



HAL
open science

Systematique et évolution des structures florales productrices de lipides au sein des Iridoideae (Iridaceae)

Olivier Chauveau

► **To cite this version:**

Olivier Chauveau. Systematique et évolution des structures florales productrices de lipides au sein des Iridoideae (Iridaceae). Biologie végétale. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112055 . tel-00976550

HAL Id: tel-00976550

<https://theses.hal.science/tel-00976550v1>

Submitted on 10 Apr 2014

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DU VEGETAL (ED 145)
DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE

Présentée par

Olivier Chauveau

Pour obtenir

Le grade de Docteur en Sciences de l'Université Paris-Sud

**Systematique et évolution des structures florales
productrices de lipides au sein des Iridoideae
(Iridaceae)**

Directrice de thèse : Sophie Nadot (ESE)

Soutenue le 29 mars 2012 devant le jury composé de :

Jean-Yves DUBUISSON	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Porter P. LOWRY	Professeur, Muséum national d'Histoire naturelle	Rapporteur
Isabelle DAJOZ	Professeur, Université Paris VII	Examinatrice
Valéry MALECOT	Maître de Conférence, Université d'Angers	Examineur
Sophie NADOT	Professeur, Université Paris-Sud	Directrice de thèse

Remerciements

Je voudrais remercier avant tout **Sophie Nadot** pour m'avoir fait confiance et m'avoir accueilli comme doctorant dans son équipe. Sa patience, son indulgence et son enthousiasme communicatif m'ont éclairé tout au long de ce travail. Ce fut plus que de la chance de l'avoir pour directrice de thèse et j'espère ardemment pouvoir continuer longtemps à collaborer avec elle et l'ensemble de l'équipe DEV.

Merci à **Michel Dron, Jacqui Shykoff** et à l'école doctorale Sciences du Végétal de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je remercie **Tatiana Souza-Chies** et **Lilian Eggers**, non seulement pour leurs conseils au cours de mes comités de thèse, mais aussi pour leur collaboration soutenue tout au long de ce travail.

Merci à **Jean-Yves Dubuisson, Pete Lowry, Isabelle Dajoz** et **Valery Malécot** d'avoir accepté de consacrer du temps à ce travail et de faire partie de mon jury de thèse.

Je suis extrêmement reconnaissant à **Spencer Brown** et **Marie-Noëlle Soler** pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant mon travail sur la plate-forme IMAGIF. Merci à l'**IFR 87** "La plante et son environnement" d'avoir financé cette partie du projet.

Merci au **Consortium National de Recherche en Génomique**, et au **Service de Systématique Moléculaire du Muséum National d'Histoire Naturelle (IFR 101)** pour m'avoir permis de réaliser une grande partie des séquençages dans le cadre du projet **Macrophylogeny of Life** dirigé par **G. Lecointre**.

Merci au projet de coopération franco-brésilien **CAPES/COFECUB Sv550/07** pour avoir financé l'ensemble des campagnes de collecte menées sur le territoire brésilien et sans lequel ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

Rita et **Edmund Heaton** (NCCPG Sisyrinchium National Collection, Newton Abbot, Royaume Uni) resteront aussi à tout jamais présents dans ma mémoire pour leur gentillesse, la chaleur de leur accueil et le nombreux matériel végétal qu'ils ont mis à ma disposition dans le cadre de ce travail. Je remercie aussi chaleureusement **Serge Aubert** et **Rolland Douzet** (Jardin Botanique de la Station Alpine du Lautaret, France) ainsi que **Frédéric Pautz** (Jardin Botanique de Lyon, France) pour avoir accepté de mener plusieurs campagnes de collecte en Argentine, au Chili et au Mexique pour le compte de ce projet.

J'ai une pensée particulière pour les membres du **laboratoire ESE** avec qui j'ai passé ces années plus qu'agréablement et je tiens à remercier tout particulièrement **Paul Leadley** pour la manière inoubliable dont il m'a accueilli au sein du laboratoire ainsi que **Jane Lecomte** qui m'a donné la chance de renouer avec la recherche scientifique. Je voudrais aussi adresser un grand merci à **Odylle Cudelou** qui a grandement contribué à faciliter mon travail de paillasse.

Je remercie tout particulièrement **Christian Raquin** qui n'a pas compté son temps pour mettre au point les protocoles de germination *in vitro* qui se sont avérés indispensables pour réaliser une grande partie de ce travail, et qui continue à se battre actuellement avec quelques graines récalcitrantes.

Une pensée spéciale aussi pour les stagiaires, thésards et post docs avec qui j'ai collaboré de près ou de loin durant ce travail : **Adriana, Adriano, Amandine, Aurélien, Esteban, Eudes, Luis, Leandro, Luana, Marine, Tiago.**

Merci à **Anne-Catherine**, et à mes enfants **Coline** et **Sélène** pour avoir supporté les trop longs moments consacrés à mon travail et pour m'avoir soutenu continuellement au cours de ces années.

Merci à **mes parents** pour m'avoir inculqué la passion de la connaissance et de la découverte.

Enfin, j'ai une pensée unique pour **Lila** qui m'a ouvert l'esprit sur la richesse de l'univers que j'ai pu découvrir au cours de ce projet.

Résumé

Les interactions plantes-pollinisateurs constituent une composante clé de la dynamique de la plupart des écosystèmes terrestres. Les interactions entre espèces jouant un rôle central dans de nombreux événements de spéciation, l'étude de l'histoire évolutive des caractères étroitement liés à ce type d'interaction contribue à améliorer notre connaissance des mécanismes impliqués. Les insectes représentent le groupe majeur des espèces animales visitant les fleurs pour collecter généralement pollen et/ou nectar, mais certains d'entre eux recherchent d'autres ressources polliniques. Les relations entre les fleurs produisant des lipides et les abeilles spécialisées collectant cette ressource constituent un exemple d'interaction étroite et inhabituelle. Ce type de fleur ne s'observe qu'au sein de 11 familles non apparentées d'angiospermes. L'apparition des structures florales productrices de lipides (élaïophores) résulte d'un seul événement évolutif dans la plupart de ces familles, à l'exception des Orchidaceae et des Iridaceae où des transitions multiples se sont produites. De plus, même si le nombre de transitions et la manière dont ces structures florales ont évolué à l'intérieur des Iridaceae sont encore inconnus, le nombre et la distribution géographique des espèces sécrétrices de lipides floraux suggèrent que les transitions vers la production de ce type de ressource pourraient avoir joué un rôle clef dans la diversification de la sous-famille des Iridoideae sur le continent américain.

L'objectif de cette thèse était d'améliorer la connaissance de l'histoire évolutive de ce système de pollinisation particulier au sein des Iridaceae et d'évaluer son importance en tant que facteur de diversification. Un large échantillonnage de terrain a été réalisé au sein des genres américains de la sous-famille des Iridoideae afin de disposer de phylogénies moléculaires robustes à deux échelles taxonomiques différentes. Le rôle joué par l'évolution des stratégies de pollinisation en relation avec la sécrétion de lipides floraux a été évalué dans le contexte global de la sous-famille mais aussi à une échelle plus réduite. Le genre *Sisyrinchium*, comprenant à la fois de nombreuses espèces produisant des lipides floraux mais aussi des espèces dont la seule ressource fournie aux pollinisateurs semble être le pollen, et dont la diversification est de loin la plus importante sur le continent américain, a été choisi pour ce deuxième volet de l'étude. Une double démarche a été mise en œuvre, couplant une approche phylogénétique avec la caractérisation micro-morphologique et fonctionnelle des structures susceptibles d'être impliquées dans la relation plante-pollinisateur au sein du genre.

Les résultats ont permis de montrer l'apparition répétée des élaïophores aux deux échelles taxonomiques de l'étude et de mettre en évidence le rôle majeur joué par l'apparition de ce caractère homoplasique dans la diversification de la famille sur le continent américain. La poursuite de ce travail nécessitera d'étudier de manière approfondie non seulement la biologie de la reproduction mais aussi la biologie de la pollinisation afin de mieux cerner l'impact de ces interactions sur la dynamique des écosystèmes où elles existent.

Mots-clés : Iridoideae, *Sisyrinchium*, élaïophores, phylogénie, phylogéographie, histoire évolutive, innovation clé.

Abstract

Plant-pollinator interactions are key components of the dynamics of most terrestrial ecosystems. Since species interactions are considered to play a central role in many speciation events, studying the evolutionary history of traits closely linked to this kind of interaction contributes to improve our knowledge of the mechanisms involved. Insects are the largest group of animals visiting flowers to collect mostly pollen and/or nectar, but some insects seek other resources. Relationships between oil-secreting flowers and specialized oil-collecting bees constitute an example of a close and uncommon interaction. Flowers offering oil as a resource are found in only 11 families distributed across the angiosperms among unrelated orders. In most of these families floral oil-producing structures (elaiophores) evolved only once, except in Orchidaceae and Iridaceae where oil rewards evolved multiple times. Furthermore, even if our phylogenetic knowledge is too incomplete to infer how many times and how elaiophores have evolved within the Iridaceae, the number and the geographical distribution of oil-flower species suggest that transitions to floral oil-producing structures may well have played a key role in the diversification of the Iridoideae subfamily on the American continent.

The goal of this study was to improve our knowledge of the evolutionary history of this uncommon pollination system and to test whether the evolution of elaiophores is a causal factor of diversification within the Iridaceae. Species of the American genera of Iridoideae were widely sampled in the field to produce robust phylogenetic frameworks at two different taxonomic levels. This work aimed at better understanding the evolution of the pollination strategies related to floral oil-secretion not only in the general context of the subfamily but also at a lower taxonomic level. *Sisyrinchium*, the largest genus in the New World Iridoideae, including species with oil-producing flowers and species with only pollen flowers, was selected for the second part of this study. Phylogenetic analyses were combined with micro-morphological and functional characterizations of the floral structures potentially involved in plant-pollinator interactions within the genus.

The results showed that elaiophores evolved several times at both taxonomic levels and that this homoplastic character has played a key role in the diversification of the family on the American continent. For future prospects, thorough studies of the reproductive and pollination biology are required to elucidate how these interactions impact the dynamics of the ecosystems in which they occur.

Keywords: Iridoideae, *Sisyrinchium*, elaiophores, phylogeny, phylogeography, evolutionary history, key innovation.

Table des matières

Table des matières	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	4
INTRODUCTION.....	6
1. La pollinisation avec récompense lipidique au sein des Angiospermes	6
1.1. Les structures florales impliquées dans la pollinisation avec récompense lipidique ..	7
1.1.1. <i>Elaiophores de type épithélial</i>	8
1.1.2. <i>Elaiophores de type trichome</i>	8
1.2. Les pollinisateurs.....	12
1.2.1. <i>Abeilles collectrices de lipides</i>	13
1.2.2. <i>Structures spécialisées pour la collecte des lipides</i>	13
1.2.3. <i>Relations plantes-pollinisateurs</i>	26
1.3. Evolution de la pollinisation avec récompense lipidique parmi les angiospermes ...	28
1.3.1. <i>De nombreuses transitions indépendantes chez les plantes à fleurs</i>	28
1.3.2. <i>Deux cas particuliers : Orchidaceae et Iridaceae</i>	31
2. Diversité de l'organisation florale et pollinisation chez les Iridaceae	33
2.1. Systématique de la famille	33
2.2. Diversité de l'organisation florale.....	36
2.3. Diversité des nectaires et des élaïophores	38
2.4. La pollinisation par les abeilles	41
2.5. Les autres vecteurs biotiques.....	42
3. Systématique de la sous-famille des Iridoideae : présentation des tribus actuellement reconnues.....	47
3.1. Sisyrinchieae	48
3.2. Trimezieae	50
3.3. Tigridieae.....	51
4. Objectifs de la présente thèse	54
♦ Phylogénies moléculaires à plusieurs niveaux taxonomiques.....	55
• <i>La sous-famille des Iridoideae</i>	55
• <i>Le genre Sisyrinchium</i>	55
♦ Histoire évolutive des structures florales productrices de lipides	56
♦ Diversification de la sous-famille des Iridoideae sur le continent américain.....	56
♦ Diversification du genre <i>Sisyrinchium</i>	57

CHAPITRE 1	58
Phylogénie moléculaire, systématique et évolution de la sous-famille des Iridoideae	58
1. Phylogénie moléculaire et scénarios évolutifs	59
1.1. Résumé du contexte et des méthodes de l'article 1	59
1.1.1. <i>Echantillonnage taxinomique</i>	59
1.1.2. <i>Echantillonnage génétique</i>	60
1.1.3. <i>Étude des structures florales productrices de lipides</i>	60
1.2. Article 1	62
INTRODUCTION	64
MATERIALS AND METHODS	66
RESULTS	73
DISCUSSION	86
SUPPLEMENTARY INFORMATION	92
ACKNOWLEDGEMENTS	93
LITERATURE CITED	93
APPENDIX 1	98
1.3. Détail des informations supplémentaires utilisées dans l'article 1	103
1.4. Résumé des principaux résultats de l'article 1	103
1.4.1. <i>Phylogénie moléculaire et systématique</i>	103
1.4.2. <i>Histoire évolutive des structures glandulaires florales</i>	106
2. Conclusions du chapitre 1	108
CHAPITRE 2.	110
Phylogénie moléculaire, systématique et évolution du genre <i>Sisyrinchium</i>	110
1. Phylogénie moléculaire et scénarios évolutifs	111
1.1. Résumé du contexte et des méthodes de l'article 2.....	111
1.1.1. <i>Echantillonnage taxinomique</i>	111
1.1.2. <i>Echantillonnage génétique</i>	112
1.1.3. <i>Étude des structures florales productrices de lipides</i>	112
1.1.4. <i>Étude de l'histoire évolutive de la distribution géographique du genre</i>	113
1.2. Article 2.....	114
INTRODUCTION	117
MATERIALS AND METHODS	119
RESULTS	126
DISCUSSION	141
SUPPLEMENTARY INFORMATION	150
ACKNOWLEDGEMENTS	150
LITERATURE CITED	151
APPENDIX 1	157
1.1. Détail des informations supplémentaires utilisées dans l'article 2	165
1.2. Résumé des principaux résultats de l'article 2	165
1.2.1. <i>Phylogénie moléculaire</i>	165
1.2.2. <i>Histoire évolutive des trichomes glandulaires</i>	165

1.2.3. <i>Biogéographie du genre Sisyrinchium</i>	165
1.3. Variation du taux de diversification au sein du genre <i>Sisyrinchium</i>	166
1.3.1. <i>Résultats</i>	166
1.3.2. <i>Discussion</i>	168
2. Identification des ressources offertes aux pollinisateurs au sein de la tribu des Sisyrinchieae	169
2.1. Résumé du contexte et des objectifs de l'article 3	169
2.2. Article 3	171
INTRODUCTION	173
MATERIALS AND METHODS	174
RESULTS	176
DISCUSSION	186
ACKNOWLEDGEMENTS	192
LITERATURE CITED	192
3. Conclusions du chapitre 2	196
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	198
1. Conclusion générale	198
2. Perspectives	202
BIBLIOGRAPHIE	204
ANNEXES	220
Annexe 1 - Informations supplémentaires de l'article 1	220
Annexe 2 - Informations supplémentaires de l'article 2	236

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Elaiophores de type épithélial.	8
Figure 2. Elaiophores de type trichomes.	10
Figure 3. Abeilles collectrices de lipides de la famille des Melittidae et des Apidae.	13
Figure 4. Abeilles collectrices de lipides de la famille des Apidae.	19
Figure 5. Position phylogénétique des 11 familles d'angiospermes comprenant des espèces produisant des lipides floraux.	28
Figure 6. Phylogénie moléculaire des Iridaceae.	34
Figure 7. Diversité de la morphologie florale au sein des Iridaceae.	37
Figure 8. Coupe transversale de l'ovaire de <i>Klattia stokoei</i> L.Guthrie (Nivenioideae) et <i>Tritoniopsis burchellii</i> (N.E.Br.) Goldblatt (Crocoideae) indiquant la position des nectaires dans les cloisons.	39
Figure 9. Phylogénie moléculaire des Iridoideae.	48
Figure 10. Principales synapomorphies morphologiques et anatomiques entre les genres de la tribu des Sisyrinchieae.	49
Figure 11. Androcée et gynécée typiques du clade formé par les tribus des Trimezieae et des Tigridaeae.	51
Figure 12. Diversité de la morphologie florale au sein du genre <i>Tigridia sensu</i> Goldblatt & Manning (2008).	54
Tableau 1. Récapitulatif des principales informations concernant les abeilles collectrices de lipides floraux au sein de la tribu des Tapinotaspidini.	21
Tableau 2. Récapitulatif des transitions vers l'apparition de structures sécrétant des lipides floraux ainsi que des réversions identifiées à l'intérieur des différentes familles d'angiospermes à partir des phylogénies actuelles.	30
Tableau 3. Synapomorphies de la sous-famille des Crocoideae.	35
Tableau 4. Synapomorphies de la sous-famille des Iridoideae.	35

Tableau 5. Vecteurs biotiques pollinisant les espèces de la famille des Iridaceae en Afrique sub-saharienne.	43
Tableau 6. Détection des variations de taux de diversification au sein du genre <i>Sisyrrinchium</i> à l'aide du logiciel SymmeTREE.	167
Tableau 7. Comparaison des différents modèles obtenus à l'aide de la méthode d'analyse ML BISSE pour le caractère A (trichomes floraux) au sein du genre <i>Sisyrrinchium</i> .	168
Tableau 8. Comparaison des différents modèles obtenus à l'aide de la méthode d'analyse ML BISSE pour le caractère B (élaïophores) au sein du genre <i>Sisyrrinchium</i> .	169
Tableau 9. Valeurs des différents paramètres calculés à partir du meilleur modèle obtenu à l'aide de la méthode d'analyse ML BISSE pour la caractère A (trichomes floraux) et le caractère B (élaïophores).	169

N.B. : les figures et les tableaux des articles inclus dans cette thèse sont numérotés de façon indépendante au sein de chaque article.

INTRODUCTION

1. La pollinisation avec récompense lipidique au sein des Angiospermes

Les angiospermes, ou plantes à fleurs, comprennent environ un sixième du nombre total des espèces vivantes décrites actuellement à la surface du globe et les insectes représentent à eux seuls quasiment les deux tiers de cette richesse spécifique. Ces deux groupes dominent la flore et la faune des surfaces terrestres de la planète et leurs interactions jouent un rôle essentiel dans la dynamique et l'évolution des écosystèmes terrestres (Waser, 2006). Parmi ces interactions, l'une des plus importantes est celle qui s'est établie entre les angiospermes et les insectes qui visitent et pollinisent leurs fleurs. Dans ce contexte, le groupe des abeilles est prépondérant et joue un rôle majeur dans la reproduction sexuée d'une grande partie de la végétation naturelle des écosystèmes terrestres de la planète (Michener, 2007). Ce type d'interaction fait intervenir dans la plupart des cas la production d'une ressource par la plante, collectée et utilisée par l'insecte ; un service mutuel plus ou moins strict s'établit donc entre les partenaires et la relation est alors qualifiée de mutualiste. En effet, durant la collecte de la ressource produite par la plante, l'insecte peut entrer en contact avec les organes reproducteurs de la fleur, entraînant un transfert du pollen sur son corps, et ensuite de son corps vers les surfaces stigmatiques de la fleur, assurant ainsi la reproduction sexuée de la plante visitée (Glover, 2007). Un composé produit au niveau de la fleur ou de l'inflorescence peut être considéré comme une ressource pour un pollinisateur à partir du moment où il est récolté et utilisé par celui-ci et que cette collecte entraîne des visites répétées, avec pour conséquence la pollinisation de la plante productrice de cette ressource (Simpson & Neef, 1981). Dans la plupart des cas, les relations entre plantes et pollinisateurs forment des réseaux d'interactions complexes où les différents acteurs sont en relation avec une gamme plus ou moins large de partenaires (Memmot, 1999). A l'intérieur d'une communauté les réseaux d'interactions mutualistes sont fortement structurés, mais les interactions à l'intérieur de ces réseaux sont généralement asymétriques, les espèces spécialisées étant fréquemment dépendantes d'espèces généralistes (Bascompte et al., 2003). La plupart des relations mutualistes entre plantes à fleurs et pollinisateurs peuvent donc être considérées comme facultatives (Bronstein, 1994 ; Thompson, 1999). Néanmoins, même si les relations de mutualisme obligatoire entre les espèces de plantes à fleurs et leurs pollinisateurs sont rares, leur étude offre la possibilité d'observer les adaptations réciproques qui se sont développés au cours de l'évolution des partenaires. Elles peuvent servir de modèle pour comprendre comment

l'établissement de relations mutualistes peut conduire à des transformations liées aux influences réciproques des différentes espèces impliquées et ainsi d'évaluer l'importance de ces relations dans les phénomènes de coévolution (Renner & Schaefer, 2010).

Le pollen et le nectar représentent les deux principales ressources produites par les plantes à fleurs mais de nombreux autres composés chimiques peuvent aussi jouer ce rôle. La troisième ressource, par le nombre d'espèces de plantes à fleurs impliquées (Simpson & Neff, 1981; Vogel, 1988), est constituée par des lipides à haute valeur énergétique produits au niveau de différents organes floraux spécialisés. Ces lipides sont récoltés par des abeilles présentant elles aussi des organes spécialisés pour réaliser la collecte, et utilisés ensuite de différentes manières (Vogel, 1969; 1974; Buchmann, 1987; Rasmussen & Oleson, 2000). Les interactions plantes-pollinisateurs basées sur la production de lipides floraux sont à l'origine de relations de dépendances obligatoires ou facultatives entre les partenaires, mettant en jeu de nombreuses adaptations tant morphologiques que chimiques ou comportementales (Renner & Schaefer, 2010).

1.1. Les structures florales impliquées dans la pollinisation avec récompense lipidique

La production de ce groupe de composés chimiques au niveau des fleurs de plusieurs familles d'angiospermes a été découverte et décrite il y a une quarantaine d'années par Stefan Vogel (1969), bien que les structures glandulaires à l'origine de leur sécrétion fussent connues depuis au moins 200 ans (Simpson & Neff, 1981). Les lipides produits sont dans tous les cas des esters d'acides gras et du glycérol. La propriété dominante des acylglycérols naturels est leur caractère complètement apolaire ou neutre, les groupes polaires disparaissant dans les liaisons esters. L'ensemble des observations réalisées montrent qu'ils appartiennent généralement aux classes des monoglycérides (esters avec un seul acide gras) ou des diglycérides (esters avec deux acides gras) et rarement aux triglycérides (ester avec trois acides gras). La chaîne carbonée des acides gras entrant dans leur composition a une longueur variant entre 14 et 18 atomes de carbones (Vogel, 2009). Ces lipides sont produits et stockés par des structures glandulaires spécialisées appelées élaïophores (Vogel, 1974). Ces structures peuvent se situer sur différents types de pièces florales. Elles constituent des surfaces glandulaires clairement délimitées à l'intérieur de la fleur, qui peuvent être subdivisées anatomiquement et histologiquement en deux grandes catégories (Vogel, 1969, 1974, 2009).

1.1.1. Elaiophores de type épithélial

Les élaïophores de type épithélial forment des crêtes ou des bourrelets sur les organes qui les portent. Ils sont composés de cellules glandulaires épidermiques (Fig. 1) qui forment un épithélium prononcé composé de cellules dont la taille est très supérieure aux cellules environnantes (Endress, 1995). Les sécrétions lipidiques abondantes sont stockées sous une épaisse cuticule protectrice collective, formant un film au-dessus de la surface des cellules sécrétrices (Vogel, 1974; Simpson & Neff, 1981; Buchmann, 1987; Machado, 2004). Ce type d'élaïophores se rencontre principalement au sein des Krameriaceae (genre *Krameria*) et des Malpighiaceae (16 genres regroupant plus de 750 espèces sur les 1250 que compte la famille) mais aussi chez quelques espèces d'Orchidaceae (réparties dans les sous-tribus des Bifrenariinae, Cyrtopodiinae et Oncidiinae, la plupart des espèces concernées appartenant au genre *Oncidium*) et une espèce d'Iridaceae (Buchmann, 1987; Endress, 1995; Rasmussen & Olesen, 2000; Machado, 2004; Stipiczyńska & Davies, 2008; Pansarin et al., 2009; Renner & Schaefer, 2010). Les élaïophores de type épithélial sont toujours disposés sur les pièces du périanthe, mais leur position varie suivant les familles. Ils couvrent la face abaxiale d'une paire de pétales réduits de la fleur des Krameriaceae (Simpson & Salywon, 1999) et sont positionnés par paire sur la face abaxiale des sépales de la fleur des espèces de Malpighiaceae présentant ce type de structure (Anderson, 1990). Dans la famille des Orchidaceae, le labelle des espèces qui possèdent des élaïophores peut porter une, deux ou trois surfaces glandulaires de ce type, positionnées sur le callus et/ou sur les lobes latéraux du labelle (Singer & Cocucci, 1999; van der Cingel, 2001; Singer et al., 2006; Stipiczyńska et al., 2007; Davies & Stipiczyńska, 2009). Dans la famille des Iridaceae, *Tritoniopsis parviflora* (Jacq.) G.J. Lewis est la seule espèce qui présente des élaïophores de type épithélial. Cette espèce de Crocoideae sud-africaine possède des surfaces glandulaires sécrétrices de lipides sur la moitié proximale de la face adaxiale de chacun des tépales (Manning & Goldblatt, 2002; Manning & Goldblatt, 2005).

