i>	
Préchauffage	94°C	3 min	94°C	2,30 min
Dénaturation	94°C	1 min	94°C	1 min
Hybridation	48°C	1 min	52°C	45 s
Elongation	72°C	1 min	72°C	30 s
Elongation finale	72°C	7 min	72°C	7 min
Nombre de cycles	28		29	

3. 2. 5. « Cycle sequencing »

Les produits de PCR ont été purifiés et concentrés par centrifugation sur colonnes de purification Qiagen® suivant le protocole expérimental du producteur (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen Inc., Crawley, West Sussex, RU), puis réamplifiés en utilisant séparément chaque amorce de PCR (diluées au 1:10) selon le protocole expérimental du kit « BigDye® Terminator v.3.1 » (ABI). Cette étape se nomme « cycle sequencing ». Les volumes du mélange réactionnel ainsi que le programme d'amplification sont donnés Tableau 9. Les produits de « cycle sequencing » ont été purifiés par précipitation dans l'éthanol et analysés par séquenceur capillaire (ABI 3100).

Tableau 9 : Mélange réactionnel et programme utilisé pour le « cycle sequencing ».

Produits	Volumes en µl	Programme : <u>Dénaturation</u> : 96°C, 30 secondes. <u>Hybridation</u> : 50°C, 5 secondes. <u>Elongation</u> : 60°C, 4 minutes. <u>Nombre de cycles</u> : 26 ^a BigDye® Terminator v.3.1 kit (ABI)
Eau bidistillée déminéralisée	1.75 à 5.75	
Ready Reaction Premix ^a	1	
Cycle Sequencing Buffer ^a (5x)	1.5	
Amorce (10 ng/mL)	0.75	
Produits de PCR	1 à 5	
Volume total de la réaction	10	

3. 2. 6. Alignement des séquences

Les séquences nucléidiques ont été contrôlées et assemblées par lecture des électrophérogrammes avec les logiciels Sequence NavigatorTM 1.0 et AutoAssemblerTM 1.4.0. Chaque base ambiguë a été vérifiée et corrigée manuellement afin d'assurer la cohérence des deux brins. Les séquences ont été alignées manuellement dans PAUP* version 4.0b. 10 (Swofford, 2003) (système d'exploitation MacOS 9).

3. 2. 7. Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques ont été effectuées à partir de quatre jeux de données : les matrices individuelles des trois locus et la matrice combinée, regroupant les trois régions. L'analyse séparée des matrices constitue une phase exploratoire du jeu de données, afin de repérer les taxons qui présentent de longues branches terminales (Encadré 3) et de détecter les clades répétés et donc fiables. La matrice combinée en revanche maximise la congruence de tous les caractères. C'est à partir de son analyse selon les méthodes cladistiques et bayésiennes que nous discuterons l'hypothèse phylogénétique inférée de nos résultats, ainsi que l'évolution des principaux caractères utilisés pour la discrimination des sous-tribus ou des genres dans la taxonomie des Vandaeae.

**ENCADRE 3. ATTRACTIONS ARTEFACTUELLES DE BRANCHES (G. LECOINTRE,
DOSSIER CNRS)**

Toutes les méthodes sont sujettes à l'artéfact dit d'attraction des branches longues. Cet artéfact provient des inégalités du taux d'évolution des caractères entre les lignées analysées. Les espèces qui évoluent plus vite que les autres pour les caractères utilisés se traduisent dans un arbre par une branche propre plus longue. On a pu montrer théoriquement et expérimentalement qu'au-delà d'un certain écart de vitesse d'évolution entre les espèces, les espèces qui évoluent plus vite ont plus de chance d'avoir des états de caractères communs *par hasard* que par ascendance commune, et que le nombre de caractères communs ainsi acquis devenait supérieur aux caractères qui auraient dû les séparer. Par conséquent, elles sont regroupées ensemble dans l'arbre indépendamment des parentés. En somme, cet artéfact regroupe les espèces aux taux d'évolution les plus proches. Moins l'arbre contient de branches, et plus il est propice à cet artéfact.

Lorsque certaines espèces présentent des branches très longues, elles sont attirées par la branche "naturellement longue" qu'est la branche de l'extra-groupe (l'extra-groupe est l'espèce la plus éloignée de toutes les autres, sorte de référent extérieur nécessaire pour enraciner l'arbre). Certains auteurs ont étudié ce phénomène et l'ont généralisé, concluant que tout empilement successif de branches à la base de l'arbre n'était pas fiable, car probablement dû à un extra-groupe attirant toutes les branches longues du jeu de données.

(<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosevol/decouv/articles/chap7/lecointre4.html>)

3. 2. 7. 1. *Parcimonie*

Toutes les analyses de parcimonie ont été réalisées avec le logiciel PAUP* version 4.0b. 10. Des zones d'un ou plusieurs nucléotides insérés ou perdus ont été repérées lors de l'alignement des séquences (indels). Les délétions (gaps) ont été codées dans la matrice comme des données manquantes. Ces données sont optimisées de manière parcimonieuse par le logiciel, mais ne portent pas d'information phylogénétique. Les séquences nucléidiques se sont révélées suffisamment variables pour que les gaps ne soient pas codés dans la matrice.

La recherche des arbres les plus courts s'est faite avec le modèle de parcimonie de Wagner (Kluge et Farris, 1969 ; Farris, 1970) où les réversions et les convergences sont acceptées à priori. Les analyses (1000 réplifications) ont été réalisées avec l'algorithme de recherche heuristique TBR (tree bisection-reconnection) (le premier taxon choisi aléatoirement, 10 arbres sauvés par réplification) (Salamin et al., 2003), avec un traitement des caractères non ordonné et non pondéré, correspondant à la pondération minimale de Fitch (Fitch, 1971). L'optimisation des données manquantes (gaps et ?) a été effectuée selon l'option DELTRAN, privilégiant les convergences. Les extrémités incomplètes de chaque matrice ont été exclues des analyses.

3. 2. 7. 2. *Bootstrap et valeur phylogénétique des arbres*

La qualité phylogénétique des arbres est donnée par les indices de cohérence (CI), d'homoplasie (HI), de rétention (RI) et par l'indice de cohérence recalculé (RC) généralement utilisés en analyse cladistique. L'indice de cohérence (Kluge et Farris, 1969) mesure la quantité de synapomorphies. L'indice de rétention (Farris, 1989) donne le rapport entre le nombre d'homoplasies observables et le nombre d'homoplasies observées (Darlu et Tassy, 1993). Il complète le CI en ce sens où celui-ci ne prend pas en compte les

autapomorphies. Enfin, l'indice de cohérence recalculé (Farris, 1989) correspond au CI après avoir pondérés les caractères non informatifs.

La robustesse des clades a été mesurée par une analyse de bootstrap (Elfron, 1979 ; Felsenstein, 1985) pour 1000 réplifications avec l'algorithme TBR en sauvant 10 arbres par réplification.

3. 2. 7. 3. *Analyses Bayésiennes*

L'analyse bayésienne a été réalisée avec le logiciel MrBayes 3.1.1 (Ronquist et Huelsenbeck, 2003) (système d'exploitation GNU/LINUX Redhat 9) sur les caractères informatifs de la matrice combinée (*trnL-F-matK-rps16*) uniquement. Le modèle de substitution de l'ADN (à spécifier dans MrBayes) a été choisi parmi 56 modèles avec le logiciel Modeltest 3.7 (Posada et Crandall, 1998). Ce logiciel sélectionne parmi un choix de 56 modèles possibles, celui qui représente le mieux les données, par une série de tests hiérarchiques basés sur les valeurs de vraisemblance maximum (*best-fit maximum likelihood*). Le choix du modèle a été effectué selon le critère AIC (Akaike Information Criterion, Akaike, 1974). Le modèle qui correspondait le mieux à notre jeu de données fut celui du *General Time Reversible model*, dont le taux de variation entre les sites (α) suit une distribution gamma (GTR + Γ). Ce modèle comprend 11 paramètres : la fréquence stationnaire de chaque base nucléotidique : $\pi(A)$, $\pi(C)$, $\pi(T)$, $\pi(G)$, les taux de substitutions des bases : $\Gamma_{A \leftrightarrow C}$, $\Gamma_{A \leftrightarrow G}$, $\Gamma_{A \leftrightarrow T}$, $\Gamma_{C \leftrightarrow G}$, $\Gamma_{C \leftrightarrow T}$, $\Gamma_{G \leftrightarrow T}$ et le taux de variation entre les sites (α) de distribution gamma. Ce modèle a été implémenté dans MrBayes sans valeurs préalables. Deux analyses simultanées et indépendantes ont été effectuées via MrBayes, en utilisant l'algorithme de Monte Carlo par chaînes de Markov (MCMC). Chaque analyse a été effectuée sur un million de cycles (aussi appelés générations), incluant chacun quatre chaînes de Markov, initialement choisies au hasard par le logiciel. Toutes les 100

générations, les différents paramètres de l'analyse²³ ainsi que l'arbre correspondant ont été enregistrés (samplefreq = 100).

L'intérêt des deux analyses est de pouvoir les comparer afin de déterminer à partir de quelles générations les deux jeux de données sont homogènes, c'est-à-dire quand les logarithmes des valeurs de vraisemblance, estimés toutes les 100 générations deviennent stationnaires. Cela signifie que les probabilités postérieures (PP) des arbres inférés ont la même distribution et que les deux analyses convergent vers le même résultat. Dans les premières phases en effet, les deux analyses vont inférer des arbres très différents. L'augmentation du nombre de cycles permet de rendre l'estimation des probabilités postérieures représentative du jeu de données. La détermination du nombre de générations nécessaires avant que les diagnostics ne convergent est aussi appelé le « *burn-in* ». Il permet de repérer quels sont les arbres à éliminer. Dans notre cas, les valeurs de $-\ln L$ se sont stabilisées vers 100 000 générations. La fréquence de l'échantillonnage était fixée toutes les 100 générations ; pour 1 000 000 générations, 10 000 arbres ont été inférés (10001 pour être exact car la première génération est toujours échantillonnée). Les 1000 premiers arbres ont donc été éliminés : le consensus majoritaire ainsi que les probabilités postérieures ont donc été produits à partir de la compilation des 9001 arbres restants avec l'option « *sumt* » de MrBayes.

²³ soit : les logarithmes des valeur de vraisemblance ($-\ln L$), la somme des longueurs des branches et les différents paramètres du modèle.

TABLEAU 10 : Résultats des analyses cladistiques de chaque matrice.

	<i>trnL-F</i>	<i>rps16</i>	<i>matK</i>	Combinée
Nombre de taxons	134	120	129	138
dont extra-groupes	4	4	4	4
Longueur minimale des arbres	1123	465	972	2591
Nombre d'arbres obtenus	6310	3000	8280	9210
Indices				
- Indice de cohérence CI	0,664	0,637	0,637	0,641
- Indice d'homoplasie HI	0,363	0,363	0,363	0,359
- Indice de rétention RI	0,854	0,854	0,840	0,835
- Indice de cohérence recalculé RC	0,544	0,544	0,535	0,535
Propriétés des séquences				
- Nombre de bases alignées ^a (exclues)	1948 (167)	987 (77)	1896 (67)	4831 (311)
- Nombre (%) de sites constants	1336 (68,6)	732 (74,2)	1376 (72,6)	3444 (71,3)
- Nombre (%) de sites non-informatifs	257 (13,2)	93 (9,4)	214 (11,3)	564 (11,7)
- Nombre (%) de sites informatifs	355 (18,2)	162 (16,4)	306 (16,1)	823 (17)

^aAprès exclusion des extrémités incomplètes

3. 3. Résultats

3. 3. 1. Edifications des matrices

3. 3. 1. 1. *Matrice trnL-F*

L'amplification et le séquençage de cette région a été réalisée avec succès pour 134 espèces, dont 4 extra-groupes. Les espèces *Aerangis macrocentra*, *Angraecum calceolus*, *A. minutum* 2, et *Phalaenopsis cornucervi* n'ont pu être séquencées. Toute une partie de la région *trnL-F* s'est avérée très variable (entre les bases 447 et 560) et l'insertion de nombreux indels a été nécessaire à l'alignement des séquences. Néanmoins, cette zone a été conservée dans les analyses. Cette matrice inclut un total de 1948 caractères dont 31,4% était variables (Tableau 10).

3. 3. 1. 2. *Matrice rps16*

Cette matrice est constituée de 120 taxons dont 4 extra-groupes. Les espèces *Angraecum cadetii* 1, *A. caulescens* et *A. conchoglossum* n'ont pu être amplifiées ou séquencées. Dans leur travail antérieur sur les Angraecinae néotropicales, Carsward et al. (2003) ont utilisé les *ITS* et les régions *matK* et *trnL-F* comme marqueurs phylogénétiques. En conséquence, les espèces issues de leur étude et pour lesquelles nous avons utilisé les séquences dans nos analyses ne sont pas représentées dans cette matrice. L'alignement des séquences a donné 987 caractères dont 25,8% était variables (Tableau 10).

3. 3. 1. 3. *Matrice matK*

Pour cette matrice, 129 espèces ont pu être amplifiées, séquencées et alignées, dont 4 extra-groupes. L'amplification d'*Aeranthus adenopoda*, *A. henrici*, *A. ramosa*, *Angraecum ramosum*, *A. striatum* x *bracteosum*, *A. teretifolium*, *Jumellea anjouanensis*, *J.*

aff *neglecta* et *Oeonia rosea* n'a pas été possible. Cette matrice est constituée de 1896 caractères et présente un taux de variabilité de 27,4% (Tableau 10).

3. 3. 1. 4. Matrice combinée

Comme il était attendu, l'ADN des trois matrices étant du même génome (chloroplastique), aucune incongruence dans l'inférence phylogénétique issue des analyses individuelles n'a été détectée. Les données ont donc été combinées en une seule matrice, représentée par 138 taxons dont quatre extra-groupes (les espèces absentes de chaque matrice ont été codées en données manquantes). Dans cette matrice, la sous-tribu des Aeridinae est illustrée par deux genres, *Phalaenopsis* et *Aerides* et trois espèces ; celle des Aerangidinae par six genres, *Aerangis*, *Angraecopsis*, *Beclardia*, *Chamaeangis*, *Mystacidium* et *Solenangis* et neuf espèces et enfin celle des Angraecinae par 8 genres, *Aeranthes*, *Angraecum*, *Bonniera*, *Campylocentrum*, *Cryptopus*, *Dendrophylax*, *Jumellea* et *Oeonia* et 122 espèces. Sur les 48 espèces que nous avons recensées pour la sous-tribu à La Réunion, seules, *Angraecum cordemoyi*, *Jumellea recurva*, *Oeonia volucris* et *Oeoniellea polystachys* sont absente de l'étude. La matrice combinée représente un total de 4831 caractères, dont 28,7% était variables (Tableau 10).

3. 3. 2. Résultats selon le critère de parcimonie

Les résultats de l'analyse séparée des trois matrices *trnL-F*, *matK* et *rps16* nous ont essentiellement servi à détecter les taxons très divergents et les clades solides, c'est-à-dire ceux qui ont été retrouvés dans chaque analyse. Les phylogrammes obtenus pour chacune des trois matrices séparées ne seront donc pas discutés pas en détail.

Selon le principe de parcimonie, l'analyse de la matrice combinée a produit 9210 arbres équi-parcimonieux, de 2591 pas. L'un de ces arbres, aléatoirement choisi, est

présenté Figures 13 et 14. La topologie générale du cladogramme représente trois grands clades, fortement soutenus par des valeurs de bootstrap (BP) de 99 ou 100% (cf. clade I, clade II et clade III, Figure 13). Le **clade I** est composé des trois espèces de la sous-tribu des **Aeridinae**, à la base de l'arbre. Le **clade II** regroupe non seulement toutes les espèces de la sous-tribu des **Aerangidinae**, mais aussi certaines espèces de la sous-tribu des **Angraecinae**. Parmi elles se trouvent (1) les espèces des genres sud-américains *Camphylocentrum* et *Dendrophylax*, (2) celles des genres *Cryptopus* et *Oeonia*, (3) certaines espèces du genre *Angraecum*, incluant en outre que des espèces **africaines** et (4) deux espèces dont la validité taxonomique est douteuse, *Aeranthès henrici* et *Angraecum* sp. TP84 auxquelles nous reviendrons par la suite. Enfin, le **clade III** ne comprend lui que des espèces de la sous-tribu des **Angraecinae** dont celles des genres *Jumellea*, *Aeranthès* et *Bonnieria* ainsi la majorité des espèces du genre *Angraecum*, espèces principalement de **Madagascar**, des **Comores** ou des **Mascareignes**.

3. 3. 3. Résultats selon les méthodes bayésiennes

La topologie du consensus majoritaire des 9001 arbres issus de l'analyse bayésienne (Figure 15) est sensiblement la même que celle du consensus strict obtenu selon la procédure de parcimonie, à ceci près que les robustesses des clades, données par de fortes probabilités postérieures (PP) sont en général bien meilleures. Dans le clade II par exemple, *Aeranthès henrici* et *Beclardia macrostachya* qui avaient une position non résolue avec le critère de parcimonie sont associées (avec une robustesse de PP 0.98 par la méthode bayésienne) au clade formé des genres *Cryptopus* et *Oeonia* auquel il faut ajouter *Angraecum* sp. TP84. Identiquement dans le clade III, le groupe constitué des espèces des genres *Aeranthès* et *Jumellea* est supporté par des probabilités postérieures de 0.83, tandis que ce même groupe n'a obtenu que des valeurs de bootstrap inférieures à 50%.

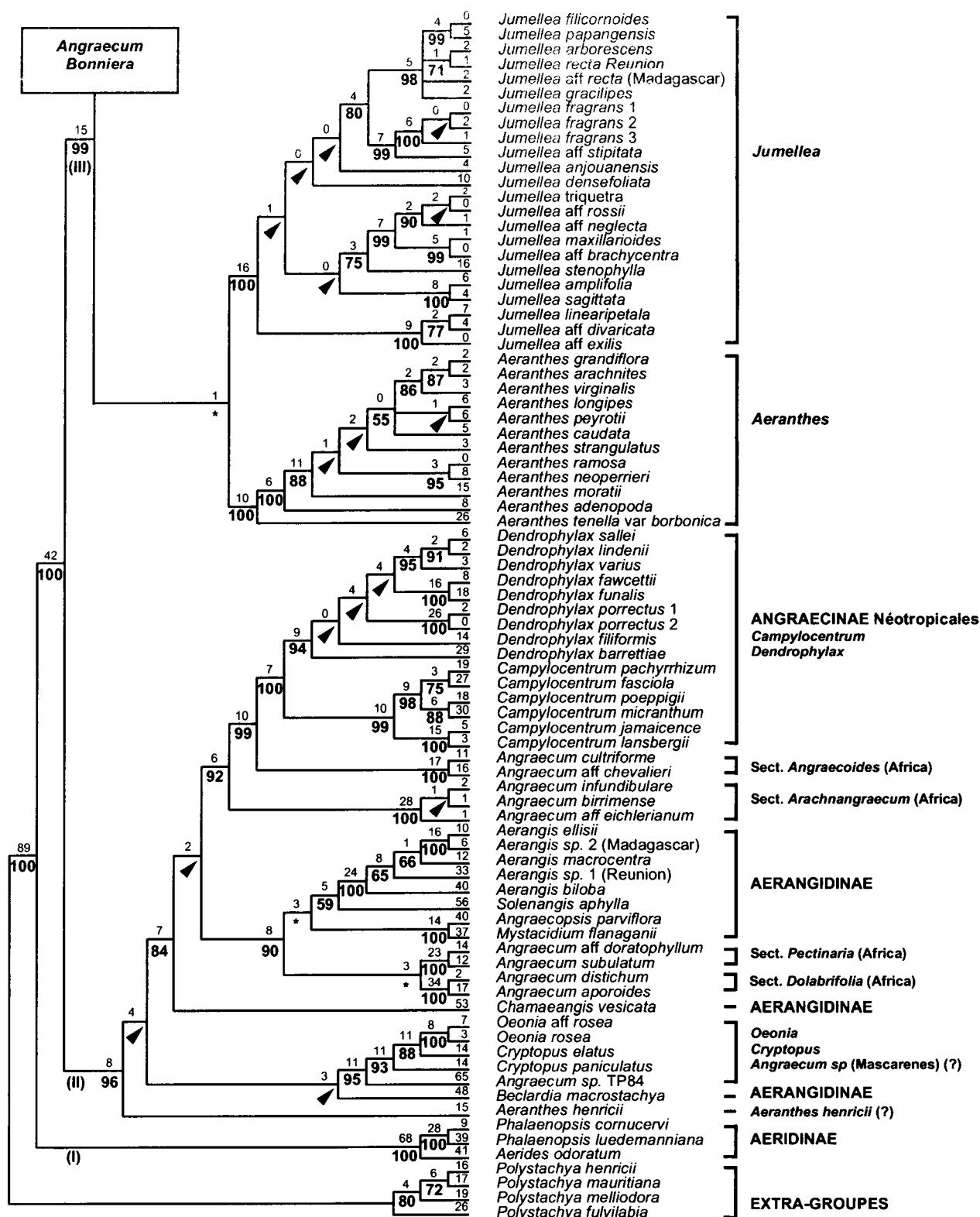


FIGURE 13. Première partie de l'arbre choisi aléatoirement parmi les 9210 arbres les plus parcimonieux ($L=2591$; $CI=0.641$; $HI=0.359$; $RI = 0.835$; $RC=0.535$). Les chiffres au dessus des branches représentent leur longueur selon l'optimisation DELTRAN ; ceux en-dessous des branches indiquent les valeurs de bootstrap, représentées par un astérisque si ces valeurs sont inférieure à 50%. Les flèches noires indiquent les embranchements non retrouvés dans le consensus strict. Les délimitations des sous-tribus correspondent à celles de Dressler (1993) et celles des sections du genre *Angraecum*, à celles de Garay (1973).

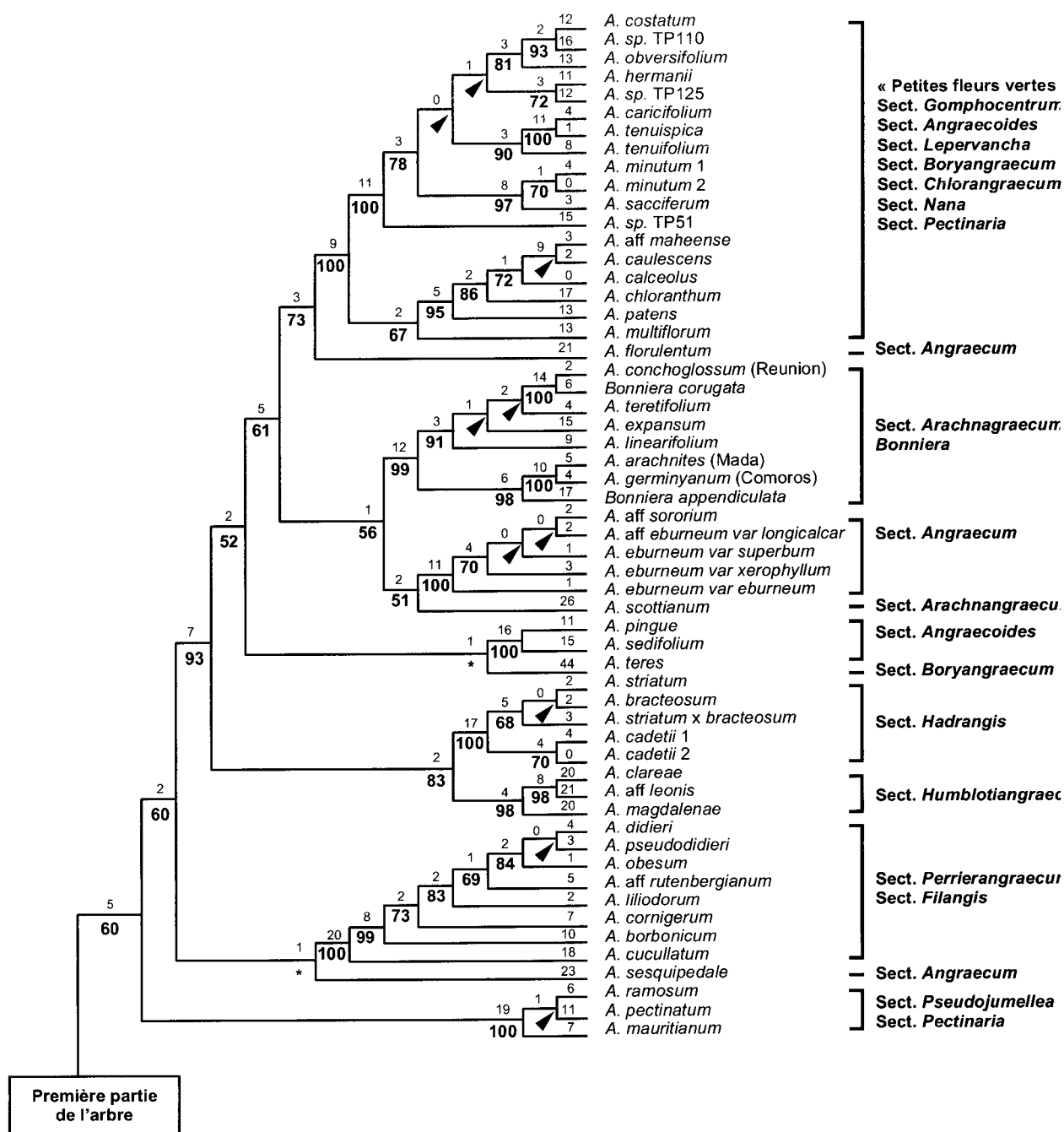


FIGURE 14. Deuxième partie de l'arbre choisi aléatoirement parmi les 9210 arbres les plus parcimonieux ($L=2591$; $CI=0.641$; $HI=0.359$; $RI = 0.835$; $RC=0.535$). Les chiffres au dessus des branches représentent leur longueur selon l'optimisation DELTRAN ; ceux en-dessous des branches indiquent les valeurs de bootstrap, représentées par un astérisque si ces valeurs sont inférieure à 50%. Les flèches noires indiquent les embranchements non retrouvés dans le consensus strict. Les délimitations des sections du genre *Angraecum* correspondent à celles de Garay (1973).

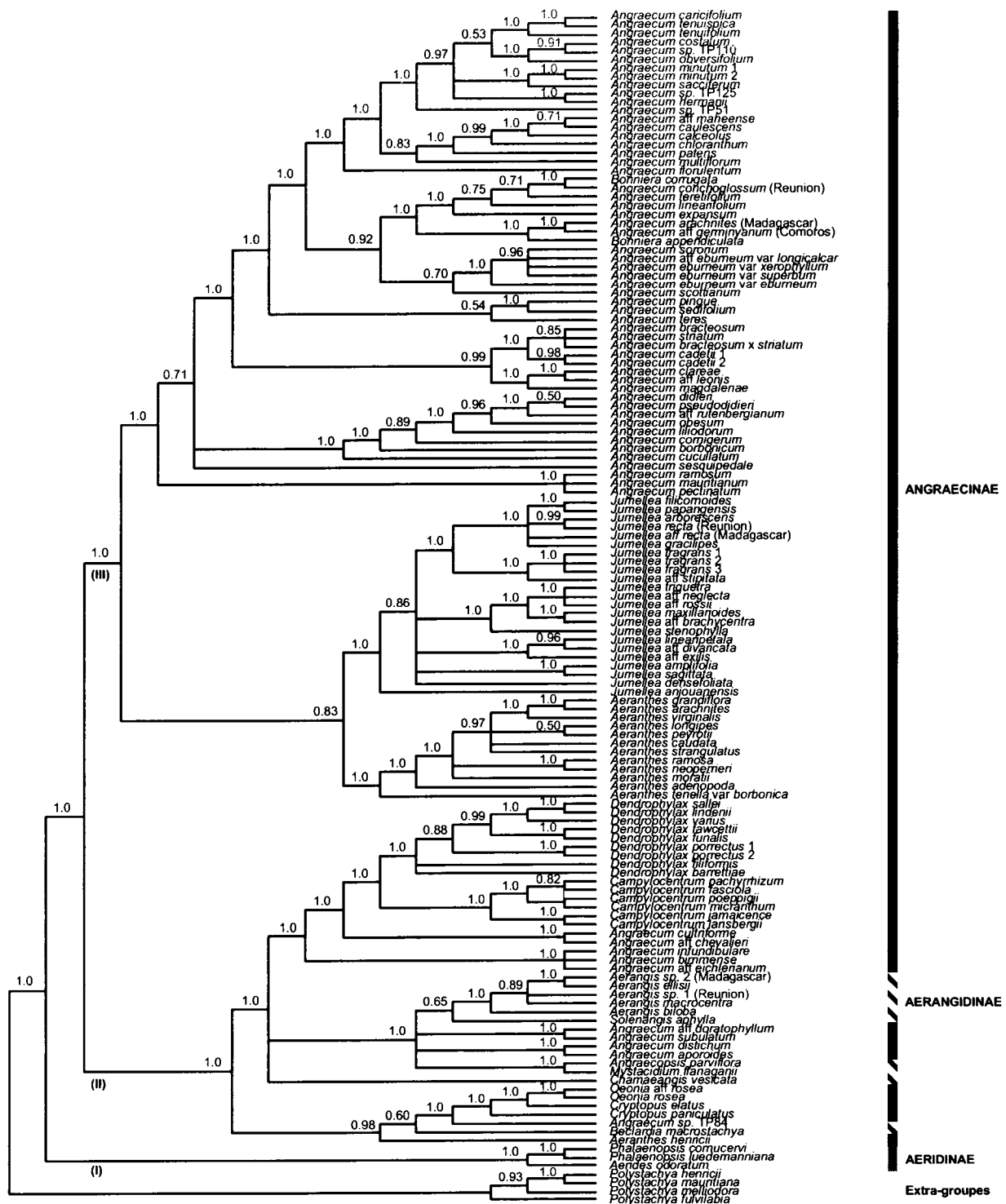


FIGURE 15. Consensus majoritaire des 9001 arbres issus de l'analyse bayésienne de la matrice combinée. Les chiffres au-dessus des branches indiquent les valeurs des probabilités postérieures. Les délimitations des sous-tribus correspondent à celles de Chase et al. (2003).

3. 4. Discussion

Le regroupement des trois matrices permet une assez bonne résolution des arbres, quelles que soient les méthodes utilisées (cladistique ou bayésienne).

3. 4. 1. Clade I : La sous-tribu des Aeridinae

Des quatre sous-tribus reconnues par Chase et al. (2003) au sein des Vandaeae, les Polystachyinae, les Aeridinae, les Aerangidinae et les Angraecinae, les trois dernières se distinguent par leur croissance de type monopodial. Tandis que les espèces de la sous-tribu des Aeridinae sont principalement asiatiques, celles des Aerangidinae et des Angraecinae sont elles principalement afro-malgaches, avec toutefois une dominance africaine pour les espèces des Aerangidinae et malgache (et îles voisines) pour celles des Angraecinae. Les résultats de nos analyses confirment ceux de D. C. Jarrell et M. T. Clegg : les sous-tribus des Aerangidinae et des Angraecinae sont plus proches entre elles que de celle des Aeridinae (Jarrell et Clegg, 1995), dont les espèces forment dans chaque analyse, un groupe bien différencié (clade I), soutenu par de nombreuses divergences entre les séquences (68 transformations communes). Outre les trois taxons inclus dans nos analyses (échantillonnage très faible), la monophylie de la sous-tribu des Aeridinae a été clairement démontrée dans une récente étude basée sur le séquençage des régions *matk* et *ITS* (Topik et al., 2005).

3. 4. 2. Clade II : Les Angraecinae et les Aerangidinae

Le clade II est lui aussi fortement soutenu, par une valeur de bootstrap de 90% et une probabilité postérieure de 1.0. Les relations phylogénétiques entre les taxons ne sont en revanche pas totalement résolues au niveau spécifique. Toutefois, trois grands clades se

dessinent au sein du groupe, tous fortement soutenus. Le premier est constitué d'un petit groupe d'espèces des genres *Cryptopus* et *Oeonia* et de l'espèce *Angraecum* sp. TP84. Le deuxième est lui formé de la majorité des Aérangidinae et de quatre espèces africaines du genre *Angraecum*. Le troisième enfin regroupe les genres sud-américains *Dendrophylax* et *Campylocentrum* ainsi que cinq espèces du genre *Angraecum*, également africaines.

3. 4. 2. 1. *Cryptopus* et *Oeonia*

Les genres *Cryptopus* et *Oeonia* forment un groupe bien soutenu (BP 93 / PP 1.0) auquel le taxon TP84, endémique de La Réunion, non seulement très rare mais aussi peu connu est rattaché (BP 95 / PP 1.0). Cette espèce fut incluse parmi les *Angraecum*, mais sa place au sein du genre est incertaine. La forme de l'éperon notamment est proche de celui des espèces du genre *Beclardia*. Le labelle se singularise également : il est plus ou moins lobé (bien que ce ne soit pas profondément marqué) à l'image des genres *Oeonia*, *Cryptopus* ou *Beclardia*. L'extrémité des feuilles est elle aussi semblable à celles des espèces des genres *Cryptopus* et *Oeonia*. Outre ces distinctions morphologiques, la place douteuse de l'espèce au sein du genre *Angraecum* est fortement soutenue par les données moléculaires : elle serait en effet la seule espèce du genre *Angraecum* non africaine présente dans le clade II. L'étude taxonomique de l'espèce est actuellement en cours. Toutefois, ce taxon présente de longues branches terminales (65 transformations) qui pourraient également masquer le sens phylogénétique de sa position dans l'arbre. Les genres *Oeonia* et *Cryptopus* forment comme nous l'avons vu un ensemble d'espèces très proches morphologiquement, que ce soit sur le plan végétatif ou floral. L'inclusion de ces espèces dans le clade II les distingue nettement de la lignée des espèces des genres *Jumellea*, *Aeranthus* et *Angraecum* présentes dans le clade III.

3. 4. 2. 2. *Aerangidinae* – *Angraecum* (sect. *Dolabrifolia* et *Pectinaria*).

Au sein de la tribu des Vandaeae, les deux sous-tribus des Polyststachyinae et des Aeridinae forment chacune des groupes d'espèces homogènes, monophylétiques. Celles des Aerangidinae et des Angraecinae ne sont quant à elles pas clairement délimitées dans notre phylogénie, sur la base des espèces que nous avons incluses dans l'analyse. Sur les phylogrammes que nous avons obtenus, les espèces des genres *Aerangis*, *Angraecopsis*, *Mystacidium*, *Solenangis*, parmi les Aerangidinae, montrent des relations de parenté étroites, bien que le clade formé de ces espèces soit à la fois peu soutenu par l'analyse de bootstrap (BP < 50%), mais fortement reconnu par l'analyse bayésienne (PP = 1.0). Les deux espèces supplémentaires, illustrant la sous-tribu des Aerangidinae dans notre étude, *Chamaeangis vesicata* et *Beclardia macrostachya* sont quant à elles exclues des autres membres de la sous-tribu. Concernant *Chamaeangis vesicata*, sa position n'est pas clairement résolue, quelles que soient les méthodes cladistiques ou bayésiennes envisagées et les matrices séparées ou combinées étudiées. Cependant, la place indéterminée de *Chamaeangis vesicata* dans les phylogrammes n'exclut pas son inclusion parmi les Aerangidinae. Sur les plans morphologique et cytologique notamment, les espèces du genre *Chamaeangis* semblent parfaitement s'inscrire au sein des Aerangidinae, ayant non seulement le rostellum allongé, mais aussi le nombre basique de chromosomes supérieur à 20 (Arends et van der Lann, 1981, 1986). Ce genre est représenté par sept espèces, exclusives de l'Afrique tropicale (la Croix et la Croix, 1997) à l'image de la majorité des espèces définissant les Aerangidinae.

Quant à *Beclardia macrostachya*, au contraire de *Chamaeangis vesicata*, sa place parmi les Aerangidinae s'avère remise en cause sur la base de nos résultats. Dans l'analyse séparée des matrices *matK* et *trnL-F*, mais aussi dans l'analyse bayésienne, cette espèce est en effet située au sein du clade formé par les espèces des genres *Cryptopus* et *Oeonia*.

Comme eux, le genre *Beclardia* regroupe des espèces au labelle lobé. J. Bosser avait déjà souligné la place incertaine des espèces de ce genre parmi les Aerangidinae (Bosser, 1997). Les fleurs ont en effet l'allure générale de celles des Angraecinae, mais la structure du rostellum, allongée et profondément bifide, a néanmoins conduit J. Bosser à placer *Beclardia* dans la sous-tribu des Aerangidinae. Le développement du rostellum est en outre le principal caractère utilisé à la discrimination des Aerangidinae et des Angraecinae. Cependant il n'est pas homogène chez tous les genres définissant ces mêmes sous-tribus : les deux genres africains *Calypstrochilum* et *Ossiculum* par exemple regroupent des espèces dont le rostellum est allongé bien qu'ils soient classés parmi les Angraecinae (Arends et van der Laan, 1986). Malheureusement nous n'avons pas de représentants de ces deux genres dans notre jeu de données. S'il est trop tôt pour s'avancer pour l'espèce *Chamaeangis vesicata*, l'allongement du rostellum, dans l'exemple particulier de *Beclardia macrostachya* semble refléter un cas d'évolution parallèle (homoplasie) avec l'ensemble des espèces des Aerangidinae, plutôt qu'une homologie avérée, héritée d'une ascendance commune. La distribution géographique du genre est également intéressante à souligner : l'origine malgache des deux espèces qui le définissent, *Beclardia macrostachya* et *B. grandiflora* Bosser les distingue en effet des autres espèces incluses parmi les Aerangidiane, principalement africaines. Le développement du rostellum ne semble donc pas constituer un caractère suffisamment fiable pour distinguer entre elles les deux sous-tribus. Arends et van der Lann (1896) avaient initié le regroupement de l'ensemble des espèces des deux sous-tribus selon quatre groupes définis par la forme du rostellum et le nombre basique de chromosomes. Ils reconnaissent la validité des Aerangidinae dont les espèces sont caractérisées, comme nous l'avons vu, par un rostellum allongé et un nombre basique de chromosomes typiquement supérieur à 20. Malheureusement, *Beclardia macrostachya* ne fut pas incluse dans leur étude.

Le nombre de chromosome de cette espèce n'est par ailleurs pas connu (D. Roberts, communication personnelle). Les données cytologiques auraient pourtant permis de déterminer si le genre doit être transféré de la sous-tribu des Aerangidinae vers celle des Angraecinae, comme les analyses moléculaires et dans une moindre mesure comme les données morphologiques et biogéographiques le suggèrent.

Toutefois, ce débat sur la définition des deux sous-tribus n'est peut-être plus d'actualité : l'inclusion des Aerangidinae parmi les Angraecinae pose de toute façon problème quant à la délimitation des deux sous-tribus selon le sens actuellement donné à la classification de la famille des Orchidaceae (recherche de groupes naturels monophylétiques) (Chase et al., 2003). En effet, outre l'exclusion des genres *Chamaeangis* et *Beclardia*, les autres genres de la sous-tribu des Aerangidinae sont associés à quatre espèces africaines du genre *Angraecum* au sein d'un clade dont la validité est fortement soutenue (BP 90 / PP 1.0). Ces *Angraecum*, typiquement africains, appartiennent à deux sections : *Angraecum aporoides* et *A. distichum* à celle des *Dolabrifolia* ; *A. doratophyllum* et *A. subulatum* à celle des *Pectinaria*. Les deux sections sont assez proches morphologiquement : elles ne se distinguent que par l'insertion et la taille des feuilles (Tableau 11). La section *Dolabrifolia* compte quatre espèces exclusivement d'Afrique ; la section *Pectinaria* regroupe quant à elle neuf espèces dont quatre sont présentes en Afrique et cinq à Madagascar et îles voisines. Dans le contexte de notre étude, les espèces malgaches et réunionnaises de la section *Pectinaria* (*A. hermannii* et *A. pectinatum*) sont nettement séparées des espèces africaines regroupées avec les Aerangidinae. L'investigation cytologique du groupe à l'initiative d'Arends et van der Laan (1981, 1986) avait mis en évidence l'hétérogénéité du genre *Angraecum* : bien que le nombre basique de chromosomes soit égal à 19 chez la majorité des espèces, chez certaines, exclusivement

africaines, il peut cependant être supérieur à 20. Or, les seules espèces dont le nombre basique de chromosomes est également supérieur à 20 sont celles de la sous-tribu des Aerangidinae et celle du genre sud américain *Dendrophylax*. En relevant sur notre phylogénie le nombre basique de chromosomes de chaque espèce (Figure 16), il apparaît clairement que les espèces africaines du genre *Angraecum* à $x > 20$ sont justement celles qui forment le clade solide avec la majorité des Aerangidinae. Le nombre basique de chromosomes semble donc avoir un impact fort sur l'histoire évolutive des espèces au sein des deux sous-tribus, si bien qu'il est possible d'envisager la radiation des Aerangidinae (*Beclardia* probablement exclut) à partir d'ancêtres proches des *Angraecum* africains à $x > 20$. Une analyse morphologique de ces espèces qui se singularisent au sein du genre *Angraecum* (*A. aporoides*, *A. distichum*, *A. doratophyllum* et *A. subulatum* dans cette étude) et de celle des Aerangidinae avec lesquelles elles forment un groupe homogène serait utile afin de déterminer les synapomorphies qui permettraient de distinguer ce clade, robuste vis-à-vis des données moléculaires et cytologiques.

TABLEAU 11. Distinction morphologique entre les différentes sections du genre *Angraecum* dont les espèces sont phylogénétiquement proches de celles de la sous-tribu des Aerangidinae (d'après Garay, 1973).

Caractères	Sections	
	<i>Dolabrifolia</i>	<i>Pectinaria</i>
Tige	Longue	Longue
Feuilles	Equitantes^a, très petites, compressées	Lâchement insérées sur la tige, allongées
Inflorescence	fleurs solitaires	fleurs solitaires
Pédoncule	Très petit	Très petit
Fleurs	Blanches, petites	Blanches, petites
Ovaire	Sessile	Sessile

^a Se dit de feuilles érigées, en éventail, pliées longitudinalement, à l'insertion distique, chaque base de la feuille insérant étroitement la base de la feuille suivante (Bossert et al., 1976-, Glossaire).

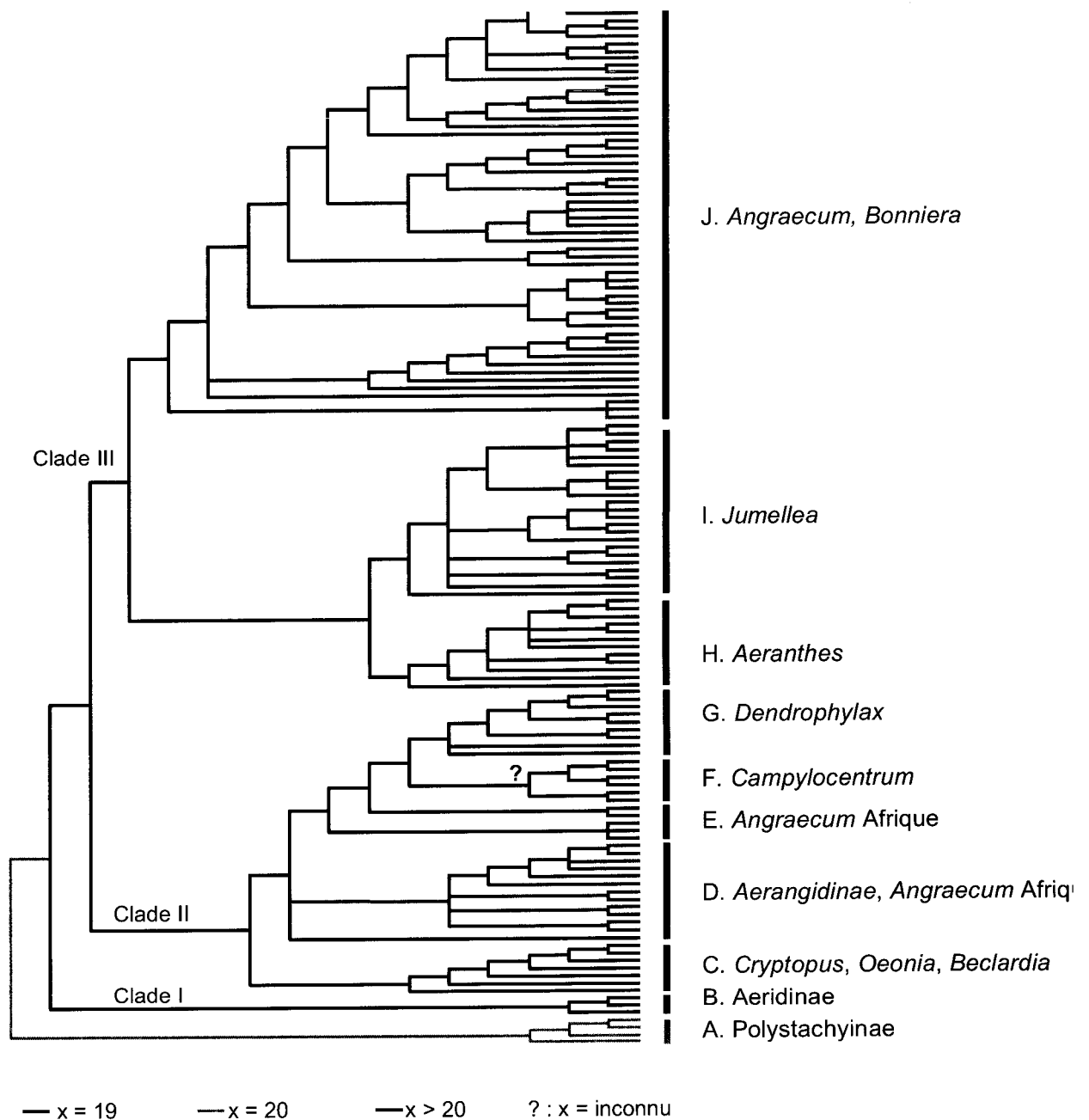


FIGURE 16. Hypothèse de l'évolution du nombre basique de chromosomes (d'après les résultats d'Arends et van der Laan, 1981, 1986) (arbre repris de la Figure 15).

(A. *Polystachyinae* : majoritairement $x = 20$; B. *Aeridinae* : majoritairement $x = 19$; C. *Cryptopus elatus* : $x = 19$, *Oeonia*, *Beclardia* : $x = ?$; D. *Aerangidinae* : $x > 20$, *Angraecum doratophyllum* : $x = 23$, *A. subulatum* et *A. distichum* : $x = 24$, *A. aporoides* : $x = 25$; E. *Angraecum cultriforme*, *A. chevalieri*, *A. infundibulare*, *A. birrimense* et *A. eichleirianum* : $x = 19$; F. *Campylocentrum* (Amérique du Sud) : $x = ?$; G. *Dendrophylax funalis* (Amérique du Sud) : $x = 21$; H. *Aeranthes caudata* : $x = 19$; I. *Jumellea anjouanensis*, *J. filicornoides* : $x = 19$; J. *Angraecum caricifolium*, *A. sacciferum*, *A. calceolus*, *A. arachnithes*, *A. scottianum*, *A. leonis*, *A. eburneum* et *A. sesquipedale* : $x = 19$).

3. 4. 2. 2. Genres américains – *Angraecum* (sect. *Angraecoides* et *Arachnangraecum*)

Dans notre étude, les espèces du genre *Angraecum* se distribuent à la fois dans le clade II et dans le clade III ; le genre apparaît clairement polyphylétique. Les espèces du clade II ont en commun leur répartition strictement africaine. Elles s'orientent toutefois selon deux grands groupes : la première partie se rapproche des espèces de la sous-tribu des *Aerangidinae*, comme nous venons de le voir ; la deuxième est à la base de la lignée des genres sud-américains, avec lesquels elles forment par ailleurs un groupe monophylétique fortement soutenu (BP 92 ; PP 1.0).

Les *Angraecum* associés aux genres sud américains *Campylocentrum* et *Dendrophylax* sont représentatifs de deux sections : *Angraecum chevalieri* et *A. cultriforme* appartiennent à la section *Angraecoides* ; *A. infundibulare*, *A. birrimense* et *A. eichleirianum* font partie de la section *Arachnangraecum*. Les sections sont principalement différenciées par la forme et la taille des segments floraux (Tableau 12). B. Carlsward et son équipe avaient en outre déjà mis en évidence la proximité phylogénétique des espèces américaines et de ces *Angraecum* africains (Carlsward et al., 2003). Historiquement, les genres sud-américains furent en partie délimités sur la taille des fleurs. De nombreux botanistes en effet avaient envisagé d'inclure l'espèce *Harrisella porrecta* dans le genre *Campylocentrum* sur la base commune de leurs fleurs de très petite taille (e.g. William, 1951 ; McVaugh, 1985 ; Dressler, 1993 ; Nir, 2000, cités par Carlsward et al., 2003). Selon les données moléculaires de B. Carlsward et al., la taille des fleurs dans le groupe n'a aucune valeur phylogénétique : la distribution du dimorphisme de la morphologie florale ne fut en effet aucunement associée aux différents groupes monophylétiques reconnus dans leur étude (Carlsward, 2003). Ces auteurs montrent ainsi qu'*Harrisella porrecta*, malgré la taille de ses fleurs, est bien plus proche des espèces à grandes fleurs du genre *Dendrophylax*. Ils iront même jusqu'à renommer l'espèce *Dendrophylax porrectus*. Ils

confirment, par ce nouvel exemple, l'extrême plasticité de la morphologie florale des orchidées (voir aussi Palmer et Chase, 1997 ; Pridgeon et Chase, 1998 ; Whitten et al., 2000 ; Williams et al., 2001).

TABLEAU 12. Distinction morphologique entre les différentes sections du genre *Angraecum* phylogénétiquement proches des genres sud-américains (d'après Garay, 1973).

Caractères	Sections	
	<i>Angraecoides</i>	<i>Arachnangraecum</i>
Tige	Longue	Longue
Inflorescence	1-2 fleur(s)	1-2 fleur(s)
Pédoncule	Plus long que les entre-nœuds	Plus long que les entre-nœuds
Fleurs	Vertes (rarement blanches), petites	Blanches ou verdâtres, grandes
Labelle	Naviculaire, acuminé	Orbiculaire, acuminé
Eperon	< 30 mm, cylindrique ou claviforme	> 30 mm, filiforme

Morphologiquement, les Angraecinae du nouveau continent se singularisent par la présence d'espèces aphylls (sans feuille), seules représentantes dans la sous-tribu (genre *Dendrophyllax* et une partie du genre *Campylocentrum*). Selon B. Carlswald et al., l'évolution vers la condition aphylls serait un caractère dérivé apparu indépendamment deux fois chez les Angraecinae néotropicales et au moins à deux autres reprises chez les Vandae : en Asie et dans la zone afro-malgache (Carlswald et al., 2003).

Les espèces américaines sont également caractérisées par des plantes dont les inflorescences sont pluriflores. Or, les *Angraecum* avec lesquels elles partagent un ancêtre commun sont eux représentés par des espèces à fleurs solitaires ou ayant deux fleurs au maximum. Le nombre de fleurs par inflorescence est un caractère qui a été largement

utilisé dans la taxonomie des Angraecinae pour différencier ou regrouper les espèces, sections ou genres (e.g. Schechter, 1914 ; Garay, 1973). L'état de ce caractère semble cependant très peu stable dans l'histoire évolutive de la sous-tribu : dans une même lignée (clade II et clade III) ou au sein d'un même genre (*Angraecum* ou *Aeranthès* par exemple), il existe à la fois des plantes pluri- ou uniflores. Peu de données existent dans la littérature sur l'état ancestral de ce caractère. R. Dressler suggère que la présence de nombreuses bractées à la base des fleurs du genre *Sigmatostalix* (Ondidiinae, Cymbidieae) pourrait représenter les vestiges de la condensation d'une inflorescence pluriflore (Dressler, 1981, 1993). Chez certaines espèces typiquement uniflores, comme celles du genre *Jumellea* ou celle du genre *Angraecum* sect. *Perrierangraecum* par exemple, la présence de plusieurs « gaines » autour du pédoncule, de nature et de morphologie similaires à celles de la bractée, pourrait également suggérer la réduction de l'inflorescence.

3. 4. 3. Clade III : *Jumellea*, *Aeranthès*, *Angraecum* et *Bonniera*

Le clade III est constitué de la majorité des espèces de notre jeu de données. Il peut être divisé en cinq grands groupes, tous monophylétiques, retrouvés par ailleurs dans chacune des analyses séparées. Néanmoins, les relations phylogénétiques entre ces groupes restent obscures. Ils se composent (1) des genres *Jumellea* et (2) *Aeranthès*, (3) du genre *Angraecum* sect. *Perrierangraecum* et sect. *Filangis*, (4) du groupe formé par les trois espèces *Angraecum pectinatum*, *A. mauritianum* et *A. ramosum* et (5) du reste des espèces du genre *Angraecum* incluant le genre *Bonniera*.

3. 4. 3. 1. *Jumellea* – *Aeranthès*

Le genre *Aeranthès* forme un groupe monophylétique bien soutenu (BP 100 ; PP 0.1) si toutefois *Aeranthès henrici* en est exclu. La place douteuse de cette dernière espèce

dans le genre *Aeranthès* a été plusieurs fois soulignée (Labe, 2001 ; D. Roberts, communication personnelle) ; nos données moléculaires vont en ce sens. Le gigantisme d'*Aeranthès henrici* (tige, feuilles, fleurs, racines) ainsi que le blanc pur de ses fleurs le distinguent en tous points des autres espèces du genre *Aeranthès*. Une étude approfondie de l'espèce (thèse de doctorat) est actuellement en cours au RBG Kew (D. Roberts, communication personnelle).

Le genre *Aeranthès* présente de nombreuses autapomorphies permettant son identification rapide, telles les inflorescences pendantes formées de fleurs hyalines et vertes en général, avec l'extrémité des segments très effilés. Si nos analyses permettent une bonne discrimination du genre parmi les Angraecinae, les cladogrammes obtenus ne sont toutefois pas résolus au niveau spécifique. Le nombre très faible de transformations qui existe entre les espèces pourrait suggérer que ce genre ait connu une radiation récente.

Le genre *Jumellea* forme au même titre que le genre *Aeranthès* un groupe naturel, bien soutenu (BP 100 ; PP 1.0). L'homogénéité des espèces trouve également une réalité morphologique : les inflorescences uniflores, ainsi que la soudure des sépales latéraux, entre eux et à la base de la colonne rendent les fleurs facilement reconnaissables. A l'image du genre *Aeranthès*, les relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Jumellea* ne sont pas clairement résolues.

La place des genres *Aeranthès* et *Jumellea* au sein des Angraecinae est difficilement interprétable. Selon le critère de parcimonie, ils seraient phylogénétiquement proches, mais le clade *Jumellea-Aeranthès* est très faiblement soutenu, avec seulement une transformation le discriminant. De la même façon, la présence de ce clade n'a jamais été retrouvée dans les analyses séparées. Les espèces des genres *Jumellea* et *Aeranthès*

diffèrent par de nombreux caractères morphologiques, parmi les plus utilisés dans la taxonomie des Angraecinae, comme le nombre de fleurs par inflorescence, la couleur et la texture des fleurs, la forme et la taille de l'éperon ou la morphologie de la colonne.

Avec toutes les précautions nécessaires, liées à la faible robustesse du clade *Jumellea-Aeranthus* et aux nombreux caractères morphologiques qui les séparent, il est donc difficile de conclure quant à la position des deux genres parmi les Angraecinae. De nombreux botanistes (Perrier de la Bâthie, 1941 ; Garay, 1973) ont néanmoins remarqué la ressemblance des espèces du genre *Jumellea* et des *Angraecum* de la section *Perrierangraecum*. Ces deux groupes ont en commun la présence de plantes à fleurs solitaires, d'un blanc pur, développant le plus souvent un éperon long et filiforme. Chez les espèces du genre *Angraecum* sect. *Perrierangraecum* cependant, la base de la colonne enveloppe toujours le labelle (Garay, 1973). Perrier de la Bâthie (1941) dans la description qu'il fait du genre *Angraecum* décrit la colonne sans pied et sans expansions. Il précise en outre « Quelques espèces de la section *Perrierangraecum* ont néanmoins des rudiments d'expansions basilaires (passage au genre *Jumellea*) ». Les *Angraecum* sect. *Perrierangraecum*, au même titre que les *Jumellea* forment un ensemble d'espèces homogènes dont la monophylie est fortement supportée. Cependant, aucune parenté entre les deux groupes n'a été mise en évidence dans notre étude. Un échantillonnage plus complet de la sous-tribu permettrait certainement une meilleure compréhension des relations phylogénétiques que les espèces du genre *Jumellea* entretiennent avec celles de la section *Perrierangraecum*.

3. 4. 3. 2. *Angraecum* sect. *Perrierangraecum* – sect. *Filangis*

Le genre *Angraecum* est divisé, comme nous l'avons vu, en 19 sections. 15 d'entre elles sont illustrées dans notre étude : *Angraecum* (3 espèces), *Angraecoides* (5 espèces), *Arachangraecum* (10 espèces), *Boryangraecum* (2 espèces), *Chlorangraecum* (une espèce), *Dolabrifolia* (2 espèces), *Filangis* (une espèce), *Gomphocentrum* (5 espèces), *Hadrangis* (3 espèces), *Humblotiangraecum* (3 espèces), *Lepervancha* (3 espèces), *Nana* (une espèce), *Pectinaria* (4 espèces), *Perrierangraecum* (8 espèces), *Pseudojumellea* (2 espèces).

Parmi elles, la section *Perrierangraecum* est l'un des groupes dont l'existence a été reconnue dans toutes nos analyses : elle inclut des espèces dont l'homogénéité est fortement soutenue (BP 100 ; PP 1.0). Le groupe est monophylétique, mais il comprend toutefois l'espèce *Angraecum cornigerum*, initialement placé dans la section *Filangis* par L. Garay (Garay, 1973). Peu de caractères sépare la section *Filangis* de la section *Perrierangraecum* : elles se différencient principalement par le nombre de gaines recouvrant le pédoncule, la taille des fleurs et la forme de l'ovaire (Tableau 13). Selon la taille des fleurs, l'inclusion d'*A. cornigerum* dans la section *Filangis* est douteuse. En revanche, deux gaines uniquement recouvrent le pédoncule et l'ovaire présente 6 côtes saillantes, le distinguant donc des *Perrierangraecum*. L. Garay créa la section *Filangis* (7 espèces de Madagascar, une espèce réunionnaise) pour distinguer les espèces à long éperon (qu'il plaça dans la section *Filangis*), des espèces à courts éperons de la section *Conchoglossum* (5 espèces africaines, 4 espèces malgaches) (Garay, 1973). Malheureusement, *A. cornigerum* est le seul représentant de la section *Filangis* que nous ayons pu obtenir et nous n'avons aucune espèce de la section *Conchoglossum*. Un meilleur échantillonnage des espèces permettrait de tester la monophylie des *Filangis*, celle des *Conchoglossum* et leur inclusion ou non parmi les *Perrierangraecum*.

Enfin, la place de ce groupe particulier est insuffisamment résolue pour conclure avec satisfaction sur les relations phylogénétiques que les espèces entretiennent avec leurs consœurs du genre *Angraecum*, mais aussi avec les espèces du genre *Jumellea* dont elles sont morphologiquement proches (cf. paragraphe précédent).

La position incertaine d'*A. sesquipedale* (sect. *Angraecum*) à la base de ce groupe (non retrouvée dans les analyses séparées) semble être dû à la grande divergence du génome de l'espèce (23 transformations terminales), certainement couplé à notre faible échantillonnage de la section dont il fait partie. La pollinisation hautement spécialisée d'*A. sesquipedale* avec le sphinx *Xanthopan morganii* var. *praedicta*, dont les processus adaptatifs ont conduit au développement spectaculaire de l'éperon (Darwin, 1862 ; Wasserthal, 1997) pourrait en partie expliquer la grande variation du génome de l'espèce.

TABLEAU 13. Distinction morphologique entre les sections *Perrierangraecum* et *Filangis* (d'après Garay, 1973).

Caractères	Sections	
	<i>Perrierangraecum</i>	<i>Filangis</i>
Tige	Longue	Longue
Inflorescence	fleur solitaire	fleur solitaire
Pédoncule	Longueur variable, couvert par 3-4 gaines	Plus court que les entre-nœuds, couvert par 1-2 gaine(s)
Fleurs	Blanches, de grande taille	Blanches, petites, rarement moyennes
Eperon	Plus long que l'ovaire	Plus long que l'ovaire
Ovaire pédicellé	Oui	Oui
Ovaire	Généralement triquètre	Cylindrique

3. 4. 3. 3. *Angraecum ramosum* – *A. mauritianum* – *A. pectinatum*

Le quatrième groupe reconnu de façon systématique dans le clade III est formé de trois espèces, *Angraecum pectinatum* (sect. *Pectinaria*), *A. ramosum*²⁴ et *A. mauritianum* (sect. *Pseudojumellea*) (BP 100 ; PP 1.0). *A. pectinatum* est donc phylogénétiquement proche d'*A. ramosum* et *A. mauritianum*, bien qu'il soit placé dans une section différente. Les différences morphologiques discriminant les sections *Pectinaria* et *Pseudojumellea* sont principalement basées sur la taille des fleurs et la présence / absence de pédoncule ou de pédicelle (Tableau 14). Le rapprochement des trois espèces montre une fois encore combien la taille des fleurs n'est pas un caractère phylogénétiquement fiable. *A. pectinatum* présente en effet de toutes petites fleurs blanches (sépalés de 6 mm), tandis qu'*A. ramosum* et *A. mauritianum* ont des fleurs beaucoup plus grandes (sépalés > 15 mm).

Comme ils l'avaient envisagé pour les espèces de la section *Perrierangraecum*, les fleurs blanches et solitaires des espèces de la section *Pseudojumellea* ont conduit les botanistes à rapprocher cette section du genre *Jumellea* (son nom l'indique !) (Schlechter, 1918 ; Garay, 1973). Rien dans notre hypothèse phylogénétique ne soutient ce rapprochement. Cependant, la non-résolution des cladogrammes n'exclut pas que les espèces soient phylogénétiquement proches.

²⁴ L. Garay a confondu *A. ramosum* avec le complexe des *A. germinyanum*. Il ne propose donc aucune section pour le vrai *A. ramosum*, endémique de la Réunion (Garay, 1973). Sur la base des caractères morphologiques et moléculaires, nous proposons dans l'inclure dans la section *Pseudojumellea*.

TABLEAU 14. Distinction morphologique entre les sections *Pseudojumellea* et *Pectinaria* (d'après Garay, 1973).

Caractères	Sections	
	<i>Pseudojumellea</i>	<i>Pectinaria</i>
Tige	Longue	Longue
Inflorescence	1 fleur	1 fleur
Pédoncule	Proéminent	Très petit
Fleurs	Blanches, moyennes	Blanches, petites
Ovaire	Pédicellé, plus long que les entres-noeuds	Sessile

3. 4. 3. 4. *Angraecum* – *Bonnieria*

A l'exclusion des différents groupes monophylétiques que nous venons de passer en revue (i.e. les genres *Aeranthès*, *Jumellea* et pour le genre *Angraecum*, les sections *Perrierangraecum-Filangis* et *Pectinaria-Pseudojumellea*), le dernier groupe d'espèces qui se distingue incontestablement du clade III, groupe fortement soutenu et monophylétique (BP 93 ; PP 1.0), est constitué du reste des espèces du genre *Angraecum* et du petit genre *Bonnieria*. Plusieurs sous-ensembles se dessinent néanmoins au sein de ce grand clade : (1) les sections sœurs *Hadrangis* et *Humblotiangraecum*, (2) la section *Angraecoides* formée d'*A. sedifolium* et d'*A. pingue*, (3) les sections *Arachnangraecum*, *Angraecum* et le genre *Bonnieria*, et enfin (4) un groupe d'espèces que nous nomerons par la suite les « *Angraecum* à petites fleurs vertes ».

Sect. *Hadrangis* – sect. *Humblotiangraecum*

La monophylie des sections *Hadrangis* et *Humblotiangraecum* est robuste (BP 100 ; PP 1.0 pour les *Hadrangis* et BP 98 ; PP 1.0 pour les *Humblotiangraecum*). Les deux sections, proches morphologiquement (Tableau 15 et Figure 17) forment un groupe d'espèces sœurs (BP 83 ; PP 1.0). La section *Humblotiangraecum* est exclusivement malgache, avec une espèce présente aux Comores ; celle des *Hadrangis* forme quant à elle la seule section endémique des Mascareignes. Les formes florales des ancêtres des trois espèces de la section *Hadrangis* devaient donc être proches par leur morphologie des *Humblotiangraecum* actuelles. La taille de l'éperon est le principal caractère qui permette de distinguer la section *Hadrangis* de la section *Humblotiangraecum*, court et sacciforme chez les *Hadrangis*, long et filiforme chez les *Humblotiangraecum*. Abondamment utilisé dans la taxonomie des Angraecinae (e.g. de Cordemoy, 1899 ; Schlechter, 1918 ; Garay, 1973), le développement de l'éperon est d'autant plus délicat à reconnaître comme élément distinctif des genres, sections ou espèces que son évolution est fortement liée à la relation plante-pollinisateur. Chez les Aeridinae, la réduction ou l'allongement de l'éperon est apparue de façon récurrente, l'éperon court (< 30 mm) représentant l'état apomorphique du caractère dans la sous-tribu (Topik et al., 2005). La variation de la longueur de l'éperon calquée sur notre phylogénie, (Figure 18) montre également l'évolution homoplasique du caractère, grandement lié à l'histoire reproductive des espèces. Toutefois, il est difficile de conclure quant à l'état ancestral de ce caractère chez les orchidées angraecoïdes. L'extra-groupe que nous avons choisi (sous-tribu des Polystachyinae) est représenté par des espèces à court éperon. Sur le cladogramme, le développement de l'éperon est donc l'état apomorphe. Cependant, dans le clade représenté par les espèces malgaches et réunionnaises du genre *Angraecum*, de nombreuses réversions de la longueur de l'éperon ont eu lieu.

TABLEAU 15. Distinction morphologique entre les sections *Humblotiangraecum* et *Hadrangis* (d'après Garay, 1973).

Caractères	Sections	
	<i>Humblotiangraecum</i>	<i>Hadrangis</i>
Tige	Assez courte, absente en général	Assez courte, absente en général
Inflorescence	Multi-florifère	Multi-florifère
Fleurs	Blanches, charnues	Blanches, charnues
Eperon	Bien plus long que l'ovaire	Bien plus long que l'ovaire
- Ouverture	Large à la base	Large à la base
- Longueur	Plus ou moins long	Court
- Forme	Filiforme	Conique ou sacciforme
Pédicelle de l'ovaire	Généralement court	Généralement court



FIGURE 17. Illustration de la forme et de la taille de l'éperon. (A) *Angraecum leonis* (sect. *Humblotiangraecum*) et (B) *A. cadetii* (sect. *Hadrangis*).

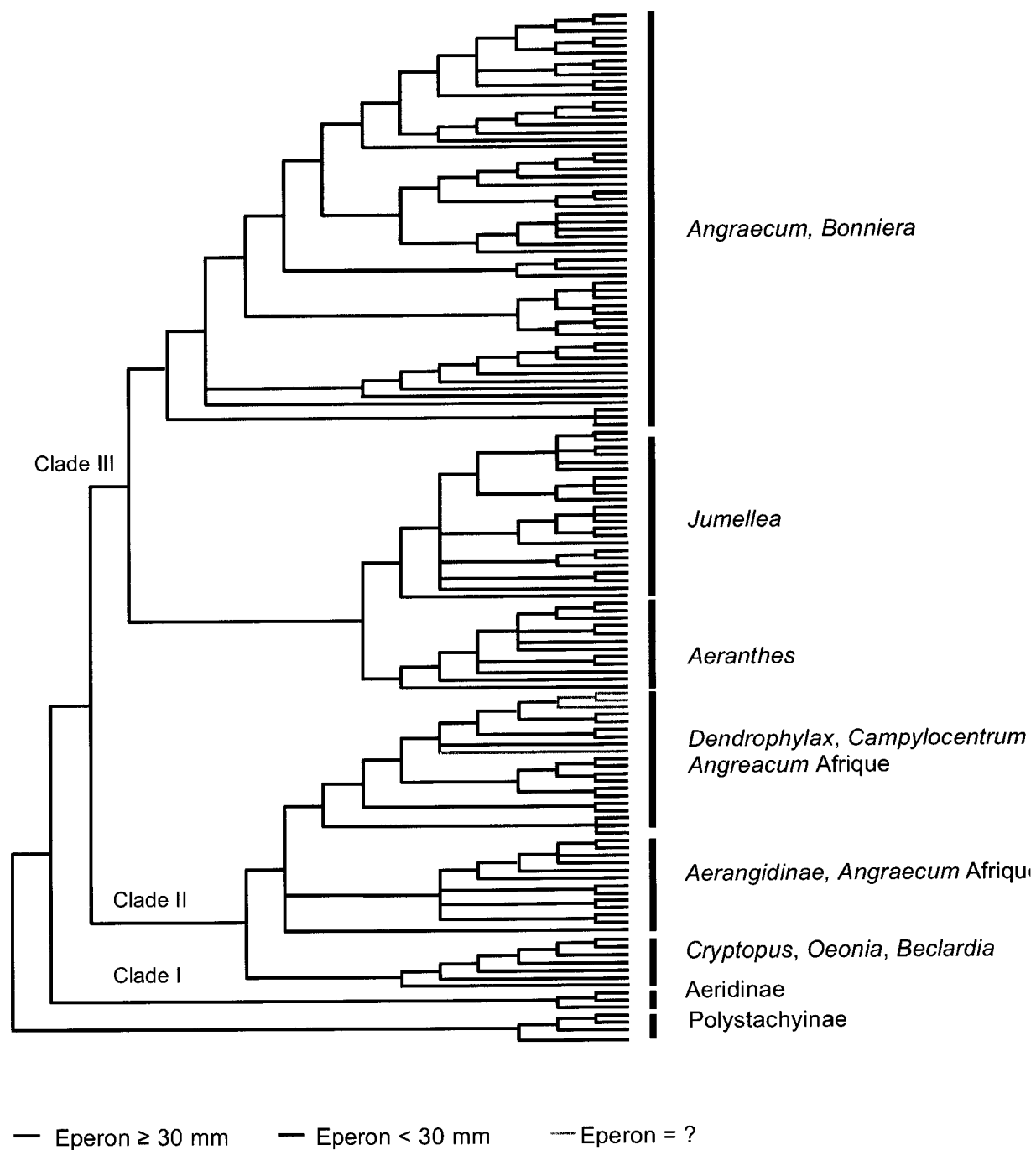


FIGURE 18. Hypothèse de l'évolution de la longueur de l'éperon chez les orchidées angraecoïdes (arbre repris de la Figure 15).

Angraecum pingue – Angraecum sedifolium

Outre les sections *Hadrangis* et *Humblotiangraecum*, celle des *Angraecoides*, illustrée par *Angraecum sedifolium* (Madagascar) et *A. pingue* (Madagascar, Réunion) dans le clade III se singularise. Loin d'être monophylétique (la section a également des représentants africains dans le clade II), le fort « pattern » géographique qui lui est associé semble remettre en cause sa validité. Tandis que les espèces africaines présentent de fortes affinités avec les genres sud américains dans le clade II, la position des espèces malgache et réunionnaise n'est pas clairement résolue au sein du clade III. Bien qu'elles soient caractérisées par des fleurs jaune-verdâtre et solitaires, elles se distinguent de la majorité des *Angraecum* à fleurs vertes, également présents dans le clade III.

Le rapprochement d'*Angraecum teres* (sect. *Boryangraecum*) avec *A. sedifolium* et *A. pingue* semble être lié à l'artéfact dû à la longueur de sa branche terminale (44 transformations). En effet, (1) le clade formé des trois espèces n'est pas soutenu (BP < 50 ; PP 0.54) ; (2) *A. teres* a une position non résolue dans toutes les analyses séparées.

Bonniera – sect. *Arachnangraecum* – sect. *Angraecum*

Le clade formé des sections *Angraecum*, *Arachnangraecum* et du genre *Bonniera* est peu soutenu par nos analyses (BP 56 ; PP 0.92). Isolée, la section *Arachnangraecum* forme cependant un groupe plus robuste (BP 99 ; PP 1.0), outre l'inclusion du genre *Bonniera* et l'exclusion de l'espèce *A. scottianum* (Comores). Cette dernière, bien qu'elle appartienne à la section *Arachnangraecum*, est située à la base de l'ensemble des différentes sous-espèces d'*A. eburneum* (sect. *Angraecum*). Le clade formé n'est cependant pas soutenu (BP 51 ; PP 0.70). La grande divergence du génome d'*A. scottianum* (23 transformations) explique certainement sa place incertaine (attraction des longues branches

terminales). Cette divergence peut être en outre expliquée par l'évolution autochtone et indépendante de l'espèce aux Comores.

Les espèces du genre *Bonniera* ont toutes deux été envisagées comme des formes péloriques, d'*Angraecum conchoglossum* pour *Bonniera corrugata* et d'*A. arachnithes* pour *B. appendiculata* (Schlechter, 1918 ; Garay, 1973 ; Hermans et Cribb, 2005). Nos analyses confirment les origines respectives des deux espèces. Elles se distinguent des *Angraecum* par le labelle pétaloïde et l'éperon absent ou très réduit. Nos résultats suggèrent donc que les deux espèces aient évolué indépendamment à La Réunion, à partir d'ancêtres distincts, l'un proche d'*A. conchoglossum* et l'autre d'*A. arachnithes*. Or, seul *A. conchoglossum* est actuellement présent à La Réunion. Toutefois, avant d'être récemment divisées en trois espèces distinctes (Hermans et Cribb, 2005), *A. arachnithes*, *A. conchoglossum* et *A. germinyanum* étaient connues sous une seule et même espèce, *A. germinyanum*.

La section *Angraecum*, représentée dans notre étude par *A. eburneum* et ses sous-espèces, *A. sororium*, *A. sesquipedale* et *A. florulentum* est pour sa part fortement divisée. Le complexe des *A. eburneum* forme néanmoins avec *A. sororium* un clade robuste (BP 100 ; PP 1.0). Cependant l'identification de l'individu d'*A. sororium* que nous avons séquencé n'a pas encore été totalement vérifiée par les spécialistes du RBG Kew.

La position d'*A. florulentum* est également problématique. L. Garay avait déjà remarqué son appartenance douteuse à la section *Angraecum* du fait de son appareil végétatif très différent de celui des autres espèces (Garay, 1973). Il suggéra que l'espèce trouverait une place plus satisfaisante parmi les *Arachnangraecum*. De la même façon, J. Stewart constata que l'espèce pouvait aussi bien appartenir à la section *Arachnangraecum*

qu'à celle des *Angraecum*, mais elle ne donna aucune conclusion (Stewart, 1980). Malheureusement, nos données moléculaires ne permettent pas de choisir l'une ou l'autre des sections *Arachnangraecum* ou *Angraecum* pour *A. florulentum*. L'espèce s'inscrit en effet dans le clade des « *Angraecum* à petites fleurs vertes » (voir ci-dessous) (BP 73 ; PP 1.0), bien que cette position douteuse ne fût retrouvée par aucune de nos analyses séparées. L'attraction artéfactuelle des branches terminales (21 transformations) s'avère une fois de plus l'explication la plus plausible pour interpréter la position incertaine d'*A. florulentum*. Enfin, à l'image d'*A. florulentum*, *A. sesquipedale* (comme nous l'avons vu) est extrêmement éloigné des autres membres de la section *Angraecum*, mais proche de celle des *Perrierangraecum*. Lors de la révision du genre entreprise par L. Garay, l'auteur fait néanmoins mention du singularisme d'*A. sesquipedale* parmi les espèces de la section *Angraecum*. *A. sesquipedale* présente en effet des inflorescences anormalement pauciflores, souvent réduites à une seule fleur (Garay, 1973).

Les espèces du genre *Angraecum* à « petites fleurs vertes »

A l'exception des espèces de la section *Angraecoides*, toutes les espèces du genre *Angraecum* qui présentent de fleurs vertes, verdâtres ou vert-jaunâtre sont réunies au sein d'un clade dont la monophylie est fortement soutenue (BP 100 ; PP 1.0). Les 18 espèces qui forment ce groupe solide sont représentées par 6 sections : *Boryangraecum*, *Chlorangraecum*, *Lepervancha*, *Lemurangis*, *Nana* et *Pectinaria*. Toutes ces sections sont caractérisées par des espèces à fleur vertes, à l'exception de la section *Pectinaria* qui regroupe normalement des espèces à fleurs blanches. Dans ce clade, la section *Pectinaria* est représentée par une espèce réunionnaise du cirque de Cilaos, *A. hermanni*. Dans notre phylogénie, la section *pectinaria* est illustrée par deux espèces africaines dans le clade II et l'espèce *A. pectinatum* dans le clade III. Indubitablement, *A. hermanni* est très en retrait

des espèces citées ci-dessus. Bien que l'inflorescence et le pédicelle de l'ovaire soient sessiles (caractères de la section *Pectinaria*), la couleur de ses fleurs jaune-verdâtre et sa position dans nos analyses (très isolée des autres membres de la section) rendent douteuse l'appartenance d'*A. hermanni* à la section *Pectinaria*. J. de Cordemoy rapprocha initialement *A. hermanni* d'*A. pingue* dans la section *Angraecoides* du genre *Mystacidium* (genre que R. Schlechter rétablit par la suite parmi les *Angraecum*, Schlechter, 1918). Cependant, J. de Cordemoy n'avait pas eu l'occasion d'en observer les fleurs. Sur la base des caractères morphologiques et moléculaires, *A. hermanni* pourrait être rattaché à la section *Lemurangis*, tout comme l'*Angraecum* sp. TP125 (BP 72 ; PP 1.0) récemment découverte à la Réunion, qui présente de la même façon de petites fleurs vertes, solitaires et sessiles.

La taxonomie des Angraecinae fut également empreinte de la couleur des fleurs dans le choix de la délimitation des genres, sections ou espèces. Néanmoins, le choix de la couleur n'est pas toujours évident selon les espèces : les nuances sont multiples, déclinant toutes les composantes possibles entre le vert et le blanc. Plusieurs espèces présentent en effet un dimorphisme de la couleur au sein des fleurs, avec en général sépales et pétales verts tandis que le labelle est blanc (i.e. *Dendrophylax* spp; *Oeonia* spp), voir tacheté de rouge dans le genre *Oeonia*. Les fleurs de la section *Arachnangraecum* peuvent également avoir des segments verdâtres ou blanc-vert. Toutefois, les espèces qui présentent de telles fleurs se distinguent en tous points des espèces dont les fleurs sont entièrement vertes ou vert-jaunâtre n'ayant aucun segment d'un blanc pur. Elles s'en distinguent d'autant plus que la pigmentation des segments floraux s'accompagne le plus souvent d'une modification de leur structure, charnue pour les fleurs blanches (à l'exception du genre *Aeranthès*) ; hyaline pour les fleurs vertes ou vert-jaunâtre. La Figure 19 illustre en ce sens les espèces dont les fleurs sont entièrement vertes et hyalines, par distinction à toutes celles

qui ont au moins un segment floral de couleur blanche et dont la structure est plus ou moins épaisse. En retraçant l'évolution de ce caractère sur l'hypothèse phylogénétique, la couleur blanche semble plésiomorphique pour les espèces étudiées (Figure 19). Le passage à couleur verte regroupe en général des espèces dont la monophilie est fortement soutenue, notamment dans le genre *Angraecum* : associé à la structure des pièces florales, ce caractère s'avère être l'un des moins homoplasiques utilisé dans la taxonomie des orchidées angraecoïdes.

Les caractères morphologiques qui permettent la distinction des nombreuses sections regroupant les « *Angraecum* à fleurs vertes » sont peu nombreux. Ils se résument le plus souvent à ceux définis par L. Garay dans la clé d'identification des différentes sections du genre (Garay 1973). La monophylie de la plupart des sections ne semble pas être vérifiée par les données moléculaires. Toutefois, notre échantillonnage est très incomplet. Aux Mascareignes, ces espèces discrètes sont également les moins connues. Le regroupement de trois espèces endémiques des Mascareignes (*A. costatum*, *A. obversifolium* et *A. sp.* TP110) (BP 81 ; PP 1.0) et celui d'*A. hermanni* et d'*A. sp.* TP125 (BP 72 ; PP 1.0), également endémiques, sont néanmoins intéressants à souligner. Ils suggèrent que des phénomènes de spéciation ont très certainement eu lieu chez ces petits *Angraecum*, rares pour la plupart, souvent inféodés aux forêts humides de montagne.

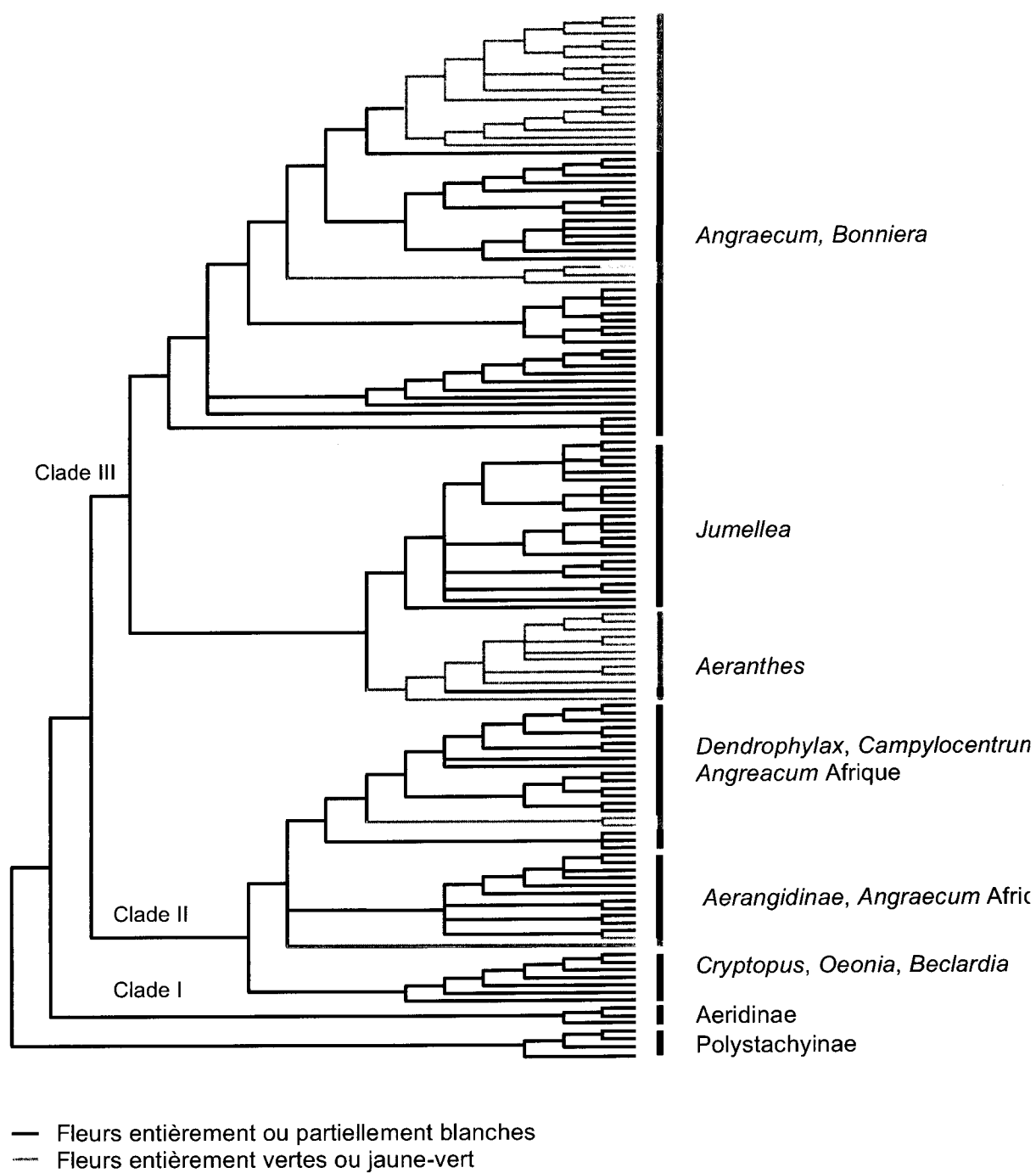


FIGURE 19. Hypothèse de l'évolution de la couleur des fleurs chez les orchidées angraecoïdes (arbre repris de la Figure 15).

4. BIOGEOGRAPHIE DES ANGRAECINAE

La biogéographie permet d'expliquer la distribution géographique des taxons (Ridley, 1996). Le recul évolutif inféré de l'analyse phylogénétique permet de mieux comprendre les événements de dispersion et de diversification des espèces, plus généralement, il offre une vision élargie de l'histoire évolutive du groupe. Deux hypothèses sont principalement envisagées lors des processus de spéciation liés à la biogéographie des espèces : vicariance et/ou dispersion. Dans le cas particulier des Mascareignes, de l'origine volcanique des trois îles, la vicariance au niveau de la colonisation de l'archipel peut être écartée. La capacité de dispersion des souches ancestrales a donc joué un rôle majeur dans la répartition actuelle des orchidées angraecoïdes des Mascareignes, du moins pour toutes les espèces qui n'ont pas connu de radiation *in situ* sur l'archipel.

4. 1. Colonisation des Mascareignes et radiation sur l'archipel

L'isolement géographique et l'origine volcanique des îles océaniques peuvent rendre complexe leur colonisation et l'établissement consécutif de populations par les espèces continentales, qui doivent à la fois requérir de fortes capacités de dispersion et d'adaptation aux nouveaux écosystèmes insulaires.

4. 1. 1. Mode de dispersion des graines chez les orchidées

Se différenciant hautement de la morphologie des autres monocotylédones, les graines d'orchidées ne possèdent ni gemmule, ni radicule, ni albumen nourricier (ou quelques rares cellules). Chaque graine est réduite à un massif de cellules peu nombreuses et indifférenciées, l'embryon, logé dans une fine enveloppe protectrice constituée de deux téguments minces et translucides (Roguenant et al., 2005). A maturité une capsule d'orchidée peut contenir jusqu'à plusieurs millions de ces graines, infiniment petites et extrêmement légères. Cette structure particulière assure aux orchidées la dissémination de leurs graines à des distances parfois considérables, le plus souvent par le vent (Dressler, 1981 ; Arditti et Ghami, 2000). La colonisation des trois orchidées indigènes de l'archipel Hawaïi, par exemple, située à plus de 3000 km du premier continent, montre la capacité de dissémination des orchidées à très longue distance (Dressler, 1981). Trois grandes voies de dispersion ont néanmoins été envisagées pour les orchidées : anémochorie²⁵, hydrochorie²⁶, ornithochorie²⁷, mais le vent reste certainement l'agent disséminateur dominant (voir à ce sujet la synthèse d'Arditti et Ghami, 2000).

Toutefois, bien que les graines d'orchidées confèrent l'avantage de dissémination à longue distance, la présence de l'élément fongique avec lequel l'espèce va former les mycorhizes indispensables à sa germination est nécessaire à l'établissement des individus pionniers lors de la colonisation de nouveaux territoires (Dressler, 1981).

²⁵Anémochorie : dispersion par le vent.

²⁶Hydrochorie : dispersion par l'eau.

²⁷Ornithochorie : dispersion par les oiseaux.

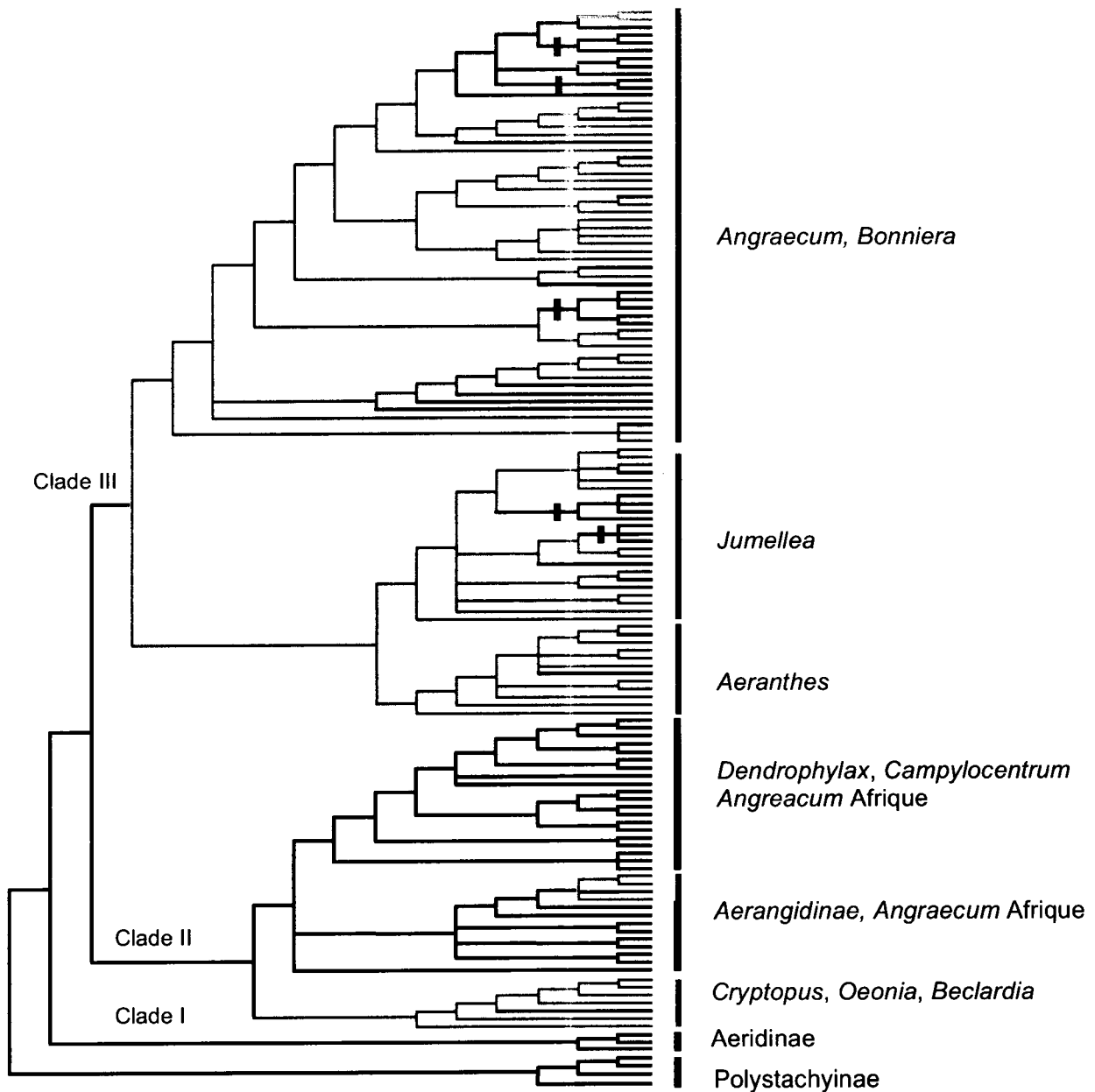
4. 1. 2. Les voies de colonisation de l'archipel des Mascareignes

Le sud-ouest de l'Océan Indien connaît une période cyclonique très marquée de novembre à avril, durant laquelle l'archipel des Mascareignes est sous l'influence de systèmes dépressionnaires pouvant évoluer en cyclone. Ces systèmes traversent en général l'Océan Indien d'Est en Ouest pour achever leur course sur les côtes de Madagascar. Toutefois, leur activité est aussi caractérisée par des trajectoires cycloniques surprenantes, pouvant alors prendre des directions inverses et ramener vers les Mascareignes des vents ayant côtoyés les terres malgaches. Tel est le cas par exemple du cyclone Katia en 1970 (Roberts, 2001) ou plus récemment de Hyacinthe en 1981 (Mayoka, 1998). Bien que d'autres voies de colonisation existent (courants marins, circulations atmosphériques en dehors des cyclones comme les courants *jet stream*, ornithochorie...), l'influence des systèmes cycloniques compte certainement pour beaucoup dans la colonisation de l'archipel par les organismes vivants.

4. 1. 3. Origine des Angraecinae des Mascareignes

T. Cadet a montré que plus de 80% des taxons indigènes des Mascareignes avaient une origine malgache ou africaine (Cadet, 1977). Pour D. Roberts, sept grands genres malgaches (*Angraecum*, *Bulbophyllum*, *Cynorkis*, *Habenaria*, *Jumellea*, *Liparis* et *Polystachya*) sont à l'origine de la majorité des orchidées de l'archipel, le genre le plus riche en nombre d'espèces étant le genre *Angraecum* (Roberts, 2001). La distribution géographique des espèces confrontée au support phylogénétique (Figure 20) confirme l'origine massivement malgache des Angraecinae réunionnaises, avec de nombreux événements de colonisation, suivis de nombreuses spéciations (fort taux d'endémisme), mais peu de radiations au sein de l'archipel ; l'émergence de lignées spécifiquement insulaires (trois espèces au maximum) s'est produite à deux reprises chez le genre

Jumellea, très certainement chez les *Angraecum* à petites fleurs vertes de la section *Lemurangis* et chez les *Angraecum* de la section *Hadrangis*.



- Réunion (endémiques)
- Madagascar (endémiques, incluant les espèces réunionnaises présentes à Madagascar)
- Afrique (endémiques, incluant les espèces malgaches et/ou réunionnaises présentes en Afrique)
- Diversification des espèces à La Réunion

FIGURE 20. Cartographie de la géographie des espèces sur le support phylogénétique (arbre repris de la Figure 15).

4.2. Hypothèse de scénario évolutif des Angraecinae-Aerangidinae

Concernant la sous-tribu Angraecinae, la synthèse des différents travaux permet de dresser un scénario hypothétique de la diversification du groupe. J. C. Arends et F. M. van der Lann, sur la base des données cytologiques, postulent une ascendance commune aux trois sous-tribus des Aeridinae, des Aerangidinae et des Angraecinae ; ils suggèrent que les formes ancestrales auraient été de la forme $x = 20$, soit un ancêtre proche des Polystachyinae actuelles, dont les espèces sont dominées par ce nombre basique de chromosomes (Arends et van der Laan, 1986). Ce postulat a été confirmé par l'outil moléculaire avec lequel il a été clairement démontré, à plusieurs reprises et avec des jeux de données différents, que la sous-tribu des Polystachyinae est à la base des Vandeeae, groupe-frère des trois autres sous-tribus (Chase et al., 2003 ; Freudenstein et al., 2004). Dans ce cas, comme le souligne M. W. Chase, le nom de la tribu est mal choisi : elle devrait être nommée en conséquence la tribu des Polystachyeae (Chase et al., 2003). Néanmoins, les espèces de la sous-tribu des Polystachyinae ont connu une radiation massive en Afrique (Dressler, 1993 ; la Croix et la Croix, 1997), apportant à l'hypothèse de départ l'origine géographique du centre de diversification de la tribu. Selon l'étude cytologique d'Arends et van der Laan (1986), le nombre basique de chromosomes des Aeridinae, des Aerangidinae et des Angraecinae a connu une évolution bidirectionnelle, avec des espèces ayant réduit ce nombre basique de chromosomes ($x = 17$ à $x = 19$; $x = 19$ étant le nombre dominant), ou au contraire l'ayant augmenté ($x = 21$ à $x = 27$). Les espèces proches de $x = 20$, soit $x = 19$ ou $x = 21$ sont considérées comme les formes ancestrales. Parmi elles, les espèces de la sous-tribu des Aeridinae et la majorité des espèces des Angraecinae malgaches sont caractérisées par un nombre basique de chromosomes de $x = 19$, suggérant la diversification ancienne des espèces et une grande affinité entre les taxons

asiatiques et malgaches (Arends et van der Laan, 1986) ; les espèces représentées par $x = 21$ ou $x > 20$ sont quant à elles principalement africaines (i.e. les Aerangidinae : $x = 21$ à $x = 27$, certaines espèces africaines du genre *Angraecum* : $x = 21$ à $x = 25$) ou du continent américain, bien que la cytologie des espèces sud-américaines ait très peu été investie : une seule espèce *Dendrophylax funalis* a été étudiée ; aucune du genre *Campylocentrum* (B. Carlswald, communication personnelle). Or, toutes les espèces caractérisées par $x > 20$ ont en commun sur notre phylogénie, leur rapprochement avec des espèces du genre *Angraecum*. De la même façon, les espèces à $x = 17$ ou $x = 18$ sont représentées par deux genres africains, *Ossiculum* et *Calypstrochilum*, ayant tous deux des affinités morphologiques avec le genre *Angraecum* (Cribb et van der Laan, 1986 ; la Croix et la Croix, 1997). *Angraecum* est donc certainement un très vieux genre, s'étant différencié très tôt dans l'histoire évolutive du groupe. Il semble en effet être à l'origine de la diversification des genres sud-américains, de celle des Aerangidinae (en excluant probablement *Beclardia*), des deux genres *Ossiculum* et *Calypstrochilum* en Afrique (proximité morphologique) et enfin des genres *Aeranthus* et *Jumellea* à Madagascar. L'implication de l'extraordinaire radiation des espèces du genre *Angraecum* dans la taxonomie du groupe est considérable : bien que les espèces forment un groupe plus ou moins homogène, comment rendre compte de la dimension phylogénétique dans la délimitation du genre et de ceux dont il semble être à l'origine ? Notre étude est préliminaire et reste incomplète : une révision élargie de l'ensemble des deux sous-tribus, incluant la cytologie, la morphologie et la phylogénie des espèces s'avère nécessaire. Enfin, parmi les autres genres de la sous-tribu des Angraecinae inclus dans notre jeu de données, la lignée des genres *Cryptopus*, *Oeonia* et certainement *Beclardia*, caractérisé pour le genre *Cryptopus* par un nombre basique de chromosomes de $x = 19$, semble également s'être différenciée assez tôt dans la sous-tribu, mais indépendamment des formes

ancestrales du genre *Angraecum*, avec lequel elle ne partage pas d'ancêtres communs relativement proches.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de cette étude était de tester la monophylie de la sous-tribu des Angraecinae parmi les Vandae. L'inclusion des Aerangidinae au sein des Angraecinae y répond négativement.

Le deuxième objectif était de vérifier la monophylie du genre *Angraecum* et de ces différentes sections. De la même façon, les inclusions des genres sud-américains, de ceux de la sous-tribu des Aerangidinae, des genres *Jumellea* et *Aeranthes* répondent négativement à la question. De ce fait, la majorité des sections reconnues par L. Garay ne forme pas non plus de groupes naturels (Garay, 1973). Depuis sa création par J.-B. Bory de Saint-Vincent en 1804, la délimitation difficile du genre *Angraecum* a rendu complexe le devoir de classification des taxonomistes. Les difficultés posées par ce grand genre se situent notamment dans la délimitation de ses sections dont les frontières ne sont pas toujours claires, trop proches ou trop ambiguës pour permettre à chaque espèce d'y trouver une place satisfaisante (Garay, 1973 ; Stewart, 1980). Il est vrai également que la délimitation des sections repose sur très peu de caractères, d'autant moins fiables que l'étude de l'histoire évolutive des orchidées a montré leur plasticité et leur grande variabilité (taille des fleurs ou longueur de l'épéron par exemple).

Nous nous interrogeons également sur les relations phylogénétiques des genres à l'intérieur des Angraecinae, et notamment sur la position du genre *Bonniera*. Nos résultats suggèrent que le genre *Bonniera* n'est pas monophylétique, l'origine des espèces étant liée à la mutation en une forme pélorique d'individus du complexe des « *Angraecum germinyanum* ».

Cette étude reste préliminaire et le scénario évolutif inféré, une hypothèse. Toutefois, elle nous permet d'envisager la direction qu'elle pourrait suivre par la suite. Sur la base des résultats que nous avons obtenus, il serait souhaitable de poursuivre le séquençage des régions étudiées en incluant dans la matrice combinée un plus grand nombre de taxons, en particulier les espèces des deux genres *Ossiculum* et *Calypstrochilum*, afin de vérifier s'ils partagent un ancêtre commun avec les espèces africaines du genre *Angraecum*. L'addition d'un représentant de chaque genre de la sous-tribu des Aerangidinae permettrait également de tester plus solidement la monophylie de ce groupe, dont le nombre basique de chromosomes présente une corrélation intéressante avec les données moléculaires. Il serait utile en ce sens de poursuivre l'investigation cytologique du groupe, notamment celle des espèces du genre *Beclardia* afin de déterminer sans aporie l'inclusion ou non de ce genre parmi les Aerangidinae. Notre étude reposait sur le séquençage de régions chloroplastiques, mais elle mériterait d'être complétée par le séquençage de gènes nucléaires. Enfin, l'étude cladistique d'une matrice de caractères morphologiques permettrait de mieux identifier les caractères homologues du groupe et les synapomorphies des clades inférés.

Les études menées sur la morphologie, la cytologie ou la phylogénie des orchidées « angraecoïdes » demandent donc d'être approfondies. Elles permettront de définir avec satisfaction quel est le sens à donner à la taxonomie du groupe : faut-il redéfinir le genre

Angraecum et les sections qui lui sont associées ? Faut-il redéfinir les sous-tribus des Angraecinae et des Aerangidinae ?

Enfin, nous avons vu que les espèces des Mascareignes trouvent leurs plus proches parentes à Madagascar, suggérant une origine principalement malgache de la sous-tribu dans l'archipel. Malgré le nombre important d'espèces présentes aux Mascareignes, (notamment à La Réunion) et leur fort taux d'endémicité, notre hypothèse phylogénétique suggère que peu de radiations ont eu lieu *in situ* à La Réunion. Les facteurs qui gouvernent et déterminent la spéciation et/ou le maintien d'une espèce suite à la colonisation des îles océaniques sont nombreux, intrinsèques (mode de reproduction, potentiel génétique) ou extrinsèques (faune pollinisatrice, écologie, climat) à l'espèce colonisatrice. Parmi ces facteurs, la capacité de s'adapter et de se maintenir dans un nouvel environnement est grandement liée au succès reproducteur de l'espèce dont la descendance permettra le fondement d'une nouvelle population, voire d'une nouvelle espèce, voire d'une nouvelle lignée. Si le mode de dispersion des graines détermine le succès de la colonisation des îles, les systèmes et les modes de reproduction, la présence ou non du groupe fonctionnel de pollinisateurs à l'arrivée des espèces pionnières et la capacité de s'adapter aux nouvelles pressions écologiques imposées par le milieu détermineront notamment le succès de la survie et de la perpétuation de l'espèce dans l'île colonisée. L'étude de la biologie reproductive des Angraecinae réunionnaises est donc l'objet du chapitre suivant. Cette étude a pour but de comprendre et d'expliquer les particularismes de la reproduction des espèces insulaires qui auraient favorisé leur radiation ou au contraire qui auraient influencé leur non-diversification sur l'archipel, dans une vision élargie et comparative de leurs homologues malgaches.

CHAPITRE II

IMPLICATIONS DE LA RELATION PLANTE-POLLINISATEUR DANS L'EVOLUTION DES FORMES FLORALES REUNIONNAISES :

EXEMPLES DU GENRE *JUMELLEA* ET DE LA SECTION *HADRANGIS* DU GENRE *ANGRAECUM*.

« Si quelqu'un veut sérieusement
rechercher la vérité, il ne doit pas faire le choix
d'une science particulière ; elles sont toutes
unies entre elles et dépendent les unes des
autres. Qu'il pense seulement à accroître la
lumière de sa raison. »

Descartes (cité par E. Morin, 2001).

1. INTRODUCTION

La reproduction assure la survie, la continuité et l'expansion des espèces. Elle est l'ensemble des processus par lesquels un organisme perpétue ses gènes. Chez les organismes pluricellulaires, la capacité à la reproduction est l'aboutissement de la différenciation d'une partie des cellules en cellules sexuelles hautement spécialisées, les gamètes, dont la fécondation permet la naissance d'un nouvel individu (embryons contenus dans les graines chez les végétaux). La sexualité, création de nouveaux génomes, semble le moteur de l'histoire évolutive de la vie sur terre (Richards, 1997). Lorsqu'elle fait intervenir deux partenaires, elle est l'une des plus formidables sources de recombinaison génétique. Grâce aux possibilités infinies de brassage de gènes lors de la méiose et de la fécondation, tout zygote possède un patrimoine génique unique. La transmission de gènes d'une génération à la suivante assure le maintien de l'intégrité génétique de l'espèce, tout en permettant les possibilités de nouveauté et d'évolution par mutations génétiques. Le siège de la sexualité chez les angiospermes est la fleur. Hermaphrodite ou unisexuée, les angiospermes semblent avoir exploré « toutes » les sexualités...

ENCADRE 4. LES DIFFERENTS TERMES DE LA SEXUALITE VEGETALE...	
AUTOCOMPTABILITE	Capacité physiologique d'une espèce à produire des fruits et des embryons viables à partir d'autofécondations.
ALLOGAMIE	Mode de reproduction sexuée issu de fécondations croisées
AUTOGAMIE	Mode de reproduction sexuée issu d'autofécondations.
AUTOPOLLINISATION	Pollinisation spontanée du stigmate d'une fleur par son propre pollen, sans aucun vecteur pollinique (<i>sensus</i> Catling, 1990). Le terme anglais <i>self-pollination</i> , traduit <i>self-pollinisation</i> ici, réfère la pollinisation d'une fleur par son propre pollen, mais par l'action d'un pollinisateur.
AUTOFECONDATION	Fécondation de gamètes mâle et femelle produits par un même individu (correspond au terme anglais <i>self-fertilization</i> <i>sensus</i> Lloyd et Schoen, 1992). S'oppose à fécondation croisée ou allofécondation (voir ce mot)
AUTOFERTILITE	Utilisé ici comme la capacité d'une espèce à se reproduire par autopolinisations.
FECONDATION CROISEE OU ALLOFECONDATION	Fécondation de gamètes mâle et femelle produits par deux individus distincts (correspond au terme anglais <i>cross-fertilization</i> <i>sensus</i> Lloyd et Schoen, 1992). S'oppose à autofécondation (voir ce mot)
FECONDATION	Fusion, chez les êtres organisés, des gamètes mâle et femelle en une cellule unique.
GEITONOGAMIE	Forme d'autofécondation chez laquelle le stigmate d'une fleur est pollinisé par le pollen d'une autre fleur, mais du même individu.
CLEISTOGAMIE	Autopollinisation particulière de fleurs dont la corolle ne s'ouvre pas.
SYSTEMES DE REPRODUCTION	Modalités de distribution spatio-temporelle des organes sexuels : hermaphrodisme (organes mâles et femelles au sein de la même fleur), monoécie (fleurs unisexuées portées par le même individu), dioécie (fleurs unisexuées portées par deux individus différents)...
REGIME REPRODUCTEUR	Modalités de croisements des individus d'une espèce ou d'une population : allogamie, autogamie, ...

La dispersion des grains de pollen jusqu'au stigmate définit la pollinisation. Lorsqu'elle s'opère entre deux individus (allopollinisation) elle permet la reproduction croisée, favorisant l'allogamie²⁸ au sein de la population (Encadré 4). La reproduction croisée permet l'échange de gènes entre individus. Outre les nouveautés permises par les mutations génétiques, la combinaison de gènes favorables assure la variabilité essentielle à l'adaptation aux changements constants des conditions environnementales (Richards, 1997). En conséquence, l'allogamie est souvent maximisée chez les végétaux supérieurs par le développement de nombreux mécanismes visant à favoriser le croisement intraspécifique et/ou à limiter les possibilités d'autofécondations. Ces mécanismes sont liés aux systèmes de reproduction, à la compatibilité et aux protagonistes de la pollinisation. La démarche inférentielle de l'étude des modes de reproduction est double : (1) formuler des hypothèses *a priori* sur la dynamique génétique d'une population (Hamrick, 1982 ; Hamrick et Godt, 1997 ; Richards, 1997) : les possibilités d'autofécondations variées (autopollinisation, autofécondations par géitonogamie, *self-pollination*) entraînant peu ou pas de variabilité génétique (e.g. Scacchi et al., 1991), mais aussi (2) déterminer si l'espèce requière l'aide de pollinisateurs pour se reproduire : les espèces autofertiles et/ou cléistogames en sont souvent affranchies.

²⁸ Tous les termes liés à la reproduction sont définis dans l'encadré 4.

1. 1. Reproduction des Orchidées : état des connaissances

En Europe, l'organisation générale de la fleur d'orchidée fut réellement comprise et interprétée par M. Adanson et B. de Jussieu à la fin XVIII^e siècle (Roguenant et al. 2005). La reproduction est restée longtemps un grand mystère. Cependant, l'avancement des connaissances, les ouvrages de référence (e.g. van der Pijl et Dodson, 1966 ; Dressler, 1981, 1993 ; van der Cingel, 2001), les multiples synthèses sur les particularités de la reproduction des orchidées permettent d'en dresser les principales conclusions (e.g. Nilsson, 1992 et notamment Tremblay et al., 2005) :

1. 1. 1. Les mécanismes qui favorisent l'autogamie et leurs conséquences

- Hermaphrodisme et autocompatibilité

Les fleurs d'orchidées sont typiquement hermaphrodites, permettant *a priori* les possibilités d'autopollinisations, si l'espèce est autocompatible. L'autocompatibilité en effet autorise l'autofécondation et la possibilité éventuelle de reproduction sexuée chez une plante isolée. Pour la même raison, les individus autocompatibles sont avantagés lors des processus de colonisation à longue distance et d'établissement de nouvelles populations dans les îles (i.e. « loi de Baker », Baker, 1955, 1967 ; Stebbins, 1970). L'autocompatibilité est majoritaire chez les orchidées (Dressler, 1993 ; Tremblay et al., 2005). Bien que la production de fruits soit légèrement meilleure lorsqu'ils sont issus d'allofécondations, l'autofécondation ne semble pas avoir d'impacts réellement négatifs sur le nombre de fruits produits. Elle affecterait davantage la quantité et la qualité (viabilité) d'embryons produits (Tremblay et al., 2005).

- Autofertilité

La faculté d'autopollinisation n'est pas rare chez les orchidées. Elle concerne 10 à 15% des espèces (Dressler, 1993). Elle peut être partielle ; son expression dépend alors de la fréquence des visites de la faune pollinisatrice (e.g. Catling 1990 ; Scacchi et al., 1991). Elle s'accompagne néanmoins, dans la majorité des cas, de l'affranchissement total de pollinisateurs (van der Pijl et Dodson, 1966 ; Catling, 1990). La distribution des espèces autofertiles n'ayant pas recours aux pollinisateurs est à la fois corrélée au gradient latitudinal (e.g. Régions boréales : 50% ; Europe : 27 à 50% ; Canada : 17%, Catling, 1990 ; Tremblay et al., 2005) et au gradient altitudinal (e.g. Australie du sud-est : 25% Catling, 1990). L'augmentation d'espèces autofertiles avec l'altitude est expliquée par la baisse de la diversité de l'entomofaune dans les milieux élevés et froids (van der Pijl et Dodson, 1966 ; Catling, 1990 ; Dressler, 1993). En conséquence l'autofertilité est plus représentée chez les espèces terrestres et notamment chez la majorité des espèces mycohétérotrophes²⁹ (Dressler, 1993). Elle peut être également abondante dans les milieux insulaires, conséquence de l'absence possible des pollinisateurs effectifs de la souche immigrante (Dressler, 1993). L'autofertilité a évolué de façon récurrente dans toutes les grandes lignées des orchidées (i.e. sous-familles) (Catling, 1990), bien que R. Dressler constate sa répartition inégale, moindre chez les groupes connus pour leurs interactions multiples avec les pollinisateurs comme celui des Vandaeae (0,3%). Les mécanismes de l'autopollinisation sont nombreux (voir Catling, 1990) incluant certaines modifications structurales comme la déliquescence du rostellum. Chez *Liparis loeselii*, elle est assistée de la pluie (Catling, 1980).

²⁹ Les plantes mycohétérotrophes sont approvisionnées en carbone par leurs champignons mycorhiziens. Elles sont généralement dépourvues de chlorophylle.

L'autofertilité confère l'assurance reproductive aux espèces (Hagerup, 1952 ; Jain, 1976, cité par Tremblay et al., 2005), une meilleure fécondité (77% en moyenne, Tremblay et al., 2005) et l'indépendance vis-à-vis des agents de la pollinisation notamment sur la limitation de la reproduction (Tremblay et al., 2005). En revanche, elle favorise à courts termes la dépression de consanguinité et l'absence de descendance liée à l'expression d'allèles létaux (Tremblay et al., 2005). Après la purge d'allèles délétères, l'autopollinisation entraîne la stigmatisation des formes florales défavorisant les possibilités d'adaptation et d'évolution de l'espèce.

L'autofertilité entraîne le plus souvent une réduction du coût de la reproduction. Ainsi, les formes florales autofertiles sont en général caractéristiques, représentées par de petites fleurs pâles, peu colorées, sans structures spécialisées, comme la forme pétaloïde du labelle ou l'éperon court ou absent. Les traits associés à l'attraction des pollinisateurs comme l'odeur ou la production de nectar sont eux aussi souvent réduits (Catling, 1990).

- Géitonogamie

La géitonogamie est une forme « cachée » d'autofécondation, certainement la plus difficile à quantifier. Paradoxalement elle est liée au comportement des pollinisateurs, dont la relation poussée dans la famille est perçue comme le moteur de la reproduction croisée. Son impact est certainement sous-estimé car elle a les propriétés écologiques de l'allofécondation mais les conséquences génétiques de l'autofécondation (Lloyd et Schoen, 1992). La tromperie ou certaines structures du pollinaire³⁰ (cf. ci-dessous) la minimisent néanmoins.

³⁰ Rappel : le pollinaire est constitué des pollinies, caudicules (ou stipes) et viscidium (cf Figure 2).

Malgré les diverses possibilités de l'autofécondation, l'allogamie est souvent sélectionnée sur le long terme (Roberts, 2003 ; Tremblay et al., 2005). En conséquence les mécanismes autorisant les croisements intraspécifiques ont été régulièrement favorisés au cours de l'histoire évolutive de la famille (Roberts, 2003) :

1. 1. 2. Les mécanismes qui favorisent l'allogamie et leurs conséquences

- Herchogamie³¹ et séparation temporelle des sexes

Hermaphrodites mais aussi herchogames, l'allopollinisation est permise chez les orchidées par la différenciation d'un obstacle mécanique, le rostellum, permettant la séparation spatiale des pollinies de la cavité stigmatique. Celui-ci résulte de la modification de l'un des trois lobes du stigmate (Dressler, 1993). Malgré l'herchogamie dominante, de rares cas de fleurs unisexuées ont été observés (monoécie ou quasi-dioécie) dans les genres *Catasetum*, *Cycnoches* et *Mormodes* (Dressler, 1993) et chez *Satyrium ciliatum* (Chen, 1979, cité par Dressler, 1993). La détermination du genre sexuel est en partie sous contrôle des conditions environnementales, notamment de la disponibilité des ressources. Il en résulte une grande plasticité de l'expression des sexes (e.g. Zimmerman, 1980). Enfin, chez certaines espèces, la fonctionnalité du stigmate n'est permise que par le prélèvement du pollinaire, constituant une forme de protandrie³² (Romero, 1990 cité par Roberts, 2001).

³¹ Herchogamie : caractéristique d'une fleur hermaphrodite dans laquelle un obstacle s'oppose au dépôt de son propre pollen sur son stigmate (séparation spatiale des sexes) (Roguenant et al., 2005)

³² Protandrie : maturité fonctionnelle des organes mâles avant celle des organes femelles.

- Auto-incompatibilité

L'auto-incompatibilité est l'un des systèmes les plus efficaces avec la dioécie pour assurer la sexualité entre deux partenaires. Elle concernerait au moins 10% des espèces, les Epidendroideae principalement (Dressler, 1993 ; Johansen, 1990), mais peu de données existent (Tremblay et al., 2005). Les mécanismes empêchant l'autofécondation ne sont pas clairement identifiés (Tremblay et al., 2005). Ils se situeraient au niveau de l'inhibition de la croissance du tube pollinique par des processus biochimiques (Dressler, 1993). La production de fruits chez les espèces auto-incompatibles est extrêmement faible, certainement corrélée à la non-formation de fruits issus de géitonogamie (Tremblay et al., 2005).

- Structure du pollinaire

La morphologie du pollinaire présente certaines caractéristiques favorisant la fécondation croisée. L'innovation majeure concerne l'évolution de l'aggrégation du pollen en structure hautement spécialisée plus ou moins complexes, les pollinies³³ (voir Figure 2). Leur rôle dans l'efficacité de la pollinisation est considérable : transport facilité, fécondation d'un grand nombre d'ovules en un minimum de visites des pollinisateurs (Johnson et Edwards, 2000 ; Tremblay et al., 2005), mais contrairement à la plupart des autres fleurs pour lesquelles le pollen peut être disséminé un grand nombre de fois, la fonction mâle chez les orchidées est souvent limitée, du fait de la structure même du pollinaire.

³³ Cette structure pollinique particulière existe également chez les Asclepiadaceae.

L'abaissement retardé des pollinies³⁴ ou la surface hautement adhésive du viscidium permettent d'éviter particulièrement la géitonogamie (voir la synthèse de Johnson et Edwards, 2000 pour la description détaillée des différents mécanismes).

- Les pollinisateurs nécessaires à la production de fruits

Si l'allogamie est permise par l'herchogamie, elle est possible grâce à l'intervention obligatoire d'un vecteur de pollen, le plus souvent animal. Ces agents polliniques sont responsables du succès reproducteur des espèces selon la fonction mâle, mesurée par le biais du nombre de pollinies prélevées et selon la fonction femelle, quantifiée par le nombre de fruits produits (l'incidence de la disponibilité des ressources sur le succès reproducteur de la fonction femelle semble moindre dans la famille, Zimmerman et Aide, 1989 ; Tremblay et al., 2005). Mais les pollinisateurs vont également déterminer la qualité de la reproduction, c'est-à-dire l'autogamie *versus* l'allogamie. Leur incidence sur l'histoire évolutive de la famille est donc extrêmement importante (Tremblay et al., 2005) : il est aujourd'hui clairement admis que le succès reproducteur des individus est principalement limité par les pollinisateurs (Tremblay et al., 2005). Les principales conséquences sont un nombre très restreint de fruits produits et une baisse de la taille effective des populations, aboutissant à la double inférence de la dérive génétique et de la sélection naturelle dans la diversification de la famille (cf. Introduction générale).

Parmi les pollinisateurs identifiés, l'ordre des insectes et son cortège d'espèces est de loin le plus important. Les insectes interviennent dans la pollinisation de

³⁴ Pour certaines espèces, le dépôt de pollen n'est permis que si les pollinies ont une position précise sur le corps du pollinisateur, soit lorsque les caudicules, en se déséchant, se courbent vers l'avant. Ceci a lieu après un moment suffisamment long pour empêcher les pollinisateurs de féconder les fleurs d'un même individu (géitonogamie).

plus de 75% des espèces (Rogucnant et al., 2005). Lépidoptères (papillons de jour et de nuit), hyménoptères, diptères ou coléoptères, leurs motivations sont variables et les formes florales qui en résultent tout autant. Beaucoup moins conséquente, la pollinisation par les oiseaux est effective chez environ 3% des espèces (van der Pijl et Dodson, 1966). Le succès reproducteur est différent selon les groupes de pollinisateurs. Les plus « efficaces » sont les oiseaux (taux de fécondité de 54%, Tremblay et al., 2005), suivi des papillons de nuit (42%). Par opposition, la pollinisation par les mouches (myophilie) est parmi la moins efficace (12%) (Tremblay et al., 2005).

L'inférence de l'interaction plante-pollinisateur se situe donc au niveau du succès reproducteur et directement (sélection naturelle) ou indirectement (dérive génétique, puis sélection) au niveau de la diversité des formes florales, dont la spécialisation a permis la maximisation de la pollinisation (Johnson et Steiner, 2000). Van der Pijl et Dodson (1966), puis van der Cingel (2001) ont décrit les principaux syndromes floraux des orchidées ; parmi les plus caractérisés, les syndromes sphingophiles et ornithophiles. Les conséquences du changement de pollinisateurs sur l'expression des traits floraux et sur la radiation des espèces ont particulièrement été étudiées en Afrique du Sud par S. D. Johnson dans les genres *Disa* (Steiner et al., 1994 ; Johnson et Steiner, 1997 ; Johnson et al., 1998a,b) et *Satyrium* (Johnson, 1997a,b ; Johnson et Kurzweil, 1998 ; Ellis et Johnson, 1999). Les nombreux travaux de L. A. Nilsson, J. Ackerman, R. Tremblay et E. L. Borba ont permis une meilleure compréhension du rôle des pollinisateurs dans le succès reproducteur des espèces épiphytes ou terrestres des milieux tropicaux (e.g. Ackerman et Montero, 1985 ; Ackerman, 1989 ; Ackerman et Montalvo, 1990 ; Nilsson et

al., 1985, 1987; Rodríguez-Robles et al., 1992 ; Ackerman et al., 1994, 1996 ; Tremblay, 1997a, b ; Borba et Semir, 1998 ; Tremblay et al., 1998 ; Salguero-Farías et Ackerman, 1999 ; Borba et al., 1999 ; Borba et Semir, 1999, 2001 ; Borba et al., 2001a, b ; Borba et al., 2002, voir aussi Lehnebach et Robertson, 2004...). Si l'extraordinaire diversification des orchidées épiphytes a été attribuée à leurs systèmes de pollinisation hautement spécialisés, les mécanismes de radiation liés à un changement de pollinisateurs sont globalement moins connus chez les espèces tropicales (voir néanmoins Borba et Semir, 2001). Le rôle des pollinisateurs pourrait être particulièrement important dans la diversification de la sous-tribu des Laeliinae (Epidendreae) (Amérique tropicale) dont les espèces interagissent avec différents groupes de pollinisateurs (abeilles, guêpes, sphinx, colibris, mouches, Dressler, 1993).

- La tromperie

Près d'un tiers des espèces sont « trompeuses » ou « tricheuses » (Ackerman, 1986b) ; elles n'offrent aucune récompense à leurs pollinisateurs, comme le nectar riche en sucre ou le pollen. Les particularités de la reproduction des orchidées trompeuses ont fait l'objet de plusieurs synthèses (e.g. Ackerman, 1986b ; Nilsson, 1992 ; Johnson et Nilsson, 1999 ; Cozzolino et Widmer, 2005). Les formes de tromperie sont très variées (Ackermann, 1986b), les plus courantes sont la pseudocopulation, la défense territoriale (les fleurs miment un intrus contre lequel l'insecte tente de se défendre) et la tromperie alimentaire avec ou sans modèle, le modèle étant une espèce nectarifère dont les fleurs (couleur, forme) sont mimées par l'espèce trompeuse (voir par exemple Nilsson, 1983 et Johnson, 1994). L'évolution de la tromperie est restée

longtemps énigmatique, suscitant débats et questionnements (Cozzolino et Widmer, 2005). La perte de récompense induit en effet une attraction moindre des pollinisateurs et par conséquent une production de fruits plus faible comparée à celle des espèces nectarifères (Neiland et Wilcock, 1998 ; Tremblay et al., 2005). Pourquoi dans ce cas, la tromperie serait-elle sélectionnée ? Une des nombreuses hypothèses proposées argue en faveur d'un avantage à l'allogamie (Johnson et Nilsson, 1999 ; Johnson et al, 2004, voir aussi Cozzolino et Widmer, 2005) : les pollinisateurs adoptent en effet un comportement différent selon qu'ils butinent des fleurs nectarifères ou déceptrices. Ils s'attardent plus longuement sur les inflorescences des plantes qui leur offrent la récompense recherchée, maximisant ainsi la collecte du nectar. Ce comportement particulier favorise l'autofécondation des fleurs par géitonogamie. La géitonogamie sera en outre moindre chez les espèces trompeuses, sur l'inflorescence desquelles les pollinisateurs déçus (mais pas stupides !) ne s'attarderont pas.

1. 2. Objectifs et plan du chapitre

Les orchidées angraecoïdes sont connues pour leur syndrome de pollinisation typiquement lépidoptérophile. Malgré la richesse exceptionnelle des représentants de la sous-tribu des Angraecinae et dans une moindre mesure de celle des Aerangidinae à Madagascar, très peu d'études ont été réalisées sur les interactions interspécifiques de ces orchidées avec la faune pollinisatrice. Toutes les investigations menées ont en outre été focalisées sur les espèces à long ou à très long éperon (Nilsson et al., 1985, 1987 ; Nilsson et Rabakonandrianina, 1988 ; Wasserthal, 1997). Nilsson et al. (1987) estiment qu'environ 10% (plus de 70 espèces) de la flore « orchidéenne » malgache sont représentés par les orchidées à très long éperon (> 80 mm). Sur l'île de La Réunion, les orchidées dont l'éperon dépasse 80 mm existent elles aussi, mais elles restent minoritaires : elles concernent une espèce indigène également présente à Madagascar (*Angraecum conchoglossum*), une espèce endémique des Mascareignes (*Jumellea recta*) et six espèces endémiques de La Réunion (*Aerangis* sp., *Angraecum cornigerum*, *Jumellea divaricata*, *J. exilis*, *J. recurva* et *J. stenophylla*). Les espèces à très long éperon représentent ainsi moins de 5% des orchidées de l'île. Le patron de distribution des formes florales à La Réunion en ce qui concerne le cas particulier des orchidées sphingophiles à très long éperon est donc très différent de celui de Madagascar, la grande île étant caractérisée par un nombre d'espèces à très long éperon plus important proportionnellement au nombre total d'orchidées que sa flore renferme. La distribution du nombre d'espèces en fonction de la taille de l'éperon, différente de la grande île à La Réunion suit particulièrement ce schéma dans le genre *Angraecum* (Figure 21).

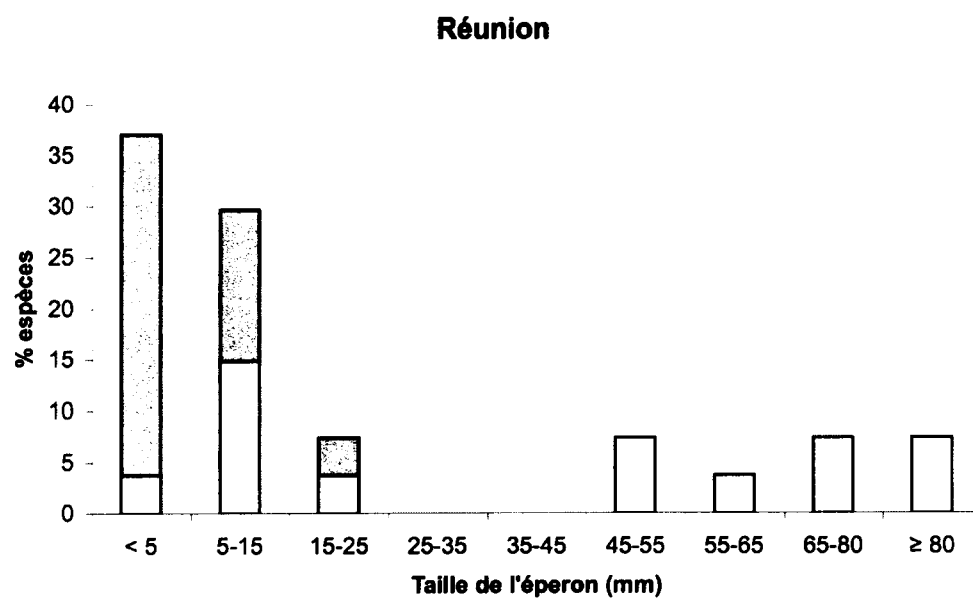
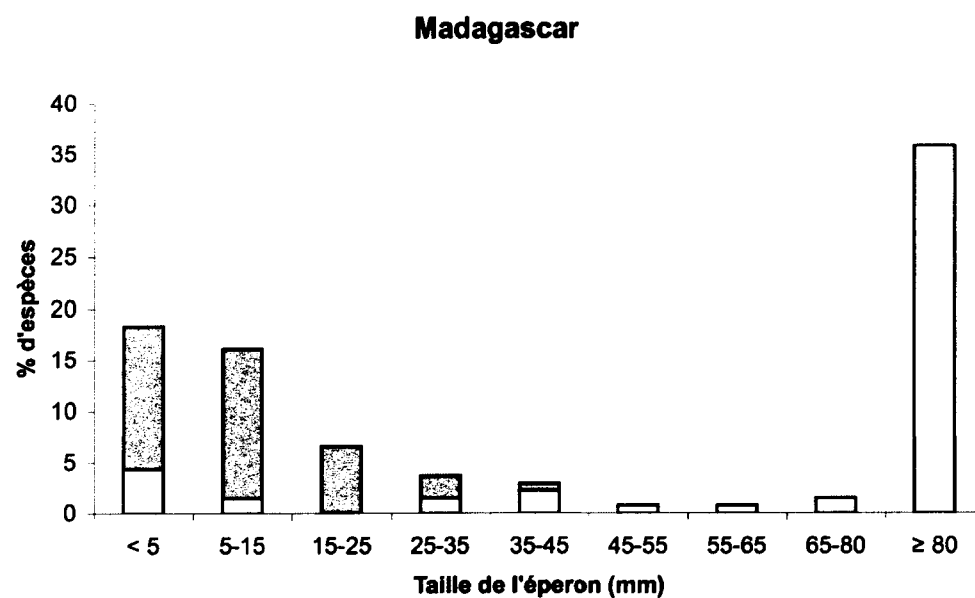


FIGURE 21. Distribution des espèces du genre *Angraecum* en fonction de la taille de l'éperon et de la couleur des fleurs (gris : fleurs vertes ; blanc : fleurs blanches).

Parallèlement à la présence d'orchidées à long ou à très long éperon, près de 60 espèces de sphinx ont été identifiées à Madagascar. Ces lépidoptères y sont en majorité endémiques (Griveaud, 1959 ; Carcasson, 1967 cités par Nilsson et al. 1987) et présentent un long proboscis caractéristique (Nilsson et al. 1987). À la Réunion, 13 espèces de sphinx sont connues, espèces indigènes également présentes à Madagascar ou en Afrique (Guillermet et Guillermet, 1986).

Le genre *Jumellea* pour lequel les espèces à long éperon sont en revanche majoritaires à la Réunion est particulièrement intéressant. Ce genre est représenté par neuf espèces sur l'île : cinq d'entre elles ont des éperons supérieurs à 80 mm, tandis que chez les quatre autres, ils sont inférieurs à 50 mm. Or, seules les espèces à court éperon (que nous nommerons par la suite les espèces brévicarces³⁵) se sont différenciées aux Mascareignes, les clades *J. aff stipitata* – *J. fragrans* et *J. triquetra* – *J. aff rossii*, constituant deux des rares cas de radiations sur l'archipel. À l'inverse, les cinq espèces à long éperon sont toutes issues d'événements de colonisation distincts (Figure 22).

³⁵ Latinisme pour désigner les fleurs à court éperon (*calcar* en latin signifie éperon) (par opposition, les fleurs à long éperon seront qualifiées « longicalcares »).

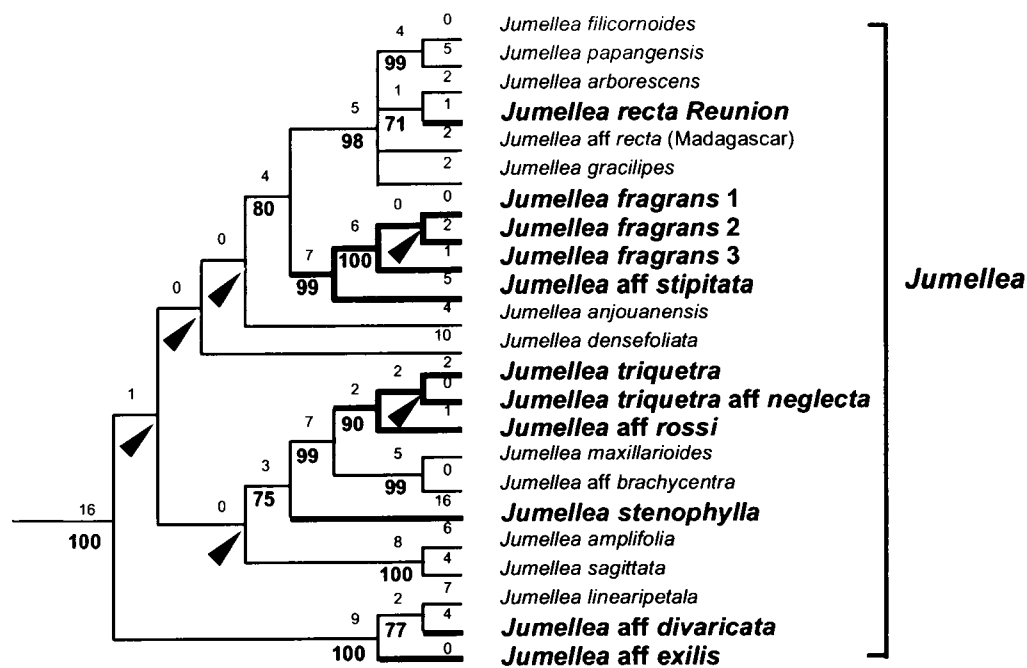


FIGURE 22. Phylogénie du genre *Jumellea* (arbre repris de la Figure 13). En gras, les espèces uniquement présentes à La Réunion ; en rouge, les espèces à long éperon (> 80 mm) ; en noir, les espèces à court éperon (< 50 mm).

Les espèces malgaches à long éperon ont bénéficié de l'attention particulière des biologistes évolutionnistes (e.g. Darwin, 1862 ; Nilsson, 1988, 1992). Leurs interactions avec les Sphingidés ont alimenté l'actualité scientifique de débats passionnés dont ont émergé de nouveaux enjeux dans la compréhension des relations interspécifiques et de leurs conséquences sur les processus de spéciation (« *coevolution race* » versus « *pollinator shift* »). Pourtant, les formes florales dans la sous-tribu sont diverses (Perrier de la Bâthie, 1941). Les espèces à petites fleurs vertes par exemple, sont majoritaires dans le genre *Angraecum* : elles représentent près de 65 espèces (47%) à Madagascar (Perrier de la Bâthie, 1941), 17 (36%) en Afrique (la Croix et la Croix, 1997) et une quinzaine d'espèces (52%) à La Réunion. Sur l'île, les trois espèces de la section *Hadrangis*, *Angraecum bracteosum*, *A. cadetii* et *A. striatum* (Figure 23) sont également originales. Leur éperon sacciforme, court (6-12 mm) et large à l'ouverture (4-10 mm) malgré la taille moyenne des fleurs, l'absence totale d'odeur semblent deux caractéristiques tout à fait spécifiques du genre. Cette section monophylétique est endémique des Mascareignes (Figure 24). Ses plus proches parentes sont les espèces malgaches à long éperon de la section *Humblotiangraecum*. Très proches morphologiquement, les deux sections se distinguent par la réduction de l'éperon chez les espèces réunionnaises et l'absence totale d'odeur. Le recul évolutif inféré de la phylogénie permet de mieux comprendre l'évolution des traits floraux. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'évolution particulière de la morphologie des fleurs d'*Hadrangis* était le résultat de l'interaction spécifique avec la faune pollinisatrice locale, processus évolutifs autochtones liés à l'insularité de La Réunion.



FIGURE 23. La section *Hadrangis* (de gauche à droite *A. striatum*, *A. bracteosum*, *A. cadetii*, photos T. Pailler)

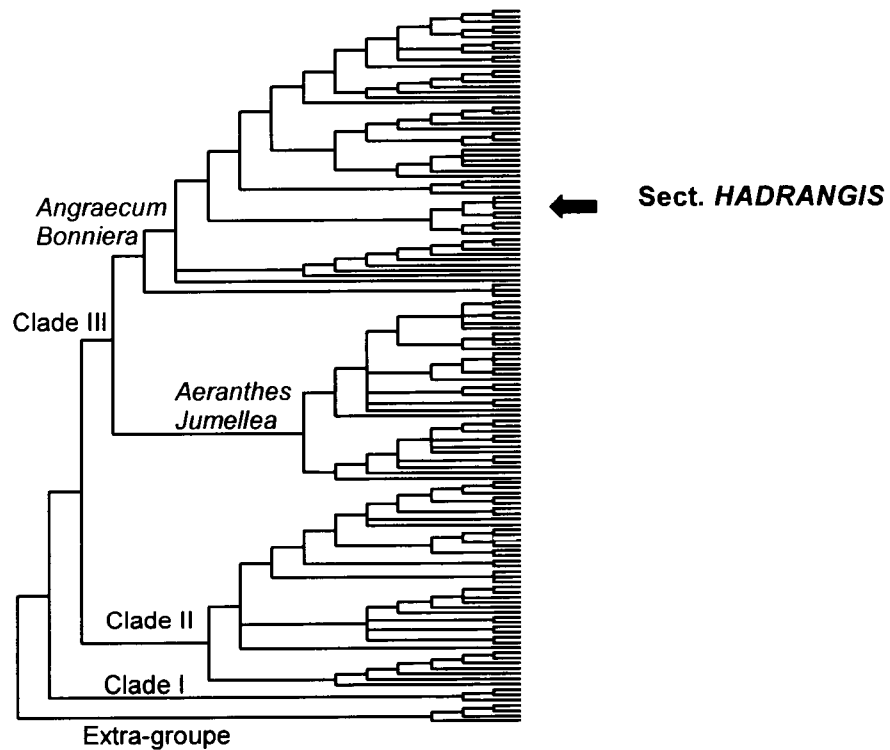


FIGURE 24. Position de la section *Hadrangis* (en rouge) sur l'arbre phylogénétique (arbre repris de la Figure 15).

Dans un premier temps, ce chapitre a pour objectifs de présenter la synthèse des modes de reproduction possibles chez les Angraecinae réunionnaises. Deux grandes parties seront ensuite développées. La première concerne le genre *Jumellea*. Dans une démarche comparative des espèces longi- et brévicalcares, elle a pour objectif de définir les particularités de la reproduction de ces deux groupes et d'en déduire les conséquences évolutives et écologiques dans la répartition, le fonctionnement et le maintien des populations à La Réunion.

La deuxième partie est consacrée à l'étude de la biologie florale et reproductive des trois espèces de la section *Hadrangis* : elle a pour but de répondre à la double question que soulève leur radiation sur l'île : quelle est l'implication la relation plante-pollinisateur dans l'évolution de ce syndrome floral particulier ? Quels sont les mécanismes qui ont conduit à la spéciation et qui maintiennent l'intégrité génétique de ces trois espèces ?

Enfin, l'évolution de l'interaction sphingidé-orchidée suite à la colonisation de La Réunion sera discutée dans l'optique d'une synthèse des connaissances apportées par la complémentarité de la phylogénie et de la biologie reproductive.

2. CARACTERISATION DES SYNDROMES DE POLLINISATION

L'accumulation de données depuis environ cinq ans concernant la biologie florale et l'écologie des orchidées réunionnaises a permis le développement de la connaissance de la famille sur l'île (T. Pailler, données non publiées, Roberts, 2001). Ces données regroupent des informations sur la biologie reproductive des espèces (autocompatibilité, autofertilité, taux de fécondité, production de nectar, émission d'odeur...). Des campagnes de prospection de terrain, à l'initiative de T. Pailler mais également poursuivies au cours de mes trois années de doctorat ont permis l'établissement d'un jeu de données de la répartition/abondance des orchidées sur l'île. 121 relevés ont ainsi été effectués sur l'ensemble des écosystèmes primaires de la Réunion (Figure 25). Pour chaque relevé, les informations collectées ont été : (1) présence/absence spécifique (2) phénologie des espèces et (3) abondance relative de la taille des populations. L'analyse des données, en collaboration avec H. Jacquemyn de l'Université de Leuven a permis de mettre en évidence la distribution de l'ensemble des espèces sur l'île (Jacquemyn et al. 2005) (Annexe 2) : (1) les orchidées réunionnaises sont en majorité représentées par des espèces à fleurs de petites taille et peu colorées, (2) les espèces sont en majorité localisées et rares (près de 50% d'entre elles sont réparties dans moins de 5% des localités prospectées), (3) la richesse spécifique est la plus abondante sur la ceinture des 400 et 800 m et décroît avec l'élévation altitudinale, (4) le taux d'espèces autofertiles (46%) est parmi le plus important recensé jusqu'à ce jour dans la famille (Jacquemyn et al., 2005, Annexe 2) et (5) le nombre d'espèces autofertiles augmente selon le gradient altitudinal. Plus généralement dans la famille des Orchidaceae, les milieux insulaires et altitudinaux, à l'image de ceux de la Réunion sont communément les plus riches en nombre d'espèces capables de s'autoféconder (cf. Introduction du chapitre). Le relief découpé et l'insularité de la

Réunion permettent donc d'expliquer la présence-record d'orchidées autofertiles. Qu'ils soient insulaires ou de haute altitude, l'évolution vers l'autofertilité dans ces habitats particuliers est corrélée à l'absence ou à la faible abondance d'insectes pollinisateurs, entomofaune typiquement moins riche, elle-même mise en relation avec les difficultés de colonisation des îles océaniques ou les conditions climatiques plus rudes des milieux extrêmes de montagne. Malgré le taux élevé d'espèces autofertiles, la majeure partie des orchidées réunionnaises entretient néanmoins des relations étroites avec l'entomofaune pollinisatrice locale : près de 40% ont un syndrome de pollinisation lépidoptérophile, 21% seraient pollinisés par les mouches et 5% par les abeilles. La tromperie est également présente à la Réunion : *Calanthe sylvatica* semble exploiter la naïveté des *Macroglossum milvus*, sphinx diurnes également pollinisateur de nombreuses espèces de Rubiaceae (T. Pailler, données non publiées). De façon identique, *Cryptopus elatus*, espèce déceptive, est pollinisée par *Hyles biguttata*, également de la famille des Sphingidés (cet exemple sera développé par la suite). L'interaction plante-pollinisateur à la Réunion semble donc à l'image de la famille : spécialisée ou totalement absente. Cependant, la connaissance des relations interspécifiques que la famille entretient avec la faune pollinisatrice reste un champ d'investigations extrêmement fécond, tant la majorité des systèmes de pollinisation est encore inconnue.

Pour les orchidées angraecoïdes, les patrons de distribution des espèces, le taux d'autofertilité et les syndromes de pollinisation diffèrent de ceux qui sont observés pour la famille. L'étude des traits floraux de 18 espèces représentatives des différentes formes florales (Encadré 5, Figure 26) a permis de distinguer trois syndromes de pollinisation (Figure 27) : (1) microlépidoptérophilie, (2) phalénophilie/sphingophilie et (3) le syndrome particulier des *Angraecum* sect. *Hadrangis*. Ce dernier cas sera discuté au paragraphe 4.

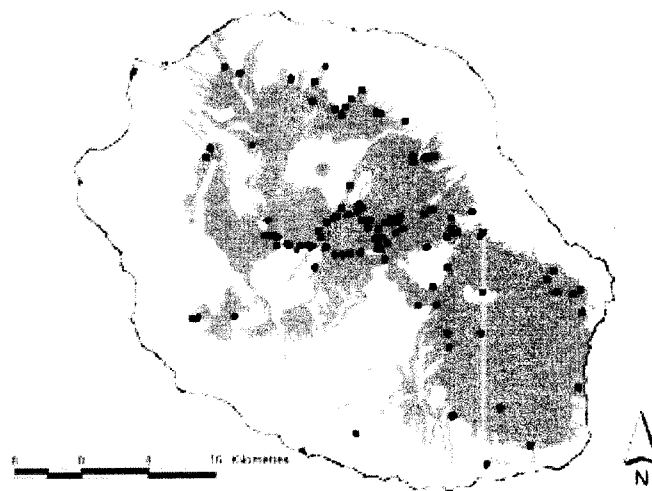


FIGURE 25. Localisation (points noirs) des 121 relevés effectués dans les habitats naturels préservés de La Réunion (zone grise).

ENCADRE 5. MESURES FLORALES : MATERIELS ET METHODES

Les mesures florales ont été effectuées sur 18 espèces plus un individu identifié comme hybride entre *A. striatum* et *A. bracteosum*. Pour chaque espèce, les inflorescences ou fleurs solitaires ont été récoltées au hasard dans la population sur différents individus et préservées dans l'alcool (70% éthanol). Pour les individus pluriflorifères, trois fleurs ont été choisies aléatoirement sur l'inflorescence. Au total, 18 traits floraux ont été mesurés (incluant la bractée et la longueur du pédicelle si présent) sur toutes les fleurs. Pour les individus pluriflorifères, trois caractères de l'inflorescence ont été ajoutés. Les mesures ont été effectuées sous une loupe binoculaire Leica MZII au moyen de pieds à coulisse électroniques d'une précision de 0,01 mm. Les caractères mesurés sont illustrés ci-dessous, Figure 26.

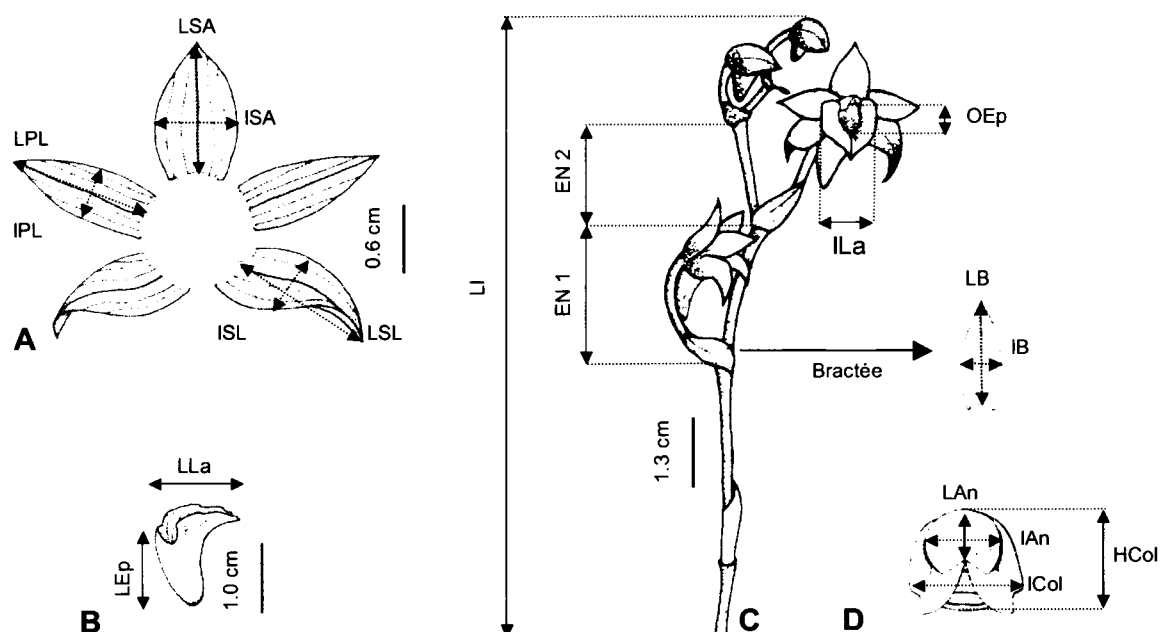


FIGURE 26. Illustration des caractères mesurés. **A. Tépalés** : LSA : longueur du sépale adaxial. ISA : largeur du sépale adaxial. LPL : longueur du pétale latéral. IPL : largeur du pétale latéral. LSL : longueur du sépale latéral. ISL : largeur du sépale latéral. **B. Labelle et éperon** : LLa : longueur du labelle. LEp : longueur de l'éperon. **C. Inflorescence** : LI : longueur de l'inflorescence. EN 1 : longueur de l'entre nœud 1-2. EN 2 : longueur de l'entre nœud 2-3. LB : longueur de la bractée. IB : largeur de la bractée. ILa : largeur du labelle. OEp : ouverture de l'éperon. **D. Colonne** : LAn : longueur de l'anthère. IAn : largeur de l'anthère. ICol : largeur de la colonne. HCol : hauteur de la colonne (A, B, C : dessins d'*Angraecum striatum*, C. Micheneau ; D : *Angraecinae*, d'après Dressler, 1981) (ne sont pas illustrés : longueur du pédicelle (Lp), longueur de l'ovaire (LOv) et diamètre de l'ovaire (DOv)).