1.1.2. Elaiophores de type trichome

Les élaïophores de type trichome sont constitués de quelques centaines à plusieurs milliers de trichomes glandulaires (Fig. 2), formant dans la plupart des cas une surface très dense de cellules sécrétrices (Buchmann, 1987; Endress, 1995; Silvera, 2002; Machado, 2004). La production de lipides est continue et les sécrétions sont généralement non protégées bien que dans certains cas les lipides puissent être accumulés dans un espace subcuticulaire situé dans

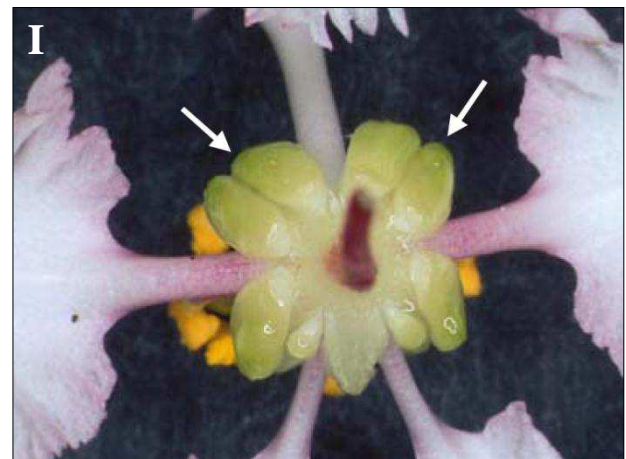
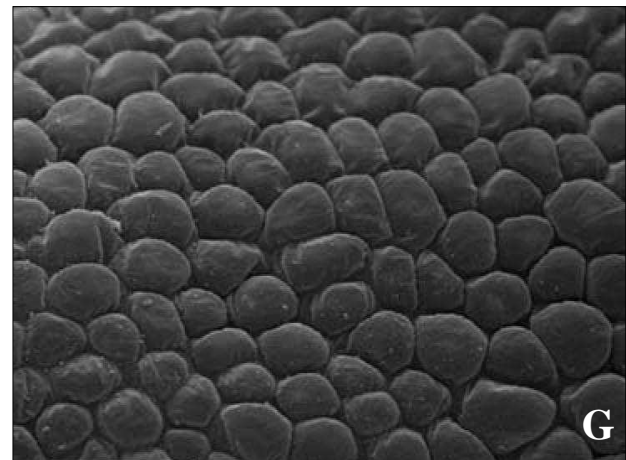
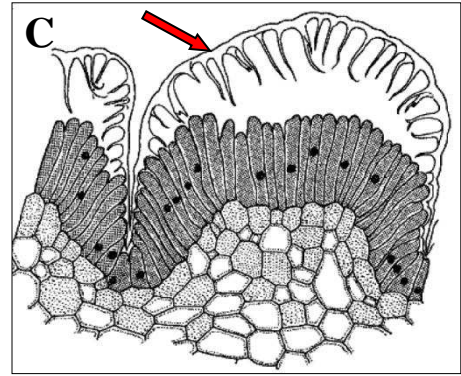
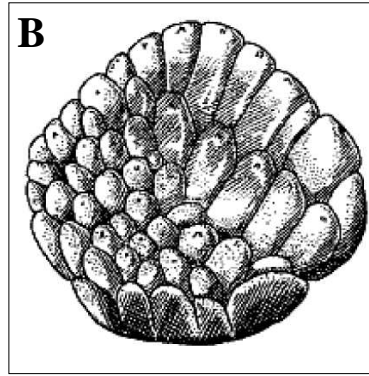
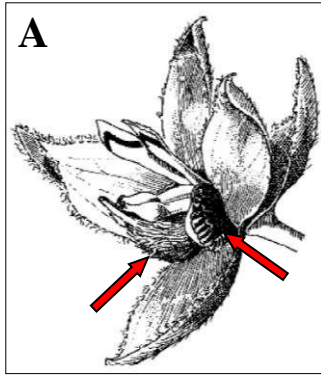


Figure 1. Elaiophores de type épithélial. (A-C) *Krameria triandra* Ruiz & Pav. (Krameriaceae) d'après Vogel (1974). (A) Position des 2 pétales réduits portant les élaïophores (flèches). (B) Aspect extérieur d'un pétale réduit. (C) Coupe transversale d'un élaïophore montrant la cuticule qui renferme le film lipidique produit par les cellules glandulaires de la surface de l'élaïophore (flèche). (D-E) *Krameria lanceolata* Torr. (Krameriaceae). (D) Aspect général de la fleur. (E) Pétales réduits portant les élaïophores. (F-G) *Oncidium ornithorhynchum* Kunt (Orchidaceae) d'après Davies & Stpiczyńska (2009). (F) Elaiophores sur les lobes latéraux et le lobe central du labelle (flèches). (G) Vue de la surface d'un élaïophore au microscope électronique à balayage. (H-I) *Malpighia urens* L. (Malpighiaceae) d'après Dumri (2008). (H) Aspect général de la fleur. (I) Elaiophores portés par les sépales réduits (flèches).

la partie supérieure des trichomes (Vogel, 1974; Buchmann, 1987; Cocucci and Vogel, 2001). Ces élaïophores existent au sein de neuf familles d'angiospermes. Ils sont constitués de trichomes glandulaires multicellulaires dans les familles des Calceolariaceae (genre *Calceolaria*), des Plantaginaceae (*Angelonia*, *Basistemon* et *Monttea*), des Solanaceae (*Nierembergia*), des Myrsinaceae (*Lysimachia*), des Cucurbitaceae (*Momordica*, *Siraitia*, *Telfairia*, *Thladiantha* et *Baijiana*), des Scrophulariaceae (*Alonsoa*, *Colpias*, *Diascia* et *Hemimeris*) et des Stilbaceae (*Anastrabe*, *Bowkeria* et *Ixianthes*). Ces trichomes sont unicellulaires dans les familles des Orchidaceae (nombreuses espèces réparties dans quatre sous-tribus : Coryciinae, Chranichidinae, Cyrtopodiinae, Oncidiinae) et des Iridaceae (nombreuses espèces uniquement dans la sous-famille des Iridoideae), le nombre d'espèces présentant ce type de structures dans chacune de ces deux familles étant aujourd'hui encore difficile à estimer (Machado, 2004; Stpiczyńska & Davies, 2008; Pansarin et al., 2009; Renner & Schaefer, 2010).

Les élaïophores de type trichomes sont généralement positionnés sur les pièces du périanthe mais ils peuvent aussi plus rarement être situés sur les filets des étamines (Buchmann, 1987; Goldblatt & Manning, 2008; Renner & Schaefer, 2010). La corolle des Plantaginaceae est gamopétale à sa base et les élaïophores sont répartis à l'intérieur du tube plus ou moins prononcé formé par cette partie soudée (Simpson et al., 1990). De plus, dans le genre *Angelonia*, ils sont concentrés à l'intérieur de deux éperons développés à la base de la corolle (Vogel & Machado, 1991). Les Scrophulariaceae présentent aussi une corolle gamopétale et les trichomes glandulaires peuvent se situer à l'intérieur d'une dépression (*Alonsoa*) ou d'une paire d'éperons (*Colpias* et *Diascia*) développées à sa base (Steiner, 1989; Vogel & Machado, 1991; Steiner & Whitehead, 2002; Dumri et al., 2008). Les élaïophores sont aussi situés à la base de la partie interne de la corolle gamopétale au sein des Stilbaceae (Steiner & Whitehead, 1996), des Solanaceae (Cocucci, 1991) et des Cucurbitaceae (Vogel, 1981a). La corolle des Calceolariaceae est bilabiée, avec une lèvre inférieure renflée et concave en forme de sabot (Fig. 2).

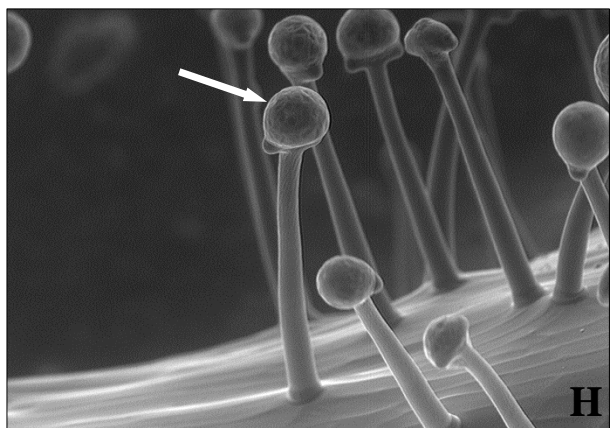
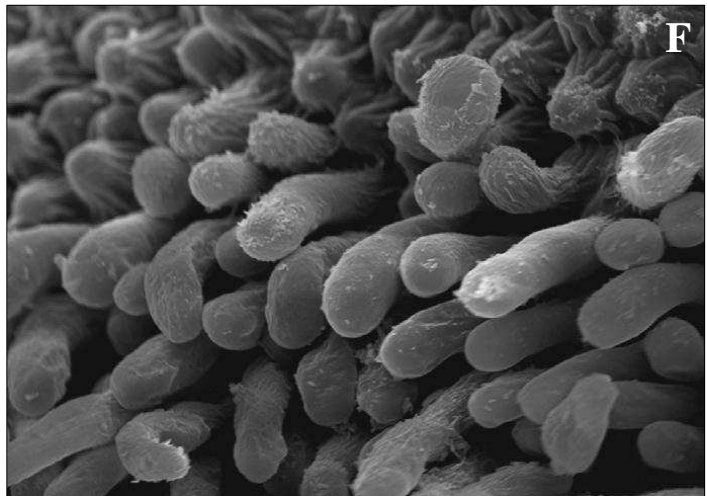
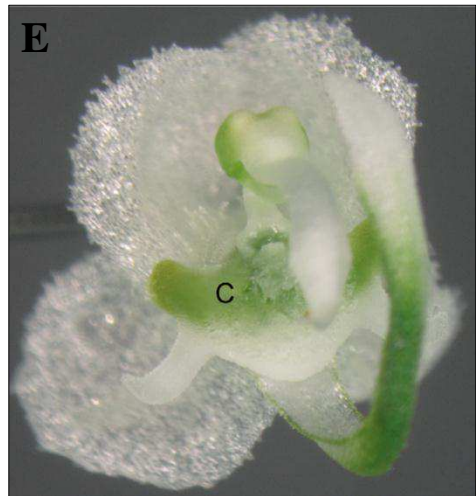
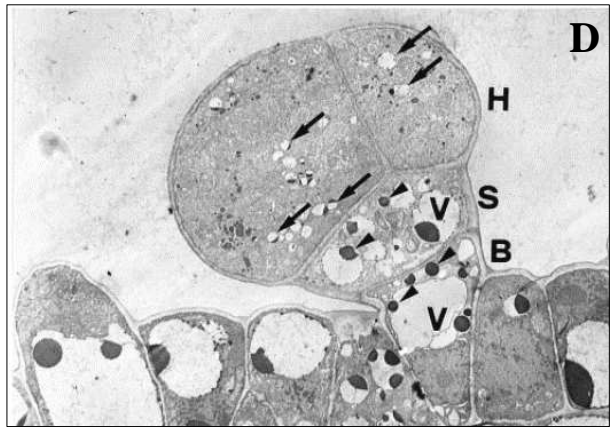
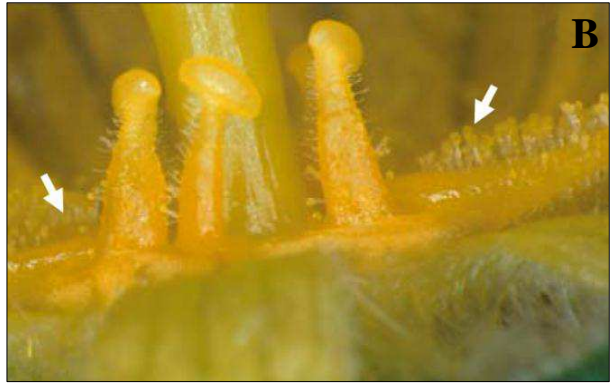


Figure 2. Elaiophores de type trichomes. (A-B) *Thladiantha dubia* Bunge (Cucurbitaceae) d'après Dumri (2008). (A) Coupe longitudinale de la fleur indiquant la position des élaïophores à la base des pétales (flèches). (B) Trichomes glandulaires sécrétant les lipides. (C) *Calceolaria elatior* Griseb. (Calceolariaceae) d'après Cosacov et al. (2009) : coupe longitudinale de la fleur montrant la position des élaïophores sur la lèvre inférieure des pétales soudés (rectangle). (D) *Calceolaria adscendens* Lindl. (Calceolariaceae) d'après Sacchetti et al. (1999) : coupe longitudinale de la lèvre inférieure des pétales soudés au microscope électronique à transmission montrant un trichome glandulaire pluri-cellulaire. (E-F) *Ornithocephalus kruegeri* Rchb.f. (Orchidaceae) d'après Davies & Stpiczyńska (2009). (E) Aspect général de la fleur montrant la position des trichomes glandulaires sur le callus du labelle (c). (F) Vue des trichomes glandulaires unicellulaires du callus au microscope électronique à balayage. (G-H) *Sisyrinchium scariosum* I.M. Johnst. (Iridaceae). (G) Aspect général de la fleur montrant la position des trichomes glandulaires sur la colonne staminale (flèche). (H) Aspect des trichomes glandulaires unicellulaires au microscope électronique à balayage montrant le film de sécrétion lipidique situé au dessus de chaque trichome (flèche).

Les trichomes glandulaires qui composent les élaïophores tapissent le lobe médian replié à l'intérieur de la lèvre inférieure de nombreuses espèces de *Calceolaria* (Vogel, 1974; Molau, 1988; Cosacov et al., 2009). Chez *Lysimachia*, le seul genre de Myrsinaceae où des élaïophores ont été observés (environ 40% des espèces du genre), les élaïophores sont toujours répartis sur la colonne staminale (Vogel, 1986; Buchmann, 1987; Dumri, 2008).

Bien que très majoritairement positionnés sur le labelle (généralement sur le callus, mais aussi parfois sur les lobes latéraux, le disque et le lobe médian), les élaïophores de type trichome unicellulaire des Orchidaceae s'observent parfois aussi sur la colonne staminale dans les genres *Grobysa* et *Ornithocephalus*, ou sur les pétales latéraux dans le genre *Zygostates* (Toscano de Brito, 2001; Patek & Stpiczyńska, 2007; Stpiczyńska & Davies, 2008; Davies, 2009; Pansarin et al., 2009; Pansarin & Pansarin, 2010). La famille des Iridaceae présente également deux types de distribution des élaïophores à l'intérieur de la fleur. Généralement positionnés sur les tépales internes, mais pouvant aussi parfois s'étendre aux tépales externes (genres *Herbertia* et *Sisyrinchium*), ils couvrent une grande partie de la colonne staminale chez de nombreuses espèces de *Sisyrinchium* où ils peuvent être alors totalement absent des tépales (Cocucci & Vogel, 2011; Rudall et al., 2003; Goldblatt & Manning, 2008).

1.2. Les pollinisateurs

Les relations de mutualisme impliquant les abeilles collectrices de lipides et les plantes à fleurs productrices de cette ressource concernent des abeilles solitaires hautement spécialisées appartenant à quelques genres répartis dans deux familles : les Melittidae et les Apidae (*sensu* Michener, 2007). Les abeilles collectrices de lipides floraux ont développé au cours de l'évolution un ensemble de structures spécialisées situées sur leurs pattes ou leur abdomen.

1.2.1. Abeilles collectrices de lipides

Les abeilles solitaires qui présentent à la fois ce type de structures morphologiques complexes et un comportement adapté à la récolte des lipides floraux sont réparties à l'intérieur de quatre tribus de la famille des Apidae (Centridini, Ctenoplectrini, Tapinotaspidini et Tetrapediini) et deux genres de la sous-famille des Melittinae (Melittidae). Elles représentent moins de 2% de la richesse spécifique des abeilles à travers le monde (Buchmann, 1987; Cocucci et al., 2000). L'utilisation des lipides floraux est un caractère qui est probablement apparu indépendamment dans chacune de ces tribus et sous-familles, de manière concomitante avec les apparitions indépendantes de structures florales productrices de lipides dans les différentes familles d'angiospermes concernées (Vogel, 1974, 1988; Renner & Schaefer, 2010).

1.2.2. Structures spécialisées pour la collecte des lipides

Les abeilles collectrices de lipides possèdent différents types d'organes spécialisés grâce auxquelles elles peuvent récolter les lipides et les transporter jusqu'à leur nid, parfois mélangés avec du pollen. Les détails morphologiques de ces structures ont été discutés par Vogel (1966 à 1990), Neef & Simpson (1981), et Cocucci et al. (2000). A la différence du nectar récolté à l'aide des organes buccaux des abeilles, les lipides floraux sont collectés au niveau des pattes ou de l'abdomen des abeilles spécialisées, et ces parties du corps sont recouvertes par des soies ou des peignes dont les fonctions d'abrasion et d'absorption sont particulièrement adaptées à la récolte de cette ressource (Vogel, 1974; Buchmann, 1987).

Seuls deux genres possèdent ce type de structure à l'intérieur de la famille des Melittidae : *Macropis* et *Rediviva*. Le premier compte 15 espèces d'abeilles de taille petite à moyenne (7 à 12 mm) réparties sur l'ensemble de la zone Holarctique (Néarctique + Paléarctique), toutes dépendantes de la collecte de lipides floraux et du pollen de *Lysimachia* pour nourrir leurs larves (Celary, 2004; Dötterl & Schäffler, 2007; Michener, 2007). Les femelles possèdent plusieurs adaptations morphologiques pour la collecte et le transport des lipides (Fig. 3 - C). Ces structures sont constituées de courts et denses poils situés sur la surface de l'ensemble des mésomédiotarses des pattes mésothoraciques (pattes médianes) et de longues et fines soies distribuées sur le tibia et le métabasitarse des pattes métathoraciques (pattes postérieures). La récolte des lipides floraux est réalisée à l'aide des pattes médianes. L'abeille récolte aussi le pollen qu'elle mixe avec les lipides, l'ensemble étant ensuite transféré et stocké sur les soies des pattes postérieures (Celary, 2004).

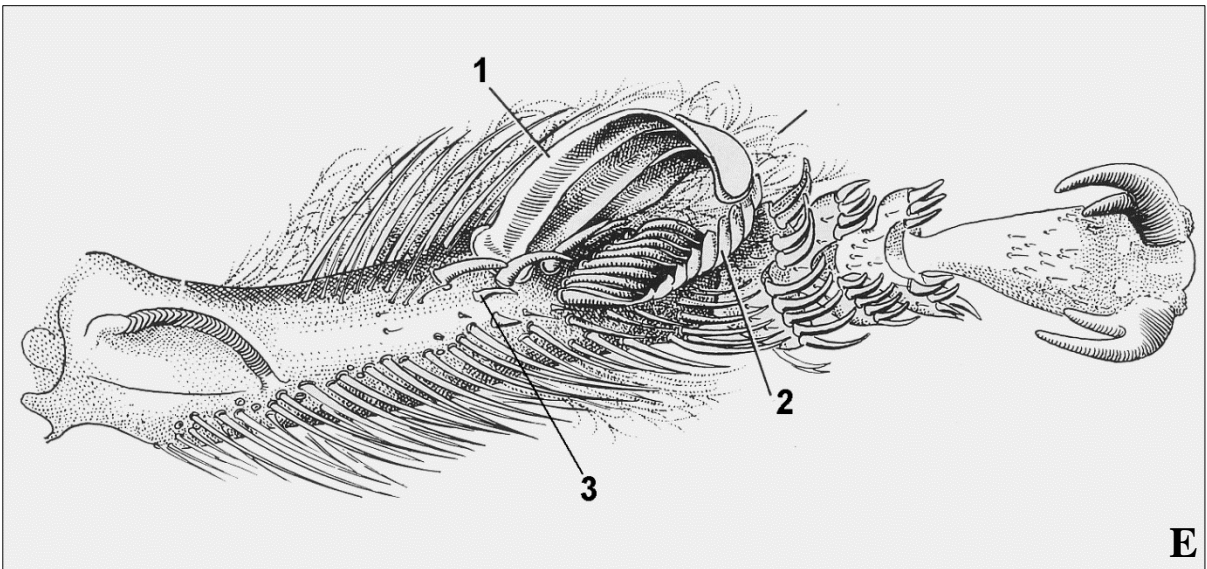
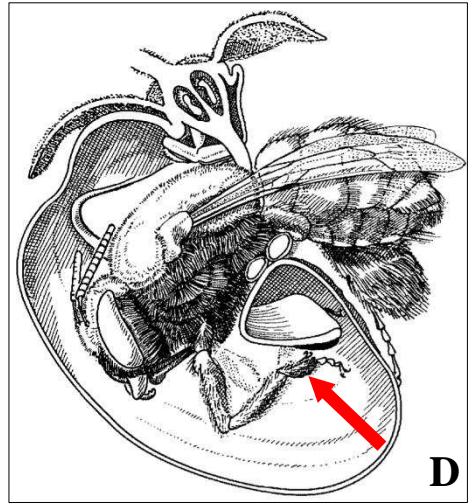
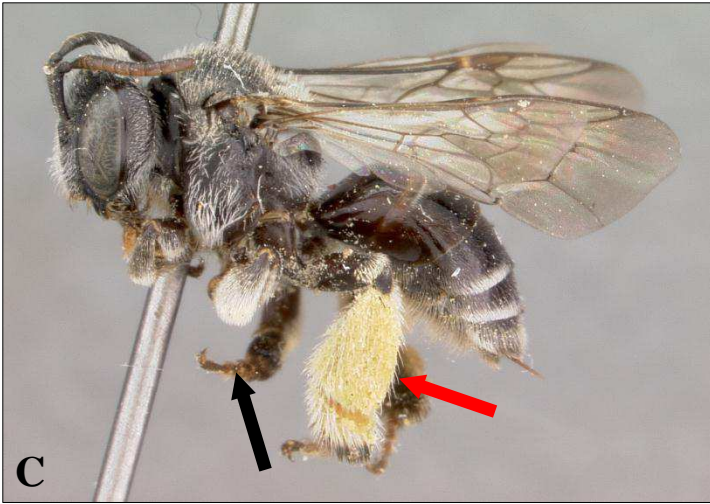
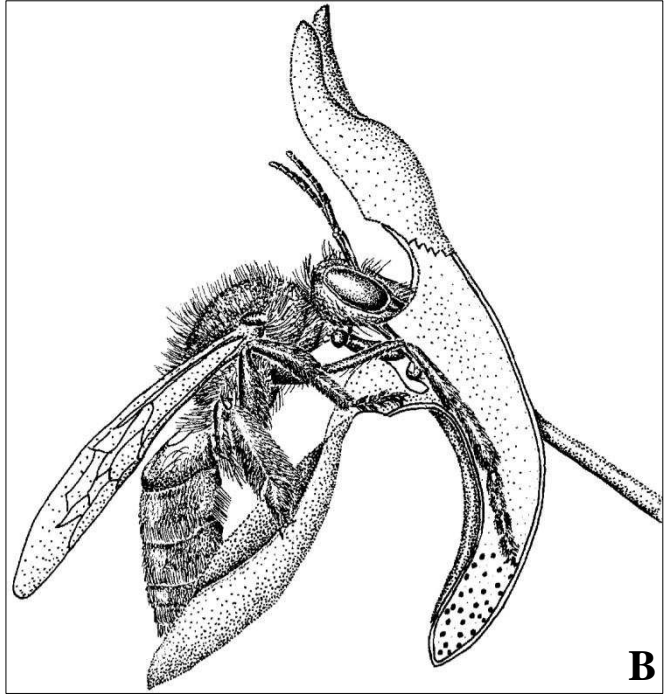


Figure 3. Abeilles collectrices de lipides de la famille des Melittidae et des Apidae. (A-B) Abeilles collectrices de lipide du genre *Rediviva* (Melittidae: Melittinae). (A) Femelle de *Rediviva emdeorum* Vogel & Michener, montrant l'allongement des pattes prothoraciques (pattes antérieures) servant à atteindre les élaïophores situés dans les éperons des fleurs du genre *Diascia* (Scrophulariaceae), d'après Michener (2007). (B) Femelle de *Rediviva* sp. collectant les lipides dans une fleur de *Diascia* sp. (Steiner & Whitehead, 1990). (C) Femelle de *Macropis* sp. (Melittidae: Melittinae) montrant la position des poils sur les mésomédiotarses des pattes mésothoraciques (pattes médianes - flèche noire) servant à la collecte des lipides floraux produits par les élaïophores de *Lysimachia* sp. (Myrsinaceae), et le développement des soies sur le tibia et le métabasitarse des pattes métathoraciques (pattes postérieures - flèche rouge) utilisées pour le transport de ces lipides. (D) Femelle de *Centris autrani* Vachl. (Apidae: Centridini) pénétrant dans une fleur de *Calceolaria* sp. (Calceolariaceae) pour atteindre les élaïophores situés dans le repliement du lobe médian de la lèvre inférieure de la fleur. Les pattes antérieures couvertes de soies modifiées (flèche) sont utilisées pour la collecte des lipides (Vogel, 1974). (E) Vue partielle d'une patte antérieure de femelle de *Centris autrani* Vachl. montrant la présence de soies modifiées servant à collecter les lipides sur le basitarse : (1) organe crochet, (2) peigne réduit, (3) surface de soies courtes et rigides (Vogel, 1974).

Les abeilles femelles du genre *Macropis* utilisent en outre ces lipides floraux pour tapisser l'intérieur des cellules du nid souterrain où sont élevées les larves, probablement pour en imperméabiliser l'intérieur (Cane et al., 1983; Buchmann, 1987).

Le genre *Rediviva* (Fig. 3 - A & B) est distribué en Afrique du Sud et au Lesotho et compte 23 espèces de taille moyenne (10 à 17 mm) qui collectent probablement toutes des lipides dans les fleurs de quatre familles d'angiospermes (Iridaceae, Orchidaceae, Stilbaceae et Scrophulariaceae) présentes dans cette région du globe. A l'intérieur du genre, les espèces présentent des variations concernant les adaptations morphologiques liées à ce comportement (Steiner & Whitehead, 1988; Steiner, 1998; Manning & Goldblatt, 2002; Steiner & Whitehead, 2002, Michener, 2007). Les femelles de la plupart des espèces possèdent une zone de soies spatulées destinées à la collecte des lipides, densément réparties sur l'ensemble des tarsi des pattes antérieures, mais quelques espèces possèdent aussi ce type de structures sur les tarsi des pattes médianes (Steiner & Whitehead, 1996). De plus, tout comme dans le cas de *Macropis*, de longues et fines soies distribuées sur le tibia et le métabasitarse des pattes postérieures sont utilisées pour stocker et transporter les lipides.

Les abeilles du genre *Rediviva* transfèrent ainsi les lipides collectés vers les pattes postérieures pour les transporter jusqu'à leur nid souterrain où ils sont utilisés pour nourrir les larves et probablement aussi pour imperméabiliser les cellules où sont élevées les larves (Dumri et al., 2008).

En outre, les femelles de la majorité des espèces possèdent des pattes antérieures plus ou moins allongées et spécialement adaptées pour exploiter les élaïophores situés au fond des éperons des fleurs du genre *Diascia* (Scrophulariaceae). Parmi l'ensemble des familles d'abeilles, *Rediviva* est le seul genre où ce type d'adaptation est apparu au cours de

l'évolution (Steiner & Whitehead, 1991). L'allongement des pattes antérieures suivant les espèces semble directement relié au type de fleur qu'elles pollinisent (Steiner & Whitehead, 1991). Fortement prononcé pour les espèces visitant les fleurs de *Diascia*, dont l'éperon est particulièrement profond, il diminue en fonction de la profondeur à laquelle se trouvent les élaïophores à l'intérieur de la fleur (Steiner & Whitehead, 1996; Steiner & Whitehead, 2002; Manning & Goldblatt, 2005). Des variations de la longueur des pattes antérieures ont été mises en évidence entre populations de la même espèce de *Rediviva*, liées aux variations de la profondeur des éperons entre populations pour une même espèce de *Diascia* (Steiner & Whitehead, 1990). L'ensemble de ces observations semble indiquer une coévolution très étroite entre non seulement la morphologie des fleurs possédant des élaïophores, mais aussi la position de ces derniers à l'intérieur de la fleur, et l'allongement des pattes antérieures chez *Rediviva* (Vogel, 1974; Steiner & Whitehead, 1990; Steiner & Whitehead, 1991; Steiner & Whitehead, 1996, Machado, 2004, Michener, 2007).

La famille des Apidae renferme la grande majorité des espèces d'abeilles solitaires collectant des lipides floraux, principalement dans la zone biogéographique néotropicale du continent américain. Les interactions entre espèces d'abeilles spécialisées et espèces d'angiospermes produisant ces lipides sont nettement plus développées dans cette région, à la fois en terme du nombre d'espèces concernées mais aussi en terme de complexité et de diversité des relations établies entre les partenaires impliqués dans ces interactions (Cocucci et al., 2000; Steiner & Whitehead, 2002; Renner & Schaefer, 2010).

Ctenoplectrini : le genre *Ctenoplectra* est le seul représentant de la famille spécialisé dans la collecte des lipides floraux et dont l'aire de répartition se situe en dehors du continent américain. Les 24 espèces composant ce genre sont réparties de façon disjointe : elles sont présentes en Afrique, du Liberia jusqu'à l'Afrique du Sud, en Asie, de l'extrême Est de la Russie à Taiwan et aux Philippines, et en Océanie, de la Nouvelle-Guinée au Nord de l'Australie (Michener, 2007). *Ctenoplectra* a uniquement été observé collectant les lipides des fleurs de Cucurbitaceae (genres *Momordica* et *Thladiantha*). Les abeilles de ce genre utilisent des structures spécialisées développées sur les pièces abdominales (principalement les sternites S4 et S5 du sternum métasomal) pour récolter les lipides sécrétés par les trichomes présents à la base des pétales (Vogel, 1981b; Vogel, 1990a; Roubik, 1992; Rasmussen, 1999; Michener, 2007). Le genre, composé d'abeilles de taille plutôt petite (4,5 à 15 mm), se caractérise par l'absence de structures modifiées sur les pattes antérieures ou médianes,

contrairement à ce qui est généralement observé pour les autres genres d'abeilles solitaires spécialisées dans la collecte des lipides floraux (Buchmann, 1987, Michener, 2007). Les femelles possèdent un éperon en forme de peigne sur le tibia des pattes postérieures, utilisé pour récupérer et stocker pendant le transport les lipides absorbés par plusieurs surfaces de soies très denses localisées sous l'abdomen. L'abeille balance son abdomen dans un mouvement de va-et-vient pendant qu'elle se déplace sur les élaïophores, facilitant ainsi l'absorption des lipides par les soies. Durant la récolte, elle transfère au fur et à mesure les lipides absorbés vers les pattes postérieures en utilisant directement le peigne modifié situé sur le tibia de celles-ci (Vogel, 1981b; Roubik, 1992). Par ailleurs, il a été mis en évidence que certaines espèces de *Ctenoplectra* collectent non seulement les lipides floraux, mais aussi le pollen et le nectar des fleurs de *Thladiantha* qu'elles visitent, ces trois ressources ayant été retrouvées dans la nourriture destinée aux larves (Vogel, 1981b; Sung et al., 2009). En sus d'être destinés à nourrir les larves, les lipides entrent aussi dans la composition des matériaux de construction des nids, situés généralement dans des cavités aériennes creusées dans le bois, probablement pour imperméabiliser les cellules où se développent les larves (Sung et al., 2009).

Centridini : l'ensemble des 32 espèces du genre *Epicharis* et environ 40% des espèces du genre *Centris* (environ 145 espèces) collectent des lipides floraux. Leur aire de répartition couvre la région néotropicale, le Mexique et le sud-ouest des États-Unis (Michener, 2007). Ce sont des abeilles de taille moyenne à grande (9 à 32 mm) et elles constituent le principal pollinisateur des espèces possédant des élaïophores dans les familles des Calceolariaceae, Krameriaceae, Malphiaceae et Plantaginaceae. Elles font aussi partie du cortège des pollinisateurs des Orchidaceae, des Solanaceae et de quelques Iridaceae sur le continent américain (Vogel, 1974; Simpson & Neff, 1981; Simpson, 1982; Buchmann, 1983; Simpson, 1989; Vogel, 1990b; Cocucci, 1991; Vogel & Machado, 1991; Machado et al., 2002; Machado, 2004; Sigrist & Sazima, 2004; Michener, 2007; Stipiczyńska & Davies, 2008; Cosacov et al., 2009; Davies & Stipiczyńska, 2009; Renner & Schaefer, 2010).

Les femelles du genre *Epicharis* possèdent un peigne abrasif le long du basitarse des pattes antérieures et médianes formé de 30 à 40 soies simples, larges, érigées, rigides et recourbées à leur extrémité. Moins développées, ces structures sont aussi présentes chez les mâles mais sont considérées comme vestigiales car seules les femelles exploitent les élaïophores grâce à ces peignes (Neff & Simpson, 1981). La présence de ces structures sur les deux premières

paires de pattes, associée au fait que les abeilles du genre *Epicharis* exploitent exclusivement les élaïophores de type épithélial au sein de la famille des Malpighiaceae, semble indiquer une adaptation particulière à la collecte simultanée des lipides à partir des quatre paires d'élaïophores présentes sur les sépales des fleurs de la plupart des espèces de cette famille (Vogel, 1974; Neff & Simpson, 1981; Gaglianone, 2000; Machado, 2004).

La structure et la composition du peigne abrasif sont constantes au sein du genre *Epicharis* alors qu'il existe de nombreuses variations au sein du genre *Centris* (Neff & Simpson, 1981). Les pattes antérieures des femelles collectrices des lipides floraux possèdent aussi un peigne abrasif le long du basitarse, composé de 30 à 40 soies du même type que celles décrites pour le genre *Epicharis*. Plusieurs espèces possèdent en outre un peigne identique sur le basitarse des pattes médianes (Neff & Simpson, 1981). Cette structure est complétée sur les pattes antérieures par un organe appelé "kaputzorgane" (*sensu* Vogel, 1974), ou organe crochet, en position opposée au peigne et constitué d'une série de deux à cinq soies élargies et spatulées. Cet organe n'existe qu'au sein du genre *Centris* et semble lui aussi impliqué dans la collecte des lipides. Enfin, il y a entre le peigne et l'organe crochet une série de soies courtes et rigides dont la fonction est probablement d'ouvrir la cuticule qui renferme les lipides (Neff & Simpson, 1981). Ces soies sont aussi présentes sur le basitarse des pattes médianes de certaines espèces.

Les abeilles du genre *Centris* qui possèdent l'ensemble de ces organes spécialisés collectent des lipides produits à partir d'élaïophores de type épithélial, comme ceux que l'on observe chez les Malpighiaceae et les Krameriaceae (Fig. 4 - A & E). Dans ce cas les lipides sont stockés sous une cuticule épaisse et il est probable que la conjonction de ces adaptations joue un rôle dans son ouverture (Simpson et al., 1990). De plus, la présence de ces structures à la fois sur les pattes antérieures et médianes permet aux abeilles du genre *Centris* qui en sont pourvues de collecter simultanément les lipides sur l'ensemble des quatre paires d'élaïophores des Malpighiaceae, comme c'est le cas pour les abeilles du genre *Epicharis*.

Par ailleurs, certaines espèces sont pourvues de peignes plus courts et plus petits sur les pattes antérieures, qui peuvent être totalement absents des pattes médianes, et présentent un élargissement apical plus ou moins important de l'organe crochet (Neff & Simpson, 1981; Vogel & Machado, 1991; Rasmussen, 1999). Ces dernières sont plus particulièrement associées à la collecte des lipides à partir d'élaïophores de type trichome comme ceux que l'on observe parmi les espèces de Calceolariaceae, d'Iridaceae ou de Plantaginaceae (Fig. 3 - D & E, Fig. 4 - E). L'exploitation des élaïophores de type trichome dans les deux dernières

familles nécessite à la fois des mouvements d'abrasion verticaux et circulaires, mouvements inverses de ceux employés pour exploiter les élaïophores de type épithélial des Malpighiaceae et des Krameriaceae, ce qui pourrait expliquer les différences de taille observées de l'organe crochet (Neff & Simpson, 1981). D'autre part, dans le cas des élaïophores de type trichome, les lipides sont sécrétés à l'air libre dans la plupart des cas ou la cuticule protectrice sous laquelle ils sont accumulés est nettement plus fine que dans le cas des élaïophores de type épithélial. Leur exploitation ne nécessite donc pas que les structures de collecte détiennent un pouvoir d'abrasion aussi important, ce qui pourrait expliquer la réduction de la taille du peigne (Neff & Simpson, 1981).

Enfin, les espèces du genre *Centris* qui exploitent les lipides floraux produits par les élaïophores de type trichome des Calceolariaceae possèdent un peigne extrêmement réduit sur les pattes antérieures, associé à un organe crochet particulièrement développé, ainsi qu'à une réduction complète du peigne sur les pattes médianes. La morphologie florale des espèces de la famille des Calceolariaceae et la position des élaïophores à l'intérieur des fleurs suggèrent que les abeilles de grande taille du genre *Centris* ne peuvent utiliser les pattes médianes pour exploiter les lipides floraux (Fig. 3 - D) et que les mouvements des pattes antérieures lors de la collecte doivent être inversés par rapport aux mouvements nécessaires pour exploiter les élaïophores de type épithélial des Malpighiaceae et des Krameriaceae (Neff & Simpson, 1981).

Ces variations des organes adaptés à la collecte des lipides floraux restreignent probablement les interactions entre ces abeilles et les fleurs produisant des lipides à l'un ou l'autre des types d'élaïophores (Vogel, 1974; Neff & Simpson, 1981; Simpson et al., 1990; Vogel & Machado, 1991).

Comme pour les groupes d'abeilles précédents, le stockage et le transport des lipides par les abeilles femelle des genres *Epicharis* et *Centris* s'effectuent sur les pattes postérieures en utilisant directement le peigne modifié situé sur le tibia et le metabasitarse (Steiner, 1982), les lipides étant généralement transférés latéralement pendant le vol de retour vers le nid (Neff & Simpson, 1981). Les lipides sont généralement mélangés avec du pollen de la même source, mais pouvant aussi provenir d'autres sources, et parfois avec du nectar provenant toujours de sources différentes car les espèces productrices d'huiles florales visitées ne produisent quasiment jamais de nectar (Steiner, 1982; Teixeira & Machado, 2000). Les abeilles des genres *Epicharis* et *Centris* semblent utiliser ce mélange afin de nourrir leurs larves (Vogel,

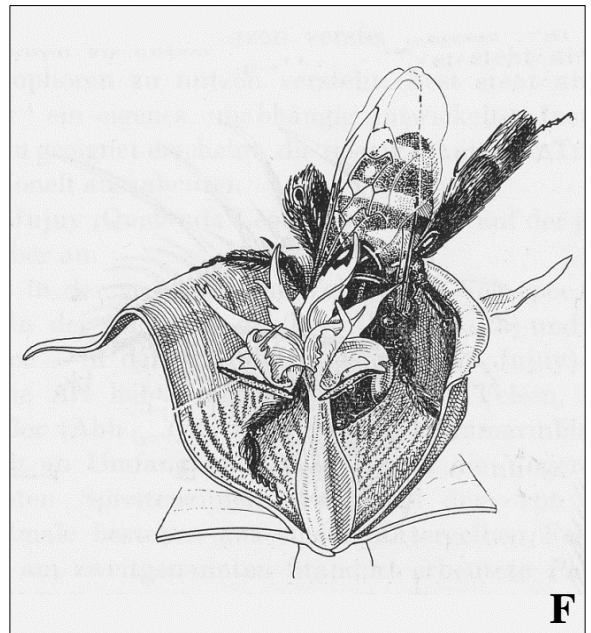
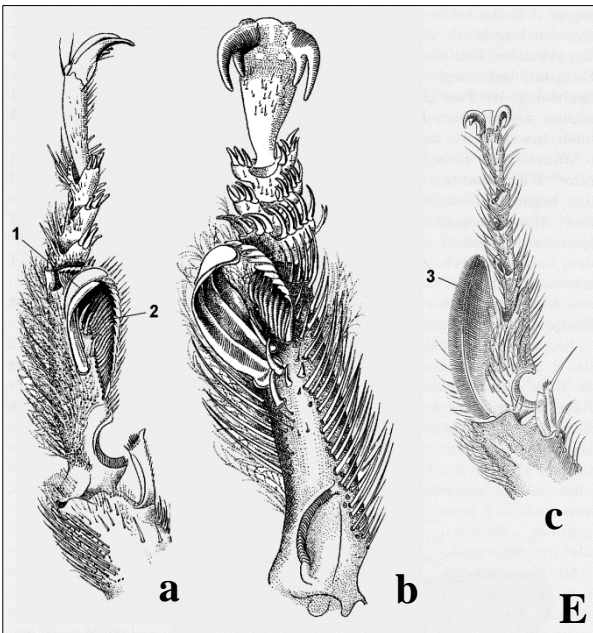
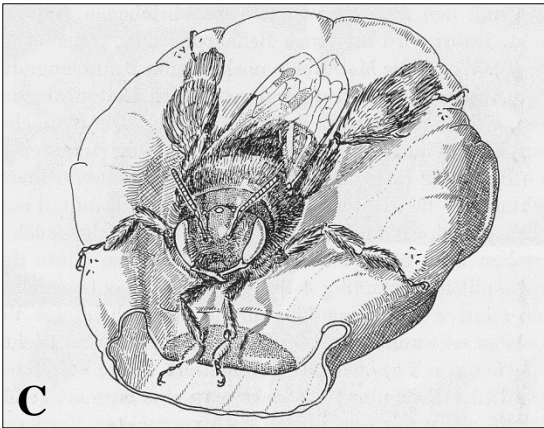
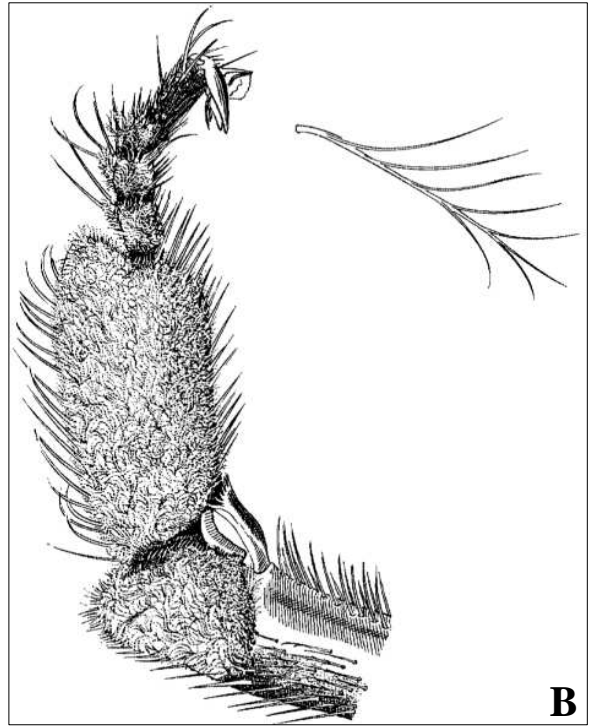
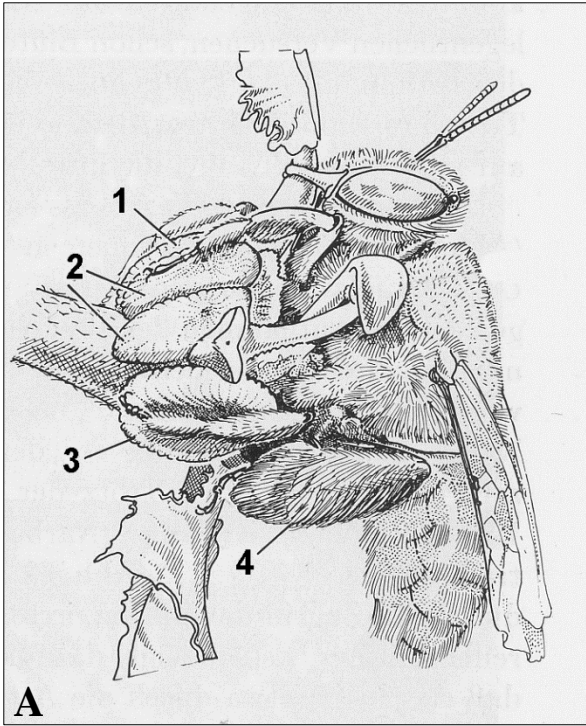


Figure 4. Abeilles collectrices de lipides de la famille des Apidae. (A) Femelle de *Centris trigonoides* Lepeltier (Apidae: Centridini) exploitant les élaïophores de type épithélial de *Stigmatophyllum littorale* Juss. (Malpighiaceae) : (1) paire d'élaïophores n°1, (2) paire d'élaïophores n°2, (3) paire d'élaïophores n°3, (4) organe de stockage des lipides sur les pattes postérieures (Vogel, 1974). (B) Vue partielle d'une patte antérieure de femelle de *Chalepogenus coeruleus* (Friese) (Apidae: Tapinotaspidini) montrant la présence de soies modifiées servant à collecter les lipides sur le basitarse (Vogel, 1974). (C) Femelle de *Chalepogenus coeruleus* (Friese) exploitant les élaïophores de type trichome de *Calceolaria filicaulis* Clos. (Calceolariaceae) avec ses pattes antérieures (Vogel, 1974). (D) Vue partielle d'une patte antérieure de femelle de *Lanthanomelissa discrepans* Holmberg (Apidae: Tapinotaspidini) montrant le développement de peignes à écailles très nombreuses sur le basitarse (Roig-Alsina, 1997). (E) Comparaison des structures de collecte des lipides floraux sur les pattes antérieures de (a) *Centris trigonoides* Lepeltier, exploitant des élaïophores de type épithélial (b) *Centris autrani* Vachl., exploitant des élaïophores de type trichome, (c) *Paratetrapedia* sp. (Apidae: Tapinotaspidini), exploitant préférentiellement des élaïophores de type épithélial : (1) organe crochet, (2) peigne, (3) peigne adapté à l'exploitation des élaïophores de type épithélial (Vogel, 1974). (F) Femelle de *Paratetrapedia melampoda* Moure exploitant les élaïophores de type trichome d'*Ennealophus euryandrus* (Griseb.) Ravenna (Iridaceae) à l'aide de ses pattes antérieures (Vogel, 1974).

1974; Neff & Simpson, 1981; Steiner, 1982; Gimenez & Lobão, 2006; Michener, 2007), mais sont aussi susceptibles d'utiliser les lipides floraux collectés pour la construction de leur nid situés dans des orifices préexistants dans le bois ou dans le sol, la localisation étant variable suivant les genres et les espèces (Vogel, 1974; Neff & Simpson, 1981; Simpson, 1989; Vinson et al., 1996).

Tapinotaspidini : c'est certainement la tribu la plus diversifiée en terme de nombre de genres et de variété des adaptations à la collecte des lipides floraux au sein de la famille des Apidae (Neff & Simpson, 1981; Roig-Alsina, 1997). Les principales informations concernant les différents genres sont récapitulées dans le Tableau 1.

Excepté les abeilles du genre *Tapinotaspoides* qui collectent des lipides extra-floraux, l'ensemble des espèces de Tapinotaspidini présente ce type de comportement et les huit genres qui composent cette tribu sont exclusivement répartis dans la région néotropicale (Michener, 2007). Ce sont des abeilles de taille plutôt petite (4,2 à 14 mm) dont les structures adaptées à la collecte des lipides floraux peuvent être situées tant sur les pattes antérieures, que les pattes médianes ou les sternites de l'abdomen des femelles (Neff & Simpson, 1981; Roig-Alsina, 1997). Par ailleurs, le tibia des pattes postérieures est, quel que soit le genre, couvert d'un mélange de soies raides, ramifiées ou non, adaptées au stockage et au transport des lipides (Roig-Alsina, 1997). Les lipides sont transférés des organes de collecte aux organes de stockage soit durant la collecte elle-même (*Chalepogenus*, sous-genre *Chalepogenus*, *Tapinotaspoides*), soit lorsque la collecte est terminée (*Chalepogenus*, sous-genre *Lanthanomelissa*), soit durant le vol de retour au nid (*Tapinotapsis*) (Cocucci et al., 2000).

Tableau 1. Récapitulatif des principales informations concernant les abeilles collectrices de lipides floraux au sein de la tribu des Tapinotaspidini.

Genre	Nombre d'espèces	Localisation des structures de collecte des lipides	Familles d'angiospermes exploitées pour la collecte des lipides	
			Hôtes majoritaires	Hôtes rares ou illégitimes
<i>Arhysoceble</i>	5	P.A.	Iridaceae Solanaceae	Krameriaceae Malpighiaceae Plantaginaceae
<i>Caenonomada</i>	3	P.A.	Iridaceae Plantaginaceae	
<i>Chalepogenus</i> :				
- Sous-genre <i>Chalepogenus</i>	21	P.A.	Calceolariaceae Iridaceae Solanaceae	Malpighiaceae
- Sous-genre <i>Lanthanomelissa</i>	5	P.A.	Iridaceae	
<i>Monoeca</i>	6	P.A. + P.M.	Malpighiaceae	
<i>Paratetrapedia</i>	29	P.A.	Krameriaceae Malpighiaceae	Iridaceae Orchidaceae Plantaginaceae
<i>Tapinotaspis</i>	3	P.M.	Solanaceae	
<i>Tapinotaspoides</i>	4	A.	Commelinaceae Convolvulaceae Cyperaceae Malvaceae Melastomataceae Sterculiaceae	
<i>Trigonopedia</i>	4	P.A.	Malpighiaceae	

Notes : P.A. = pattes antérieures, P.M. = pattes médianes, A. = abdomen. Le type d'élaïophores (lipides floraux) exploités par les abeilles au sein des différentes familles d'angiospermes est indiqué par la couleur du nom de chaque famille (rouge = élaïophores de type épithélial, bleu = élaïophores de type trichome). La couleur noire indique les familles d'angiospermes visitées pour la récolte de lipides extra-floraux.

Les structures de collectes sont constituées de peignes de soies simples, recourbées à leur extrémité, associés à des surfaces adjacentes de fines soies branchées (Fig. 4 - B & D). Des soies courtes et épaissies servant probablement à racler la surface des élaïophores sont aussi présentes (Vogel, 1974; Cocucci et al., 2000). Dans plusieurs genres, des lignes ou des

surfaces de soies élargies et recourbées à l'extrémité viennent compléter ce dispositif au niveau du probasitarse des pattes antérieures. Présentes uniquement sur les pattes antérieures des espèces des genres *Chalepogenus* (en incluant les espèces anciennement regroupée dans le genre *Lanthanomelissa*), *Caenonomada*, *Arhysoceble*, *Trigonopedia* et *Paratetrapedia*, les structures spécialisées dans la collecte des lipides sont présentes à la fois sur les pattes antérieures et les pattes médianes des six espèces d'abeilles du genre *Monoeca* (Cocucci et al., 2000). La présence de ces structures à la fois sur les pattes antérieures et médianes est comparable à ce qui a été observé au sein du genre *Centris*. Les abeilles du genre *Monoeca* étant particulièrement associée à la récolte des lipides sur les fleurs de Malpighiaceae (Sigrist & Sazima, 2004; Rozen et al., 2006), il pourrait donc s'agir d'une évolution convergente (Neff & Simpson, 1981; Gottseberger, 1996; Cocucci et al., 2000).

Les structures de collecte des lipides floraux sont totalement absentes des pattes antérieures des trois espèces du genre *Tapinotaspis* et seules les basi- et méditarses des pattes médianes sont densément couvertes par de longues soies élargies (Neff & Simpson, 1981; Cocucci, 1991; Cocucci et al., 2000). Il semble que ce groupe d'abeilles soit particulièrement adapté pour exploiter les élaïophores de type trichome des Solanaceae (Cocucci, 1991; Cosacov et al. 2008), la plupart des observations indiquant que les espèces du genre *Tapinotaspis* établissent préférentiellement des interactions avec les espèces du genre *Nierembergia* (Cocucci, 1991; Cosacov et al., 2008). Les trichomes sont éparpillés au centre de la corolle qui constitue une large surface plane, où l'abeille se déplace en balayant la surface des élaïophores avec ses pattes médianes par des mouvements d'avant en arrière (Cocucci, 1991; Cocucci et al., 2000).

Le genre *Tapinotaspoides* se démarque totalement des autres Tapinotaspidini par l'absence totale de structures spécialisées sur les pattes antérieures et médianes. Par contre, d'étroites lignes de longues soies forment des peignes sur les sternites de l'abdomen (Roig-Alsina, 1997). Les observations montrent que les quatre espèces qui composent ce genre récoltent des lipides extra-floraux sécrétés par des trichomes situés sur les tiges ou les inflorescences d'espèces appartenant à six familles différentes d'angiospermes, sans rapport avec les familles dans lesquelles on observe la sécrétion de lipides floraux (Melo & Gaglianone, 2005), ce qui pourrait expliquer la différence de structure observée.