Espèces étudiées (nombre de fleurs) (légende des espèces de la figure 27)

Angraecum borbonicum (15) (Abo) – *A. bracteosum* (43) (Abr) – *A. conchoglossum* (1) (Acon) – *A. costatum* (42) (Aco) – *A. cadetii* (24) (Aca) – *A. cucullatum* (6) (Acu) – *A. expansum* (6) (Aex) – *A. obversifolium* (28) (Aob) – *A. ramosum* (13) (Ara) – *A. striatum* (Ast) – *A. bracteosum* x *striatum* (8) (Ahy) – *Cryptopus elatus* (2) (Cel) – *Jumellea fragrans* (6) (Jfr) – *J. recta* (30) (Jrct) – *J. recurva* (1) (Jrc) – *J. rossii* (3) (Jro) – *J. stenophylla* (14) (Jste) – *J. stipitata* (6) (Jsti) – *J. triquetra* (33) (Jtri).

2. 1. Microlépidoptérophilie

L'analyse des caractères floraux a permis d'associer facilement un syndrome commun à *Angraecum costatum* et *A. obversifolium* dont la morphologie florale est caractérisée par :

- de petites fleurs vertes, nectarifères, vert-jaune ou vert pâle dont les pièces florales dépassent rarement 20 mm de longueur,
- l'éperon généralement en forme de « club » souvent inférieur à 5 mm,
- l'émission, pour certaines espèces, d'une odeur fraîche et quelque peu citronnée tout au long de la journée (observations personnelles).

Les traits floraux associés à la présence de nectar, l'éperon de taille moyenne, l'émission d'odeur et la couleur verte ou blanche des fleurs sont typiques des fleurs pollinisées par de petits papillons hétérocères. Ils définissent le syndrome de pollinisation phalénophile (Wyatt, 1983 ; Proctor et al., 1996 ; van der Cingel, 2001). Toutefois, l'analyse en composantes principales des traits floraux a montré que les espèces *A. costatum* et *A. obversifolium* (illustrant les *Angraecum* à petites fleurs vertes), se distinguent nettement des espèces à fleurs blanches, espèces qui présentent elles aussi les caractéristiques de fleurs phalénophiles. Afin de distinguer ces deux groupes, le terme *microlépidoptèreophile* est employé ici comme le syndrome de pollinisation des espèces à petites fleurs majoritairement vertes, dont la longueur de l'éperon ne dépasse pas 5 mm (Tableau 16). Par opposition, le syndrome typiquement phalénophile est représenté par les espèces à fleurs majoritairement blanches, de taille moyenne et qui présentent un éperon compris entre 5 et 50 mm.

TABEAU 16. Les orchidées angraecoïdes MICROLEPIDOPTEROPHILES de La Réunion.

Espèces	Fréquence ^a	Altitude (m)	E/I ^b	Fleurs	Autofertilité ^c	Eperon ^d
<i>Angraecopsis parviflora</i>	27,3	400-1400	I	verdâtres	Non	<5
<i>Angraecum caulescens</i>	19	400-1500	I	vertes	Non	5-9
<i>A. costatum</i>	18,2	1225-2100	E	vertes	Non	5-9
<i>A. hermanni</i>	0,8	1360	E	vertes	?	5-9
<i>A. minutum</i>	10,7	700-1920	E	vertes	Non	<5
<i>A. multiflorum</i>	5,8	850-1570	I	vertes	Non	5-9
<i>A. obversifolium</i>	43,8	650-1902	E	vertes	Non	5-9
<i>A. aff patens</i>	1,7	550-650	E	vertes	?	<5
<i>A. pectinatum</i>	12,4	410-720	I	blanches	Non	<5
<i>A. sp. TP84</i>	2,5	1300-1500	E	blanches	Oui	<5
<i>A. sp. TP114</i>	4,1	1300-1700	E	vertes	Non	<5
<i>A. sp. TP110</i>	19,0	780-1870	E	vertes	Non	<5
<i>A. sp. TP125</i>	0,8	700	E	vertes	Oui	<5
<i>A. tenuifolium</i>	2,5	1380-1870	E	vertes	Non	<5

^a Fréquence de distribution dans 121 sites prospectés (cf. Figure 25) ; ^b E : endémique des Mascareignes, I : indigène ; ^c Oui : production de fruits en absence de pollinisateurs, Non : le cas échéant (culture des individus en conditions contrôlées) ; ^d Classe moyenne de la longueur d'éperon (mm).

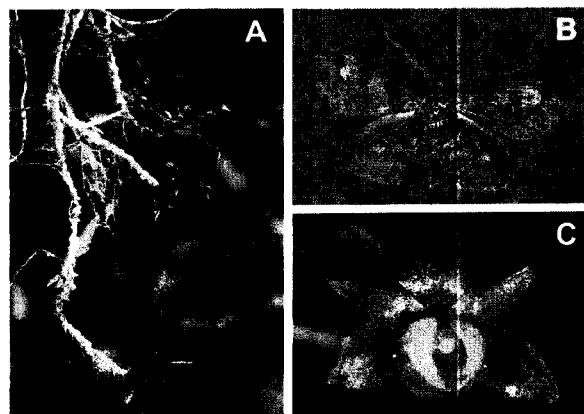


FIGURE 28. Interaction microlépidoptère. **A.** *Angraecum obversifolium*. **B.** *Eilema squalida* (proboscis de 9,1 mm ; pollinies à 4,2 mm de l'extrémité de la trompe) (pollinies identifiées comme appartenant soit à *A. obversifolium*, soit à *A. sp. TP114*). **C.** *Angraecum sp. TP114* (un deuxième papillon hétérocère, lui aussi actif de jour, portant les pollinies d'*Angraecum costatum* a été capturé. Cette espèce est en cours d'identification au Muséum d'Histoire Naturelle de La Réunion).

Deux pollinisateurs, petits papillons hétérocères actifs de jour, ont été identifiés chez les espèces microlépidoptérophiles (Figure 28). La fécondité naturelle assez élevée des ces espèces, reflète la forte activité de la faune pollinisatrice. Par exemple, le taux de fécondité d'*Angraecum pectinatum* fut d'environ 49% en 2001 à Mare Longue (sud-est de l'île, 500 m) (N = 500 fleurs) (Pailler, 2001) et de 59% en 2003 à Sainte Marguerite (est, 600 m) (N = 71 fleurs). De façon identique, l'étude plus approfondie d'une population d'*A. costatum* au Piton Textor en 2004 (zone du volcan, 2100 m) pour laquelle 42% de fruits ont été compatibilisés sur une saison florifère (N = 125 fleurs) suggère que les pollinisateurs de ce groupe sont actifs, même dans les zones de végétation les plus hautes de l'île.

A La Réunion, les espèces du genre *Angraecum* à petites fleurs vertes ont connu une spéciation particulièrement importante (Tableau 16). Les relations de mutualisme que ces espèces entretiennent avec les petits lépidoptères hétérocères, également très représentées sur l'île, s'avèrent donc fonctionnelles, dynamiques et maintenues sur l'île. Deux espèces sont néanmoins autofertiles : *Angraecum* sp. TP125, et le taxon TP84 (fleurs blanches), tous deux rares et endémiques de la Réunion (Tableau 16).

Le syndrome de pollinisation microlépidoptérophile concerne environ 30% des orchidées angraecoïdes réunionnaises.

2. 2. Phalénophilie et sphingophilie

Les espèces à fleurs blanches dont l'éperon varie de 7 à 131 mm dans notre analyse en composantes principales (respectivement *Angraecum cucullatum* et *Jumellea stenophylla*) forment un nuage de points très étalé dans lequel il est possible de distinguer deux syndromes : la phalénophilie et la sphingophilie.

La phalénophilie concerne une quinzaine espèces dont la taille de l'éperon se situe entre 5 et 50 mm (Tableau 17). La morphologie florale de ces espèces est typiquement adaptée à la pollinisation par de petits papillons nocturnes, incluant également les sphinx à petite trompe (inférieure à 50 mm). Elles se singularisent par :

- des fleurs nectarifères de taille moyenne et de couleur blanche,
- l'éperon filiforme à ouverture très étroite dont la longueur varie entre 10 et 50 mm,
- l'émission d'une odeur puissante, généralement au crépuscule (cf. analyse chimique de l'espace de tête d'*Angraecum liliodorum*, Annexe 3).

Parmi les espèces typiquement phalénophiles, celles du genre *Aeranthès* se singularisent par la couleur de leurs fleurs majoritairement verte et la taille de l'éperon souvent inférieure à celle des autres espèces du groupe. Cependant, la taille moyenne des fleurs et la grosseur des pollinies ne correspondent pas aux espèces typiquement microlépidoptérophiiles décrites dans le paragraphe précédent. Malgré la taille réduite de l'éperon, la distance effective entre l'accès au nectar et les organes reproducteurs de la colonne chez les *Aeranthès*, distance référentielle dans l'interaction plante-pollinisateur,

est bien plus grande que la simple taille de l'éperon du fait de la présence du pied caractéristique de la colonne.

TABLEAU 17. Les orchidées angraecoïdes PHALENOPHILES de La Réunion.

Espèces	Fréquence ^a	Altitude (m)	E/I ^b	Fleurs	Autofertilité ^c	Eperon ^d
<i>Aeranthès adenopoda</i>	très rare	700	I	blanches	Non	5-9
<i>A. arachnites</i>	10,7	100-1300	E	verdâtres	Non	5-9
<i>A. strangulatus</i>	8,3	550-1300	E	verdâtres	Non	5-9
<i>A. tenella</i> var. <i>borbonica</i>	1,7	120-700	E	verdâtres	Non	5-9
<i>Angraecum cucullatum</i>	16,5	400-850	E	blanches	Non	5-9
<i>A. calceolus</i>	4,1	300-850	I	vertes	Oui	15-19
<i>A. expansum</i>	49,6	550-2100	E	blanches	Non	45-49
<i>A. liliodorum</i>	2,5	120-550	E	blanches	Non	40-44
<i>A. pingue</i>	0,8	1300	E	blanches	Non	20-24
<i>A. ramosum</i>	23,1	400-1217	E	blanches	Non	20-24
<i>Beclardia macrostachya</i>	56,2	400-1	I	blanches	Non	5-9
<i>Cryptopus elatus</i>	10,7	450-1183	I	blanches	Non	25-29
<i>Jumellea aff rossii</i>	5	1180-1406	E	blanches	Non	20-24
<i>J. aff stipitata</i>	3,3	400-650	E	blanches	Non	45-49
<i>J. fragrans</i>	55,4	500-1920	E	blanches	Non	20-24
<i>J. triquetra</i>	63,6	620-2100	E	blanches	Non	10-14
<i>Oeonia rosea</i>	7,4	620-1300	E	blanches	Non	5-9
<i>Oeoniella polystachys</i>	0,8	100	I	blanches	Non	5-9

^a Fréquence de distribution dans 121 sites prospectés (cf. Figure 25) (*Aeranthès adenopoda* a été découverte indépendamment du cadre des sites prospectés : la fréquence de cette espèce n'apparaît donc pas dans le tableau. Néanmoins, très peu de populations sont connues) ; ^b E : endémique des Mascareignes, I : indigène ; ^c Oui : production de fruits en absence de pollinisateurs, Non : le cas échéant (culture des individus en conditions contrôlées) ; ^d Classe moyenne de la longueur d'éperon (mm).

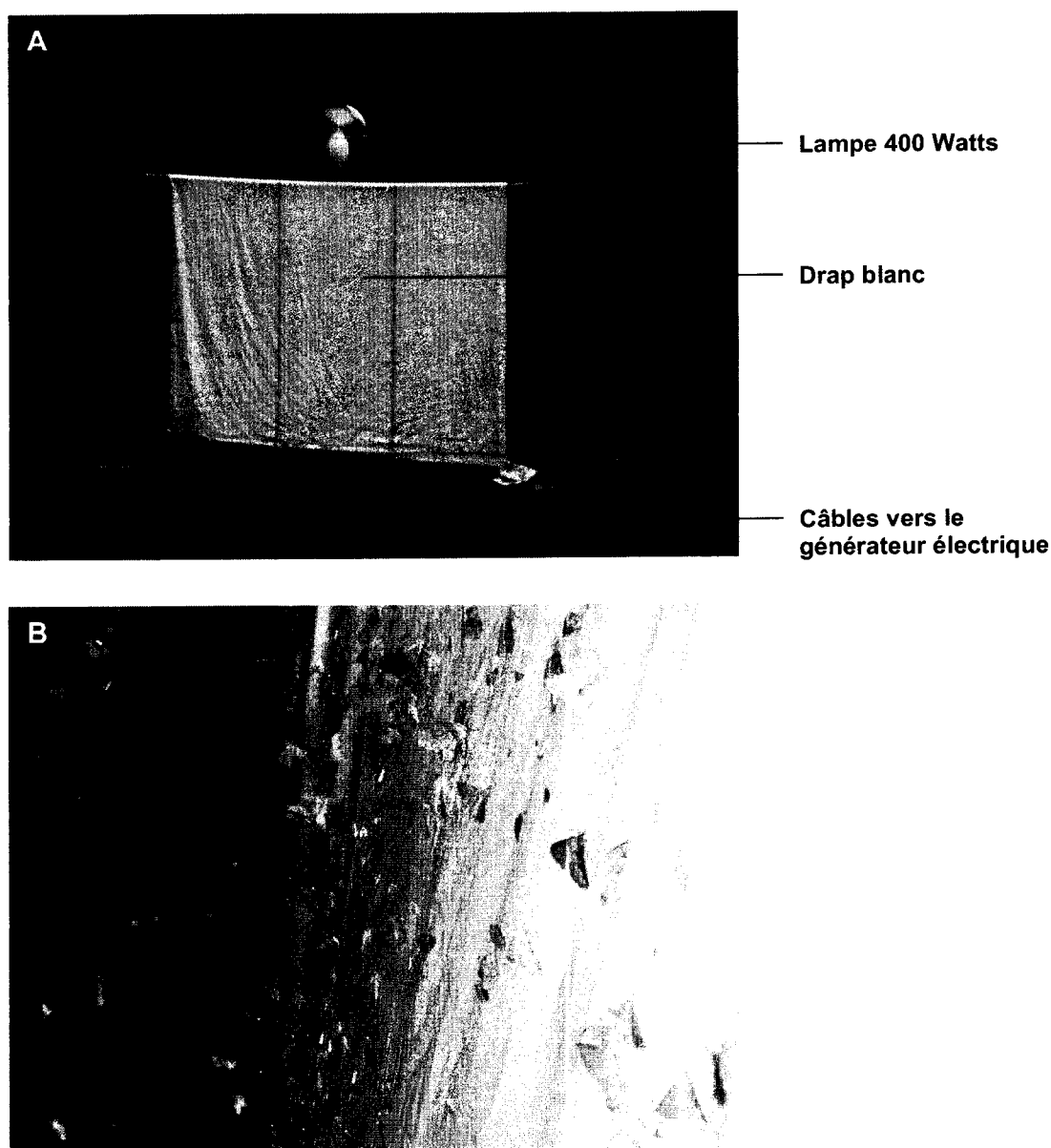


FIGURE 29. A. Illustration du dispositif des « chasses de nuit ». **B.** Nuée de papillons. (les prospections ont été menées de 17h30 à 21h30 en général. Les papillons attirés par la forte lumière ont été inspectés afin de vérifier s'ils transportaient des pollinies, de visu ou au moyen d'une loupe).

Toutefois, les syndromes de pollinisation microlépidoptérofile et phalénophile regroupent les même types de pollinisateurs, lépidoptères nocturnes. Tant que les protagonistes de la relation plante-pollinisateur ne seront pas clairement identifiés, il est tout à fait envisageable qu'il existe des pollinisateurs communs aux espèces microlépidoptérophiles et phalénophiles et aux espèces phalénophiles et sphingophiles.

Le succès reproducteur des espèces phalénophiles est dans l'ensemble assez élevé. Notons par exemple les fécondités d'*Angraecum ramosum* et d'*A. cucullatum* à Mare Longue en 2001, respectivement de 34% (N = 637 fleurs) et de 19% (N = 455 fleurs) (Pailler, 2001). L'interaction phalénophile s'avère donc tout à fait fonctionnelle et maintenue à La Réunion. Malgré les différentes prospections de terrain et les nombreuses « chasses de nuit » que nous avons menées ces trois dernière années (une vingtaine au total) (Figure 29), seul, le pollinisateur de *Cryptopus elatus*, le sphinx *Hyles biguttata* a été clairement identifié (Figure 30).



FIGURE 30. *Hyles biguttata*, pollinisateur de *Cryptopus elatus*. **A.** *Hyles biguttata* (Sphingidés, individu capturé à Basse Vallée : proboscis de 31,1 mm ; pollinies à 22,6 mm de l'extrémité de la trompe ; individu capturé à la Plaine des Palmistes : proboscis de 25,7 mm ; pollinies à 25,2 mm de l'extrémité de la trompe). **B.** *Cryptopus elatus*. **C.** Pollinies sur la trompe du sphinx (individu de la Plaine des Palmistes) (Photo : T. Pailler).

2. 2. 1. Le cas particulier de *Cryptopus elatus*

Cryptopus elatus est l'une des orchidées les plus remarquables de la Réunion, mais l'espèce est rare sur l'île : la destruction de son habitat et le braconnage actif des individus réduisent la taille des populations. Malgré la découverte de son pollinisateur, la reproduction de cette orchidée reste énigmatique. Contrairement aux espèces typiquement lépidoptérophiles, les fleurs de *Cryptopus* ne produisent pas de nectar (forme de tromperie) et n'émettent pas d'odeur. Bien que l'éperon soit présent, d'environ 30 mm, aucune goutte de nectar n'y a en effet été observée. Pas de récompense, pas d'attraction par l'odeur et pourtant deux sphinx ont été capturés portant les pollinies de *Cryptopus elatus* sur leur proboscis (Figure 30). Plus étrange, les sphinx prélèvent les pollinies, mais la production de fruits est extrêmement faible. En 2005 par exemple, sur 339 fleurs suivies dans la majorité des populations présentes sur l'île, aucun fruit n'a été recensé, soit un taux de fécondité nul pour l'espèce (Wulff, 2005). Le transfert des pollinies par les pollinisateurs est donc très inefficace. Les visites du sphinx, malgré l'absence d'odeur et de récompense des fleurs de *Cryptopus elatus* peuvent être expliquées par le comportement opportuniste du papillon. Les nombreuses espèces de la famille des Rubiaceae à fleurs blanches et nectarifères qui partagent le même pollinisateur que celui de l'orchidée pourraient jouer le rôle de « *magnet species* », c'est-à-dire de permettre au sphinx d'associer une récompense alimentaire aux grandes fleurs de couleur blanche, stimulus comportemental dont profiterait *Cryptopus elatus*. Parmi ces Rubiacées, notons par exemple *Gaertnera vaginata* (T. Pailler, communication personnelle).

La tromperie est en général rare chez les espèces pollinisées par les sphinx : deux cas seulement ont été reportés dans la littérature dans la famille des Orchidacées (Schemke, 1980 ; Ackerman et Montalvo, 1990). A La Réunion, *Calanthe sylvatica* est également une espèce trompeuse pollinisée par un sphinx diurne (observations personnelles). Les espèces

déceptives émettent cependant une odeur attractive pour le sphinx. Le cas de *Cryptopus* est d'autant plus inattendu que la double absence de nectar et d'odeur n'avait jamais été décrite auparavant dans les mécanismes de tromperie de pollinisation par les sphinx. Dans le groupe des espèces phalénophiles, une autre espèce indigène semble dépourvue d'odeur, *Beclardia macrostachya*. Le syndrome de pollinisation phalénophile pour cette espèce demande donc à être vérifié par l'identification des pollinisateurs.

Parmi les espèces phalénophiles, une seule d'entre elles est capable de s'autoféconder, *A. calceolus*. Cette espèce très cosmopolite est également présente à Madagascar, en Afrique, aux Mascareignes et aux Comores. Son mode de reproduction a certainement facilité l'établissement des populations sur l'île.

Parmi les orchidées angraecoïdes de la Réunion, plus de 39% semblent associés au mode de pollinisation phalénophile.

Bien que, chez les espèces phalénophiles, la pollinisation par les sphinx à petites trompes ne soit pas exclue, le syndrome sphingophile est typiquement associé aux formes florales adaptées à la pollinisation par de grands sphinx (van der Pijl et Dodson, 1966 ; Wyatt, 1983 ; van der Cingel, 2001). Les espèces typiquement sphingophiles, comme nous l'avons vu, se caractérisent par :

- leurs fleurs blanches nectarifères, de grande taille,
- l'éperon long et filiforme supérieur à 50 mm, mais pouvant atteindre jusqu'à 30 voire 40 cm chez les espèces malgaches (e.g. *A. sesquipedale* et *A. eburneum* subsp. *longicalcar*), entre 10 et 14 cm chez les espèces réunionnaises.
- l'émission d'une odeur puissante au crépuscules dont les notes rappellent celles du jasmin (e.g. *A. sesquipedale*, *A. eburneum*, Kaiser 1993 ; *A. magdalenae*, Roguenant et al., 2005).

La sphingophilie concerne 11 espèces à La Réunion (Tableau 18) : trois sont indigènes *A. eburneum*, *A. mauritianum* et *A. conchoglossum* également présentes à Madagascar et huit sont endémiques des Mascareignes. Or, ces huit espèces sont toutes autofertiles, suggérant l'affranchissement total des pollinisateurs et la perte de l'interaction sphingophile (*sensus* grand sphinx) à la Réunion. Le syndrome de sphingophilie est donc représenté chez environ 20% des orchidées angraecoïdes de l'île, mais 72% d'entre elles sont autofertiles.

TABLEAU 18. Les orchidées angraecoïdes SPHINGOPHILES de La Réunion.

Espèces	Fréquence ^a	Altitude (m)	E/I ^b	Fleurs	Autofertilité ^c	Eperon ^d
<i>Aerangis</i> sp.	0,8	1300	E	blanches	Oui	>80
<i>Angraecum borbonicum</i>	30,6	400-1500	E	blanches	Oui	65-69
<i>A. conchoglossum</i>	4,1	550-850	I	blanches	Non	>80
<i>A. cornigerum</i>	6,6	850-1920	E	blanches	Oui	>80
<i>A. eburneum</i>	5,0	100-650	I	blanches	Non	45-49
<i>A. mauritianum</i>	19,0	120-1300	I	blanches	Non	75-79
<i>Jumellea</i> aff <i>divaricata</i>	3,3	850-1300	E	blanches	Oui	>80
<i>J. aff exilis</i>	2,5	550-1380	E	blanches	Oui	>80
<i>J. recta</i>	4,1	100-1300	E	blanches	Oui	>80
<i>J. recurva</i>	6,6	400-850	E	blanches	Oui	>80
<i>J. stenophylla</i>	8,3	600-1397	E	blanches	Oui	>80

^a Fréquence de distribution dans 121 sites prospectés (cf. Figure 25) (*Aeranthus adenopoda* a été découverte indépendamment du cadre des sites prospectés : la fréquence de cette espèce n'apparaît donc pas dans le tableau. Néanmoins, très peu de populations sont connues) ; ^b E : endémique des Mascareignes, I : indigène ; ^c Oui : production de fruits en absence de pollinisateurs, Non : le cas échéant (culture des individus en conditions contrôlées) ; ^d Classe moyenne de la longueur d'éperon (mm).

2. 3. Conclusions

Les formes florales associées à la pollinisation par les lépidoptères hétérocères sont largement majoritaires chez les orchidées angraecoïdes de la Réunion, concernant plus de 80% des espèces. Trois syndromes floraux ont été caractérisés selon la taille des fleurs et de l'éperon et associés à la taille des papillons nocturnes et à la morphologie de leur appareil buccal. Tandis que les interactions microlépidoptérophiles et phalénophiles sont maintenues à la Réunion, interactions certainement corrélées à l'abondance et à la vaste répartition des lépidoptères hétérocères (environ 450 espèces ont été inventoriées, Guillermet et Guillermet, 1986), la relation sphingophile, caractéristique des espèces malgaches semble avoir été perdue chez les orchidées à long éperon endémiques de la Réunion, à plusieurs reprises et de façon indépendante après colonisation de La Réunion.

L'autofertilité concerne environ 20% des orchidées angraecoïdes réunionnaises. Ce taux est beaucoup plus faible que celui observé pour la famille sur l'île qui est d'environ 45% (cf. Jacquemyn et al., 2005, Annexe 2). Contrairement à la tendance générale observée chez l'ensemble des orchidées à La Réunion, l'autofertilité n'est pas corrélée au gradient altitudinal (Figure 31A) dans le cas particulier des espèces des sous-tribus des *Angraecinae* et des *Aerangindinae* : le type biologique principalement épiphyte des espèces des deux sous-tribus n'autorise pas en effet leur maintien à de très hautes altitudes. L'évolution vers l'autofertilité chez les orchidées angraecoïdes réunionnaises est en revanche fortement corrélée à la taille de l'éperon (Figure 31B). L'absence de pollinisateurs pour ces espèces autofertiles est donc attendue.

Cependant, les espèces autofertiles à long éperon de La Réunion sont-elles effectivement associées à l'absence totale d'interactions avec les pollinisateurs ? Dans le cas où l'interaction ne serait pas maintenue, qu'en est-il de l'évolution des traits floraux associés spécifiquement à la relation plante-pollinisateur, comme la production de nectar ou la synthèse de composés volatils par exemple ? Quelles sont les conséquences écologiques de l'évolution vers l'autofertilité sur la répartition des espèces sur l'île et sur l'abondance des individus au sein des populations ?

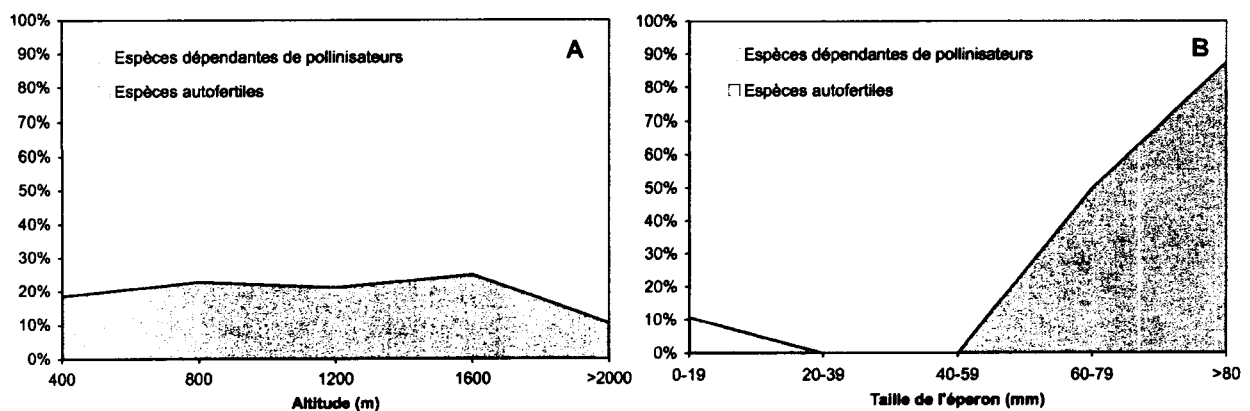


FIGURE 31. Distribution des espèces autofertiles. **A.** Selon l'altitude. **B.** Selon la longueur de l'éperon.

3. PHALENOPHILIE *VERSUS* SPHINGOPHILIE DANS LE GENRE

JUMELLEA : IMPLICATIONS EVOLUTIVES ET ECOLOGIQUES

Le dimorphisme prononcé de la taille de l'éperon des espèces du genre *Jumellea* à La Réunion offre l'opportunité d'étudier plus en détail l'implication des syndromes de pollinisation dans l'évolution et l'écologie des espèces. La biologie florale a été investie par l'analyse de la morphologie, des différentes propriétés du nectar (volume, concentration) et de la composition chimique du bouquet floral. Afin de déterminer si les espèces à long éperon sont totalement affranchies des pollinisateurs, la fécondité naturelle a été comparée à la fécondité en absence de pollinisateurs (isolation de fleurs *in situ*) et à la fécondité de fleurs émasculées (pollinies retirées). En parallèle, les longueurs de proboscis de douze espèces de sphinx ont été mesurées afin de confronter l'adéquation de la morphologie de l'appareil buccal des papillons à celle de l'éperon des orchidées et d'en déduire les pollinisateurs potentiels. Enfin, nous avons recherché activement l'identité des pollinisateurs effectifs par la répétition de « chasses de nuit », infructueuses malheureusement.

3. 1. Matériel et méthodes

3. 1. 1. Modèles biologiques

Parmi les espèces du genre *Jumellea* dont la morphologie florale est typiquement associée à la phalénophilie, les plus représentées sur l'île, *J. fragrans* et *J. triquetra* ont été nos modèles biologiques (Figure 32). *J. stenophylla* et *J. recta* ont été choisies car leurs fleurs illustrent parfaitement le syndrome de sphingophilie (Figure 32). Une espèce malgache en culture au RBG Kew, *J. arborescens*, espèce sœur de *J. recta* dans notre

phylogénie a également été étudiée dans l'objectif de comparer une espèce sphingophile de Madagascar aux espèces réunionnaises.

L'article portant sur l'étude de *J. stenophylla* en particulier a soumis à *Plant Systematics and Evolution* (Annexe 4).



FIGURE 32. Illustrations des espèces étudiées du genre *Jumellea* à long et court éperon. **A.** *J. recta* (éperon ~ 112 mm). **B.** *J. stenophylla* (éperon ~ 135 mm). **C.** *J. fragrans* (éperon ~ 20 mm). **D.** *J. triquetra* (éperon ~ 8 mm) (Photos : A, C, D : T. Pailler ; B : O. Maurin).

3. 1. 2. Sites d'études

*Bébour (BB)*³⁶

Située au centre de l'île, la forêt de Bébour occupe le plateau culminant au Piton des Neiges, rejoignant les remparts descendants du Mazerin au nord et ceux du Coteau Maigre au sud. L'altitude moyenne est de 1500 m. La forêt humide de montagne s'étale sur plus de 5000 hectares ; elle abrite les zones de végétations parmi les plus riches et les mieux préservées de l'île. Plusieurs habitats y ont été décrits (Cadet, 1977 ; Pailler et al., 1998a) mais la majorité des communautés végétales constitue la non moins renommée « Forêts de Bois de Couleur des Hauts » (Cadet, 1977), caractérisée par une grande diversité de fougères arborescentes et d'espèces ligneuses endémiques, refuges d'une richesse peu commune de mousses et d'orchidées épiphytes. *Jumellea triquetra* et *J. fragrans* y ont été étudiés. Les individus de *J. fragrans* fleurissent de façon assez ponctuelle avec un pic de floraison marqué dès les premières semaines du mois de janvier ; ceux de *J. triquetra*, au contraire ont une floraison très sporadique de décembre à fin février.

La forêt de l'Eden (ED)

Située plus à l'est de l'île et sur un plateau beaucoup plus bas (650 m), la forêt humide de moyenne altitude de l'Eden offre des restes de végétation primaire tout à fait préservés. *Jumellea stenophylla*, assez rare sur le reste de l'île, y constitue une population d'environ 100 individus (T. Pailler, communication personnelle) se développant préférentiellement sur les troncs de *Pandanus montanus* (« Pimpins ») (Pandanacées). La floraison de cette espèce ne dure que deux semaines de mi-novembre à début décembre.

³⁶ Entre parenthèses les abréviations données ci-après aux sites d'études.

La Plaine des Palmistes (PP)

Sur la commune de la Plaine des Palmistes (800m), au cœur même du village, subsistent quelques lambeaux d'un habitat tout à fait particulier : les fourrés à *Pandanus*. Géographiquement, ils recouvrent une zone intermédiaire entre la végétation de montagne ou de haute montagne et celle de basse altitude, zones qu'affectent particulièrement les orchidées réunionnaises (cf. Jacquemyn et al., 2005, Annexe 2). Caractérisés par la dominance du « Pimpin » (*Pandanus montanus*), ces habitats spécifiques abritent une flore « orchidéenne » extrêmement riche, magnifiée par la présence d'espèces rares ou très rares (e.g. *A. conchoglossum*, *J. stenophylla*, *Oeonia rosea*, *Bonniera corrugata*). Sur ce site, nous avons quantifié la fécondité de *Jumellea fragrans*, qui fleurit bien plus tardivement à la Plaine des Palmistes que sur le site Bébou, vers la fin du mois de février.

Montauban et La Grande Chaloupe (MB et GC)

Jumellea recta est une espèce inféodée aux forêts sèches de basse altitude, ou elle croît en épilithe sur le sol rocailleux. Deux sites d'études ont été choisis pour la qualité de la préservation de leur flore et pour la taille conséquente des populations de l'espèce étudiée : Montauban (600 m) au nord, situé sur la commune de saint Denis et La Grande Chaloupe (600-700 m) au nord-ouest, situé sur la commune de La Possession. Dans ces deux sites, la floraison de *J. recta* débute fin décembre pour s'achever vers la mi-janvier.

3. 1. 3. Morphologie florale

Les mesures florales, effectuées pour la caractérisation des syndromes de pollinisation (cf. § 2, Chapitre II) ont été comparées chez les différentes espèces étudiées.

3. 1. 4. Propriétés du nectar

Pour chaque espèce réunionnaise, vingt fleurs environ ont été collectées ; la longueur de l'éperon ainsi que la hauteur du nectar ont été aussitôt mesurées sur le matériel frais au 0,01 mm près (pieds à coulisse électroniques) par transparence sur une table lumineuse ou sur les phares d'une voiture. Le volume du nectar a ensuite été prélevé et mesuré au moyen de tubes capillaires (32 mm de longueur, volume de 5µL) et directement transféré dans un réfractomètre manuel (R5000, Atago Inc., Bellevue, Washington, USA). La teneur en équivalent saccharose (g/100g de solution) a été déduite de la valeur de réfraction donnée par le réfractomètre confrontée aux tables de conversion standard (Mathoulhi et Reiser, 1995).

3. 1. 5. Analyses du bouquet floral

Extractions des composés volatils

Les composés volatils ont été analysés selon la méthode de micro-extraction sur phase solide (SPME) (Zhang and Pawliszyn, 1993), adsorbés au moyen d'une fibre noire bipolaire de type carboxenTM – PDMS d'épaisseur de phase de 75 µm (*Black carboxenTM fiber*, Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA). Pour chaque analyse, un individu en bouton a été collecté, cultivé au laboratoire durant la période de floraison et réintroduit dans son milieu naturel après l'expérimentation. À l'anthèse, les fleurs ont été placées sous une cloche en verre dont la plus large extrémité permet l'introduction de l'individu (isolé par du coton), la plus étroite celle de la fibre (Figure 33). Les fibres ont été exposées au

sein de l'espace de tête des fleurs pendant des durées variables, entre 6 et 11 heures la journée et 12 à 15 heures la nuit (Tableau 19). Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, chaque analyse a été répétée au moins deux fois, utilisant la même fleur. La qualité de l'air sur le lieu de l'expérimentation a également été analysée par un « blanc » (fibre exposée sans fleur) servant de témoin.

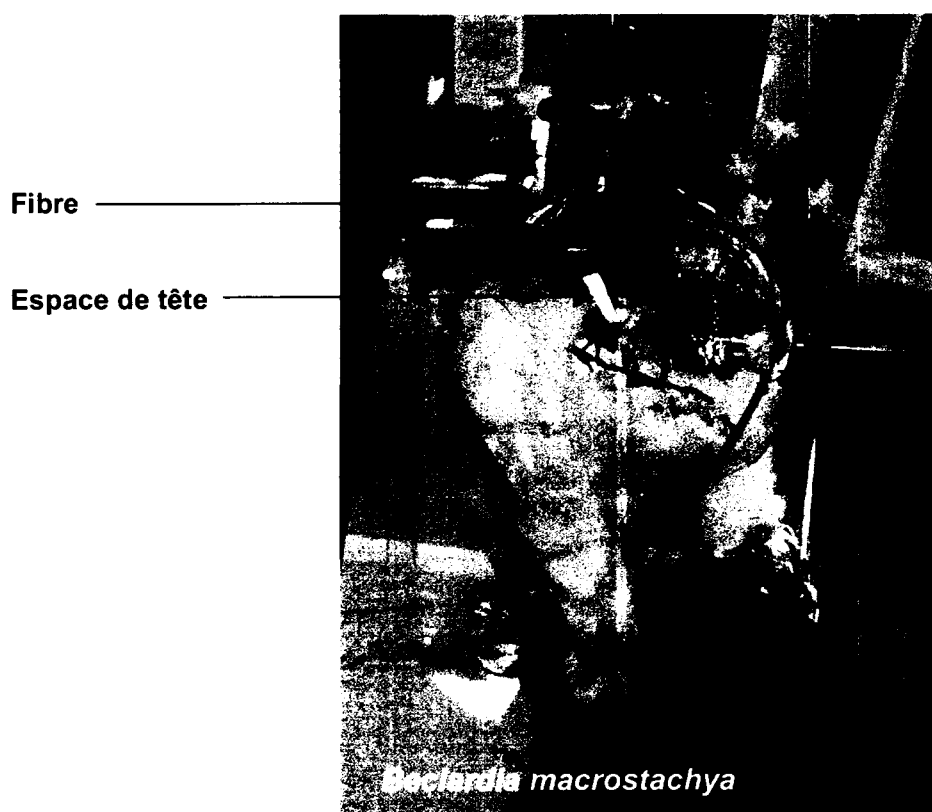


FIGURE 33. Illustration du dispositif expérimental de l'extraction des composés volatils de l'espace de tête.

TABLEAU 19. Espèces étudiées, populations et conditions d'extraction des composés volatils par SPME.

Espèces	Populations	Conditions d'extraction			
		Extractions de jour		Extractions de nuit	
		Horaires	Durée	Horaires	Durée
<i>J. arborescens</i>	RBG Kew	9h00 – 16h00	7h00	17h00 – 8h00	15h00
<i>J. fragrans</i>	Plaine des Palmistes	7h00 – 17h30	10h30	19h00 – 7h00	12h00
<i>J. recta</i>	Montauban	10h00 – 16h00	6h00	18h00 – 9h00	15h00
<i>J. rossii</i>	Bois de Nèfles	8h00 – 17h00	9h00	17h00 – 8h00	13h00
<i>J. stenophylla</i>	Plaine des Palmistes	8h00 – 17h30	9h30	17h30 – 9h00	14h30
<i>J. triquetra</i>	Plaine des Palmistes	8h00 – 16h30	8h30	17h30 – 7h00	12h30

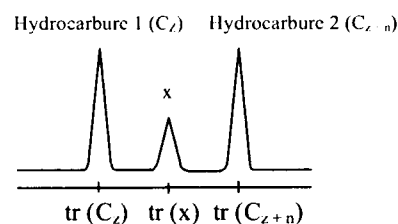
Analyses des composés volatils

Aussitôt après exposition, les analyses par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) ont été menées sur un chromatographe Hewlett Packard 6890N relié à un spectromètre de masse Hewlett Packard 5973N et équipé d'une colonne capillaire apolaire de type SPB-5 (longueur 60 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de phase de 0,25 μ m). L'injecteur du chromatographe dans lequel a lieu désorption de la fibre a été placé en mode *splitless* à 250°C (durée d'exposition de la fibre 10 minutes : toutes les molécules passent alors à l'état gazeux). Le débit de l'hélium, gaz vecteur a été fixé à 0,7 mL/min. Le four a été programmé pour augmenter la température linéairement de 60 à 230°C, de 4°C/min, avec un palier de 40 min à 230°C. Les spectres de masse ont été produits avec un courant d'ionisation de 70 eV, dans une gamme de masse de 30 à 550 uma (unité de masse atomique).

Les indices de rétention relatifs (IRR) ont été calculés par la méthode de Kovats (Kovats, 1965) en utilisant une gamme d'alcane standard de C₈-C₂₂. La méthode de calcul des indices de rétention relatifs est différente selon que l'analyse a été effectuée en programmation de température ou en isotherme.

- Programmation de température ($0 < T < 230^{\circ}\text{C}$) :

$$\text{IRR} = 100 n \frac{\text{tr}(x) - \text{tr}(C_z)}{\text{tr}(C_{z+n}) - \text{tr}(C_z)} + 100 z$$



- Isotherme ($T \geq 230^{\circ}\text{C}$) :

$$\text{IRR} = 100 n \frac{\log \text{tr}(x) - \log \text{tr}(C_z)}{\log \text{tr}(C_{z+n}) - \log \text{tr}(C_z)} + 100 z$$

Avec : n = différence du nombre d'atomes de carbone entre l'hydrocarbure 1 et 2
 $\text{tr}(x)$ = temps de rétention du composé analysé
 $\text{tr}(C_z)$ = temps de rétention de l'hydrocarbure 1
 $\text{tr}(C_{z+n})$ = temps de rétention de l'hydrocarbure 2

Les composés ont été identifiés par confrontation de leur indice de rétention relatif et de leur spectre de masse à ceux de la littérature (Adams, 2001) ou à ceux des banques de données informatisées « Nist » et « Wiley ». Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments de l'Université de La Réunion, grâce la précieuse aide d'Anne Gauvin qui a contrôlé l'identité de toutes les molécules. L'analyse de *J. arborescens* a été effectuée au RBG Kew sous la direction de Kite Geoffrey par une technique d'extraction différente : piégeage des composés volatils sur du charbon actif, puis dissolution par un solvant (hexane). Les composés ont ensuite été analysés par chromatographie sur phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), de façon identique à la technique de la SPME décrite ci-dessus.

3. 1. 6. Succès de la pollinisation et de la reproduction

3. 1. 6. 1. Isolement des fleurs in situ

Juste avant l'anthèse, les fleurs d'une quinzaine d'individus ont été marquées et recouvertes de sacs en nylon à mailles très fines (Figure 34). Ils permettent aux fleurs de respirer, mais excluent tout contact avec d'éventuels pollinisateurs. Cette expérimentation a pour double objectif de déterminer si l'espèce requière un vecteur pollinique pour produire des fruits et de quantifier l'autofertilité, c'est-à-dire de comparer la production de fruits lorsque les pollinisateurs sont exclus à celle des fleurs laissées en conditions naturelles. De trois à cinq semaines après la pose des sacs, le nombre de capsules mures a été comptabilisé.

3. 1. 6. 2. Fécondité naturelle et émasculations

Identiquement, mais sans isoler les fleurs dans les sacs, les boutons ou les fleurs fraîchement ouvertes de la majorité des individus présents dans les sites d'études ont été marqués avec de la peinture acrylique non toxique pour les fleurs, mais résistante à l'eau. Une couleur a été choisie pour les fleurs non manipulées, laissées en pollinisation libre et une deuxième pour les fleurs émasculées (pollinies délicatement enlevées avec un crayon de 0,5 mm). L'émasculatation des fleurs permet de quantifier la fécondité sans prendre en compte les fruits issus d'autopollinisation. Il n'a toutefois pas été possible de réaliser cette manipulation sur les fleurs de *Jumellea stenophylla*. Le processus d'autopollinisation de cette espèce est en effet permis par la gélification ou la déliquescence du rostellum très tôt dans le cycle de la fleur (le premier ou le deuxième jour après l'ouverture). Les pollinies germent aussitôt ; il est pratiquement impossible d'émasculer les fleurs. En revanche, l'autopollinisation de *J. recta* suit un processus tout à fait différent, proche de celui qui fut

décrit par Catling (1980) pour *Liparis loeselii* : les pollinies effectuent un mouvement circulaire de haut en bas permettant le contact avec la surface stigmatique. Chez *Liparis loeselii*, ce mouvement est accompagné par la pluie. Un tel phénomène pourrait exister dans l'autopollinisation de *J. recta*, mais il faudrait le confirmer.

Les différentes manipulations qui ont été effectuées en 2003-2004 et 2004-2005, ainsi que le nombre de fleurs échantillonnées sont récapitulées dans le Tableau 20. Pour tous les cas envisagés, le taux de fécondité a été défini comme le nombre de fruits produits sur le nombre de fleurs ouvertes, multiplié par 100.



FIGURE 34. Illustration de l'isolement des fleurs des pollinisateurs *in situ*.

TABEAU 20. Récapitulatif des expérimentations menées en 2003-2004 (I) et en 2004-2005 (II). Le nombre de fleurs échantillonnées est donné entre parenthèses.

Espèces et populations	Pose de sacs	Fécondité naturelle	Émasculations
<i>J. triquetra</i>			
Bébour	I (15)	I (64)	I (16)
<i>J. fragrans</i>			
Plaine des Palmistes		I (51) / II (77)	
<i>J. recta</i>			
Grande Chaloupe	I (24)	I (35)	I (18)
Montauban	I (14) / II (32)	I (31) / II (46)	II (29)
<i>J. stenophylla</i>			
Eden	I (21)	I (40) / II (23)	na

3. 1. 7. Interactions proboscis-éperon

Les longueurs de proboscis ont été investies chez 12 espèces de sphinx, issues des collections du Muséum d'Histoire Naturelle de Saint Denis ou de celles de T. Pailler. La trompe humidifiée a permis son déroulement et sa mesure au 0,01 mm près au moyen d'un pied à coulisse électronique. Parallèlement, les largeurs des trompes de deux espèces, *Coelonia fulvinotata* et *Agrius convolvuli* ont été mesurées graduellement tous les centimètres le long de la trompe. Néanmoins, cette dernière manipulation ne sera pas développée par la suite. Les résultats sont décrits dans le manuscrit concernant l'étude de *J. stenophylla* disponible en Annexe 4.

3. 1. 8. Analyses Statistiques

Pour toutes les variables, la normalité des données a été vérifiée au préalable (lorsque la taille des échantillons le permettait) par l'intermédiaire du test de Shapiro-Wilk. Si les données suivaient une loi normale, l'homogénéité des variances a alors elle aussi été

vérifiée. Le choix des tests statistiques appliqués s'est fait en conséquence, tests paramétriques si la normalité des données était vérifiée, tests non-paramétriques le cas échéant. Afin que le lecteur ait connaissance des différents tests appliqués, la valeur statistique du test est donnée par la suite par l'abréviation *KW* dans le cas du test non paramétrique de Kruskal Wallis. Dans le cas d'une analyse de variance (ANOVA) paramétrique, la valeur du test sera indiquée conventionnellement *F*, *t* pour le test paramétrique de Student, *W* pour le test non-paramétrique de Wilcoxon, et enfin χ^2 dans le cas du test du Chi2. Les données ont été analysées avec les logiciels R[®] pour Mac OSX ou SPSS[®] 12.0 pour Windows.

3. 2. Résultats

3. 2. 1. Morphologie florale

La longueur de l'éperon est significativement différente entre toutes les espèces étudiées ($KW = 75,1$, $P = 0,000$). *J. stenophylla* est l'espèce qui présente l'éperon le plus long de toutes les celles que nous avons étudiées ($135,1 \pm 9,5$ mm, $N = 14$), suivi de *J. recta* ($112,3 \pm 12,3$ mm, $N = 27$), *J. fragrans* ($21,2 \pm 1,7$ mm, $N = 21$) et enfin *J. triquetra* ($8,2 \pm 1,1$ mm, $N = 24$).

La longueur de l'ovaire, la hauteur et la largeur de la colonne sont elles aussi significativement différentes entre toutes les espèces (respectivement : $F = 161,2$; $KW = 60,2$; $KW = 71,8$, $P = 0,000$ pour les trois tests) (Figure 35). Des autres traits associés à la reproduction, seul le labelle est statistiquement différent entre les espèces à long et à court éperon (longueur : $KW = 46,1$; largeur : $KW = 48,6$, $P = 0,000$ pour les deux tests). L'anthère (longueur et largeur) est morphologiquement très proche chez *J. fragrans* et chez *J. triquetra*, tandis que les mesures qui lui sont associées sont statistiquement différentes entre *J. stenophylla* et *J. recta* (longueur : $KW = 33,8$; largeur : $KW = 29,6$, $P = 0,000$ pour les deux tests).

La comparaison graphique de la distribution des mesures des segments floraux stériles (sépalés, pétales latéraux, bractée, longueur du pédicelle) est disponible en Annexe 5. Parmi ces caractères, seules les longueurs du pétale latéral et du sépale adaxial discriminent les espèces à long et à court éperon (respectivement, $KW = 57,6$; largeur : $KW = 55,9$, $P = 0,000$ pour les deux tests).

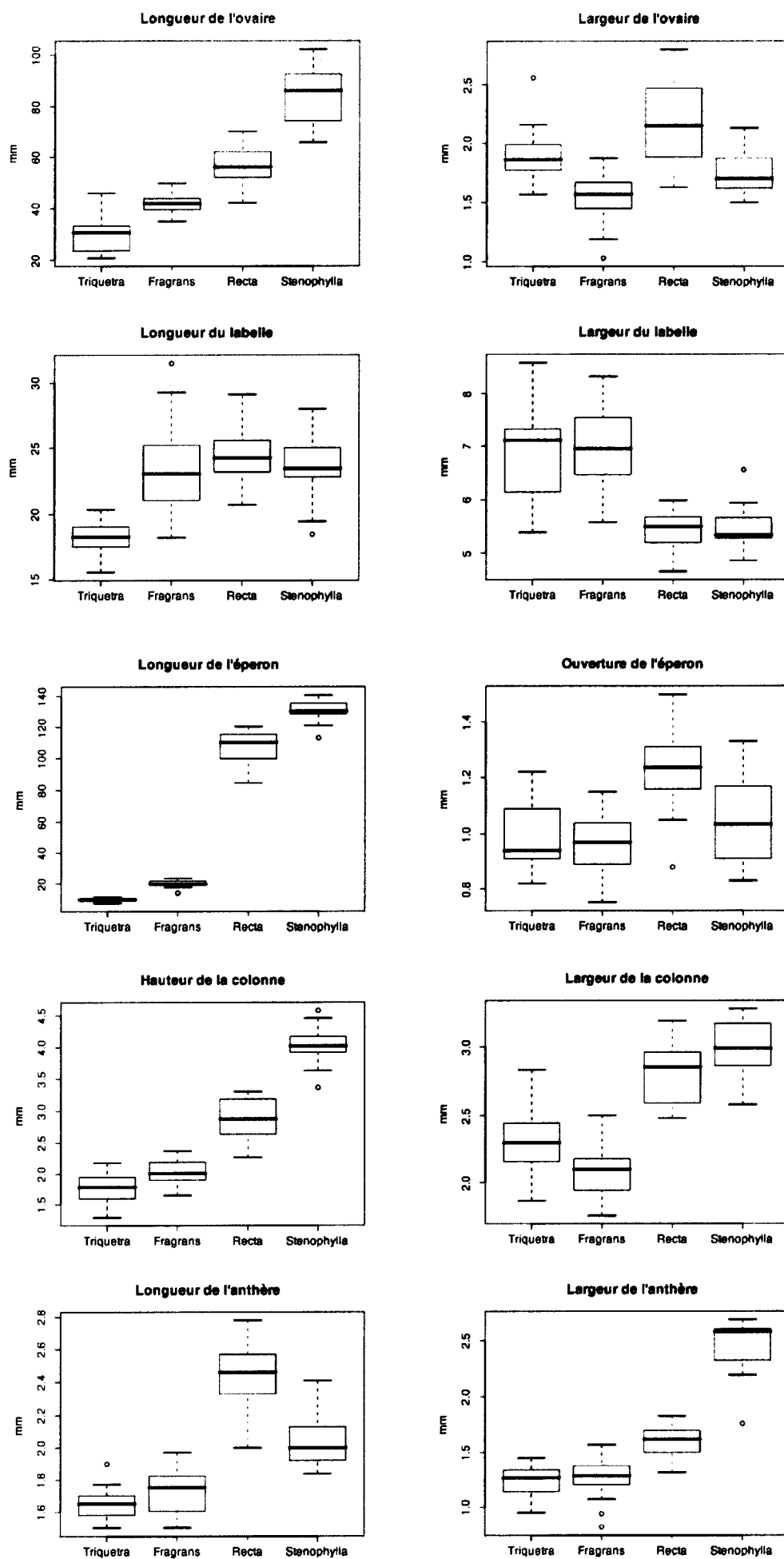


FIGURE 35.
 Comparaison des
 caractères floraux
 associés à la
 reproduction entre
J. triquetra, *J.*
fragrans, *J. recta*
 et *J. stenophylla*.

(La barre représente
 la moyenne, le
 rectangle la
 distribution de 50%
 des mesures, les
 pointillés celle de
 95% et les cercles
 correspondent aux
 mesures isolées).

3. 2. 2. Propriétés du nectar

La taille assez faible de notre échantillonnage n'est pas adéquate pour tester statistiquement les différends entre les moyennes obtenues. En conséquence, seules les tendances des résultats obtenus seront discutées.

Le pourcentage de volume occupé par le nectar décroît avec la longueur de l'éperon (Tableau 21, Figure 36). Le rapport entre la hauteur de la colonne de nectar et la longueur de l'éperon est en effet de 90% chez *J. triquetra*, 78% chez *J. fragrans*, 56% chez *J. recta* et 44% chez *J. stenophylla*. En d'autres termes, plus l'éperon est grand, moins le nectar est accessible par le pollinisateur. La production de nectar de *J. recta* est pratiquement le double de celle de *J. stenophylla* (respectivement $16,8 \pm 7,0 \mu\text{L}$ et $7,8 \pm 5,9 \mu\text{L}$), bien que l'éperon soit inférieur chez *J. recta* ($112,3 \pm 12,3 \text{ mm}$; *J. stenophylla* : $135,1 \pm 9,5 \text{ mm}$).

La teneur en sucre des espèces à court et à long éperon est peu variable, bien que *J. stenophylla* ait le nectar le moins riche en sucre. La concentration du nectar est de 28,5% en équivalent saccharose (g de saccharose pour 100 g de solution) pour *J. triquetra*, 21,1% pour *J. recta*, 19% pour *J. fragrans* et 12,9% pour *J. stenophylla* (Tableau 21).

TABLEAU 21. Longueur de l'éperon et propriétés du nectar (moyenne $\pm$ écart type, nombre de répétitions).

	Eperon court		Eperon long	
	<i>J. triquetra</i>	<i>J. fragrans</i>	<i>J. recta</i>	<i>J. stenophylla</i>
Longueur éperon (mm)	8,2 $\pm$ 1,1 (24)	21,2 $\pm$ 1,7 (21)	112,3 $\pm$ 12,3 (27)	135,1 $\pm$ 9,5 (14)
Colonne nectar (mm)	7,4 $\pm$ 1,7 (24)	16,6 $\pm$ 3,8 (15)	74,5 $\pm$ 12,7 (27)	59,5 $\pm$ 22,1 (14)
Longueur sans nectar (mm)	0,8 $\pm$ 0,7 (24)	4,0 $\pm$ 3,5 (15)	37,8 $\pm$ 20,5 (27)	75,6 $\pm$ 17,3 (14)
Volume nectar (μ L)	na ^a	na ^a	16,8 $\pm$ 7,0 (26)	7,8 $\pm$ 5,9 (12)
Teneur saccharose (g/100g)	28,5 ^b (15)	19 ^b (21)	21,1 $\pm$ 5,9 (14)	12,9 $\pm$ 1,5 (12)

^a Chez *J. triquetra* et *J. fragrans*, les volumes trop faibles du nectar n'ont pas permis leur mesure avec les tubes capillaires.

^b Du fait de la faible quantité de nectar chez *J. triquetra* et *J. fragrans*, l'indice de réfraction a été mesuré sur le nectar mélangé de l'ensemble des fleurs.

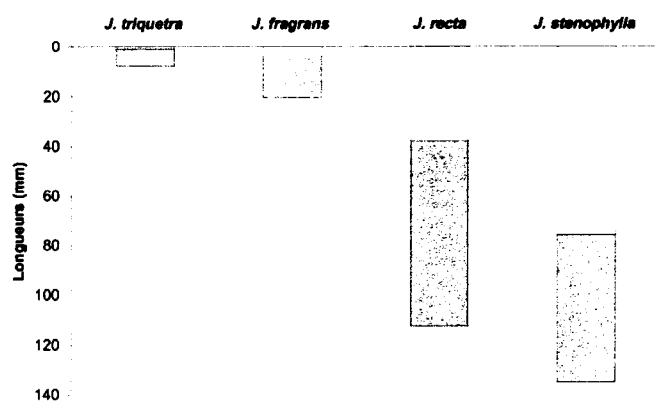


FIGURE 36. Longueur de l'éperon et de la colonne de nectar (en gris).

3. 2. 3. Analyses du bouquet floral

La composition du bouquet floral émis par six espèces du genre *Jumellea* (*J. triquetra*, *J. rossii*, *J. fragrans*, *J. recta*, *J. stenophylla* et *J. arborescens*) a été déterminée par la technique de la microextraction sur phase solide (SPME) suivie d'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Pour chaque espèce, les analyses ont été entreprises le jour et la nuit afin de rendre compte de la variabilité de la composition chimique de leurs émissions volatiles sur 24 heures.

Pour toutes les espèces étudiées, les chromatogrammes obtenus suite aux adsorptions nocturnes se sont avérés non seulement plus intenses mais aussi plus riches par le nombre de composés détectés. Les analyses effectuées de nuit ont donc été choisies pour comparer les différentes espèces (Tableau 22). Pour *J. triquetra*, les résultats, qui n'ont pas été reproductibles, n'ont pas été relevés dans le tableau. Dans le contexte de cette étude, la composition olfactive de l'espace de tête est donc illustrée pour les formes florales à court éperon par *J. fragrans* et *J. rossii* (l'espèce sœur de *J. triquetra*, dont l'éperon mesure en moyenne 22 mm) et pour les fleurs à long éperon par *J. stenophylla*, *J. recta* et *J. arborescens*.

Les résultats obtenus montrent clairement que la composition chimique des émissions volatiles est très différente selon l'espèce étudiée. Quatre profils olfactifs peuvent être distingués³⁷ (Tableau 22) :

(1) *J. rossii* révèle un espace de tête riche par le nombre de composés qu'il renferme. Son bouquet floral se caractérise par la présence dominante du *E*- β -ocimène, hydrocarbure monoterpénique aux notes chaudes et herbacées rappelant l'huile essentielle de néroli (nom attribué à l'huile essentielle des fleurs d'oranger amer). Cet hydrocarbure est en outre associé à la présence de composés aromatiques à fort impact olfactif : le benzaldéhyde

³⁷ Les notes olfactives des composés volatils identifiés ont été relevés dans l'ouvrage de S. Arctander (Arctander, 1994).

(odeur d'amande amer), l'eugénol et l'isoeugénol (odeur épicée du clou de girofle).

(2) *J. fragrans* émet un parfum fort agréable aux nuances multiples. Sa composition chimique comprend en effet de nombreux volatiles, principalement de la classe des composés aromatiques, dont l'eugénol, composé majoritaire aux notes du clou de girofle, le benzaldéhyde, puissant, sucré, rappelant l'amande amer, l'alcool benzylique aux notes plus douces et l'acétate de benzyle, mêlant odeurs de miel et de musc, évoquant également les notes florales du jasmin. La coumarine, forte appréciée des parfumeurs, est également présente. Elle est responsable de la tenue d'un parfum en apportant une note de fond tenace. Elle a la capacité de lier les notes et de prolonger alors l'effet du parfum. De surcroît, la douceur et la chaleur de ses notes sont très appréciées lorsqu'elle entre dans une composition.

(3) *J. stenophylla* se singularise par la présence majoritaire de l'indole dans son espace de tête. À forte concentration, l'indole, dérivé azoté, répand un parfum puissant aux notes ammoniaquées tout à fait désagréables. En faible concentration, ou lorsqu'il entre dans une composition, il offre en revanche une note florale plus douce, très plaisante. Dans le cas particulier de *J. stenophylla*, l'indole ne constitue pas l'unique composé du parfum émis. Il est l'élément majoritaire d'une composition comprenant au moins quatre autres composés détectés par la technique de la SPME : le benzaldéhyde, l'alcool benzylique, le benzoate de méthyle et le *cis*-oxyde de linalol sous sa forme pyranoïque. Outre la note florale de l'indole et l'odeur puissante d'amande amer que confère le benzaldéhyde, le parfum de *J. stenophylla* est également empreint des notes lourdes et sucrées, profondément florales quoi que légèrement fruitées mais aussi âcres du benzoate de méthyle et des notes fortes, sucrées, boisées et terreuses de l'oxyde de linalol. Cependant, l'émission de ces composés doit se faire de façon très ponctuelle car à aucun moment où nous avons tenté de sentir le parfum de *J. stenophylla*, nous n'avons perçu la moindre

odeur, même légère. Il serait intéressant de déterminer par la suite, les horaires exacts (heure, durée d'émission) des molécules olfactives synthétisées par les fleurs de *J. stenophylla*.

(4) *J. recta* et *J. arborescens* présentent des chromatogrammes semblables, extrêmement épurés. La présence unique du linalol apporte des notes légères, florales, boisées, rafraîchissantes, légèrement citronnées. Toutefois, si le parfum de *J. arborescens* est suffisamment intense pour être détecté par l'odorat humain, celui de *J. recta* ne l'est pas. Cette observation se traduit sur les chromatogrammes par la hauteur du pic du linalol, de très forte intensité pour *J. arborescens*, beaucoup plus faible pour *J. recta*.

TABLEAU 22. Composition chimique des émissions volatiles nocturnes des fleurs de *J. rossii*, *J. fragrans*, *J. stenophylla* (*J. steno*), *J. recta* et *J. arborescens* (*J. arbo*).

Composés par classe chimique	IRR ^a	Eperons courts		Eperons longs		
		<i>J. rossii</i> ^b	<i>J. fragrans</i> ^b	<i>J. steno</i> ^b	<i>J. recta</i> ^b	<i>J. arbo</i> ^c
Monoterpènes						
<i>Alcools</i>						
linalol	1098				+++	+++
cis-oxyde de linalol (pyranoïque)	1174			++		
non identifié						-
<i>Hydrocarbures</i>						
α -trans-bergamotène	1435		+			
limonène	1031	-				
myrcène	991	++				
Z- β -ocimène	1040	+				
E- β -ocimène	1050	+++				
allo-ocimène	1129	+				
néo-allo-ocimène	1142	++				
1,3,8-para-menthatriène	1111	+				
γ -terpinène	1062	+				
non identifié		-				
Sesquiterpènes						
<i>Hydrocarbures</i>						
Z-calaménène	1521	-				
non identifié		-				
Composés aromatiques						
<i>Alcools</i>						
alcool benzylique	1035		+++	+		
chavicol	1250		+			
eugénol	1359	++	+++			
E-isoeugénol	1452	+	++			
Z-isoeugénol	1407		+			
E-méthylisoeugénol	1492		+			
méthyleugénol	1404	+	++			
para-crésol	1076		-			
non identifié			-			
<i>Aldéhydes</i>						
benzaldéhyde	960	+	++	++		
<i>Esters</i>						
acétate de benzyle	1166		+++			
benzoate de benzyle	1760		++			
benzoate de méthyle	1091			+		
tiglate de benzyle	1498		++			
<i>Hydrocarbures</i>						
mésitylène	996		-			
Composés divers						
coumarine	1434		++			
dodécane	1200		+			
indole	1288			+++		
undécane	1100		+			
β -thujaplicinol	1538		+			

^a Indices de rétention relatifs obtenus sur colonne SPB-5 ; ^b Espèces réunionnaises ; ^c Espèce malgache, - composé présent à l'état de traces (abondance, $a < 1.10^5$) ; + composé présent peu abondant ($1.10^5 \leq a \leq 1.10^6$) ; ++ composé abondant ($1.10^6 < a \leq 1.10^7$) ; +++ composé majoritaire ($a > 1.10^7$).

La composition chimique de l'espace de tête est donc très différente selon les fleurs analysées : les espèces à court éperon (*J. rossii* et *J. fragrans*) se caractérisent par la richesse de leur bouquet floral associant à la fois diversité des composés volatils et intensité de leur émission. Les espèces réunionnaises à long éperon (*J. stenophylla* et *J. recta*) sont loin d'émettre à la tombée de la nuit, les odeurs puissantes et enivrantes des formes florales associées au syndrome sphingophile. Concernant tout d'abord *J. stenophylla*, nos analyses ont montré que cette espèce émet principalement de l'indole. Or, cette molécule s'avère être majoritaire dans les profils olfactifs associés aux fleurs sphingophiles, mais uniquement au très jeune stade de la vie des fleurs, juste avant qu'elles se développent entièrement (trois à quatre jours après l'ouverture des boutons) et qu'elles commencent à émettre leur parfum puissant, caractéristique (Kaiser, 1993). Chez *J. stenophylla*, la longévité de la fleur est précocement écourtée par l'autopollinisation systématique des pollinies sur le stigmate. En conséquence, nos analyses n'ont pu être effectuées que sur de très jeunes fleurs. Les résultats que nous avons obtenus correspondent donc bien aux profils olfactifs de fleurs sphingophiles mais juvéniles. Quant à la composition chimique du bouquet floral de *J. recta*, elle suit un tout autre schéma. Elle se rapproche de celle de son espèce sœur de Madagascar (*J. arborescens*). Ces deux espèces se distinguent cependant par l'intensité de l'odeur dégagée, intensité qui semble dérisoire chez *J. recta* (non détectable par l'odorat humain).

3. 2. 4. Succès de la pollinisation et de la reproduction

3. 2. 4. 1. Fécondité des fleurs isolées des pollinisateurs

L'isolement des fleurs *in situ* dans les sacs a tout d'abord confirmé que les espèces à court éperon, *J. fragrans* et *J. triquetra*, ne sont pas capables de s'autoféconder sans vecteur pollinique (Tableaux 23 et 24). De la même façon, toutes les fleurs non manipulées de l'espèce malgache à long éperon, *J. arborescens* n'ont produit aucun fruit (fleurs exclues de tout pollinisateur à la nurserie du RBG Kew). Cette espèce semble elle aussi incapable de se reproduire sans l'aide de pollinisateurs (Tableau 24). *J. arborescens* est en outre autocompatible : 100% des fleurs manuellement pollinisées en autofécondation ont développé un fruit (N = 12 fleurs).

En revanche, les fleurs isolées dans les sacs des deux espèces à long éperon, *J. recta* et *J. stenophylla* ont toutes deux produits des fruits : pour *J. recta* le taux de capsules produites a été de 45,8% à la GC et de 57,4% à MB en 2003-2004 et de 100% à MB en 2004-2005 ; pour *J. stenophylla*, le nombre de fruits issus de fleurs isolées a été de 66,7% à l'Eden en 2003-2004 (Tableau 23 et 24). La fécondité des fleurs lorsque les pollinisateurs ont été exclus n'est pas statistiquement différente de celle des fleurs laissées en pollinisation libre ($P > 0,05$ dans tous les cas), suggérant que les pollinisateurs ne jouent aucun rôle dans la pollinisation de ces deux espèces autofertiles à long éperon à La Réunion.

TABLEAU 23. . Pourcentage de fruits produits (nombre de fleurs échantillonnées) selon les traitements en 2003-2004 (GC : Grande Chaloupe ; MB : Montauban ; ED : Eden ; Kew : RBG Kew ; BB : Bébou ; PP : Plaine des Palmistes).

Espèces	Traitements		
	Fleurs isolées	Fleurs libres ^a	Fleurs émasculées
Eperon long			
<i>J. recta</i> GC	45,8 ^b (24)	38 (35)	0 (18)
<i>J. recta</i> MB	57,1 ^b (14)	70,4 (31)	na
<i>J. stenophylla</i> ED	66,7 ^b (21)	77,5 (40)	na
<i>J. arborescens</i> Kew	0 ^c (51)	na	na
Eperon court			
<i>J. triquetra</i> BB	0 ^b (15)	34,4 (64)	0,6 (16)
<i>J. fragrans</i> PP	na	9,8 (51)	na

^a Fécondité naturelle ; ^b *in situ* (exclusion des pollinisateurs par isolement des fleurs dans les sacs) ; ^c *ex situ* (nursérie du RBG Kew).

TABLEAU 24. . Pourcentage de fruits produits (nombre de fleurs échantillonnées) selon les traitements en 2004-2005 (MB : Montauban ; BB : Bébou ; PP : Plaine des Palmistes).

Espèces	Traitements		
	Fleurs isolées	Fleurs libres ^a	Fleurs émasculées
Eperon long			
<i>J. recta</i> MB	100 ^b (32)	80,4 (46)	0 (29)
<i>J. stenophylla</i> ED	nd	56,6 (23)	na
Eperon court			
<i>J. fragrans</i> PP	na	6,5 (77)	na

^a Fécondité naturelle ; ^b *in situ* (exclusion des pollinisateurs par isolement des fleurs dans les sacs)

3. 2. 4. 2. Fécondité des fleurs émasculées versus fécondité naturelle

Chez *J. recta*, autofertile, aucun fruit n'a été initié de fleurs émasculées (Tableaux 23 et 24), suggérant une fois encore que les pollinisateurs ne visitent pas les fleurs de cette espèce. La fécondité des fleurs émasculées, bien que très faible chez *J. triquetra* (un seul fruit produit), n'est cependant pas nulle. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir les résultats pour *J. fragrans*. La taille des échantillons des fleurs émasculées reste globalement assez faible.

3. 2. 4. 2. Fécondité naturelle : long éperon versus court éperon

La fécondité naturelle des espèces à long éperon autofertiles est globalement meilleure que celle des espèces à court éperon qui requièrent l'aide de pollinisateurs pour se reproduire (Tableau 23 et 24), bien que, dans le cas particulier de la population de *J. recta* de la Grande Chaloupe en 2003-2004, la fécondité (38%) fut à la fois plus faible que celle de la population de Montauban (70,4%), mais aussi statistiquement équivalente à celle de *J. triquetra*, espèce non autofertile (34,4%) ($\chi^2 = 0,146$; $P = 0,702$).

Parmi les espèces à court éperon, la fécondité de *J. fragrans* fut extrêmement faible à la Plaine des Palmistes, inférieure à 10% de fruits produits, quelles que soient les années.

3. 2. 5. Interactions proboscis-éperon

Les longueurs de proboscis des sphinx varient de 13 mm pour *Acherontia atropos* L. ($\pm 0,0$, N = 2) à 89,2 mm chez *Agrius convolvuli* L. ($\pm 12,9$, N = 9). Les mesures intermédiaires par ordre croissant sont : 18,0 mm pour *Cephonodes hylas* L. (N = 1), 28,0 mm pour *Macroglossum milvus* Boid. (N = 1), 28,5 mm pour *Hyles biguttata* Walk. ($\pm 4,9$, N = 2), 33,0 mm pour *Hippotion celerio* L. ($\pm 2,3$, N = 5), 37,0 mm pour *Euchloron megaera* L. ($\pm 1,0$, N = 3), 39,8 mm pour *Hippotion eson* Cram. (SD = 4,0, N = 8), 41,8 mm pour *Daphnis nerii* L. ($\pm 1,7$, N = 4), 53,9 pour *Nephele densoi* Keferst. (N = 1), 56,5 mm pour *Nephele oenopion* Hübn. ($\pm 0,6$, N = 4), et 81,0 mm pour *Coelonia fulvinotata* Butl. ($\pm 8,9$, N = 5). Lorsque ces longueurs sont mises en vis-vis avec la taille d'éperon et la hauteur moyenne du nectar qu'il contient des deux espèces à long éperon réunionnaises, il apparaît que *J. recta* et *J. stenophylla* n'admettent pas la même gamme de pollinisateurs potentiels, bien plus large chez *J. recta* (Figure 37). Tandis que cinq ou six espèces auraient potentiellement la capacité d'exploiter le nectar de *J. recta*, la morphologie buccale de deux sphinx uniquement *A. convolvuli* et *C. fulvinotata* leur permettrait d'être candidats à la pollinisation de *J. stenophylla* (Figure 37). Une étude plus approfondie suggère néanmoins que les trompes de ces deux lépidoptères, *A. convolvuli* et *C. fulvinotata*, sont trop larges pour leur permettre de collecter le nectar de *J. stenophylla* (cf. manuscrit sur *J. stenophylla*, Annexe 4). De telles études n'ont pas été envisagées pour les pollinisateurs potentiels de *J. recta*, mais son nectar bien plus abondant dans l'éperon ne conduirait assurément pas aux mêmes conclusions. Dans le cas particulier de *J. recta*, l'interactions sphinx-orchidée semble mécaniquement envisageable.