Le développement de structures spécialisées sur les pièces abdominales et le comportement lors de la collecte n'est pas sans rappeler ceux des abeilles du genre *Ctenoplectra*, les femelles balançant leur abdomen dans un mouvement de va-et-vient pendant qu'elles se déplacent sur les surfaces de trichomes glandulaires, facilitant ainsi l'absorption des lipides par les soies

(Cocucci et al., 2000; Melo & Gaglianone, 2005). Il pourrait aussi s'agir d'une évolution convergente, des transitions vers le développement de ces structures s'étant très probablement produites au sein des deux tribus (Neff & Simpson, 1981; Cocucci et al., 2000).

Les structures spécialisées observées sur les femelles des Tapinotaspidini se retrouvent généralement aussi chez les mâles mais beaucoup moins développées et leur rôle n'est pas clairement identifié (Roig-Alsina, 1997; Rasmussen, 1999), ou ces structures sont considérées comme non fonctionnelles (Michener, 2007).

Les lipides sont collectés probablement uniquement pour nourrir les larves et peuvent être mélangés à du pollen provenant de la même source ou de sources extérieures (Vogel, 1974; Cocucci et al., 2000; Cocucci & Vogel, 2001; Aguiar & Melo, 2009).

Tous les genres de la tribu des Taspinotaspidini ayant développés les structures collectrices de lipides décrites ci-dessus uniquement sur les pattes antérieures ont établi des interactions quasi exclusivement avec des groupes de plantes à fleurs produisant des lipides floraux à partir d'élaïophores de type trichome (Buchmann, 1987; Roig-Alsina, 1997; Cocucci et al., 2000; Aguiar & Melo, 2009; Machado, 2004; Pansarin & Pansarin, 2011). En effet ces structures sont majoritairement dédiées à l'absorption des lipides et leur pouvoir d'abrasion est réduit comparativement à ce que l'on observe au sein de la tribu des Centridini (Vogel, 1974; Neff & Simpson, 1981; Roig-Alsina, 1997; Rasmussen, 1999; Machado, 2004). Les sécrétions des élaïophores de type trichome étant directement accessibles ou, comme dans le cas des Iridaceae, stockées sous une cuticule beaucoup plus fine que la cuticule observée dans le cas des élaïophores de type épithélial, il est probable qu'il existe une relation entre le pouvoir abrasif des structures de collecte des lipides présentent chez les abeilles et le type d'élaïophores qu'elles peuvent exploiter (Vogel, 1974). Néanmoins cette relation n'est pas stricte et il existe de nombreuses exceptions (Vogel, 1974; Sazima & Sazima, 1989; Texeira & Machado, 2000; Aguiar & Melo, 2009).

Ainsi, les espèces du genre *Chalepogenus* (sous-genre *Chalepogenus* - 21 espèces) exploitent les élaïophores de type trichome des Iridaceae, des Calceolariaceae et des Solanaceae (Vogel, 1974; Molau, 1988; Cocucci, 1991; Schlindwein, 1998, Rasmussen, 1999; Roig-Alsina, 1999; Cocucci et al., 2000; Cosacov et al., 2009) mais aussi, bien que rarement, les élaïophores de type épithélial de Malpighiaceae (Aguiar & Melo, 2009).

Seuls les élaïophores de type trichome des Iridaceae sont exploités par les cinq espèces du sous-genre *Lanthanomelissa* (Roig-Alsina, 1997; Schlindwein, 1998; Cocucci & Vogel,

2001). De même les abeilles du genre *Caenomada* (trois espèces) ont uniquement été observées exploitant les élaïophores de type trichome des Iridaceae et des Plantaginaceae (Cocucci et al., 2000; Aguiar & Melo, 2009).

La principale source de lipides floraux exploitée par les abeilles du genre *Arhysoceble* (5 espèces) se situe au sein de la famille des Iridaceae et des Solanaceae, mais quelques espèces exploitent aussi les élaïophores de type trichome des Plantaginaceae, et exceptionnellement les élaïophores de type épithélial présents chez les Malpighiaceae et les Krameriaceae (Vogel, 1974; Vogel & Machado, 1991; Schlindwein, 1995; Cocucci et al., 2000; Aguiar & Melo, 2009).

Les genres *Paratetrapedia* (29 espèces) et *Trigonopedia* (quatre espèces) se démarquent morphologiquement par la présence sur les pattes antérieures d'un peigne sur la face postérieure du basitarse, nettement plus développé et rigide que celui généralement observé au sein des autres genres de la tribu (Buchmann, 1987; Michener, 2007). L'apparition de cette structure particulière (Fig. 4 - E) pourrait expliquer que les abeilles de ces genres exploitent préférentiellement les élaïophores de type épithélial des Malpighiaceae (*Trigonopedia* et *Paratetrapedia*) et des Krameriaceae (uniquement *Paratetrapedia*), bien que plusieurs espèces du genre *Paratetrapedia* aient aussi été observés exploitant les élaïophores de type trichome des Orchidaceae, des Plantaginaceae et des Iridaceae (Fig. 4 - F) (Buchmann, 1987; Sazima & Sazima, 1989; Simpson, 1989; Vogel & Machado, 1991; Cocucci & Vogel, 1995; Sigrist & Sazima, 2004; Mickeliunas et al., 2006; Stipiczyńska & Davies, 2008; Aguiar & Melo, 2009; Pansarin & Pansarin, 2011).

Tetrapediini : seul le genre *Tetrapedia* présente des structures spécialisées dans la collecte des lipides floraux. Il compte environ 13 espèces d'abeilles de taille petite à moyenne (8 à 13 mm) réparties dans la zone biogéographique néotropicale, du nord de l'Argentine au sud du Mexique (Michener, 2007). Les organes de collecte des lipides floraux observés sur les abeilles du genre *Tetrapedia* montrent de nombreuses similarités avec ceux des genres *Centris* et *Paratetrapedia*. Comme dans le cas des abeilles du genre *Paratetrapedia*, un peigne abrasif est présent sur le basitarse des pattes antérieures des mâles et des femelles, mais est absent des pattes médianes sur les deux sexes et très réduit chez les mâles (Vogel, 1974; Neff & Simpson, 1981, Vogel, 1988, Michener, 2007). Le peigne de *Tetrapedia* diffère de celui de *Paratetrapedia* car il est positionné sur la face antérieure du basitarse, comme c'est le cas au sein du genre *Centris*. De plus, la partie proximale du peigne se courbe pour former une

structure de type crochet analogue à celle observée chez de nombreuses espèces du genre *Centris* (Neff & Simpson, 1981). De même que pour l'ensemble des groupes d'abeilles collectrices de lipides floraux décrits précédemment, des structures spécialisées dédiées au stockage et au transport des ressources collectées sont présentes sur le tibia et le basitarse des pattes postérieures, constituées de nombreuses soies simples et allongées, associées à des surfaces de soies ramifiées (Vogel, 1974; Neff & Simpson, 1981, Michener, 2007).

Les observations montrent que les abeilles femelles du genre *Tetrapedia* exploitent préférentiellement les élaïophores de type épithélial au sein de la famille des Malpighiaceae (Neff & Simpson, 1981; Albuquerque & Rego, 1989; Sazima & Sazima, 1989), les structures de collectes spécialisées semblant plutôt adaptées à l'exploitation de ce type d'élaïophores (Neff & Simpson, 1981). Mais de nombreuses observations montrent que cette relation n'est pas stricte, plusieurs espèces au sein du genre exploitant aussi les élaïophores de type trichome dans la famille des Orchidaceae et exceptionnellement dans les familles des Plantaginaceae et des Iridaceae (Vogel & Machado, 1991; Alves-dos-Santos, 1999; Singer & Cocucci, 1999; Reis et al., 2000; Machado, 2004; Davies & Stipiczynska, 2009).

Les lipides floraux sont collectés et mélangés avec du pollen pour nourrir les larves et sont aussi utilisés avec du sable comme matériau de construction du nid situé dans une cavité du bois (Alves-dos-Santos et al., 2002; Camillo, 2005; Alves-dos-Santos et al., 2006).

1.2.3. Relations plantes-pollinisateurs

Les interactions entre espèces sont à l'origine de nombreux évènements de spéciation, la coévolution plus ou moins étroite des différents partenaires générant le plus souvent une diversité tant taxonomique que génétique à l'intérieur des groupes d'espèces concernées (Ollerton et al., 2006). En conséquence ces interactions jouent généralement un rôle prépondérant dans le fonctionnement de nombreux écosystèmes terrestres et sont certainement responsables de la plus grande part de la diversité rencontrée tant au sein des angiospermes que des hyménoptères. Cependant, les interactions caractérisées par un haut degré d'évolution réciproque entre plantes et pollinisateurs demeurent extrêmement rares dans la plupart des écosystèmes (Minckley & Roulston, 2006).

La production de ressources inhabituelles, comme les lipides floraux, réduit de manière drastique la diversité des visiteurs potentiels. A contrario, les visiteurs qui recherchent cette ressource l'exploitent généralement à partir de sources variées et l'alimentation des larves, qui est dépendante de la disponibilité en lipides floraux, repose rarement sur une seule espèce de

plante (Buchmann, 1987; Cocucci et al., 2000; Machado, 2004). Dans la zone biogéographique néotropicale, où la diversité des espèces d'angiospermes et d'abeilles solitaires impliquées dans ce système de pollinisation est de loin la plus importante, on n'observe ainsi quasiment jamais une relation étroite entre les genres ou les espèces d'abeilles collectrices et un genre particulier, ou même une famille particulière, d'angiospermes (Michener, 2007). Les interactions réciproquement spécifiques sont donc extrêmement rares et il s'agit dans la plupart des cas de relations asymétriques (Minckley & Roulston, 2006).

Les lipides floraux sont considérés comme un substitut aux sucres présents dans le nectar et remplacent généralement ce dernier dans l'approvisionnement alimentaire des larves, sans doute en raison de leur haute valeur énergétique comparée à celle du nectar (Vogel, 1974; Neff & Simpson, 1981; Buchmann, 1987, Michener, 2007). Cependant, la collecte des lipides à partir des fleurs d'angiospermes requiert le développement chez les abeilles concernées de structures et de comportements particulièrement spécialisés qui représentent un coût adaptatif important. Ces contraintes adaptatives pourraient expliquer partiellement pourquoi aussi peu d'espèces d'abeilles ont développé ce type de comportement (Renner & Schaefer, 2010). D'autre part, la spécialisation liée à la collecte des lipides floraux ne concerne que l'alimentation des larves et la construction du nid, les abeilles adultes restant dépendantes d'autres ressources pour assurer leur propre alimentation. Il s'agit donc d'une spécialisation partielle, non seulement de ce point de vue mais aussi du point de vue de l'alimentation larvaire elle-même car les lipides floraux sont généralement récoltés associés à du pollen pouvant provenir d'autres espèces d'angiospermes. Les abeilles impliquées dans la collecte de ces lipides ne sont donc pas strictement spécialisées, et ne peuvent donc être considérées comme monolectiques mais plutôt comme oligolectiques.

L'une des questions fondamentales qui se pose à l'examen de cette relation mutualiste est de comprendre pourquoi elle reste une expérience évolutive relativement limitée tant au sein des hyménoptères que des angiospermes, même si du point de vue de ces derniers le développement des structures productrices de lipides floraux chez les Malpighiaceae, les Iridaceae et probablement les Orchidaceae dans la zone biogéographique néotropicale pourrait traduire le succès évolutif de ce système de pollinisation particulier dans certains écosystèmes (Machado, 2004; Goldblatt & Manning, 2008; Renner & Schaefer, 2010).

1.3. Evolution de la pollinisation avec récompense lipidique parmi les angiospermes

1.3.1. De nombreuses transitions indépendantes chez les plantes à fleurs

La plupart des études portant sur la production de lipides floraux impliqués dans les interactions plantes-pollinisateurs suggèrent (à partir de l'observation des variations des différentes formes d'élaïophores et de leur distribution sur les différentes pièces florales du calice et/ou de la corolle ainsi que des étamines) que ce type de ressource lipidique a évolué de nombreuses fois indépendamment au sein des angiospermes (Vogel, 1974; 1981a,b; Neff & Simpson, 1981; Buchmann, 1987; Vogel, 1988; Rasmussen, 1989; Vogel, 1990a,b; Rasmussen & Olesen, 2000; Machado, 2004). En 2010, Renner & Schaefer ont montré à l'aide des phylogénies disponibles pour les groupes d'angiospermes concernés que la production de lipides floraux aurait évolué au moins 28 fois indépendamment et que parmi les 11 familles identifiées, 1500 à 1800 espèces présentaient ce type de structure. Dans la plupart des ces familles, une seule transition vers la production des lipides floraux s'est produite, hormis au sein des Orchidaceae et des Iridaceae où l'apparition des structures sécrétant des lipides à l'intérieur des fleurs s'est produite plusieurs fois indépendamment (Chase et al., 2009; Renner & Schaefer, 2010).

Ces structures ont donc évolué indépendamment dans chacune des familles (Fig. 5). Dans tous les clades, des reversions vers la perte de ces structures ont été identifiées, sauf probablement chez les Krameriaceae, où la présence d'élaïophores de type épithélial est une synapomorphie du genre *Krameria* (Simpson et al., 2004), et chez les Stilbaceae (Oxelman et al., 2005). Le récapitulatif des transitions et reversions identifiées dans chacune des familles concernées est présenté dans le Tableau 2.

Calceolariaceae : la présence d'élaïophores de type trichome est aussi une synapomorphie du genre *Calceolaria*. les nombreuses reversions identifiées à l'intérieur du genre se sont produites dans des clades dont la distribution géographique concerne des zones où la présence des abeilles collectrices de lipides, et notamment des abeilles des genres *Centris* et *Chalepogenus*, est rare (Cosacov et al., 2009).

Malpighiaceae : la présence d'élaïophores de type épithélial est une synapomorphie pour l'ensemble de la famille (Anderson, 1979, 1990). Les réversions identifiées à la base des clades africains correspondent à l'absence, dans cette zone biogéographique, des abeilles collectrices de lipides pollinisant habituellement les membres américains de la famille (Davies et al., 2004). Par ailleurs, bien que la plupart des Malpighiaceae de la zone

néotropicale soient caractérisées par la présence d'élaïophores, ceux-ci sont absents chez quelques espèces (Anderson, 1979; Vogel, 1990), indiquant l'existence probable de reversions supplémentaires.

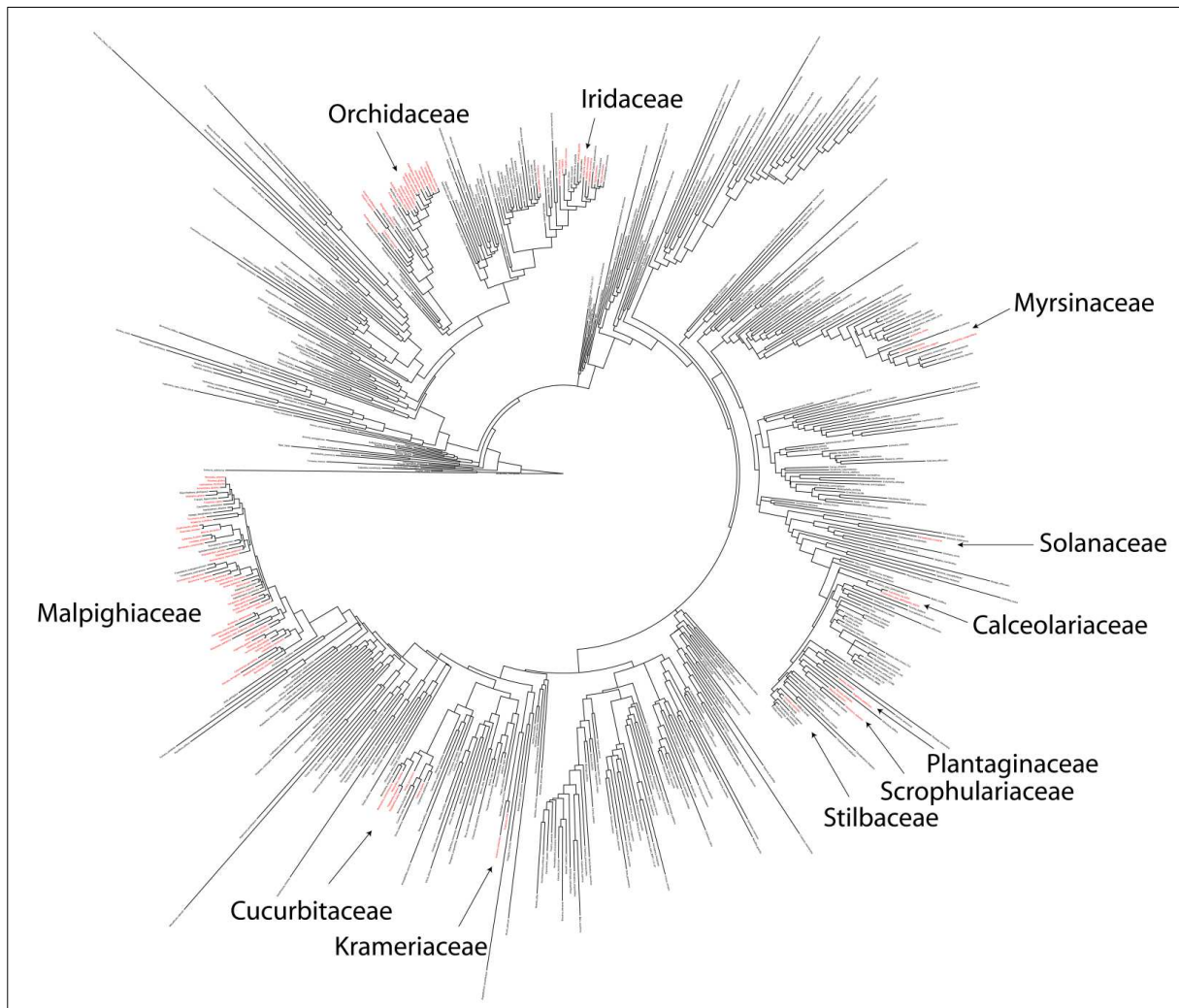


Figure 5. Position phylogénétique des 11 familles d'angiospermes comprenant des espèces produisant des lipides floraux. Phylogénie obtenue par Maximum de Vraisemblance à partir de 626 séquences rbcL représentant 440 familles d'angiospermes. (Renner & Schaefer, 2010).

Myrsinaceae : deux scénarios évolutifs sont suggérés pour la famille, selon que l'on considère que la présence des élaïophores de type trichomes est, ou non, une synapomorphie du genre *Lysimachia*. Dans le premier cas, six reversions se seraient produites ensuite à l'intérieur du clade, alors que dans le second cas, quatre transitions et deux réversions pourraient s'être produites au cours de l'histoire évolutive du genre (Renner & Schaefer, 2010).

Tableau 2. Récapitulatif des transitions vers l'apparition de structures sécrétant des lipides floraux ainsi que des réversions identifiées à l'intérieur des différentes familles d'angiospermes à partir des phylogénies actuelles (d'après Anderson, 1979, 1990; Vogel, 1990; Davies et al., 2004; Simpson et al., 2004; Oxelman et al., 2005; Cosacov et al., 2009; Tate et al., 2009; Renner & Schaefer, 2010).

<i>Aire géographique</i> Famille	Nombre de transitions	Nombre de réversions	Genres (nombre d'espèces ayant développé des structures productrices de lipides / nombre total d'espèces à l'intérieur du genre)
<i>Amérique</i>			
Krameriaceae (E)	1	0	<i>Krameria</i> (18 / 18)
Calceolariaceae (T)	1	14	<i>Calceolaria</i> (c. 49 / c. 260)
Iridaceae (T)	3	?	Nombreux genres de la sous-famille des Iridoideae (au moins 150 espèces, principalement néotropicales / c. 2000 espèces au sein de la famille)
Malpighiaceae (E)	1	Au moins 6	Nombreux genres (c. 1000 espèces, principalement néotropicales / c. 1250 espèces au sein de la famille)
Orchidaceae (E et T)	Au moins 9	?	Nombreux genres au sein de la sous-tribu des Oncidiinae (nombre d'espèces inconnu)
Plantaginaceae (T)	1	Au moins 2	<i>Angelonia</i> (25 / 25) <i>Basistemon</i> (c. 5 / 8) <i>Monopera</i> (2 / 2) <i>Monttea</i> (3 / 3)
Solanaceae (T)	1	Au moins 4	<i>Nierembergia</i> (c. 15 / 21)
<i>Zone Holarctique</i>			
Myrsinaceae (T)	1 ou 4	6 ou 2	<i>Lysimachia</i> (c. 75 / c. 190)
<i>Afrique et Asie tropicale</i>			
Cucurbitaceae (T)	1	Au moins 6	<i>Momordica</i> (? / 50) - Afrique et Asie tropicale <i>Siraitia</i> (c. 4 / c. 4) - Asie tropicale <i>Telfairia</i> (3 / 3) - Asie tropicale <i>Thladiantha</i> (25 / 25) - Asie tropicale <i>Baijania</i> (5 / 5) - Asie tropicale
<i>Afrique</i>			
Iridaceae (E)	1	0	<i>Tritoniopsis</i> (1 / 24)
Orchidaceae (E et T)	Au moins 3	?	Nombreux genres au sein des sous-tribus des Coryciinae et des Satyriinae (nombre d'espèces inconnu)
Scrophulariaceae (T)	1 ou 4	?	<i>Alonsoa</i> (2 / 18) <i>Colpias</i> (1 / 1) <i>Diascia</i> (48 / 48) <i>Hemimeris</i> (4 / 4)
Stilbaceae (T)	1	0	<i>Anastrabe</i> (30 / 30) <i>Bowkeria</i> (5 / 5) <i>Ixianthes</i> (1 / 1)

Notes : Les symboles E et T à la suite des noms des familles indiquent le type d'élaïophores pour chacune d'entre elles. (E) = élaïophores de type épithélial, (T) : élaïophores de type trichome.

Scrophulariaceae : les résultats obtenus concernant l'évolution des élaïophores de type trichome à l'intérieur de la famille par Renner & Schaefer (2010) semblent contradictoires avec ce qu'indique la phylogénie publiée par Oxelman et al. (2005). En effet, alors que les premiers auteurs proposent quatre transitions sans aucun commentaire, la reconstruction de l'histoire évolutive du caractère à partir de la phylogénie obtenue en 2005 par Oxelman et al. suggère que probablement une seule transition s'est produite à la base de la tribu des Hemimerideae, suivi de plusieurs réversions dont il n'est pas possible d'estimer le nombre en l'absence d'une représentativité suffisante des différents genres à l'intérieur du clade.

1.3.2. Deux cas particuliers : Orchidaceae et Iridaceae

Ces deux familles se distinguent des autres famille à la fois par l'existence d'élaïophores de type épithélial et de type trichome parmi les espèces qui les composent, et par le fait que la production de lipides floraux est un caractère apparu plusieurs fois indépendamment au cours de leur histoire évolutive (Vogel, 1974; Manning & Goldblatt, 2002; Goldblatt et al., 2008; Stipiczyńska & Davies, 2008; Renner & Schaefer, 2010).

Orchidaceae : il reste encore actuellement extrêmement difficile d'estimer non seulement le nombre d'espèces concernées par ce système de pollinisation à l'intérieur de la famille, mais aussi le nombre de transitions et de réversions qui se sont produites. En effet de nombreuses interactions entre plantes et pollinisateurs impliqués dans cette relation mutualiste continuent d'être décrites aujourd'hui pour cette famille, particulièrement au sein de la zone biogéographique néotropicale où les Orchidaceae sont extrêmement diversifiées et leur biologie florale demeure mal connue (Reis et al., 2006; Singer et al., 2006; Stipiczyńska et al., 2007; Stipiczyńska & Davies, 2008; Aliscioni et al. 2009; Davies & Stipiczyńska, 2009; Pansarin et al., 2009; Pansarin & Pansarin, 2011). En outre, les phylogénies proposées pour les Orchidaceae restent trop incomplètes pour réaliser une reconstruction robuste de l'histoire évolutive des élaïophores à l'intérieur de ce clade, et Renner & Schaefer (2010) suggèrent que la famille pourrait abriter en réalité un nombre bien plus important que les 12 transitions actuellement identifiées.

Iridaceae : en se basant sur la phylogénie moléculaire des Iridaceae publiée par Goldblatt et al. (2008), trois transitions vers le développement de structures florales de type élaïophore se seraient produites au cours de l'histoire évolutive de la famille. L'une a conduit à l'apparition d'élaïophores de type épithélial au sein de la sous-famille des Crocoideae. Les deux autres se

sont produites à l'intérieur de la sous-famille des Iridoideae et ont conduit à l'apparition d'élaïophores de type trichome parmi de nombreux genres et espèces répartis sur l'ensemble de la zone biogéographique néotropicale et le Mexique (Goldblatt & Manning, 2008; Renner & Schaefer, 2010). Néanmoins, l'échantillonnage utilisé pour réaliser la phylogénie moléculaire de la famille parmi les genres ayant développé un système de pollinisation basé sur la production de lipides floraux est très incomplet. En effet, de nombreux genres ne sont pas représentés et la représentativité des genres au regard du nombre d'espèces qu'ils contiennent est déséquilibrée (Goldblatt et al., 2008).

Les observations existantes concernant l'évolution des stratégies de pollinisation à l'intérieur de la famille conduisent aussi à s'interroger sur la fiabilité du nombre de transitions identifiées à partir de la phylogénie de Goldblatt et al. (2008). Goldblatt & Manning (2006) ont mis en évidence que la plupart des genres d'Iridaceae contenant 10 espèces ou plus ont développé plus d'un système de pollinisation, indiquant un haut degré de labilité entre les systèmes à l'intérieur de la famille. Les analyses phylogénétiques de nombreux genres montrent que des systèmes de pollinisation dérivés ont évolué de manière répétée dans différentes lignées à l'intérieur des genres. Par exemple, la phylogénie moléculaire du genre *Moraea* indique que les fleurs dont la seule ressource disponible pour les pollinisateurs est le pollen ont évolué quatre fois parmi les 70 espèces analysées (Goldblatt et al., 2002a). Bien que pour la plupart des autres genres, seules des phylogénies basées sur des caractères morphologiques soient disponibles, elles indiquent que dans la plupart des cas de multiples évolutions des systèmes de pollinisation se sont produites (Goldblatt & Manning, 2006). Ainsi, même en choisissant le scénario le plus conservatif, 32 changements de système de pollinisation se seraient produits parmi les 165 espèces sud africaines du genre *Gladiolus* et 14 changements parmi les 86 espèces du genre *Babiana* (Goldblatt et al., 2001; Goldblatt & Manning, 2007). *Tigridia* (*sensu* Goldblatt & Manning, 2008) constitue un autre exemple particulièrement frappant de genre au sein duquel s'est produit un phénomène d'adaptation radiative explosive ayant conduit à une diversification profonde non seulement de la morphologie florale, mais aussi des ressources impliquées dans les interactions plante-pollinisateur (Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt & Manning, 2008).