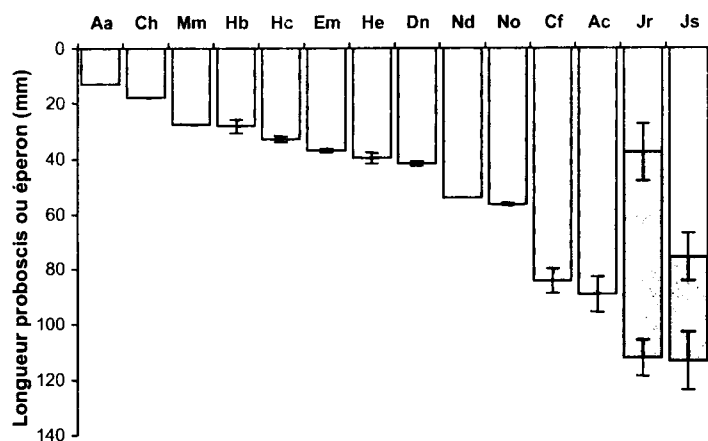


FIGURE 37. Longueur (moyenne $\pm$ $\frac{1}{2}$ écart type) des proboscis (hachuré) et des éperons (blanc) (la colonne de nectar est représentée en gris).

Aa : *Acherontia atropos* ; Ch : *Cenophodes hylas* ; Mm : *Macroglossum milvus* ; Hb : *Hyles biguttata* ; Hc : *Hippotion celerio* ; Em : *Euchloron megaera* ; He : *Hippotion eson* ; Dn : *Daphnis nerii* ; Nd : *Nephele densoi* ; No : *Nephele oenopion* ; Cf : *Coelonia fulvinotata* ; Ac : *Agrius convolvuli* ; Jr : *Jumellea recta* ; Js : *Jumellea stenophylla*.

3. 3. Discussion

Les résultats de cette étude préliminaire demandent à être confirmés, mais il est possible d'en dégager les principales tendances.

3. 3. 1. Autofertilité : Réunion *versus* Madagascar

La mise en place de l'autofertilité chez les espèces à long éperon semble spécifique aux espèces réunionnaises, bien qu'il faille approfondir les recherches à Madagascar. Parmi toutes les études effectuées sur la pollinisation des espèces malgaches aucun cas d'autofertilité n'a été recensé (e.g. Nilsson et al., 1985, 1987; Nilsson et Rabakonandrianina, 1988 ; Wasserthal, 1997), à l'image de l'exemple malgache de notre étude, *J. arborescens*, qui requiert également l'aide de pollinisateurs pour sa reproduction (Tableau 25, Figure 38). *J. arborescens* est en revanche autocompatible. L'autocompatibilité est dominante chez les orchidées (Tremblay et al., 2005). A l'image de cette tendance, toutes les orchidées angraecoïdes de la Réunion le sont également. L'autocompatibilité a certainement permis la mise en place de l'autofertilité chez les espèces réunionnaises.

La production de fruits des espèces à long éperon, *J. stenophylla* et *J. recta* fut quasiment identique selon que les fleurs aient été isolées ou non du contact des pollinisateurs. De plus, toutes les fleurs de *J. recta* que nous avons émasculées ont avorté sans donner de fruits. Comme il était attendu, la relation plante-pollinisateur chez ces espèces autofertiles semble inexistante.

TABLEAU 25. Espèces à long éperon : *Jumellea recta* versus *J. arborescens*

Répartition	Réunion	Madagascar
Espèces	<i>J. recta</i>	<i>J. arborescens</i>
Longueur éperon	112 mm	115 mm
Odeur	Linalol (peu abondant)	Linalol (très abondant)
Nectar	Oui	Oui
Autocompatibilité	Oui	Oui
Autofertilité	Oui	Non

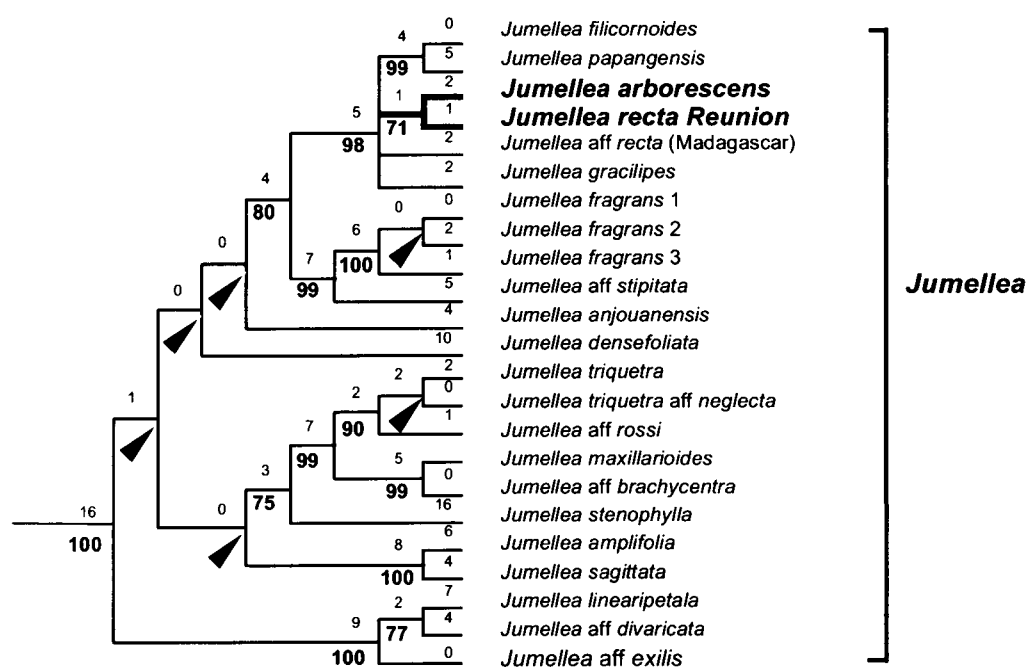


FIGURE 38. *Jumellea recta* et *J. arborescens* : deux espèces sœurs (arbre repris de la Figure 13).

3. 3. 2. Mécanismes de l'autopollinisation

Cependant, les mécanismes qui permettent l'autopollinisation des fleurs pour *J. stenophylla* et pour *J. recta* suivent deux processus tout à fait différents. Pour *J. stenophylla*, l'autofertilité s'accompagne de modifications structurales de la colonne conduisant à la déliquescence systématique du rostellum et à la germination consécutive des pollinies sur la surface stigmatique. Le phénomène de gélification du rostellum a lieu très tôt dans la vie de la fleur. Lorsqu'elle est ainsi pollinisée, la fleur fane aussitôt, expliquant la très courte longévité des fleurs de *J. stenophylla* (quatre jours maximum) (Annexe 4), longévité florale tout à fait dérisoire comparée à celle dont les espèces interagissent avec la faune pollinisatrice. Les fleurs de *Mystacidium venosum* Harve ex. Rolf par exemple, pollinisées par des sphinx en Afrique du Sud restent ouvertes 24 jours en moyenne (Luyt and Johnson, 2001). Selon P. M. Catling, les modifications structurales de la colonne traduisent une adaptation complexe à l'autofertilité (Catling, 1990). Le processus d'autopollinisation spontanée par la gélification du rostellum a également été décrit chez *Angraecum borbonicum*, espèce autofertile souvent cléistogame endémique de la Réunion (Bossier, 1988).

L'autofertilité chez *J. recta* s'accompagne d'une moindre spécialisation et s'exprime par la présence de modifications mineures de la morphologie florale, contrairement aux modifications structurales de *J. stenophylla*. Elle est permise par le basculement des pollinies sur la surface stigmatique par mouvement circulaire des caudicules. Ce processus d'autofécondation a été plusieurs fois décrit chez les espèces autofertiles de la tribu des Vandaeae, chez laquelle ce mécanisme d'autopollinisation est le plus commun (van der Pijl et Dodson, 1966 ; Catling, 1990).

3. 3. 3. Évolution des traits floraux (morphologie, nectar, odeur) : espèces autofertiles versus espèces dépendantes d'un vecteur pollinique

Généralement, les espèces autofertiles ont un éperon court ou absent (Catling, 1990). Chez la majorité des espèces à long éperon³⁸ réunionnaises, l'évolution vers l'autopollinisation a stigmatisé les traits de leurs ancêtres sans réduction de la taille de l'éperon, taille reproduite à l'identique au fil des générations. Si la taille de l'éperon varie rapidement sous l'influence des pressions sélectives des pollinisateurs (e.g. Inoue, 1986 ; Johnson et Steiner, 1997 ; Johnson et al., 1998 ; Ellis et Johnson, 1999), chez les orchidées angraecoïdes réunionnaises, elle n'a pas été contre-sélectionnée (i.e. réduction du coût énergétique) lors des processus évolutifs autorisant l'autopollinisation, du moins pas dans les premiers temps. Le cas de *J. stenophylla* en est représentatif : les nombreuses modifications structurales de la colonne suggèrent un degré élevé de l'évolution vers l'autofertilité bien que la taille de l'éperon dépasse 135 mm. En revanche, pour *A. borbonicum*, dont la spécialisation pour l'autopollinisation est encore plus élevée (modifications structurales de la colonne et cléistogamie), la taille de l'éperon est beaucoup plus courte. Est-ce dû à l'évolution vers l'autofertilité, était-ce sa taille originelle avant colonisation de l'île ?

Concernant le volume de nectar produit, bien qu'il soit logiquement beaucoup plus conséquent chez les espèces à long éperon, *J. stenophylla* semble en produire toutefois moins que sa consœur *J. recta*, malgré un éperon légèrement plus grand. La teneur en saccharose semble assez homogène pour toutes les espèces étudiées, toutefois moindre pour *J. stenophylla* (29% en équivalent saccharose pour *J. triquetra*, 21% pour *J. recta*, 19% pour *J. fragrans* et 13% pour *J. stenophylla*). La concentration en saccharose des

³⁸ Voir commentaires ci-dessous sur *A. borbonicum*.

espèces que nous avons étudiées s'inscrit cependant dans l'intervalle relevé de la littérature pour les orchidées angraecoïdes lépidoptérophiles, qui varie de 5% à 24% en équivalent saccharose avec une moyenne de 14,7% ($\pm 5,7$; N = 7) (données issues de Nilsson et al., 1985, 1987; Nilsson et Rabakonandrianina, 1988; Luyt et Johnson, 2001; Wasserthal, 1997), suggérant que les espèces autofertiles réunionnaises ne produisent pas un nectar moins riche en sucre.

Toutefois, pour *J. stenophylla*, la production de nectar assez faible et moins riche en saccharose pourrait être la conséquence de la réabsorption du nectar par la plante après pollinisation. Ce phénomène a déjà été mis en évidence chez certaines orchidées angraecoïdes sans être pour autant lié à l'autopollinisation (Koopovitz et Marchant 1998; Luyt et Johnson 2002). Luyt and Johnson (2002) par exemple ont montré que la réabsorption du nectar (très certainement des carbohydrates) après fécondation augmente la taille du fruit et la viabilité des embryons chez *Mystacidium venosum*. Chez *Platanthera chlorantha*, le saccharose présent dans le nectar a été retrouvé dans les fruits initiés après fécondation des fleurs (Stpiczyńska, 2003).

La synthèse des composés volatils joue un rôle majeur dans l'attraction des lépidoptères nocturnes. L'étude de la composition volatile de l'espace de tête des fleurs associées au syndrome de pollinisation shingophile a permis de caractériser le bouquet olfactif de ces espèces, qui peut être composé de plus d'une centaine de molécules (Kaiser, 1993 ; Kaiser et Tollsten, 1995 ; Levin et al., 2001), principalement de la classe des terpènes, des composés aromatiques et des composés azotés (Kaiser, 1993 ; Raguso et al., 2003). Les deux espèces à court éperon que nous avons étudiées, pour lesquelles la relation avec les pollinisateurs est maintenue, *J. rossii* et *J. fragrans*, sont également caractérisées par un espace de tête riche de composés à fort impact olfactif. Comme nous l'avons vu, la

fanaison précoce des fleurs de *J. stenophylla* semble inhiber la synthèse des composés volatils, bien la composition de son bouquet soit à l'image de celle des fleurs sphingophiles, mais juvéniles (Kaiser, 1993) (Annexe 4). *J. recta* et *J. arborescens*, dont la synthèse du linalol de façon pratiquement exclusive a été mise en évidence, confirme le rapprochement phylogénétique de ces deux espèces inféré de la phylogénie moléculaire. Elles se singularisent néanmoins par la pauvreté des composés volatils synthétisés. *J. recta* se distingue de *J. arborescens* par la faible abondance de l'odeur émise, non perceptible par l'odorat humain. La perte de la relation plante-pollinisateur chez cette espèce autofertile est certainement à mettre en relation avec la synthèse beaucoup plus faible du linalol.

3. 3. 4. Flux de pollen *versus* autofertilité

L'interaction avec les pollinisateurs devrait favoriser l'allogamie chez les espèces à court éperon et le flux de gènes entre les individus. Cependant, l'importance de la géitonogamie dans la reproduction de *J. triquetra* et de *J. fragrans* est inconnue. *J. fragrans* a une fécondité extrêmement faible (< 10%), largement inférieur à la moyenne de celle des orchidées tropicales nectarifères qui est d'environ 30% (Tremblay et al., 2005). La production de fruits de *J. triquetra* à Bébou est elle légèrement supérieure à ce taux. *J. fragrans* appartient avec *J. triquetra* aux rares espèces ayant une large répartition sur l'île (Figure 39). À l'opposé, les espèces autofertiles, à l'exception d'*A. borbonicum*, sont extrêmement rares (Figures 39 et 40). La fréquence bimodale d'occupation des sites est assez surprenante : l'autofertilité confère l'assurance reproductive et un taux de fécondité record aux espèces (77% de moyenne générale chez la famille, Tremblay et al., 2005). Il est attendu qu'elles aient une large répartition (Catling, 1990 ; S. D. Johnson, communication personnelle), à l'image d'*A. borbonicum*. La destruction massive des

habitats de *J. recta* (zones sèches) (Strasberg et al., in press) pourrait expliquer la faible distribution actuelle. Quand l'espèce est présente, les populations de *J. recta* sont en général de taille moyenne. *J. stenophylla* en revanche n'est jamais abondante. Outre l'action possible de la dépression de consanguinité liée au régime reproducteur autogame avant la purge d'allèles délétères, les contraintes écologiques pourraient être le facteur limitant du développement de *J. stenophylla*. Il faudrait le quantifier de façon plus rigoureuse, mais son développement quasi spécifique sur *Pandanus montanus* semble restreindre ses capacités de dispersion. L'habitat spécifique des fourrés à *Pandanus* est également très menacé, fragmenté ou détruit.

La répartition assez restreinte des orchidées angraecoïdes autofertiles est en outre à corréler avec la date d'arrivée des souches ancestrales sur l'île, des niches écologiques alors disponibles, et du temps écoulé avant la mise en place de l'autofertilité, qui agit par ailleurs comme un facteur important dans l'isolement reproducteur des espèces et dans les processus de spéciation (Catling, 1990). P. M. Catling (1990) suggère que les processus menant à l'autofertilité sont sous contrôle génétique, certainement peu influencés par les conditions géoclimatiques de l'environnement. Mais la manière dont s'opèrent ces processus est très peu connue. L'autofertilité peut procurer de nombreux avantages à long terme aux individus (voir Catling, 1990 pour de plus amples références) ; l'assurance reproductive apparaît cependant comme l'avantage le plus déterminant.

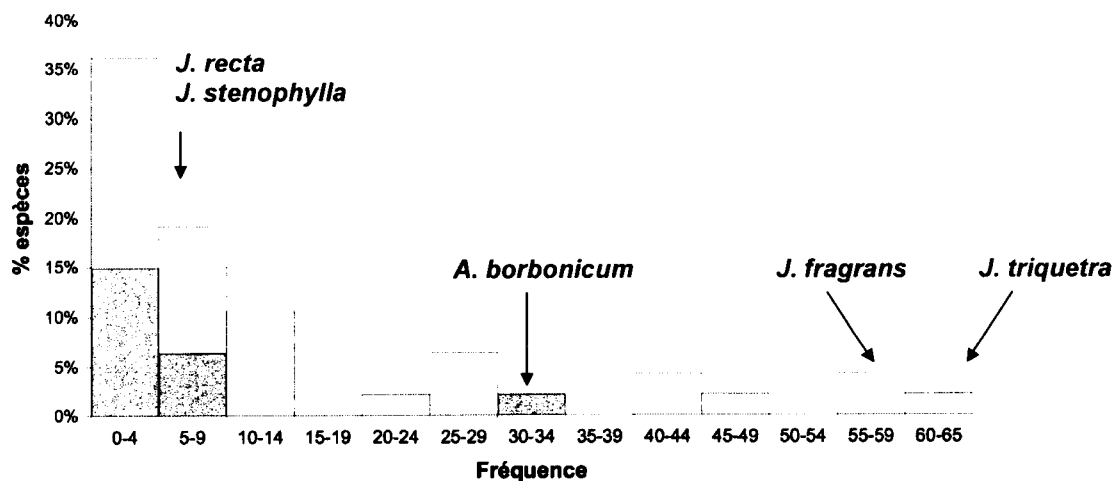


FIGURE 39. Fréquence de distribution des orchidées angraecoïdes de la Réunion sur 121 sites prospectés. Les histogrammes gris représentent la proportion d'espèces autofertiles dans chaque classe de fréquence.

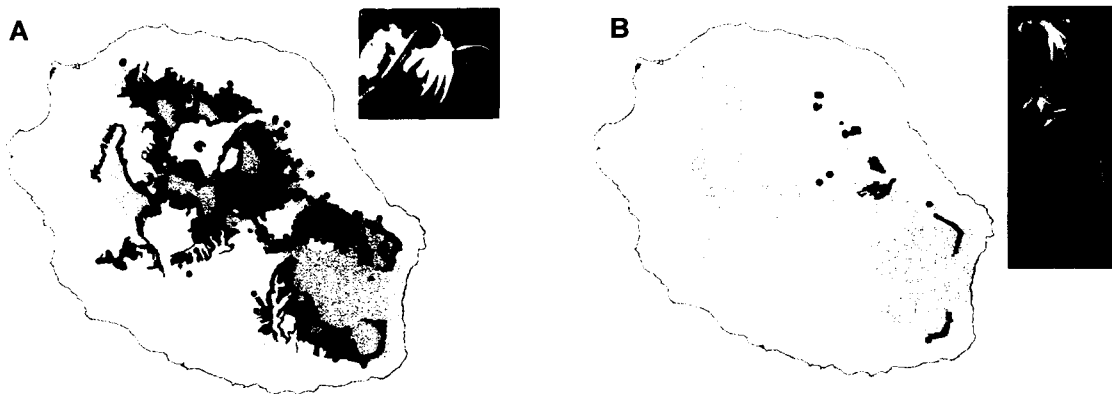


FIGURE 40. Répartition des espèces (points rouges) dans les sites inventoriés de La Réunion (vert clair : zones de végétation préservées sur l'île ; vert foncé : distribution possible correspondant au type d'habitat dans lequel l'espèce a été inventoriée). **A.** *Jumellea triquetra* (dépendante de pollinisateurs). **B.** *J. stenophylla* (autofertile).

L'autofertilité, bien qu'elle interdise le croisement entre individus n'est pas nécessairement synonyme de non-variabilité génétique, puisqu'elle fait intervenir la fusion de deux gamètes et donc le brassage des gènes (contrairement aux formes d'apomixie variées). Les pressions sélectives individuelles liées à la reproduction autonome permettent l'évolution de structures plus efficaces pour l'autopollinisation. Les différents degrés d'adaptation à l'autofertilité chez les espèces réunionnaises semblent indiquer que ces pressions agissent de façon prioritaire et plus conséquente sur les structures morphologiques de la colonne qui favorisent l'autopollinisation que sur les structures qui assureraient un gain énergétique à la plante comme en atteste la faible contre-sélection des traits floraux associés à l'attraction des pollinisateurs, bien qu'ils soient parmi les plus coûteux.

Enfin, si l'autofertilité permet la spéciation (lorsque le processus est poussé, les formes florales sont totalement différentes de leurs ancêtres, Catling, 1990), la radiation d'espèces à partir de souches autofertiles n'a pas eu lieu à La Réunion. À l'opposé, les espèces à court éperon, qui ont su s'approprier les services des pollinisateurs locaux pour leur reproduction se sont toutes diversifiées chez les *Jumellea* (*J. triquetra* / *J. rossii* ; *J. fragrans* / *J. stipitata*). Cependant l'arbre phylogénétique n'est pas suffisamment résolu pour en déduire avec certitude les formes ancestrales respectives des deux groupes. Elles auraient pourtant permis de mieux comprendre si les espèces se sont adaptées aux pollinisateurs locaux ou si leur groupe fonctionnel de pollinisateurs était déjà présent sur l'île lors de la colonisation. Il semblerait que la souche du clade *J. triquetra* / *J. rossii* soit issue d'espèces à court éperon de Madagascar. Les espèces les plus proches de ce groupe sur l'arbre phylogénétique sont en effet *J. maxillarioides* et *J. brachycentra*, toutes deux malgaches à éperon court inférieur à 50 mm. Pour le clade formé de *J. fragrans* et *J. stipitata*, il est plus prudent de ne pas s'avancer car le regroupement d'espèces dont il est le

plus proche (clade non résolu) contient à la fois des espèces à court éperon (*J. filicornoides*, éperon 20-30 mm, africaine, la Croix et la Croix, 1997) et à long éperon (*J. arborescens*, *J. gracilipes*, *J. papangensis*, *J. sp. aff recta*, éperon > 80 mm, malgaches, Perrier de la Bâthie, 1941, et *J. recta*, éperon 112 mm, Mascareignes). Les processus de radiation de ces espèces à la Réunion restent à étudier, néanmoins le rôle de l'interaction plante-pollinisateur y a certainement été déterminant.

3. 4. Conclusions et perspectives

Les principales conclusions de cette première étude sur les espèces autofertiles à long éperon du genre *Jumellea* de la Réunion, étude préliminaire, sont les suivantes :

- 1) La relation grands sphinx - orchidées à long éperon est rompue à la Réunion suggérant une colonisation décalée des espèces et/ou l'absence du pollinisateur spécifique lors de l'installation des populations sur l'île. Elle suggère également l'incapacité des espèces autofertiles à s'adapter aux pollinisateurs ayant éventuellement colonisés la Réunion plus tardivement.
- 2) Pour *J. stenophylla*, les modifications structurales de la colonne liées au mécanisme d'autopollinisation semblent empêcher toute relation avec la faune pollinisatrice locale.
- 3) Pour *J. recta* en revanche le processus est bien moins établi.
- 4) Pour les espèces autofertiles, l'étude des traits floraux sous l'influence majeure des pollinisateurs a montré que la taille de l'éperon est majoritairement invariable et la production de nectar est aussi riche en sucre que celle des espèces sphingophiles. Toutefois, les possibilités de réabsorption des carbohydrates du nectar après autopollinisation des fleurs demandent à être vérifiées et quantifiées pour *J. stenophylla*, mais également pour les orchidées angraecoïdes non autofertiles. Enfin, la synthèse de molécules olfactives de *J. recta* est réduite comparativement à sa consœur malgache *J. arborescens*.
- 5) Tandis que la persistance d'interactions avec les pollinisateurs s'accompagne de phénomènes de radiation à la Réunion, la perte *via* l'autofertilité semble l'exclure.

Cette étude est préliminaire, les perspectives sont donc multiples. Il serait tout d'abord important d'augmenter la taille d'échantillonnage que ce soient pour les mesures morphologiques, les analyses de nectar, celles de l'odeur, la fécondité *in situ* et l'émasculature des fleurs, afin d'appliquer les tests statistiques plus puissants. Il serait intéressant par la suite d'étudier la structure génétique des populations : variabilité inter- et intra-populationnelle. Chez les populations insulaires, la génétique est d'autant plus utile qu'elle peut être directement reliée à l'histoire de la colonisation des espèces, de l'établissement des populations et de la dispersion des espèces sur l'île. La Réunion offre un site tout à fait adéquat, avec de forts gradients topologique et climatique, des milieux fragmentés et des populations isolées. Chez les espèces à court éperon, elles permettraient de comprendre le rôle réel des pollinisateurs dans les taux de reproduction croisée et d'autogamie, notamment par géitonogamie. Chez les espèces autofertiles, elle permettrait d'estimer les conséquences du régime reproducteur autogame sur la dynamique génétique des espèces. Chez les orchidées, différents marqueurs moléculaires ont prouvé leur efficacité dans l'inférence de la structure génétique des populations (voir synthèses de Qamaruz-Zaman et al., 1998 ; Fay et Krauss, 2003). Parmi eux, les marqueurs microsatellites semblent les plus adéquats, car ils sont souvent très polymorphes et codominants (s'ils sont issus du génome nucléaire). Les AFLP, bien que souvent utilisés en génétique des populations sont plus délicats à utiliser chez les orchidées, du fait de la taille du génome des espèces souvent trop conséquente (Fay et Krauss, 2003).

Enfin, la spécificité d'hôte de *J. stenophylla* et de son phorophyte *Pandanus montanus* demande à être vérifiée et quantifiée dans une démarche explicative des relations de l'espèce avec les flores bryophytiques et fongiques. Bien que M. A. Clements n'ait recensé aucune spécificité, l'identité des partenaires mycorhiziens lors des processus de germination reste très peu explorée en milieu tropical (M.-A. Selosse, communication

personnelle) (Clements, 1988). La spécificité d'hôte est en général rare chez les orchidées épiphytes (e.g. Dressler, 1981 ; Ackerman et al., 1989 ; Zimmerman et Olmsted, 1992) mais elle peut néanmoins exister (Tremblay et al., 1998). Les orchidées épiphytes de la Réunion offre un modèle tout à fait intéressant : outre la possibilité de spécificité d'hôte chez *J. stenophylla*, *Bulbophyllum variegatum*, par exemple, est quasi strictement inféodée à un phorophyte spécifique, *Agauria salicifolia* (Bois de rempart) (Lancaster, 2004).

4. LA SECTION *HADRANGIS*

Les trois espèces de la section *Hadrangis*, *Angraecum bracteosum*, *A. cadetii* et *A. striatum* possèdent une forme florale qui illustre un syndrome tout à fait original au sein des Angraecinae, sous-tribu réputée pour sa pollinisation par les lépidoptères nocturnes. Ce syndrome allie un éperon court et large, au nectar souvent abondant, à l'absence totale d'odeur. Lorsque R. Schlechter créa la section *Hadrangis* en 1918, il y inclut des espèces malgaches. J. Bosser, après ré-examen du matériel la réduisit aux trois taxons des Mascareignes (Bosser, 1987). Tant elles se distinguent morphologiquement des autres *Angraecum*, la question de créer un nouveau genre fut envisagée à plusieurs reprises par Schlechter et Garay (Bosser, 1987). Toutefois, la conclusion de J. Bosser (1987) fut : « Etant donné les variations qui existent dans le pollinaire chez les *Angraecum*, ainsi que dans le développement de l'éperon, il ne nous paraît pas possible de faire de la sect. *Hadrangis* un genre à part, bien que le labelle sacciforme donne à la fleur une allure particulière ». Notre étude phylogénétique abonde en ce sens : la section *Hadrangis* s'inscrit parmi les *Angraecum* malgaches. *A. cadetii* est la seule des trois espèces présente sur l'île Maurice. Son statut y est fortement menacé : moins d'une vingtaine d'individus subsistent ; leur reproduction (production de fruits) semble très limitée (Roberts, 2001). *A. cadetii* et *A. striatum* sont endémiques de la Réunion. Un scénario de colonisation de l'archipel possible, inféré de la phylogénie, pourrait donc être le suivant : (1) colonisation de Maurice par la forme ancestrale d'*A. cadetii* à partir de souches malgaches, (2) colonisation de La Réunion à partir de Maurice et (3) diversification d'*A. cadetii* à la Réunion (i.e. *A. bracteosum* et *A. striatum*). Sur l'île de La Réunion, ces trois espèces ont une distribution géographique assez vaste. Elles sont principalement inféodées aux zones humides de basses et moyennes altitudes de l'est ou aux forêts de montagne de l'est et du

centre de l'île. *A. bracteosum* fut inventoriée dans 43% des sites prospectés, *A. striatum* et *A. cadetii* dans 28.1% (Figure 41). Tandis qu'*A. cadetii* est surtout présente dans les forêts tropicales humides de basse et de moyenne altitude, dépassant rarement 1300 m, *A. striatum*, au contraire croît essentiellement en forêt de montagne et parfois en limite haute de la forêt de moyenne altitude. *A. bracteosum* est présente en forêt tropicale humide de moyenne altitude et en forêt de montagne, couvrant l'aire de répartition d'*A. striatum* et celle d'*A. cadetii*. Dans la plupart des habitats, deux des trois espèces de la section, voire les trois peuvent donc vivre en sympatrie. Peu d'individus, certainement hybrides entre *A. bracteosum* et *A. striatum* ont été observés sur le terrain, suggérant que les croisements interspécifiques sont rares (observations personnelles, T. Pailler, communication personnelle). Chez les orchidées, l'hybridation interspécifique est en général possible entre les espèces, largement pratiquée en horticulture (e.g. Griffiths, 2002 ; Bellone, 2004). Dans les populations naturelles, l'existence d'hybrides a été reportée dans certains genres, entre espèces très proches (e.g. Sharma et Jones, 1999 ; Nielsen et Siegmund, 1999 ; Nielsen, 2000 ; voir aussi Fay et Krauss, 2003). Toutefois, l'hybridation naturelle entre espèces est rare comparée à la richesse spécifique de la famille (Dressler, 1981). Les barrières empêchant l'hybridation chez les orchidées ont été principalement imputées à la **spécialisation de la pollinisation** (van der Pijl et Dodson, 1966 ; Dressler, 1981, 1993 ; Steiner et al., 1994), notamment à la précision du lieu d'attachement des pollinies sur le corps du pollinisateur, ne permettant leur dépôt que sur un individu conspécifique (e.g. Nilsson et al. 1985, 1987 ; Bower, 1996 ; Nilsson et Rabakonandriana, 1988, Steiner, 1989 ; synthèse de Johnson et Edwards, 2000 ; Singer et Sazima, 2001). La **séparation temporelle de la phénologie** des espèces (Dressler, 1981, 1993) et la mise en place de **barrières génétiques** ont également été reportées : la viabilité des embryons hybrides peut être en effet réduite ou nulle bien que les capsules se soient convenablement développées

(e.g. Borba et al., 2001b) ; un autre cas, plus rare, a également été signalé, pour lequel les croisements interspécifiques ont donné fruits et graines viables, mais le développement consécutif des plantules fut impossible (Johnson et al., 1998b). Plus généralement, les mécanismes liés au maintien de l'isolement reproducteur des espèces ont été divisés en deux grands groupes : pré ou post-reproductifs (Dobzhansky, 1970). Les barrières pré-reproductives préviennent la formation de zygotes hybrides. Elles concernent (1) l'isolement spatial (inexistant pour les espèces de la section *Hadrangis*), (2) l'isolement temporel (décalage de la phénologie), (3) l'isolement par les pollinisateurs, (4) l'isolement mécanique dû à l'incompatibilité anatomique entre les organes génitaux ou floraux n'autorisant pas la pollinisation ou la fécondation des gamètes, et (5) l'isolement gamétique, dû à l'incompatibilité génétique des gamètes notamment lors de la germination des tubes polliniques. Les mécanismes post-reproductifs sont le plus souvent de nature génétique. Ils se traduisent par (1) la létalité des zygotes hybrides, (2) la stérilité des hybrides et (3) la dégénérescence des hybrides de deuxième génération.

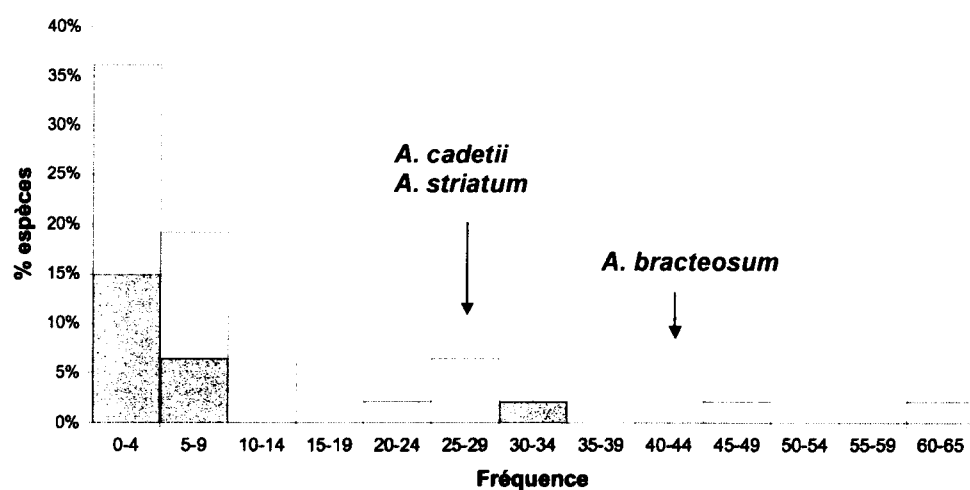


FIGURE 41. Fréquence de distribution des orchidées angraecoïdes de la Réunion sur 121 sites prospectés. Les histogrammes gris représentent la proportion d'espèces autofertiles dans chaque classe de fréquence.

Les objectifs de cette étude ont donc été de caractériser les mécanismes d'isolement reproducteur des trois espèces afin de comprendre dans quelles mesures l'intégrité génétique des espèces est possible : les barrières de l'hybridation existent-elles ? Si oui, sont-elles pré- ou post-reproductives ? Pour répondre à ces questions nous avons initié l'étude de la biologie et de l'écologie des espèces :

A. Barrières pré-reproductives :

- (1) Quels sont les traits de la morphologie florale qui permettent de distinguer les trois espèces ?
- (2) Lorsque les espèces vivent en sympatrie, quel est le patron de floraison de chacune ?
- (3) Existe-t-il une spécificité du phorophyte dans les sites étudiés et un isolement spatial au sein de l'habitat ?
- (4) Quel est le succès reproducteur de chacune des trois espèces dans les sites d'études ?
- (5) Quel est (sont) le(s) pollinisateur(s) des trois espèces ?
- (6) Les croisements interspécifiques sont-ils possibles ?

B. Barrières post-reproductives :

- (7) Si les croisements interspécifiques sont possibles, les zygotes hybrides sont-ils viables ?

4. 1. Matériels et Méthodes

4. 1. 1. Description des espèces

Les trois espèces de la section *Hadrangis* sont caractérisées par des inflorescences en grappe simple de fleurs moyennes à périanthe charnu et au labelle sacciforme (Bossert, 1987). Les viscidies sont adnées et ne forment qu'une seule pièce, si bien que les deux pollinies sont prélevées ensemble par le pollinisateur.

A. striatum se distingue par de longues inflorescences de 5 à 6 fleurs, caractérisées par les entre-nœuds très allongés (1,5 à 2 cm) et les bractées florales très petites par rapport à la longueur de l'ovaire.

Au contraire, les inflorescences d'*A. bracteosum*, bien qu'elles possèdent également 5 à 6 fleurs, sont compactes et la bractée florale dépasse la longueur de l'ovaire.

A. cadetii est lui caractérisé par ses inflorescences pauciflores (2 à 4 fleurs) charnues à entre-nœuds également épaissis de 1 à 1,5 cm de longueur et une bractée florale recouvrant typiquement la demi- longueur de l'ovaire.

L'appareil végétatif des trois espèces est dans l'ensemble semblable : les feuilles sont distiques et souples, bien que celles d'*A. striatum* soient plus dressées et légèrement moins larges.

4. 1. 2. Sites d'étude

Le site des fourrés à *Pandanus* de la Plaine des Palmistes (décrit § 3.1.2, Chapitre II) appartient à la forêt tropicale humide de moyenne altitude. Il héberge les trois espèces en sympatrie : sur le site d'environ 10 ha, délimité par la présence de milieux dégradés et un flanc descendant à la rivière sèche, tous les individus ont été numérotés et suivis lors de

la floraison pendant trois années consécutives (2003 – 2004 – 2005), soit une vingtaine de plantes pour *A. bracteosum* et *A. cadetii* et une trentaine d'individus pour *A. striatum*.

Le site de Bébour correspondant à la forêt tropicale humide de montagne a également été choisi, bien qu'*A. cadetii* y soit très rare (deux individus ont été recensés, dont un qui a été braconné en 2004) (ce site est décrit § 3.1.2, Chapitre II). Une trentaine de pieds d'*A. bracteosum* et environ 40 individus d'*A. striatum* ont été numérotés dans ce site et suivis de façon identique sur trois ans.

4. 1. 3. Barrière pré-reproductives

4. 1. 3. 1. Morphologie florale et propriétés du nectar

Les mesures florales effectuées pour la caractérisation des syndromes de pollinisation ont été comparées chez les trois espèces de la section *Hadrangis* (cf. § 2, Chapitre II). Pour *A. striatum* et *A. bracteosum*, les fleurs ont été collectées à Bébour sur des individus non suivis. À la Plaine des Palmistes, l'échantillonnage s'est fait sur un site à proximité du lieu d'étude. *A. cadetii* y étant plus rare, les fleurs ont été collectées dans une population plus conséquente à Basse Vallée au sud-est de l'île.

Les analyses de nectar ont été faites *ex situ* sur des individus cultivés en ombrière et *in situ* sur *A. striatum* pour comparaison. Pour chaque espèce, le volume du nectar a été prélevé sur les fleurs vivantes, non cueillies. Lorsque le volume était suffisamment conséquent, la teneur en sucre a été mesurée. Pour ces deux manipulations, le protocole est identique à celui que nous avons décrit pour les *Jumellea* (§ 3. 1. 4, Chapitre II).

4. 1. 3. 2. Écologie, phénologie et succès reproducteur dans les sites étudiés

Sur les deux sites d'études, trois variables écologiques ont été quantifiées pour chaque individu :

- l'identité du phorophyte,
- la hauteur de l'épiphyte sur son support,
- le diamètre du phorophyte à l'emplacement de l'orchidée.

Les différents paramètres ont été mesurés au centimètre près au moyen d'un mètre ou d'un mètre-ruban.

Les trois années et sur les deux sites, les fleurs ont été suivies une fois par semaine ou sur un intervalle de 10 jours au maximum sur une période encadrant largement le début et la fin de la floraison de tous les individus. À chaque relevé, plusieurs données ont été suivies. Elles concernent :

- le développement de la fleur : bouton / ouverture / fanaison (phénologie),
- le pollinaire : présent / prélevé (succès de la fonction mâle),
- le stigmate : vierge / dépôt de pollinies (succès de la fonction femelle)
- le développement du fruit (succès reproducteur).

Les variabilités de l'activité des pollinisateurs (succès de la pollinisation) et du succès reproducteur ont été testées statistiquement par des analyses de variance univariée (implémentées dans le modèle général de régression linéaire du logiciel SPSS). Au préalable, l'hypothèse nulle d'équivalence de la variance des erreurs de la variable dépendante (soit le taux de pollinies prélevées ou le taux de fruits développés dans nos analyses) a été testée par le test d'égalité des variances des erreurs de Levene. Dans la majorité des cas, les logarithmes du taux de fruits ont été utilisés afin de répondre aux

conditions de normalité des données imposées par le modèle. Le jeu de données a été analysé en fonction des sites et des espèces. Selon le cas, site, espèce ou année ont été les facteurs fixes du modèle.

4. 1. 3. 3. Identification des pollinisateurs

Durant les deux premières saisons nous avons intensivement observé *de visu* les individus des trois espèces afin d'en découvrir les pollinisateurs, sans succès. L'identification n'a finalement été possible que la dernière année au moyen d'une caméra vidéo Sony® DCR-TRV16E fixée sur un tripode et alimentée par un groupe électrogène, générateur électrique disposé le plus loin possible des individus filmés *in situ* grâce à un jeu de rallonges de 100 m, afin notamment de réduire les nuisances sonores. Les images ont été enregistrées sur des cassettes Fuji DVM60 de 60 minutes, remplacées toutes les heures. Les observations ont été effectuées sur un ensemble d'individus (ci-après *patch*) distants de 2 m au maximum. La caméra, cachée à environ 2-3 m des individus filmés, a été focalisée sur 1 à 5 plantes selon la session. Les films ont été réalisés de nuit ou de jour, pendant 13 heures non discontinues au maximum selon les conditions climatiques, la pluie notamment. Avant et après chaque session, le dépôt et le prélèvement de pollinies de chaque fleur ouverte des individus du *patch* (filmés ou non) ont été contrôlés. Les deux sites d'études ont été investis, mais également un individu d'*A. cadetii* de Basse Vallée. Les détails des sessions (sites, espèces, dates, nombre d'heures et d'individus filmés) sont présentés dans le Tableau 26.

TABLEAU 26. Détails des différentes sessions de film *in situ* (N : nombre).

Sessions	Dates	Heures (Total)	N fleurs filmées (N individus)
Bébour			
<i>A. striatum</i>			
Nuit 1	10-11 Jan 2005	18h30 – 5h30 h (11h)	7 (1)
Nuit 2	11-12 Jan 2005	18h30 – 5h30 h (11h)	7 (1)
Nuit 3	12-13 Jan 2005	18h30 – 5h30 h (11h)	7 (1)
Nuit 4	13-14 Jan 2005	18h30 – 5h30 h (11h)	7 (1)
Jour 1	19 Jan 2005	5h30 – 18h30 h (13h)	9 (1)
Jour 2	20 Jan 2005	5h30 – 18h30 h (13h)	10 (1)
Jour 3	21 Jan 2005	5h30 – 14h30 h (8h)	46 (5)
Jour 4	3 Fév 2005	8h00 – 11h00 (3h)	13 (1)
Jour 5	5 Fév 2005	8h00 – 11h00 (3h)	13 (1)
Jour 6	7 Fév 2005	8h00 – 11h00 (3h)	13 (1)
<i>A. bracteosum</i>			
Jour 1	16 Fév 2005	8h00 – 11h00 (3h)	27 (1)
Jour 2	23 Fév 2005	7h00 – 19h00 (12h)	26 (1)
Jour 3	24 Fév 2005	7h00 – 13h00 (6h)	26 (1)
Plaine des Palmistes			
<i>A. cadetii</i>			
Jour 1	10 Fév 2005	12h30 – 13h30 (1h)	8 (1)
Jour 2	15 Fév 2005	9h00 – 17h00 (8h)	4 (2)
Jour 3 ^a	22 Fév 2005	9h00 – 19h00 (10h)	19 (3)
Basse Vallée			
<i>A. cadetii</i>			
Jour 1	11 Fév 2005	6h30 – 17h30 (9h)	3 (1)

^a Avec un individu d'*A. bracteosum* (5 fl)

4. 1. 3. 4. Croisements inter- et intraspécifiques

Sur des individus cultivés en ombrière (cinq *A. bracteosum*, huit *A. cadetii* et neuf *A. striatum*) des pollinisations manuelles de croisements inter- et intraspécifiques ont été menées sur les trois espèces. Les pollinisations ont été effectuées aléatoirement sur l'inflorescence en laissant des fleurs libres pour minimiser un éventuel effet des ressources sur la fécondité. Le taux de fécondité a ensuite été calculé par le nombre de fruits produits sur le nombre de fleurs manuellement pollinisées multiplié par 100.

4. 1. 4. Barrière post-reproductives

4. 1. 4. 1. Viabilité des embryons

La viabilité des embryons, étudiée sur les capsules matures et déhiscentes au moyen d'un microscope optique est facilement observable chez les orchidées. La graine étant réduite à l'embryon et aux téguments fins qui le protègent, nous avons défini comme embryons viables, toutes les graines qui contenaient un embryon (amas de cellules plus foncées au centre de la graine). Le cas échéant, les graines non viables se définissent par la présence unique des téguments (couches claires plus ou moins unicellulaires caractéristiques) sans embryon. Le nombre d'embryons présents dans 100 graines choisies au hasard ont été comptabilisées. Cette manipulation a été répétée trois fois par fruits. Le nombre d'embryons viables pour une capsule donnée correspond donc à la moyenne des trois comptages successifs.

4. 2. Résultats

4. 2. 1. Barrières pré-reproductives

4. 2. 1. 1. Morphologie florale et propriétés du nectar

Une analyse en composantes principales a été réalisée sur l'ensemble des traits floraux (Figure 42). Tandis qu'*A. cadetii* se distingue des deux autres espèces, les mesures florales d'*A. striatum* et d'*A. bracteosum*, forment un ensemble de points étalés, presque indissociables.

Pour la plupart des caractères liés à la reproduction, *A. striatum* et *A. bracteosum* sont significativement différents d'*A. cadetii* ou alors les trois espèces forment des groupes distincts (Tableau 27). *A. striatum* a l'éperon le plus long (11,8 mm) suivi d'*A. bracteosum* (7,8 mm) et *A. cadetii* (6,3 mm). En revanche, le diamètre de l'éperon est beaucoup plus large chez *A. cadetii* (5 mm), *A. striatum* et *A. bracteosum* ayant la même moyenne (3,9 mm). Parmi les caractères floraux stériles, aucun regroupement de deux des trois espèces ne se distingue vraiment. En revanche, pour tous les caractères de l'inflorescence, *A. cadetii* et *A. striatum* sont significativement différents d'*A. bracteosum* (Tableau 27).

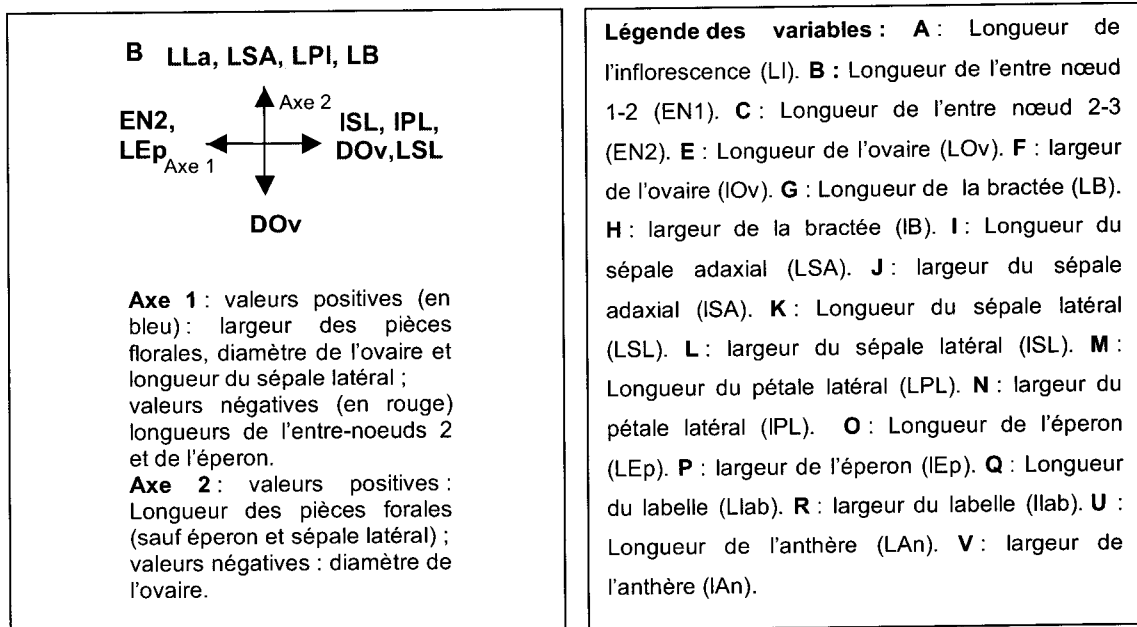
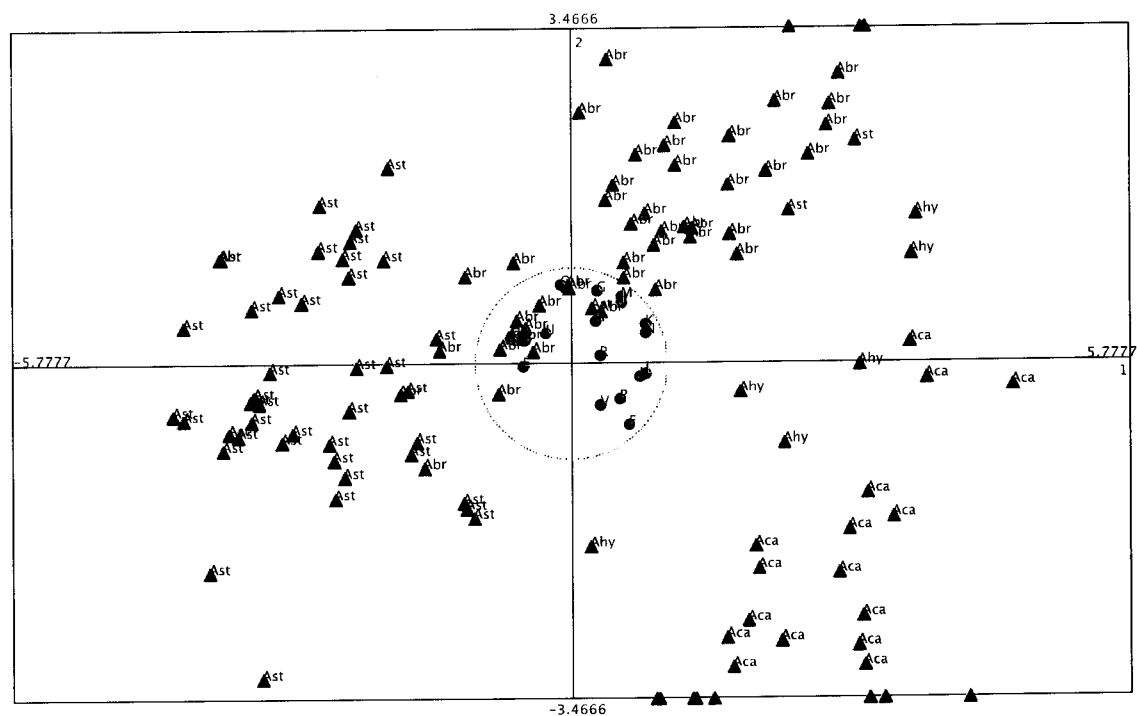


FIGURE 42. Analyse en composantes principales des caractères floraux.

A. Représentation graphique (Aca : *Angraecum cadetii*, Abr : *A. bracteosum*, A. st : *A. striatum*. Ahy : individu particulier présent sur le site de la Plaine des Palmistes, présentant à la fois certains caractères floraux d'*A. bracteosum*, mais aussi ceux d'*A. striatum*. Nous l'avons identifié comme hybride des deux espèces). **B.** Schéma de contribution des caractères aux axes (ACP réalisée avec le logiciel Statlab).

TABLEAU 27. Récapitulatif des mesures florales (moyenne +/- écart type en mm) (nombre de fleurs mesurées) et résultats des tests statistiques. Les chiffres romains indiquent les groupes homogènes après un test *post hoc* de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

Caractères	<i>A. striatum</i> (44)		<i>A. bracteosum</i> (48)		<i>A. cadetii</i> (24)		Statistique ^a
Liés à la reproduction							
Longueur labelle	12,6 +/- 1,2	(I)	13,1 +/- 1,4	(I)	9,3 +/- 1,8	(II)	38,92 ****
Largeur labelle	9,8 +/- 1,2	(II)	9,0 +/- 1,2	(I)	10,6 +/- 0,9	(III)	15,74 ****
Longueur éperon	11,8 +/- 1,1	(I)	7,8 +/- 1,1	(II)	6,3 +/- 0,9	(III)	179,97 ****
Diamètre éperon	3,9 +/- 0,4	(I)	3,9 +/- 0,6	(I)	5,0 +/- 0,6	(II)	35,28 ****
Longueur ovaire	18,8 +/- 3,0	(I)	11,3 +/- 1,6	(III)	12,9 +/- 1,6	(II)	142,24 ^b ****
Longueur anthère	2,6 +/- 0,4	(I)	2,5 +/- 0,3	(I)	3,4 +/- 0,6	(II)	11,97 ^b ****
Floraux stériles^c							
Longueur bractée	7,7 +/- 1,5	(I)	13,4 +/- 2,6	(III)	9,8 +/- 1,8	(II)	93,80 ^b ****
Largeur bractée	8,4 +/- 1,5	(I)	10,1 +/- 1,7	(II)	13,8 +/- 2,4	(III)	45,40 ^b ****
Longueur sépale adaxial	11,6 +/- 2,0	(I)	15,6 +/- 2,1	(II)	12,7 +/- 1,7	(I)	56,55 ****
Largeur sépale adaxial	6,5 +/- 0,8	(I)	6,6 +/- 0,8	(I)	7,9 +/- 0,7	(II)	32,92 ****
Longueur sépale latéral	11,2 +/- 1,8	(II)	14,7 +/- 1,8	(I)	13,9 +/- 2,1	(I)	42,10 ****
Largeur sépale latéral	5,6 +/- 0,7	(I)	5,9 +/- 0,8	(I)	7,3 +/- 0,8	(II)	31,81 ****
Longueur pétale latéral	10,4 +/- 1,8	(I)	13,5 +/- 2,0	(II)	10,6 +/- 1,0	(I)	39,65 ****
Largeur pétale latéral	4,4 +/- 0,9	(II)	5,4 +/- 0,9	(I)	5,5 +/- 0,6	(I)	23,07 ****
Inflorescence							
Longueur inflo	109,0 +/- 60,2	(I)	45,5 +/- 17,7	(II)	65,9 +/- 21,6	(I)	26,89 ****
Entre nœuds 1	18,8 +/- 6,0	(I)	9,7 +/- 2,1	(II)	15,7 +/- 4,3	(I)	59,37 ****
Entre nœuds 2	14,6 +/- 3,7	(I)	9,5 +/- 1,8	(II)	15,7 +/- 4,8	(I)	46,15 ****

^a en italique : test non paramétrique (Kruskal Wallis) (ANOVA, le cas échéant) ; ^b données transformées en log ; ^c incluant la bractée ; ***** $P = 0,0000$.

Le nectar produit par *A. bracteosum* ($1,5 \pm 1,42 \mu\text{L}$) est le moins abondant des trois espèces étudiées, suivi d'*A. striatum* ($9,6 \pm 11,7 \mu\text{L}$) et d'*A. cadetii* ($16,7 \pm 21,9 \mu\text{L}$), dont chaque fleur produit en moyenne plus de quatre fois le volume de celles d'*A. bracteosum* (Figure 43A). Si le volume de nectar produit par fleur varie énormément entre les espèces, la teneur en saccharose est quant à elle assez homogène. Elle est de $10,6 \pm 2,9\%$ en équivalent saccharose pour *A. bracteosum*, $9,7 \pm 3,6\%$ pour *A. cadetii* et $8,8 \pm 4,1\%$ pour *A. striatum* (Figure 43B).

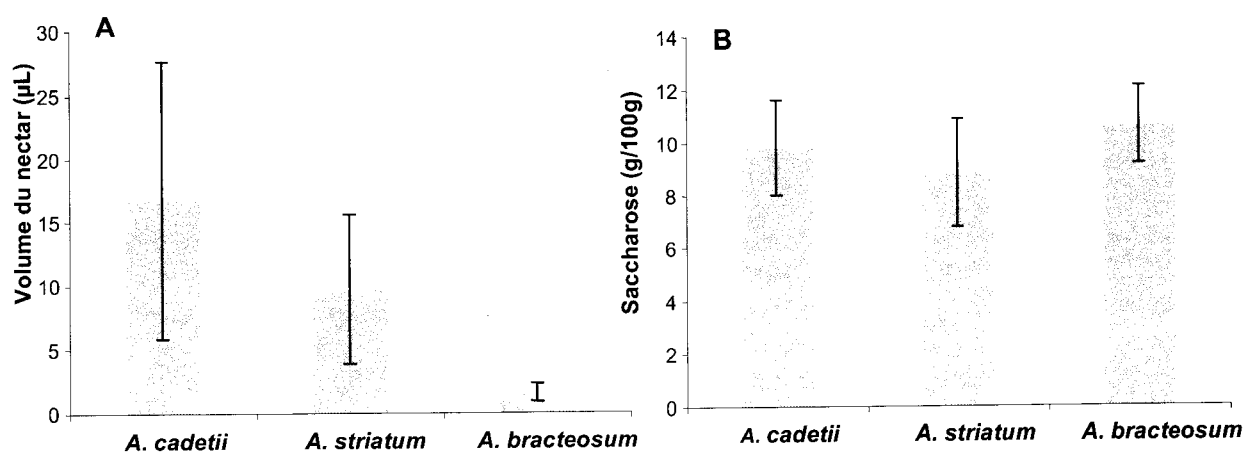


FIGURE 43. Propriétés du nectar (moyenne $\pm$ écart type). **A.** Volume (*A. cadetii*, $N = 9$ fleurs ; *A. striatum*, $N = 36$; *A. bracteosum*, $N = 26$). **B.** Teneur en saccharose (*A. cadetii*, $N = 7$; *A. striatum*, $N = 18$; *A. bracteosum*, $N = 23$).

Nous n'avons pas observé de grandes variations entre les fleurs analysées *in situ* ou *ex situ* chez *A. striatum*, suggérant que la culture des individus en ombrière n'affecte pas la production de nectar (Tableau 28).

TABLEAU 28. Propriétés du nectar mesurées *in situ* et *ex situ* chez *A. striatum* (entre parenthèse le nombre de fleurs échantillonnées).

	Volume (μL)	Saccharose (% en équivalent saccharose)
<i>In situ</i>	$7,7 \pm 3,4$ (47)	$9,8 \pm 1,3$ (31)
<i>Ex situ</i>	$8,8 \pm 4,1$ (36)	$9,6 \pm 11,7$ (18)

4. 2. 1. 2. Écologie, phénologie et succès reproducteur dans les sites étudiés

Phorophytes

La nature du phorophyte varie avec les sites. À la Plaine des Palmistes, *A. striatum* n'a été trouvé exclusivement que sur *Philippia montana* (Ericacées). À Bébour, les phorophytes d'*A. striatum* sont plus variés, mais également dominés par *Philippia montana*. *A. bracteosum*, que ce soit à Bébour ou à la Plaine des Palmistes, croît lui aussi majoritairement sur *Philippia montana*. Enfin, *A. cadetii* a été identifié principalement sur trois phorophytes à la Plaine des Palmistes *Philippia montana*, *Pandanus montanus* (Pandanacées) et *Gaertnera vaginata* (Rubiacees) (Figure 44). Que ce soit à la Plaine des Palmistes ou à Bébour, certaines espèces vivent en sympatrie sur le même phorophyte, suggérant qu'il n'y a pas de séparation spatiale au niveau de l'habitat.

La moyenne de la hauteur de l'épiphyte sur le support est plus importante à La Plaine des Palmistes, mais le diamètre du phorophyte y est en général plus petit (Figure 45).

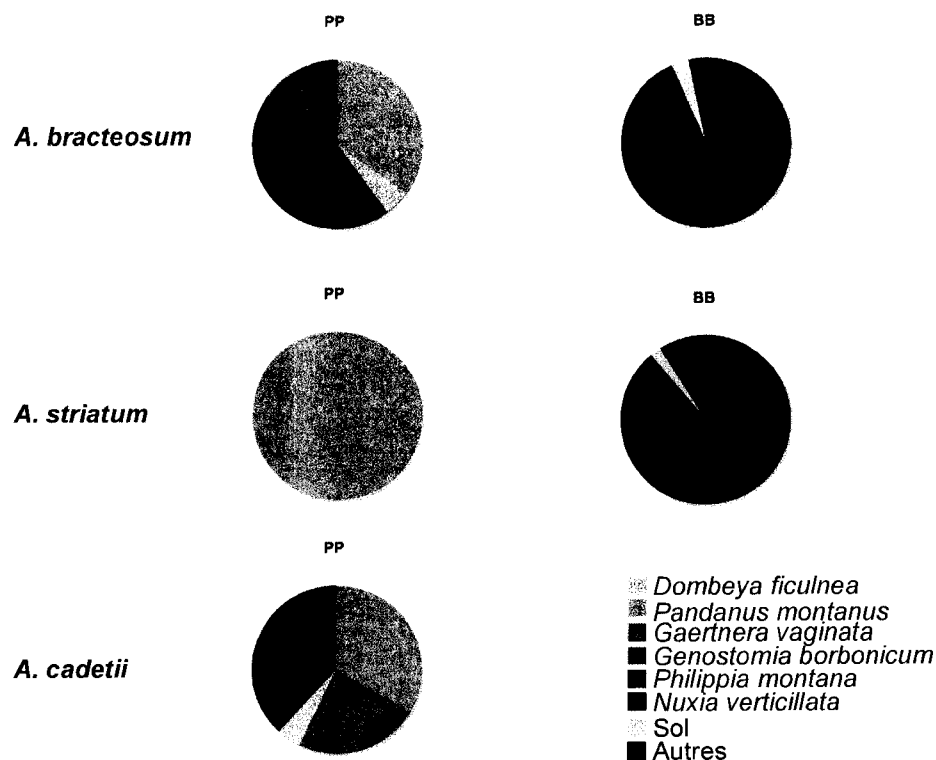


FIGURE 44. Identité des phorophytes à la plaine des Palmistes (PP) et à Bébou (BB) selon les espèces.

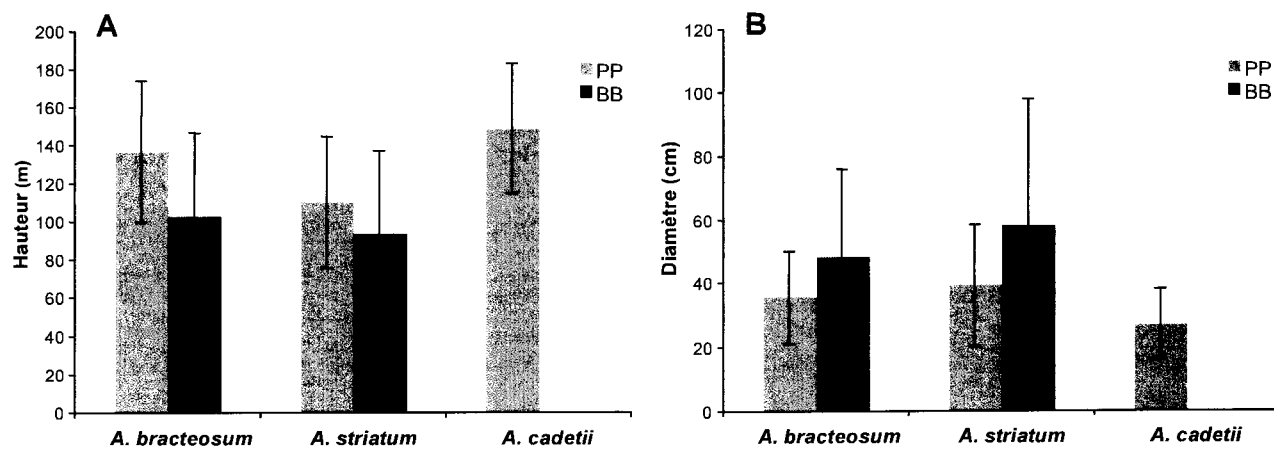


FIGURE 45. Moyenne ($\pm$ écart type) de la hauteur de l'épiphyte sur son support (A) et du diamètre des phorophytes à l'emplacement de l'épiphytes (B) (PP : Plaine des Palmiste ; BB : Bébou)

Phénologie

La floraison des individus fut très synchrone d'année en année quels que soient les sites. Ces courbes sont représentées pour la saison 2005 (Figure 46). Il apparaît clairement que le pic de floraison d'*A. striatum* est très décalé de celui des autres espèces, que ce soit à Bébour avec *A. bracteosum* ou à la Plaine des Palmistes avec *A. bracteosum* ou *A. cadetii*).

À Bébour, la période de floraison d'*A. striatum* s'étale du 5 janvier au 25 février avec un pic vers le 20 janvier. Celle d'*A. bracteosum* commence autour du 25 janvier pour les individus précoces et s'achève vers la fin du mois mars avec un pic de floraison aux alentours du 1^{er} mars (Figure 46A).

La présence simultanée des fleurs d'*A. striatum* et d'*A. bracteosum* a lieu sur une assez longue période, d'environ un mois entre le 25 février et le 25 mars, mais très peu de fleurs sont ouvertes en même temps.

Sur le site de la Plaine des Palmistes, moins haut en altitude, la floraison d'*A. striatum* peut commencer dès la fin décembre, mais le nombre de fleurs ouvertes est le plus important entre le 25 janvier et le 5 février, à l'image des individus de Bébour. La floraison d'*A. bracteosum* est légèrement plus tardive à la Plaine des Palmistes que sur le site de Bébour, commençant typiquement aux alentours du 5 février. Le développement des fleurs s'étale jusqu'aux premiers jours d'avril, avec un pic de floraison vers le 10 mars. Sur ce site, *A. cadetii* est typiquement en fleurs en même temps qu'*A. bracteosum* (Figure 46B). La période de chevauchement des floraisons des trois espèces à la Plaine des Palmistes a lieu une quinzaine de jours, typiquement du 1^{er} au 15 février.

La présence simultanée de fleurs d'*A. striatum* et d'*A. bracteosum* (plus *A. cadetii* à la Plaine des palmistes) est donc assez restreinte sur les deux sites, mais elle n'est pas nulle. Il n'y a aucun isolement temporel de la floraison d'*A. cadetii* et d'*A. bracteosum* à la Plaine des Palmistes.

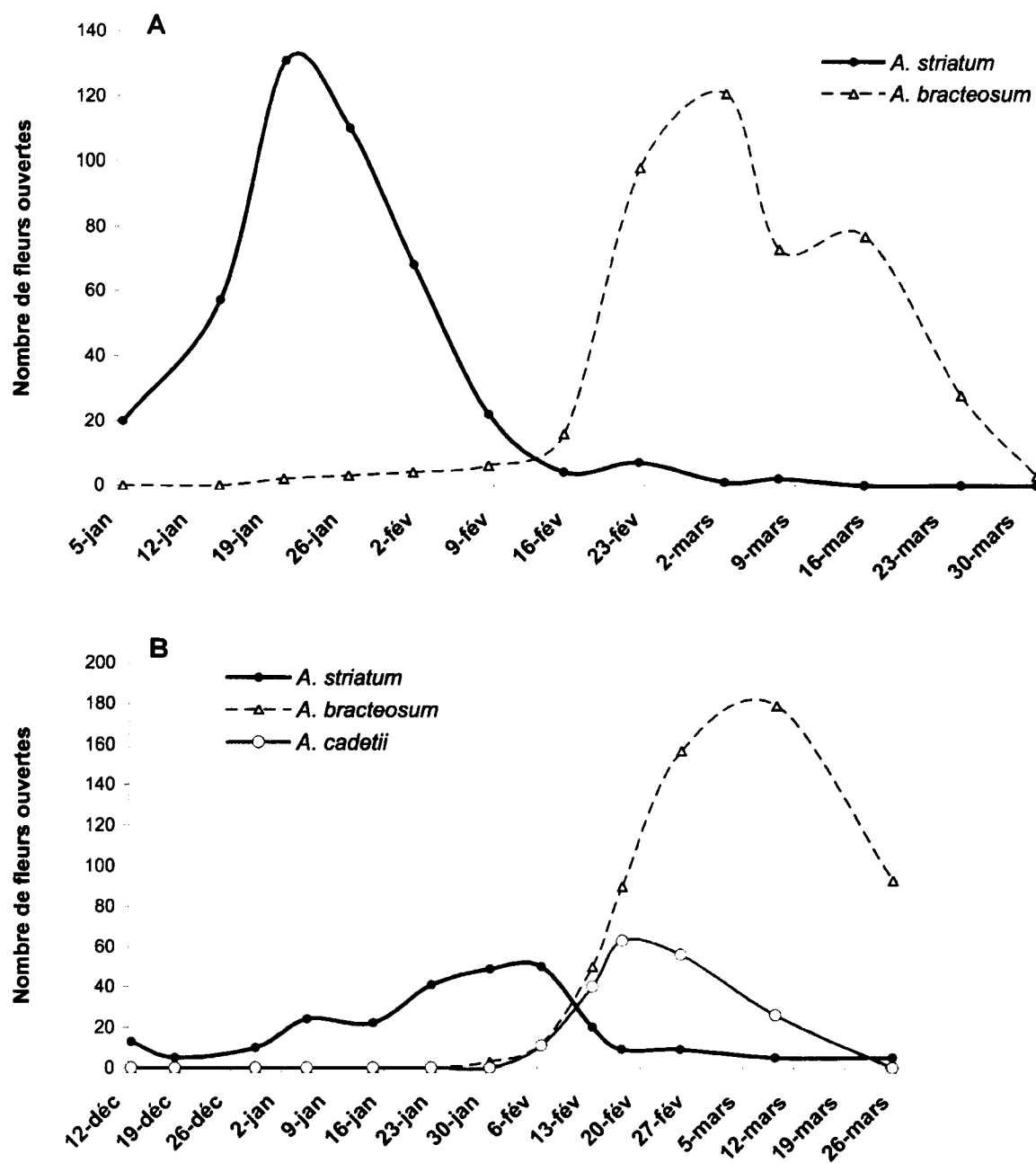


FIGURE 46. Courbes phénologiques. A. Bébou. B. Plaine des Palmistes

Succès de la pollinisation et de la reproduction

Contrairement aux deux autres espèces, le nombre de fleurs avortées chez *A. striatum* fut très conséquent, quels que soient les sites et les années, s'élevant à près de 67% de fleurs avortées à Bébouir en 2004 (Tableau 29).

Les principales sources de variation du prélèvement de pollen, au sein des populations, se situent au niveau des espèces à la Plaine des Palmistes : le prélèvement de pollinies a globalement été meilleur pour *A. striatum* et pour *A. cadetii* comparativement à celui d'*A. bracteosum*. Cette variation interspécifique a été corrélée à une variation entre les années (Figure 47A, Tableau 30A).

À Bébouir, au contraire, il n'y a pas eu de différence significative entre les espèces, mais seulement entre les années : le prélèvement a été meilleur en 2005 (Figure 47B, Tableau 30B).

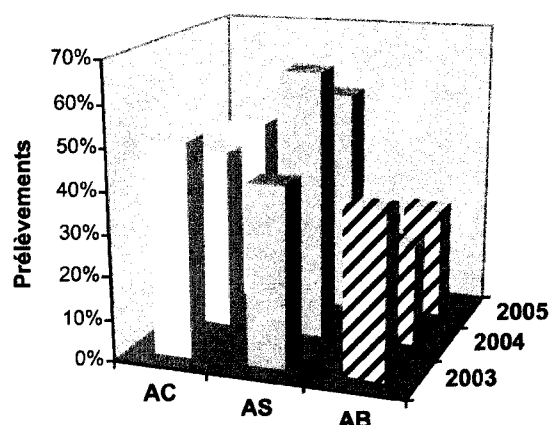
Durant les trois années d'étude, le taux de prélèvements a été globalement compris entre 32 - 64% pour *A. striatum*, 24 - 54% pour *A. bracteosum* et 43 - 51% pour *A. cadetii* (Tableau 29), avec de grandes variations entre les populations pour *A. bracteosum* (Figure 48A, Tableau 31A) et entre les années pour *A. striatum* (Figure 48A, Tableau 31A).

Tableau 29. Récapitulatif de l'échantillonnage et du succès de la pollinisation et de la reproduction des trois espèces sur les deux sites d'études pendant trois années.

(N : nombre ; flo : florifère ; fl. : fleurs ; ind : individus ; prélèvements et dépôts réfèrent à la moyenne de tous les individus par site du nombre de fleurs dont les pollinies ont été prélevées ou déposées sur le nombre de fleurs ouvertes par individu ; de façon identique, fruits réfère à la moyenne de tous les individus par site du nombre de fruits produits sur le nombre de fleurs ouvertes par individu) (BB : Bébou ; PP :Plaine des Palmistes).