Bien que les changements de systèmes de pollinisation soient particulièrement fréquents parmi les Iridaceae, il demeure extrêmement difficile d'estimer leur impact en terme de diversification car aucune étude jusque là n'a permis de démontrer formellement qu'il pouvait

exister un lien entre ces phénomènes adaptatifs et la diversification des lignées concernés (Goldblatt & Manning, 2006).

L'ensemble de ces constatations peut laisser supposer que le nombre de transitions et de réversions concernant la sécrétion de lipides floraux parmi les genres d'Iridoideae présents sur le continent américain est nettement plus élevé que ce qui a été dénombré par Renner & Schaefer (2010). Par ailleurs, le nombre élevé d'espèces ayant développé des élaïophores dans la zone biogéographique néotropicale ainsi qu'au Mexique pourrait laisser supposer (sans en être la preuve) que ce système de pollinisation constitue une innovation clef d'un point de vue évolutif, pouvant se traduire dans certains cas par un phénomène de radiation adaptative, et correspondant à une niche écologique particulière pour un grand nombre d'Iridoideae américaines (Goldblatt & Manning, 2006).

2. Diversité de l'organisation florale et pollinisation chez les Iridaceae

2.1. Systématique de la famille

Avec environ 2025 espèces réparties parmi 66 genres, la famille des Iridaceae est l'une des plus importantes de l'ordre des Asparagales (Goldblatt & Manning, 2008). Elle est aujourd'hui subdivisée en sept sous-familles (Fig. 6) dont les deux plus importantes (Crocoideae et Iridoideae) comprennent 95% de la richesse spécifique des Iridaceae (Goldblatt et al., 2008). Les états de caractères diagnostiques pour les Iridaceae sont les suivants : feuilles alternes, distiques, styloïdes (grands cristaux prismatiques) d'oxalate de calcium présents dans les gaines des faisceaux conducteurs, inflorescence déterminée en cyme unipare de type rhipidium, fleurs actinomorphes et possédant des tépales libres, grains de pollen avec exine réticulée (Goldblatt et al., 1984; Goldblatt, 1990; Goldblatt & Manning, 2008).

La présence de nectaires dans les cloisons de l'ovaire est aussi un état plésiomorphe, mais ils disparaissent complètement chez certains genres, notamment *Aristea* et *Patersonia*, et chez les Iridoideae. Seul le genre *Diplarrena*, groupe frère de l'ensemble des Iridoideae, possède des nectaires situés dans les cloisons de l'ovaire dans cette sous-famille. Les autres genres possèdent des nectaires périgoniaux situés sur les tépales ou sur les étamines, ou ne possèdent aucun nectaire (Rudall et al., 2003). Longtemps considéré comme un état de caractère dérivé, l'ovaire infère constitue aussi une plésiomorphie pour la famille (Goldblatt & Manning, 2008).

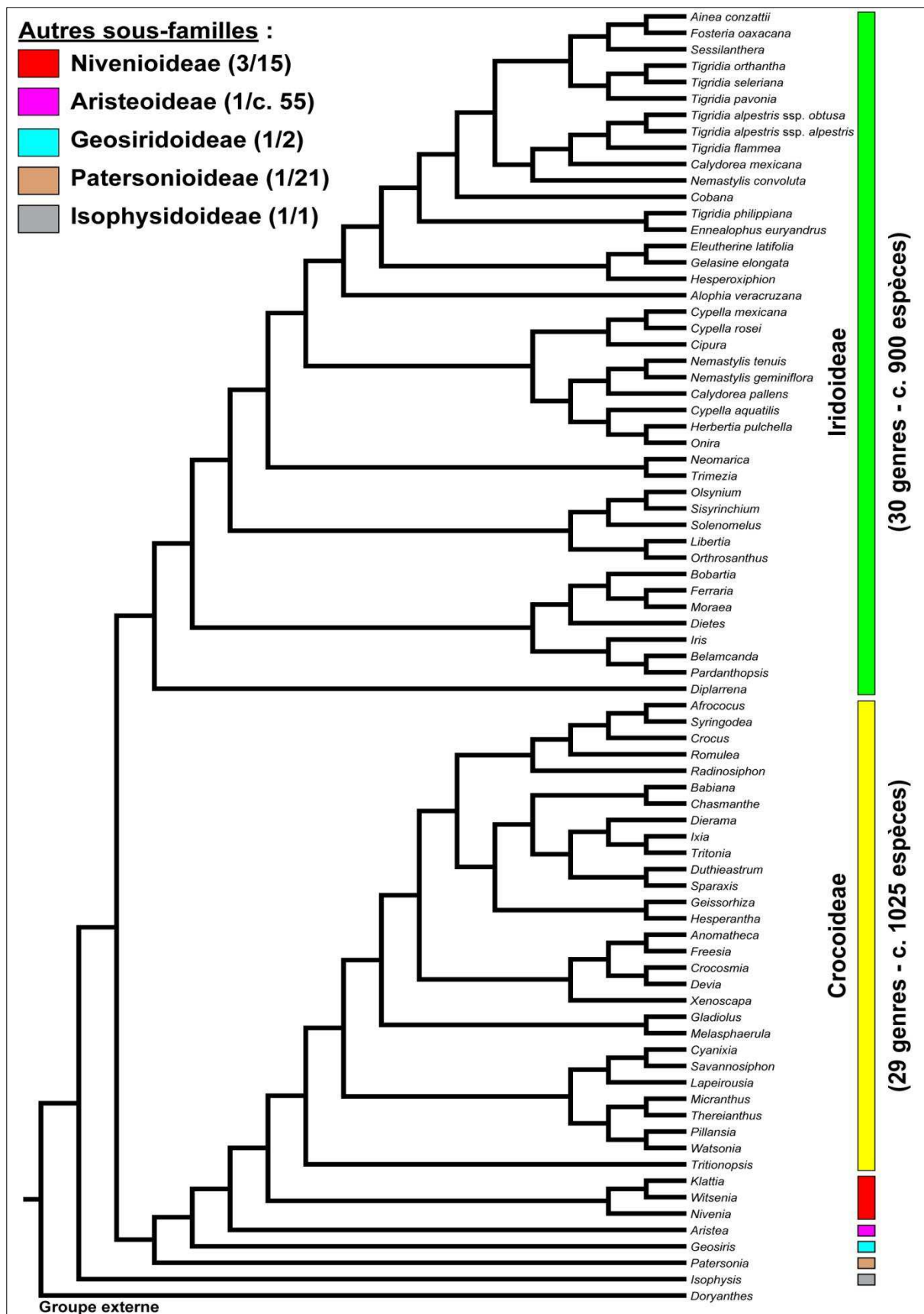


Figure 6. Phylogénie moléculaire des Iridaceae. Les sous-familles sont indiquées par les barres verticales. Les nombres entre parenthèses correspondent respectivement au nombre de genres et au nombre d'espèces compris dans chacune des sous-familles (d'après Goldblatt et al., 2008).

La phylogénie moléculaire proposée par Goldblatt et al. (2008) indique que la sous-famille des Crocoideae forme une lignée monophylétique très fortement soutenue. Elle est en outre définie par plus de synapomorphies morphologiques et anatomiques (Tableau 3) que ce que l'on peut observer dans la plupart des familles d'Asparagales (Goldblatt et al., 2008).

Tableau 3. Synapomorphies de la sous-famille des Crocoideae (Goldblatt 1990, 1991; Manning & Goldblatt, 1990; Rudall, 1995).

Caractère	État de caractère
1. Vaisseaux racinaires du xylème	Perforations simples (état de caractère partagé avec les Iridoideae).
2. Organe de réserve	Corne avec racines adventives.
3. Cellules foliaires épidermiques	Paroi ondulée et papilles nombreuses.
4. Lame foliaire	Présence d'une pseudo-nervure médiane épaissie.
5. Cellules du mésophylle	Allongées parallèlement à l'axe foliaire.
6. Inflorescence	Inflorescence en épi, fleurs toujours sessiles, sous-tendues par une paire de bractées à la base.
7. Symétrie florale	Zygomorphes.
8. Endothèque des anthères	Epaississements spiralés (état de caractère partagé avec les Iridoideae).
9. Ovule	Campylotrope.
10. Paroi pollinique	Exine microponctuée.
11. Type apertural pollinique	Monosulqué operculé (opercule formé d'une ou deux bandes).

La sous-famille des Iridoideae forme une lignée monophylétique définie elle aussi par un nombre important de synapomorphies morphologiques (Tableau 4) et moléculaires (Goldblatt, 1990; Reeves et al., 2001; Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008; Goldblatt & Manning, 2008).

Tableau 4. Synapomorphies de la sous-famille des Iridoideae (Goldblatt 1990; Rudall et al., 2003; Goldblatt et al., 2008).

Caractère	État de caractère
1. Vaisseaux racinaires du xylème	Perforations simples (ancestral pour toutes les tribus, hormis les Diplarreneae. État de caractère partagé avec les Crocoideae).
2. Symétrie florale	Actinomorphes (ancestral pour toutes les tribus, hormis les Diplarreneae dont les fleurs sont zygomorphes).
3. Tépalés	Habituellement rétrécis à la base.
4. Nectaires	Absence de nectaires dans les cloisons de l'ovaire (ancestral pour toutes les tribus, hormis les Diplarreneae). Quand ils sont présents les nectaires sont périgoniaux ou intra-staminaux.
5. Branches du style	Convolutées à tubulaires, chaque branche porte un stigmate à son extrémité. Les branches sont souvent épaissies et étroitement associées avec les étamines, et portent généralement des appendices terminaux (crêtes), conditions uniques dans la famille.
6. Endothèque des anthères	Epaississements spiralés (état de caractère partagé avec les Crocoideae).

2.2. Diversité de l'organisation florale

De nombreuses variations de la morphologie florale caractérisent la famille des Iridaceae (Rodriguez & Sytsma, 2006; Goldblatt & Manning, 2006; Goldblatt & Manning, 2008). La symétrie florale est radiale au sein des Iridoideae (Fig. 7 - A à C), hormis dans le genre *Diplarrena* groupe frère de l'ensemble des autres genres de la sous-famille (Fig. 7 - D), qui possède des fleurs à symétrie bilatérale (Goldblatt & Manning, 2008). La sous-famille des Nivenioideae est elle aussi caractérisée par des fleurs actinomorphes (Fig. 7 - E), mais la présence de fleurs zygomorphes et bilabiées constitue une synapomorphie pour les Crocoideae (Fig. 7 - F & G). Cet état n'est pas uniforme à l'intérieur de la sous-famille, et des réversions vers la symétrie radiale se sont produites concernant soit des genres dans leur intégralité (*Ixia*, *Crocus*, *Romulea*, *Syringodea*), soit quelques espèces à l'intérieur d'autres genres (Davies et al., 2004; Goldblatt et al., 2006). Par ailleurs la fusion d'une partie des pièces du périanthe, formant un tube qui peut atteindre 50 à 100 mm, est une adaptation importante des fleurs de Crocoideae (Goldblatt & Manning, 2006).

Parmi les fleurs à symétrie radiale, la plupart des espèces appartenant aux genres qui forment la tribu des Irideae (Iridoideae) possèdent des fleurs formées de trois unités bilabiées fonctionnellement séparées, chacune ressemblant à une fleur gamopétale (Fig. 7 - H). Bien que la fleur soit actinomorphe, cette structure florale particulière appelée meranthia est zygomorphe, ressemblant aux fleurs de nombreuses Lamiaceae et Scrophulariaceae, et fonctionne comme une unité de pollinisation indépendante (Goldblatt et al., 2005; Goldblatt & Manning, 2006). Néanmoins, il existe aussi de nombreuses espèces au sein de la tribu, appartenant aux genres *Moraea* et *Ferraria*, pour lesquelles le meranthia est vestigial ou même totalement absent (Goldblatt & Bernhardt, 1999; Goldblatt & Manning, 2006).

Les fleurs des genres appartenant aux autres tribus de la sous-famille des Iridoideae sont strictement actinomorphes, mais de très nombreuses variations de la morphologie et de la disposition des tépales existent parmi ces taxons, et pas moins de six types de morphologies florales ont été dénombrés à l'intérieur du genre *Tigridia* (Goldblatt & Manning, 2008).

La symétrie florale est une composante essentielle de l'évolution des systèmes de pollinisation au sein des Iridaceae et le spectre des pollinisateurs varie de manière extrêmement différente au sein des clades suivant le type de symétrie qui prévaut au sein d'un clade et la manière dont la symétrie évolue à l'intérieur de ces clades (Goldblatt & Manning, 2006). L'augmentation du nombre d'espèces par genre au sein des Iridaceae est étroitement associé à une augmentation

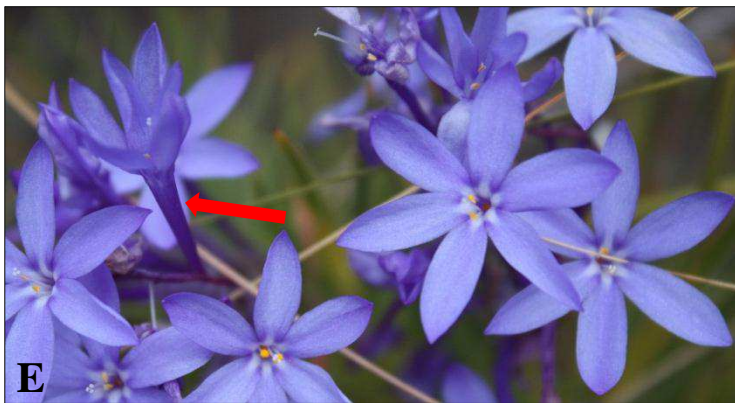


Figure 7. Diversité de la morphologie florale au sein des Iridaceae. (A à D) Sous-famille des Iridoideae. (A) Fleur actinomorphe de *Calydorea crocoides* Ravenna (Tigridieae) : périanthe en étoile et tépales subégaux. (B) Fleur actinomorphe de *Tigridia meleagris* (Lindl.) G. Nicholson (Tigridieae) : périanthe en forme de coupe et tépales inégaux (© Dale Denham-Logsdon). (C) Fleur actinomorphe de *Tigridia convoluta* (Ravenna) Goldblatt (Tigridieae) : périanthe en forme d'étoile et tépales inégaux. (© fandfofcolima@gmail.com). (D) Fleur zygomorphe de *Diplarrena moraea* Labill (Diplarreneae) : pièces internes du périanthe en forme de coupe, tépales inégaux (© <http://www.stridvall.se>). (D) Fleur actinomorphe de *Nivenia inaequalis* Goldblatt & J.C.Manning (Nivenioideae) : les pièces du périanthe sont fusionnées et forment un tube plus ou moins allongé à sa base (© <http://fotgh.wordpress.com>). (F-G) Sous famille des Crocoideae. (F) Fleur zygomorphe de *Gladiolus alatus* L. (Gladioleae) : la zygomorphie est accompagnée d'une fusion d'une partie des pièces du périanthe formant un long tube à la base de ce dernier (© lvalente@rjb.csic.es). (G) Fleur actinomorphe de *Ixia monadelphae* D.Delaroche (Croceae) : bien que la fleur soit actinomorphe, la fusion des pièces du périanthe est toujours présente (flèche) (© Andrew massyn). (H) Fleur actinomorphe de *Moraea tripetala* (L.f.) Ker Gawl. Iridoideae: Irideae) : fleur formée de trois unités zygomorphes bilabiées (flèches) appelées meranthia et fonctionnant comme des unités indépendantes vis-à-vis des pollinisateurs (© Fiona Watson).

du nombre de systèmes de pollinisation exploités, et bien que cette relation soit évidente à la fois pour les genres dont les fleurs sont plutôt actinomorphes et ceux dont les fleurs sont plutôt zygomorphes, le nombre de modifications de systèmes de pollinisation rapporté au nombre d'espèces est significativement plus élevé parmi les genres où la zygomorphie est prédominante (Goldblatt & Manning, 2008). Ces observations suggèrent que la transition vers la zygomorphie qui a eu lieu à la base des Crocoideae, associée à la formation d'un tube floral, pourrait constituer une innovation clef en augmentant la diversité des systèmes de pollinisation potentiellement exploitables (Goldblatt & Manning, 2008). Il est à noter que ces résultats sont essentiellement basés sur des observations concernant les Iridaceae de la zone sub-saharienne, et qu'à ce jour la diversité et l'évolution des systèmes de pollinisation restent très mal connues au sein des Iridaceae du continent américain (Goldblatt & Manning, 2006).

Par ailleurs, un des constats majeurs déduit des études conduites depuis le début des années 1990, principalement en Afrique sub-saharienne, est que la grande majorité des Iridaceae peuvent être considérées comme très spécialisées dans leurs interactions avec les pollinisateurs (Goldblatt & Manning, 2008). Dans ce contexte, le rôle joué par les ressources florales produites par les Iridaceae et utilisées par les pollinisateurs est fondamental. La diversité des structures productrices de ressources et la manière dont elles ont évolué à l'intérieur de la famille pourraient donc être un élément déterminant pour comprendre l'évolution des systèmes de pollinisation au sein des Iridaceae.

2.3. Diversité des nectaires et des élaïophores

Le nectar est la ressource la plus commune collectée au sein de la famille des Iridaceae. Il constitue une source de nourriture pour de nombreux animaux, incluant les abeilles, les mouches et de nombreux autres insectes et oiseaux. Les organes floraux qui produisent le

nectar, le volume produit, la concentration ainsi que les proportions des différents types de sucres contenus dans le nectar varient de manière importante à l'intérieur de la famille (Goldblatt & Manning, 2008).

La présence de nectaires dans les cloisons de l'ovaire est une plésiomorphie pour la famille. Ces nectaires s'insèrent dans une cavité qui résulte d'une fusion incomplète d'une petite région située en bordure des carpelles (Fig. 8). Ils sont particulièrement répandus dans deux sous-familles : les Crocoideae et les Nivenioideae (Daumann, 1970; Goldblatt, 1993; Rudall et al., 2003). Ces nectaires sécrètent le nectar vers l'extérieur à l'aide d'étroits canaux débouchant dans la partie apicale de l'ovaire, proches de la base du style en position opposée aux tépales internes (Goldblatt & Manning, 2008).

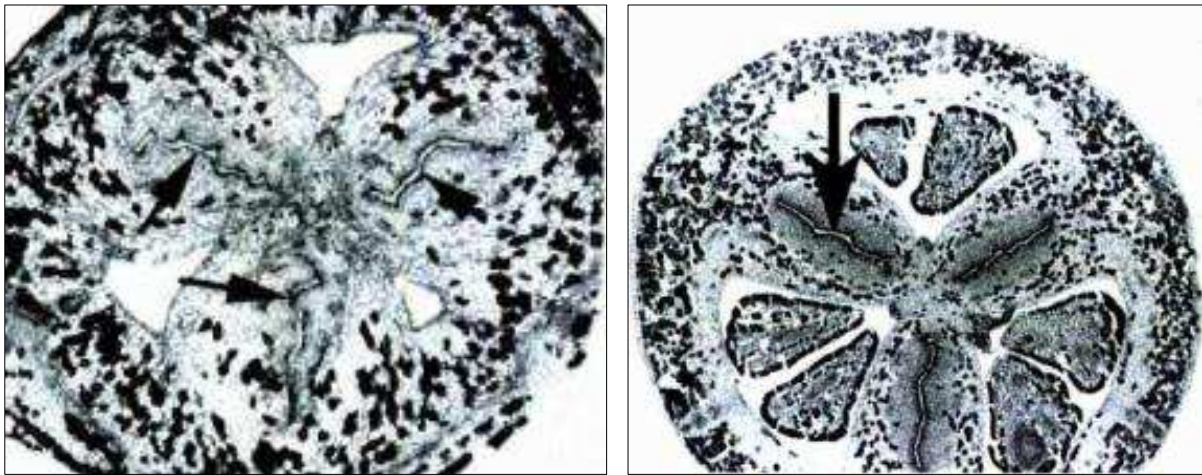


Figure 8. Coupe transversale de l'ovaire de (A) *Klattia stokoei* L.Guthrie (Nivenioideae) et (B) *Tritoniopsis burchellii* (N.E.Br.) Goldblatt (Crocoideae) indiquant la position (flèches) des nectaires dans les cloisons (Rudall et al., 2003).

Hormis pour le genre *Diplarrena* (cf. chapitre 2.1), les Iridoideae se caractérisent par l'existence de nectaires périgoniaux au sein de nombreux genres répartis dans les quatre principales tribus de la sous-famille (Rudall et al., 2003; Goldblatt & Manning, 2008). Ils sont localisés habituellement à la base des tépales externes au sein de la tribu des Irideae, à la base de la colonne staminale chez les Sisyrinchieae, et généralement sur les tépales internes des espèces appartenant aux tribus strictement américaines des Trimezieae et des Tigridieae, bien qu'occasionnellement aussi distribués sur les tépales externes (Molseed, 1970; Vogel, 1974; Rudall et al., 2003). La coexistence à la fois de nectaires dans les cloisons de l'ovaire et de nectaires périgoniaux à l'intérieur d'une même famille est très inhabituelle et les Iridaceae constituent peut être un cas unique de ce point de vue (Rudall et al., 2003). Par ailleurs, le développement important des élaïophores de type trichome au sein de la sous-famille des Iridoideae constitue un élément supplémentaire conférant un caractère unique à l'évolution

des structures productrices de ressources utilisés par les pollinisateurs chez les Iridaceae (Rudall et al., 2003; Goldblatt & Manning, 2008).

Au sein de la sous-famille des Iridoideae, les nectaires et les élaïophores prennent de nombreuses formes différentes et il y a apparemment parmi les Iridoideae une prédisposition au développement de structures sécrétrices périgoniales (Rudall et al., 2003). La position des nectaires de plusieurs espèces d'*Iris* à la base du périanthe et de la colonne staminale (Daumann, 1935), extrêmement proches de la base du style, pourrait laisser supposer que les nectaires périgoniaux aient pu évoluer par hétérotopie à partir des nectaires présents dans les cloisons de l'ovaire, l'évolution de ces structures sécrétrices au sein des Iridoideae s'étant accompagnée de leur déplacement dans une position de plus en plus distale sur les primordia des organes concernés (Alberch et al., 1979; Bateman, 1994; Baum & Donoghue, 2002; Rudall & Bateman, 2002). De plus, il semble peu probable qu'une toute nouvelle source de nectar ait évolué au sein des Iridoideae au même moment où les nectaires présents dans les cloisons de l'ovaire ont disparu, sans qu'il existe une relation développementale entre les deux événements et les deux structures (Rudall et al., 2003). Le développement des élaïophores de type trichome dans la même position que celle des nectaires périgoniaux, à l'intérieur de la seule sous-famille où se sont développés ces derniers n'est certainement pas dû au hasard et il est probable qu'il existe aussi un lien évolutif et développemental entre ces deux types de structures sécrétrices (Rudall et al., 2003; Goldblatt & Manning, 2008).

Le système de pollinisation reposant sur la collecte des lipides floraux est plus particulièrement développé dans la zone biogéographique néotropicale et les zones tempérées adjacentes du continent américain. En effet, le nombre d'espèces d'Iridaceae produisant ces lipides et le nombre d'espèces d'abeilles spécialisées dans leur collecte sont très nettement supérieurs à ce qui peut être observé dans les autres zones biogéographiques du globe (Rudall et al., 2003; Goldblatt & Manning, 2006; Goldblatt & Manning, 2008). Il semble donc probable que le développement des élaïophores de type trichome ait joué un rôle prépondérant dans la diversification de la famille sur le continent américain (Goldblatt et al., 2008). L'origine de la diversification des Iridoideae à travers cette région du globe serait donc liée à l'évolution de caractères floraux différents de ceux qui ont conduit à l'extraordinaire diversification des Crocoideae en Afrique sub-saharienne. En effet, l'apparition et le développement de la zygomorphie associée à la présence d'un tube floral, ainsi que l'existence de nectaires à la base de l'ovaire semblent avoir joué un rôle majeur dans ce contexte (Goldblatt & Manning, 2008).

Plus de 92% des espèces d'Iridaceae de la zone sub-saharienne présentent un système de pollinisation spécialisé où le nombre d'espèces d'insectes ou d'autres animaux intervenant dans la pollinisation de chacune des espèces est très faible. Le nombre d'espèces généralistes visitées par différents types de pollinisateurs est extrêmement faible, comptant pour moins de 3% des espèces (Goldblatt & Manning, 2006) et deux systèmes de pollinisation spécialisés coexistent chez les espèces restantes (Goldblatt et al., 2000a, 2000b, 2002b, 2004; Manning & Goldblatt, 2005). Le fait que les Iridaceae soient des plantes vivaces à durée de vie relativement longue, que la reproduction végétative tienne une grande place dans la dissémination des espèces et qu'elles soient relativement dispersées dans les écosystèmes où elles se développent, constituent certainement des conditions favorisant le développement de stratégies de pollinisation spécialisées (Johnson & Bond, 1994; Waser et al., 1996; Goldblatt & Manning, 2006, 2008). Il semble donc légitime de s'interroger sur l'importance du développement des élaïophores à l'intérieur de la sous-famille des Iridoideae et d'évaluer si cette stratégie de pollinisation spécialisée a joué un rôle dans la diversification des Iridaceae à l'intérieur de la zone biogéographique néotropicale et des zones tempérées adjacentes.