Populations	Saisons					
	2003		2004		2005	
	BB	PP	BB	PP	BB	PP
<i>A. striatum</i>						
N individus	43	28	45	33	42	31
N individus flo.	43	28	39	24	38	17
N fl. avortées (%)	463 (58,7)	90 (22,9)	505 (63,3)	202 (66,9)	355(45,7)	55 (25,1)
N fl. suivies	325	303	293	100	422	164
N fleurs/inflo	5,8 +/- 1,4	6,2 +/- 1,3	5,6 +/- 1,3	5,4 +/- 2,1	5,3+/-1,8	5,1 +/- 1,9
Prélèvements	0,32 +/- 0,35	29,7 +/- 35,0	0,46 +/- 0,39	46,3 +/- 43,5		29,6+/-34,9
Dépôts	0,29 +/- 0,42	17,6 +/- 19,4	0,23 +/- 0,25	12,2 +/- 27,4	0,42+/-0,29	6,4 +/- 12,9
Fruits	0,15 +/- 0,22	6,2 +/- 12,9	0,20 +/- 0,24	10,7 +/- 26,7	0,17+/-0,23	6,2 +/- 12,9
% ind prélevés	55,8	64,3	66,7	83,3	78,9	88,2
% ind fructifères	39,5	39,3	56,4	25	55,2	47,1
<i>A. bracteosum</i>						
N individus	30	20	29	20	29	19
N individus flo	30	20	28	19	29	17
N fl. avortées (%)	13 (3%)	11 (2,5%)	10 (2,4%)	19 (3,9%)	28 (6,1%)	5 (1,2%)
N fl. suivies	413	428	403	471	428	417
N fleurs/inflo	5,6 +/- 1,1	6,1 +/- 1,3	5,9 +/- 1,4	6,1 +/- 1,5	6,3 +/-0,7	6,2 +/- 1,2
Prélèvements	0,34 +/- 0,29	39,4 +/- 27,0	0,48 +/- 0,28	22,4 +/- 22,1	0,54+/-0,32	0,26 +/- 0,34
Dépôts	0,21 +/- 0,17	21,6 +/- 14,2	0,19 +/- 0,26	6,2 +/- 8,6	0,33+/-0,26	0,10 +/- 0,14
Fruits	0,09 +/- 0,15	5,9 +/- 9,4	0,09 +/- 0,15	3,3 +/- 7,3	0,12+/-0,22	0,06 +/- 0,10
% ind prélevés	90	95	53,6	84,2	92,9	70,6
% ind fructifères	50	40	46,4	26,3	48,2	35,3
<i>A. cadetii</i>						
N individus		21		20		20
N individus flo		21		18		16
N fl. avortées (%)		2 (1,9%)		1 (1,3%)		0
N fl. suivies		99		74		83
N fleurs/inflo		2,6 +/- 1,3		2,4 +/- 1,1		2,4 +/- 0,7
Prélèvements		0,51 +/- 0,36		0,43 +/- 0,36		0,45 +/- 0,35
Dépôts		0,37 +/- 0,34		0,22 +/- 0,38		0,27 +/- 0,34
Fruits initiés		0,24 +/- 0,34		0,21 +/- 0,38		0,20 +/- 0,34
% ind prélevés		76,2		77,8		75
% ind fructifères		42,9		38,9		37,5

A. Plaine des Palmistes



B. Bébou

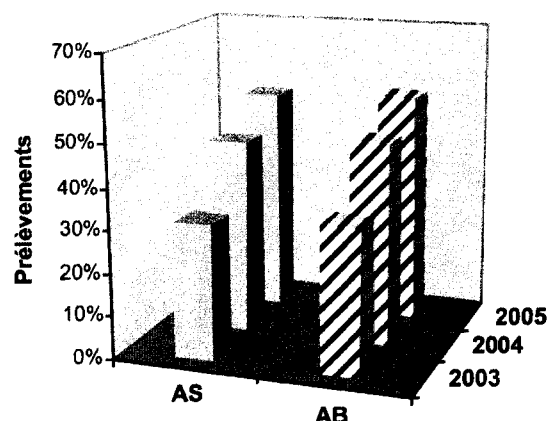


FIGURE 47. Taux de fleurs prélevées en conditions naturelles dans chaque site étudié (AC : *A. cadetii*, AS : *A. striatum*, AB : *A. bracteosum*). **A.** Plaine des Palmistes. **B.** Bébou.

TABLEAU 30. Variation du taux de prélèvements de pollen entre années et entre espèces dans chaque site (ANOVA univariée). **A.** Plaine des Palmistes. **B.** Bébou.

A. Plaine des Palmistes					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	P
Modèle corrigé	3.487 ^a	8	0.436	4.336	0.000
Constante	34.477	1	34.477	342.975	0.000
Espèce	2.353	2	1.176	11.702	0.000^b
Année	0.058	2	0.029	0.290	0.749
Année * Espèce	1.253	4	0.313	3.117	0.017^b
Erreur	16.687	166	0.101		
Total	56.068	175			
Total corrigé	20.173	174			

^a Valeur globale du modèle : $R^2 = 0.88$ (R^2 ajusté = 0.60).

^b Groupes homogènes : *A. bracteosum* (a) – *A. striatum* (b) – *A. cadetii* (b) (test post hoc de Bonferroni, $\alpha = 0.05$).

B. Bébou					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	P
Modèle corrigé	0.818 ^a	5	0.164	1.521	0.185
Constante	45.903	1	45.903	426.916	0.000
Espèce	0.037	1	0.037	0.346	0.557
Année	0.679	2	0.340	3.158	0.045^b
Année * Espèce	0.068	2	0.034	0.318	0.728
Erreur	19.677	183	0.108		
Total	66.911	189			
Total corrigé	20.494	188			

^a Valeur globale du modèle : $R^2 = 0.088$ (R^2 ajusté = 0.060).

^b Groupes homogènes : 2003 (a) – 2004 (ab) – 2005 (b) (test post hoc de Bonferroni, $\alpha = 0.05$).

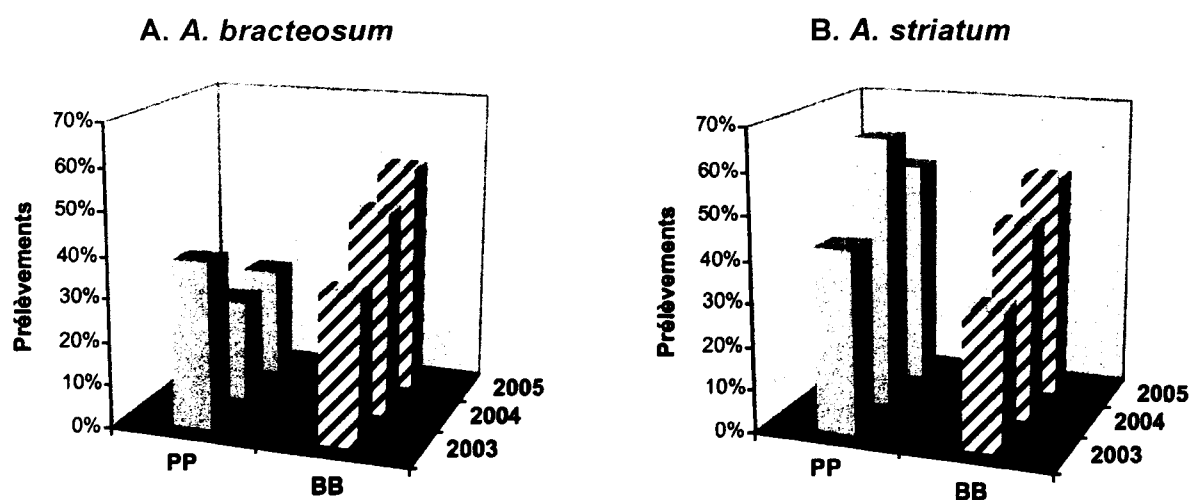


FIGURE 48. Taux de fleurs prélevées en conditions naturelles pour chaque espèce. **A.** *A. bracteosum*. **B.** *A. striatum* (PP : Plaine des Palmistes ; BB : Bébour).

TABLEAU 31. Variation du taux de prélèvements de pollen entre années et entre sites pour chaque espèce (ANOVA univariée). **A.** *A. bracteosum*. **B.** *A. striatum*.

A. A. bracteosum						
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	P	
Modèle corrigé	1.548 ^a	5	0.310	3.626	0.004	
Constante	20.558	1	20.558	240.786	0.000	
Site	1.137	1	1.137	13.314	0.000	
Année	0.069	2	0.034	0.404	0.668	
Site * Année	0.399	2	0.199	2.336	0.101	
Erreur	11.697	137	0.085			
Total	37.239	143				
Total corrigé	13.245	142				

^a Valeur globale du modèle : $R^2 = 0.117$ (R^2 ajusté = 0.085).

B. A. striatum						
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	P	
Modèle corrigé	1.758 ^a	5	0.352	3.112	0.010	
Constante	45.487	1	45.487	402.633	0.000	
Site	0.191	1	0.191	1.692	0.195	
Année	1.437	2	0.719	6.362	0.002^b	
Site * Année	0.248	2	0.124	1.099	0.336	
Erreur	18.189	161	0.113			
Total	66.924	167				
Total corrigé	19.946	166				

^a Valeur globale du modèle : $R^2 = 0.040$ (R^2 ajusté = 0.014).

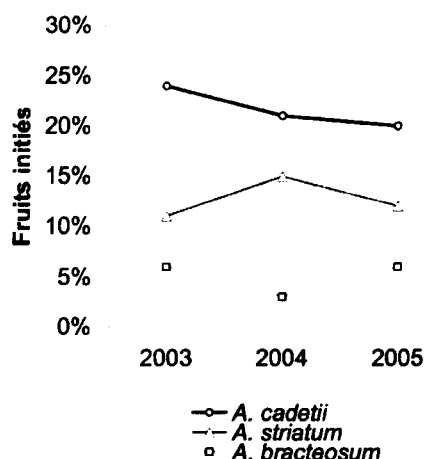
^b Groupes homogènes : 2003 (a) – 2004 (b) – 2005 (b) (test *post hoc* de Bonferroni. $\alpha = 0.05$).

Contrairement au prélèvement de pollen, le facteur année a peu d'effets sur la production de fruits dont la principale source de variation au sein des sites étudiés se situe au niveau des espèces : à la Plaine des Palmistes, la fécondité a été significativement la plus basse pour *A. bracteosum* (3 – 6%) comparativement à ces deux consœurs, quelles que soient les années (*A. striatum* : 11 – 15% ; *A. cadetii* : 43 – 51%) (Figure 49A, Tableau 32A).

Le patron identique existe à Bébour où *A. bracteosum* a produit significativement moins de fruits qu'*A. striatum*, quelles que soient les années, respectivement 9 – 12% de fruits produits pour *A. bracteosum* contre 15 – 20% pour *A. striatum* (Figure 49B, Tableau 32B).

Entre les populations, la production de fruits a été également constante au fil des saisons, mais légèrement plus élevée à Bébour qu'à la Plaine des Palmistes (Figure 50, Tableau 33), pour *A. striatum* et *A. bracteosum*.

A. Plaines des Palmistes



B. Bébou

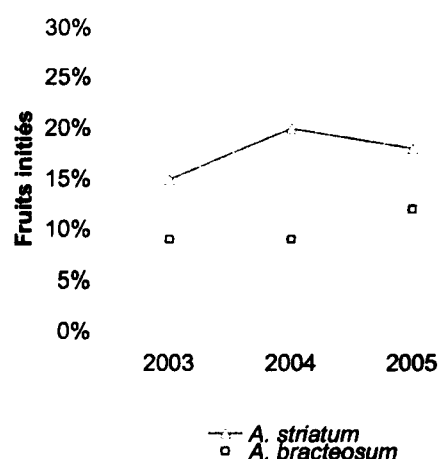


FIGURE 49. Variation par espèce et année du pourcentage de fruits produits dans chaque site étudié. **A.** Plaine des Palmistes. **B.** Bébou.

TABLEAU 32. Variation du taux de fruits produits entre années et entre espèces dans chaque site étudié (ANOVA univariée). **A.** Plaine des Palmistes. **B.** Bébou.

A. Plaine des Palmistes					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	P
Modèle corrigé	30,490 ^a	8	3,811	5,691	0,000
Constante	146,822	1	146,822	219,248	0,000
Espèce	24,411	2	12,205	18,226	0,000^b
Année	0,975	2	0,487	0,728	0,487
Année * Espèce	3,820	4	0,955	1,426	0,236
Erreur	40,180	60	0,670		
Total	228,904	69			
Total corrigé	70,670	68			

^a Valeur globale du modèle : $R^2 = 0.431$ (R^2 ajusté = 0.356).

^b Groupes homogènes : *A. bracteosum* (a) – *A. striatum* (b) – *A. cadetii* (b) (test *post hoc* de Bonferroni, $\alpha = 0.05$).

B. Bébou					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	P
Modèle corrigé	9,089 ^a	5	1,818	3,710	0,004
Constante	216,036	1	216,036	440,970	0,000
Espèce	7,744	1	7,744	15,808	0,000
Année	1,594	2	0,797	1,627	0,202
Année * Espèce	0,245	2	0,123	0,251	0,779
Erreur	47,031	96	0,490		
Total	266,497	102			
Total corrigé	56,120	101			

^a Valeur globale du modèle : $R^2 = 0.162$ (R^2 ajusté = 0.118).

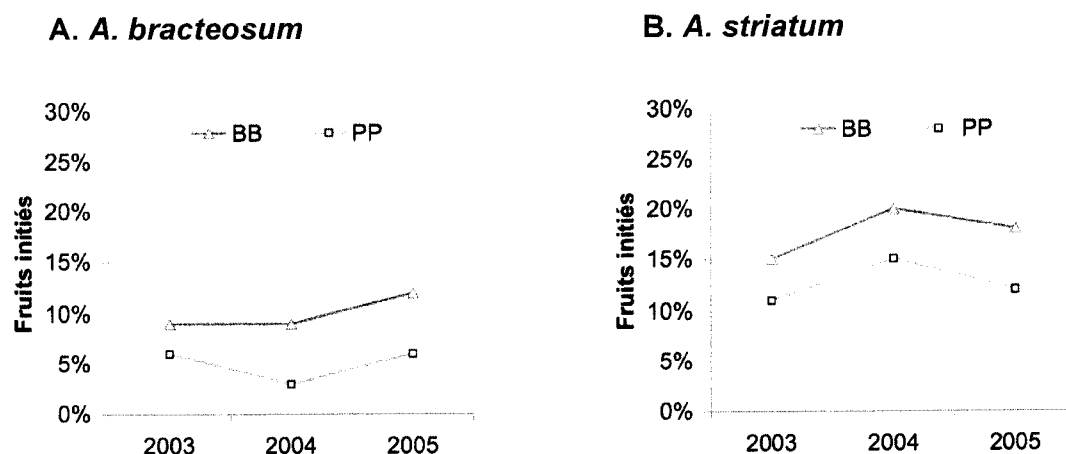


FIGURE 50. Pourcentage de fruits produits de chaque espèce. A. *A. bracteosum*. B. *A. striatum*.

TABLEAU 33. Variation du taux de fruits entre années et entre sites pour chaque espèce (ANOVA univariée). A. *A. bracteosum*. B. *A. striatum*.

A. A. bracteosum					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	P
Modèle corrigé	6.160 ^a	5	1.232	1.929	0.103
Constante	232.886	1	232.886	364.591	0.000
Site	4.571	1	4.571	7.157	0.010
Année	0.623	2	0.311	0.488	0.617
Site * Année	0.264	2	0.132	0.206	0.814
Erreur	37.048	58	0.639		
Total	288.377	64			
Total corrigé	43.208	63			

^a Valeur globale du modèle : $R^2 = 0.143$ (R^2 ajusté = 0.069).

B. A. striatum					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	P
Modèle corrigé	0.336 ^a	5	0.067	1.234	0.295
Constante	4.486	1	4.486	82.377	0.000
Site	0.229	1	0.229	4.201	0.042
Année	0.088	2	0.044	0.807	0.448
Site * Année	0.002	2	0.001	0.018	0.982
Erreur	8.768	161	0.054		
Total	14.417	167			
Total corrigé	9.104	166			

^a Valeur globale du modèle : $R^2 = 0.037$ (R^2 ajusté = 0.007).

Le prélèvement de pollinies a donc été variable entre les espèces, les sites et les saisons. La production de fruits en revanche, constante d'année en année, a été différente selon les espèces (*A. cadetii* > *A. striatum* > *A. bracteosum*) et les sites étudiés (*Bébour* > *Plaines des Palmistes*).

Sur le plan populationnel, le nombre d'individus fructifères participant à la reproduction de l'espèce est assez élevé pour toutes les espèces et sur les deux sites étudiés. De façon identique, le nombre d'individus ayant exporté au moins une pollinie est élevé pour les trois espèces, suggérant que les pollinisateurs sont actifs au sein de toute la population (Tableau 29).

4. 2. 1. 3. Identification des pollinisateurs

Les lectures des cassettes vidéo ont révélé que le pollinisateur d'*A. striatum* est un oiseau passériforme de la famille des Zosteropidés, *Zosterops borbonicus* ou « z'oiseau blanc » (Figure 51), endémique des Mascareignes (une sous-espèce différente existe à Maurice). Cet oiseau est très commun sur l'île. Pour *A. striatum*, un total de sept visites ont été filmées, durant lesquelles le prélèvement mais aussi le dépôt de pollinie par l'oiseau ont clairement eu lieu (Tableau 34). La pollinisation d'*A. striatum* par *Z. borbonicus* est donc avérée. En revanche, les pollinisateurs d'*A. cadetii* et d'*A. bracteosum* n'ont malheureusement pas été identifiés. A la Plaine des Palmistes, *Z. borbonicus* visite *A. cadetii*, mais aucun prélèvement ou dépôt de pollinies n'a été mis en évidence (Figure 52)³⁹.

³⁹ La pollinisation d'*A. striatum* par *Z. borbonicus* a fait l'objet d'un article accepté avec révisions mineures à *Annals of Botany* (Annexe 6). Le comportement de l'oiseau lors de la pollinisation de l'orchidée y est décrit. Voir également l'article pour la synthèse bibliographique de la pollinisation ornithophile chez les orchidées.

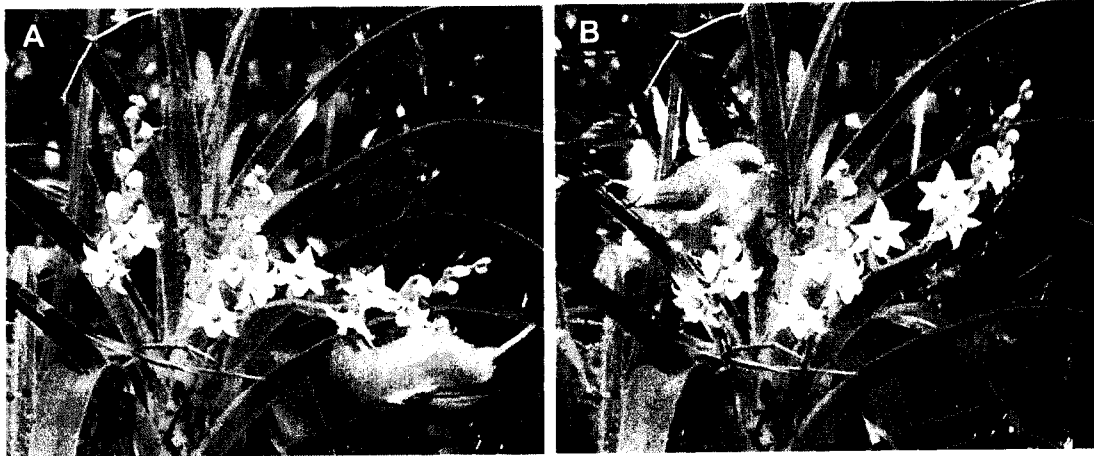


FIGURE 52. Pollinisation d'*Angraecum striatum* par *Zosterops borbonicus*. **A.** *Z. borbonicus* collectant le nectar des fleurs de l'orchidée. **B.** Illustration de l'attachement des pollinies sur le bec de l'oiseau (images issues des cassettes vidéo).

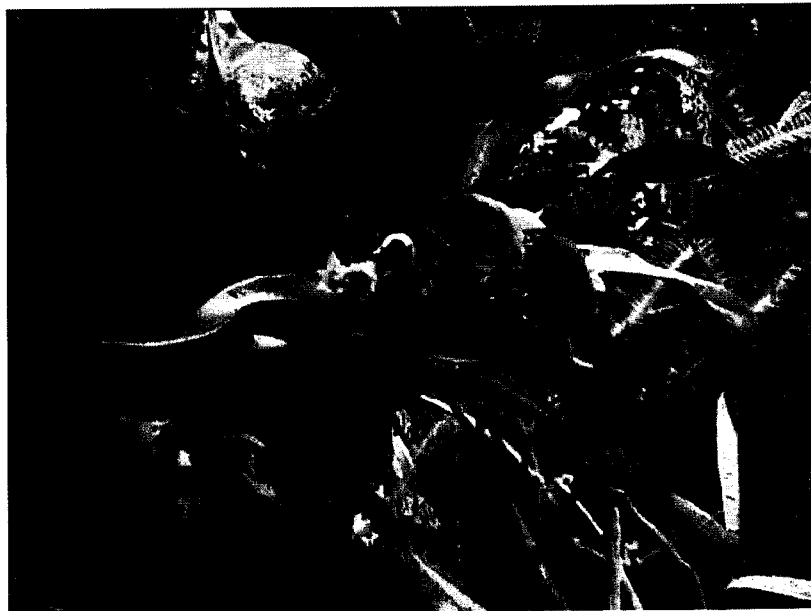


FIGURE 53. *Zosterops borbonicus* collectant le nectar d'*Angraecum cadetii* (images issues des cassettes vidéo).

TABLEAU 34. Nombres de visites et de fleurs filmées. Nombres de fleurs dont les pollinies ont été prélevées (N fl. prel) ou déposées sur la surface stigmatique (N fl. dep) après passage de l'oiseau blanc, *Zosterops borbonicus*.

Sessions	Visites	N fl. filmées (N ind)	N fl. prel	N fl. dep
Bébour				
<i>A. striatum</i>			0	0
Nuit 1	0	7 (1)	0	0
Nuit 2	0	7 (1)	0	0
Nuit 3	0	7 (1)	0	0
Nuit 4	0	7 (1)	0	0
Jour 1	2	9 (1)	4	0
Jour 2	3	10 (1)	1	0
Jour 3	1	46 (5)	0	1
Jour 4	0	13 (1)	0	0
Jour 5	0	13 (1)	0	0
Jour 6	0	13 (1)	0	0
<i>A. bracteosum</i>				
Jour 1	0	27 (1)	0	0
Jour 2	0	26 (1)	0	0
Jour 3	0	26 (1)	0	0
Plaine des Palmistes				
<i>A. cadetii</i>				
Jour 1	0	8 (1)	0	0
Jour 2	1	4 (2)	0	0
Jour 3 ^a	0	19 (3)	0	0
Basse Vallée				
<i>A. cadetii</i>	0		0	0
Jour 1	0	3 (1)	0	0

^a Avec un individu d'*A. bracteosum* (5 fl)

4. 2. 1. 4. Croisements inter- et intra-spécifiques

Tous les croisements entre espèces ont donné des fruits contenant graines embryonnées (Tableau 35 et 36). Il ne semble donc pas y avoir d'incompatibilité génétique « stigmate – pollen » entre des trois espèces.

TABLEAU 35. Taux de fécondité lors des croisements interspécifiques et intraspécifiques en allofécondation ou en autofécondation (nombre de fleurs).

Receveur \ Donneur	<i>A. striatum</i>	<i>A. bracteosum</i>	<i>A. cadetii</i>
<i>A. striatum</i>	100 (4)	100 (6)	100 (7)
<i>A. bracteosum</i>	100 (5)	100 (5)	100 (4)
<i>A. cadetii</i>	100 (6)	100 (6)	100 (5)
Autofécondation	100 (5)	100 (4)	100 (8)

4. 2. 2. Barrières post-reproductives

4. 2. 2. 1. Présence de zygotes hybrides dans les graines

Pour *A. striatum*, la présence d'embryons fut globalement la plus faible des trois espèces (< 60% pour tous les traitements), meilleure dans les cas de pollinisations interspécifiques avec *A. cadetii* et moins conséquente en autofécondation (73.4 +/- 16.4 versus 27.3 +/- 39.2). De façon identique, le nombre d'embryons comptés dans les graines d'*A. bracteosum* a été le plus élevé dans les fruits issus de croisements avec *A. cadetii*. Chez cette dernière espèce (*A. cadetii*), la présence d'embryons a été globalement la plus importante (> 70% pour tous les traitements), mais meilleure dans les cas de croisements intraspécifiques en allofécondation. Notre échantillonnage est cependant trop faible pour tester statistiquement ces résultats.

TABLEAU 36. Nombre d'embryons viables (%) (moyenne $\pm$ écart type) lors des croisements interspécifiques et intraspécifiques en allofécondation ou en autofécondation (nombre de fleurs).

Receveur\Donneur	<i>A. striatum</i>	<i>A. bracteosum</i>	<i>A. cadetii</i>
<i>A. striatum</i>	57.1 +/- 33.2 (3)	50.5 +/- 10.2 (4)	59.8 +/- 20.2 (7)
<i>A. bracteosum</i>	72.5 +/- 0.7 (2)	62.1 +/- 30.2 (3)	78.9 +/- 6.9 (4)
<i>A. cadetii</i>	73.4 +/- 16.4 (3)	78.9 +/- 10.9 (3)	90.4 +/- 8.1 (5)
Autofécondation	27.3 +/- 39.2 (5)	71.3 +/- 16.4 (4)	76.1 +/- 27.1 (8)

4. 3. Discussion

4. 3. 1. Barrières pré-reproductives

4. 3. 1. 1. *Isolement phénologique*

Sur les deux sites étudiés, les floraisons décalées d'*A. striatum* et d'*A. bracteosum* pourraient limiter les possibilités d'hybridations entre les deux espèces. Néanmoins le chevauchement de la floraison de certains individus existe à Bébour et à la Plaine des Palmistes où par exemple, les trois espèces peuvent être en fleurs simultanément. En revanche, l'isolement temporel de la floraison, inexistant chez *A. bracteosum* et *A. cadetii*, n'est pas un facteur permettant d'expliquer la préservation de l'intégrité génétique de ces deux espèces.

4. 3. 1. 2. *Isolement dû aux pollinisateurs – morphologie florale*

Majoritaire chez les orchidées, le maintien de l'intégrité génétique par la spécialisation de la pollinisation, notamment chez les orchidées épiphytes (cf. Introduction) est tout à fait envisageable pour les trois espèces de la section *Hadrangis*. Bien que nous n'ayons identifié qu'un seul pollinisateur (celui d'*A. striatum*), les trois espèces illustre le même syndrome, l'ornithophilie. Un deuxième candidat, *Zosterops oliveaceus* « Z'oiseau vert » également endémique des Mascareignes pourrait être potentiellement le pollinisateur des trois espèces, tout comme l'oiseau blanc. *Z. oliveaceus* est probablement d'origine plus ancienne sur l'île (Gill, 1971). En général, les espèces de la famille des Zosteropidés n'ont pas un régime alimentaire exclusivement nectarivore. Les espèces, à l'image de l'oiseau blanc, complètent le plus souvent leur alimentation par des fruits, des graines ou des insectes (Gill, 1971). Leur rôle dans la pollinisation des

angiospermes n'est cependant pas négligeable (Proctor et al., 1996 ; Kunitake et al., 2004). *Z. oliveaceus*, en revanche, a un régime nectarivore plus prononcé (Gill, 1971). Ce régime alimentaire entraîne un comportement spécifique différant chez les deux oiseaux. Tandis que *Z. borbonicus* (régime généraliste) est opportuniste, *Z. oliveaceus* (nectarivore) est très territorial et plus agressif vis-à-vis des autres espèces (Gill, 1971 ; Barau et al., 2005). Ces deux espèces partagent globalement les mêmes ressources alimentaires au niveau de la flore indigène (Gill, 1971). Cependant, s'ils sont en compétition pour la même plante, l'oiseau blanc s'efface quasi-systématiquement face à l'oiseau vert (Gill, 1971). Nous n'avons jamais identifié *Z. oliveaceus* visitant l'une des trois espèces de la section *Hadrangis*. L'oiseau vert, plus rare que l'oiseau blanc sur l'île, est d'autant moins facile à observer. Néanmoins, le régime spécifiquement nectarivore de *Z. oliveaceus* et l'origine ancienne de cette espèce à La Réunion en font un candidat potentiel dans la relation plante-pollinisateur de la section *Hadrangis*. Deux pollinisateurs sont donc envisageables, mais la spécialisation des oiseaux pour l'une ou l'autre des orchidées n'est certainement pas très élevée. Le comportement opportuniste de l'oiseau blanc, l'interactivité conséquente que l'espèce entretient avec les flores indigène et exotique de l'île (cf. Annexe 6) ne suggèrent pas de relation interspécifique spécialisée pour l'oiseau. D'autant que l'oiseau blanc visite aussi bien les fleurs d'*A. striatum* que celles d'*A. cadetii* à la Plaine des Palmistes. De façon identique pour *Z. oliveaceus*, si l'espèce visite l'une des trois orchidées, il n'y a pas de raison pour qu'elle ne s'intéresse pas aux deux autres ou au moins à l'une des deux autres. La spécialisation viendrait donc de différences morphologiques au niveau des fleurs. L'éperon d'*A. striatum* (ouverture et longueur) est remarquablement adapté à la morphologie du bec de *Z. borbonicus*, si bien qu'il semble impossible pour l'oiseau de collecter le nectar sans prélever les pollinies (bec : 3,7 mm de diamètre à la base, 11,6 mm de longueur (Gill, 1971 ; M. Lecorre, données non publiées) ; éperon de l'orchidée : 3,9

mm à l'ouverture, 11,6 mm en longueur). En revanche, l'ouverture de la fleur d'*A. cadetii* est bien plus grande que la largeur du bec de *Z. borbonicus* et l'éperon beaucoup plus petit (6,3 mm en moyenne). L'adéquation moins prononcée de la morphologie des fleurs d'*A. cadetii* vis-à-vis de celle du bec l'oiseau blanc (bec qui est le lieu d'attachement des pollinies) pourrait impliquer un transport de pollen moins efficace et non systématique lors du butinage des fleurs, à l'image de la visite que nous avons filmée lors de laquelle aucun prélèvement n'a été effectué. Toutefois, le taux de pollen exporté à la plaine des Palmistes pour *A. cadetii* est dans l'ensemble l'équivalent à celui d'*A. striatum*, de l'ordre de 50% des fleurs. Le prélèvement de pollen semble donc tout aussi efficace entre les deux espèces. Deux hypothèses sont donc envisageables :

(1) l'oiseau blanc est effectivement le pollinisateur des deux orchidées, celui d'*A. striatum* comme celui d'*A. cadetii*,

(2) *Z. borbonicus* visite *A. cadetii*, mais ne le pollinise pas ou rarement.

Suivant l'hypothèse d'un pollinisateur commun aux deux espèces, l'oiseau blanc, le taux de prélèvement de pollinies relevé pour *A. cadetii*, similaire à celui d'*A. striatum* (bien que la morphologie de la fleur soit moins « adaptée » au bec de l'oiseau et que nous n'ayons pas observé de prélèvement lors de visites des fleurs) pourrait être expliqué par la compensation de la longévité des fleurs, d'environ 25 jours pour *A. cadetii*, tandis qu'elle n'est que de 17 jours pour *A. striatum* et de 10 jours seulement pour *A. bracteosum* (Tableau 37). S'il est avéré que *Z. borbonicus* soit le pollinisateur non seulement d'*A. striatum*, mais aussi celui d'*A. cadetii*, l'intégrité génétique des deux espèces pourrait alors être expliquée par (1) la répartition géographique des espèces assez différente dans l'ensemble sur l'île (*A. cadetii* est majoritairement de basse altitude ; *A. striatum*, à l'opposé est plutôt une espèce inféodée aux milieux de montagne) bien que les deux

espèces puissent vivre en sympatric, (2) par la floraison assez décalée des individus, bien qu'un petit nombre de fleurs puisse évoluer simultanément dans un même site ou enfin (3) par la distance ou la position de l'attachement des pollinies sur le bec de l'oiseau, empêchant mécaniquement leurs dépôts sur un individu non conspécifique. Les pollinies d'*A. cadetii* sont démesurément grandes par rapport à celles d'*A. striatum*. Elles sont non seulement de taille plus élevée, mais aussi de forme atypique, non globulaire, plutôt aplatie, tronquée vers l'avant et arrondie vers l'arrière, de 1,3 mm de long (Bossier, 1987). Leur transport sur le bec de *Z. borbonicus* impliquerait une plus grande gêne pour l'oiseau et peut-être la perte du pollen d'*A. cadetii* plus conséquente. Il n'est pas rare en effet que les oiseaux se « frottent » le bec sur les troncs des arbres avoisinants afin de se débarrasser des pollinies encombrantes (Dressler, 1971 ; Johnson, 1996). Ce comportement a en outre été observé chez *Z. borbonicus* (J. Fournel, communication personnelle). Toutefois, la pollinisation d'*A. cadetii* a été la plus efficace de toutes les espèces étudiées suggérant que le taux de pollen prélevé, mais non redéposé sur les fleurs n'est pas moindre pour *A. cadetii* que pour *A. striatum* notamment (Figure 53).

TABLEAU 37. Durée de vie des fleurs en jours (moyenne +/- écart type) (*ex situ*, fleurs non pollinisées) (entre parenthèses, nombre de fleurs)

Espèces	<i>Angraecum cadetii</i>	<i>Angraecum striatum</i>	<i>Angraecum bracteosum</i>
Jours	24 +/- 6 (14)	17 +/- 6 (10)	10 +/- 3 (11)

Plaine des Palmistes

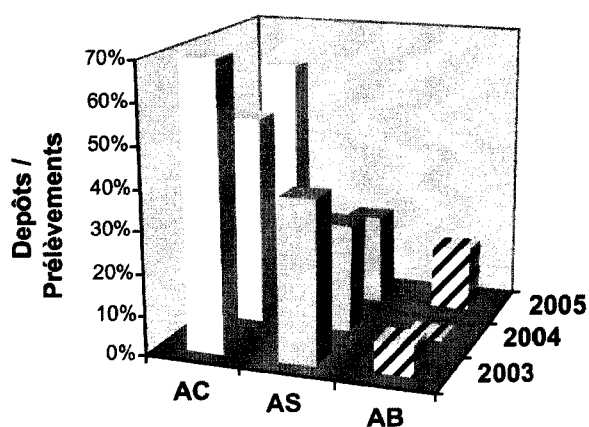


FIGURE 53. Efficacité de la pollinisation (dépôts / prélèvements) des trois espèces étudiées sur le site de la Plaine des Palmistes.

L'alternative de l'hypothèse envisagée ci-dessus serait celle d'un pollinisateur différent de l'oiseau blanc pour *A. cadetii*. *Z. oliveaceus* et sa nectarivorie prononcée pourrait être le candidat potentiel, mais le bec de cet oiseau est encore plus fin que celui de *Z. borbonicus*, à l'image des oiseaux typiquement nectarivores. L'évolution du régime spécialisé pour la nectarivorie a été expliquée dans le cas particulier des oiseaux par la recherche originelle d'insectes ou d'eau dans les fleurs (van der Cingel, 2001). Chez *A. cadetii*, il n'est pas rare que l'éperon abrite de petits insectes (observation personnelle). Leur présence est facilitée par la forme très ouverte des fleurs ; elle pourrait motiver un oiseau non nectarivore à les visiter.

Face à ces multiples hypothèses, l'identité du (ou des) pollinisateur(s) d'*A. cadetii* reste indéterminée. De nouvelles observations *in situ* sont nécessaires.

Il en est de même pour *A. bracteosum* dont la morphologie florale est diamétralement l'opposé de celle d'*A. cadetii* et dans une moindre mesure de celle d'*A. striatum*. Cette espèce est caractérisée par des fleurs très fermées au nectar riche en sucre mais peu abondant. Son labelle a la particularité d'être plus épaissi (calus) au niveau de l'ouverture de l'éperon (Figure 54), juste en dessous de la colonne. Cette caractéristique n'est pas rare chez les orchidées ornithophiles : le calus, en formant une barrière à l'accès au nectar, oblige les oiseaux à forcer leur bec contre la colonne pour le collecter (van der Pijl et Dodson, 1966 ; van der Cingel, 2001). Simultanément, ils prélèvent les pollinies transportées sur le bec. *A. bracteosum*, du fait de l'ouverture très étroite de ses fleurs pourrait être pollinisé par l'oiseau vert, mais de plus amples observations sont nécessaires.

Pour *A. bracteosum*, nous avons relevé les plus faibles taux de prélèvements de pollen, de dépôts, mais aussi de fruits développés. Une série de pollinisations manuelles de

supplémentation⁴⁰ de pollen menées sur *A. bracteosum* (résultats non présentés) a montré que les ressources disponibles du milieu ne semblent pas être le facteur limitant du développement des fruits au cours d'une saison florifère. En conséquence, le comportement des pollinisateurs semble la raison la plus probable de la limitation de la reproduction pour cette espèce, comme c'est d'ailleurs le cas pour la majorité des orchidées (Tremblay et al., 2005). *A. bracteosum* offre beaucoup moins de nectar aux pollinisateurs que ces deux consœurs, un facteur qui pourrait également expliquer leurs visites moins nombreuses, notamment à la Plaine des Palmistes où *A. cadetii* qui produit en moyenne quatre fois plus de nectar qu'*A. bracteosum*, est en fleur durant la même période (si toutefois les deux espèces partagent le même pollinisateur...). L'identification des pollinisateurs d'*A. cadetii* et d'*A. bracteosum* semble donc nécessaire à la compréhension du maintien du patrimoine génétique de chaque espèce.

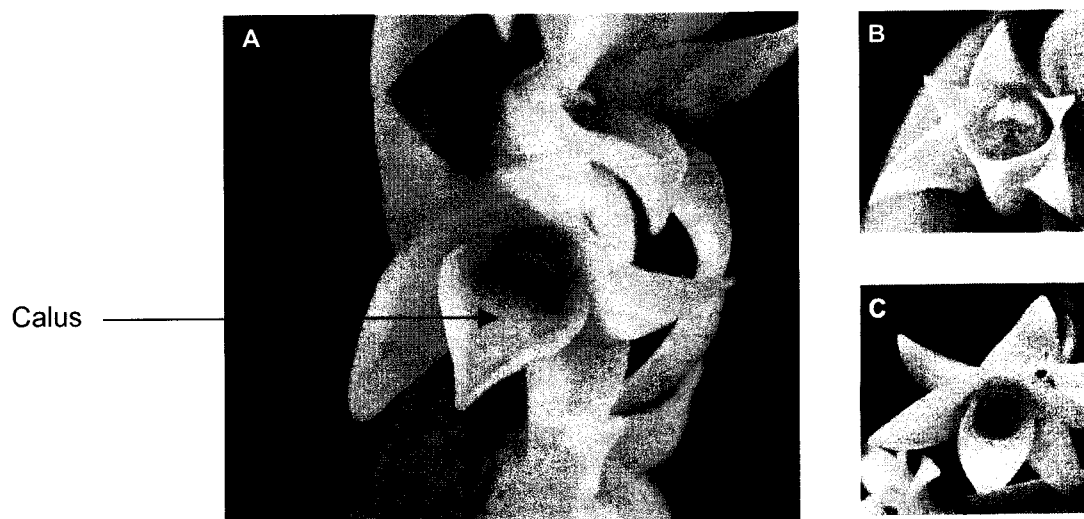


FIGURE 54. Illustration du calus caractéristique du labelle d'*Angraecum bracteosum* (A), noter l'ouverture très étroite de la fleur. *A. cadetii* (B) et *A. striatum* (C) pour comparaison.

⁴⁰ Supplémentation : pollinisations *in situ* de toutes les fleurs de l'individu.

4. 3. 2. Incompatibilité génétique interspécifique

Les barrières génétiques au niveau de la germination des tubes polliniques et de la fécondation des gamètes interspécifiques n'existent pas chez les trois espèces de la section *Hadrangis*. Les barrières post-reproductives, conduisant à la létalité des zygotes hybrides ne semblent pas non plus exister pour les espèces étudiées, pour lesquelles un nombre important d'embryons a été dénombré dans les capsules issues de croisements interspécifiques. Cependant nous n'avons pas testé si la germination des embryons hybrides conduisait au développement de plantules viables. Face aux difficultés de faire germer les graines d'orchidées (fécondation *in vitro*), les études menées sur l'incompatibilité génétique intra- ou interspécifiques sont généralement limitées aux nombres d'embryons « viables » par capsules, le terme d'embryons présents serait néanmoins plus approprié. S. D. Johnson et al. ont néanmoins montré que la production d'embryons n'est pas toujours corrélée au développement consécutif de plantules viables, bien que ce cas d'incompatibilité reste anecdotique dans la famille (Johnson et al., 1998b).

Nous avons initié l'élaboration du protocole de la germination des orchidées angraecoïdes réunionnaises, mais l'optimisation des différents paramètres en est encore au stade de l'expérimentation. Des résultats positifs ont uniquement été obtenus sur les graines de *Beclardia macrostachya*.

4. 3. 3. Ornithophilie versus Sphingophilie à La Réunion

Contrairement à la majorité des orchidées angraecoïdes, les trois espèces de la section *Hadrangis* ne sont pas associées à la pollinisation lépidoptérophile. Concernant la morphologie florale, les espèces ornithophiles de la Réunion se distinguent de leurs consoeurs lépidoptérophiles par la forme générale de l'éperon, conique, tandis qu'elle est typiquement filiforme chez les espèces pollinisées par les papillons nocturnes.

Outre la morphologie des segments floraux, la teneur en saccharose du nectar est moins importante chez les espèces ornithophiles (8,6 - 10,6% en équivalent saccharose), que chez les espèces lépidoptérophiles du genre *Jumellea* que nous avons étudiées (12,9 - 28,5% équivalent saccharose). Ce patron correspond à la tendance générale observée à plusieurs reprises chez les espèces pollinisées par les oiseaux dont le nectar est typiquement plus abondant mais aussi plus dilué que celui des espèces pollinisées par les insectes (Baker, 1975 ; Bolten et Feinsinger, 1978 ; Proctor et al., 1996 ; Pyke et Waser, 1981 ; Meléndez-Ackerman, 1997 ; Nicolson, 2002 ; Dupont et al., 2004 ; Manning et Goldblatt, 2005). La dilution marquée du nectar des fleurs ornithophiles serait à corrélérer à la nature des sucres qui le compose (e.g. Nicolson, 2002) (cf. Annexe 6 pour complément de discussion).

Enfin, les trois espèces de la section *Hadrangis* se singularisent, à l'image des espèces ornithophiles, par l'absence d'odeur.

Le taux de fécondité des trois espèces de la section *Hadrangis* varie significativement entre les espèces et les sites étudiés, mais elle semble en revanche assez régulière selon les années. La fécondité, de l'ordre de 11-24% pour les deux espèces *A. striatum* et *A. cadetii* et de l'ordre de 3-12% pour *A. bracteosum* est bien inférieure au taux moyen reporté chez les orchidées ornithophiles qui est d'environ 60% (Annexe 6).

Cependant, *A. cadetii* et *A. striatum* ont tous deux un taux de fécondité assez proche de celui de *Comparettia falcata* (18,1%), épiphyte tropicale, pollinisée par les colibris (Rodríguez-Robles et al., 1992).

Le taux de fécondité des espèces ornithophiles de La Réunion se situe dans l'intervalle de celui des espèces lépidoptérophiles étudiées, plus faible que celui de *J. triquetra*, mais plus élevé ou équivalent celui de *J. fragrans*.

4. 3. 4. Evolution vers l'ornithophilie aux Mascareignes

Le syndrome de pollinisation ornithophile de la section *Hadrangis* semble original au sein de la sous-tribu des Angraecinae. Chez les oiseaux, trois familles ont principalement évolué vers la nectarivorie en milieu tropical de manière indépendante : les Nectaridiinae (Souï-mangas) en Afrique et en Asie, les Trochilidae (Colibris) en Amérique et les Meliphagidae ("*Honeyeaters*") en Australie (van der Pijl et Dodson, 1966; Wolf et al., 1975; Stiles, 1981; Proctor et al., 1996). Si les colibris et les soui-mangas ont été clairement identifiés comme les pollinisateurs de plusieurs orchidées (e.g. van der Pijl et Dodson, 1966 ; Rodríguez-Robles et al., 1992 ; Singer et Sazima, 1994 ; Johnson, 1996 ; Johnson et Brawn, 2004), la pollinisation par les « *Honeyeaters* » reste plus anecdotique dans la littérature (van der Pijl et Dodson, 1966; van der Cingel, 2001). Néanmoins, dans la relation oiseau-orchidée (interaction rare dans la famille), les pollinisateurs identifiés jusqu'à présent n'appartenaient qu'aux lignées qui ont évolué vers la nectarivorie. Pour la première fois, la relation Zosteropidae-Orchidaceae (famille non-adaptée à la collecte de nectar) est décrite dans la pollinisation des orchidées (Annexe 6).

L'évolution vers l'ornithophile dans les îles est un phénomène récurrent (Anderson et al., 2001 ; Anderson, 2003). Pour compenser les faibles ressources liées à la pauvreté de l'entomofaune locale, les vertébrés insectivores incluent généralement nectar et fruits à leur régime alimentaire (Olesen et al., 2003 ; Dupont et al., 2004). Sur les îles, l'évolution des traits floraux a pu être influencée de façon significative en réponse au comportement spécifique de la faune insulaire lié la nectarivorie plus prononcée, tandis que sur le continent, les forces évolutives imposées par ces mêmes taxons sont moindres ou inexistantes (Dupont et al., 2004). F. B. Gill expliqua l'évolution vers la nectarivorie de l'oiseau vert à La Réunion par l'absence préalable d'oiseaux nectarivores (Nectaridiinae) sur l'île (niche écologique vide) (Gill, 1971). Deux oiseaux ayant strictement les mêmes ressources alimentaires (nectar) évoluent difficilement en sympatrie (compétition, défense du territoire) (Gill, 1971). Si l'oiseau vert est effectivement le pollinisateur de l'une ou de plusieurs espèces de la section *Hadrangis*, il est possible que l'évolution vers la nectarivorie de l'oiseau soit corrélée à celle de la pollinisation ornithophile des orchidées. Outre les pressions sélectives plus fortes imposées par l'avifaune en milieu insulaire, l'absence probable du pollinisateur spécifique de la forme ancestrale de la section *Hadrangis* a certainement été elle aussi déterminante dans l'évolution des trois orchidées vers l'ornithophilie.

4. 4. Conclusions et perspectives

Comme les espèces du genre *Jumellea* à court éperon dont la relation avec la faune pollinisatrice locale est maintenue à La Réunion, les espèces de la section *Hadrangis* se sont diversifiées sur l'île. Cependant, les mécanismes ayant conduit à leur spéciation, ainsi que ceux qui permettent le maintien de l'intégrité génétique des trois espèces ne sont pas encore déterminés. Ils semblent liés à la spécialisation de la pollinisation plutôt qu'à l'isolement temporel de la floraison (notamment pour *A. cadetii* et *A. bracteosum*) ou à la mise en place de barrières d'incompatibilité génétique entre les espèces.

L'étude de la relation *Angraecum-Zosterops*, initiée dans ce travail de recherche, offre des champs d'investigation multiples, concernant par exemple l'écologie fonctionnelle des écosystèmes primaires réunionnais ou la biologie florale et reproductive des orchidées. Toutefois, la poursuite de l'identification des pollinisateurs, couplée à l'étude de la variabilité génétique des espèces au niveau populationnel semblent les deux voies de recherches les plus décisives et les plus prometteuses pour permettre l'avancement des connaissances sur les processus évolutifs qui ont permis la spéciation des trois espèces et le maintien de l'intégrité génétique de chacune.

5. EVOLUTION DE L'INTERACTION SPHINGOPHILE APRES COLONISATION DE LA REUNION

La phylogénie moléculaire des sous-tribus des *Aerangidinae* et des *Angraecinae* a permis de mettre en évidence que les souches ancestrales des espèces à long éperon endémiques de la Réunion, mais aussi celles de la section *Hadrangis* du genre *Angraecum* étaient malgaches, toutes à long éperon. La richesse spécifique de telles formes florales à Madagascar a été expliquée par l'adaptation à long terme des orchidées angracoïdes à la lépidoptérofaune pollinisatrice, notamment à celle de la famille des Sphingidés, relations interspécifiques conduisant à la mise en place d'interactions unilatéralement spécialisées pour l'orchidée. Une telle spécialisation rend la plante entièrement dépendante de son unique pollinisateur (cf. Introduction générale).

L'évolution autochtone des formes à long éperon émigrantes de Madagascar a suivi deux grandes voies indépendantes à La Réunion, deux évolutions distinctes, bien que leur déterminisme semble avoir été inféré en partie de la même causalité : l'absence du partenaire spécifique lors de la colonisation de l'île. Ces deux voies sont : (1) l'évolution vers un mode de reproduction autonome, l'autofertilité, dans le cas des espèces à long éperon des genres *Jumellea* et *Aerangis* et de celles de la section *Perrierangraecum* du genre *Angraecum* et (2) l'adaptation à la faune pollinisatrice locale, l'évolution vers l'ornithophilie, pour les espèces de la section *Hadrangis* du genre *Angraecum* (Figure 55).

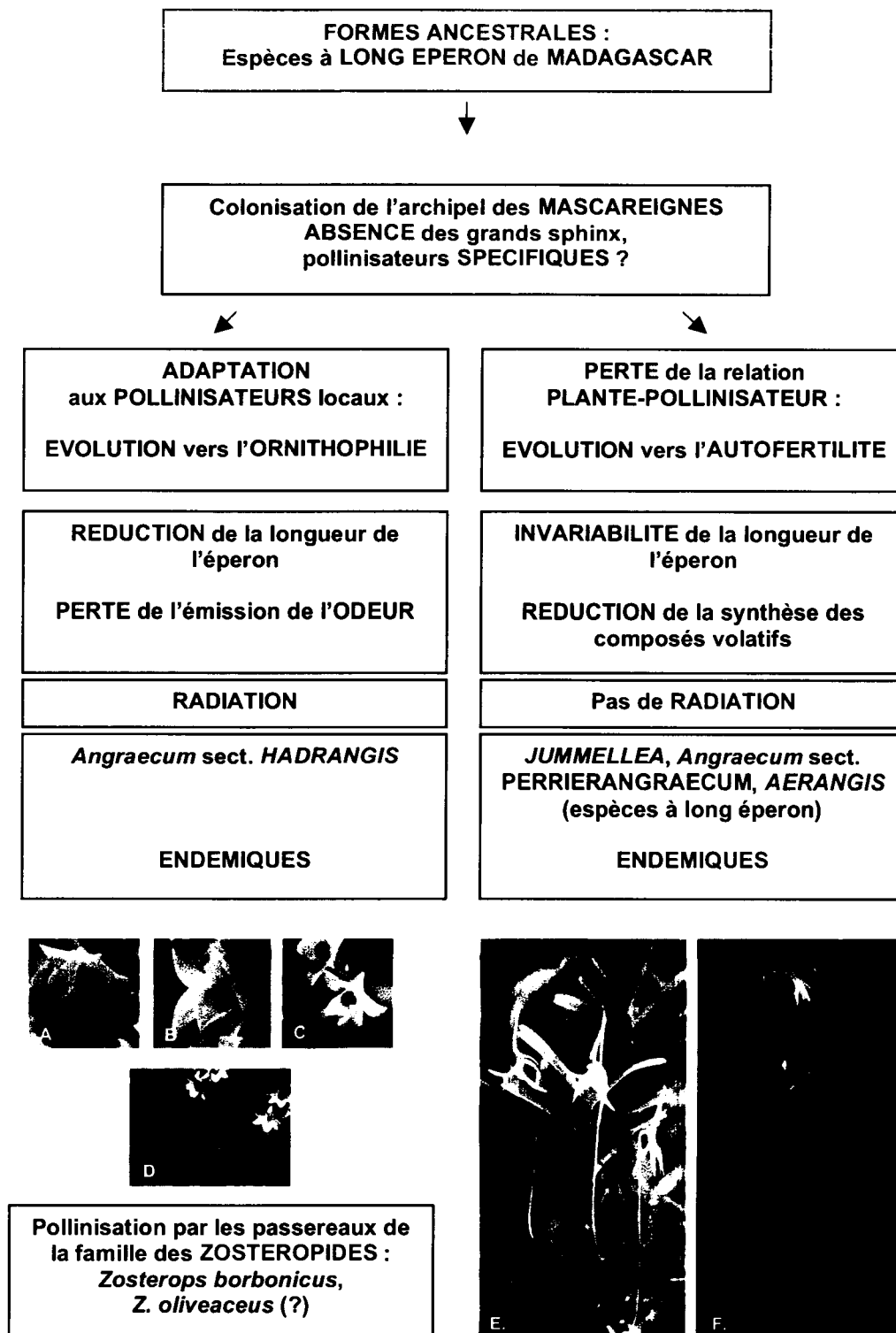


FIGURE 55. Scénario hypothétique évolutif bidirectionnel des orchidées angraecoïdes réunionnaises à partir de souches malgaches à long éperon. **A.** *Angraecum cadetii*. **B.** *A. bracteosum*. **C.** *A. striatum*. **D.** *Zosterops borbonicus*. **E.** *Jumellea recta*. **F.** *J. stenophylla*.

5. 1. Perte de l'interaction sphingophile

En ce qui concerne l'évolution vers l'autofertilité, le passage à un mode de reproduction autonome a eu lieu au moins à sept reprises de façon indépendante chez les orchidées angraecoïdes réunionnaises (Figure 56). Chez ces espèces, la relation sphingophile, envisagée pour les formes ancestrales, semble totalement perdue à La Réunion. L'évolution vers l'autofertilité suggère l'absence des pollinisateurs spécifiques, les grands sphinx, lors de la colonisation de l'archipel par les souches ancestrales. Malgré la présence actuelle de deux espèces représentatives de ces lépidoptères à La Réunion, *Agrius convolvuli* et *Coelonia fulvinotata*, aucune espèce autofertile ne semble s'être adaptée à ces deux pollinisateurs potentiels locaux.

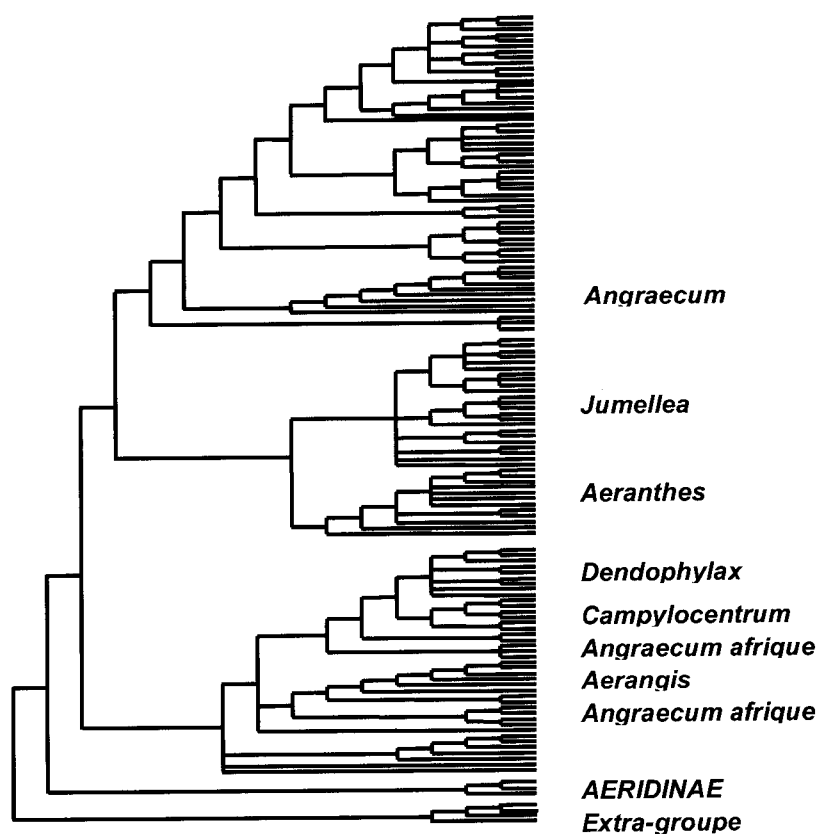


FIGURE 56. Distribution des espèces autofertiles à long éperon de la Réunion (en rouge) sur le support phylogénétique (arbre repris de la Figure 15).

5. 2. Maintien de la relation sphingophile

En revanche, les espèces à long éperon qui requièrent obligatoirement l'aide d'un vecteur pollinique pour se reproduire et pour lesquelles la relation orchidée-sphinx semble s'être maintenue à La Réunion concernent uniquement les espèces indigènes, *Angraecum mauritianum*, *A. eburneum* et *A. conchoglossum*. Bien que les pollinisateurs n'aient pas été clairement identifiés pour *A. mauritianum* et *A. eburneum*, la production de fruits plus ou moins abondante, relevée dans les populations naturelles de ces deux espèces, l'émission d'une odeur puissante des fleurs au crépuscule (contrairement aux espèces autofertiles) sont révélatrices du maintien de l'interaction sphingophile. En revanche, la présence de cette interaction qui semble fonctionnelle pour *A. mauritianum* et *A. eburneum* demande confirmation pour *A. conchoglossum*, espèce rare à La Réunion et pour laquelle aucun fruit n'a été observé en trois ans sur le site de la Plaine des Palmistes par exemple. *A. arachnithes*, qui est morphologiquement très proche d'*A. conchoglossum* à Madagascar est elle pollinisée par le sphinx *Panogena lingens* Butler, absent à la Réunion. Dans le cas particulier d'*A. conchoglossum*, l'étude plus approfondie du mécanisme de sa pollinisation et du succès de sa reproduction s'avère nécessaire afin de conclure quant au maintien de l'interaction sphingophile de cette espèce à la Réunion, d'autant que la longueur de la taille de l'éperon de l'orchidée se situe dans l'intervalle de celle des taxons autofertiles (Figure 57).

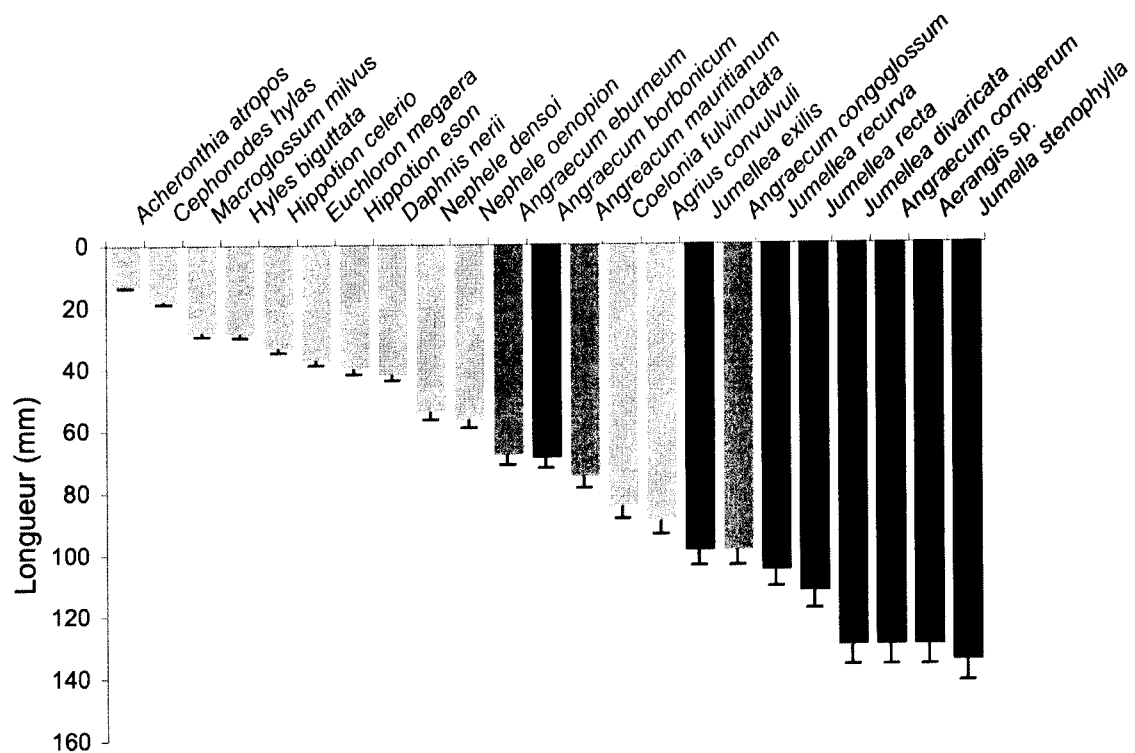


FIGURE 57. Comparaison de la longueur des trompes des sphinx indigènes (en gris) et de la longueur de l'éperon des orchidées angraecoïdes indigènes (en jaune) et endémiques (en rouge) de la Réunion. Les couleurs sont également corrélées au mode de reproduction des espèces : rouge pour les orchidées autofertiles, jaune pour celle dont la présence de pollinisateurs est nécessaire à la production de fruits.

5. 3. Evolution de la sphingophilie vers l'ornithophilie

Contrairement à leurs consœurs autofertiles, dont l'évolution vers un régime de reproduction autonome a stigmatisé les formes florales, l'adaptation à l'avifaune pollinisatrice locale des trois espèces de la section *Hadrangis* du genre *Angraecum* a conduit au développement de traits floraux tout à fait caractéristiques de la pollinisation par les oiseaux : production de nectar dilué, réduction de la taille de l'éperon et perte de l'odeur. Selon Fenster et al. (2004), le passage à un groupe de pollinisateurs fonctionnels différent (de la pollinisation par les sphinx vers celle par les oiseaux dans ce cas précis) est permis si les taxons possèdent originellement les « clefs » morphologiques qui autorisent l'établissement de la nouvelle relation plante-pollinisateur. Les espèces de la section *Hadrangis* possédaient certainement la morphologie florale requise au passage vers la pollinisation ornithophile, contrairement à celles du genre *Jumellea* ou à celles de la section *Perrierangraecum* du genre *Angraecum*, espèces à long éperon aujourd'hui autofertiles à La Réunion. Le groupe-frère de la section *Hadrangis*, c'est-à-dire les espèces de la section *Humblotiangraecum* se singularisent par l'ouverture très large de l'éperon, caractère inexistant chez toutes les espèces qui ont évolué vers l'autofertilité à La Réunion. En outre, les espèces pollinisées par les oiseaux présentent en général des inflorescences pluriflores, ce qui est le cas notamment de toutes les orchidées ornithophiles relevées de la littérature (Annexe 6). Or, si les inflorescences des espèces du groupe *Hadrangis-Humblotiangraecum* sont elles aussi pluriflores, celles des espèces autofertiles de la Réunion, caractérisée par des plantes à fleurs solitaires, ne le sont pas.

Les prédispositions morphologiques des souches ancestrales des trois espèces de la section *Hadrangis*, comme la largeur de l'ouverture de l'éperon et l'inflorescence pluriflore énumérées ci-dessus, ont donc certainement favorisé le passage de la

sphingophile attendue chez ces formes ancestrales vers l'ornithophile actuelle des espèces de la section *Hadrangis*, ornithophilie avérée pour *A. striatum* et attendue pour *A. cadetii* et *A. bracteosum*. Mais, l'implication de la morphologie des formes émigrantes dans l'évolution vers l'ornithophilie n'est pas unicausale. Elle est à mettre en relation, comme nous l'avons vu, avec l'absence probable de grands sphinx lors de la colonisation de l'île et avec la nectarivorie généralement plus prononcée des oiseaux en milieux insulaires (Dupont et al., 2004).

CONCLUSION GENERALE

PERSPECTIVES

Cette étude portait sur la systématique, la biologie reproductive et la biologie évolutive des espèces de la sous-tribu des Angraecinae présentes à La Réunion. La reconstruction phylogénétique d'un échantillonnage des orchidées angraecoïdes de la zone sud-ouest de l'Océan Indien à partir de séquences d'ADN du génome chloroplastique a permis d'envisager la thématique de recherche selon deux grandes voies : (1) celle de l'implication de l'outil moléculaire dans la systématique du groupe dont les relations phylogénétiques entre les taxons, malgré le nombre important d'espèces, avaient été très peu étudiées ; (2) celle de l'évolution de la relation plante-pollinisateur et des traits floraux associés, suite à la colonisation de La Réunion.

Les objectifs de l'étude étaient les suivants :

(1) SYSTEMATIQUE : déterminer les relations phylogénétiques entre les espèces de la sous-tribu des Angraecinae et dans une moindre mesure de celle des Aerangidinae afin de retracer l'histoire évolutive des caractères morphologiques utilisés dans la taxonomie du groupe et de distinguer les traits convergents de ceux qui ont été hérités d'une ascendance commune,

(2) BIOGEOGRAPHIE : déterminer l'origine géographique des espèces réunionnaises, les formes ancestrales associées et les cas de radiation *in situ* dans l'île,

(3) BIOLOGIE de la POLLINISATION : caractériser les syndromes de pollinisation des formes florales réunionnaises afin de rendre compte d'éventuelles spécificités morphologiques propres à l'île,

(4) BIOLOGIE EVOLUTIVE : déterminer l'implication de la relation interspécifique dans l'évolution des traits floraux associés aux pressions sélectives des pollinisateurs et le rôle de la relation plante-pollinisateur dans les processus de radiation.

En fonction nos objectifs, les résultats que nous avons obtenus ont été traités dans le Chapitre I selon qu'ils concernaient la systématique ou la biogéographie des taxons et dans le Chapitre II selon qu'ils s'inscrivaient dans le domaine de la biologie de la pollinisation ou de la biologie évolutive des espèces.

Quant à l'implication taxonomique de la reconstruction phylogénétique des orchidées angraecoïdes de la zone afro-malgache, nos résultats montrent clairement l'inclusion de la sous-tribu des Aerangidinae au sein de celle des Angraecinae, tandis que la monophylie de chacune des deux autres sous-tribus formant les Vandaeae, les Aeridinae

et les Polystachyinae avait été vérifiée à plusieurs reprises lors d'études antérieures (Rasmussen et Freudenstein, 1999 ; Freudenstein et al., 2004 ; Topik et al., 2005, voir également Chase et al., 2003).

L'extraordinaire radiation du genre *Angraecum*, certainement l'un des plus vieux genre de la sous-tribu des Angraecinae et dont certains représentants en Afrique semblent non seulement à la base (origine commune) de la majorité des genres inclus dans la sous-tribu des Aerangidinae, mais aussi à l'origine de la lignée des genres actuellement présents sur le continent américain, est à l'origine de la paraphylie de la sous-tribu des Angraecinae. Les souches ancestrales, notamment celles du genre *Angraecum* ont évolué de façon indépendante en Afrique et à Madagascar, chacune à la base de lignées distinctes entre la grande île et le continent. Une forte corrélation du nombre basique de chromosomes et de la localité géographique des espèces avait d'ailleurs été suggérée lors de l'étude cytologique du groupe, il y a près de 20 ans (Arends et van der Laan, 1983, 1986). Le patron de distribution cytologique correspond tout à fait à celui des relations de parenté entre les espèces inféré de nos analyses moléculaires. Outre le genre *Angraecum* polyphylétique, tous les autres genres de la sous-tribu des Angraecinae inclus dans notre jeu de données semblent monophylétiques, aux exceptions près (1) du genre *Bonniera*, endémique de La Réunion, dont les espèces sont incluses parmi celles de la section *Arachnangraecum* du genre *Angraecum*, et (2) du genre *Aeranthès* dont la monophylie est supportée, mais à la condition que l'espèce *Aeranthès henricii*, par ailleurs morphologiquement éloignée des ses consœurs génériques, en soit exclu.

Parmi les caractères les plus couramment utilisés pour la classification des orchidées angraecoïdes comme la couleur des fleurs, la taille de l'éperon ou la morphologie du rostellum, la cartographie de leur évolution sur le support phylogénétique a permis de montrer que la couleur des fleurs, pigmentation associée la structure hyaline ou

charnue des segments floraux constitue une base assez solide pour discriminer entre elles les espèces, à l'exception toutefois du genre *Aeranthes* au sein duquel la couleur est polymorphe. Outre ce dernier genre et le fait que le passage à la couleur verte soit apparu de façon récurrente, elle constitue toutefois une synapomorphie intéressante d'un ensemble d'espèces du genre *Angraecum*, espèces également caractérisées par des fleurs de petite taille et pollinisées par de petits papillons hétérocères actifs de jour à La Réunion.

La taille de l'éperon est en revanche très polymorphe. L'état ancestral de ce caractère est difficilement interprétable et dépend du référentiel choisi. Dans le genre *Angraecum*, par exemple, chez les espèces africaines, l'éperon court semble plésiomorphe, tandis qu'à Madagascar et à La Réunion notamment, bon nombre d'espèces à court éperon dérive de formes ancestrales longuement éperonnées.

La morphologie du rostellum a été un caractère décisif dans l'histoire de la classification des orchidées angraecoïdes puisqu'elle est à la base de la distinction des sous-tribus des *Aerangidinae* et des *Angraecinae*. L'allongement du rostellum, état apomorphique du caractère, regroupe la majorité des genres inclus dans les *Aerangidinae*, groupe monophylétique. Toutefois, dans le cas particulier du genre *Beclardia*, ce caractère semble avoir évolué de façon parallèle : selon nos analyses, l'inclusion de ce genre dans la sous-tribu des *Aerangidinae* sur la base de la morphologie du rostellum ne semble pas justifiée. Il serait extrêmement intéressant de confronter la cytologie du genre *Beclardia* aux données morphologiques et moléculaires, contradictoires.

Enfin, parmi les caractères ayant servi à discriminer les genres, les sections ou les espèces dans le groupe des orchidées angraecoïdes, mais dont nous n'avons pas retracé l'évolution sur l'arbre phylogénétique, la taille des fleurs semble très variable, notamment chez les espèces sud-américaines pour lesquelles elle n'est pas représentative des relations de parenté entre les taxons (Carlsward et al., 2003). Le nombre de fleurs par inflorescence

est également difficile à utiliser dans la taxonomie du groupe, bien qu'il fut en partie à la base de l'identification des sections reconnues par L. Garay dans le genre *Angraecum* (Garay, 1973). Les principales difficultés viennent du fait que ce caractère n'est pas clairement défini : les espèces furent regroupées selon qu'elles avaient une voire deux fleurs, ou bien plus de trois. Ce regroupement particulier vient du fait que la distinction d'espèces strictement uniflores, bien qu'elle soit possible dans certains cas (comme par exemple les espèces de la section *Perrierangraecum* du genre *Angraecum*), n'est pas évidente en général du fait des possibilités multiples qui existent pour ce caractère chez les espèces.

Notre étude préliminaire sur la connaissance des relations de parenté des genres et des espèces au sein des Angraecinae et des Aerangidinae a surtout permis de mettre l'accent sur les points qui demandent à être davantage explorés, plutôt qu'elle n'apporte de réelles solutions sur la taxonomie de ce groupe obscure et difficile. Ainsi, les perspectives sont multiples : la délimitation des sous-tribus des Aerangidinae et des Angraecinae s'avère obsolète sur la base des données moléculaires, mais également cytologiques, selon la définition originelle des sous-tribus par V. Summerhayes (Summerhayes, 1966). De façon identique, une révision morphologique du genre *Angraecum* sur la base des regroupements solides inférés des données cytologiques et moléculaires est nécessaire, ainsi que la poursuite de l'investigation des espèces dans ces deux domaines en augmentant le nombre de taxons échantillonnés lors de l'étude cytologique initiée par Arends et van der Lann (1983, 1986), mais aussi lors l'étude moléculaire présentée ici.

Le support phylogénétique a également permis de mettre en évidence l'origine des Angraecinae présentes aujourd'hui à la Réunion, origine principalement malgache. La différenciation des trois espèces de la section *Hadrangis* du genre *Angraecum* aux

Mascareignes a également été clairement démontrée, radiation dont les souches ancestrales étaient proches des espèces à long éperon typiquement sphingophiles de la section *Humblotiangraecum*.

La caractérisation des syndromes de pollinisation des orchidées angraecoïdes de La Réunion a permis de confirmer que les espèces ont principalement développé des relations interspécifiques avec la lépidoptérofaune locale, avec les papillons nocturnes en particulier, très représentés sur l'île. Toutefois, deux cas semblent spécifiques de la Réunion : (1) l'autofertilité des espèces à long éperon, dont les formes florales correspondent en tous points au syndrome sphingophile et (2) l'ornithophilie des espèces de la section *Hadrangis*, dont l'interaction avec les oiseaux passériformes de la famille des Zosteropidés, mise en évidence dans cette étude, est tout à fait nouvelle pour la famille des Orchidaceae chez laquelle la pollinisation par les oiseaux reste rare.

L'évolution vers l'autofertilité des espèces à long éperon, apparue de façon indépendante chez trois genres à la Réunion (*Aerangis*, *Jumellea* et *Angraecum*) s'ensuit ou non de modifications structurales de la colonne, modifications qui permettent alors d'augmenter l'efficacité de l'autopollinisation autonome des fleurs. La faculté de « s'auto-reproduire » s'accompagne également pour les espèces réunionnaises à long éperon d'une diminution de la synthèse des composés volatils lié à l'attraction des pollinisateurs, mais la taille de l'éperon et la production de nectar riche en sucre sont maintenues. La relation plante-pollinisateur chez les espèces autofertiles semble totalement absente. La perte de l'interaction interspécifique est corrélée à la non-radiation des espèces sur l'île, mais la causalité des patrons observés, bien qu'elle soit fortement envisageable, reste difficilement prouvable de façon scientifique, tant les facteurs qui gouvernent les processus de radiation

sont multiples, écologique et génétique. Enfin, malgré la production de fruits conséquente chez la plupart des espèces autofertiles à long éperon, ces espèces sont en général rares et inféodées à des milieux spécifiques, sauf l'espèce *Angraecum borbonicum* qui a une large répartition, la seule exception des huit espèces autofertiles à long éperon présentes à La Réunion.