2.4. La pollinisation par les abeilles

La majeure partie des informations disponibles concernant la pollinisation, que ce soit par les abeilles ou par les autres vecteurs biotiques (cf. chapitre suivant), provient d'études réalisées depuis une dizaine d'années en Afrique sub-saharienne. Les données disponibles concernant la pollinisation des Iridaceae dans les autres régions du globe restent aujourd'hui rares et ne permettent pas d'évaluer avec exactitude l'importance du rôle joué par les différents vecteurs biotiques potentiellement impliqués dans les interactions plantes-pollinisateurs au sein de la famille. Néanmoins, le fait que l'Afrique sub-saharienne représente l'un des deux principaux centres de diversité à l'échelle de la famille et que la plupart des autres informations disponibles résultent d'observations réalisées dans la zone néotropicale (second centre de diversité), permet d'avoir un premier aperçu de l'importance relative des différents vecteurs biotiques impliqués dans la pollinisation.

La pollinisation par les abeilles constitue le système de pollinisation le plus commun au sein des Iridaceae et concerne 57% des 1150 espèces d'Afrique sub-saharienne, aucun des autres vecteurs biotiques identifiés ne pollinisant plus de 12% du total des espèces étudiées (Goldblatt & Manning, 2006, 2008). Bien que les stratégies de pollinisation d'un grand nombre d'espèces de la zone néotropicale et des zones tempérées adjacentes restent inconnues

à ce jour, la quasi totalité des espèces de cette région ayant fait l'objet d'observations sont pollinisées par des abeilles (Vogel, 1974; Neff & Simson 1981; Buchmann, 1987; Lee, 1994; Cocucci et al., 2000; Cocucci & Vogel, 2001; Truylio et al., 2002; Machado, 2004; Devoto & Medan, 2008; Goldblatt & Manning, 2008) et l'intervention d'autres vecteurs biotiques dans leur pollinisation reste anecdotique (Molseed, 1970; Freitas & Sazima, 2003; Devoto & Medan, 2008; Goldblatt & Manning, 2008).

La pollinisation par les abeilles récoltant le nectar des fleurs d'Iridaceae est certainement ancestrale pour les Crocoideae, les Nivenioideae et les Iridoideae et constitue probablement également l'état ancestral pour l'ensemble de la famille (Goldblatt & Manning, 2008). Au sein des Crocoideae et des Iridoideae, il existe une très grande diversité d'interactions entre les abeilles et les fleurs qu'elles pollinisent. Celles-ci se différencient non seulement en fonction du type et de la composition des ressources produites par la plante, des conditions de leur production (morphologie des organes producteurs, localisation et accessibilité à l'intérieur de la fleur), et de la temporalité à laquelle elles sont produites, mais aussi en fonction du niveau de spécialisation des abeilles vis-à-vis de ces caractéristiques florales (Cocucci et al., 2000; Cocucci & Vogel, 2001; Goldblatt & Manning, 2006, 2008). Il existe en outre d'autres types d'interactions entre plantes et abeilles au sein de la famille des Iridaceae qui ne font pas intervenir la production d'une ressource utilisée par l'insecte. Ainsi, de nombreuses espèces d'*Iris* de la section *Oncocyclus*, distribuées en Asie centrale et dans l'ouest asiatique, ont développée une autre stratégie. Les mâles de plusieurs espèces d'abeilles de la famille des Apidae utilisent les fleurs de couleur foncée de ces espèces d'*Iris* pour s'abriter durant la nuit et profiter de l'élévation de température matinale à l'intérieur de la fleur. Ils transportent le pollen d'une fleur à l'autre durant le choix de la fleur qui va les abriter pour la nuit, et participent ainsi activement à la reproduction sexuée de ces espèces (Sapir et al., 2005, 2006).

2.5. Les autres vecteurs biotiques

Alors que la pollinisation par les abeilles est prédominante à l'échelle de la famille, l'intervention d'une vaste gamme de pollinisateurs différents caractérise en Afrique subsaharienne la sous-famille des Crocoideae, et dans une moindre mesure celle des Nivenioideae (Goldblatt & Manning, 2006, 2008). Un récapitulatif des informations disponibles pour les différentes catégories de pollinisateurs des Iridaceae en Afrique subsaharienne est présenté dans le Tableau 5.

Tableau 5. Vecteurs biotiques pollinisant les espèces de la famille des Iridaceae en Afrique sub-saharienne. Les chiffres indiquent le pourcentage d'espèces pollinisées pour chaque sous-famille représentée dans cette région du globe (d'après Goldblatt & Manning, 2008).

Catégories de pollinisateurs	Aristeoideae	Nivenioideae	Crocoideae	Iridoideae	Total
<i>Pollinisateurs spécialisés</i>					
Hyménoptères (abeilles)	90	32	47	72	57
Hyménoptères (autres)	0	0	0	5	1
Diptères	2	32	16	0	12
Lépidoptères (papillons nocturnes)	0	0	9	1	6
Lépidoptères (papillons diurnes)	0	0	2	0	2
Coléoptères	8	0	6	7	6
Oiseaux	0	29	10	0	8
<i>Pollinisateurs généralistes ou coexistence de deux types de pollinisateurs spécialisés</i>					
	0	7	10	15	8

Diptères : parmi les vecteurs biotiques autres que les abeilles, les mouches à longue trompe de la famille des Nemistrinidae et des Tabanidae (Diptera) jouent un rôle prépondérant, pollinisant 15.9% des espèces de Crocoideae et 32% des espèces de Nivenioideae d'Afrique sub-saharienne (Goldblatt et al., 2000a, 2000b, 2002a; Goldblatt & Manning, 2006, 2008). Parmi les Iridaceae de la flore d'Afrique du Sud, plus de 250 espèces sont pollinisées exclusivement par ces insectes. Les fleurs de ces espèces se caractérisent par la présence d'un long tube étroit de 25 à 100 mm de long à la base du périanthe, contenant la plupart du temps du nectar dans la moitié inférieure, celui-ci n'étant accessible qu'à ces mouches qui possèdent une trompe suffisamment longue pour l'atteindre. Généralement, le tube floral est légèrement plus long que la trompe de l'insecte qui visite la fleur, forçant celui-ci à entrer en contact avec les anthères et les surfaces stigmatiques. Certaines espèces du genre *Hesperantha* (Crocoideae) dupent ces pollinisateurs avec des fleurs présentant le même type de morphologie mais ne produisant pas de nectar ; néanmoins ce système de pollinisation par tromperie reste exceptionnel (Goldblatt et al., 2004).

La pollinisation des Iridaceae par d'autres types de diptères est extrêmement rare et seules 0,1% des Crocoideae sont concernées par ce système de pollinisation en Afrique sub-saharienne (Manning & Goldblatt, 2008). Dans la zone néotropicale, un seul cas de pollinisation par des mouches de la famille des Syrphidae a été enregistré sur une espèce de *Sisyrrinchium* (Iridoideae: Sisyrrinchieae) ne produisant ni nectar ni lipides floraux (Freitas &

Sazima, 2003). L'absence d'autres observations concernant la pollinisation des Iridaceae par les diptères ne permet pas de tirer de conclusions quant à l'importance de ce système de pollinisation dans cette zone biogéographique. Bien que cela ne soit pas documenté par des observations permettant de les qualifier de pollinisateurs, il est probable que des mouches sphécoides (Sphecidae) puissent être des agents de pollinisation de certaines espèces du genre *Tigridia* (Iridoideae: Tigridae) distribuée au Mexique et au Guatemala. Leurs fleurs produisent du nectar à partir de trichomes glandulaires répartis sur les tépales internes et dégagent une odeur fétide (Molseed, 1970). D'autres diptères ont aussi été observés visitant plusieurs espèces de *Sisyrinchium* et d'*Olsynium* (Iridoideae: Sisyrinchieae) mais aucune information ne permet de confirmer leur rôle en tant que pollinisateurs (Arroyo et al., 1982; Freitas, 2002).

Lépidoptères (papillons nocturnes) : la pollinisation des Iridaceae par les papillons de nuit (appartenant pour la plupart aux familles des Drepanogynidae, Geometridae et Noctuidae) n'est connue qu'en Afrique sub-saharienne. Il est peu probable qu'elle existe dans d'autres régions du globe où aucune espèce d'Iridaceae ne présente le même type de caractères floraux. Elle est particulièrement importante au sein des genres *Gladiolus* et *Hesperantha* (Goldblatt & Manning, 2002; Goldblatt et al., 2004) et concerne quelques espèces de *Babiana*, *Freesia*, *Moraea*, *Savannosiphon* et *Tritonopsis*, représentant au total 9% des Crocoideae et 1% des Iridoideae (Goldblatt & Manning, 2008). Les fleurs de ces espèces sont caractérisées par des tépales de couleur pâle, la présence d'un tube étroit et long à la base du périanthe, un parfum puissant durant l'anthèse et une période d'anthèse vespérale et/ou nocturne (Goldblatt & Manning, 2006).

Lépidoptères (papillons diurnes) : les grands papillons appartenant aux familles des Papilionidae et des Satyridae tiennent une place extrêmement restreinte parmi le cortège des pollinisateurs et ce système de pollinisation ne semble développé que pour quelques espèces d'Iridaceae d'Afrique sub-saharienne et uniquement parmi les Crocoideae, représentant environ 2% des espèces de cette région (Goldblatt & Manning, 2002, 2006, 2008; Goldblatt et al., 2004). Les fleurs de ces espèces sont caractérisées par des tépales rouge-orangés, rarement jaunes ou pourpres, la présence d'un long tube étroit à la base du périanthe, une absence de parfum et un nectar particulièrement dilué, probablement parce qu'un nectar plus concentré serait trop visqueux et ne pourrait être collecté par ces papillons dont la trompe est particulièrement étroite (Goldblatt & Manning, 2006).

Coléoptères : la pollinisation par les membres de la famille des Scarabaeidae est l'un des systèmes de pollinisation le plus surprenant au sein de la famille des Iridaceae. Ces scarabées utilisent les fleurs actinomorphes et brillamment colorées de nombreuses espèces de *Moraea* (Iridoideae) et d'*Ixia* (Crocoideae), mais aussi d'autres genres d'Aristoideae, de Nivenioideae et de Crocoideae, comme sites pour se rassembler et se reproduire (Goldblatt et al., 1998; Steiner, 1998, Goldblatt et al., 2005). Ils peuvent occasionnellement consommer le pollen des fleurs qu'ils visitent mais ce comportement est considéré comme subsidiaire dans les interactions établies avec les Iridaceae (Goldblatt & Manning, 2008). La plupart des fleurs des espèces d'Iridaceae pollinisées par ces scarabés présentent des marques foncées disposées au centre du périanthe et mimant le corps des scarabés de façon étonnamment fidèle. Leur rôle supposé est d'inciter les scarabés à visiter préférentiellement ce type de fleur (Goldblatt & Manning, 2006). En Afrique sub-saharienne, les scarabées sont responsables de la pollinisation de 8% des Aristoideae, 6% des Crocoideae et 7% des Iridoideae (Goldblatt & Manning, 2008). Ce système de pollinisation est couramment combiné avec la pollinisation par des abeilles collectant le pollen, seule ressource produite par la plupart de ces espèces (Goldblatt et al., 2005).

Ce type de pollinisation n'est pas documenté pour les espèces d'Iridaceae de la zone néotropicale et des zones tempérées adjacentes, néanmoins quelques observations indiquent que des membres de plusieurs familles de coléoptères pourraient jouer un rôle dans la pollinisation d'espèces appartenant aux genres *Cypella*, *Herbertia* (Iridoideae: Tigridieae) et *Olsynium* (Iridoideae: Sisyrinchieae) (Arroyo et al., 1982; Devoto & Medan, 2008).

Hyménoptères (autres que les abeilles) : quelques rares espèces du genre *Ferraria* (Iridoideae: Irideae) en Afrique du Sud présentent un système de pollinisation particulièrement inhabituel au sein de la famille, faisant intervenir des guêpes de la famille des Vespidae comme vecteurs de pollinisation (Goldblatt & Manning, 2006). Les fleurs de *Ferraria* sécrètent du nectar très peu concentré à partir des pièces du périanthe qui forment une coupe profonde et dégagent une odeur fétide intervenant certainement dans le système de pollinisation (Goldblatt et al., 2009).

En dehors de ce genre sud africain, il est probable que des guêpes appartenant aux familles des Vespidae et des Pompilidae puissent être des agents de pollinisation de certaines espèces du genre *Tigridia* (Iridoideae: Tigridieae) en raison de leurs nombreuses similitudes florales avec le genre *Ferraria*, en particulier en ce qui concerne la forme du périanthe, la présence de

nectar et le parfum dégagé par les fleurs. Le nectar, dont la concentration est inconnue, est secrété à partir de trichomes glandulaires présents sur les tépales internes (Molseed, 1970).

Oiseaux : La pollinisation par les oiseaux (appartenant principalement à la famille des Nectariniidae) s'est développée chez 64 espèces de Nivenioideae et de Crocoideae, uniquement distribuées en Afrique sub-saharienne (Goldblatt et al., 1999). Ce système de pollinisation tient ainsi un rôle majeur au sein de ces deux sous-familles, concernant respectivement 29% des espèces de Nivenioideae et 10% des Crocoideae de cette zone géographique (Goldblatt & Manning, 2008). Les fleurs d'Iridaceae pollinisées par les oiseaux sont pour la plupart rouge-orangées et possèdent généralement un tube allongé à la base du périanthe. Le nectar sécrété en grande quantité est accumulé dans la moitié inférieure du tube. La longueur du tube est souvent corrélée à la longueur du bec de l'oiseau pollinisateur. Les fleurs sont typiquement zygomorphes au sein des Crocoideae et actinomorphes au sein des Nivenioideae et ne dégagent aucun parfum (Goldblatt et al., 1999). L'inflorescence est souvent portée par une tige robuste et beaucoup plus rigide que celle que l'on observe chez les espèces pollinisées par les insectes, une caractéristique qui permet à l'oiseau de se percher sur la tige pendant qu'il collecte le nectar (Goldblatt & Manning, 2006). En Afrique sub-saharienne, la pollinisation par les oiseaux est particulièrement développée au sein des genres *Gladiolus* (Crocoideae) et *Watsonia* (Nivenioideae) où elle a évolué indépendamment dans plusieurs lignées (Goldblatt & Manning, 2008).

Ce système de pollinisation est rare dans les autres régions du monde où sont distribuées les Iridaceae, mais les colibris (Trochilidae) sont les principaux pollinisateurs de l'espèce nord américaine *Iris fulva* Ker Gawl. (Iridoideae: Irideae) et de quatre espèces de *Tigridia* (Iridoideae: Tigridieae) au Mexique (Cruden, 1971; Emms & Arnold, 2000; Wesselingh & Arnold, 2000). La coloration rouge foncée des fleurs d'*I. fulva* est inhabituelle à l'intérieur du genre et l'absence de parfum dégagé par la fleur, associées au fait que les tépales externes forment avec les branches du style une longue gorge dans laquelle s'accumule le nectar en grande quantité, forment un contexte morphologique unique à l'intérieur du genre qui semble particulièrement adapté à la pollinisation par les oiseaux (Wesselingh & Arnold, 2000).

Les caractéristiques particulières des fleurs des quatre espèces de *Tigridia* pollinisées exclusivement par des colibris sont si inhabituelles au regard des caractères morphologiques généralement exprimés à l'intérieur de ce genre que ces espèces furent placées dans un genre différent nommé *Rigidella* (Cruden, 1971). A la différence de la plupart des fleurs d'Iridaceae pollinisées par des oiseaux, elles ne présentent pas de tube au niveau du périanthe, le nectar

s'accumule dans des poches profondes formées par les tépales. En revanche, la quantité relativement importante de nectar produit ainsi que la coloration rouge du périanthe sont bien caractéristiques des fleurs pollinisées par les oiseaux (Goldblatt & Manning, 2008). Il semble de plus ce système de pollinisation ait évolué plusieurs fois de manière indépendante à l'intérieur du genre *Tigridia*, comme dans le cas des genres *Gladiolus* et *Watsonia* en Afrique (Rodríguez, 1999).

3. Systématique de la sous-famille des Iridoideae : présentation des tribus actuellement reconnues

La sous-famille des Iridoideae constitue un des deux embranchements majeurs des Iridaceae, comprenant au moins 900 espèces réparties dans 30 genres différents et représentant environ 40% de la richesse spécifique de la famille (Goldblatt & Manning, 2008). Le genre australien *Diplarrena* est le seul représentant de la tribu des Diplarreneae, groupe frère du reste des Iridoideae, qui se subdivisent en quatre groupes circonscrits taxonomiquement au niveau tribu (Fig. 9) :

- Les Irideae, dont l'aire de distribution couvre essentiellement les régions biogéographiques du Paléarctique et de l'Afrotropical (avec seulement quelques espèces d'*Iris* distribuées dans le Néarctique et 1 espèce de *Dietes* dans la région Australasienne),
- Les Sisyrinchieae, dont la distribution couvre le continent américain avec seulement quelques espèces des genres *Libertia* et *Orthrosanthus* distribuées dans l'Australasien,
- Les Trimezieae, uniquement néotropicaux,
- Les Tigridieae, essentiellement néotropicaux avec quelques espèces dont la distribution couvre aussi le sud du Néarctique.

Si l'on se réfère à la richesse spécifique des différentes tribus, la dichotomie majeure observée à l'intérieur de la sous-famille correspond à la séparation entre la tribu des Irideae et les genres appartenant aux tribus de Sisyrinchieae, Trimezieae et Tigridieae. L'aire de répartition des Irideae couvre essentiellement les régions biogéographiques du Paléarctique et de l'Afrotropical (avec seulement quelques espèces d'*Iris* distribuées dans le Néarctique et 1 espèce de *Dietes* dans la région Australasienne). Les Sisyrinchieae, Trimezieae et Tigridieae se répartissent quasi exclusivement sur le continent américain (excepté les genres *Libertia* et *Orthrosanthus* dont quelques espèces sont distribuées dans l'Australasien), la plupart des genres appartenant à ces tribus étant uniquement néotropicaux.

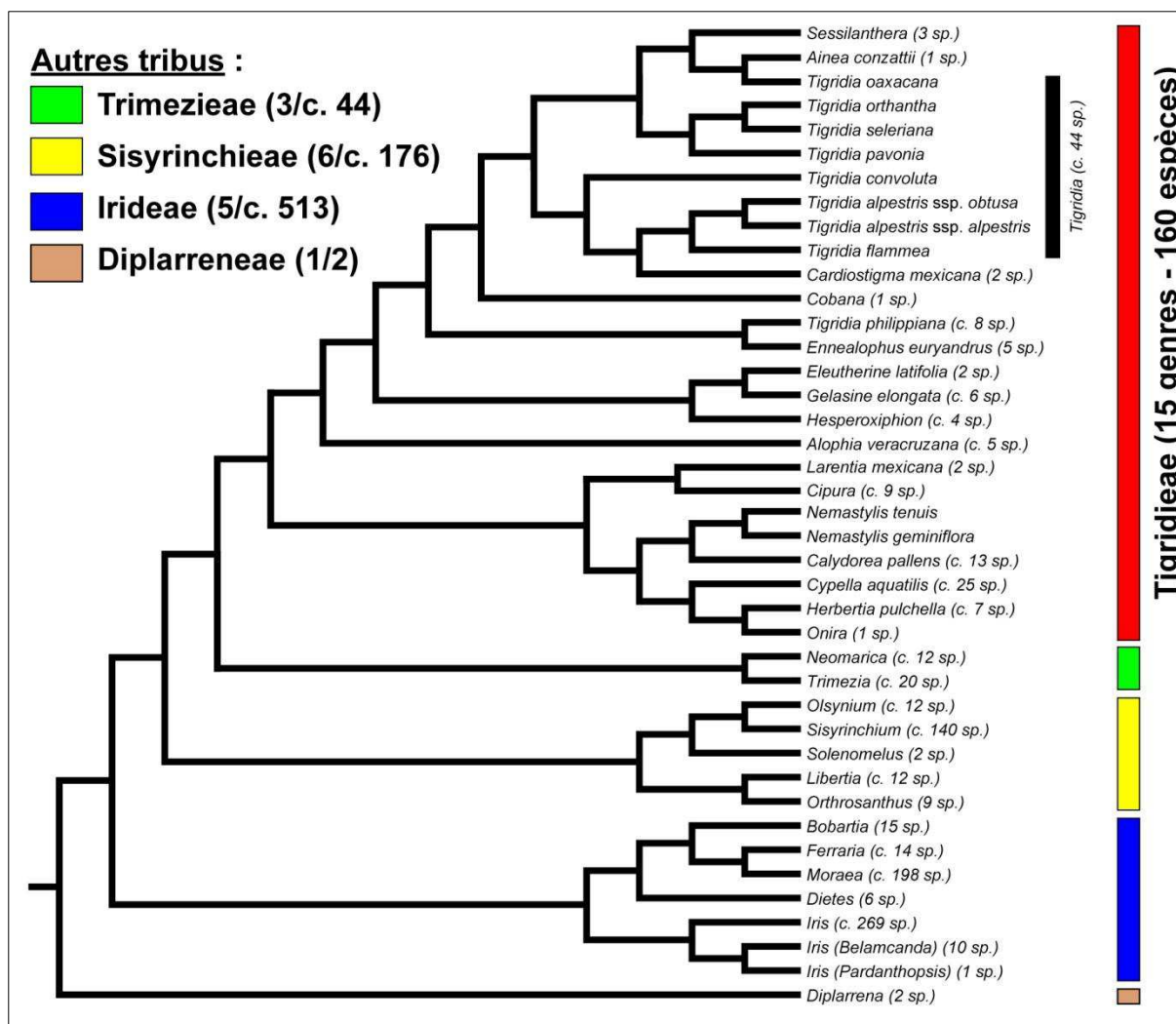


Figure 9. Phylogénie moléculaire des Iridoideae. Les différentes tribus sont indiquées par les barres verticales. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de genres suivi du nombre d'espèces pour chaque tribu. Le nombre d'espèces par genre est indiqué dans la phylogénie (d'après Goldblatt et al., 2008).

3.1. Sisyrinchieae

La tribu est composée de six genres et est largement dominée, en termes de nombre d'espèces, par le genre *Sisyrinchium* qui représente à lui seul environ 80% de la richesse spécifique de ce groupe taxonomique. Les synapomorphies morphologiques qui caractérisent les Sisyrinchieae sont peu nombreuses. Les filets des étamines sont généralement fusionnés sur leur moitié inférieure et le style présente une légère torsion, ses branches alternant avec les étamines et s'étendant souvent entre les parties libres des filets (Goldblatt et al., 2008).

Les genres sont en revanche différenciés à l'intérieur de la tribu par un nombre relativement important de synapomorphies (Fig. 10) et la phylogénie moléculaire confirme en grande partie les observations morphologiques et anatomiques (Goldblatt et al., 1990, 2008).

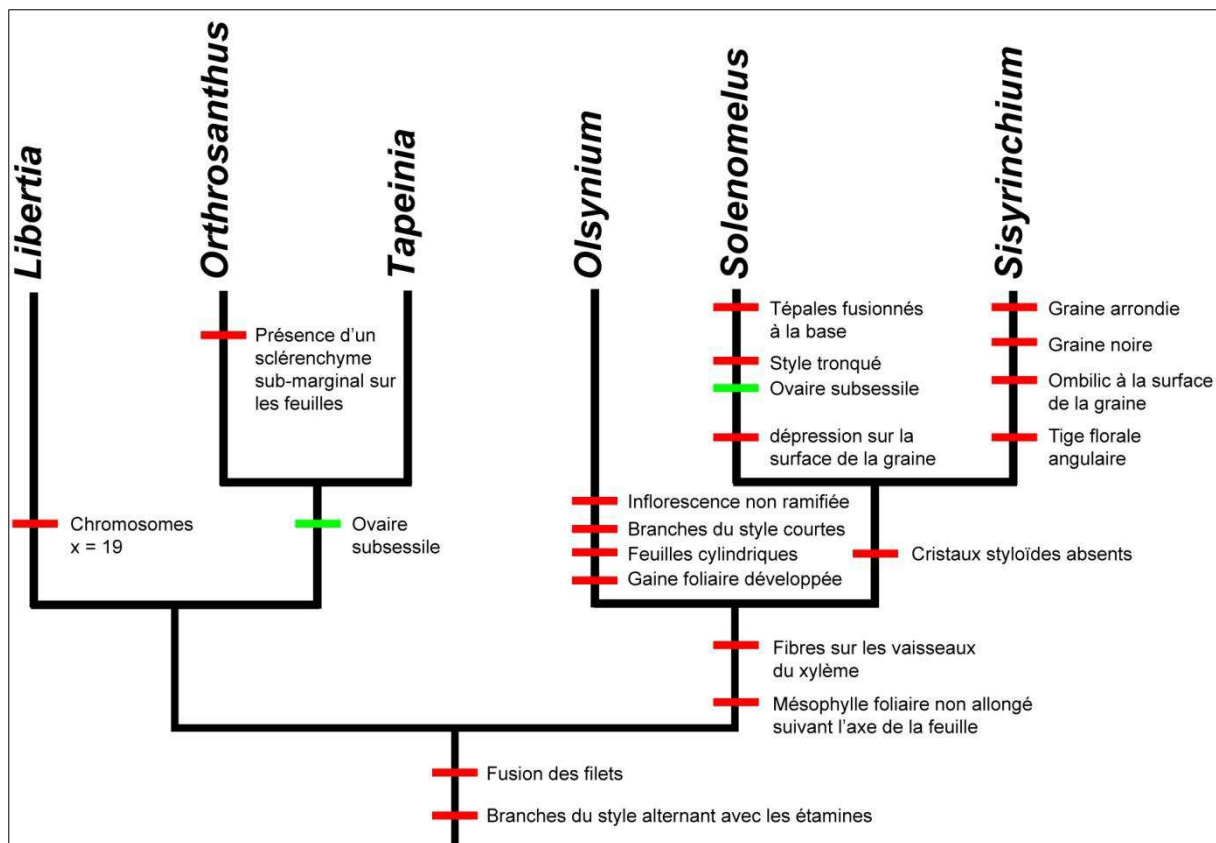


Figure 10. Principales synapomorphies morphologiques et anatomiques entre les genres de la tribu des Sisyrinchieae (d'après Goldblatt et al., 1990, 2008). Les barres vertes indiquent un parallélisme de l'état de caractère entre plusieurs lignées.