L'évolution vers l'ornithophilie, au contraire, a conduit au développement de traits spécifiques associés à l'interaction avec les oiseaux comme la production de nectar dilué, la diminution de la taille de l'éperon ou la perte totale de la synthèse des composés olfactifs. La relation ornithophile est corrélée à la radiation des espèces sur l'île en trois taxons. Les mécanismes qui ont permis et qui permettent le maintien de l'intégrité génétique restent cependant à clarifier. L'investigation menée en ce sens suggère que l'isolement reproducteur n'est pas corrélé à la distribution spatiale des espèces, qui peuvent en outre évoluer en sympatrie. L'isolement temporel par le décalage de la floraison des espèces, bien qu'il existe entre *A. striatum* et *A. bracteosum* et entre *A. striatum* et *A. cadetii*, autorise cependant sur une courte période la présence simultanée des fleurs des trois espèces. Le décalage de la floraison d'*A. bracteosum* et d'*A. cadetii* est pour sa part inexistant. L'isolement génétique par la mise en place de barrières pré- (incompatibilité des gamètes) ou post-zygotique (létalité des embryons) n'existe pas non plus. Cependant la viabilité des plantules issues d'hybridations n'a pas été vérifiée. L'isolement par la spécificité des pollinisateurs doit être clairement démontré, mais les comportements de butinage des deux oiseaux, *Zosterops borbonicus* (pollinisateur avéré) et *Z. oliveaceus* (pollinisateur potentiel) semblent très peu spécialisés, au regard des nombreuses fleurs des plantes indigènes ou exotiques qu'ils visitent. L'isolement reproducteur dû à la morphologie florale, notamment au lieu d'attachement spécifique des pollinies sur le bec

des pollinisateurs semble la voie la plus probable qui permettent le maintien du patrimoine génétique des espèces. Toutefois, nous n'avons aucune idée des processus ayant conduit à la spéciation de la section *Hadrangis*. Il n'est pas exclu que l'une des trois espèces soit issue de l'hybridation des deux autres. En ce sens, l'outil moléculaire serait un recours de choix pour investir la variabilité génétique des populations de ces trois espèces et de détecter les éventuelles introgressions génomiques.

Dans une vision évolutive élargie, cette étude a permis de mettre en évidence deux voies d'évolution tout à fait différentes au sein d'espèces phylogénétiquement proches de la famille des Orchidaceae suite à la colonisation d'une île océanique, La Réunion. L'absence de reproduction sexuée due à l'absence probable des pollinisateurs spécifiques lors de l'arrivée des souches émigrantes de Madagascar semble être le moteur de l'évolution vers un nouveau mode de reproduction dans l'un des cas et de l'adaptation à de nouveaux pollinisateurs dans le deuxième exemple. Cette étude illustre la singularité des écosystèmes insulaires et l'exceptionnelle capacité des orchidées de s'adapter à de nouveaux milieux.

L'implication de ce travail dans la conservation des espèces a permis de mettre en évidence que la présence et le maintien des pollinisateurs dans le milieu ne sont pas les facteurs déterminant la survie des orchidées endémiques à long éperon puisque toutes ces espèces sont autofertiles. En revanche, la conservation des habitats semble la priorité pour ces espèces rares et le plus souvent spécifiques d'un écosystème particulier, comme les fourrés à *Pandanus* pour *J. stenophylla* ou la forêt de Piemont pour *Angraecum cornigerum*.

A l'image de l'extrême fragilité des écosystèmes insulaires, la biodiversité dans les îles océaniques a connu un déclin sans précédent durant ces 400 dernières années. Le développement humain est la première cause de l'extinction massive des espèces, par son activité (Carlquist, 1980 ; Stasberg, 1994), mais aussi par l'introduction de plantes envahissantes bouleversant l'équilibre des écosystèmes primaires (Strasberg, 1994). La connaissance fondamentale du fonctionnement de ces systèmes et des relations de mutualisme qui se tissent entre les espèces est indispensable, afin d'appréhender les extinctions en cascade dues aux interactions interspécifiques (Neiland et Wilcock, 1998 ; Johnson et Steiner, 2000).

L'étude de la relation *Hadrangis-Zosterops* participe en ce sens de la compréhension générale du fonctionnement des écosystèmes singuliers des îles océaniques et de l'établissement des interactions plantes-pollinisateurs dans un contexte insulaire. A l'aube de ce XXI^e siècle, la connaissance des écosystèmes tropicaux souffre encore de grandes lacunes par rapport à celle des régions tempérées. Pourtant, ils participent pleinement, et les écosystèmes insulaires en particulier, au patrimoine biologique unique de la planète, tout comme l'extraordinaire beauté des orchidées, toujours fascinantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACKERMAN JD, MONTERO OJC. 1985.** Reproductive Biology of *Oncidium variegatum*: Moon Phases, Pollination, and Fruit Set. *American Orchid Society Bulletin* **54**: 326-329.
- ACKERMAN JD. 1986a.** Coping with the epiphitic existence: pollination strategies. *Selbyana* **9**: 52-60.
- ACKERMAN JD. 1986b.** Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* **1**: 108-113.
- ACKERMAN JD. 1989.** Limitations to Sexual Reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). *Systematic Botany* **14**: 101-109.
- ACKERMAN JD, MONTALVO AM, VERA AM. 1989.** Epiphyte host specificity of *Encyclia krugii*, a Puerto Rican endemic orchid. *Lindleyana* **4**: 74-77.
- ACKERMAN JD, MONTALVO AM. 1990.** Short- and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology* **71**: 263-272.
- ACKERMAN JD, RODRÍGUEZ-ROBLES JA, MELÉNDEZ EJ. 1994.** A Meager nectar offering by an epiphytic orchid is better than nothing. *Biotropica* **26**: 44-49.
- ACKERMAN JD, SABAT A, ZIMMERMAN JK. 1996.** Seedling establishment in an epiphytic orchid: and experimental study of seed limitation. *Oecologia* **106**: 192-198.
- ADAMS RP. 2001.** Identification of essential oil components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- ADSERSON H. 1995.** Research on islands: classic, recent, and prospective approaches. In: VITOUSEK PM, LOOPE LL and ADSERSEN H, eds. *Islands. Biological diversity and ecosystem function*. Berlin: Springer Verlag. 7-21.
- AKAIKE H. 1974.** A new look at statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*. **19**: 716-723.
- ALEJANDRO GD, RAZAFIMANDIMBISON SG, LIEDE-SCHUMANN S. 2005.** Polyphyly of *Mussaenda* inferred from ITS and trnT-F data and its implication for generic limits in Mussaendeae (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **92**: 544-557.
- ANDERSON GJ, BERNARDELLO G, STUESSY TF, CRAWFORD DJ. 2001.** Breeding system and pollination of selected plants endemic to Juan Fernández Islands. *American Journal of Botany* **88**: 220-233.
- ANDERSON SH. 2003.** The relative importance of birds and insects as pollinators of the New Zealand flora. *New Zealand Journal of Ecology* **27**: 83-94.
- ANDREASEN K, BREMER B. 2000.** Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae-Ixoroideae: morphology, nuclear and chloroplast DNA data. *American Journal of Botany* **87**: 1731-1748.

- APG. 1998.** An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85**: 531-553.
- APG. 2003.** An update of APG classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 399-436.
- ARDITTI J, GHAMI AKA. 2000.** Transley Review No. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* **145**: 367-421.
- ARCTANDER, S. 1994.** Perfume and flavor chemicals (Aroma chemicals), vol. 1 et 2. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- ARENDs JC, VAN DER LAAN FM. 1983.** Cytotaxonomy of the monopodial orchids of the African and Malagasy regions. *Genetica* **62**: 81-94.
- ARENDs JC, VAN DER LAAN FM. 1986.** Cytotaxonomy of the Vandaeae. *Lindleyana* **1**: 33-41.
- ARMBRUSTER WS. 1992.** Phylogeny and the evolution of plant animal interactions. *Biosciences* **42**: 12-20.
- ARMBRUSTER WS. 1993.** Evolution of plant-pollination systems: hypotheses and tests with the neotropical vine *Dalechampia*. *Evolution* **47**: 1480-1505.
- ARMBRUSTER WS, BALDWIN BG. 1998.** Switch from specialized to generalized pollination. *Nature* **394**: 394-632.
- ASHWORTH L, AGUILAR R, GALETTO L, AIZEN MA. 2004.** Why do pollination generalist and specialist plant species show similar reproductive susceptibility to habitat fragmentation? *Journal of Ecology* **92**: 717-719.
- ATWOOD JT. 1986.** The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* **9**: 171-186.
- BAKER HG. 1955.** Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution* **9**: 347-348.
- BAKER HG. 1963.** Evolutionary mechanisms in pollination biology. *Science*: 877-883.
- BAKER HG. 1967.** Support for Baker's law - as a rule. *Evolution* **21**: 853-856.
- BAKER HG. 1975.** Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* **7**: 37-41.
- BALDWIN BG, KYHOS DW, DVORAK J, CARR GD. 1991.** Chloroplast DNA evidence for a North America origin of the Hawaiian silversword alliance (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **88**: 1840-1843.

- BALDWIN BG, SANDERSON MJ, J. M. PORTER JM, WOJCIECHOWSKI MF, CAMPBELL CS, DONOGUE MJ. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri botanical Garden* **82**: 247-277.
- BALDWIN BG. 1998. Evolution in the endemic Hawaiian Compositae. In: STUESSY TF and ONO M, eds. *Evolution and speciation of island plants*. Cambridge: Cambridge University Press. 49-73.
- BALDWIN BG, SANDERSON MJ. 1998. Age and rate of diversification of the Hawaiian silversword alliance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1840-1843.
- BALLARD HE, SYTSMA KJ. 2000. Evolution and biogeography of the woody Hawaiian violets (*Viola*, Violaceae): arctic origins, herbaceous ancestry and bird dispersal. *Evolution* **54**: 1521-1532.
- BARAU A, BARRE N, JOUANIN C. 2005. *Oiseaux de La Réunion*. Editions Orphie, Paris.
- BARRETT SCH, SHORE JS. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Evolution* **41**: 340-354.
- BARRETT SCH, MORGAN MT, HUSBAND BC. 1989. The dissolution of a complex polymorphism: the evolution of self-fertilization in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution* **43**: 1398-1416.
- BARRETT SCH. 1996. The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* **351**: 725-733.
- BATEMAN RM, PRIDGEON AM, CHASE MW. 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis* sensu stricto. *Lindleyana* **12**: 113-141.
- BATEMAN RM, HOLLINGSWORTH PM, PRESTON J, LUO Y-B, PRIDGEON AM, CHASE MW. 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **142**: 1-40.
- BAYER RJ, PUTTOCK CF, KELCHNER SA. 2000. Phylogeny of South African Gnaphalieae (Asteraceae) based on two noncoding chloroplast sequences. *American Journal of Botany* **87**: 259-272.
- BIRKY CW, P. FUERST P, MARUYAM T. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics* **121**: 613-614
- BELLONE R. 2002. *Orchidées, guide de l'amateur*. Belin, Paris.
- BERLIOCCI L. 2000. *The Orchid in Lore and Legend*. Timber Press, Portland.

- BERNARD N. 1904.** Recherches expérimentales sur les orchidées. La germination des orchidées. *Revue Générale de Botanique* **16**: 405–451, 458–475.
- BERNARDELLO G, AGUILAR R, ANDERSON GJ. 2004.** The reproductive biology of *Sophora fernandeziana* (Leguminosae), a vulnerable endemic species from Isla Robinson Crusoe. *American Journal of Botany* **91**: 198-206.
- BOLTEN AB, FEINSINGER P. 1978.** why do hummingbird flowers secrete dilute nectar? *Biotropica* **10**: 307-309.
- BONNEVILLE A, BARRIOT JP, BAYER R. 1988.** Evidence from geoid data of a hotspot origin for the Southern Mascarene Plateau and Mascarene Islands (Indian Ocean). *Journal of Geophysical Research* **93**: 4199-4212.
- BORBA EL, SEMIR J. 1998.** Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian Campos Rupestres. *Lindleyana* **13**: 203-218.
- BORBA EL, SEMIR J. 1999.** Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 197-204.
- BORBA EL, SHEPHERD GJ, SEMIR J. 1999.** Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian 'campo rupestre' vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 205-214.
- BORBA EL, SEMIR J. 2001.** Pollinator specificity and convergences in Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* **88**: 75-88.
- BORBA EL, FELIX JM, SOLFERINI VN, SEMIR J. 2001a.** Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* **88**: 419-428.
- BORBA EL, SEMIR J, SHEPHERD GJ. 2001b.** Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89-99.
- BORBA EL, SHEPHERD GJ, VAN DEN BERG C, SEMIR J. 2002.** Floral and Vegetative Morphometrics of Five *Pleurothallis* (Orchidaceae) Species: Correlation with Taxonomy, Phylogeny, Genetic Variability and Polination Systems. *Annals of Botany* **90**: 219-230.
- BORY DE SAINT VINCENT J-BG. 1804.** *Voyages dans les principales îles des mers d'Afrique*. F. Buisson, Paris.
- BOSSER J. 1969.** Contribution à l'étude des Orchidaceae de Madagascar XI. Sur les affinités des genres *Cryptopus* et *Neobathiera*. *Adansonia* **4**: 539-547.

- BOSSER J. 1987.** Contribution à l'étude des Orchidaceae de Madagascar et des Mascareignes. XXII. *Adansonia* **3**: 249-254.
- BOSSER J. 1988.** Contribution à l'étude des Orchidaceae de Madagascar et des Mascareignes. XXIII. *Adansonia* **1**: 19-24.
- BOSSER J. 1997.** Contribution à l'étude des Orchidaceae de Madagascar et des Mascareignes. XXVII. *Adansonia* **19**: 181-188.
- BOSSER J, CADET T, GUEHO J, MARAIS W. 1976-.** *Flore des Mascareignes : La Réunion, Maurice, Rodrigues*. MSIRI Mauritius - Orstom, Paris - RBG Kew.
- BOWER CC. 1996.** Demonstration of pollinator-mediated reproductive isolation in sexually deceptive species of *Chiloglottis* (Orchidaceae). *Australian Journal of Botany* **44**: 15-33.
- BOULLARD B. 1988.** *Dictionnaire de Botanique*. Ellipses, Paris.
- BRUNEAU A. 1997.** Evolution of homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *American Journal of Botany* **84**: 54-71.
- CADET T. 1977.** *La végétation de l'île de la Réunion : étude phytoécologique et phytosociologique*. Thèse de Doctorat. Université Aix Marseille III, Aix en Provence.
- CAMERON KM, CHASE MW, WHITTEN WM, KORES PJ, JARRELL DC, ALBERT VA, YUKAMA T, HILLS HG, GOLDMAN DH. 1999.** A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* **86**: 208-224.
- CAMERON KM, CHASE MW. 2000.** Nuclear 18S rDNA sequences of Orchidaceae confirm the subfamilial status and circumscription of Vanilloideae. In: WILSON KL and MORRISON DA, eds. *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne, Australia: CSIRO Publishing. 457-464.
- CAMERON KM. 2004.** Utility of plastid *psaB* gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 1157-1180.
- CAMERON KM. 2005.** Leave it to the leaves: a molecular phylogenetic study of Malaxideae (Epidendroideae, Orchidaceae). *American Journal of Botany* **92**: 1025-1032.
- CARLQUIST S. 1974.** *Island Biology*. Columbia University Press, New York.
- CARLQUIST S. 1980.** *Hawaii: a Natural History*. National Tropical Botanical Garden, Hawaii.

- CARLSWARD BS, WHITTEN MW, WILLIAMS NH. 2003. Molecular phylogenetics of Neotropical Leafless Angraecinae (Orchidaceae): Reevaluation of generic concepts. *International Journal of Plant Sciences* **164**: 43-51.
- CATLING PM. 1980. Rain-assisted autogamy in *Liparis loeselii* (L.) L. C. Rich. (Orchidaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **107**: 525-529.
- CATLING PM. 1990. Auto-pollination in the Orchidaceae. In: ARDITTI J, ed. *Orchid Biology, Reviews and Perspectives, V*. Portland, Oregon: Timber Press, Inc.
- CHASE MW, HILLS HG. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* **40**: 215-220.
- CHASE MW, SOLTIS D, OLMSTEAD RG, MORGAN D, LES DH, MISHLER B, DUVAL MR, PRICE RA, HILLS HG, QIU Y-L, KRON KA, RETTIG JH, CONTI E, PALMER JD, MANHART JR, SYTSMA KJ, MICHAELS HJ, KRESS WJ, KAROL KG, CLARK WD, HEDRÉN M, GAUT BS, JANSEN RK, KIM K-J, WIMPEE CF, SMITH JF, FURNIER GR, STRAUS SH, XIANG Q-Y, PLUNKETT GM, SOLTIS PS, SWENSEN SM, WILLIAMS SE, GADEK PA, QUINN CJ, EGUIARTE L, GOLENBERG E, LEARN GH, GRAHAM SW, BARRETT SCH, DAYANANDAN S, ALBERT VA. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **80**: 528-580.
- CHASE MW, CAMERON KM, HILLS HG, JARRELL DC. 1994. DNA sequences and phylogenetics of the Orchidaceae and other lilioid monocots. In: PRIDGEON A, ed. *Proceeding of the fourteenth World Orchid Conference*. Glasgow: Her Majesty's Stationary Office. 61-63.
- CHASE MW, PALMER JD. 1997. Leapfrog radiation in floral and vegetative traits among twig epiphytes in the orchid subtribe Oncidiinae. In: GIVNISH TJ and SYTSMA KJ, eds. *Molecular Evolution and Adaptive Radiation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- CHASE MW. 2001. The origin and biogeography of Orchidaceae. In: PRIDGEON AM, CRIBB PJ, CHASE MW and RASMUSSEN FN, eds. *Genera orchidacearum. Vol. 2*. Oxford: Oxford University Press. 1-5.
- CHASE MW, CAMERON K, BARRETT RL, FREUDENSTEIN JV. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON KW, BARRETT RL and CRIBB P, eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publication (Borneo). 69-89.
- CHASE MW. 2005. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. *Curtis's Botanical Magazine* **22**: 2-7.
- CHASE MW, HANSON L, ALBERT VA, WHITTEN MW, WILLIAMS NH. 2005. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Annals of Botany* **95**: 191-199.

- CLEGG, MT. 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **90**: 363-367.
- CLEMENTS MA. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* **3**: 73-86.
- CORRIVEAU JL, COLMEMAN AV. 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *American Journal of Botany* **75**: 1443-1468.
- COZZOLINO S, WIDMER A. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 487-494.
- CRAWFORD DJ, STUESSY TF. 1997. Plant speciation on oceanic islands. In: IWATSUKI K and RAVEN PH, eds. *Evolution and diversification of island plants*. Tokyo: Springer Verlag. 249-267.
- CRAWFORD DJ, SANG T, STUESSY TF, KIM S-C, SILVA O M. 1998. *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae) and *Robinsonia* (Asteraceae: Senecioneae) on the Juan Fernandez Islands: similarities and differences in biology and phylogeny. In: STUESSY TF and ONO M, eds. *Evolution and speciation of island plants*. Cambridge: Cambridge University Press. 97-119.
- CRIBB P, VAN DER LAAN FM. 1986. *Ossiculum*. *Kew Bulletin* **41**: 823-824.
- DARLU P, TASSY P. 1993. *La Reconstruction phylogénétique. Concept et Méthodes*. Masson, Paris.
- DARWIN C. 1859. *On the origin of species*. John Murray, London.
- DARWIN C. 1862. *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effect of intercrossing*. John Murray, London.
- DARWIN C. 1877. *On the origin of species (6e ed.)*. John Murray, London.
- DE CORDEMOY EJ. 1895. *Flore de l'île de La Réunion*. Klincksieck, Paris.
- DE CORDEMOY EJ. 1899. Révision des Orchidées de la Réunion. *Revue Générale de Botanique* **11**: 409-429.
- DOBZHANSKY T. 1970. *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York.
- DOUZERY EJP, PRIDGEON AM, KORES P, LINDER HP, KURZWEIL H, CHASE MW. 1999. Molecular phylogenies of *Diseae* (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany* **86**: 887-899.
- DOYLE JJ, DOYLE JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.

- DRESSLER RL. 1981. *The Orchids, Natural History and Classification*. Harvard University Press, Cambridge.
- DRESSLER RL. 1990a. The major clades of the Orchidaceae-Epidendroideae. *Lindleyana* 5: 117-125.
- DRESSLER RL. 1990b. The Neottieae in orchid classification. *Lindleyana* 5: 102-109.
- DRESSLER RL. 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Dioscorides, Portland.
- DU PETIT-THOUARS AA. 1822. *Histoire Particulière des Plantes Orchidées recueillies sur les trois îles australes d'Afrique*. L'auteur, Arthus Bertrand, Treuttel & Wurtz, Paris.
- DU PUY D, CRIBB P, BOSSER J, HERMANS J, HERMANS C. 1999. *The Orchids of Madagascar*. Royal Botanical Gardens, Kew, London.
- DUPONT YL, HANSEN DM, RASMUSSEN JT, OLESEN JM. 2004. Evolutionary changes in nectar sugar composition associated with switches between bird and insect pollination: the Canarian bird-flower element revisited. *Functional Ecology* 18: 670-676.
- ELFRON B. 1979. Bootstrap methods: an other look at the Jackknife. *Ann. Statist.* 29: 1-26.
- ELIASSEN UH. 1995. Patterns of diversity in island plants. In: VITOUSEK PM, LOOPE LL and ADSERSEN H, eds. *Islands. Biological diversity and ecosystem function*. Berlin: Springer Verlag. 35-50.
- ELLIS AG, JOHNSON SD. 1999. Do pollinators determine hybridization patterns in sympatric *Satyrium* (Orchidaceae) species? *Plant Systematics and Evolution* 219: 137-150.
- ESTOUP A, CLEGG SM. 2003. Bayesian inferences on the recent island colonization history by the bird *Zosterops lateralis lateralis*. *Molecular Ecology* 12: 657-674.
- FAEGRI K, VAN DER PIJL L. 1979. *The Principles of Pollination Ecology*. Pergamon, Oxford.
- FARRIS JS. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology* 18: 374-385.
- FARRIS JS. 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- FARRIS JS, ALBERT VA, KALLERSJO M, LIPSCOMB DL, KLUGE AG. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- FAY MF, KRAUSS SL. 2003. Orchid conservation genetics in the molecular age. In: DIXON KW, BARRETT RL and CRIBB P, eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publication (Borneo). 91-112.

- FEINSINGER P, WOLFE JA, SWARM LA. 1982. Island ecology: reduced hummingbird diversity and the pollination biology of plants, Trinidad and Tobago, West Indies. *Ecology* **63**: 494-506.
- FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- FENSTER CB, ARMBRUSTER WS, WILSON P, DUDASH, M. R., THOMPSON JD. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **35**: 375-403.
- FITCH WM, MARGOLISH E. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* **155** 179-184.
- FITCH WM. 1971. Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic Zoology* **20**: 406-416.
- FOURNEL J, MICHENEAU C, PAILLER T. 2005. *Aeranthus adenopoda* H. Perrier, une orchidée nouvelle pour l'île de la Réunion. *L'Orchidophile* **164**: 7-10.
- FRANCISCO-ORTEGA J, BARBER JC, SANTOS-GUERRA A, FEBLES-HERNANDEZ R, JANSEN RK. 2001. Origin and evolution of the endemic genera of Gonosperminae (Asteraceae: Anthemideae) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* **88**: 161-169.
- FRANCISCO-ORTEGA J, FUERTES-AGUILAR J, KIM S-C, SANTOS-GUERRA A, CRAWFORD DJ, JANSEN RK. 2002. Phylogeny of the Macaronesian endemic *Crambe* section *Dendrocrambe* (Brassicaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* **89**: 1984-1990.
- FREUDENSTEIN JV, RASMUSSEN FN. 1999. What does morphology tell us about orchid relationships? - a cladistic analysis. *American Journal of Botany* **86**: 225-248.
- FREUDENSTEIN JV, CHASE MW. 2001. Analysis of mitochondrial *nad1b-c* intron sequences in Orchidaceae: utility of length-change characters. *Systematic Botany* **26**: 643-657.
- FREUDENSTEIN JV, HARRIS EM, RASMUSSEN FN. 2002. The Evolution of Anther Morphology in Orchids: Incumbent anthers, Superposed pollinia, and the Vandoid complex. *American Journal of Botany* **89**: 1747-1755.
- FREUDENSTEIN JV, VAN DEN BERG C, GOLDMAN DH, KORES PJ, MOLVRAJ M, CHASE MW. 2004. An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analysis of Jackknife branch support strategy. *American Journal of Botany* **91**: 149-157.
- GARAY LA. 1973. Systematics of the genus *Angraecum* (Orchidaceae). *Kew Bulletin* **28**: 495-516.

- GILL FB. 1971. Ecology and evolution of the sympatric Mascarene white-eyes, *Zosterops borbonica* and *Zosterops oliveacea*. *The Auk* **88**: 35-60.
- GIVNISH TJ. 1998. Adaptive plant evolution in islands: classical patterns, molecular data, new insights. In: GRANT PR, ed. *Evolution on Islands*. Oxford: Oxford University Press. 281-304.
- GOLDBLATT P, MANNING JC, BERNHARDT P. 2000. Adaptive radiation of pollination mechanisms in *Sparaxis* (Iridaceae: Ixiodeae). *Adansonia, série 3* **22**: 57-70.
- GOLDBLATT P, MANNING JC, BERNHARDT P. 2001. Radiation of pollination systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae) in Southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**: 713-734.
- GOLDBLATT P, BERNHARDT P, MANNING JC. 2002. Floral biology of *Romulea* (Iridaceae: Crocoideae): a progression from generalist to a specialist pollination system. *Adansonia, série 3* **24**: 243-262.
- GOLDMAN DH, FREUDENSTEIN JV, KORES PJ, MOLVRAY M, JARRELL DC, WHITTEN WM, CAMERON KM, JANSEN RK, CHASE MW. 2001. Phylogenetics of Arethuseae (Orchidaceae) based on plastid *matK* and *rbcL* sequences. *Systematic Botany* **26**: 670-695.
- GRAHAM SW, BARRETT SCH. 2004. Phylogenetic reconstruction of the evolution of stilar polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* **91**: 1007-1021.
- GRANT V. 1993. Origin of floral isolation between ornithophilous and sphingophilous plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 7729-7733.
- GRANT V. 1994. Modes and origins of mechanical and ethological isolation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 3-10.
- GUILLERMET C, GUILLERMET CWW. 1986. *Contribution à l'étude des papillons hétérocères de l'île de La Réunion: résultats des chasses de nuit à l'usage des amateurs et des débutants*. Société Réunionnaise des Amis du Muséum, Saint Denis.
- GRIFFITHS M. 2002. *Orchidées. De l'horticulture considérée comme un des beaux arts*. Delachaux et Nieslé, Paris.
- HAECKEL E. 1866. *Generelle Morphologie der Organismen*. Georg Reimer., Berlin.
- HAMRICK JL. 1982. Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* **69**: 1685-1693.
- HAMRICK JL, GODT WMJ. 1997. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. In: SILVERTOWN M, FRANCO M and HARPER JL, eds. *Plant life histories: ecology, phylogeny and evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.

- HERMANS J, CRIBB P. 2005. The *Angraecum germinyanum* complex. *The Orchid Review* 113: 90-97.
- HILU KW, LIANG H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany* 84: 830-839.
- HILU KW, BORSCH T, MULLER K, SOLTIS DE, SOLTIS PS, SAVOLAINEN V, CHASE MW, POWELL MP, ALICE LA, EVANS R, SAUQUET H, NEINHUIS C, SLOTTA TAB, ROHWER JG, CAMPBELL CS, CHATROU LW. 2003. Angiosperm phylogeny based on <011> *matK* sequence information. *American Journal of Botany* 90: 1758-1776.
- HOLDER M, LEWIS P. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature* 4: 275-284.
- HOWARTH DG, GUSTAFSSON MHG, BAUM DA, MOTLEY TJ. 2003. Phylogenetics of the genus *Scaevola* (Goodeniaceae): implication for dispersal patterns across the Pacific Basin and colonization of the Hawaiian Islands. *American Journal of Botany* 90: 915-923.
- HUELSENBECK JP, RONQUIST F, NIELSEN R, BOLLBACK JP. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- HUMEAU L. 1999. *Ecologie et évolution de la dioécie et du dimorphisme sexuel de la taille des fleurs chez les Dombeya (Sterculiacées) endémiques de La Réunion*. Thèse de Doctorat. Université de La Réunion, Saint Denis.
- HUMEAU L, PAILLER T, THOMPSON JD. 1999a. Cryptic dioecy and leaky dioecy in endemic species of *Dombeya* (Sterculiaceae) on La Réunion. *American Journal of Botany* 86: 1437-1447.
- HUMEAU L, PAILLER T, THOMPSON JD. 1999b. Variation in the breeding system of two sympatric *Dombeya* species on La Réunion island. *Plant Systematics and Evolution* 218: 77-87.
- INOUE K. 1986. Experimental studies on male and female reproductive success: effects of variation in spur length and pollinator activity on *Platanthera mandarinorum* spp. *Hachijoensis* (Orchidaceae). *Plant Species Biology* 1: 207-215.
- JACQUEMYN H, MICHENEAU C, ROBERTS DL, PAILLER T. 2005. Elevation gradients of species diversity, breeding system and floral traits of orchid species on Réunion Island. *Journal of Biogeography* 32: 1751-1761.
- JARRELL DC, CLEGG MT. 1995. Systematic implications of the chloroplast-encoded *matK* gene on the tribe Vandeeae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 82 (Supplement): 137 (Abstract).
- JOHANSEN B. 1990. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean society* 103: 165-196.

- JOHNSON LA, SOLTIS DE. 1994. *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae *sensu stricto*. *Systematic Botany* **19**: 143-156.
- JOHNSON LA, SOLTIS DE. 1995. Phylogenetic inference in Saxifragaceae *sensu stricto* and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**: 149-175.
- JOHNSON SD. 1992. A butterfly with a passion for the red. *African Wildlife* **46**: 176-178.
- JOHNSON SD. 1994. Evidence for Batesian mimicry in a butterfly-pollinated orchid. *Biological Journal of the Linnean Society* **53**: 91-104.
- JOHNSON SD, BOND WJ. 1994. Red flowers and butterfly pollination in the fynbos of south Africa. In: ARIANOUSTOU M and GROVES R, eds. *Plant-animal Interactions in Mediterranean-type Ecosystems*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 137-148.
- JOHNSON SD. 1996. Bird pollination in South African species of *Satyrium* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **203**: 91-98.
- JOHNSON SD. 1997a. Insect pollination and floral mechanisms in south african species of *Satyrium* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **204**: 195-206.
- JOHNSON SD. 1997b. Pollination ecotypes of *Satyrium hallackii* (Orchidaceae) in South Africa. *Botanical Journal of the Linnean society* **123**: 225-235.
- JOHNSON SD, STEINER KE. 1997. Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). *Evolution* **51**: 45-53.
- JOHNSON SD, KURZWEIL H. 1998. Systematics and phylogeny of the *Satyrium erectum* group (Orchidaceae), with descriptions of two new species from the Karoo region of South Africa. *Botanical Journal of the Linnean Society* **127**: 179-194.
- JOHNSON SD, LINDER HP, STEINER KE. 1998a. Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (orchidaceae). *American Journal of Botany* **85**: 402-411.
- JOHNSON SD, STEINER KE, WITHEHEAD VB, VOGELPOEL L. 1998b. Pollination ecology and maintenance of species integrity in co-occurring *Disa racemosa* and *Disa venosa* SW. (Orchidaceae) in south africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85**: 231-241.
- JOHNSON SD, NILSSON LA. 1999. Pollen carryover, geitonogamy, and the evolution of deceptive pollination systems in orchids. *Ecology* **80**: 2607-2619.
- JOHNSON SD, EDWARDS TJ. 2000. The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 243-269.
- JOHNSON SD, STEINER KE. 2000. Generalization *versus* specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 140-143.

- JOHNSON SD, BROWN M. 2004.** Transfer of pollinaria on bird's feet: a new pollination system in orchids. *Plant Systematics and Evolution* **244**: 181-188.
- JOHNSON SD, PETER CI, ÅGREN J. 2004.** The effects of nectar addition on pollen removal and geitonogamy in the non-rewarding orchid *Anacamptis morio*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **271**: 803-809.
- JONES K. 1967.** The chromosomes of orchids, II Vandae Lindl. *Kew Bulletin* **21**: 151-156.
- KAISER R. 1993.** *The scent of Orchids: olfactory and chemical investigations*. Editiones Roche, Basel.
- KAISER R, TOLLSTEN L. 1995.** An introduction to the scent of cacti. *Flavour fragrans Journal* **10**: 153-164.
- KIM S-C, CRAWFORD DJ, FRANCISCO-ORTEGA J, SANTOS-GUERRA A. 1996.** A common origin of woody *Sonchus* and five related genera in the Macronesian islands: molecular evidence for extensive radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 7743-7748.
- KIM S-C, KEELEY SC, VROOM PS, JANSEN RK. 1998.** Molecular evidence for an African origin of the Hawaiian endemic *Hesperomannia* (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 15 440-15 445.
- KÖLREUTER JG. 1761.** *Vorläufige Nachrichten von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen*. Gleditschischen Handlung, Leipzig.
- KOPOWITZ H, MARCHANT TA. 1998.** Postpollination nectar reabsorption in the African epiphyte *Aerangis veridickii* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **85**: 508-512.
- KORES PJ, MOLVRAJ M, WESTON PH, HOPPER SD, BROWN AP, CAMERON KM, CHASE MW. 2001.** A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. *American Journal of Botany* **88**: 1903-1914.
- KOVATS E. 1965.** Gas chromatographic characterization of organic substances in the Retention Index System. . In: GIDDINGS JC and KELLER RA, eds. *Advances in chromatography, vol. 1*. New York: Marcel Dekker. 229
- KLUGE AG, FARRIS JS. 1969.** Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* **18**: 1-32.
- KUNITAKE YK, HASEGAWA M, MIYASHITA T, HIGUCHI H. 2004.** Role of seasonally specialist bird *Zosterops japonica* on pollen transfer and reproductive success of *Camellia japonica* in a temperate area. *Plant Species Biology* **19**: 197-201.
- LA CROIX I, LA CROIX E. 1997.** *African orchids in the wild and in cultivation*. Timber Press, Inc., Portland.
- LABE P. 2001.** Les Orchidées de Madagascar. *Orchidées. Culture et Protection*. **48**: 6-33.

- LAMARCK JB. 1809. *Philosophie Zoologique*. Dentu, Paris.
- LANCASTER N. 2004. *A study of the distribution of orchids in the Mascarene Islands*. Reading University, Reading.
- LECOINTRE G, LE GUYADER H. 2001. *Classification phylogénétique du vivant*. Belin, Paris.
- LEHNEBACH CA, ROBERTSON AW. 2004. Pollination Ecology of Four Epiphytic Orchids of New Zealand. *Annals of Botany* **93**: 773-781.
- LEVIN RA, RAGUSO RA, MCDADE LA. 2001. Fragrance chemistry and pollinator affinities in Nyctaginaceae. *Phytochemistry* **58**: 429-440.
- LINDLEY J. 1824. *Aeranthus grandiflora*. *Botanical Register* **10**: t. 817.
- LINDQVIST C, ALBERT VA. 2002. Origin of the Hawaiian endemic mints within north America *Stachys* (Lamiaceae). *American Journal of Botany* **89**: 1709-1724.
- LLOYD DG, SHOEN DJ. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. *International Journal of Plant Sciences* **153**: 358-369.
- LOWREY TK, QUINN CJ, TAYLOR RK, CHAN R, KIMBALL RT, DE NARDI JC. 2001. Molecular and morphological reassessment of relationships within the *Vittadinia* group of Astereae (Asteraceae). *American Journal of Botany* **88**: 1279-1289.
- LUYT R, JOHNSON SD. 2001. Hawkmoth pollination of the African epiphytic orchid *Mystacidium venosum*, with special reference to flower and pollen longevity. *Plant Systematics and Evolution* **228**: 49-62.
- LUYT R, JOHNSON SD. 2002. Postpollination nectar reabsorption and its implications for fruit quality in an epiphytic orchid. *Biotropica* **34**: 442-446.
- MAAD J. 2000. Phenotypic selection in hawkmoth-pollinated *Platenthera bifolia*: targets and fitness surface. *Evolution* **54**: 112-123.
- MALCOMBER ST. 2002. Phylogeny of *Gaertnera* Lam. (Rubiaceae) based on multiple DNA markers: evidence of a rapid radiation in a widespread, morphologically diverse genus. *Evolution* **56**: 42-57.
- MANNING JC, GOLDBLATT P. 2005. Radiation systems in the Cape genus *Tritoniopsis* (Iridaceae: Crocoideae) and the development of bimodal pollination strategies. *International Journal of Plant Sciences* **166**: 459-474.
- MATHLOUTHI M, REISER P. 1995. *Le saccharose. Propriétés et applications*. Polytechnica, Paris.
- MAYOKA M. 1998. *Les cyclones à La Réunion*. Météo France, Centre des cyclones tropicaux de La Réunion, Sainte Clotilde.

- MAYR E. 1963. *Animal species and evolution*. Harward University Press, Cambridge.
- MAC ARTHUR RH, WILSON EO. 1967. *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton.
- MCDUGALL I, CAMPSTON W. 1965. Strontium isotopic composition and potassium-rubidium ratio in some rocks from Reunion and Rodriguez. *Nature* **207**: 252-253.
- MCDUGALL I, CHAMALAUN FH. 1969. Isotopic dating and geomagnetic polarity studies on volcanic rocks from Mauritius, Indian Ocean. *Geological Society of America Bulletin* **80**: 1419-1442.
- MCDUGALL I. 1971. The geochronology and evolution of the young volcanic island of Reunion, Indian Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **35**: 261-288.
- McMULLEN CK. 1987. Breeding systems of selected Galapagos Islands angiosperms. *American Journal of Botany* **74**: 1694-1705.
- MELÉNDEZ-ACKERMAN EJ. 1997. Patterns of color and nectar variation across an *Ipomopsis* (Polemoniaceae) hybrid zone. *American Journal of Botany* **84**: 41-47.
- MICKEVITCH MF, WELLER SJ. 1990. Evolutionary character analysis: tracing character change on a cladogram. *Cladistics* **6**: 137-170. .
- MOLVRAY M, KORES PJ, CHASE MW. 1999. Phylogenetic relationships within *Korthalsella* (Viscaceae) based on nuclear ITS and plastid *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* **86**: 249-260.
- MOLVRAY MP, KORES J, CHASE MW. 2000. Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters. In: WILSON KL and MORRISON DA, eds. *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne, Australia: CSIRO Publishing. pp. 441-448.
- MYERS N, MITTERMEIER CG, FONSECA DA GAB, KENT J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858.
- NEILAND MR, WILCOCK C. 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* **82**: 1657-1671.
- NEYLAND R, URBATSCH LE. 1996. Phylogeny of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae) inferred from *ndhF* chloroplast gene sequences. *American Journal of Botany* **83**: 1195-1206.
- NICOLSON SW. 2002. Pollination by passerines birds: why are the nectars so dilute? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **131**: 645-652.
- NIELSEN LR, SIEGISMUND HR. 1999. Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). *Heredity* **83**: 560-567.

- NIELSEN LR. 2000. Natural hybridization between *Vanillia claviculata* (W.Wright) Sw. and *V. barbellata* Rehb.f. (Orchidaceae): genetic, morphological, and pollination experimental data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **133**: 285-302.
- NILSSON LA. 1983. Mimesis of bellflower (*Campanula*) by the red helleborine orchid *Cephalanthera rubra*. *Nature* **305**: 799-800.
- NILSSON LA, JONSSON L, RASON L, RANDRIANJOHANY E. 1985. Monophily and pollination mechanisms in *Angraecum arachnites* Schltr. (Orchidaceae) in a guild of long-tongued hawk-moths (Sphingidae) in Madagascar. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 1-19.
- NILSSON LA, JONSSON L, RALISON L, RANDRIANJOHANY E. 1987. Angraecoid orchids and hawkmoths in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica* **19**: 310-318.
- NILSSON LA. 1988. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* **334**: 147-149.
- NILSSON LA, RABAKONANDRIANINA E. 1988. Hawk-moth scale analysis and pollination specialization in the epilithic Malagasy endemic *Aerangis ellisii* (Reichenb. fil.) Schltr. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **97**: 49-61.
- NILSSON LA. 1992. Orchid pollination biology. *Trends in Ecology and Evolution* **7**: 255-259.
- OLESEN JM, RØNSTED N, TOLDERLUND U, CORNETT C, MØLGAARD P, MADSEN J, JONES CG, OLESEN CE. 1998. Mauritian red nectar remains a mystery. *Nature* **393**: 529.
- OLESEN JM, ESKILDSSEN LI, VENKATASAMY S. 2002. Invasion of pollination network on oceanic islands: importance of invader complexes and edemic super generalists. *Diversity and Distribution* **8**: 181-192.
- OLESEN JM, VALIDO A. 2003. Lizards as pollinators and seed dispersers: an island phenomenon. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 177-181.
- OLLERTON J. 1996. Reconciling ecological processes with phylogenetic patterns: the apparent paradox of plant-pollinator systems. *Journal of Ecology (Oxford)* **84**: 767-769.
- OLLERTON J. 1998. Sundbird surprise for syndromes. *Nature* **394**: 726-727.
- OLMSTEAD RG, PALMER JD. 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany* **81**: 1205-1224.
- OXELMAN B, LIDÉN M, BERGLUND D. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* **206**: 393-410.
- PAILLER T. 1997. *L'hétérostylie dans l'archipel des Mascareignes: présence, maintien et évolution*. Thèse de Doctorat. Université de La réunion, Saint Denis.

- PAILLER T, THOMPSON JD. 1997.** Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Réunion Island. *American Journal of Botany* **84**: 315-327.
- PAILLER T, HUMEAU L, FIGIER J. 1998a.** *Flore pratique des forêts de montagne de l'île de La Réunion*. Azalées, Sainte Marie.
- PAILLER T, HUMEAU L, FIGIER J, THOMPSON JD. 1998b.** Reproductive biology of the functionally dioecious and morphologically heterostylous island endemic *Chassalia corallioides* (Rubiaceae). *Biological Journal of the Linnean society* **64**: 297-313.
- PAILLER T. 2001.** Les orchidées de la Réserve naturelle de Mare Longue. *Le courrier de la nature* **189**: 48-50.
- PAILLER T. 2004.** *Ecologie et évolution des systèmes de reproduction chez les plantes à fleurs de l'île de La Réunion*. HDR. Université de La Réunion, Saint de Denis.
- PALMER JD. 1991.** Plastid chromosomes: structure and evolution. . In: BOGORAD L and VASIL K, eds. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics in Plants, Vol. 7, The Molecular Biology of Plastids*, . New York: Academic Press. pp. 5-53. .
- PALMER JD, JANSEN BK, MICHAELS HJ, CHASE MW, MANHART JR. 1998.** Chloroplast DNA Variation and Plant Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **75**: 1180-1206.
- PANERO JL, FRANCISCO-ORTEGA J, JANSEN RK, SANTOS-GUERRA A. 1999.** Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a New World biogeographic connection of the Macaronesian Island endemic *Pericallis* (Asteraceae: Senecioneae). *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **96**: 13 886- 13 891.
- PAX DL, PRICE RA, MICHAELS HJ. 1997.** Phylogenetic position of the hawaiian geraniums based on *rbcL* sequences. *American Journal of Botany* **84**: 72-78.
- PELSER PB, GRAVENDEEL B, VAN DER MEIJDEN R. 2002.** Tackling speciose genera: species composition and phylogenetic position of *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae) based on plastid and nrDNA sequences. *American Journal of Botany* **89**: 929-939.
- PERRIER DE LA BATHIE H. 1934.** *Ambrella*, genre nouveau d'orchidées (angraccoidés) de Madagascar. *Bulletin de la Société Botanique de France* **81**: 655-657.
- PERRIER DE LA BATHIE H. 1941.** *Flore de Madagascar, 49° famille: Orchidées II*. Tananative Imprimerie Officielle, Tananarive.
- POSADA D, CRANDALL K. 1998.** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.

- PRIDGEON AM, BATEMAN RM, COX AV, HAPEMAN JR, CHASE MW. 1997.** Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear *ITS* sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensus lato. *Lindleyana* **12**: 89-109.
- PRIDGEON AM, CHASE MW. 1998.** Phylogenetics of subtribe Catasetinae (Orchidaceae) from nuclear and chloroplast DNA sequences. In: DE BRITTO CE, ed. *Proceedings of the 15th world orchid conference, Rio de Janeiro*. Turriers, France: Naturalia. 275-281.
- PRIDGEON AM, CRIBB PJ, CHASE MW, RASMUSSEN FN. 2001.** *Genera Orchidacearum. Volume 2. Orchidoideae (part 1)*.
- PRIDGEON AM, CRIBB PJ, CHASE MW, RASMUSSEN FN. (eds). 1999.** *Genera Orchidacearum. Volume 1*. Oxford University Press, Oxford.
- PRIDGEON AM, CRIBB PJ, CHASE MW, RASMUSSEN FN. (eds). 2001.** *Genera Orchidacearum. Volume 2*. Oxford University Press, Oxford.
- PRIDGEON AM, CRIBB PJ, CHASE MW, RASMUSSEN FN. (eds). 2003.** *Genera Orchidacearum. Volume 3*. Oxford University Press, Oxford.
- PROCTOR M, YEO P, LACK A. 1996.** *The Natural History of Pollination*. Timber Press, Portland.
- PYKE GH, WASER NM. 1981.** The production of dilute nectars by hummingbird and honeyeater flowers. *Biotropica* **13**: 260-270.
- QAMARUZ-ZAMAN F, FAY MF, PARKER JS, CHASE MW. 1998.** Molecular techniques employed in the assessment of genetic diversity: a review focusing on Orchid conservation. *Lindleyana* **13**: 259-283.
- RADTKEY RR. 1996.** Adaptive radiation of day-geckos (*Phelsuma*) in the Seychelles archipelago: a phylogenetic analysis. *Evolution* **50**: 604-623.
- RAGUSO RA, LEVIN RA, FOOSE SE, HOLMBERG MW, MCDADE LA. 2003.** Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination "syndromes" in *Nicotiana*. *Phytochemistry* **63**: 265-284.
- RAVEN PH. 1979.** A survey of reproductive biology in Onagraceae. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 575-593.
- RAZ L, ALBERT VA, MOTLEY TJ. 1998.** Molecular systematics of Hawaiian *Chamaesyce* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* **85** (6, supplement): 153-154 (Abstract).
- RICHARDS AJ. 1997.** *Plant breeding systems, 2nd ed.* Chapman et Hall, London.
- RIDLEY M. 1996.** *Evolution. 2nd ed.* Blackwell Science, Cambridge.

- ROBERTS DL. 2001.** *Reproductive Biology and Conservation of the Orchids of Mauritius*. PhD. University of Aberdeen, Aberdeen.
- ROBERTS DL. 2003.** Pollination biology: the role of sexual reproduction in orchid conservation. In: DIXON KW, BARRETT RL and CRIBB P, eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publication (Borneo). 113-136.
- ROBERTS DL, FLORENS VFB, BAIDER C, BOSSER J. 2004.** *Taeniophyllum coxii* (Summerh.) Summerh. (Orchidaceae): a new record for Mauritius, Indian Ocean. *Kew Bulletin* **59**: 493-494.
- RODRÍGUEZ-ROBLES JA, ACKERMAN JD, MELÉNDEZ EJ. 1992.** Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comparettia falcata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **79**: 1009-1017.
- ROGUENANT A, RAYNAL-ROQUES A, SELL Y. 2005.** *Un amour d'orchidée. Le mariage de la fleur et de l'insecte*. Belin, Paris.
- RONQUIST F, HUELSENBECK JP. 2003.** MrBayes: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1772-1774.
- ROTHSCHILD LW, JORDAN K. 1903.** A revision of the lepidopterous family Sphingidae. *Novitates Zoologicae* **9** (suppl.): 1-972.
- SALAMIN N, CHASE MW, HODKINSON TR, SAVOLAINEN V. 2003.** Assessing internal support with large phylogenetic DNA matrices. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**: 528-539. .
- SALAZAR GA, CHASE MW, SOTO ARENAS MA, INGROUILLE M. 2003.** Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* **90**: 777-795.
- SALGUERO-FARÍA JA, ACKERMAN JD. 1999.** A nectar reward: is more better? *Biotropica* **31**: 303-311.
- SCACCHI R, DE ANGELIS G, CORBO M. 1991.** Effect of the breeding system on the genetic structure in three *Cephalanthera* spp. (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **176**: 53-61.
- SCHEMSKE DW. 1980.** Evolution of floral dispalpy in the orchid *Brassavola nodosa*. *Evolution* **34**: 498-493.
- SCHEMSKE DW. 1980.** Evolution of floral dispalpy in the orchid *Brassavola nodosa*. *Evolution* **34**: 498-493.
- SCHILLING EE, PANERO JL, ELIASSEN UH. 1994.** Evidence from chloroplast DNA restriction site analysis on the relationships of *Scalesia* (Asteraceae: Heliantheae). *American Journal of Botany* **81**: 248-254.
- SCHLECHTER R. 1914.** *Die Orchideen*. Verlag Paul Parey, Berlin.

- SCHLECHTER R. 1915. *Beihefte zum Botanischen Centrablatt* 33: 439.
- SCHLECHTER R. 1918. Versuch eine natürlichen Neordnung der afrikanischen angraekoiden Orchidaceen. *Beihefte zum Botanischen Centrablatt* 36: 62-181.
- SCHLECHTER R. 1925. Orchidaceae Perrieranae. Ein Beitrag zur Orchideenkunde der Insel Madagascar. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 33: 306-360.
- SCHLECHTER R. 1926. Das System der Orchidaceen. *Notizblatt der Botanischer Gartens zu Berlin* 9: 590-591.
- SCHLUTER D, MCPHAIL JD. 1993. Character displacement and replicate adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 197-200.
- SCHULTZ ST, GANDERS FR. 1996. Evolution of unisexuality in the Hawaiian Islands: A test for micro-evolutionary theory. *Evolution* 50: 842-855.
- SHARMA IK, JONES DL. 1999. Characterisation of natural hybrids between *Pterostylis alveata* Garnet and *Pterostylis ophioglossa* R. Br. (Orchidaceae) by starch gel electrophoresis. *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 499-505.
- SINGER RB, SAZIMA M. 2001. Flower morphology and pollination mechanism in three sympatric Goodyerinae orchids from South-eastern Brazil. *Annals of Botany* 88: 989-997.
- SOLTIS DE, SOLTIS PS. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: SOLTIS PS, SOLTIS DE and DOYLE JJ, eds. *Molecular systematics of plants, vol. II*. Boston: Kluwer. 1-42.
- SOLTIS PS, SOLTIS DE, CHASE MW. 1999. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes: a research tool for comparative biology. *Nature* 402: 402-404.
- SOLTIS DE, SOLTIS PS, CHASE MW, MORT ME, ALBACH DC, ZANIS M, SAVOLAINEN V, HAHN WH, HOOT SB, FAY MF, AXTELL M, SWENSEN SM, PRICE LM, KRESS WJ, NIXON KC, FARRIS JS. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133.
- SOSA V, CHASE MW, SALAZAR GA, WHITTEN MW, WILLIAMS NH. 2001. Phylogenetic position of *Dignathe* (Orchidaceae: Oncidiinae): evidence from nuclear ITS ribosomal DNA sequences. *Lindleyana* 16: 94-101.
- SPRENGEL CK. 1826. *Systema Vegetabilium, editio decima sexta* 3: 727.
- SPRENGEL CK. 1793. *Das entdeckte Geheimniss der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen*. Vieweg, Berlin.
- STEBBINS GL. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in Angiosperms. I: Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307-326.

- STEINER KE. 1989. The pollination of *Disperis* (Orchidaceae) by oilcollecting bees in southern Africa. *Lindleyana* **4**: 164–183. .
- STEINER KE, WITHEHEAD VB, JOHNSON SD. 1994. Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive South African orchids. *American Journal of Botany* **81**: 185-194.
- STEWART J. 1980. The angraecoid orchids of the African region. *American Orchid Society Bulletin* **49**: 621-629.
- STILES FG. 1981. Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Annals of The Missouri Botanical Garden* **68**: 323-351.
- STPICZYŃSKA M. 2003. Incorporation of [3H]sucrose after the resorption of nectar from the spur of *Platnathera chlorantha* (Custer) Rchb. *Canadian Journal of Botany* **81**: 927-932.
- STRASBERG D. 1994. *Dynamique des forêts tropicales de l'île de La Réunion, processus d'invasions et de régénération sur les coulées volcaniques*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II, Montpellier.
- STRASBERG D, ROUGET M, RICHARDSON DM, BARET S, DUPONT J, COWLING RM. in PRESS. An assessment of habitat diversity and transformation on La Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a basis for conservation planing. *Biodiversity and Conservation*.
- SUMMERHAYES VS. 1958. African Orchids, XXVI. *Kew Bulletin* **13**: 260-277.
- SUMMERHAYES VS. 1966. African orchids: XXX. *Kew Bulletin* **20**: 188.
- SWOFFORD DL. 2003. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- SZLACHETKO DL, RUTKOWSKI P. 2000. *Gynostemia Orchidarium* 1. *Acta Botanica Fennica* **169**: 1-380.
- SZLACHETKO DL, MARGOŃSKA H. 2002. *Gynostemia Orchidarium* 2. *Acta Botanica Fennica* **175**: 1-275.
- SZLACHETKO DL. 2003. *Gynostemia Orchidarium* 3. *Acta Botanica Fennica* **176**: 1-311.
- TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, BOUVET J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105-1109.
- THOMPSON JD, PAILLER T, STRASBERG D, MANICACCI D. 1996. Tristyly in the endangered Mascarene Island endemic *Hugonia serrata* (Linaceae). *American Journal of Botany* **83**: 1160-1167.

- TOPIK H, YUKAWA T, ITO M. 2005.** Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): insights from plastid *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences. *Journal of Plant Research* **118**: 271-284.
- TREMBLAY RL. 1992.** Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany* **70**: 642-650.
- TREMBLAY RL. 1997a.** Morphological Variance among Populations of tropical with restricted gene flow. *Plant species Biology* **12**: 85-96.
- TREMBLAY RL. 1997b.** Distribution and dispersion patterns of individuals in nine species of *Lepanthes* (Orchidaceae). *Biotropica* **29**: 38-45.
- TREMBLAY R, ZIMMERMAN JK, LEBRON L, BAYMAN P, SASTRE I, ALERS-GARCIA A. 1998.** Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis*. *Biological conservation* **85**: 297-304.
- TREMBLAY RL, ACKERMAN JD, ZIMMERMAN JK, CALVO RN. 2005.** Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of Linnean Society* **84**: 1-54.
- VAN DEN BERG C, HIGGINS WE, DRESSLER RL, WHITTEN MW, SOTO ARENAS MA, CULHAM A, CHASE MW. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96-114.
- VAN DEN BERG C, GOLDMAN DH, FREUDENSTEIN JV, PRIDGEON AM, CAMERON K, CHASE MW. 2005.** An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **92**: 613-624.
- VAN DER CINGEL NA. 2001.** *An atlas of Orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia*. A. A. Balkema Publishers, Rotterdam.
- VAN DER PIJL L, DODSON CH. 1966.** *Orchid Flowers, Their Pollination and Evolution*. University of Miami Press, Coral Gables.
- VARGAS P, BALDWIN BG, CONSTANCE L. 1998.** Nuclear ribosomal DNA evidence for a western North American origin of Hawaiian and South American species of *Sanicula* (Apiaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 235-240.
- WASER NM, CHITTKA L, PRICE MV, WILLIAMS NM, OLLERTON J. 1996.** Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* **77**: 1043-1060.
- WASSERTHAL LT. 1997.** The pollinators of the Malagasy star orchids *Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. *Botanica acta* **110**: 343-359.

- WHITTEN MW, WILLIAMS NH, CHASE MW. 2000. Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. *American Journal of Botany* **87**: 1842-1856.
- WIKSTRÖM N, SAVOLAINEN V, CHASE MW. 2001. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **268**: 2211-2220.
- WILLIAMS NH, WHITTEN WM, CHASE MW. 2001. Phylogenetic positions of *Miltoniopsis*, *Caucaea*, a new genus, *Cyrtochiloides* and *Oncidium phymatochilum* (Orchidaceae: Oncidiinae) based on nuclear and plastid DNA sequence data. *Lindleyana* **16**: 272-285.
- WILSON PG, O'BRIEN MM, GADEK PA, QUINN CJ. 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany* **88**: 2013-2025.
- WILSON P, CASTELLANOS MC, HOGUE JN, THOMPSON JD, ARMBRUSTER WS. 2004. A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos* **104**: 345-361.
- WITTER MS, CARR GD. 1988. Adaptative radiation and genetic differentiation in the Hawaiian silversword alliance (Compositae: Madiinae). *Evolution* **42**: 1278-1287.
- WOLF LL, HAINSWORTH FR, GILL FB. 1975. Foraging efficiencies and time budgets in nectar-feeding birds. *Ecology* **56**: 117-128.
- WOLFE KH. 1991. Protein-coding genes in chloroplast DNA: compilation of nucleotide sequences, data base entries and rates of molecular evolution. In: VASIL K, ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, 7 BI. San Diego: Academic Press. 467-482.
- WOODELL SRJ. 1979. The role of unspecialized pollinators in the reproductive success of Aldabran plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* **286**: 99-108.
- WULFF A. *Le plan directeur de conservation, un outil d'aide à la gestion de l'environnement : Proposition d'un plan d'action pour la conservation de Cryptopus elatus, une orchidée endémique de La Réunion, protégée par arrêté ministériel*. Mémoire de DESS, Université de La Réunion, Saint Denis.
- WYATT R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. In: REAL L, ed. *Pollination Biology*. Orlando: Academic Press. 51-95.
- YANG Z, RANNALA B. 1997. Bayesian Phylogenetic Inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 717-724.
- ZHANG Z, PAWLISZYN J. 1993. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* **65**: 1843-1852.

- ZIMMERMAN JK. 1980. Ecological correlates of labile sex expression in the orchid *Catsetum viridifolium*. *Ecology* **72**: 597-608.
- ZIMMERMAN JK, AIDE TM. 1989. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany* **76**: 67-73.
- ZUCKERKANDL E, PAULING L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: BRYSON V and VOGEL HJ, eds. *Evolving genes and proteins*. New York: Academic Press. 97-166.

ANNEXES

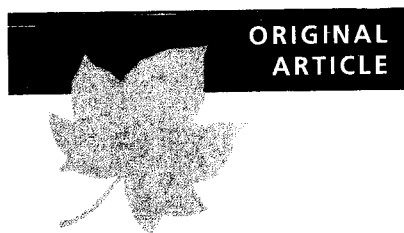
ANNEXE 1

ANNEXE 1. Liste des espèces de la sous-tribu des Angraecinae présentes aux Mascareignes, élaborée à partir d'observations de terrain et de la bibliographie existante (e.g. Roberts, 2001 ; du Petit Thouars, 1822 ; de Cordemoy, 1895, 1899).

Espèces	Localisation ^a						
<i>Aeranthus adenopoda</i>	Reu		Mada				
<i>Aeranthus arachnites</i>	Reu						
<i>Aeranthus caudata</i>	Reu		Mada				
<i>Aeranthus strangulatus</i>	Reu						
<i>Aeranthus tenella</i> var. <i>borbonica</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum</i> aff. <i>rutenbergianum</i>		Mau					
<i>Angraecum borbonicum</i>	Reu						
<i>Angraecum bracteosum</i>	Reu						
<i>Angraecum cadetii</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum calceolus</i>	Reu	Mau	Mada	Com	Sey		Afr
<i>Angraecum caulescens</i>	Reu	Mau	Mada	Com			
<i>Angraecum conchoglossum</i>	Reu		Mada				
<i>Angraecum cordemoyi</i>	Reu						
<i>Angraecum cornigerum</i>	Reu						
<i>Angraecum costatum</i>	Reu						
<i>Angraecum cucullatum</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum eburneum</i>	Reu	Mau	Mada	Com	Sey		Afr
<i>Angraecum expansum</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum hermanni</i>	Reu						
<i>Angraecum liliodorum</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum mauritianum</i>	Reu	Mau	Mada				
<i>Angraecum minutum</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum multiflorum</i>	Reu	Mau	Mada		Sey		
<i>Angraecum obversifolium</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum patens</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum pectinatum</i>	Reu	Mau	Mada	Com			
<i>Angraecum pingue</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum ramosum</i>	Reu	Mau					
<i>Angraecum</i> sp. aff. <i>caulescens</i>			Ro				
<i>Angraecum</i> sp. TP51	Reu	Mau					
<i>Angraecum</i> sp. TP84	Reu						
<i>Angraecum</i> sp. TP110	Reu						
<i>Angraecum</i> sp. TP125	Reu						
<i>Angraecum striatum</i> Thou.	Reu						
<i>Angraecum tenuifolium</i>	Reu						
<i>Bonniera appendiculata</i>	Reu						
<i>Bonniera corrugata</i>	Reu						
<i>Cryptopus elatus</i> subsp. <i>dissectus</i>	Reu	Mau	Mada				
<i>Jumellea</i> aff. <i>divaricata</i>	Reu						
<i>Jumellea</i> aff. <i>exilis</i>	Reu						
<i>Jumellea fragrans</i>	Reu	Mau					
<i>Jumellea recta</i>	Reu	Mau	Ro				
<i>Jumellea recurva</i>	Reu	Mau					
<i>Jumellea</i> aff. <i>rossii</i>	Reu						
<i>Jumellea stenophylla</i>	Reu						
<i>Jumellea</i> aff. <i>stipitata</i>	Reu						
<i>Jumellea triquetra</i>	Reu	Mau					
<i>Oeonia rosea</i>	Reu		Mada				
<i>Oeonia volucris</i>	Reu	Mau	Mada				
<i>Oeoniella aphrodite</i>			Ro				
<i>Oeoniella polystachys</i>	Reu	Mau	Mada	Com	Sey		

^a Reu: Réunion; Mau: Maurice; Ro: Rodrigues; Mada: Madagascar; Com: Comores; Sey: Seychelles; Afr: Afrique.

ANNEXE 2



ORIGINAL
ARTICLE

Elevational gradients of species diversity, breeding system and floral traits of orchid species on Réunion Island

Hans Jacquemyn^{1*}, Claire Micheneau², David L. Roberts³ and Thierry Pailler²

¹Laboratory for Forest, Nature and Landscape Research, Catholic University of Leuven, Leuven, Belgium, ²Université de la Réunion, UMR C53 Cirad-Université, Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Saint-Denis Messag, Cedex 9, La Réunion, France and ³Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK

ABSTRACT

Aim This research investigates changes in orchid species composition and diversity, plant breeding system and floral traits along an elevational gradient spanning 2300 m (200–2500 m).

Location The study was conducted on Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean).

Methods Data on the distribution of 135 orchid species from 35 genera were gathered from 121 localities situated between 200 and 2500 m a.s.l. For each locality, 500-m transects were walked and each orchid species was recorded. Measures of species diversity (species richness, a modified Shannon diversity index and the modified Shannon equitability index) were related to altitude using ordinary least-squares regression. Species turnover and elevational gradients in species composition were determined by: (1) relating scores of detrended correspondence analysis to altitude using ordinary least-squares regression, and (2) relating Sørensen similarity indices to differences in altitude using Mantel tests. Finally, the average proportion of species displaying similar floral traits or showing the same breeding system were compared among altitudinal zones.

Results Species richness per transect ranged from 1 to 36 species (mean 14.3) and decreased significantly with increasing altitude. Similarly, species evenness decreased significantly with increasing altitude. Around 50% of all orchid species were rare (occurred in fewer than 5% of all localities), and only a few occurred in more than 50% of all localities. Orchid species composition changed continuously with altitude, indicating turnover of species with increasing altitude. Analogously, orchid breeding systems and floral traits also changed with altitude. Relatively more auto-pollinating species were found at high altitudes compared with mid- and low-altitude sites where animal-pollinated species were most abundant. Species characterized by a cleistogamous pollination system were found almost exclusively in high-altitude sites, whereas the proportion of species displaying floral traits related to pollination by long-tongued moths (sphinx) and flies sharply decreased with increasing altitude.

Main conclusions Environmental conditions associated with altitude exert a large influence on orchid species composition and the distribution of orchid breeding systems. Our results revealed a high proportion of auto-pollinating species, and confirm earlier findings that auto-pollinating species are more frequent in high-altitude sites.

Keywords

Breeding system evolution, elevational gradient, floral traits, Indian Ocean, island colonization, Mascarene Islands, Orchidaceae, species composition, species turnover.

*Correspondence: Hans Jacquemyn, Laboratory for Forest, Nature and Landscape Research, University of Leuven, Vital Decosterstraat 102, B-3000 Leuven, Belgium.
E-mail: hans.jacquemyn@agr.kuleuven.ac.be

INTRODUCTION

Distribution patterns of individual species and communities have received a lot of attention in the ecological literature (MacArthur & Wilson, 1967; MacArthur, 1972; Ricklefs & Schluter, 1993; Rosenzweig, 1995), and several measures to determine changes of composition have been proposed (Whittaker, 1960, 1972; Nekola & White, 1999; Vellend, 2001; Koleff *et al.*, 2003). Generally, it can be expected that species replace one another along predefined gradients (e.g. rainfall, altitude, distance) or among different habitats, suggesting that spatial variation in species composition reflects the spatial distribution of suitable environmental conditions. However, Cody (1993) showed that not only does species turnover occur among clearly distinct habitats, but within habitats spatial configuration, spatial context and time may also influence changes in species composition.

In tropical systems, one of the major gradients that may exert large differences on plant species composition and diversity is altitude, and examples of relationships between plant species composition and altitude have been found in several parts of the world, both in mainland areas [e.g. Mexico (Vázquez & Givnish, 1998); Malaysia (Nakashizuka *et al.*, 1992)] and oceanic islands [e.g. Costa Rica (Lieberman *et al.*, 1996); Hawaii (Kitayama & Mueller-Dombois, 1994); Borneo (Kitayama, 1992)]. Species compositional turnover along elevation gradients can often be related to temperature, differences in nutrient availability and plant speciation, or elevational declines in plant growth and habitat turnover.

In contrast, only a few studies have related changes in plant species composition to plant breeding systems or floral traits (Pailler *et al.*, 1998; Humeau *et al.*, 2000). It is generally acknowledged that a relatively large amount of self-compatible species can be found on oceanic islands, compared with mainland areas where self-incompatible species are mostly predominant (Baker, 1955; McMullen, 1987; Barrett, 1996). In most cases the relatively high proportion of self-compatible species on islands has been attributed to the absence of major pollinator groups on these islands (reviewed by Barrett, 1996). Plant species on islands also tend to produce less showy flowers that are often white or greenish, in contrast with the brightly coloured and often conspicuous flowers of plant species found on mainland areas (Carlquist, 1974). However, studies of breeding systems or floral traits along predefined gradients on oceanic islands are still scarce.

Orchid species are well known for their highly evolved flowers that ensure cross-pollination (Johnson & Steiner, 2000). However, not all orchid species possess adaptations that guarantee cross-pollination, and some have become modified to ensure self-pollination. Catling (1990) estimated the proportion of self-pollinating orchids to be as large as 5–20% of the total number of orchid species. Moreover, it appeared that the geographical distribution of self-pollination is not random, but instead shows a clear pattern. In mainland areas, auto-pollination tends to occur predominantly at high latitudes or at higher elevations (Catling, 1990). For example,

50% of the orchid taxa occurring in the boreal regions of the northern hemisphere are auto-pollinating (Catling, 1990). In the mountainous zones of south-eastern Australia 25% of orchid taxa have been shown to be auto-pollinating, which is higher than the percentage of auto-pollinating species in Australia as a whole (Bates, 1978).

Hence it can be expected that, along with changes in orchid species composition, plant breeding systems and floral traits may also change with increasing altitude. The direction and magnitude of this change may depend on the relationship between plant and pollinators. If strong relationships exist between pollinator and plant, strong changes in plant breeding system can be expected if pollinator community composition changes along the studied gradient. On the other hand, since on islands several major pollinator groups are absent and several species may have evolved to self-pollination, the distribution of plant breeding systems and floral traits may be completely random.

In this study we present data on orchid species composition, breeding system and floral traits along an altitudinal gradient on Réunion Island. More specifically, the aim is to address the following questions:

1. How do orchid species composition and diversity vary with altitude?
2. How does altitude affect the distribution of orchid breeding systems and floral traits?
3. Is there a relationship between breeding system or floral traits and orchid rarity?

MATERIALS AND METHODS

Study system

Réunion Island (55°39' E; 21°00' S) is situated in the western Indian Ocean some 1200 km off the African mainland and 800 km from Madagascar (Fig. 1). It is part of the Mascarene Islands (Mauritius, Rodriguez and Réunion Island). Réunion Island is the largest of the three islands (2512 km²) and also contains the largest proportion of intact habitats (c. 30%) (Strasberg *et al.*, 2005). Altitude reaches 3070 m in the centre (Piton des Neiges) and 2631 m in the south-east (Piton de la Fournaise). The island has a tropical climate with a rainy season from November to April and a cooler, drier season from June to September. Mean annual rainfall is high in the eastern part of the island, ranging from 1500 mm on the coast to > 8000 mm at high altitudes. On the western part rainfall is remarkably lower, varying between 500 and 1500 mm along the south-western coast. Mean annual temperatures vary between 24° C along the coastline and 12° C at 2000 m altitude.

Five major habitat types can be distinguished on Réunion Island (Cadet, 1980): a semi-dry lowland forest consisting mainly of sclerophyllous tree species; tropical lowland rainforest; mid-altitude tropical rainforest; montane rainforest; and, at high altitudes, shrubland dominated by Ericaceous species. These major vegetation types are basically structured along a gradient of altitude and rainfall (Cadet, 1980).

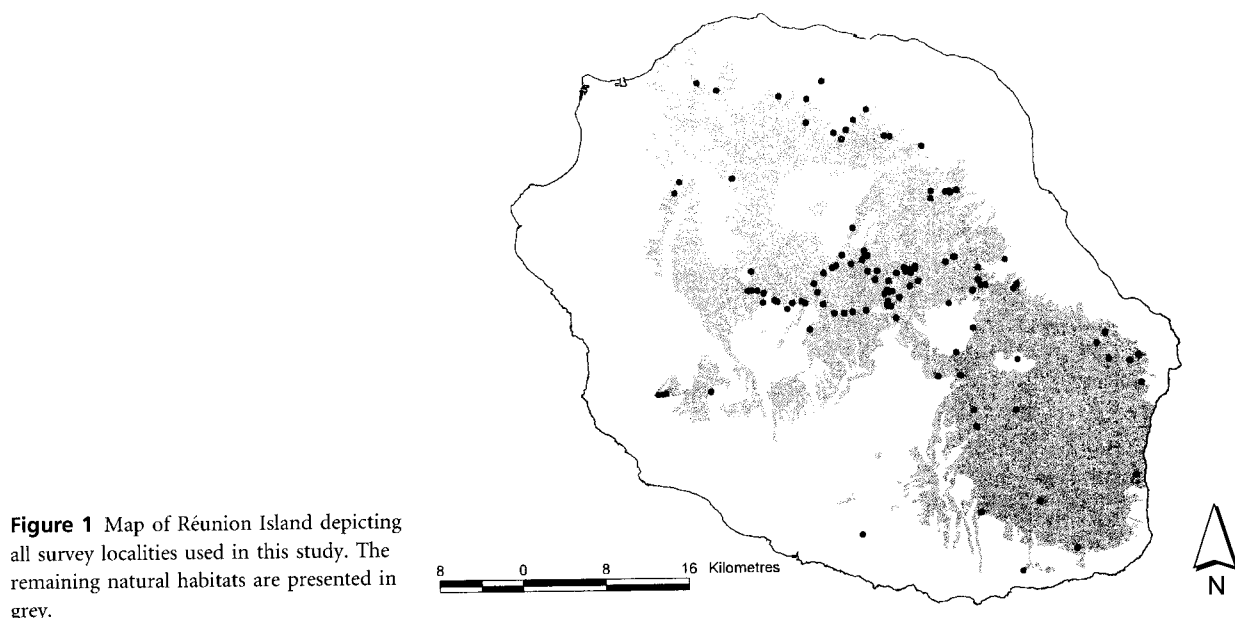


Figure 1 Map of Réunion Island depicting all survey localities used in this study. The remaining natural habitats are presented in grey.

Data collection

The orchid flora of Réunion Island contains around 135 species divided over 35 genera, and makes up nearly 20% of the original flora of La Réunion (T. Pailler, unpubl. data). Presence/absence data of the total orchid flora of La Réunion were collected between 2001 and 2002 at 121 localities spanning the whole range of altitudes found on the island (Fig. 1). At each locality, all orchid species were recorded by walking 500-m-long, horizontal transects and surveying all species occurring within this transect. Plants were mostly identified immediately in the field, but in cases of doubt samples were taken into the laboratory for further inspection.

At the same time, information on breeding system and a wide range of floral traits (flower colour, scent, nectar production and spur length) was also collected. For each species, bagging experiments were carried out to investigate experimentally whether or not orchid species were auto-pollinating. Several flowers in bud stage were bagged and afterwards fruiting success was determined. Species setting fruit after flowers were bagged were considered to be auto-pollinating. The presence of nectar production was investigated on fresh flowers from several individuals by visual inspection. A field monocular ($\times 10$) was used for small flowers, and in some cases nectar production was quantified using 5- μ L capillary tubes. Spur length was measured to the nearest 0.01 mm, either on fresh flowers in the field or on herbarium specimens, using a digital calliper.