La richesse spécifique du genre *Sisyrinchium* place celui-ci au quatrième rang par ordre d'importance à l'intérieur de la famille. Outre cette caractéristique, il se distingue par une distribution géographique particulièrement large, couvrant le continent américain du Groenland à la Terre de Feu et du niveau de la mer jusqu'à une altitude de plus de 4000 m dans les Andes péruviennes (Rudall et al., 1986). Le développement d'élaïophores de type trichome concerne approximativement 35% des espèces au sein du genre et est unique à l'intérieur de la tribu (Vogel, 1974; Cocucci & Vogel, 2001; Goldblatt & Manning, 2008). De plus, les élaïophores de la plupart des espèces se situent sur la colonne staminale et ce type de développement ne connaît pas d'équivalent au sein des Iridaceae (Cocucci & Vogel, 2001; Rudall et al., 2003; Goldblatt & Manning, 2008).

Les cinq autres genres qui composent la tribu comptent un nombre très réduit d'espèces, compris entre un et environ une douzaine, et sont distribués essentiellement dans les régions andines d'Amérique du Sud, notamment au Chili et en Argentine (Goldblatt et al., 1990; Goldblatt & Manning, 2008). La distribution disjointe des genres *Orthrosanthus* et *Libertia* s'expliquerait par une dispersion de ces deux genres à l'époque (jusqu'au milieu de l'Eocène)

où l'Amérique du Sud et l'Australasie étaient encore connectées via le continent Antarctique (Goldblatt et al., 2008).

3.2. Trimezieae

La dichotomie observée au sein de la phylogénie moléculaire des Iridaceae entre la tribu des Sisyrinchieae et le clade formé par les tribus des Trimezieae et des Tigridiaceae est non seulement soutenue de manière robuste par les données moléculaires mais elle se caractérise aussi par plusieurs synapomorphies morphologiques (Goldblatt et al., 1990, 2008). Les filets des anthères sont généralement libres et ne sont pas suffisamment robustes pour soutenir les anthères qui sont maintenues en position plus ou moins érigée par les branches épaissies du style auxquelles elles adhèrent (Fig. 11).



Figure 11. Androcée et gynécée typiques du clade formé par les tribus des Trimezieae et des Tigridiaceae. Les filets des étamines sont libres et ne soutiennent pas les anthères qui sont maintenues en position érigées par les branches épaissies du style auquel elles adhèrent. (A) Fleur de *Trimezia exillima* Ravenna (Trimezieae). (B) Fleur de *Cypella fucata* Ravenna (Tigridiaceae).

Néanmoins cet état de caractère disparaît dans quelques genres dérivés au sein de la tribu des Tigridiaceae où les filets peuvent être partiellement à entièrement fusionnés (Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt & Manning, 2008). Enfin, l'existence de nectaires et d'élaïophores sur les tépales internes des membres de ces deux tribus est aussi considérée comme dérivée pour ce clade (Goldblatt et al., 1990).

A l'intérieur de ce groupe monophylétique, la tribu des Trimezieae constitue un clade également soutenu de manière robuste par les données moléculaires et caractérisé par un organe de réserve constitué par un rhizome compact, souvent érigé et parfois comparable à un corne de par sa compacité (Goldblatt et al., 2008). Elle se compose de trois genres

(*Neomarica*, *Pseudotrimezia* et *Trimezia*) dont la systématique et les délimitations taxonomiques restent aujourd'hui mal connues (Ravenna, 1977, 1988; Goldblatt et al., 1990; Chukr & Giulietti, 2001; Chukr & Giulietti, 2003; Chukr & Giulietti, 2008; Goldblatt & Manning, 2008; Bragança Gil et al., 2009). Le genre *Pseudotrimezia* est endémique de l'état de Minas Gerais au centre du Brésil, et se caractérise au sein de la tribu par des fleurs à tépales subégaux et l'absence de nectaires ou d'élaïophores sur les tépales (Chukr & Giulietti, 2003). La diversité spécifique des genres *Neomarica* et *Trimezia* est concentrée au centre du Brésil mais quelques espèces sont distribuées jusqu'à l'Amérique Centrale (Henrich & Goldblatt, 1987; Chukr & Giulietti, 2008; Goldblatt & Manning, 2008). Les deux genres se distinguent par plusieurs caractères morphologiques. Les espèces du genre *Neomarica* possèdent des rhizomes rampants, une inflorescence portée par une tige compressée et largement ailée et il n'existe qu'une seule feuille caulinaires située au niveau de l'entre-nœud de la tige florale précédant immédiatement l'inflorescence. Cette dernière est généralement simple mais peut dans certains cas être ramifiée, les ramifications étant habituellement subsessile et regroupées à l'apex (Henrich & Goldblatt, 1987; Chukr & Giulietti, 2001; Brangança Gil et al., 2009). Les espèces du genre *Trimezia* possèdent un rhizome extrêmement compact et érigé, comparable à un corme. L'inflorescence est portée par une tige cylindrique à elliptique et l'inflorescence est généralement ramifiée (Henrich & Goldblatt, 1987; Chukr & Giulietti, 2008; Goldblatt & Manning, 2008).

Les fleurs de ces deux genres possèdent un périanthe en forme de coupe, les tépales internes étant convolutés. La présence de trichomes glandulaires dans un repli de la surface adaxiale situé à la base du limbe des tépales internes est avérée pour *Trimezia* et *Neomarica* mais le type de sécrétion diffère d'un genre à l'autre. Alors que ces trichomes glandulaires sont des élaïophores dans le genre *Trimezia*, Stefan Vogel a mis en évidence que les trichomes de *Neomarica* sécrètent du nectar (Vogel, 1974; Simpson & Neff, 1981; Ravenna, 1984, 1988).

3.3. Tigridaeae

La tribu des Tigridaeae forme un clade soutenu lui aussi de manière robuste par les données moléculaires au sein de la phylogénie des Iridaceae (Goldblatt et al., 2008). La distribution géographique des membres de cette tribu couvre essentiellement les zones tempérées et andines de l'Amérique du Sud ainsi qu'une grande partie de l'Amérique centrale et le sud est des États-Unis (Goldblatt et al., 1990; Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt & Manning, 2008). Les principaux centres de diversité sont situés dans le bassin du Paraná et au Mexique

(Goldblatt & Manning, 2008). Plusieurs synapomorphies caractérisent cette tribu, les trois principales étant la présence d'un bulbe pour l'organe de réserve, un nombre chromosomique de base $x=7$ et des feuilles caduques et plicatulées (Goldblatt et al., 1990; Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008).

La circonscription des genres au sein de cette tribu demeure aujourd'hui difficile à établir, leur nombre variant de 15 à 20 suivant les auteurs avec de nombreux genres monospécifiques, et il est difficile de savoir combien de genres devraient être reconnus et quels caractères sont importants pour établir leur définition (Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt & Manning, 2008). Goldblatt & Manning (2008) suggèrent que ce nombre devrait être inférieur à 15, de nombreux genres étant définis uniquement à partir de légères variations de la structure des étamines et du style. Les analyses moléculaires ont déjà mis en évidence que plusieurs d'entre eux devraient ainsi faire l'objet d'une révision (Rodríguez, 1999; Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008). Les genres *Fosteria*, *Rigidella* et *Sessilanthera*, par exemple, sont nichés à l'intérieur du genre *Tigridia* et les variations mineures observées au niveau du périanthe et de l'appareil reproducteur (Fig. 12) sont le reflet de changements de stratégies de pollinisation entre ces différentes espèces (Rodríguez, 1999; Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008; Goldblatt & Manning, 2008). Néanmoins, le fait que de nombreux genres encore reconnus aujourd'hui soient absents des différentes phylogénies moléculaires publiées et que la représentativité des genres au regard du nombre d'espèces qui les composent soit insuffisante, n'ont pas permis de proposer une révision globale de la systématique de la tribu et de comprendre la complexité des relations de parenté à l'intérieur de ce clade (Goldblatt et al., 2008).

Parmi les Tigridieae, de nombreux genres présentent des structures glandulaires florales productrices soit de lipides, soit de nectar. Ces structures sont essentiellement des trichomes glandulaires unicellulaires présents sur la face adaxiale de la base du limbe des tépales internes, mais aussi parfois à la base de la face adaxiale des tépales externes, comme au sein du genre *Herbertia*. Ces trichomes sont des élaïophores, principalement à l'intérieur des genres *Alophia*, *Cypella*, *Ennealophus*, *Herbertia*, *Hesperoxiphion* et *Tigridia* (sous-genre *Tigridia*), mais produisent du nectar au sein du genre *Tigridia* (sous-genre *Hydrotaenia* et des espèces historiquement décrites au sein des genres *Fosteria* et *Rigidella*) (Molseed, 1968; Cruden, 1971; Vogel, 1974; Ravenna, 1981a, 1981b, 1989; Henrich & Goldblatt, 1994; Lee, 1994; Goldblatt & Manning, 2008).

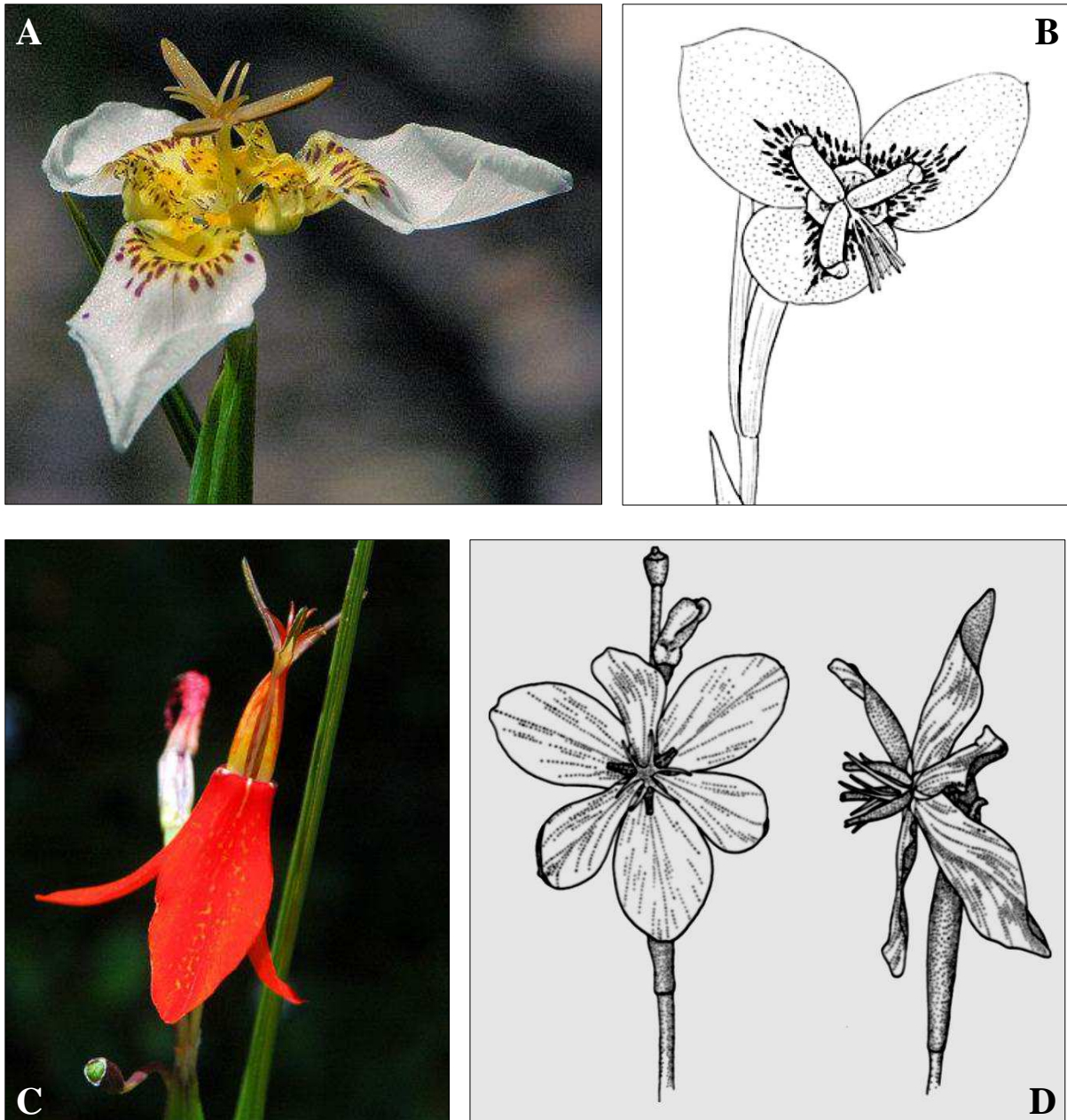


Figure 12. Diversité de la morphologie florale au sein du genre *Tigridia sensu* Goldblatt & Manning (2008). (A) Fleur de *Tigridia chiapensis* Molseed : périanthe en forme de coupe, tépales inégaux, filets des étamines partiellement soudés, style trifide, chaque ramification étant subdivisée en deux lobes allongés et divergents, stigmates disposés à l'apex des ramifications, élaïophores de type trichome disposés sur les tépales internes (© www.dancingoaks.com). (B) Fleur de *Tigridia oaxacana* (Molseed) Goldblatt (= *Fosteria oaxacana* Molseed) : périanthe en forme de coupe, tépales inégaux, filets des étamines totalement soudés, style subdivisé en 6 ramifications érigées, les surfaces stigmatiques couvrant l'ensemble des ramifications, trichomes nectarifères sur les tépales internes (d'après Molseed (1968)). (C) Fleur de *Tigridia orthanta* (Lem.) Ravenna (= *Rigidella orthanta* Lem.) : pièces internes du périanthe en forme de coupe, tépales inégaux, tépales externes en forme de tube, tépales internes érigés, filets des étamines totalement soudés, style trifide, chaque ramification étant subdivisée en deux lobes allongés et divergents, stigmates disposés à l'apex des ramifications, trichomes nectarifères sur les tépales internes (© Mary Sue Ittner). (D) Fleur de *Sessilanthera latifolia* (Weath.) Molseed & Cruden : périanthe en forme d'étoiles, tépales subégaux, filets des étamines totalement soudés, style trifide, chaque ramification étant subdivisée en deux lobes allongés et divergents, stigmates disposés à l'apex des ramifications, absence de structures glandulaires (d'après Molseed and Cruden (1969)).

Deux cas de production de nectar à partir de l'épiderme des tissus connectifs des anthères ont par ailleurs été signalés, l'un concernant *Alophia drummondii* (Graham) R.C.Foster et l'autre *Cypella herbertii* (Lindl.) Herb. Ce type de structure glandulaire a été très peu étudié et il n'existe pas d'autres observations au sein des Tigridieae qui permettent de savoir s'il s'agit de cas isolés ou si ce type de structure sécrétrice existe plus généralement à l'intérieur de ces genres (Lee, 1994; Devoto & Medan, 2008). Néanmoins dans ces deux cas, lipides et nectar sont produits simultanément par la même plante, ce qui pourrait suggérer un système de pollinisation bimodal comparable à celui qui a été observé chez les Crocoideae pour l'espèce *Tritoniopsis parviflora* (Manning & Goldblatt, 2002, 2005).

4. Objectifs de la présente thèse

L'état de la connaissance relative à la phylogénie des trois tribus américaines de la sous-famille des Iridoideae ainsi qu'à l'évolution de la pollinisation avec récompense lipidique au sein de celles-ci laisse plusieurs questions en suspens, en particulier celle du rôle joué par la production de ressources lipidiques florales dans la diversification de la famille des Iridaceae sur le continent américain.

En effet, si la mise en place de la zygomorphie et le développement d'un tube à la base du périanthe sont les deux facteurs prépondérants responsables de la diversification extraordinaire de la famille en Afrique sub-saharienne, il est possible que la diversification de la sous-famille des Iridoideae sur le continent américain, essentiellement dans la zone biogéographique néotropicale et les zones tempérées immédiatement adjacentes, ait plutôt comme origine le développement de structures florales sécrétant des lipides.

Au sein de ces tribus, le genre *Sisyrinchium* présente des caractéristiques écologiques et morphologiques particulières. La richesse spécifique qui le caractérise, ainsi que l'extension du genre sur une grande partie du continent américain au sein d'écosystèmes extrêmement variés constituent deux paramètres essentiels qui le différencient des autres genres non seulement à l'intérieur de la tribu des Sisyrinchieae mais aussi à l'échelle globale des Iridaceae où seuls les genres *Iris*, *Moraea* (Irideae: Iridoideae) et *Gladiolus* (Gladioleae: Crocoideae) présentent des caractéristiques comparables. Par ailleurs, à la différence des autres membres des Iridoideae dont les élaïophores se sont développés uniquement sur les pièces du périanthe, le genre *Sisyrinchium* se caractérise par le développement de ces structures sur la colonne staminale de la majorité des espèces possédant des élaïophores, et par l'existence également de nombreuses espèces dont la seule ressource utilisable par les

pollinisateurs est le pollen, laissant supposer l'existence de plusieurs systèmes de pollinisation à l'intérieur du genre.

En conséquence, une stratégie d'étude à deux échelles taxonomiques différentes a été mise en œuvre afin de tester l'importance du développement de la pollinisation avec récompense lipidique au sein des Iridaceae et d'évaluer le rôle joué par ce système de pollinisation rare à l'échelle des angiospermes sur la diversification de la famille à travers le continent américain.

Connaître les relations phylogénétiques et comprendre l'histoire évolutive des élaïophores à ces deux échelles taxonomiques ne constituent qu'un objectif proximal. En effet, plus largement, l'obtention de ces informations est le point de départ d'autres axes de recherche concernant notamment la biologie de la pollinisation de l'ensemble de ces taxons afin de comprendre la nature des relations mutualistes qui se sont établies entre plantes et pollinisateurs au cours de l'évolution et le rôle de ces dernières dans la dynamique des écosystèmes où elles se sont développées.

En résumé, les objectifs ayant orienté les recherches menées dans le cadre de ce travail de thèse étaient les suivants :

◆ **Phylogénies moléculaires à plusieurs niveaux taxonomiques**

- La sous-famille des Iridoideae

Afin de résoudre la position phylogénétique de nombreux taxons mal connus ou dont la position phylogénétique n'a jamais été testée au moyen de phylogénies moléculaires, un large échantillonnage couvrant au mieux la diversité taxonomique de l'ensemble des genres constituant les 3 tribus sujets de l'étude a été réalisé. A partir de cet échantillonnage, une phylogénie moléculaire multi-marqueurs, basée sur le jeu de marqueurs chloroplastiques utilisé par Goldblatt et al. (2008) complété par l'ajout de plusieurs marqueurs chloroplastiques non-codants, a été réalisée afin de produire un cadre phylogénétique robuste indispensable pour atteindre les objectifs suivants à cette échelle taxonomique.

- Le genre *Sisyrinchium*

Les mêmes objectifs ont été poursuivis pour le genre *Sisyrinchium*. Au début de ce travail, seules trois espèces sur 140 avaient été échantillonnées dans le cadre des phylogénies moléculaires de la famille ou de la sous-famille des Iridoideae publiées à ce jour (Souza-Chies et al., 1997; Reeves et al., 2001; Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008).

L'obtention d'un échantillonnage suffisamment important pour couvrir l'ensemble du genre a nécessité le développement d'une collection vivante à partir de semences afin de disposer du matériel nécessaire aux différents volets de l'étude, ainsi que plusieurs campagnes de collectes sur le terrain afin de couvrir au mieux la diversité taxonomique du genre. Le développement d'un partenariat avec une équipe de recherche de l'Université Fédérale du Rio Grande do Sul (Brésil) a fait partie des moyens mis en œuvre pour réaliser cet objectif. Ce partenariat, ainsi que les missions de terrain ont été financés dans le cadre du projet CAPES/COFECUB Sv550/07. Par ailleurs, afin de disposer d'une phylogénie moléculaire suffisamment résolue à cette échelle taxonomique, il a été nécessaire, au regard des objectifs de l'étude, de développer un jeu de marqueurs couvrant l'ensemble des trois génomes.

◆ **Histoire évolutive des structures florales productrices de lipides**

A l'issue de ces travaux d'échantillonnage et de phylogénie, les scénarios évolutifs des élaïophores ont été déduits aux deux échelles taxonomiques. Les données nécessaires afin de réaliser ce volet de l'étude ont été recueillies essentiellement dans la littérature à l'échelle des Iridoideae et les caractères étudiés ont concerné l'évolution des structures florales tant productrices de lipides que de nectar pour tester l'éventuelle existence de relations évolutives entre ces deux types de structures très proches anatomiquement au sein des tribus faisant l'objet de l'étude. À l'échelle du genre *Sisyrinchium*, le faible nombre de données disponibles dans la littérature ne permettant pas d'effectuer ce travail dans les mêmes conditions (Vogel, 1974; Cocucci & Vogel, 2001), l'échantillonnage de terrain et la collection vivante ont été utilisés pour vérifier la présence de ces structures pour chaque espèce échantillonnée et le type de sécrétion produite par ces structures.

◆ **Diversification de la sous-famille des Iridoideae sur le continent américain**

Afin de tester si l'évolution des élaïophores, et plus largement des structures florales productrices de ressources susceptibles d'être utilisées par les pollinisateurs, ont joué un rôle dans la diversité taxonomique aujourd'hui observée au sein de la sous-famille des Iridoideae, plusieurs méthodes d'analyses ont été mises en œuvre et les résultats ont été discutés au regard du rôle majeur joué par l'évolution de caractères morphologiques et reproducteurs dans la diversification de la famille sur le continent africain.

◆ Diversification du genre *Sisyrrinchium*

Les mêmes outils ont été utilisés pour répondre à cette question au sein du genre *Sisyrrinchium* afin de tester si l'évolution des élaïophores peut avoir joué un rôle différent à cette échelle taxonomique réduite. En outre, la phylogénie moléculaire du genre a été utilisée afin d'inférer l'histoire biogéographique de *Sisyrrinchium* et d'identifier le rôle potentiel de l'évolution des élaïophores dans la dispersion du genre sur le continent américain.

Les travaux menés afin de remplir ces objectifs ont donné lieu à trois articles, un publié et deux soumis.

CHAPITRE 1

Phylogénie moléculaire, systématique et évolution de la sous-famille des Iridoideae



Cypella discolor Ravenna (Tigridieae: Iridoideae) : les élaïophores sont situés sur le pli longitudinal des tépales internes. Specimen photographié au sud-ouest de l'état du Rio Grande do Sul, Brésil.



Sisyrinchium sellowianum Klatt (Sisyrinchieae : Iridoideae) : la position des élaïophores sur la colonne staminale est typique du genre. Specimen photographié au nord de l'état du Santa Catarina, Brésil.

1. Phylogénie moléculaire et scénarios évolutifs

Ce premier chapitre présente les travaux de phylogénie moléculaire et de reconstruction de l'histoire évolutive des structures glandulaires de type trichome au sein des fleurs à l'échelle de la sous-famille des Iridoideae. Ces travaux répondent à deux objectifs :

- (i) identifier les transitions vers le développement de structures glandulaires de type trichome, productrices de nectar ou de lipides floraux, ainsi que les éventuelles réversions qui se sont produites au cours de l'histoire évolutive des tribus Sisyrinchieae, Trimezieae et Tigridaeae,
- (ii) évaluer le rôle joué par l'évolution de ces structures dans la diversification de la sous-famille des Iridoideae sur le continent américain.

1.1. Résumé du contexte et des méthodes de l'article 1

1.1.1. Echantillonnage taxinomique

La systématique la plus récente de la famille des Iridaceae reconnaît 24 genres au sein des trois tribus américaines de la sous-famille des Iridoideae (Goldblatt & Henrich, 1991; Goldblatt & Manning, 2008). Néanmoins, la délimitation de plusieurs genres telle qu'elle est définie par les auteurs n'est pas encore unanimement acceptée (Ravenna, 2001, 2009; Rodríguez & Sytsma, 2006) et les auteurs eux-même restent prudents quant à la révision de certains genres (Goldblatt & Manning, 2008). Il a donc semblé pertinent d'échantillonner largement au sein de ces genres dans le cadre d'une étude portant sur l'évolution de caractères morphologiques impliqués dans la biologie de la pollinisation, car c'est en effet essentiellement la variation de ces caractères qui fut à la base des distinctions génériques faites par le passé (Goldblatt & Manning, 2008). Au sein de la tribu des Tigridaeae, l'échantillonnage inclut ainsi les genres *Ainea*, *Cardiostigma*, *Colima*, *Fosteria*, *Rigidella* et *Sessilanthera*, intégrés dans le genre *Tigridia*, ainsi que *Kelissa*, *Onira* et *Phalocallis*, intégrés dans *Cypella*, les genres *Tamia* et *Catila*, intégrés dans *Calydorea*, et *Cardenanthus* intégré dans *Mastigostyla* (Goldblatt & Manning, 2008). De même, les genres *Phaiophleps* et *Chamelum*, intégrés dans le genre *Olsynium* au sein de la tribu des Sisyrinchieae, ont aussi été ajouté à l'échantillonnage (Goldblatt et al., 1990). Seuls deux genres monospécifiques (*Salpingostylis* et *Tapeinia*) n'ont pas pu être inclus dans l'échantillonnage, faute de matériel disponible et utilisable dans le cadre des travaux de l'étude.

La représentativité de nombreux genres au sein de la phylogénie moléculaire publiée par Goldblatt et al. (2008) était réduite à une seule espèce pour la plupart des genres, totalisant

seulement 34 espèces, et représentant moins de 9% de la richesse spécifique au sein du clade regroupant les tribus des Sisyrinchieae, Trimezieae et Tigridieae (cf. Figure 9). L'échantillonnage a donc été augmenté au sein de chaque genre afin d'obtenir une phylogénie plus représentative de la diversité existante au sein des différentes tribus sujets de l'étude, totalisant 97 espèces et représentant plus de 25% de la richesse spécifique du clade.