Subdivision of species based on breeding system and floral traits

Species were subdivided into different categories based on their breeding system and floral traits (Appendix 1). With

regard to breeding system, a distinction was made between orchids that were auto-pollinating (species that do not rely on pollen vectors for successful fruit set) and species that require pollen vectors for successful fruit set (animal-pollinated plants). In accordance with earlier findings of Neiland & Wilcock (1998), all species appeared to be self-compatible (T. Pailler, unpubl. data), so that further distinction between self-compatible and self-incompatible species was not needed.

With regard to floral traits, orchids were divided into different categories based on flower colour, spur length, nectar production and floral scent. The groups delineated may be related to some major pollinator groups residing on the island (flies; bees; small-, medium- and large-tongued moths). However, despite the fact that orchid species show highly specialized pollination systems (Johnson & Steiner, 2000), the relationship between floral traits and their specific pollinators still needs to be confirmed, therefore the generalization of floral traits to putative pollinator syndromes is likely to be an oversimplification and requires caution (Waser *et al.*, 1996; Ollerton, 1998; Johnson & Steiner, 2000). Nevertheless, for simplicity the different groups of orchids with similar floral traits were named according to the pollinator syndrome most likely to represent the group. Flowers of orchids of the sphingophilous pollinator syndrome (long-tongued moths) have long spurs (between 60 and 140 mm), are mostly white and produce a weak scent. Species of the microlepidopterophilous pollinator syndrome are generally visited by small, short-tongued moths and produce greenish flowers that have very short spurs (between 2 and 5 mm) and that are scentless most of the time. Cleistogamous species do not open their flowers and are self-pollinated. Finally, orchids that have no spurs, are cream or purple coloured and offer no reward are probably visited by flies.

Data analysis

Measures of species richness (n = number of orchid species in a plot) and two indices of diversity and equitability were related to altitude using ordinary least-squares regression. We used a modified Shannon diversity index, $e^{H'}$, which is expressed as $\exp(\sum p_i \ln p_i)$ where p_i is the relative frequency of species i ; and a modified Shannon equitability index, $e^{H'}/N$ (Peet, 1974).

To test the hypothesis that orchid species composition was related to altitude, first a detrended correspondence analysis (DCA) was performed and sample scores of the first DCA axis were related to altitude using ordinary least-squares regression. Second, similarity in species composition was estimated for each pair of plots using the Sørensen similarity index [$S = 1 - 2w/(a + b)$, where a and b are the numbers of species in each plot of two samples, and w is the number of species held in common]. For each pair of plots, the absolute value of the difference in altitude between both plots was determined and both matrices were related to each other. Because the $(n^2 - n)/2$ data points are not independent (Dietz, 1983), conventional statistical tests cannot be used. Therefore, a nonparametric randomization test based on permutations of matrix elements (Mantel, 1967) was used to correlate the species matrix with the matrix containing differences in altitude between all pairs of plots. Significance was determined based on a total of 9999 randomizations.

The proportion of species with a particular breeding system or species showing similar floral traits, averaged over sites at a given range of elevation, were plotted against elevation to determine trends in pollination systems over the observed elevational gradient. Altitude was categorized in different classes and a nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis test; Siegel & Castellan, 1988) was used to test the hypothesis that the proportion of species sharing the same breeding system, or the proportion of orchids displaying similar floral traits, was related to altitude. In order to have a sufficient number of plots within different altitude classes, altitude was grouped in one of six categories: 0–400, 401–800, 801–1200, 1201–1600, 1601–2000 and > 2000 m a.s.l. Finally, to test the hypothesis that orchid rarity was related to breeding system, species frequency among the 121 localities was compared between auto-pollinating and animal-pollinated species using a Mann–Whitney test. All statistical analyses were performed using SPSS ver. 11.0 for Windows, except the DCA which was performed with CANOCO ver. 4.5.

RESULTS

In total, 121 orchid species were observed in the 121 localities investigated (for a full list of species see Appendix 1). The number of species per locality varied between 1 and 36 (mean 14.3, SD 7.9). Despite the low number of species observed at the few remaining localities below 400 m a.s.l., species richness decreased significantly with increasing

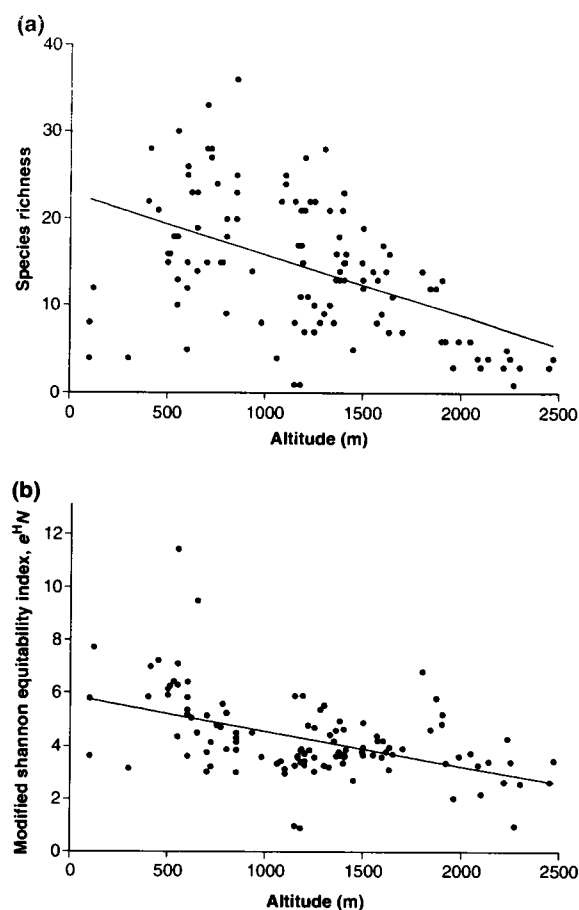


Figure 2 Relationship between altitude and (a) orchid species richness (number of species per plot); (b) modified Shannon equitability index calculated from 121 localities on Réunion Island.

altitude ($F = 36.35$, $P < 0.0001$) (Fig. 2a). Species richness reached its maximum value between 400 and 800 m and then decreased to arrive at its minimum at high-altitude sites. Likewise, the modified Shannon diversity index and the modified Shannon equitability index were significantly related to altitude ($F = 16.36$ and 35.01 , respectively, $P < 0.0001$) (Fig. 2b).

Site occupancy (the percentage of localities where a species occurred) ranged from 0.83% to 63.64% (mean 11.78%, SD 14.07) (Appendix 1) and was skewed significantly to the right (skewness = 1.813, $P < 0.001$) (Fig. 3). Almost 50% of all orchid species studied were rare, that is, they occurred in < 5% of the localities investigated, and only five species (*Beclardia macrostachya*, *Bulbophyllum nutans*, *Calanthe sylvatica*, *Jumellea fragrans* and *Jumellea triquetra*) occurred in > 50% of all localities.

The DCA scores of the first axis (eigenvalue 0.531) were significantly related to altitude ($r = 0.92$, $P < 0.001$) (Fig. 4), indicating a continuous change in orchid species composition with increasing altitude. The mean Sørensen similarity index

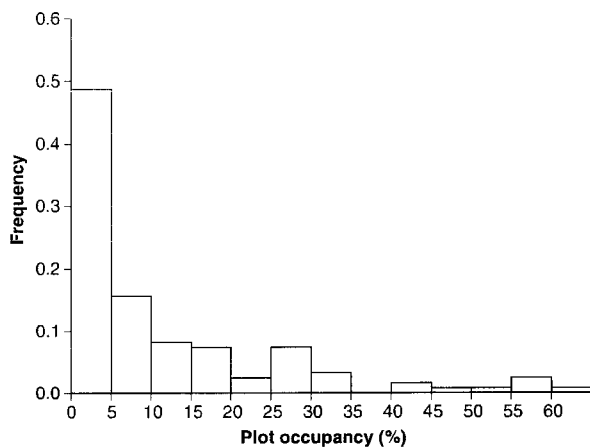


Figure 3 Species frequency distribution of 121 orchid species surveyed in 121 localities along an altitudinal gradient in La Réunion.

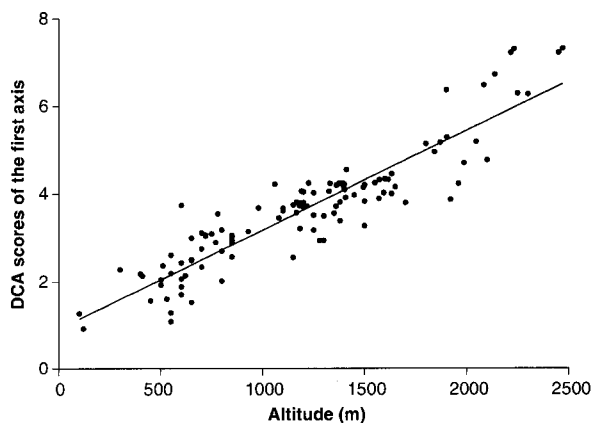


Figure 4 Relationship between altitude and sample scores of the first ordination axis determined by detrended correspondence analysis (DCA). DCA scores were calculated for 121 localities based on presence/absence of 121 orchid species.

calculated for all pairs of plots was low (0.25). However, the results of the Mantel test showed a strong and significantly negative correlation between pairwise Sørensen similarity indices and altitude ($r_M = -0.62$, $P < 0.0001$), also indicating species turnover with increasing altitude.

Of the species investigated, 46% were auto-pollinating, whereas the other 54% were dependent on pollen vectors for successful fruit set (Appendix 1). Although the proportion of auto- and animal-pollinating species was more or less the same, auto-pollinating species were significantly more rare than animal-pollinating species (mean frequency 8.3% and 17.2%, respectively, Mann–Whitney $Z = 2.88$, $P = 0.004$). The relative proportions of auto-pollinating and animal-pollinating species were also significantly different among the different altitudinal zones (Kruskal–Wallis

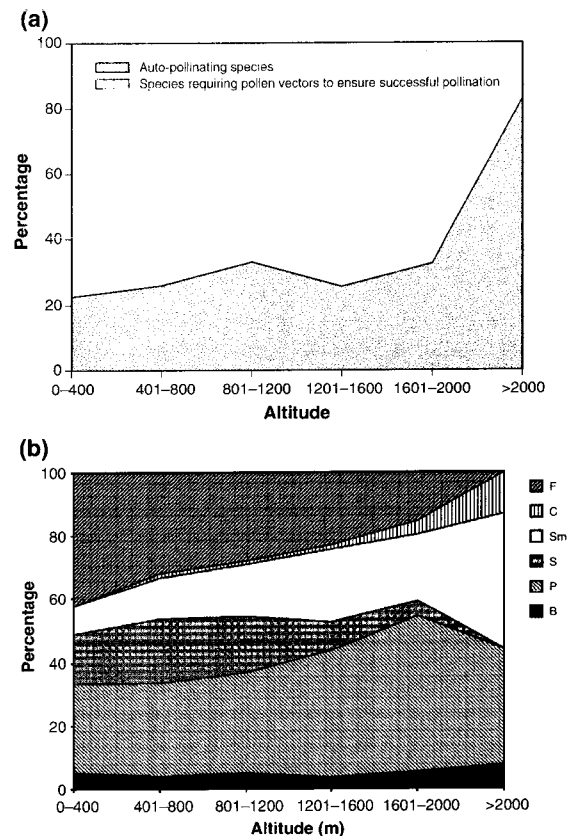


Figure 5 Altitudinal gradient in the average fraction of species per plot with (a) cross- and self-pollination; (b) different pollination syndromes [pollination by F, flies; C, cleistogamous pollination; B, bees; P, medium-tongued moths; Sm, small-tongued moths; S, long-styled (sphinx) moths].

$\chi^2 = 19.2$; $P = 0.002$) (Fig. 5a). In low- to mid-altitude zones, orchid species dependent on pollinators to obtain successful fruit set were present more frequently than auto-pollinating species, whereas in high-altitude zones the reverse was observed. At altitudes above 2000 m a.s.l. the proportion of auto-pollinating species was $> 80\%$, indicating that almost no out-crossing species were present at high altitudes.

Orchids exhibiting floral traits that may reflect pollination by flies represent 21% of the total orchid flora. Orchids displaying floral traits related to pollination by long-tongued and short-tongued moths make up another 40% of the species investigated. Orchids showing cleistogamous pollination or floral traits related to pollination by bees represent only a small minority (5%) of the species investigated. The averaged relative proportions of species changed with altitude (Fig. 5b). Species characterized by a cleistogamous pollination system were found almost exclusively in high-altitude sites, whereas the proportion of species displaying floral traits presumably related to pollination by long-tongued moths and flies sharply decreased with increasing altitude.

DISCUSSION

Species diversity and species composition

In general, local orchid species richness decreased significantly with increasing altitude. However, at the few remaining localities below 400 m a.s.l., species richness was fairly low. Nevertheless, a clear linear decreasing trend with altitude was found. These findings are consistent with other investigations of species richness along altitudinal gradients, and confirm earlier studies that demonstrated that species richness is highest at mid-altitudes and decreases with increasing altitude (Gentry & Dodson, 1987; Wolf & Flamenco-S, 2003). The high species richness between 400 and 800 m may be explained by the presence of a zone where the altitudinal distributions of many species overlap. The distribution of typical lowland orchid species may range from 0 to 800 m, whereas orchid species typical of high-altitude sites may also occasionally be found at lower altitudes. Hence the total pool of species capable of co-existing at mid-altitudes is larger than that at low- and high-altitude sites. This explanation is corroborated by the fact that orchid assemblages showed a nested subset pattern which was significantly related to altitude (results not shown), and by significant species turnover along the elevational gradient studied. These two patterns together suggest progressive diminution (*sensu* Patterson *et al.*, 1996) of orchid species richness at higher elevations, which is accompanied by occasional compensatory replacement of orchid species exclusively occurring at high-altitude sites (e.g. *Disa borbonica*, *Physoceras boryana*, *Satyrium amoenum*).

Another factor that may explain the high species richness at mid-altitude sites results from the geometrical constraint on species ranges (Colwell & Lees, 2000). When species are distributed stochastically within a bounded domain (e.g. from sea level to mountain top), null models predict that there is a mid-domain peak in species richness. Roberts & Brummit (2005), using data on the distribution of orchids based on herbaria records, demonstrated that the distribution of the total orchid flora of La Réunion over the same altitudinal gradient was indeed unimodally distributed. Their analysis, which summed all species that may occur at a given altitude, given their altitudinal range, also showed that only a few species occurred at low and high altitudes, whereas species richness peaked at mid-altitude sites.

However, the relatively low local species richness at low altitudes may also have been caused partly by the fact that, in this region, relatively few intact habitats remain (Strasberg *et al.*, 2005), and extinctions in the past due to anthropogenic disturbances and accompanying habitat fragmentation and deterioration are partially responsible for the observed lower species richness at low altitudes. For example, the orchid *Angraecum palmiforme*, which was known to occur exclusively at low altitudes, has probably gone extinct on the island. Similarly, *Eulophia versicolor* and *Eulophia borbonica*, both of which are typical lowland orchids, have become extremely rare

due to habitat loss and deterioration of the remaining habitat patches.

The low overall similarity index further indicates considerable variation in local orchid species composition. The strong altitudinal gradient and habitat diversity among altitudinal ranges, together with the fact that around 50% of all species have low frequencies of occurrence, partly explain the low similarity indices. Indeed, our data clearly showed that orchid species composition varied continuously with altitude, indicating turnover of orchid species with increasing altitude. Moreover, this continuous change also indicates that orchid species appear and disappear more-or-less independently with increasing altitude. The latter may have contributed to the low similarity index. Further, the relatively large distances between localities may also explain the low overall similarity, as it has been shown that species similarity changes with increasing distance among sampling points (Nekola & White, 1999). Jacquemyn *et al.* (2001), for example, showed decreasing similarity in forest plant community composition with increasing spatial distance between forest patches in a 42 km² area in central Belgium. Similarly, Kadmon & Pulliam (1993) found tree species composition on islands related significantly to the distance from a common mainland. Hence distances between localities may further explain the low overall similarity index.

Distribution of breeding systems and floral traits

In his review of the reproductive biology and genetics of island plants, Barrett (1996) pointed out that there might be large differences in floral traits between island and mainland plants, which may be associated mainly with the relative proportions of generalist pollinators in island and mainland areas. The description of the floral traits studied here confirms earlier observations of Carlquist (1974), who showed that floral traits of island plants were largely different from those of mainland plants. The orchid flora of La Réunion, which consists of c. 135 species divided over 35 genera, does not differ in this respect. Indeed, most species lack the showy characteristics often observed in mainland orchids of, for example, Europe or Australia. Investigation of the floral traits of 121 orchid species showed that the majority have pale, white or greenish flowers, some very small. Similar to the results presented here, Godley (1979) showed that 60.6% of New Zealand flora were characterized by white flowers.

Van der Pijl & Dodson (1966) estimated occurrence of autogamy within the orchid family to be c. 3%. Recent estimates, however, yielded higher figures (between 5% and 20%) (Ackerman, 1985; Catling, 1990). On Réunion Island almost half the species studied were self-pollinating. This figure is among the highest in the world. Only in the boreal regions of the northern hemisphere has a incidence of auto-pollination been reported (c. 50%; Catling, 1990). This high proportion of auto-pollinating species on Réunion Island may be seen as an adaptation that secures survival in the absence

of highly specialized pollinators. Roberts & Brummit (2005) hypothesized that most orchids found on Réunion Island originated from Madagascar, which is characterized by highly specialized pollinator interactions. After La Réunion was formed some 3 Ma, orchids probably colonized the island, especially the lower parts, from Mauritius. Afterwards, speciation and further colonization from Madagascar occurred in the orchid-free habitats at higher altitudes on La Réunion. At present nearly 50% of all orchid species occurring in La Réunion are endemic to the Mascarenes, and 25% to La Réunion. As all highly specific pollinators probably did not colonize the island, orchids had to become self-pollinating or adapt their flower morphology in such a way that other pollinators could function as pollen vectors. This may explain the high incidence of auto-pollination within the group of species with long spurs. However, since these species are not present in high-altitude sites, lack of highly specialized pollinators cannot be the sole explanation for the observed patterns of altitudinal variation in breeding system.

When looking at the growth form of the orchid species studied here, 31% of the self-pollinating species were epiphytic whereas 69% were terrestrial orchids. As hardly any epiphytic orchids occurred above 2000 m, the high proportion of self-pollinating species was almost entirely due to the occurrence of self-pollinating terrestrial orchids. Catling (1990) explained the higher occurrence of self-pollination among terrestrial orchids as a selective advantage in disturbed environments where pollinator activity may be highly unpredictable. In more stable environments, such as forests, auto-pollination may be less of an advantage. Nonetheless, auto-pollinating species had a significantly lower frequency than animal-pollinating species (8.3% vs. 17.2%, respectively), despite the fact that the number of auto- and animal-pollinating species was nearly the same. This may be explained by possible trade-offs related to self-pollination, the most prominent being inbreeding depression (Tremblay *et al.*, 2005).

The results of this study further revealed that floral traits also changed along the investigated elevational gradient. Arroyo *et al.* (1982), studying altitudinal variation in pollinator communities in the high temperate Andes of Central Chile, found a sharp decrease in the number of fly species with increasing altitude. Similarly, the number of bee species also decreased sharply with increasing altitude. On Réunion Island similar decreases in fly pollinators may have caused the complete absence of orchids thought to be mainly pollinated by flies at high altitudes. However, more research on the occurrence of orchid pollinators and the strength of the relationship between pollinator and orchid is needed to confirm the relationship between orchid occurrence and their presumed pollinators.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was a joint collaboration between the University of Leuven and the University of La Réunion, and was supported by the Flemish Fund for Scientific Research

(FWO) (H.J.) and the 'Ministère français de l'Écologie et du Développement Durable: Ecosystèmes Tropicaux' (T.P.). H.J. thanks FWO for funding travelling costs. Olivier Honnay, Ole R. Vetaas, Robert J. Whittaker and two anonymous referees provided very useful comments on an earlier draft.

REFERENCES

- Ackerman, J.D. (1985) Pollination of tropical and temperate orchids. *Proceedings of the 11th World Orchid Conference* (ed. by K.W. Tan), pp. 98–101. American Orchid Society, Miami.
- Arroyo, M.T.K., Primack, R. & Armesto, J. (1982) Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. *American Journal of Botany*, **69**, 82–97.
- Baker, H.G. (1955) Self-compatibility and establishment after 'long-distance' dispersal. *Evolution*, **9**, 347–348.
- Barrett, S.C.H. (1996) The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **351**, 725–733.
- Bates, R. (1978) Pollination of orchids – Part 9. *Journal of the Native Orchid Society of South Australia*, **2**, 7–8.
- Cadet, T. (1980) *La Végétation de l'Île de la Réunion: Etude Phytoécologique et Phytosociologique*. Imprimerie Cazal, Saint-Denis, La Réunion.
- Carlquist, S. (1974) *Island biology*. Columbia University Press, New York.
- Catling, P.M. (1990) Auto-pollination in the Orchidaceae. *Orchid biology: reviews and perspectives*, V (ed. by J. Arditti), pp. 121–158. Timber Press, Portland, OR, USA.
- Cody, M.L. (1993) Bird diversity components within and between habitats in Australia. *Species diversity in ecological communities* (ed. by R.E. Ricklefs and D. Schluter), pp. 147–158. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- Colwell, R.K. & Lees, D.C. (2000) The mid-domain effect: geometric constraints on the geography of species richness. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 70–76.
- de Cordermoy, E.J. (1895) *Flore de l'île de La Réunion*. Paul Klincksieck, Paris.
- Dietz, E.J. (1983) Permutation tests for association between two distance matrices. *Systematic Zoology*, **32**, 21–26.
- Gentry, A.H. & Dodson, C.H. (1987) Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Annals of the Missouri Botanical Gardens*, **74**, 205–233.
- Godley, E.J. (1979) Flower biology in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, **17**, 441–466.
- Humeau, L., Pailler, T. & Thompson, J.D. (2000) Variation in gender and flower-size dimorphism in the dioecious tree *Dombeya ciliata*, an endemic to La Reunion Island. *Biotropica*, **32**, 463–472.
- Jacquemyn, H., Butaye, J., Dumortier, M., Hermy, M. & Lust, N. (2001) Effects of age and distance on the composition of mixed deciduous forest fragments in an agricultural landscape. *Journal of Vegetation Science*, **12**, 635–642.

- Johnson, S.D. & Steiner, K.E. (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 140–143.
- Kadmon, R. & Pulliam, H.R. (1993) Island biogeography: effect of geographical isolation on species composition. *Ecology*, **74**, 977–981.
- Kitayama, K. (1992) An altitudinal transect study of the vegetation of Mount Kinabalu, Borneo. *Vegetatio*, **102**, 149–171.
- Kitayama, K. & Mueller-Dombois, D. (1994) An altitudinal transect analysis of the windward vegetation on Haleakala, a Hawaiian Island mountain. 2. Vegetation zonation. *Phytocoenologia*, **24**, 135–154.
- Koleff, P., Gaston, K.J. & Lennon, J.J. (2003) Measuring beta diversity for presence-absence data. *Journal of Animal Ecology*, **72**, 367–382.
- Lieberman, D., Lieberman, M., Peralta, R. & Hartshorn, G.S. (1996) Tropical structure and composition on a large scale altitudinal gradient in Costa Rica. *Journal of Ecology*, **84**, 137–152.
- MacArthur, R.H. (1972) *Geographical ecology*. Harper and Row, New York.
- MacArthur, R.H. & Wilson, E.O. (1967) *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209–220.
- McMullen, C.K. (1987) Breeding systems of selected Galápagos Islands angiosperms. *American Journal of Botany*, **74**, 1694–1705.
- Nakashizuka, T., Yusop, Z. & Nik, A.R. (1992) Altitudinal zonation of forest communities in Selangor, Peninsular Malaysia. *Journal of Tropical Forest Science*, **4**, 233–244.
- Neiland, M.R.M. & Wilcock, C.C. (1998) Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany*, **85**, 1657–1671.
- Nekola, J.C. & White, P.S. (1999) The distance decay of similarity in biogeography and ecology. *Journal of Biogeography*, **26**, 867–878.
- Ollerton, J. (1998) Pollination. Sunbird surprise for syndromes. *Nature*, **394**, 726–727.
- Pailler, T., Humeau, L., Figier, J. & Thompson, J.D. (1998) Reproductive trait variation in the functionally dioecious and morphologically heterostylous island endemic *Chassalia corallioides* (Rubiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **64**, 297–313.
- Patterson, B.D., Pacheco, V. & Solari, S. (1996) Distributions of bats along an elevational gradient in the Andes of south-eastern Peru. *Journal of Zoology*, **240**, 637–658.
- Peet, R.K. (1974) The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **5**, 295–307.
- Ricklefs, R.E. & Schluter, D. (1993) *Species diversity in ecological communities*. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- Roberts, D.L. & Brummitt, N.A. (2005) The influence of geometric constraints on the colonisation, speciation and range expansion of orchids. *African plants: biodiversity, taxonomy and uses* (ed. by S.A. Ghazanfar and H. Beentje). Royal Botanic Gardens, Kew (in press).
- Rosenzweig, M.L. (1995) *Species diversity in space and time*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Siegel, S. & Castellan, N.J. (1988) *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*, McGraw-Hill, New York.
- Strasberg, D., Rouget, M., Richardson, D.M., Baret, S., Dupont, J. & Cowling, R.M. (2005) An assessment of habitat diversity and transformation on La Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a basis for identifying broad-scale conservation priorities. *Biodiversity and Conservation*, in press.
- Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K. & Calvo, R.N. (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society*, **84**, 1–54.
- Van der Pijl, L. & Dodson, C.H. (1966) *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables, FL, USA.
- Vázquez, G.J.A. & Givnish, T.J. (1998) Altitudinal gradients in tropical forest composition, structure, and diversity in the Sierra de Manantlán. *Journal of Ecology*, **86**, 999–1020.
- Vellend, M. (2001) Do commonly used indices of β -diversity measure species turnover? *Journal of Vegetation Science*, **12**, 545–552.
- Waser, N.M., Chittka, L., Price, M.V., Williams, N.M. & Ollerton, J. (1996) Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, **77**, 1043–1060.
- Whittaker, R.H. (1960) Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, **30**, 279–338.
- Whittaker, R.H. (1972) Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, **21**, 213–251.
- Wolf, J.H.D. and Flamenko-S, A. (2003) Patterns in species richness and distribution of vascular epiphytes in Chiapas, Mexico. *Journal of Biogeography*, **30**, 1689–1707.

BIOSKETCHES

Hans Jacquemyn is a post-doctoral researcher at the University of Leuven, Belgium and is mainly interested in spatial distribution patterns of plant species in a wide range of environments. Recently his interest has migrated to orchid species and factors influencing their spatial and temporal distribution.

David Roberts is working at the Royal Botanical Gardens and **Thierry Pailler** and **Claire Micheneau** at the University of La Réunion. All have a deep interest in orchid biology and biogeography.

Editor: Ole Vetaas

Appendix 1 Orchid species from the altitudinal transect on Réunion island together with their frequency, observed altitudinal range, breeding system and similarity based on floral traits (nectar reward, flower colour, scent and spur length)

Species	Frequency	Altitudinal range	Breeding system*	Pollination syndrome†
<i>Aerangis punctata</i>	0.8	1300	AP	S
<i>Aeranthus arachnites</i>	10.7	100–1300	CP	P
<i>Aeranthus strangulata</i>	8.3	550–1300	CP	P
<i>Aeranthus tenella</i>	1.7	120–700	CP	P
<i>Angraecopsis parviflora</i>	27.3	400–1400	CP	Sm
<i>Angraecum borbonicum</i>	30.6	400–1500	AP	S
<i>Angraecum bracteosum</i>	43.0	510–1650	CP	
<i>Angraecum cadetii</i>	28.1	400–1325	CP	
<i>Angraecum calceolus</i>	4.1	300–850	AP	Sm
<i>Angraecum caulescens</i>	19.0	400–1500	CP	Sm
<i>Angraecum cornigerum</i>	6.6	850–1920	AP	S
<i>Angraecum costatum</i>	18.2	1225–2100	CP	Sm
<i>Angraecum cucullatum</i>	16.5	400–850	CP	P
<i>Angraecum eburneum</i>	5.0	100–650	CP	S
<i>Angraecum expansum</i>	49.6	550–2100	CP	P
<i>Angraecum germinyanum</i>	4.1	550–850	CP	S
<i>Angraecum hermannii</i>	0.8	1360	?	Sm
<i>Angraecum liliodorum</i>	2.5	120–550	CP	S
<i>Angraecum mauritianum</i>	19.0	120–1300	CP	S
<i>Angraecum</i> sp. (TP88)‡	4.1	1300–1700	CP	Sm
<i>Angraecum</i> sp. (TP84)‡	10.7	700–1920	CP	Sm
<i>Angraecum multiflorum</i>	5.8	850–1570	CP	Sm
<i>Angraecum obversifolium</i>	43.8	650–1902	CP	Sm
<i>Angraecum patens</i>	1.7	550–650	CP	Sm
<i>Angraecum pectinatum</i>	12.4	410–720	CP	Sm
<i>Angraecum pingue</i>	0.8	1300	CP	P
<i>Angraecum ramosum</i>	23.1	400–1217	CP	P
<i>Angraecum</i> sp. (TP125)‡	0.8	700	CP	
<i>Angraecum</i> sp. (TP114)‡	19.0	780–1870	CP	Sm
<i>Angraecum spicatum</i>	2.5	1300–1500	AP	Sm
<i>Angraecum striatum</i>	28.1	550–1902	CP	
<i>Angraecum tenuifolium</i>	2.5	1380–1570	CP	Sm
<i>Arnottia mauritiana</i>	28.9	400–1650	AP	
<i>Beclardia macrostachya</i>	56.2	300–1987	CP	P
<i>Benthamia gracilis</i>	1.7	1400–1800		
<i>Benthamia latifolia</i>	15.7	720–2300	AP	P
<i>Benthamia nigrescens</i>	26.4	550–2046	AP	P
<i>Benthamia</i> sp. (TP120)‡	2.5	1200–1800		
<i>Benthamia spiralis</i>	26.4	410–2470	AP	Sm
<i>Bonniera appendiculata</i>	11.6	1200–1842	CP	
<i>Bonniera corrugata</i>	0.8	930	?	
<i>Bulbophyllum</i> sp. (TP166)‡	0.8	720	AP	
<i>Bulbophyllum clavatum</i>	4.1	410–1375	CP	F
<i>Bulbophyllum cylindrocarpum</i>	29.8	850–1902	?	F
<i>Bulbophyllum densum</i>	31.4	400–1633	CP	F
<i>Bulbophyllum incurvum</i>	9.9	100–720	CP	F
<i>Bulbophyllum macrocarpum</i>	26.4	400–1500	?	F
<i>Bulbophyllum</i> sp. (TP61)‡	9.1	410–1400		
<i>Bulbophyllum nutans</i>	56.2	550–1960	CP	F
<i>Bulbophyllum occlusum</i>	18.2	650–1500	AP	F
<i>Bulbophyllum occultum</i>	10.7	120–720	AP	F
<i>Bulbophyllum prismaticum</i>	23.1	120–1200	CP	F
<i>Bulbophyllum sambiranense</i>	16.5	300–1600	AP	
<i>Bulbophyllum</i> sp.	2.5	720–780	CP	F
<i>Bulbophyllum variegatum</i>	11.6	100–850	CP	F
<i>Calanthe candida</i>	2.5	410–800	AP	

Appendix 1 continued

Species	Frequency	Altitudinal range	Breeding system*	Pollination syndrome†
<i>Calanthe sylvatica</i>	50.4	410–1650	CP	S
<i>Bulbophyllum longifolium</i>	5.8	100–850	CP	F
<i>Corymborkis corymbis</i>	0.8	550	CP	S
<i>Cryptopus elatus</i>	10.7	450–1183	CP	S
<i>Cynorkis boryana</i>	1.7	1250–1800		
<i>Cynorkis cadetii</i>	0.8	1900	AP	C
<i>Cynorkis citrata</i>	4.1	400–1150	AP	
<i>Cynorkis coccinelloides</i>	9.9	1190–2138	AP	
<i>Cynorkis cordemoyi</i>	0.8	1190		
<i>Cynorkis falcate</i>	7.4	1800–2470	AP	
<i>Cynorkis fastigiata</i>	8.3	510–1183	AP	
<i>Cynorkis graminea</i>	2.5	1400–2250	AP	
<i>Cynorkis purpurascens</i>	15.7	100–1500	AP	P
<i>Cynorkis rosellata</i>	8.3	750–1600	AP	C
<i>Cynorkis</i> sp. (TP32)‡	5.8	550–1900		
<i>Cynorkis squamosa</i>	32.2	600–1633	AP	B
<i>Disa borbonica</i>	5.0	1800–2470	AP	C
<i>Disperis oppositifolia</i>	0.8	120	AP	
<i>Disperis tripetaloides</i>	2.5	550–650	AP	
<i>Eulophia borbonica</i>	0.8		AP	B
<i>Eulophia pulchra</i>	3.3	550–650	AP	B
<i>Graphorkis concolor</i>	6.6	410–700	CP	B
<i>Graphorkis concolor</i> var <i>alphabetica</i>	1.7	600		
<i>Gymnochilus nudum</i>	1.7	600–780	AP	
<i>Habenaria</i> sp. (TP131)‡	2.5	550–1800		
<i>Habenaria</i> sp. (TP43)‡	3.3	700–2138		
<i>Habenaria</i> sp. (TP44)‡	0.8	1902		P
<i>Habenaria praealta</i>	11.6	500–1250	AP	P
<i>Habenaria sigillum</i>	13.2	450–1190	CP	P
<i>Habenaria</i> sp. (JF1)‡	0.8	850	AP	P
<i>Habenaria undulata</i>	2.5	600–930		
<i>Hemiparis trilinguis</i>	0.8	1200	AP	
<i>Holothrix villosa</i>	3.3	1150–1350		
<i>Jumellea divaricata</i>	3.3	850–1300	AP	S
<i>Jumellea exile</i>	2.5	550–1380	AP	S
<i>Jumellea fragrans</i>	55.4	500–1920	CP	P
<i>Jumellea recta</i>	4.1	100–1300	CP	S
<i>Jumellea recurva</i>	6.6	400–850	AP	S
<i>Jumellea rossi</i>	5.0	1180–1406	CP	P
<i>Jumellea stenophylla</i>	8.3	600–1397	AP	S
<i>Jumellea stipitata</i>	3.3	400–650	CP	P
<i>Jumellea triquetra</i>	63.6	620–2100	CP	P
<i>Liparis caespitosa</i>	1.7	550–650	AP	
<i>Liparis caulescens</i>	4.1	500–1400		
<i>Liparis disticha</i>	9.9	100–1500	CP	
<i>Liparis flammula</i>	0.8	1190		
<i>Liparis flavescens</i>	3.3	550–1300	CP	
<i>Liparis purpurascens</i>	2.5	500–750	AP	
<i>Liparis reflexa</i>	6.6	1150–1842		
<i>Liparis scaposa</i>	5.0	1060–1870	AP	
<i>Liparis</i> sp. (TP28)‡	3.3	700–1600		
<i>Oberonia disticha</i>	33.1	100–1500	?	F
<i>Oceoclades monophylla</i>	0.8	550	AP	
<i>Oenia rosea</i>	7.4	620–1300	CP	P
<i>Oeniella polystachys</i>	0.8	100	CP	P
<i>Phajus longibracteatus</i>	0.8	800	AP	
<i>Phajus pulchellus</i>	21.5	410–1411	AP	

Appendix 1 *continued*

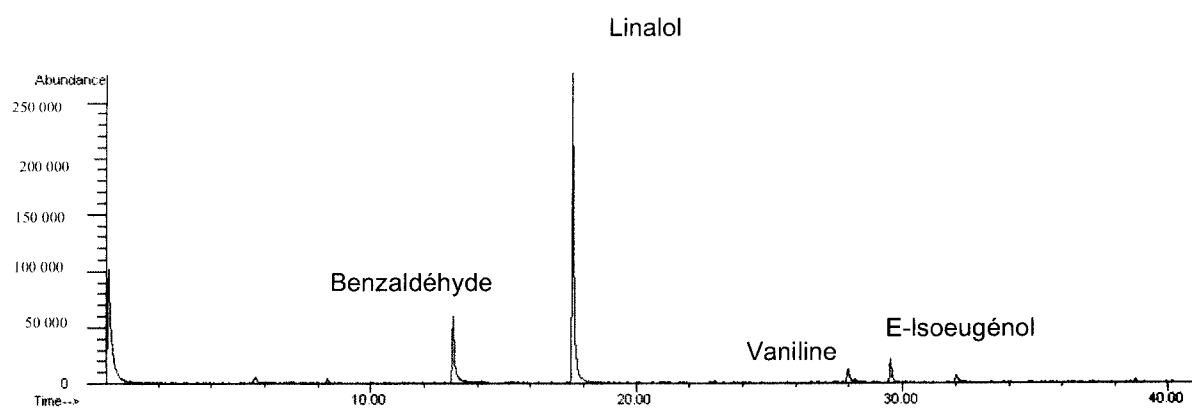
Species	Frequency	Altitudinal range	Breeding system*	Pollination syndrome†
<i>Phajus tetragonus</i>	5.8	410–650	AP	
<i>Physoceras boryana</i>	2.5	1400–2233		
<i>Polystachya cultriformis</i>	29.8	400–1500	CP	F
<i>Polystachya fusiformis</i>	9.9	400–1300		F
<i>Polystachya mauritiana</i>	11.6	120–800	CP	F
<i>Polystachya minuta</i>	2.5	410–600		
<i>Polystachya rosea</i>	4.1	600–850	AP	C
<i>Satyrium amoenum</i>	5.0	1870–2470	AP	P

*AP, auto-pollinating species; CP, cross-pollinating species dependent on pollinators to reach successful fruit set.

†Putative pollination syndrome based on nectar reward, spur length, scent and flower colour: pollination by F, flies; C, cleistogamous pollination; B, bees; P, medium-tongued moths; Sm, small-tongued moths; S, long-tongued (sphinx) moths.

‡Since the flora of Réunion Island is more than 100 years old (de Cordemoy, 1895), the exact name of some species still needs to be determined or its status needs to be reconfirmed. Numbers refer to voucher specimens deposited in the Réunion Herbarium (University of Réunion Island).

ANNEXE 3



Angraecum liliodorum

ANNEXE 3. Chromatogramme des émissions volatiles nocturnes d'*Angraecum liliodorum*.

ANNEXE 4

Self-pollination in a long-spurred endemic orchid (*Jumellea stenophylla*) on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean)

C. Micheneau¹, J. Fournel², A. Gauvin³, and T. Pailler¹.

¹ Université de La Réunion, Peuplements Végétaux et Bio-Agresseurs en Milieu Tropical, Saint Denis, La Réunion, France

²Herbier Universitaire de La Réunion, Saint Denis, La Réunion, France

³ Université de La Réunion, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments, Saint Denis, La Réunion, France

Abstract. Since the time of Darwin, long-spurred angraecoid orchids are known for their fascinating coevolution with long-tongued hawkmoths (Sphingidae) on Madagascar. We studied the reproductive biology of *Jumellea stenophylla*, a long-spurred endemic angraecoid orchid, and the proboscis morphology of the majority of native hawkmoth species. *J. stenophylla* exhibits typical sphingophilous flowers, but compared with other sphingid-pollinated orchids, the floral bouquet was highly depauperate, and the flower longevity was very short, lasting only four days. Moreover, autonomous self-pollinations occurred in all flowers. Fruit set was 66.7 % when pollinators were excluded, and averaged 77 % in natural conditions. While the species did not require pollinator to achieve reproduction, none of the studied hawkmoths can be considered as potential pollinator. This study documented a case of self-fertility in a long-spurred angraecoid orchid. On Reunion, this reproductive system seems highly linked to the absence of specific pollinator on the island.

Key words. Hawkmoth, *Jumellea stenophylla*, long-spurred angraecoid orchid, oceanic island, Reunion Island, self-pollination.

Oceanic islands are known for their lack of specialized pollinators, and the absence of whole groups of pollinators (Carlquist 1974; Woodell 1979; Lloyd 1985; McMullen 1987). Plants with floral morphologies requiring certain pollinator types or species may thus experience difficulties in the establishment of new populations on isolated islands, unless they are able to self-pollinate (Baker 1967; Ehrendorfer 1979; Inoue 1990; Barrett 1996). Indeed, self-pollination can provide reproductive assurance when pollen availability limits maternal fertility, i.e. when mates or visits by pollinators are scarce (Darwin 1876; Jain 1976; Lloyd 1992). As a result, the ability to self-pollinate may be a common feature of oceanic island plants (Baker 1967; Carlquist 1974; Barrett 1996).

The islands of Reunion, Mauritius and Rodriguez form the Mascarene Archipelago in the southern Indian Ocean, roughly 800 – 1000 km east of Madagascar. Whereas Mauritius emerged at nearly 8 million years ago, Reunion is much younger, having emerged at roughly 2.1 million years ago (McDougall and Chamalaun 1969). Previous studies of native taxa have shown that several species have, contrary to the predictions of Baker (1967), successfully colonised the Mascarene islands despite their self-incompatibility, e.g. the various distylous and tristylous species that occur on the islands of Reunion and Mauritius (Thompson et al. 1996; Pailler 1997; Pailler and Thompson 1997; Pailler et al. 1998). In addition, Reunion has a remarkably high rate of dioecy in its native flora (T. Pailler unpublished data). Plant-pollinator interactions are also diverse on Reunion. For example, distylous *Gaertnera vaginata* Lam. (Rubiaceae) is pollinated by small sphingid species (*Macroglossum milvus* Boisd., *Hyles biguttata* Walk.), distylous *Erythroxylum laurifolium* Lam. (Erythroxylaceae) is pollinated by bees (*Megachile* sp), tristylous *Hugonia serrata* Lam. (Linaceae) is pollinated by butterflies (*Papilio phorbanta* L.), and the dioecious *Dombeya elegans* Cordem. (Sterculiaceae) is bird-pollinated (*Zosterops olivaceus* and *Z. borbonicus*) (T. Pailler, personal observations). Reunion harbors in fact a fairly diverse insect fauna; for example it is home to 13 native species of sphingids (Guillermet and Guillermet 1986), compared with only six on Hawaii (Howarth and Mull 1992, cited in Barrett 1996).

Reunion is also characterized by high orchid species richness, as more than 130 indigenous species have been reported (Roberts 2001). More than ten of these concern long-spurred species, belonging either to the subtribe Angraecinae or Aerangidinae (i.e. angraecoid orchids) (T. Pailler, unpublished data). Since Darwin (1862), long-spurred angraecoid orchids are known for their fascinating coevolution with long-tongued hawkmoths (Sphingidae) on Madagascar. The pollination systems of only few species have however been studied so far, compared to their high diversity on Madagascar (Perrier de la Bâthie 1939). Nevertheless, all

studies have shown that long-spurred angraecoid orchids were highly pollinator specific, as most of them have only one recorded pollinator (Nilsson et al. 1985, 1987; Wasserthal 1997), or rarely two (Nilsson and Rabakonandrianina 1988). This specialization has been thought as the result of a long-term coevolution between long-tongued sphingids and long-spurred orchids in Madagascar, archaic relationships that have persisted in the isolated island (Nilsson et al. 1985). The flora of Reunion has been reported to originate primarily (> 80 % of native taxa) from Madagascar and Africa (Cadet 1977). Ongoing phylogenetic studies, inferred from plastid DNA sequences (C. Micheneau, M. Fay, M. Chase, B. Carlsward and T. Pailler, unpublished data) have shown that all long-spurred angraecoid orchids present on Reunion derived from Malagasy ancestors. This offers the opportunity to study the functioning and maintenance of angraecoid-sphingid interactions on a tropical oceanic island setting, compared to the Malagasy situation. The angraecoid orchids that are sphingid-pollinated exhibit typically long-spurred flowers (from 9 to 30 cm), pure white, producing relatively large amounts of nectar (reward), and a sweet scent at dusk (attractant) (van der Pijl and Dodson 1966). Sphingids that pollinate such species have a long tongue, fly at dusk over long distances, locate the flower at distance by its scent, and at short distance by its white color and visit the flower for the nectar it contains (van der Pijl and Dodson 1966; Nilsson 1992).

The purpose of this study was to describe the pollination biology of *Jumellea stenophylla* (Frapp.) Schltr., a long-spurred angraecoid orchid, endemic to Reunion Island. To do so, we asked the following questions: (1) Does *J. stenophylla* have the typical floral features of other sphingophilous angraecoid species? To answer this question, we studied the floral shape (spur length, spur diameter), floral scent, and nectar properties. (2) Among native sphingids from Reunion, which species can be considered as potential pollinators? To answer this question, we compared morphologies of hawkmoth proboscis and orchid spurs. (3) Does *J. stenophylla* require and use pollinators to reproduce in natural populations? To examine this question, we investigated the breeding system of *J. stenophylla*, the pollinator activity (pollen removal) and the orchid reproductive success (fruit set) in natural conditions.

Materials and methods

Study species and study site. The genus *Jumellea* Schltr. comprises about 60 species, which occur on Madagascar (42 species) (du Puy et al. 1999), on the Comoros Island (6 species) (du Puy et al. 1999), on the Mascarene Islands (9 species) (Roberts 2001), and in Africa (2 species) (la Croix and la Croix 1997) (Fig. 1A). On Reunion, nine species are present (all

endemic to the Mascarenes) of which five are long-spurred (spur length more than 9 cm) and four are short-spurred (spur length less than 5 cm). *Jumellea stenophylla* is an epiphytic endangered species, endemic to Reunion. Each individual produces one or a small number of shoots that generally produce one or two solitary flowers per year. Flowers are white to brownish and long-spurred. *J. stenophylla* grows typically in *Pandanus* thickets, a habitat that has declined greatly since human colonization of Reunion (Strasberg et al. in press). In this habitat, populations often contain fewer than 100 individuals, and less than ten sites (all between 600 - 1000 m asl) are known (Fig. 1B). One population of *J. stenophylla* was studied in the field. This is the largest of the known populations in the wild. The study site was located in the humid mid-altitude forest of Eden, in the east of the island, at 650 m asl (Fig. 1B). In this habitat, individuals grow preferentially on *Pandanus montanus* Bory trees. At the study site, the flowering season lasted only two weeks, from mid November to early December.

Spur length and nectar properties. Measurements were made on flowers from five different stages: (1) just before anthesis (N = 10) (hereafter Bud), (2) one-day-old flowers (N = 10) (hereafter D1), (3) two-days-old flowers (N = 16) (hereafter D2), (4) three-days-old flowers (N = 6) (hereafter D3), and (5) four-days-old flowers (N = 12) (hereafter D4). For each stage, flowers were collected randomly in the population. Spur length (distance between the tip of the spur and the entrance to the spur) was measured to the nearest 0.01 mm using digital calipers. Spur length measurements were performed on fresh material in the field. The same flower was used to measure the height of the nectar column the spur (distance between the tip of the spur and the level of nectar in the spur) with the same precision. To allow the collection of nectar, the tip of the spur was slightly opened using a scalpel. The nectar was then directly collected from the spur with a capillary tube (5 μ l). The percent of sucrose equivalents in the nectar (g of sucrose per 100 g of solution) was quantified by directly transferring the nectar from the capillary tube to a hand refractometer (R5000, Atago Inc., Bellevue, Washington, USA).

Scent analysis. Floral volatiles were analyzed using solid phase micro extraction (SPME) technique (Zhang and Pawliszyn 1993), employing a black carboxenTM fiber coated with 75 μ m polydimethylsiloxane (PDMS) (Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA). One wild specimen was collected in bud, cultivating at the laboratory during the flowering period and putting back in the field after experiments. Opened flowers were placed in a glass-

bell, sealed at the large extremity with cotton wool and at the other end by the SPME-fiber. One flower each time (two or three-days old) was exposed to the fiber from 8.00 am to 5.30 pm during the day and from 5.30 pm to 9.00 am the night. To ensure the result reproducibility, each experiment was repeated twice by using the same flower. Blanks (i.e. exposed fiber without flower) were run to establish a base line. Analyses were performed using a Hewlett Packard 6890N gas chromatograph (GC), coupled directly to a Hewlett Packard 5973N mass spectrometer (MS). Compounds were desorbed from the fiber in the GC injector (splitless injection mode) at 250°C and separated on a capillary SPB-5 non polar columnn (60 m x 32 mm; phase thickness 0.25 µm) with helium as carrier gas (0.7 mL/min). The GC oven was programmed to increase temperature from 60°C to 230°C at 4°C/min, following by a stabilization at 230°C during 40 min. Mass spectra were produced with a current ionisation of 70eV, in a scan range of m/z 30-550. Retention indices of the constituents were determined by Kovats method using *n*-alkanes (C₈-C₂₂) as standards (Kovats 1965). Compounds were identified by comparison of their retention indices and their mass spectral fragmentation with those reported in the literature (Adams 2001) and stored on the MS "Nist" and "Wiley" libraries.

Breeding system. The ability of the plant to reproduce by self-fertilization was tested in the field during the 2003 flowering season. Twenty-one flowers, randomly chosen in the population, were enclosed in bags just prior to anthesis to exclude pollinators. Bags were maintained up to the end of the fruiting period to prevent predation. We also quantified the natural fruiting success in the studied population in 2003 (N = 40 flowers) and 2004 (N = 23 flowers): unmanipulated flowers were marked just before anthesis. Fruit set was recorded for each treatment around four weeks after the flowering period; it was calculated by the ratio of mature fruits to open flowers. In 2004, 54 additional flowers were examined for pollinia removal in the studied population.

To describe self-pollination mechanism of the species, the flowers, collected in the different stages described above, were observed under a microscope. Previous observations suggested that the pollinia germinated onto the stigma, without being removed from the anther, early during the lifespan of the flower. We made cross sections of the gynostem on flowers of the different developmental stages to describe the external changes that occurred in this part of the flower.

Spur-proboscis interactions. Reunion is home of 13 native species of hawkmoth. Twelve species were studied, with sample sizes ranging from $N = 1$ to $N = 9$. Only one species (*Basiothia medea* Fabric.) was not measured because of lack of material. This small and very rare species has been caught only once on Reunion Island (Guillermet and Guillermet 1986). We investigated the proboscis length of these species based either on the collection of the Université de La Réunion or on the entomofauna collection of the Muséum d'Histoire Naturelle de La Réunion. Each hawkmoth specimen was first humidified, the proboscis unrolled and its length (from the tip of the proboscis to its attachment point on the head of the insect) measured to the nearest 0.01 mm using digital calipers.

To determine whether *J. stenophylla* can potentially be pollinated by long-tongued hawkmoths present on Reunion, we measured every centimeter the proboscis width of two species, *Agrius convolvuli* L. ($N = 4$) and *Coelonia fulvinotata* Butl. ($N = 2$). Measurements were made to the nearest 0.01 mm, using a Leica MZII binocular and digital calipers. We compared these measurements to the internal diameter of orchid spurs ($N = 10$, D1 stage). Prior to measurements, nectar column height was recorded to the nearest 0.01 mm using digital calipers.

Results

Spur length and nectar properties. The flower longevity was very short, as the flowers typically started to wilt at the end of the 4th day (D4 stage). Spur length increased significantly over blossoming time to reach its maximum size on four-days-old flowers (D4 stage) ($F = 20.46$, $P = 0.0000$) (Table 1).

Nectar was produced starting with the first flowering day. Contrary to the spur length, its volume continuously decreased until the flowers wilted (column height: $F = 4.73$, $P = 0.0065$; nectar volume: $F = 4.91$, $P = 0.0057$) (Table 1). Nectar sugar concentration decreased identically with flower age, but sample sizes were too small to test the significance of this variation (Table 1).

Scent analysis. Day and night chromatograms showed approximately identical patterns, and were characterized by few volatiles (i.e. no more than six compounds) (Table 2). During the day, the global response was however clearly weaker (see abundance in Table 2), and one compound (methyl benzoate) was not detected. In both cases, indole was nevertheless the dominant peak by far (Table 2).

Breeding system. *Jumellea stenophylla* is clearly able to reproduce in the absence of pollinators. The fruiting success of bagged flowers reached 66.7 % (N = 21 flowers) in 2003, while fruit production in natural conditions was 77.5 % (N = 40 flowers). Fruit set however did not significantly differ whether pollinators were excluded or not ($\chi^2 = 0.835$, $P = 0.361$), suggesting that pollinators play a minor (if any) role in fruit production in natural conditions. In 2004, the natural fruit set (56.5 %, N = 23 flowers) was lower than in 2003, but no significant differences between years was detected ($\chi^2 = 0.815$, $P = 0.367$). None of the 54 additional observed flowers had removed pollinia in 2004.

Gynostem observations at the different flower stages revealed that autonomous self-pollinations started very early in the flower lifespan. Typically, pollinia fused onto the stigma after the rostellum dissolving, so that two-day-old flowers (D2 stage) exhibited already the “collapse” of the stigma, indicating that pollination had occurred. If self-pollinations were observed in all flowers, fruit development may then follow or not. In all the cases, flower lifespan lasted no more than five days.

Spur-proboscis interactions. Hawkmoth proboscis length varied from 13 mm in *Acherontia atropos* L. (SD = 0.0, N = 2) to 89.2 mm in *Agrius convolvuli* L. (SD = 12.9, N=9). Intermediate measures (in increasing order) were 18.0 mm for *Cephonodes hylas* L. (N= 1), 28.0 mm for *Macroglossum milvus* Boid. (N=1), 28.5 mm for *Hyles biguttata* Walk. (SD = 4.9, N = 2), 33.0 mm for *Hippotion celerio* L. (SD = 2.3, N = 5), 37.0 mm for *Euchloron megaera* L. (SD = 1.0, N = 3), 39.8 mm for *Hippotion eson* Cram. (SD = 4.0, N = 8), 41.8 mm for *Daphnis nerii* L. (SD = 1.7, N = 4), 53.9 for *Nephele densoi* Keferst. (N = 1), 56.5 mm for *Nephele oenopion* Hübn. (SD = 0.6, N = 4), and 81.0 mm for *Coelonia fulvinotata* Butl. (SD = 8.9, N = 5) (Fig. 3). Only two sphingid species (*A. convolvuli* and *C. fulvinotata*) have a proboscis length long enough to be able to reach the nectar in the orchid spur (Fig. 2).

The measurements of the proboscis width and the internal spur diameter revealed however that both of these long-tongued species had a proboscis too wide to be completely inserted into the orchid spur (Fig. 3A), and then to reach the nectar (Fig. 3B). As a result, none of the twelve studied sphingids are able to feed on *J. stenophylla* flowers.

Discussion

Floral traits. In our study, the different floral traits that may contribute to outcrossing success were investigated, namely flower longevity, nectar properties (volume, sugar concentration) and scent production. Compared with sphingid-pollinated orchids, the flower longevity was very short, as it lasted only four days. Flower lifespan of hawkmoth-pollinated *Mystacidium venosum* Harve ex. Rolf, for example lasted on average 24 days. The flower longevity was however reduced to only five days if the flower was pollinated, and 19 days if pollinia were removed (Luyt and Johnson 2001). In *J. stenophylla*, the shortened flower longevity seems to be due to the autonomous self-pollinations that occurred in all flowers.

J. stenophylla produced a relatively small amount of nectar (mean = 6.10 μ l, SD = 6.08, N = 9, D1 stage). For example, Nilsson et al. (1985) found a nectar production of 12.8 μ l in *Angraecum germinyanum* Hort.Sand. ex Hook.f. (reported as *A. arachnites* Schltr.), a long-spurred species from Madagascar which exhibits spurs similar or longer than *J. stenophylla* spurs. We observed that nectar volume decreased over flower lifespan. As any insect is thought to feed on nectar, an alternative hypothesis would be that the nectar may be resorbed by the flower. Nectar resorption has been already reported in some angraecoids (Koopovitz and Marchant 1998; Luyt and Johnson 2002). Luyt and Johnson (2002) for example, have shown that the resorption of nectar after pollination (and presumably its carbohydrate content) enhanced fruit size and seed viability of *Mystacidium venosum*. In *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb., sucrose originating from nectar resorption of pollinated flowers was found back in the initiated fruit (Stpiczyńska 2003). In *J. stenophylla*, sugar content decreased with nectar volume, suggesting that sucrose may be resorpted by the flowers. Further studies are nevertheless needed to quantify this trend. The nectar sugar concentration of *J. stenophylla* fell however within the range reported in other hawkmoth-pollinated angraecoids, which varied from 5 % to 24 % sugar in sucrose equivalents, with a mean value of 14.7 % (SD = 5.7; N=7) (data from Nilsson et al. 1985, 1987; Nilsson and Rabakonandrianina 1988; Luyt and Johnson 2001; Wasserthal 1997).

Orchid flower scent is known to have an important role in attracting pollinators at long distance. Sphingophilous orchids give off typically the “white floral” night-scents (Kaiser 1993), also emitted by jasmine, honeysuckle, tuberose, lilies, or *Gardenia* and night-scented *Nicotiana* species as well (Kaiser 1993). This “white floral” bouquet incorporates usually many different volatiles (up to one hundred) from different chemical classes, belonging mainly to acyclic terpene alcohols (primarily linalool, nerolidol, farnesol, including the

corresponding hydrocarbons), aromatic alcohol (particularly benzyl alcohol, phenylethyl alcohol, and derived esters), and nitrogenous compounds (such as indole and oximes) (Kaiser 1993; Raguso et al. 2003). Our results have shown that few compounds, however representative of “white floral” scents, constituted the floral bouquet of *J. stenophylla*, primarily dominated by indole. This latter compound is present in the majority of night-scent flowers, but at low concentrations, giving a pleasant “fresh floral” scent to the flowers. It could however be dominant at the very beginning of flowering, just before the flower would fully develop (typically the 3rd or 4th night after flower-opening) (Kaiser 1993). At high concentrations, indole confers an extremely aggressive odor, almost tarry-repulsive (Arctander 1994). Flower longevity of *J. stenophylla* was precociously shortened by autonomous self-pollinations. As a result, scent analysis were made on young flowers, of two or three-days old as a maximum. This may explain why indole was found as dominant compound, as it is typically the case of young night-scent flowers.

Self-pollination and pollinator services. All previous studies about pollination biology of long-spurred angraecoids have concerned only Malagasy species (Nilsson et al. 1985, 1987; Nilsson and Rabakonandrianina 1988; Wasserthal 1997). In these studies, long-spurred orchids were pollinator-dependent for sexual reproduction and were all hawkmoth-pollinated (see references above). The pollination biology of the genus *Jumellea* has been investigated only once (Nilsson et al. 1987). In Madagascar, *Jumellea teretifolia* Schltr. (with a spur length of about 12-13 cm) was pollinated by *Panogena lingens* Butl., a native hawkmoth with a proboscis averaging 10.5 cm in length (Nilsson et al. 1987). Our results have shown that autonomous self-pollinations occurred at a very high rate in *J. stenophylla*, and that the species did not require pollinators for successful reproduction. It has often been discussed (Baker 1967; Barrett 1996) and shown (Barrett and Shore 1987; Inoue et al. 1996) that selection for selfing may be strong during island colonization due to lack of mates and/or outcross pollen. Our study provides a novel illustration of this trend. Self-pollination is widespread in orchids, and its presence in many independent lineages indicates a convergent evolution (Catling 1990). It is however more common in terrestrial species than in epiphytic species (Dressler 1981). In *J. stenophylla*, the rostellum dissolving allows the germination of pollen grains very early during the development stage of the flower, and permits autonomous self-pollinations. As a result, pollinia removal seems impossible at any stages of the flower lifespan, corroborant our field observations. In the subtribe Angreacinae, such a phenomenon

has also been reported in *Angraecum borbonicum* Bosser, another selfing species endemic to Reunion (Bosser 1988).

Spur-proboscis interactions. Our results have shown that none of the 12 studied hawkmoth species of Reunion displayed optimum morphology to be able to feed on *J. stenophylla* nectar. On Reunion, *A. convolvuli* is the hawkmoth with the longest tongue. This species exhibits however differences in proboscis length, much more reduced on Reunion (mean = 89.2 mm, SD = 12.9, N=9) than on Madagascar (mean = 131.5 mm, N = 4) (data from Nilsson et al. 1985; Nilsson and Rabakonandrianina 1988). This hawkmoth has previously been reported to pollinate the long-spurred *Aerangis ellisii* (Rchb.f.) Schltr. (with a spur length of around 15.8 cm), a Malagasy angraecoid (Nilsson and Rabakonandrianina 1988), as other species elsewhere (e.g. Alexandersson and Johnson 2002).

Evolution from sphingophily to self-fertility ? The presence of autonomous self-pollination in *J. stenophylla* may be the result of different scenarios, either the Malagasy ancestor of *J. stenophylla* was selfing prior to Reunion colonization, or reproduction by autonomous self-pollination evolved in situ on Reunion. In the first case, self-pollination may have facilitated colonization and consecutive establishment of *J. stenophylla* populations on Reunion. Following the second scenario, the ancestor of *J. stenophylla* would have been hawkmoth-pollinated in Madagascar. The lack of specialized pollinators on Reunion may have led to autochthonous evolution through self-reproduction. Our results reinforce this hypothesis as we have shown that none of the current sphingids present on Reunion seems to act as pollinators. Moreover, self-reproduction is a recurrent phenomenon in long-spurred Reunion's species, as it occurred in all endemic species displaying spur length superior to 9 cm (i.e. *Angraecum cornigerum* Cordem., *Jumellea divaricata* Schltr., *J. exilis* Schltr., *J. recta* Schltr. and *J. recurva* Schltr.) (T. Pailler, unpublished data). Another scenario would be that specialized hawkmoth get extinct today.

Concluding remarks. Our study has shown that in the case of *J. stenophylla*, the sphingid-long-spurred orchid interaction was not present on Reunion. On the contrary, the species became independent of pollinator, as it is totally selfing. The evolution through self-reproductive system made the orchid totally attractiveness for hawkmoths (short flower lifespan, no attractive odor, and rewardless for actual reunionese sphingid species).

Pollination is not a limiting factor for the survival of *J. stenophylla*. However this epiphytic orchid seems likely to be host-specific with *Pandanus montanus* trees. Niche specificity is probably the most ecological constraint to the development of the species. For this endangered endemic species, the conservation of its habitat, especially *Pandanus* thickets, appears then primordial. It would be worthwhile for further studies to investigate and quantify this host-specificity pattern.

We thank the Ministère Français de l'Ecologie et du Développement durable (programme écosystèmes tropicaux) and the Région Réunion for financial support, Raphael Parnaudeau (Muséum d'Histoire Naturelle de La Réunion), Emmanuelle Revel and Emmanuelle Mahé for practical help, and John D. Thompson for useful comments on preliminary versions of the manuscript.

References

- Adams R. P. (2001) Identification of essential oil components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Alexandersson R., Johnson S. D. (2002) Pollinator mediated selection on flower tube length in a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proc. R. Soc. Lond. B.* 269: 631-636.
- Arctander S. (1994) Perfume and flavor chemicals (Aroma chemicals), vol. 1. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Baker H. G. (1967) Support for Baker's law - as a rule. *Evolution* 21: 853-856.
- Barrett S. C. H. (1996) The reproductive biology and genetics of island plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 351: 725-733.
- Barrett S. C. H., Shore J. S. (1987) Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Evolution* 41: 340-354.
- Bosser J. (1988). Contribution à l'étude des Orchidaceae de Madagascar et des Mascareignes. XXIII. *Adansonia* 1: 19-24.
- Cadet T. (1977) La végétation de l'île de la Réunion : étude phytoécologique et phytosociologique. PhD thesis, Université Aix Marseille III, Aix en Provence.
- Carlquist S. (1974) Island Biology. Columbia University Press, New York.
- Catling P. M. (1990). Auto-pollination in the Orchidaceae. In: Arditti J. (ed.) *Orchid biology, reviews and perspectives*, V. Timber Press, Portland.
- Darwin C. (1862) On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effect of intercrossing. John Murray, London.
- Darwin C. (1876). Effects of cross and self-fertilisation in the vegetable kingdom. John Murray, London.
- Dressler R. L. (1981) The orchids, natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge.
- du Puy D., Cribb P., Bosser J., Hermans J., Hermans C. (1999) The orchids of Madagascar. Royal Botanical Gardens, Kew, London.
- Ehrendorfer F. (1979) Reproductive biology in island plants. In: Bramwell D. (ed.) *Plants and islands*. Academic Press, London, pp. 293-306.
- Guillermet C., Guillermet C. W. W. (1986) Contribution à l'étude des papillons hétérocères de l'île de La Réunion: résultats des chasses de nuit à l'usage des amateurs et des débutants. Société Réunionnaise des Amis du Muséum, Saint Denis.
- Inoue K. (1990) Evolution of mating systems in island populations of *Campanula microdonta*: pollinator availability hypothesis. *Plant Species Biol.* 5: 57-64.

- Inoue K., Maki M., Masuda M. (1996) Evolution of *Campanula* flowers in relation to insect pollinators on islands. In: Lloyd D. G., Barrett S. C. H. (eds.) *Floral biology: Studies on floral evolution in animal pollinated plants*. Chapman and Hall, New York, pp. 377-400.
- Jain S. K. (1976) The evolution of inbreeding in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 7: 469-495.
- Kaiser R. (1993) *The scent of Orchids: olfactory and chemical investigations*. Roche, Basel.
- Koopowitz H., Marchant T. A. (1998) Postpollination nectar reabsorption in the African epiphyte *Aerangis verdickii* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 85: 508-512.
- Kovats E. (1965) Gas chromatographic characterization of organic substances in the Retention Index System. In: Giddings J. C., Keller R. A. (eds.) *Advances in chromatography*, vol. 1. Marcel Dekker, New York, pp. 229.
- la Croix I., la Croix E. (1997) *African orchids in the wild and in cultivation*. Timber Press, Portland.
- Lloyd D. G. (1985) Progress in understanding the natural history of New Zealand plants. *N. Z. J. Bot.* 23: 707-722.
- Lloyd D. G. (1992) Self- and cross-pollination in plants. II. The selection of self-fertilization. *Int. J. Plant Sci.* 153: 370-380.
- Luyt R., Johnson S. D. (2001) Hawkmoth pollination of the African epiphytic orchid *Mystacidium venosum*, with special reference to flower and pollen longevity. *Plant Syst. Evol.* 228: 49-62.
- Luyt R., Johnson S. D. (2002) Postpollination nectar reabsorption and its implications for fruit quality in an epiphytic orchid. *Biotropica* 34: 442-446.
- McDougall I., Chamalaun F. H. (1969) Isotopic dating and geomagnetic polarity studies on volcanic rocks from Mauritius, Indian Ocean. *Geol. Soc. Am. Bull.* 80: 1419-1442.
- McMullen C. K. (1987) Breeding systems of selected Galapagos Islands angiosperms. *Am. J. Bot.* 74: 1694-1705.
- Nilsson L. A. (1992) Orchid pollination biology. *Trends Ecol. Evol.* 7: 255-259.
- Nilsson L. A., Jonsson L., Ralison L., Randrianjohany E. (1987) Angraecoid orchids and hawkmoths in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica* 19: 310-318.
- Nilsson L. A., Jonsson L., Rason L., Randrianjohany E. (1985) Monophily and pollination mechanisms in *Angraecum arachnites* Schltr. (Orchidaceae) in a guild of long-tongued hawk-moths (Sphingidae) in Madagascar. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 91: 1-19.
- Nilsson L. A., Rabakonandrianina E. (1988) Hawk-moth scale analysis and pollination

- specialization in the epilithic Malagasy endemic *Aerangis ellisii* (Reichenb. fil.) Schltr. (Orchidaceae). Bot. J. Linn. Soc. 97: 49-61.
- Pailler T. (1997) L'hétérostylie dans l'archipel des Mascareignes: présence, maintien et évolution. PhD thesis, Université de La réunion, Saint Denis.
- Pailler T., Thompson J. D. (1997) Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Réunion Island. Am. J. Bot. 84: 315-327.
- Pailler T., Humeau L., Figier J., Thompson J. D. (1998) Reproductive trait variation in the functionally dioecious and morphologically heterostylous island endemic *Chassalia corallioides* (Rubiaceae). Biol. J. Linn. Soc. Lond. 64: 297-313.
- Perrier de la Bâthie H. (1939) Flore de Madagascar, 49° famille: Orchidées II. Tananative Imprimerie Officielle, Tananarive.
- Raguso R. A., Levin R. A., Foose S. E., Holmberg M. W., McDade L. A. (2003) Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination "syndromes" in *Nicotiana*. Phytochemistry 63: 265-284.
- Stpiczyńska M. (2003) Incorporation of [3H]sucrose after the resorption of nectar from the spur of *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb. Can. J. Bot. 81: 927-932.
- Roberts D. L. (2001) Reproductive biology and conservation of the Orchids of Mauritius. PhD thesis, University of Aberdeen, Aberdeen.
- Strasberg D., Rouget M., Richardson D. M., Baret S., Dupont J., Cowling R. M. (in press) An assessment of habitat diversity and transformation on La Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a basis for conservation planning. Biodivers. Conserv.
- Thompson J. D., Pailler T., Strasberg D., Manicacci D. (1996) Tristyly in the endangered Mascarene Island endemic *Hugonia serrata* (Linaceae). Am. J. Bot. 83: 1160-1167.
- van der Pijl L., Dodson C. H. (1966) Orchid flowers, their pollination and evolution. University of Miami Press, Coral Gables.
- Wasserthal L. T. (1997) The pollinators of the Malagasy star orchids *Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. Bot. acta 110: 343-359.
- Woodell S. R. J. (1979) The role of unspecialized pollinators in the reproductive success of Aldabran plants. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 286: 99-108.
- Zhang Z., Pawliszyn J. (1993) Headspace solid-phase microextraction. Anal. Chem. 65: 1843-1852.

Address of the authors: Claire Micheneau (e-mail: claire.micheneau@univ-reunion.fr),
Thierry Pailler, UMR 53 Peuplements Végétaux et Bio-Agresseurs en Milieu Tropical,
Université de La Réunion, 15 avenue René Cassin BP 7151, 97415 Sainte Clotilde Messag
Cedex 9, La Réunion, France. Jacques Fournel, Herbier Universitaire de La Réunion, 15
avenue René Cassin, BP 7151, 97415 Sainte Clotilde Messag Cedex 9, La Réunion, France.
Anne Gauvin, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments,
Université de La Réunion, 15 avenue René Cassin BP 7151, 97415 Ste Clotilde Messag
Cedex 9, La Réunion, France

Table 1. Mean $\pm$ SD (N) of spur length and nectar properties over flower lifespan. Letters indicate significant differences among flower stages (post hoc Bonferroni tests ($\alpha = 0.05$) performed after one way ANOVA).

	Flower stages				
	Bud	D1	D2	D3	D4
Spur length (mm)	84.3 $\pm$ 11.5 ^a (10)	114.6 $\pm$ 21.8 ^b (10)	128.5 $\pm$ 17.6 ^{bc} (16)	129.9 $\pm$ 4.1 ^{bc} (6)	137.9 $\pm$ 9.0 ^c (12)
Nectar					
Column height (mm)	–	41.7 $\pm$ 42.2 ^a (10)	26.2 $\pm$ 18.5 ^{ab} (16)	27.6 $\pm$ 15.3 ^{ab} (5)	3.2 $\pm$ 9.7 ^b (12)
Volume (μ L)	–	6.1 $\pm$ 6.1 ^a (9)	2.9 $\pm$ 3.2 ^{ab} (16)	1.6 $\pm$ 0.7 ^{ab} (4)	0.2 $\pm$ 0.8 ^b (12)
Sucrose (g/100g)	–	10.7 $\pm$ 1.3 (6)	9.2 $\pm$ 1.4 (2)	7.6 $\pm$ 1.8 (6)	5.2 (1)

Table 2. Headspace SPME volatiles of *J. stenophylla*.

Compounds	RRI ^a	% ^b		Peak abundance	
		Day	Night	Day	Night
Aromatic compounds					
<i>Aldehyde</i>					
Benzaldehyde	961	15.4	8.5	47 960	1 130 826
<i>Alcohol</i>					
Benzyl alcohol	1032	4.4	1.5	23 904	165 394
<i>Ester</i>					
Methyl benzoate	1091	–	1.15	–	239 023
Monoterpene					
<i>Alcohol</i>					
<i>cis</i> -Linalool oxide (pyranoid)	1174	6.0	0.3	37 030	2 289 073
Nitrogenous compounds					
Indole	1288	67.6	88.4	609 449	13 943 591
Unidentified compounds	–	6.6	0.2	44 851	70 038

^aRelative Retention Indices to C₈-C₂₂ n-alkanes on the SPB-5 column; ^bRelative percentages obtained from peak area on the SPB-5 column.

Fig. 1. Geographical distribution. **A.** Worldwide distribution of the genus *Jumellea* (dark zones). **B.** Repartition of *J. stenophylla* populations (dark zones) among remaining preserved habitats (light zones) on Reunion.

Fig. 2. Proboscis lengths of native hawkmoths (hatches bars) and variations of *J. stenophylla* spur length over its flower lifespan (black bars represent the nectar column height in the spur). Aa: *Acherontia atropos*, Ch: *Cenophodes hylas*; Mm: *Macroglossum milvus*; Hb: *Hyles biguttata*; Hc: *Hippotion celerio*; Em: *Euchloron megaera*; He: *Hippotion eson*; Dn: *Daphnis nerii*; Nd: *Nephele densoi*; No: *Nephele oenopion*; Cf: *Coelonia fulvinotata*; Ac: *Agrius convolvuli*; D1 to D4: one to four days-old flowers.

Fig. 3. Comparison between proboscis width of both *Agrius convolvuli* (N = 4) (black triangles) and *Coelonia fulvinotata* (N = 2) (white triangles) and spur internal diameter of *J. stenophylla* (N = 10, stage D1) (black squares). **A.** Entire proboscis morphology: points above the curve of *J. stenophylla* represent proboscis parts that are too thick to be inserted into the spur. **B.** Proboscis parts that could be inserted into the spur without friction. Note that proboscis lengths are then too small to reach the nectar in the spur.

Fig. 1

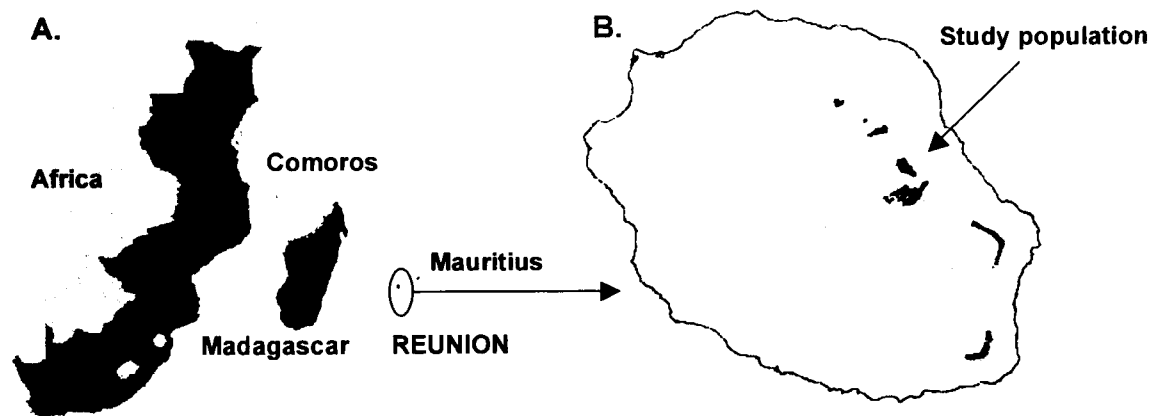


Fig. 2

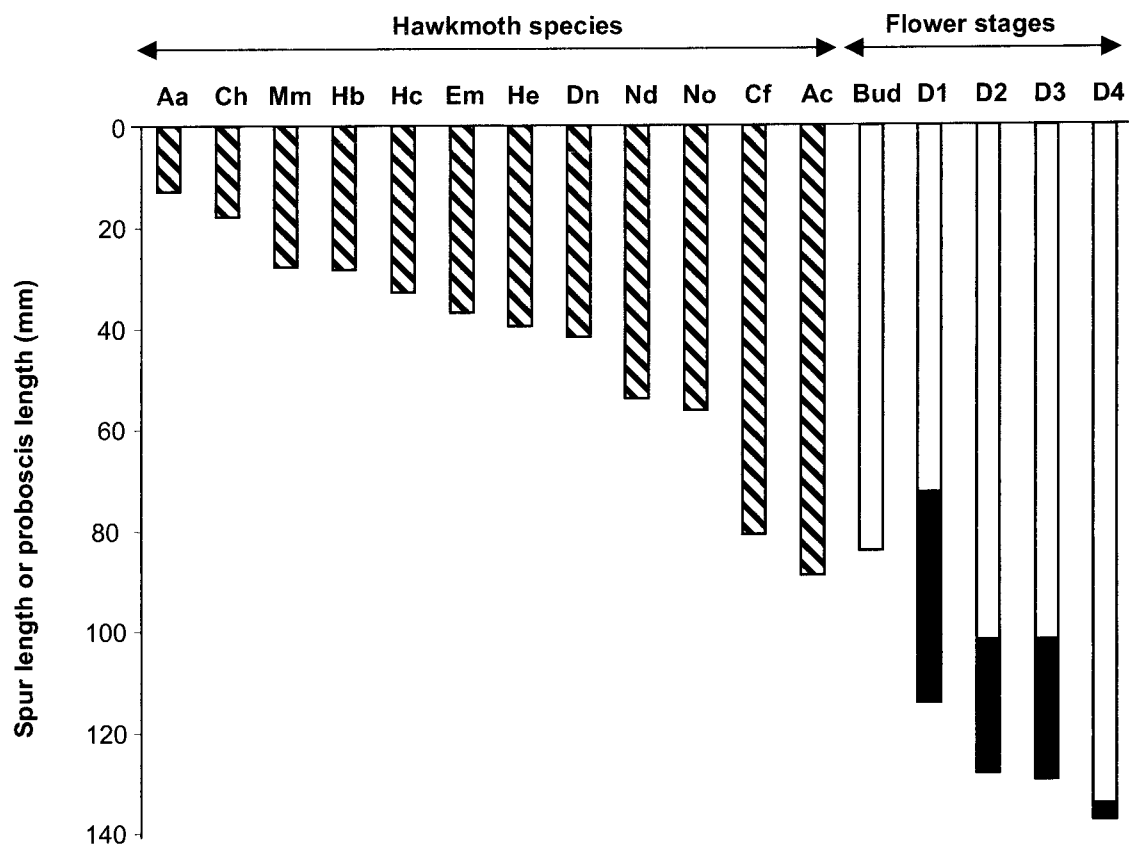
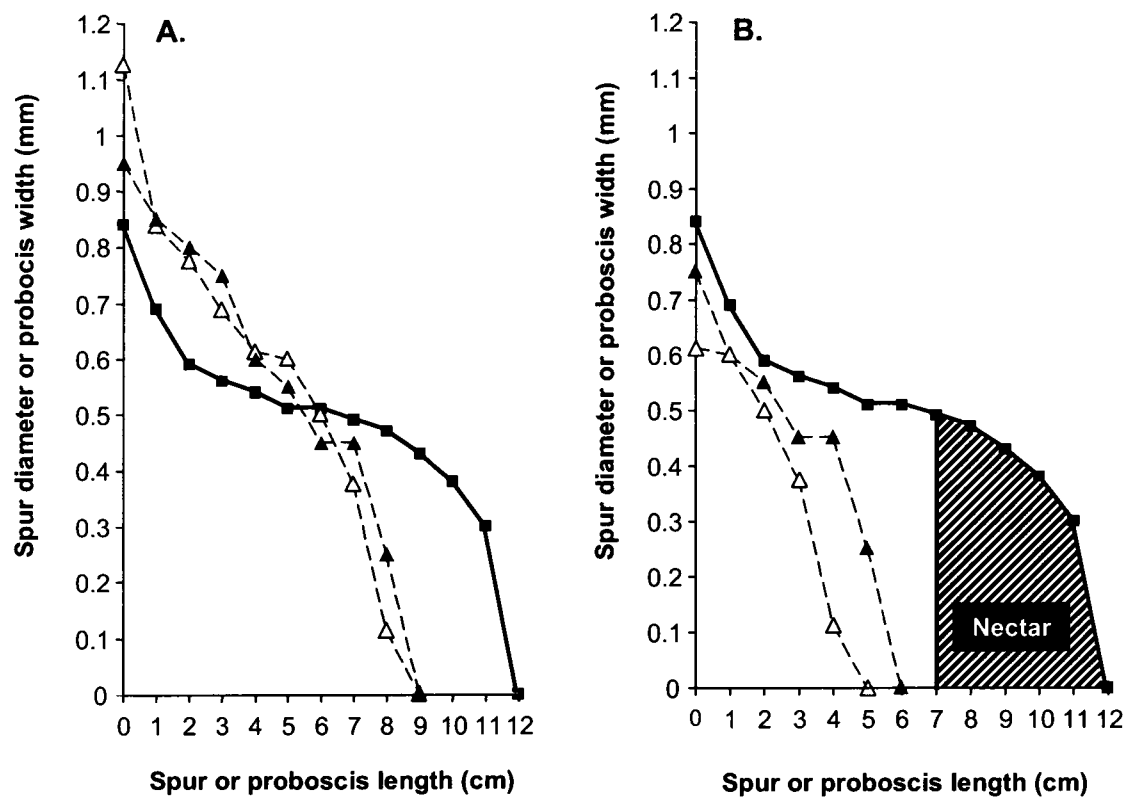
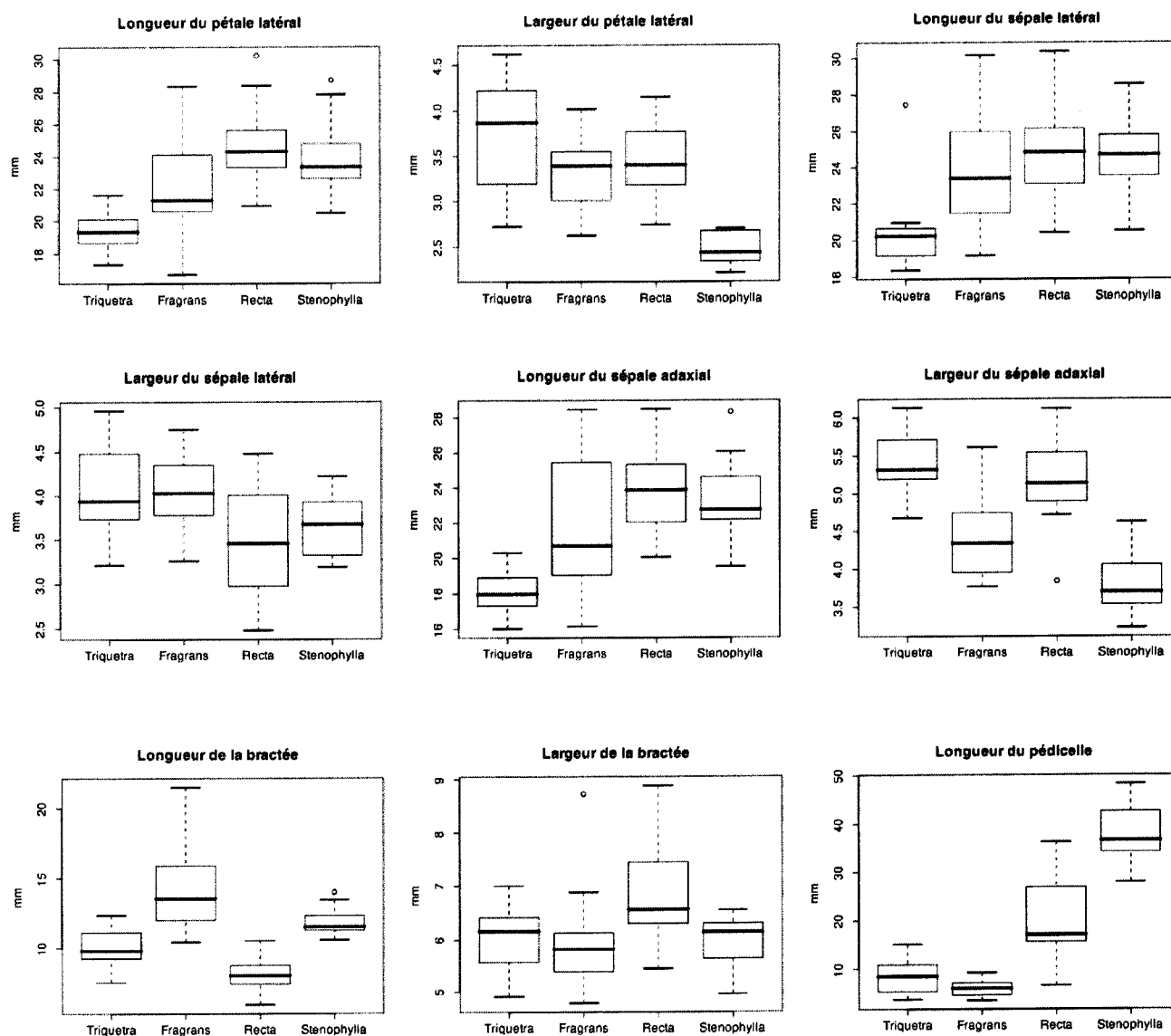


Fig. 3



ANNEXE 5



ANNEXE 5. Distribution des mesures des pièces florales non reproductives des espèces du genre *Jumellea* étudiées.

ANNEXE 6

**Bird pollination in an angraecoid orchid on Reunion Island (Mascarene Archipelago,
Indian Ocean)**

Claire Micheneau

UMR 53 Peuplements Végétaux et Bio-Agresseurs en Milieu Tropical, Université de La
Réunion, 15 avenue René Cassin BP 7151, 97415 Sainte Clotilde Messag Cedex 9, La
Réunion, France.

Tel: + 262 (0) 262 938 651 / Fax: + 262 (0) 262 938 119

E-mail: claire.micheneau@univ-reunion.fr

Number of figures: 3

Number of tables: 5

Abstract: 295 words

Text (including Acknowledgments): 4841 words

**Bird pollination in an angraecoid orchid on Reunion Island (Mascarene Archipelago,
Indian Ocean)**

CLAIRE MICHENEAU^{1,*}, JACQUES FOURNEL² and THIERRY PAILLER¹

¹ UMR 53 Peuplements Végétaux et Bio-Agresseurs en Milieu Tropical, Université de La Réunion, 15 avenue René Cassin BP 7151, 97415 Sainte Clotilde Messag Cedex 9, La Réunion, France; ² Herbar Universitaire de La Réunion, 15 avenue René Cassin, BP 7151, 97415 Sainte Clotilde Messag Cedex 9, La Réunion, France.

Bird pollination in an angraecoid orchid.

*Corresponding author: claire.micheneau@univ-reunion.fr

ABSTRACT

Background and Aims Although numerous angraecoid orchids display typical sphingophilous syndrome in Madagascar (i.e white nectariferous long-spurred flowers, producing a strong scent at the crepuscule attractive to moth), three species of *Angraecum* in Reunion, belonging to the endemic section *Hadrangis*, have atypical unscented and short-spurred flowers. The aim of the study was to investigate the implication of plant-pollinator interaction on the evolution of floral morphology of these peculiar island floral forms.

Methods We investigated the flower morphology of *A. striatum* (one of the three sect. *Hadrangis* species) by performing a set of floral measures, and the reproductive biology by a set of hand pollination experiments. Natural pollinators were observed by means of a video digital camera. Pollinator efficiency (pollen removal and deposition) and reproductive success (fruit set) was quantified once a week in natural field conditions during the 2005 flowering season (i.e. from Jan. to Mar.).

Key Results The orchid is self-compatible but requires a pollinator to achieve fruit set. Only one pollinator was observed, the endemic white-eye *Zosterops borbonicus* (Zosteropidae). These birds perched on inflorescences, and probed most fresh-looking flowers on each plant for nectar. Nectar was both abundant (averaging 7.7 μ L) and dilute (averaging 9.7% sugar in sucrose equivalents). Birds were mostly active between 8:30 h and 9:30 h. Visits to plants were extremely short, lasting from 9 to 27 seconds. At the study site, 60.9% of flowers had pollen removed, and 46.4% had pollinia deposited on stigmas. The proportion of flowers that initiated a fruit averaged 20.6% in natural conditions.

Conclusions For the first time, a bird-pollinated orchid is described from a subtribe that is mainly specialised for moth pollination. This study documents a morphological shift in flowers in response to pollinator adaptations in the insular context of the Mascarene Archipelago.

- 1 **Key words:** *Angraecum striatum*; Bird-pollination; Mascarenes; oceanic islands; Orchidaceae;
- 2 Reunion; white-eyes; Zosteropidae.
- 3

INTRODUCTION

Establishment of plant-pollinator interactions is one of the most intriguing investigations of evolutionary ecology. The study of bird-pollination systems has provided powerful models for understanding the consequences of pollinator shifts on floral trait evolution (i.e. floral morphology, colour, fragrance and reward properties) (Stiles, 1981; Bradshaw and Schemske, 2003; Fenster *et al.*, 2004), mainly because these cases are mostly derived from various forms of insect pollination (Stiles, 1981; Grant, 1993; Grant, 1994; Bradshaw and Schemske, 2003; Dupont *et al.*, 2004; Manning and Goldblatt, 2005). Bird-pollination is poorly represented in Orchidaceae (van der Pijl and Dodson, 1966; van der Cingel, 2001), which are predominantly insect-pollinated (Darwin, 1862; van der Pijl and Dodson, 1966; Dressler, 1981; Nilsson, 1992; van der Cingel, 2001). The rare examples of orchid pollinating birds are found in exclusively nectarivores, belonging mainly to hummingbirds (Trochilidae) in the New World (Dodson, 1962 cited in van der Pijl and Dodson, 1966; van der Pijl and Dodson, 1966; Rodríguez-Robles *et al.*, 1992; Singer and Sazima, 2000) and sunbirds (Nectariniidae) in South Africa (Johnson, 1996; Johnson and Brown, 2004). Bird-pollinated orchids show the usual convergent adaptations observed in other families of bird pollinated flowering plants (i.e. multi-flowered inflorescences of reddish, unscented, and short-spurred fleshy flowers) (van der Pijl and Dodson, 1966; van der Cingel, 2001). Most flowers have a narrow opening, restricted by a strong fold on the lip that forces a bird to push its beak against the column to reach the nectar in the spur. Unlike most angiosperms where the powder-like pollen is dispersed through a bird feathers, in Orchidaceae, smooth surfaces such as the beak (Catling, 1987; Rodríguez-Robles *et al.*, 1992; Johnson, 1996; Singer and Sazima, 2000) or even foot of a bird (Johnson and Brown, 2004) are the most suitable places for pollinarium attachment. These surfaces allow firm fixation of the large, strongly adhesive plate-like viscidia (Johnson, 1996; Singer in Sazima, 2000) typically found in ornithophilous orchids. In Orchidaceae, bird pollination is

1 particularly common in the high elevation Andean regions, where insects are rare and
 2 hummingbirds reach their greatest diversity (van der Pijl and Dodson, 1966; Dressler, 1971).
 3 Birds have been suggested to supplant insect pollinators where insect density is low, for
 4 example in high elevation ecosystems (van der Pijl and Dodson, 1966; Cruden, 1972;
 5 Hargreaves *et al.*, 2004), in cases of winter blooming species (Castro and Roberston, 1997;
 6 Anderson, 2003; Kunitake *et al.*, 2004) and on islands (Feinsinger *et al.*, 1982; Anderson *et*
 7 *al.*, 2001; Bernardello *et al.*, 2004; Dupont *et al.*, 2004) where the insect fauna is depauperate
 8 (Carlquist, 1974; Woodell, 1979; McMullen, 1987; Barrett, 1996; Anderson *et al.*, 2001).

9 Oceanic islands provide natural opportunities for studying the combined process of
 10 species dispersal, establishment, maintenance and speciation, not only because insular
 11 ecosystems are often simplified (less diverse biotic communities) compared with the mainland,
 12 but also because species evolve in closed, isolated, and reduced areas whose recent geological
 13 age is often known. Insular plants are frequently morphologically divergent from their
 14 continental relatives, showing a high level of speciation and spectacular adaptations (e.g.
 15 Carlquist, 1974; Baldwin, 1998; Oleson *et al.*, 1998; Lindqvist and Albert, 2002), including
 16 shifts in breeding systems (e.g. Baker, 1955; Carlquist, 1974; Barrett and Shore, 1987;
 17 McMullen, 1987; Barrett *et al.*, 1989; Barrett, 1996; Schultz and Ganders, 1996) and/or
 18 pollination systems (e.g. Carlquist, 1974; Weller *et al.*, 1995; Oleson and Valido, 2003). Given
 19 that available pollinator assemblages during both colonization and consecutive establishment
 20 are considered the major driving force in plant mating system evolution (e.g. Carlquist, 1974;
 21 McMullen, 1987; Barrett, 1996; Anderson *et al.*, 2001), morphological shifts in response to
 22 pollinator adaptations have been poorly investigated so far on the Mascarene Islands (Reunion,
 23 Mauritius, and Rodrigues). Reunion is the youngest island of the archipelago, having emerged
 24 approximately 3 million years ago (McDougall and Chamalaun, 1969). Among indigenous
 25 vascular plants, Orchidaceae represent the largest family, including approximately 130 species

1 (du Petit Thouars, 1822; Cordemoy, 1895; Roberts, 2001; see also Jacquemyn *et al.*, 2005).
2 *Angraecum* (Vandaeae, Angraecinae) is one of the most important genera, represented by 25
3 species of which 12 are endemic.

4 *Angraecum* is famed for the Malagasy star *A. sesquipedale*, which has a spur length of
5 c. 30 cm, and was predicted by Darwin in 1862 to be pollinated by an unknown long-tongued
6 hawkmoth. Although the predicted pollinator (*Xanthopan morganii* var. *praedicta*) was found
7 41 years later in the primary forests of Madagascar (Rothschild and Jordan, 1903), effective
8 pollination was only demonstrated 135 years after Darwin's prediction (Wasserthal, 1997).
9 Since the time of Darwin, angraecoid orchids have been associated with a sphingophilous
10 pollination syndrome (i.e. white flowers with long spurs, producing a strong scent at dusk
11 attractive to moths) (van der Pijl and Dodson, 1966). Despite the great number of species
12 belonging to *Angraecum* (c. 200 species, occurring mainly in Madagascar) (Garay, 1973; du
13 Puy *et al.*, 1999), few pollination studies have been reported. The rare investigations that have
14 been conducted on Malagasy orchids (Nilsson *et al.*, 1985; 1987; Wasserthal, 1997) have
15 focused exclusively on long-spurred *Angraecum* species, which exhibit a typical
16 sphingophilous syndrome. Floral morphology is nevertheless diverse within the genus,
17 suggesting varying pollination systems. Three species (*A. striatum*, *A. bracteosum* and *A.*
18 *cadetii*), endemic to the Mascarene Islands are particularly interesting since their flowers are
19 unscented and display short wide spurs. These features are sufficiently uncommon for white
20 flowers in the genus to prompt Bosser (1987) to revise sect. *Hadrangis* to comprise only these
21 three species. We therefore proposed that the atypical flower morphology of sect. *Hadrangis*
22 species resulted from specific adaptations to the local pollinator fauna, linked to the oceanic
23 island context of the Mascarene Archipelago.

24 The main objectives of this study were to (1) describe the flower morphology and
25 breeding system of *A. striatum*, a representative species of sect. *Hadrangis* (2) identify its

1 natural pollinators, and (3) quantify pollinator efficiency (pollen removal and deposition) and
 2 reproductive success (fruit set) in natural conditions.

4 MATERIALS AND METHODS

5 *Study site*

6 Reunion Island is located 800 km to the east of Madagascar (55°39'E; 21°00'S). It is a small
 7 island (c. 2500 km²) dominated by two volcanic massifs, one of which is still active (Piton de
 8 La Fournaise, 2619 m). The other (Piton des Neiges) rises to 3070 m and is the highest point
 9 in the Indian Ocean. Reunion presents a highly diverse ecosystem in terms of topography and
 10 climatic gradients. Since first settlement (c. 450 years ago), littoral and lowland habitats have
 11 been destroyed through human activities, but mountain vegetation has persisted in the rugged
 12 interior of the island. Today, 30% of the original vegetation still remains on Reunion
 13 (Strasberg *et al.*, in press), whereas less than 1% has been preserved on Mauritius (Strahm,
 14 1993). Our study site was located at 1150 m in the Bébou Massif, a cloud forest preserved in
 15 the centre of Reunion. This evergreen forest is characterized by a high diversity of native tree
 16 ferns and hardwood species, harboring many mosses, ferns and epiphytic orchids.

18 *Study species*

19 Our study was conducted within the 2005 flowering season on the endemic *A. striatum*, a
 20 monopodial epiphytic orchid relatively common in primary cloud forests, from 600 to 1600 m
 21 altitude. Flowering lasted about two months from the beginning of January to the end of
 22 February, with a flowering peak around the 20th of January. Plants usually produced 1-4 erect
 23 racemes of 1-10 white unscented flowers, fleshy in texture. Unpollinated flower lifespan is
 24 about 20 days. The spur is conical in shape, short (1 cm) and wide at the entrance (0.4 cm) and
 25 contains a large amount of visible nectar. The pollinarium consists of two hard, pale yellow

pollinia attached to a single viscidium by two distinct stipes. Pollinia removal and deposition are easily observable to the naked eye.

Floral measurements and nectar properties

In 2003 sixteen inflorescences, each from distinct plants, were collected and preserved in 70 % ethanol for morphological measurements. Three fully opened flowers were randomly chosen per sampled inflorescence and dissected for floral measurements. A total of 14 morphological characters were measured, of which 4 were inflorescence traits and 10 were floral features (Fig. 1). Measurements were made to the nearest 0.01 mm, using a Leica MZII stereomicroscope with a digital caliper.

Nectar properties were recorded on 47 unvisited flowers from 13 plants. For each flower, we measured nectar column height in the spur (distance between the tip of the spur and the level of nectar) to the nearest 0.01 mm using a digital caliper. We quantified nectar volume using calibrated 5 μ L capillary tubes. Nectar was then directly transferred to a hand refractometer (R5000, Atago, USA, Inc.), from which sugar concentration (g of sucrose equivalents per 100 g of solution) was determined using sucrose equivalent tables.

Breeding system

Hand pollination experiments were set up both *in situ* and *ex situ* to investigate the breeding system of *A. striatum*. *In situ* experiments were carried out on 23 inflorescences, each on distinct plants situated at the study site. Prior to flower anthesis, plants were first enclosed by fine-mesh nylon to exclude pollinators. Three treatments were performed: (1) no pollination, to detect this species' ability to set fruit in absence of pollinators (autonomous self-pollination) (13 inflorescences; 38 flowers), (2) self-pollinations to quantify self-compatibility (6 inflorescences; 24 flowers), (3) cross-pollinations (5 inflorescences; 16 flowers). Self-

pollinations were carried out by hand, pollinating flowers with their own two pollinia. Cross-pollinations were performed by hand, pollinating flowers with two pollinia from a distinct conspecific plant (at least 2 m distant). Bags were maintained till the end of the fruiting period to prevent predation.

The same sets of experiments were performed *ex situ* on 7 plants (10 inflorescences; 52 flowers) cultivated in a greenhouse, as follows: 25 flowers (10 inflorescences) were unmanipulated, 7 flowers (7 inflorescences) were self-pollinated and 6 flowers (5 inflorescences) were cross-pollinated.

In situ, one treatment was assigned on the whole inflorescence (i.e. all flowers of the inflorescence were either self-pollinated, cross-pollinated or unmanipulated). *Ex situ* however, the three different treatments were randomly assigned on the flowers of the same inflorescence (i.e. each inflorescence received the three treatments). Fruit set for each treatment was recorded four weeks after pollination, when capsules reached their maximum size. Comparison between self- and cross- pollination were performed using Fisher's exact tests with no prior alternative using R software (v 1. 10) for MacOSX (Iacus and Urbanek, 2005). Comparison between *in situ* and *ex situ* was not performed since bias would be introduced by (1) resource allocation (the number of pollinated flowers per inflorescence was not equal *in situ* or *ex situ*), (2) the fact that fruit development may be alter in the bagged plants (reduction of photosynthetic light).

Pollinator observations

Pollinator observations were performed using a video digital camera (Sony DCR-TRV16E camcorder with night shot option) fixed on a tripod, with power supplied by a generator situated at least 4 m from the study site to avoid noise disturbance. Observations were recorded on one-hour Fuji DVM60 tapes, replaced each hour, for intervals of 3 to 13 hours

(weather dependent) over 6 days and 4 nights. The camcorder was hidden in the forest, five metres from a patch of six individuals separated by less than two meters, and focused on one to five individuals each time (hereafter termed target individuals). Before and after each videotape session, each flower of the target individuals was examined for pollen removal and/or deposition. Dates, hours and sample size of each session are shown in Table 1.

Pollination success and fruit set at the population level

Once a week from 5 Jan. to 2 Mar. 2005 (i.e. 9 census dates), 38 additional individuals (N=422 flowers) were examined for purposes of determining male and female pollination success (respectively pollen removal and deposition). Fruit set in natural conditions was calculated by the proportion of tagged flowers that develop fruit.

Bird-pollinated orchids: literature background

In the purpose to compare morphological convergences in ornithophilous orchids, previous studies about bird-pollinated orchids were summarised by compelling information (if available) about orchid taxonomy (subfamily, tribe, subtribe), habit (epiphytic, terrestrial), locality (tropical, temperate), odour production, numbers of flowers per inflorescence, flower colour, spur length, nectar properties (volume and sugar concentration), pollen movement (pollinaria removal and deposition), and fruit set in natural conditions.

RESULTS

Floral measurements and nectar properties

Inflorescences displayed on average 5.1 flowers (SD=1.5; N=16). Floral parts (excluding the lip) showed little variation (Table 1). Nectar volume averaged 7.7 μ L per flower (SD=3.4; N=47) with a concentration of 9.7 % sugar in sucrose equivalents (SD=1.3; N=47).

1

2 *Breeding system*

3 None of the flowers tested for autonomous self-pollination produced fruit, either *in situ* or *ex*
 4 *situ*, suggesting that *A. striatum* requires a pollinating agent to set fruit (Table 2). However the
 5 species is self-compatible (Table 2) and there was no significant difference in fruit set between
 6 self-and cross- pollination treatments ($p=0.3295$ *in situ*; $p=1$ *ex situ*).

7

8 *Pollinator observations*

9 The only species recorded visiting *Angraecum striatum* were *Zosterops borbonicus* (White-
 10 eye, Zosteropidae) during the day and some unidentified cockroach species at night. However
 11 pollen movement was only recorded after bird visits. We observed *Z. borbonicus* on three
 12 consecutive days during flowering peak of the population. On these occasions pollen transfer
 13 by birds (i.e. pollinarium removal and deposition) was clearly observed. At the end of the first
 14 day 4 previously intact flowers had pollinaria removed, on the second day no pollen removal
 15 was observed although one flower was pollinated (Table 3).

16 Daily activity of the birds was regular, taking place only in the morning between 8:30 h and
 17 9:30 h. with an additional visit on the second day at 13:30 h (Fig. 3). Six visits in total were
 18 recorded (Table 3). The time of a plant visit varied from 9 to 27 seconds ($\bar{x}=15.3$; $SD=6.7$;
 19 $N=6$). White-eyes typically landed on a leaf or inflorescence and probed all “fresh looking”
 20 flowers within reach, starting often from lower flowers, and moving around the inflorescence
 21 rachis if necessary. During a visit, 2 to 10 flowers were probed ($\bar{x}=6.3$; $SD=2.7$; $N=6$), which
 22 represented 40% to 100% of opened flowers per plant. Birds rarely probed the same flower
 23 twice. They fed on nectar by inserting the beak into the large entrance of the spur (Fig. 2A). At
 24 the same time, they accumulated a large number of pollinaria on both the upper and lower base

of the beak (Fig. 2B). On one occasion, we observed an individual *Z. borbonicus* cleaning its beak on tree fern stipes to remove pollinaria.

Pollination and reproductive success at the population level

The rate of pollinarium removal was 60.9% (257/422 flowers) for the whole population (38 individuals), and pollen deposition was 46.4% (196/422 flowers). Pollination efficiency (deposition/removal) was high (76.2%). In natural conditions, the proportion of tagged flowers that set a fruit averaged 20.6% (87 initiated fruits/422 flowers).

Bird-pollinated orchids: literature background

The principal studies so far about bird-pollinated orchids, including this study, are summarized in Table 4. Within bird-pollinated orchids, morphological shifts in relation to functional interactions with birds are convergent, regardless of bird type (hummingbirds, sunbirds or white-eyes), orchid subfamily (Epidendroideae, Orchidoideae, the latter including Spiranthoideae; Chase *et al.*, 2003), habit (epiphytic or terrestrial) and distribution (tropical or temperate). All bird-pollinated orchids show multi-flowered inflorescences of short-spurred flowers (less than 2.5 cm long) lacking a detectable odour (see Table 4). The majority of bird-pollinated orchids also display vividly coloured flowers, but the flowers of *A. striatum* are pure white.

DISCUSSION

Floral morphology and nectar properties

Except colour flower segments (pure white), flower morphology of *A. striatum* matches with orchid bird pollination syndrome. According to Johnson and Steiner (2000), convergences in floral features are limited by phylogenetic constraints. Many examples have also shown that

flower colour is not necessarily correlated with pollination syndrome (e.g. Waser *et al.*, 1996; Momose *et al.*, 1998, Ollerton, 1998; Johnson and Steiner, 2000). Flower colour within Angraecinae may be a conservative character. In contrast, spur length and fragrance production have evolved quickly with pollinator pressure. In Orchidaceae, spur is reported to be under pollinator directional selection (Inoue, 1986; Nilsson, 1988; Johnson and Steiner, 1997; Johnson *et al.*, 1998; Ellis and Johnson, 1999; Tremblay *et al.*, 2005), although this is not always the case (see Maad, 2000 and Luyt and Johnson, 2001). The value of spur length as a character for discriminating section or species (as has historically been the case within *Angraecum*, Perrier de la Bâthie, 1941; Garay, 1973) reaches its taxonomic limit in this study. Although there is no heavy callus on the lip of *A. striatum*, beak and spur morphologies appear to have a narrow optimum for efficient pollination. The bills of *Z. borbonicus* match perfectly with flower entrance diameter and are suitable for both extracting nectar and performing pollination (bill: 3.7 mm in basal diameter, 11.6 mm in length) (Gill, 1971; M Lecorre, Université de la Réunion, France, unpubl. res.).

Nectar of bird-pollinated flowers is typically abundant and dilute compared with the nectar of insect-pollinated species (Baker, 1975; Bolten and Feinsinger, 1978; Proctor *et al.*, 1996; Pyke and Waser, 1981; Nicolson, 2002; Dupont *et al.*, 2004; Manning and Goldblatt, 2005). Nectar volume and concentration average (and range), respectively, 5.4 μ L (2.7-11.7) and 20.3% (9.9-31.2) sugar in sucrose equivalents. The nectar of *A. striatum* was both more abundant and more dilute than the average volume and concentration for ornithophilous orchid. Recent studies (e.g. Nicolson, 2002) have shown that nectar dilution differs between flowers visiting by hummingbirds and other passerine flower-feeding birds. Dilution seems closely correlated with nectar sugar constituents due to sugar osmotic properties: composite sugars (i.e. sucrose) are predominant in low-dilution nectar, whereas simple hexose sugars are found in high-dilution nectar. Differences in nectar sugar chemistry are strongly correlated with

physiological properties inherent in each pollinator group (Baker and Baker, 1983; Baker *et al.*, 1998; Nicolson, 2002; Nicolson and Fleming, 2003; Dupont *et al.*, 2004). Thus, insects and hummingbirds are able to digest complex sugars such as sucrose, whereas generalist passerine birds are only able to digest simple hexose sugar (e.g. Martinez del Rio *et al.*, 1992). Dupont *et al.* (2004) also found a correlation between nectar composition and pollination system (entomophily vs. ornithophily), but contrary to the traditional view that nectar composition is a conservative trait, it was evolutionarily labile among Canarian bird-pollinated flowers. We did not investigate the components making up the sugar of *A. striatum*, but it would be worthwhile for further studies to compare nectar composition between bird- and insect-pollinated species of *Angraecum* in the Mascarenes. The nectar of the sphingophilous *A. sesquipedale* was however more concentrated (16.5% sugar in sucrose equivalents; Wasserthal, 1997) than the nectar of *A. striatum* (9.7% sugar in sucrose equivalents), suggesting differences in sugar composition.

Bird-orchid interactions

Although around 50 bird families have been reported as flower visitors (Proctor *et al.* 1996), three major avian radiations are involved independently in specialized nectar diet: hummingbirds (Trochilidae) in the New World, sunbirds (Nectariniidae) in the Old World (primarily Africa) and honeyeaters (Meliphagidae) in Australasia (van der Pijl and Dodson, 1966; Wolf *et al.*, 1975; Stiles, 1981; Proctor *et al.*, 1996, Anderson, 2003). Although hummingbirds and sunbirds have been reported definitively as orchid pollinators (e.g. van der Pijl and Dodson, 1966; Rodríguez-Robles *et al.*, 1992; Singer and Sazima, 1994; Johnson, 1996; Johnson and Brawn, 2004), reports of pollination by honeyeaters are mostly anecdotal (see van der Pijl and Dodson, 1966; van der Cingel, 2001). In this study, a bird species outside these three main nectarivorous groups (*Zosterops borbonicus*) has been unambiguously

observed. The family Zosteropidae (white-eyes) includes around 100 species of small arboreal songbirds (Gill, 1971; Slikas *et al.*, 2000) with a widespread distribution throughout the Old World tropics and subtropics. White-eyes have colonized more oceanic islands than any other passerine family (Moreau, 1964, cited in Gill, 1971). Although some species of white-eyes play an important role in plant pollination (Gill, 1971; Proctor *et al.*, 1996; Kunitake *et al.*, 2004) white-eyes have a generalist diet which includes fruit, insects and nectar (Gill, 1971).

Zosterops borbonicus is endemic to the Mascarenes (two subspecies are reported, *Z. b. mauritianus* in Mauritius, and *Z. b. borbonicus* in Reunion.). On Reunion, it is one of the most common passerine birds (465, 000 individuals were estimated in 1983, Barau *et al.*, 2005), occurring over the whole island from sea level to 2300 m, with a large habitat range including both primary forests and inhabited disturbed human zones. *Zosterops borbonicus* has a generalist diet, including nectar, seeds, fruits and insects. However it has been reported visiting the flowers of more than 40 species of indigenous and introduced species (see Table 5).

Angraecum striatum in turn seems to have only one pollinator. Orchids are known for their high pollinator specificity (Tremblay, 1992; Johnson and Steiner, 2000; Tremblay *et al.*, 2005), and about 60% of species have only one recorded pollinator (Tremblay, 1992). This specialization maximizes the efficiency of pollination (Nilsson, 1992), but results in reproduction often being strongly limited by pollinators (Tremblay *et al.*, 2005), making orchids more dependent on their pollinators than the reverse (Nilsson, 1992 ; Roberts, 2003). Pollinator limits seem to have played an important role in the extraordinary diversification of the family (see Tremblay *et al.*, 2005). In long-tongued hawkmoth-pollinated *Angraecum*, such an asymmetric pollination system is evident. For example, *Angraecum arachnites*, was exclusively pollinated by *Panogena lingens* (Sphingidae), even through many potential pollinators were abundant in the vicinity of the orchid. This hawkmoth in turn was an effective pollinator of several long-spurred orchid species (Nilsson *et al.*, 1985).

Orchids reported as bird-pollinated however generally share several species of the local avifauna. *Stenorrhynchos lanceolatus*, for example is pollinated by three different hummingbirds in southern Brazil (Singer and Sazima, 2000), and *Satyrium* species are often pollinated by two or more sunbirds in South Africa (Johnson, 1996). *Zosterops borbonicus* was the only observed pollinator of *A. striatum*, although another species of endemic white-eye, *Z. oliveaceus*, is present in Reunion. The almost exclusively nectar diet of *Z. oliveaceus* (Gill, 1971) makes it a good candidate pollinator of *A. striatum* or the two others species of *Angraecum* sect. *Hadrangis*, which display the same ornithophilous flower characteristics. We did not observe *Z. oliveaceus* on *A. striatum*; however this species is less abundant than *Z. borbonicus* (Gill, 1971).

Zosterops borbonicus behaviour

Birds were mainly active in the morning, between 8:30 h and 9:30 h, which mostly agrees with previous reports of bird-pollinated orchids (e.g. Johnson, 1996: visits occurred between 9:00 h and 10:00 h; Johnson and Brown, 2004: visits mainly occurred from 7:00 h to 9:30 h; but Singer and Sazima, 2000: visits occurred between 10:00 h and 16:35 h). Similarly to hummingbirds (Singer and Sazima, 2000) and sunbirds (Johnson, 1996; Johnson and Brown, 2004), white-eyes probed the majority of fresh-looking flowers on plants when foraging. As *A. striatum* is self-compatible, self-pollination (*sensu stricto* or through geitonogamy) could be expected to result from the bird's behaviour on the inflorescences. According to Singer and Sazima (2000), although self-pollinations may occur in *Stenorrhynchos lanceolatus*, chances of cross-pollination are enhanced by the granular texture of the pollinaria (from one pollinaria removal, many pollination events may follow) and the fact that birds visit several inflorescences. Moreover they estimated that pollinaria may remain up to 6h30 on the bird's bill. Similarly, Johnson (1996) highlighted the firm attachment of *Satyrium* pollinaria on a

birds' bill due to specific properties of these large and firmly adhesive viscidia. Firm fixation was thought to prevent pollinarium removal by birds when grooming. We could also suggest that strong adherence would at the same time reduce self-pollination. Long periods of pollinarium attachment facilitated by strongly adherent viscidia seem to occur in *A. striatum*. Even if we failed to detect significant consequences of either self- or cross-pollinations on fruit set, it would be worthwhile to quantify the degree of geitonogamy among the population.

In our study, plant visits by bird were extremely brief as it has also been observed in the hummingbird-pollinated *Stenorrhynchos lanceolatus* (Singer and Sazima, 2000). Van der Pijl and Dodson (1966) highlighted the difficulties of observing bird pollination due to their furtive behaviour. In this context, bird pollination in orchids may be underestimated due to the brevity of their visits and difficulty of observations. During the last three years, we have repeated intensive field observations but did not observe any visitors to orchid flowers. Videotape observations offer a method of observing visitation to flowers without the presence of humans altering bird behaviour.

Pollination and fruiting success

Within the 2005 flowering season 60.9% of flowers experienced pollen removal, and 46.4% had pollinia deposited on their stigma. For comparison, removal (and deposition) rates ranged from 28.1% (22.3%) (Rodríguez-Robles *et al.*, 1992) to 74.7% (94.1%) (Singer and Sazima, 2000) in hummingbird-pollinated orchids and average 38% (25.9%) in sunbird-pollinated orchids (Ellis and Johnson, 1999) (Table 4). Although pollination rate was high, proportion of flowers that initiated fruit was only 20.6%, suggesting high failure in fruit development. If reproductive success is strongly pollen-limited in Orchidaceae (see Tremblay *et al.*, 2005 for more references), resource limitation should also be considered (Sabat and Ackerman, 1996), especially over the lifetime of a species (e.g. Zimmerman and Aide, 1989; Ackerman and

Montalvo, 1990; Mélen-dez-Ackerman *et al.*, 2000). During our study we noted a spectacular rate of flower abortion, which reached 45.7% in the population. As reproduction limits were not the subject of this study, we are unable to discuss fruit and flower abortions. More studies, focusing precisely on predation and resource allocation, are needed.

Fruit production (20.6%) was however closed to the general mean reported recently for tropical orchids (17%) (Tremblay *et al.*, 2005). Compared with other bird-pollinated orchids, fruit set was however inferior (20.6% vs. 59.6%), but close to the hummingbird-pollinated *Comparettia falcata* (18.1%), which shares both the epiphytic habit and a tropical distribution (Rodríguez-Robles *et al.*, 1992).

During our study, birds were active within the whole population of *A. striatum*, 84% of the sampled individuals had at least one flower with its pollinarium removed, while 87% had at least one flower pollinated. However, 47% of the individuals in the population failed to set fruit, which is close to the range of 50-60% reported by Tremblay *et al.* (2005) for tropical orchids.

Evolution from sphingophily to ornithophily?

The extraordinary number and diversity of long-spurred Angraecinae in Madagascar have been explained by their long-term evolution with long-tongued Sphingidae fauna, archaic relationships that have persisted in the relatively stable environment of the isolated island (Nilsson *et al.*, 1985). In most cases, islands are colonized from mainland areas, even if rare examples of the reverse are known (e.g. Nilcholson *et al.*, 2005). The flora of Reunion has been reported to originate primarily (> 80 % of native taxa) from Madagascar and Africa (Cadet 1977). Ongoing phylogenetic investigations, inferred from plastid DNA sequences (C Micheneau, Université de la Réunion, France; M Fay, RBG Kew, UK; M Chase, RBG Kew, UK; B Carlsward, University of Florida, USA; T Pailler, Université de la Réunion, France ,

unpubl. res.) show that section *Hadrangis* has its closest relatives in section *Humblotiangraecum* (Madagascar and Comoros), which flowers exhibit the sphingophilous syndrome. Following the hypothesis of colonization from Madagascar, sect. *Hadrangis* would have had a sphingophilous-like form when it colonized the Mascarenes. Today, some long-spurred Angraecinae are present on Reunion. However all endemic species that exhibit flowers with spurs longer than 9 cm have become totally independent of pollinators, and are able of autonomous self-pollinations, indicating that the interactions with sphingids has been lost in these long-spurred angraecoids (T Pailler and C Micheneau, Université de la Réunion, France, unpubl. res.; see Jacquemyn *et al.*, 2005 for a discussion about autogamy in orchids from Reunion).

Bird-pollination is considered to be a widespread phenomenon among insular plants (e.g. Anderson *et al.*, 2001; Anderson, 2003). To compensate for the general scarcity of island insects, insect-feeding vertebrates often include nectar and fruits in their diet (Olesen and Valido, 2003; Dupont *et al.*, 2004). According to Dupont *et al.* (2004), "insular flowers may have evolved directionally in response to opportunist flower-visiting birds even though these pollinators are not thought to drive evolution in mainland flora." On Reunion, if *Z. borbonicus* is an opportunist, the presence of the nectar-specialized *Z. oliveaceus* may have played a precursor role in the establishment of *Zosterops-Angraecum* interactions. According to Gill (1971), *Z. oliveaceus* is believed to have colonized the Mascarene Archipelago before *Z. borbonicus*. We could then hypothesize that specialization through nectar feeding of *Z. oliveaceus* coevolved with sect. *Hadrangis* adaptation to ornithophily. We expect then to observe *Z. oliveaceus* as pollinator of at least one species of sect. *Hadrangis*. More studies are needed to test this hypothesis. Nevertheless, the original case of bird-pollinated *Angraecum* developed in this study illustrates once again both the singularity of insular ecosystems and the fascinating ability of orchids for pollinator adaptation.

1
2
3
4
5
6
7

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mark W Chase, as well as two anonymous referees for useful comments on preliminary versions of the manuscript, and Alain Brondeau (Office National des Forêts) for material support. This work was support by the Ministère Français de l'Ecologie et du Développement Durable (Écosystèmes Tropicaux) and the Région Réunion.

LITERATURE CITED

- 1
- 2 **Ackerman JD, Montalvo AM. 1990.** Short- and long-term limitations to fruit production in a
- 3 tropical orchid. *Ecology* **71**: 263-272.
- 4 **Anderson GJ, Bernardello G, Stuessy TF, Crawford DJ. 2001.** Breeding system and pollination of
- 5 selected plants endemic to Juan Fernández Islands. *American Journal of Botany* **88**: 220-233.
- 6 **Anderson SH. 2003.** The relative importance of birds and insects as pollinators of the New Zealand
- 7 flora. *New Zealand Journal of Ecology* **27**: 83-94.
- 8 **Baldwin BG. 1998.** Evolution in the endemic Hawaiian Compositae. In: Stuessy TF, Ono M,
- 9 eds. *Evolution and speciation of island plants*. Cambridge: Cambridge University
- 10 Press, 49-73.
- 11 **Baker HG. 1955.** Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution* **9**:
- 12 347-348.
- 13 **Baker HG. 1975.** Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* **7**: 37-41.
- 14 **Baker HG, Baker I. 1983.** Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones CE
- 15 and Little RL, eds. *Handbook of experimental pollination ecology*. New York: Van Nostrand
- 16 Reinholdt, 117-141.
- 17 **Baker HG, Baker I, Hodges SA. 1998.** Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds
- 18 and bats in the tropics and subtropics. *Biotropica* **30**: 559-586.
- 19 **Barau A, Barré N, Jouanin C. 2005.** *Oiseaux de La Réunion*. Paris: Orphie.
- 20 **Barrett SCH, Shore JS. 1987.** Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia*
- 21 complex (Turneraceae). *Evolution* **41**: 340-354.
- 22 **Barrett SCH, Morgan MT, Husband BC. 1989.** The dissolution of a complex polymorphism: the
- 23 evolution of self-fertilization in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution*
- 24 **43**: 1398-1416.
- 25 **Barrett SCH. 1996.** The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical*

- 1 *Transactions of the Royal Society of London Series B* **351**: 725-733.
- 2 **Bernardello G, Aguilar R, Anderson GJ. 2004.** The reproductive biology of *Sophora*
- 3 *fernandeziana* (Leguminosae), a vulnerable endemic species from Isla Robinson Crusoe.
- 4 *American Journal of Botany* **91**: 198-206.
- 5 **Bolten AB, Feinsinger P. 1978.** Why do hummingbird flowers secrete dilute nectar? *Biotropica* **10**:
- 6 307-309.
- 7 **Bosser J. 1987.** Contribution à l'étude des *Orchidaceae* de Madagascar et des Mascareignes. XXII.
- 8 *Adansonia* **3**: 249-254.
- 9 **Bradshaw HD, Schemske DW. 2003.** Allele substitution at a flower colour locus produces a
- 10 pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* **426**: 176-178.
- 11 **Cadet T. 1977.** *La végétation de l'île de la Réunion : étude phytoécologique et*
- 12 *phytosociologique*. PhD thesis. Université Aix Marseille III.
- 13 **Carlquist S. 1974.** *Island Biology*. New York: Columbia University Press.
- 14 **Castro I, Robertson AW. 1994.** Honeyeaters and the New Zealand forest flora: the utilisation and
- 15 profibility of small flowers. *New Zealand Journal of Ecology* **21**: 169-179.
- 16 **Catling PM. 1987.** Notes on the breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aublet) Garay
- 17 (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **74**: 58-68.
- 18 **Chase MW, Cameron K, Barrett RL, Freudenstein JV. 2003.** DNA data and Orchidaceae
- 19 systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Barrett RL and Cribb P, eds.
- 20 *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publication (Borneo). 69-89.
- 21 **Cordemoy EJ. 1895.** *Flore de l'île de La Réunion*. Paris: Klincksieck.
- 22 **Cruden RW. 1972.** Pollinators in high-elevation ecosystems: relative effectiveness of birds and bees.
- 23 *Science* **176**: 1439-1440.
- 24 **Darwin C. 1862.** *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by*
- 25 *insects, and on the good effect of intercrossing*. London: John Murray.

- 1 **Dressler RL. 1971.** Dark pollinia in hummingbird-pollinated orchids or do hummingbirds suffer from
2 strabismus? *The American Naturalist* **105**: 80-83.
- 3 **Dressler RL. 1981.** *The orchids, natural history and classification*, Cambridge: Harvard University
4 Press.
- 5 **du Petit-Thouars AA. 1822.** *Histoire Particulière des Plantes Orchidées recueillies sur les trois îles*
6 *australes d'Afrique*. Paris: L'auteur, Arthus Bertrand, Treuttel & Wurtz.
- 7 **du Puy D, Cribb P, Bosser J, Hermans J, Hermans C. 1999.** *The orchids of Madagascar*. London:
8 Royal Botanical Gardens.
- 9 **Dupont YL, Hansen DM, Rasmussen JT, Olesen JM. 2004.** Evolutionary changes in nectar sugar
10 composition associated with switches between bird and insect pollination: the Canarian bird-
11 flower element revisited. *Functional Ecology* **18**: 670-676.
- 12 **Ellis AG, Johnson SD. 1999.** Do pollinators determine hybridization patterns in sympatric *Satyrion*
13 (Orchidaceae) species? *Plant Systematics and Evolution* **219**: 137-150.
- 14 **Feinsinger P, Wolfe JA, Swarm LA. 1982.** Island ecology: reduced hummingbird diversity and the
15 pollination biology of plants, Trinidad and Tobago, West Indies. *Ecology* **63**: 494-506.
- 16 **Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thompson JD. 2004.** Pollination syndromes
17 and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **35**: 375-403.
- 18 **Garay LA. 1973.** Systematics of the genus *Angraecum* (Orchidaceae). *Kew Bulletin* **28**: 495-516.
- 19 **Gill FB. 1971.** Ecology and evolution of the sympatric Mascarene white-eyes, *Zosterops borbonica*
20 and *Zosterops oliveacea*. *The Auk* **88**: 35-60.
- 21 **Grant V. 1993.** Origin of floral isolation between ornithophilous and sphingophilous plant species.
22 *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**: 7729-7733.
- 23 **Grant V. 1994.** Historical development of ornithophily in the western North America flora.
24 *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 10407-1010411.
- 25 **Hargreaves AL, Johnson SD, Nol E. 2004.** Do floral syndrome predict specialization in plant

- 1 pollination systems? An experimental test in an "ornithophilous" African *Protea*. *Oecologia*
- 2 **140**: 295-301.
- 3 **Iacus SM, Urbanek S. 2005.** R Cocoa GUI 1.10. © R Foundation for Statistical Computing.
- 4 **Inoue K. 1986.** Experimental studies on male and female reproductive success: effects of variation in
- 5 spur length and pollinator activity on *Platanthera mandarinorum* spp. *Hachijoensis*
- 6 (Orchidaceae). *Plant Species Biology* **1**: 207-215.
- 7 **Jacquemyn H, Micheneau C, Roberts DL, Paillet T. 2005.** Elevation gradients of species diversity,
- 8 breeding system and floral traits of orchid species on Réunion Island. *Journal of Biogeography*
- 9 **32**: 1751-1761.
- 10 **Johnson SD. 1996.** Bird pollination in South African species of *Satyrium* (Orchidaceae). *Plant*
- 11 *Systematics and Evolution* **203**: 91-98.
- 12 **Johnson SD, Steiner KE. 1997.** Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in
- 13 the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). *Evolution* **51**: 45-53.
- 14 **Johnson SD, Linder HP, Steiner KE. 1998.** Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa*
- 15 (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **85**: 402-411.
- 16 **Johnson SD, Steiner KE. 2000.** Generalization versus specialization in plant pollination systems.
- 17 *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 140-143.
- 18 **Johnson SD, Brown M. 2004.** Transfer of pollinaria on bird's feet: a new pollination system in
- 19 orchids. *Plant Systematics and Evolution* **244**: 181-188.
- 20 **Kunitake YK, Hasegawa M, Miyashita T, Higuchi H. 2004.** Role of seasonally specialist bird
- 21 *Zosterops japonica* on pollen transfer and reproductive success of *Camellia japonica* in a
- 22 temperate area. *Plant Species Biology* **19**: 197-201.
- 23 **Lindqvist C, Albert VA. 2002.** Origin of the Hawaiian endemic mints within North America *Stachys*
- 24 (Lamiaceae). *American Journal of Botany* **89**: 1709-1724.
- 25 **Luyt R, Johnson SD. 2001.** Hawkmoth pollination of the African epiphytic orchid *Mystacidium*

1 *venosum*, with special reference to flower and pollen longevity. *Plant Systematics and*
 2 *Evolution* **228**: 49-62.

3 **Maad J. 2000.** Phenotypic selection in hawkmoth-pollinated *Platanthera bifolia*: targets and fitness
 4 surface. *Evolution* **54**: 112-123.

5 **Manning JC, Goldblatt P. 2005.** Radiation systems in the Cape genus *Tritoniopsis* (Iridaceae:
 6 Crocoideae) and the development of bimodal pollination strategies. *International Journal of*
 7 *Plant Sciences* **166**: 459-474.

8 **Martinez del Rio C, Baker HG, Baker I. 1992.** Ecological and evolutionary implications of
 9 digestive processes: bird preferences and the sugar constituents of floral nectar and fruit pulp.
 10 *Experientia* **48**: 544-551.

11 **McDougall I, Chamalaun FH. 1969.** Isotopic dating and geomagnetic polarity studies on volcanic
 12 rocks from Mauritius, Indian Ocean. *Geological Society of America Bulletin* **80**: 1419-1442.

13 **McMullen CK. 1987.** Breeding systems of selected Galápagos Islands angiosperms. *American*
 14 *Journal of Botany* **74**: 1694-1705.

15 **Meléndez-Ackerman EJ, Ackerman JD, Rodríguez-Robles JA. 2000.** Reproduction in an orchid
 16 can be resource-limited over its lifetime. *Biotropica* **32**: 282-290.

17 **Momose K, Yumoto T, Nagamitsu T, Kato M, Nagamasu H, Sakai S, Harrison RD, Itioka T,**
 18 **Hamid AA, Inoue T. 1998.** Pollination biology in a lowland dipterocarp forest in Sarawak,
 19 Malaysia. 1. Characteristics of the plant-pollinator community in a lowland dipterocarp forest.
 20 *American Journal of Botany* **85**: 1477-1501.

21 **Nicholson KE, Glor RE, Kolbe JJ, Larson A, Hedges SB, Losos JB. 2005.** Mainland colonization
 22 by island lizards. *Journal of Biogeography* **32**: 929-938.

23 **Nicolson SW. 2002.** Pollination by passerines birds: why are the nectars so dilute? *Comparative*
 24 *Biochemistry and Physiology, Part B* **131**: 645-652.

25 **Nicolson SW, Fleming PA. 2003.** Nectar as food for birds: the physiological consequences of

- 1 drinking sugar solutions. *Plant Systematics and Evolution* **238**: 139-153.
- 2 **Nilsson LA, Jonsson L, Rason L, Randrianjohany E. 1985.** Monophily and pollination mechanisms
- 3 in *Angraecum arachnites* Schltr. (Orchidaceae) in a guild of long-tongued hawk-moths
- 4 (Sphingidae) in Madagascar. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 1-19.
- 5 **Nilsson LA, Jonsson L, Ralison L, Randrianjohany E. 1987.** Anagraecoid orchids and hawkmoths
- 6 in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica* **19**:
- 7 310-318.
- 8 **Nilsson LA. 1988.** The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* **334**: 147-149.
- 9 **Nilsson LA. 1992.** Orchid pollination biology. *Trends in Ecology and Evolution* **7**: 255-259.
- 10 **Olesen JM, Rønsted N, Tolderlund U, Cornett C, Mølgaard P, Madsen J, Jones CG,**
- 11 **Olsen CE. 1998.** Mauritian red nectar remains a mystery. *Nature* **393**: 529.
- 12 **Olesen JM, Valido A. 2003.** Lizards as pollinators and seed dispersers: an island phenomenon.
- 13 *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 177-181.
- 14 **Ollerton J. 1998.** Sunbird surprise for syndromes. *Nature* **394**: 726.
- 15 **Perrier de la Bâthie H. 1941.** *Flore de Madagascar (49e famille, vol. 2)*. Tananarive: Tananative
- 16 Imprimerie Officielle.
- 17 **Proctor M, Yeo P, Lack A. 1996.** *The natural history of pollination*. Portland: Timber Press.
- 18 **Pyke GH, Waser NM. 1981.** The production of dilute nectars by hummingbird and honeyeater
- 19 flowers. *Biotropica* **13**: 260-270.
- 20 **Roberts DL. 2001.** Reproductive biology and conservation of the orchids of Mauritius. PhD Thesis,
- 21 University of Aberdeen, UK.
- 22 **Roberts DL. 2003.** Pollination biology: the role of sexual reproduction in orchid conservation. In:
- 23 Dixon KW, Barrett RL and Cribb P, eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural
- 24 History Publication (Borneo). 113-136.
- 25 **Rodríguez-Robles JA, Meléndez EJ, Ackerman JD. 1992.** Effects of display size, flowering

- phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comparettia falcata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **79**: 1009-1017.
- Rothschild LW, Jordan K. 1903.** A revision of the lepidopterous family Sphingidae. *Novitates Zoologicae* **9** (suppl.): 1-972.
- Sabat AM, Ackerman JD. 1996.** Fruit set in a deceptive orchid: the effect of flowering phenology, display size, and local floral abundance. *American Journal of Botany* **83**: 1181-1186.
- Schultz ST, Ganders FR. 1996.** Evolution of unisexuality in the Hawaiian Islands: A test for micro-evolutionary theory. *Evolution* **50**: 842-855.
- Singer RB, Sazima M. 2000.** The pollination of *Stenorrhynchos lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich. (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in southern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **223**: 221-227.
- Slikas B, Jones IB, Derrickson SR, Fleischer RC. 2000.** Phylogenetic relationships of Micronesian White-eyes based on mitochondrial sequence data. *The Auk* **117**: 355-365.
- Stiles FG. 1981.** Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 323-351.
- Strahm WA. 1993.** The conservation and restoration of the flora of Mauritius and Rodrigues. PhD thesis, University of Reading, UK.
- Strasberg D, Rouget M, Richardson DM, Baret S, Dupont J, Cowling RM. In press.** An assessment of habitat diversity and transformation on La Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a basis for conservation planning. *Biodiversity and Conservation*.
- Tremblay RL. 1992.** Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany* **70**: 642-650.
- Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN. 2005.** Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of Linnean Society* **84**: 1-54.

- 1 **van der Cingel NA. 2001.** *An atlas of Orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia.* A.
2 A. Balkema Publishers, Rotterdam.
- 3 **van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid Flowers, their pollination and evolution.* Coral Gables:
4 University of Miami Press.
- 5 **Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J. 1996.** Generalization in pollination
6 systems, and why it matters. *Ecology* 77: 1043-1060.
- 7 **Wasserthal LT. 1997.** The pollinators of the malagasy star orchids *Angraecum sesquipedale*, *A.*
8 *sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift.
9 *Botanica acta* 110: 343-359.
- 10 **Weller SG, Wagner WL, Sakai AK. 1995.** A phylogenetical analysis of *Shiadea* and *Alsinidendron*
11 (Caryophyllaceae: Alsinoideae): implications for the evolution of breeding systems. *Systematic*
12 *Botany* 20: 315-337.
- 13 **Wolf LL, Hainsworth FR, Gill FB. 1975.** Foraging efficiencies and time budgets in nectar-feeding
14 birds. *Ecology* 56: 117-128.
- 15 **Woodell SRJ. 1979.** The role of unspecialized pollinators in the reproductive success of Aldabran
16 plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 286: 99-108.
- 17 **Zimmerman JK, Aide TM. 1989.** Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs.
18 resource limitation. *American Journal of Botany* 76: 67-73.
- 19

1 FIG 1. Illustrations of the measured morphological characters: A, Inflorescence: IL:
2 inflorescence length, IN 1: internode 1, IN 2: internode 2, LW: lip width, FO: flower opening;
3 B, Corolla: ASL: adaxial sepal length, ASW: adaxial sepal width, LSL: lateral sepal length,
4 LSW: lateral sepal width, LPL: lateral petal length, LSW: lateral petal width; C, Lip and spur:
5 LL: lip length, SL: spur length.

6

7 FIG 2. A, *Zosterops borbonicus* feeding on nectar, perched on the inflorescence of *Angraecum*
8 *striatum*; B, *Zosterops borbonicus* with pollinaria attached on its beak. (Pictures inferred from
9 videotapes, C Micheneau and J Fournel).

10

11 FIG 3. Number of bird visits per hour (bars), and total hours of observations (line) against time
12 of day (24 hr).

TABLE 1. Mean $\pm$ standard deviation (SD) of floral segment measures (N: sample size)

Floral segments	Length (mm)	Width (mm)	N
Inflorescence	109.8 $\pm$ 56.4	1.8 ^a $\pm$ 0.5	16
Internode 1	18.6 $\pm$ 5.8	Na	16
Internode 2	14.5 $\pm$ 3.5	Na	16
Adaxial sepal	11.6 $\pm$ 1.9	6.49 $\pm$ 0.8	44
Lateral sepal	11.2 $\pm$ 1.8	5.56 $\pm$ 0.7	44
Lateral petal	10.4 $\pm$ 1.82	4.38 $\pm$ 0.8	44
Lip	12.6 $\pm$ 1.2	9.7 $\pm$ 1.2	44
Spur	11.6 $\pm$ 1.1	3.9 ^b $\pm$ 0.4	44

^a diameter; ^b opening entrance

TABLE 2. Details of videotape sessions: dates and recorded hours, pollinator identification, number of visits per session (N visits), number of opened flowers (N fl) on target individuals (N Ti) and pollen movements (i. e. number of flowers with removed pollinia (N rem fl) and deposited pollinia (N pol fl) after a session)

Sessions	Dates	Session hours (Total)	Visitor identification	N visits	N fl (N Ti)	N rem fl	N pol fl
Night 1	10-11 Jan. 2005	18:30 – 5:30 h (11h)	-	0	7 (1)	0	0
Night 2	11-12 Jan. 2005	18:30 – 5:30 h (11h)	-	0	7 (1)	0	0
Night 3	12-13 Jan. 2005	18:30 – 5:30 h (11h)	-	0	7 (1)	0	0
Night 4	13-14 Jan. 2005	18:30 – 5:30 h (11h)	Cockroaches	2	7 (1)	0	0
Day 1	19 Jan. 2005	5:30 – 18:30 h (13h)	<i>Zosterops borbonicus</i>	2	9 (1)	4	0
Day 2	20 Jan. 2005	5:30 – 18:30 h (13h)	<i>Zosterops borbonicus</i>	3	10 (1)	1	0
Day 3	21 Jan. 2005	5:30 – 14:30 h (8h)	<i>Zosterops borbonicus</i>	1	46 (5)	0	1
Day 4	3 Feb. 2005	8:00 – 11:00 (3h)	-	0	13 (1)	0	0
Day 5	5 Feb. 2005	8:00 – 11:00 (3h)	-	0	13 (1)	0	0
Day 6	7 Feb. 2005	8:00 – 11:00 (3h)	-	0	13 (1)	0	0

TABLE 3. *In situ* and *ex situ* fruit production according to the different pollination treatments

<i>In situ</i>	Number of fruits (N flowers)	Fruit set (%)
Pollinator excluded	0 (38)	0
Self-pollinations	14 (24)	58.3
Cross-pollinations	12 (16)	75.0
<i>Ex situ</i>	Number of fruits (N flowers)	Fruit set (%)
Pollinator excluded	0 (25)	0
Self-pollinations	5 (7)	71.4
Cross-pollinations	5 (6)	83.3

TABLE 4. Morphological properties and reproductive success of ornithophilous orchids

Bird group	Hummingbirds	Sunbirds	White-eyes
Orchid genera	<i>Comparattia</i> ^a	<i>Stenorrhynchos</i> ^b	<i>Satyrium</i> ^d <i>Disa</i> ^c <i>Angraecum</i> ^f
Subfamily	Epidendroideae	Orchidoideae	Orchidoideae
Tribe	Maxillarieae	Cranichideae	Diseae
Subtribe	Oncidiinae	Spiranthinae	Satyriinae
Habit	Epiphytic	Terrestrial	Terrestrial
Locality	Puerto Rico	Brazil	South Africa
Odour	None	None	None
Flowers/inflorescence	1-13	up to 30	up to 100
Flower colour	Deep red to pink	Pink-salmon	Orange or yellow
Spur length (mm)	13.1 ^g	-	12.3
Pollen removal (%)	28.1 ^g	74.7	38.0
Pollen deposition (%)	22.3 ^g	94.1	25.9
Fruit set (%)	18.1 ^g	83.2	41.8
Nectar volume (μL)	3.6 ^g	-	5.5
% sugar (g/100g)	14.0 ^g	-	23.6

^a Rodríguez-Robles *et al.*, 1992 (*Comparattia falcata*); ^b Singer and Sazima, 2000 (*Stenorrhynchos lanceolatus*); ^c Johnson, 1996 (*Satyrium carneum* / *S. princeps*); ^d Johnson, 1996; Ellis and Johnson, 1999 (*Satyrium coriifolium*); ^e Johnson and Brown, 2004 (*Disa chrysostachya* / *D. satyriopsis*); ^f This study (*Angraecum striatum*); ^g mean between two years.

TABLE 5. Other plant species visited by *Zosterops borbonicus* on Reunion

Native species (Family)	Habit	Colour	Introduced species (Family)	Habit	Colour
<i>Aphloia theiformis</i> (Flacourtiaceae) ^{a, b}	Tree	White	<i>Callistemon citrinus</i> (Myrtaceae) ^a	Tree	Red
<i>Dombeya blattiolens</i> (Sterculiaceae) ^a	Tree	Red	<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae) ^{a, b}	Tree	Red
<i>D. ciliata</i> ^a	Tree	Pink	<i>Chrysalidocarpus lutescens</i> (Palmaeae) ^a	Tree	Cream
<i>D. delislei</i> ^a / <i>D. elegans</i> ^a / <i>D. reclinata</i> ^a	Tree	White	<i>Cuphea platycentra</i> (Lythraceae) ^{a, b}	Herb	Red
<i>D. ficulnea</i> ^a / <i>D. pilosa</i> ^a / <i>D. punctata</i> ^a	Tree	White-Pink	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (Euphorbiaceae) ^a	Shrub	Red
<i>Eugenia buxifolia</i> (Myrtaceae) ^a	Tree	White	<i>Fuchsia magellanica</i> (Onagraceae) ^{a, b}	Vine	Red
<i>Forgesia racemosa</i> (Escaloniaceae) ^{a, b}	Shrub	Red	<i>Kalanchoe pinnata</i> . (Crassulaceae) ^{a, b}	Herb	Cream
<i>Geniostoma borbonicum</i> (Loganiaceae) ^{a, b}	Shrub	White	<i>Lantana camara</i> (Verbenaceae) ^{a, b}	Shrub	Yellow to Pink
<i>Hibiscus boryanus</i> (Malvaceae) ^a	Tree	Red	<i>Lomatophyllum purpureum</i> (Liliaceae) ^a	Herb	Red
<i>Hypericum lanceolatum</i> (Hypericaceae) ^{a, b}	Shrub	Yellow	<i>Lomatophyllum tormentorii</i> (Liliaceae) ^a	Herb	Orange
<i>Lomatophyllum macrum</i> (Liliaceae) ^a	Herb	Orange	<i>Musa acuminata</i> (Musaceae) ^a	Shrub	Cream
<i>Molanea alternifolia</i> (Sapindaceae) ^a	Tree	Cream	<i>Rubus alceifolius</i> (Rosaceae) ^a	Vine	White
<i>Mussaenda landia</i> (Rubiaceae) ^a	Tree	White	<i>Spathodea campanulata</i> (Bigoniaceae) ^a	Tree	Orange
<i>Sophora demudata</i> (Fabaceae) ^{a, b}	Tree	Yellow	<i>Syzgium jambos</i> (Myrtaceae) ^{a, b}	Tree	White-Pink
<i>Syzgium borbonicum</i> (Myrtaceae) ^a	Tree	White			
<i>S. cordemoyi</i> ^a / <i>S. cymosum</i>	Tree	Red			
<i>Trochetia granulata</i> (Sterculiaceae) ^a	Shrub	White			

^a Authors, personal observations; ^b Gill, 1971.

Résumé

Cette étude portait sur la systématique, la biologie reproductive et la biologie évolutive des espèces de la sous-tribu des Angraecinae (Vandeae, Orchidaceae) de l'île de La Réunion. La reconstruction phylogénétique des espèces de la zone sud-Ouest de l'Océan Indien à partir de séquences d'ADN du génome chloroplastique a permis d'envisager la thématique de recherche selon deux grandes voies : (1) celle de l'implication de l'outil moléculaire dans la systématique du groupe ; (2) celle de l'évolution de la relation plante-pollinisateur et des traits floraux qui lui sont associés, suite à la colonisation d'une île océanique.

Concernant l'étude systématique, nos résultats indiquent clairement (1) l'inclusion de la sous-tribu des Aerangidinae au sein de celle des Angraecinae et (2) la polyphylie du genre *Angraecum*. L'étude de la biologie reproductive a montré que la majorité des espèces réunionnaises illustre parfaitement le syndrome de pollinisation lépidoptérophile. Toutefois, deux cas semblent spécifiques de la Réunion : (1) l'autofertilité des espèces à long éperon (> 8 cm) et (2) l'ornithophilie des espèces de la section *Hadrangis* du genre *Angraecum*, dont l'interaction avec les oiseaux passériformes de la famille des Zosteropidés est tout à fait nouvelle pour la famille des Orchidaceae, chez laquelle la pollinisation par les oiseaux reste rare.

Cette étude illustre deux voies d'évolution différentes d'espèces proches phylogénétiquement de la famille des Orchidacées suite à la colonisation d'une île océanique, l'île de La Réunion. L'absence de reproduction sexuée, due à l'absence probable des partenaires spécifiques de la pollinisation, les grands sphinx, lors de l'arrivée des souches émigrantes de Madagascar sur l'île semble le moteur de l'évolution vers un nouveau mode de reproduction dans le premier cas et de l'adaptation à de nouveaux pollinisateurs dans le deuxième exemple.

Mots clés : ADN chloroplastique, Angraecinae, évolution des formes florales, île océanique, île de la Réunion, Orchidaceae, phylogénie moléculaire, relation plante-pollinisateur.

Abstract

We investigated systematics and reproductive biology of Mascarene orchids from large subtribe Angraecinae (Vandeae, Orchidaceae). Phylogenetic investigation of Angraecinae from the Southern-West Indian Ocean zone from plastid DNA sequences was used for both inferring taxonomic implications and evolution of plant-pollinator interactions and morphological shifts in response to pollinator adaptations after Reunion Island colonization.

Angraecinae and the large genus *Angraecum* as currently circumscribed do not form clades. While most of species are expected to be pollinated by small moth, pollination biology studies conducted on endemic species from Reunion highlighted two original cases: (1) the autonomous self-pollination of long-spurred species and (2) bird pollination (*Zosterops borbonicus*, Zosteropidae) of species belonging to the genus *Angraecum* sect. *Hadrangis*. For the first time, a bird species from a family that is not adapted for nectar collection is reported as an orchid pollinator.

This study illustrates two different evolutionary ways of closely related species from Orchidaceae, after colonization of an oceanic island: Reunion Island. We suggest that the lack of highly specialized sphingid pollinators in the Mascarenes has been the major driving force for the unique adaptations of the endemic species.

Key words: Angraecinae, floral trait evolution, molecular phylogeny, oceanic islands, Orchidaceae, plant-pollinator interactions, plastid DNA, Reunion Island.