1.1.2. Echantillonnage génétique

Afin que la phylogénie moléculaire réalisée dans le cadre de cette étude puisse être utilisée dans le contexte global de la famille des Iridaceae dans le futur, le choix des régions du génome chloroplastique utilisées par Goldblatt et al. (2008) s'est imposé à cette échelle taxonomique. Les régions codantes *rps4*, *matK*, *rbcL* ainsi que la région *trnL-F* (incluant les deux exons et l'intron *trnL*, la région intergénique *trnL-trnF* et l'exon *trnF*) et l'intron *rps16* constituent ce jeu de marqueurs chloroplastiques (Taberlet et al., 1991; Oxelman et al., 1996; Souza-Chies et al., 1997; Reeves et al., 2001; Hilu et al., 2003). Néanmoins, le but de cette partie de l'étude étant de clarifier les relations phylogénétiques à une échelle taxonomique plus réduite et de produire une phylogénie robuste qui pourra être utilisée comme base de travail pour étudier l'évolution de caractères phénotypiques, il semblait opportun au regard de la faiblesse des supports obtenus par Goldblatt et al. (2008) au niveau de plusieurs nœuds, notamment au sein du clade des Tigridieae, de compléter l'échantillonnage génétique à l'aide de plusieurs régions non codantes du génome chloroplastique, ces régions présentant potentiellement des taux de substitution plus élevés que les régions codantes (Shaw et al., 2005, 2007). Le choix des régions intergéniques *rps4-trnS* et *matK-trnK* a été motivé par la comparaison des séquences d'Iridoideae déjà disponibles pour ces deux régions sur GenBank, indiquant un pourcentage important de variabilité au sein de chacune d'elle (Souza-Chies et al., 1997; Reeves et al., 2001; Goldblatt et al., 2008).

1.1.3. Étude des structures florales productrices de lipides

Comme cela a été vu précédemment, les trichomes glandulaires présents au sein des fleurs de nombreuses espèces des tribus américaines de la sous-famille des Iridoideae produisent soit du nectar soit des lipides qui sont collectés par les pollinisateurs. Ces structures glandulaires ne semblent se différencier que par le type de ressource qu'elles sécrètent et il est possible qu'elles soient liées d'un point de vue développemental et évolutif (Rudall et al., 2003). L'étude de l'évolution de ces structures florales a donc été menée en considérant l'ensemble des trichomes produisant des ressources au sein des fleurs des espèces composant chacune des

tribus (Sisyrinchieae, Trimezieae et Tigridieae). Les observations disponibles dans la littérature, complétées par des observations personnelles, ont permis de construire une matrice rassemblant les différents états observés pour les trichomes floraux de chaque espèce incluse dans l'échantillonnage. La phylogénie moléculaire a été utilisée pour inférer l'histoire évolutive des différents types de trichomes floraux dans le contexte des tribus américaines de la sous-famille des Iridoideae. Dans un deuxième temps, différentes méthodes d'estimation de l'évolution du taux de diversification au sein de la phylogénie ont été mis en œuvre afin d'une part, de mettre en évidence l'existence éventuelle de variations au sein de la phylogénie, et d'autre part d'évaluer l'impact de la présence des trichomes floraux, et plus particulièrement des élaïophores, sur la diversification du groupe taxonomique sujet de l'étude.

1.2. Article 1

Original Article

<p style="text-align: center;">Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera</p>

Olivier Chauveau^{1,*}, Lilian Eggers², Tatiana T. Souza-Chies² and Sophie Nadot¹

¹*Université Paris-Sud, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR 8079, Orsay, F-91405, France,* ²*Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43433, Brazil,*

* *Corresponding author (e-mail: olivier.chauveau@u-psud.fr)*

Cet article a été soumis à la revue *Annals of Botany*. Olivier Chauveau a collecté les échantillons, réalisé les identifications, le travail de laboratoire, les analyses, et la rédaction de l'article. Lilian Eggers a participé à l'échantillonnage, à la rédaction de l'article et a révisé les identifications. Tatiana T. Souza-Chies et Sophie Nadot ont initié le projet et participé à la rédaction de l'article.

Note : les références manquantes des séquences soumises à GENBANK dans l'appendice 1 de l'article seront ajoutées dans le manuscrit final.

Abstract

Background and aims

Oil-producing flowers related to oil-bee pollination are a major innovation in Neotropical and Mexican Iridaceae. We investigated phylogenetic relationships among a wide array of New World genera of the tribes Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridieae (Iridaceae: Iridoideae) and examined the evolution of nuptial glandular structures, which are predominantly trichomal elaiophores.

Methods

Phylogenetic analyses based on seven molecular markers obtained from 97 species were conducted to produce the first extensive phylogeny of the New World tribes of subfamily Iridoideae. The resulting phylogenetic hypothesis was used to trace the evolutionary history of glandular structures present within the flowers of numerous species in each tribe. Hypotheses of differential diversification rates among lineages were also investigated using both topological and Binary-State Speciation and Extinction (BISSE) methods.

Key results and conclusions

Nuptial glandular structures and especially trichomal elaiophores evolved multiple times independently in the American tribes of Iridoideae. The distribution pattern of species displaying nuptial glandular trichomes across the phylogeny reveals lability in the pollination system and suggests that these structures may have played a significant role in the diversification of the Iridoideae on the American continent.

Key words: elaiophores, glandular trichomes, Iridoideae, nectaries, pollination systems, Sisyrinchieae, Tigridieae, Trimezieae.

INTRODUCTION

Bees are the world's dominating pollinating agents. Their role in pollination and in turn in sexual reproduction ranges from simply beneficial to essential for the pollination of much of the natural vegetation of the world (Michener, 2007). In addition to or instead of pollen and nectar, which are the two most common resources collected by bees, flowers of 11 unrelated families distributed throughout the angiosperms produce non-volatile oils (Buchmann, 1987; Rasmussen and Olesen, 2000; Steiner and Whitehead, 2002; Neff and Simpson, 2005; Renner and Schaefer, 2010). These oils are collected and mainly used as food stores for larvae by specialized bees of the Melittidae and Apidae families of Hymenoptera (Michener, 2007). Floral epithelial or trichomal oil-producing organs, so-called elaiophores, are present in more than 1500 species of flowering plants. Twenty-eight transitions towards oil-bee pollination were identified among angiosperms, and Iridaceae is one of the two families where elaiophores evolved more than once (Renner and Schaefer, 2010). The actual number of transitions in Iridaceae is unknown due to phylogenetic uncertainties, but the latest comprehensive phylogeny of Iridaceae (Goldblatt et al., 2008) allowed to identify at least three independent origins of oil offering flowers within the family (Renner and Schaefer, 2010), although numerous New World genera were missing or poorly sampled regarding their morphological diversity and species richness.

Floral oils are the third type of resource collected by pollinators in Iridaceae (Goldblatt and Manning, 2008), coming after pollen and nectar. All transitions but one towards oil-offering flowers concern strictly American taxa of the Iridoideae (Renner & Schaefer, 2010), where oils are produced by conspicuous glandular trichomes located on the tepals or the staminal column. *Tritoniopsis parviflora* (Jacq.) G.J.Lewis (Crocoideae), from South Africa, is the only oil-producing species outside Iridoideae and outside America. It stands out from the rest of Iridaceae by secreting floral oils from epithelial elaiophores (Manning and Goldblatt, 2002).

The subfamily Iridoideae is a major evolutionary branch of the family, comprising at least 815 species and making up about 40% of the species richness within the family (Goldblatt and Manning, 2008). The Iridoideae are subdivided in four large tribes plus the Australian genus *Diplarrena* Labill., which is the only representative of the monotypic Diplarreneae, sister to all other tribes (Goldblatt and Manning, 2008). The predominantly Old World Irideae (with some species of *Iris* Tourn. ex L. in North America), and the largely New World Sisyrinchieae (*Libertia* Spreng. and *Orthrosanthus* Sweet include Australasian species), sister

to the two strictly New World tribes, Trimezieae and Tigridaeae, form a monophyletic lineage defined by molecular and morphological synapomorphies (Goldblatt, 1990; Reeves et al., 2001; Rodriguez and Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008; Goldblatt and Manning, 2008). The major dichotomy in the Iridoideae is the separation of the Old World genera, and the New World genera including *Libertia* and *Orthrosanthus* (Goldblatt et al., 2008).

Trichomal elaiophores are particularly widespread in *Sisyrinchium*, the largest genus in the New World Iridaceae (c. 140 species). They are located either on the staminal column or on the adaxial side of the tepals, sometimes on both parts, a distribution pattern that was only observed on flowers of this genus (Goldblatt and Manning, 2008; Chauveau et al., 2011). A recent comprehensive study of *Sisyrinchium* L. suggested that floral glandular trichomes evolved three times independently in the genus, including two transitions towards oil-secreting trichomes (Chauveau et al., 2011). Trichomal elaiophores evolved also probably once in the common ancestor of Trimezieae and Tigridaeae, with at least six reversions (Renner and Schaefer, 2010).

However, these estimates rely on a phylogeny in which, due to incomplete sampling of genera and lack of representativeness in the most species rich genera, phylogenetic and taxonomical relationships inside the American tribes Trimezieae and Tigridaeae remain poorly understood, preventing us from identifying precisely all the transitions toward oil-bee pollination within these tribes (Reeves et al., 2001; Rodriguez and Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008).

It has been suggested that elaiophores may have evolved from perigonal nectaries (Rudall et al., 2003), since both trichomal nectaries and trichomal elaiophores are widespread among the three mostly American tribes of the Iridoideae with high topological and anatomical similarities, although this hypothesis remains untested.

The goal of this study was to elucidate phylogenetic relationships among and within the tribes Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridaeae (Fig. 1) using a large sampling of species, representing the taxonomic diversity of these tribes. A total evidence approach was carried out to produce molecular phylogenetic trees and to test the monophyly of the generic divisions defined in the published classifications. The resulting historical framework was used to infer the evolutionary history of nuptial trichomes, mainly nectaries and elaiophores, towards a better understanding of the evolution of pollination strategies in relation to floral secretions. Differential diversification rates analyses were used to estimate whether nuptial trichomes, and more specifically trichomal elaiophores, may have contributed to the diversification of the Iridaceae on the American continent.



Figure 1. Floral morphology in tribes Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridaeae included in the present study: (A to B) Sisyrinchieae: (A) *Sisyrinchium sellowianum*, (B) *Olsynium junceum*, (C) Trimezieae: *Neomarica candida*, (D to I) Tigridaeae: (D) *Calydorea crocoides*, (E) *Cypella herbertii*, (F) *Herbertia quareimana*, (G) *Onira unguiculata*, (H) *Gelasine elongata* and (I) *Cardenanthus vargasii*.

MATERIALS AND METHODS

Taxonomic sampling

The list of taxa sampled, voucher information and GenBank accession numbers is given in Appendix 1. We sampled a total of 97 species covering most of the genera proposed in the

literature for the tribes Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridieae. Based on the systematic published by Goldblatt and Manning (2008), only two monospecific genera are missing: *Tapeinia* Juss. (Sisyrinchieae) and *Salpingostylis* Small (Tigridieae). Within the tribe Tigridieae, our sampling included species which formerly belonged to genera reduced or provisionally retained in *Tigridia* Juss. (*Ainea* Ravenna, *Cardiostigma* Baker, *Colima* (Ravenna) Aarón Rodr. & Ortiz-Cat., *Fosteria* Molseed, *Rigidella* Lindl. and *Sessilanthera* Molseed & Cruden), *Cypella* Herb. (*Kelissa* Ravenna, *Onira* Ravenna and *Phalocallis* Herb.), *Calydorea* Herb. (*Catila* Ravenna and *Tamia* Ravenna) and *Mastigostyla* I.M.Johnst. (*Cardenanthus* R.C.Foster). The monophyly of these recent taxonomic circumscriptions still remains to be tested, and variation in the presence/absence of trichomal nectaries and elaiophores is widespread in these genera (Ravenna, 1979, 1981, 1983, 2009; Goldblatt and Henrich, 1991; Goldblatt and Manning, 2008), accounting for our extensive sampling. Outgroups were selected from the genera *Iris*, *Dietes* Salisb. ex Klatt and *Diplarrena* (one species per genus), and represent the two other tribes of Iridoideae (Goldblatt et al., 2008). Plant material was sampled mostly from the wild, or from cultivated specimens obtained from seeds collected in the wild and grown in botanical gardens or national collections.

DNA extraction, amplification and sequencing

Total DNA was extracted from fresh or silica gel-dried leaves using the NucleoSpin[®] Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) extraction kit, following manufacturer's instructions. A combination of coding and non-coding cpDNA regions was used to infer phylogenetic relationships among the taxa sampled. We selected the five DNA regions already used by Goldblatt et al. (2008): three coding regions (*rps4*, *matK* and *rbcL*), the *trnL-F* region (*trnL* intron, *trnL* exon 2 and the intergenic spacer *trnL-trnF*) and the *rps16* intron (Taberlet et al., 1991; Johnson & Soltis, 1995; Oxelman et al., 1997; Souza-Chies et al., 1997; Reeves et al., 2001). These loci have shown their potential to complement each other in improving the phylogenetic signal at the family and subfamily taxonomic levels within Iridaceae (Souza-Chies et al., 1997; Reeves et al., 2001; Goldblatt et al., 2008). Our study includes molecular characters from two additional non-coding cpDNA regions (spacer *rps4-trnS* and *matK-5'trnK* intron) in order to improve the current resolution of the phylogeny among Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridieae (Shaw et al., 2005, 2007). Primers used to amplify each DNA region and additional primers used for sequencing are given in Table S1 [Supplementary Information]. PCR amplifications were performed using a PTC-100 MJ-

Research thermal cycler in 30 µl total volume reaction with the following reaction components: 1.5 µl of genomic DNA (~15-50 ng), 0.5 µM of each primer, 100 µM of dNTP, 1x of *rTaq* buffer, 1.5 mM of MgCl₂, and 0.2 U of *Taq* polymerase (*Taq* CORE Kit 10, MP Biomedicals, Illkirch, France). The *rps4* + spacer *rps4-trnS*, *matK* + *matK-5'trnK* intron, and *trnL-F* loci were successfully amplified with the addition of DMSO (1.2 µl) to the PCR mix. Detailed PCR conditions for each DNA locus used in this study are given in Table S2 [Supplementary Information]. Each DNA region was amplified as a single fragment except in a few cases where internal primers originally designed for sequencing were used to amplify the targeted region in smaller fragments. PCR products were purified and automatically sequenced by Cogenics (Meylan, France) using an ABI PRISM automatic sequencer (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) with forward and reverse primers. Raw forward and reverse sequences for each sample were assembled with CodonCode Aligner 3.5.3 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA); ambiguous bases were corrected after examination of chromatograms, and consensus sequences were edited.

Phylogenetic analyses

Alignments were first produced using Clustal X (Thompson et al., 1997) and MUSCLE (Edgar, 2004) and further improved manually using MEGA5 (Tamura et al., 2011). All detected polymorphisms (SNPs and insertion-deletions [indels]) were visually checked and further validated using a base quality threshold above 20. The indels of the non-coding regions (spacer *rps4-trnS*, *rps16* intron, *matK-5'trnK* intron and *trnL-F* region) shared by two or more taxa were coded as binary characters using GapCoder (Young and Healy, 2003), a program based on simple indel coding sensu Simmons and Ochoterena (2000). All seven cpDNA regions were first analysed independently (results not shown). Since the comparison of the resulting topologies of separate analyses revealed no instances of well-supported topological differences and, since a better resolution was obtained when these regions were analysed together than separately, they were combined into a single supermatrix for subsequent analysis.

Maximum Parsimony analysis

Data sets including indels coded with GapCoder were analysed using the parsimony criterion in PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2002). Parsimony ratchet (Nixon, 1999) searches consisting of 20 independent replicates of 200 iterations with 15% of characters reweighted

per iteration were scripted using the program PAUPRat (Sikes and Lewis, 2001) and run in PAUP*. Strict and majority-rule consensus trees were calculated from all most parsimonious trees and the robustness of nodes was evaluated using MP with 1000 bootstrap replicates of new heuristic searches (100 random addition replicates, tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping and multrees on).

Maximum likelihood and Bayesian analysis

Maximum Likelihood (ML) analyses (Felsenstein, 1981) were performed using RAxML 7.2.6 (Stamatakis, 2006) with the data partitioned as indicated in Table S3 [Supplementary Information] and the most appropriate evolutionary model implemented for each type of partition. The GTRGAMMA model (GTR model + optimisation of substitution rates + Γ model of rate heterogeneity) was used for the DNA partitions and the BINGAMMA model (model for binary substitution using the Γ model of rate heterogeneity) for the coded indels partitions; the alpha parameter was estimated separately for each DNA and binary partition. To assess the stability of the tree topology and branch length values, 200 independent ML searches were conducted to find the best-scoring ML tree; RAxML used different randomized stepwise addition parsimony starting trees for each ML search. The reliability of ML topologies was evaluated by non-parametric standard bootstrap tests using 1000 pseudo-replicates. Bootstrap values were then summarized and reported on the best-scoring ML tree.

Bayesian MCMC (Yang and Rannala, 1997) analyses were run using MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) with the data partitioned and the most appropriate evolutionary model implemented for each partition as indicated in Table S3 [Supplementary Information]. Model parameters were set to those calculated by MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). The Akaike information criterion was chosen to select the most appropriate model of DNA substitution for each data set or data partition used in the analyses. Coded indels were included in a separate data matrix and treated using a simple model with variable rates. Two independent runs, each comprising four Markov chains (one cold and three heated) and starting with a random tree, were performed simultaneously for 10^7 generations, sampling trees at every 100th generation. Convergence diagnostic was calculated every 10^4 generation and its critical value was set in order to automatically stop the analysis when the standard deviation of the split frequencies had reached the value defined by the stopval command (stoprule=yes stopval=0.01). In all analyses, the first 25% trees from each run were discarded as burnin. Resulting trees from the two independent runs were then pooled to produce one

50% majority rule consensus tree and Bayesian posterior probabilities were generated for the resulting tree.

Combined datasets phylogenies

Node supports resulting from all three analyses (MP, ML and Bayesian) were reported on the best-scoring ML tree. For each analysis, a given support value was kept if the bootstrap support for MP or ML was higher than 50%, or if the posterior probability (PP) was higher than 0.90. Nodes were considered fully supported if they had a Parsimony bootstrap value (PBS) and a ML bootstrap value (LBS) of 100%, as well as a Bayesian posterior probability (PP) of 1.00. Strongly supported nodes were defined with a threshold of at least 80% for the PBS and LBS values, and a PP value ≥ 0.95 . Nodes for which only two of the three support values reach these minimum value and the third support value was at least 50 % (PBS), 60 % (LBS) and 0.95 (PP) were considered moderately supported, and nodes for which only one of the three support values reaches the minimum values and the two other support values were at least 50 % (PBS), 50 % (LBS) and 0.90 (PP) were considered weakly supported.

Characterisation of nuptial glandular structures and trichomes

Glandular structures secreting nectar or oils are present in the flowers of numerous species within tribes Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridieae. Among them, glandular trichomes are predominant. They are located mainly on the stamens but also on the adaxial side of tepals in *Sisyrinchium* species (Sisyrinchieae) and the nature of their secretion has been identified in many species (Chauveau et al., 2011). Among Trimezieae and Tigridieae, glandular trichomes are found only on the adaxial side of inner tepals, except for the genus *Herbertia* Sweet, where they are located on both series of tepals, although much more scattered on the outer tepals (Ravenna, 1989; Goldblatt and Manning, 2008). These structures will be called hereafter nuptial glandular structures and nuptial trichomes to emphasize the difference with glandular structures that can be located elsewhere on the flower (Delpino, 1874; Fahn, 2000; Chauveau et al., 2011). Morphological data were obtained from the literature and from observations on herbarium specimens (BAA, CTES, ICN, K and P) or specimens held in living collections in the botanical gardens of the Université Paris-Sud (France) and Porto Alegre (Brazil) as indicated in Table S4 [Supplementary Information]. When the literature indicated that the presence of nuptial secretory structures was not constant within a genus, this trait was systematically verified for each species included in the study, using herbarium

specimens or living plants. Because we were unable to identify the type of secretion for the nuptial trichomes of *Larentia mexicana* (Tigridieae), this character was coded as unknown. Similarly, uncertainties concerning the presence of nuptial glandular structures remain for species of the genus *Olsynium* Raf. (Sisyrinchieae). *Olsynium douglasii* produces nectar from an extensive vascular tissue located just beneath the outer epidermis of the swollen part of the staminal column whereas *O. junceum* produces nectar from anticlinally elongated epidermal cells on both surfaces of the staminal swollen tube (Forcone et al., 1997; Rudall et al., 2003). It has been suggested that several other species of *Olsynium*, which have a similar swollen base of the staminal column, could produce nectar in the same manner (Rudall et al., 2003). Although this kind of staminal column was observed in the flowers of *O. filifolium* and *O. scirpoideum*, the presence of nectaries was not confirmed. Then, the absence/presence of nuptial glandular structures and the type of secretion were coded as unknown.

For character optimisation, nuptial glandular structures were coded using three discrete characters, respectively the anatomical type (A), the type of secretion (B) and the localisation (C) of nuptial glandular structures. Five states were defined for the first character, namely (0) absent, (1) unicellular trichomes, (2) pluricellular scales, (3) carpel margins cells and (2) epithelial cells. The type of secretion was coded with six states: (0) absence of nuptial glandular structure, (1) trichomal nectaries, (2) trichomal elaiophores, (3) pluricellular scales nectaries, (4) septal nectaries and (5) epithelial nectaries. Nuptial glandular structure localisation was coded as follows: (0) absent, present (1) on the staminal column, (2) on the inner tepals, (3) on both whorls of tepals and (4) on the ovary. The ML best scoring tree was used for character optimisation with the MP and ML methods implemented in MESQUITE 2.75 (Maddison and Maddison, 2010). With MP, character states were treated as unordered, allowing any transition among states. ML optimisation was conducted using the MK1 model of evolution (Schluter et al., 1997; Pagel, 1999), which gives equal probability for changes between all character states.

Detection of differential diversification rates

Two methodological strategies were used to estimate differential diversification rates across the phylogeny inferred. The topological strategy allows the identification of differential diversification rates along a phylogeny independently from character states, whereas the likelihood based BISSE method (Maddison et al., 2007) estimates whether speciation (λ) and

extinction (μ) rates depend on the state of a particular character, and allows the assessment of a state-dependent effect of this character on diversification rates.

The program SymmeTREE (Chan and Moore, 2005) compares the topological species distribution observed to a random species distribution. This method was employed to determine if diversification rate shifts exist across lineages. Being a topological method, it relies on the order of branching events and does not require information on branch lengths. Six whole-tree tests of differential diversification rates, each sensitive to different scenarios and nodal depths, were used. I_c tests for diversification at deeper nodes by determining if the observed trees are more or less asymmetric than expected (Page, 1993). M_π and M_Σ both consider the asymmetry of internal nodes, with M_π sensitive to deeper nodes through multiplication of individual nodes probabilities and M_Σ sensitive to nodes closer to the tips of the tree through addition of node probabilities. M_π^* and M_Σ^* differ from the two previous statistical tests by having each node probability weighted by its size (Chan and Moore, 2002). B_1 measures tree balance as opposed to imbalance; this latter statistical test excludes the root and is sensitive to changes at the tips of the tree (Shao and Sokal, 1990). The MP strict consensus tree, ML best-scoring tree and Bayesian majority rule consensus tree were all used for the SymmeTREE analysis.

The BISSE speciation/extinction likelihood analysis implemented in MESQUITE 2.75 was used to calculate the likelihood and estimate the parameters of a six parameters model of speciation, extinction and character change. This analysis required a fully resolved phylogram and binary characters. Branch lengths were needed for likelihood calculation and for estimating each character state along branches. Therefore, a range of constrained BISSE models were explored to test the hypotheses regarding differential diversification of lineages in the absence (state 0) or presence (state 1) of nuptial glandular trichomes (character D) on the one hand, and of trichomal elaiophores (character E) on the other hand. The different states were coded for each character according to the observations made for characters A and B. The fully relaxed six-parameter model (FR model) using the ML best-scoring tree, was first estimated. Then, more constrained models were compared in a hierarchical manner (models having one parameter constrained (1C models) to be equal versus FR model, models having two parameters constrained (2C models) versus 1C models, and fully constrained model versus 2C model) to test whether the fully relaxed model was a significantly better fit than models in which speciation, extinction or transition rates were equal. Because the BISSE constrained models are nested within the fully relaxed one, the significance of differences in

model was estimated with likelihood ratio tests. Conversely, statistical comparisons were started with the most constrained model (each parameter equal in states 0 and 1) and compared to models relaxing one constraint at a time (1C models). The significance of differences in models was estimated in the same way and when a significant improvement in likelihood was observed, the corresponding model was compared with models relaxing two constraints at a time (2C models) and at last the best 2C model was compared with the FR model.

RESULTS

Phylogenetic analyses

No major incongruences were detected among topologies based on the separate analysis of each cpDNA region, allowing us to combine the datasets. All cpDNA markers were combined into a single supermatrix totalling 6787 characters (including the 310 coded indels), of which 1267 (18.6%) were phylogenetically informative. The parsimony informative characters were distributed mainly among non-coding regions (21.6%), but the percentage of informative characters was also high in coding regions (16.2%), the *matK* region totalling more than 61.9% of the parsimony informative characters of the coding regions.

Parsimony ratchet analysis of all seven cpDNA regions yielded 3969 equally most-parsimonious trees of 3449 steps, CI (excluding uninformative characters) = 0.66 and RI = 0.91. ML searches produced a best-scoring ML tree with $-\ln L = 30\,001$ (Fig. 2). The 9000 trees retained from the Bayesian analysis were summarized into a 50% majority-rule consensus tree. Tree topologies resulting from the total evidence analyses with parsimony ratchet, likelihood and Bayesian approaches were largely congruent as shown by the number of shared nodes reported on the ML best-scoring tree (Fig. 3). MP, ML and Bayesian analyses fully support the monophyly of Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridaeae (parsimony and likelihood bootstrap supports (PBS and LBS, respectively) = 100 % and posterior probability (PP) = 1 for each tribe), confirming the results of Goldblatt et al. (2008).

Sisyrinchieae. The monophyly of the genera included in the present study is fully supported for *Olsynium*, *Orthrosanthus*, *Sisyrinchium* and *Solenomelus* and strongly supported for *Libertia*. A dichotomy is observed between *Libertia* + *Orthrosanthus* on the one hand, which are distributed on the American and Australasian continents, and the three exclusively American genera on the other hand.

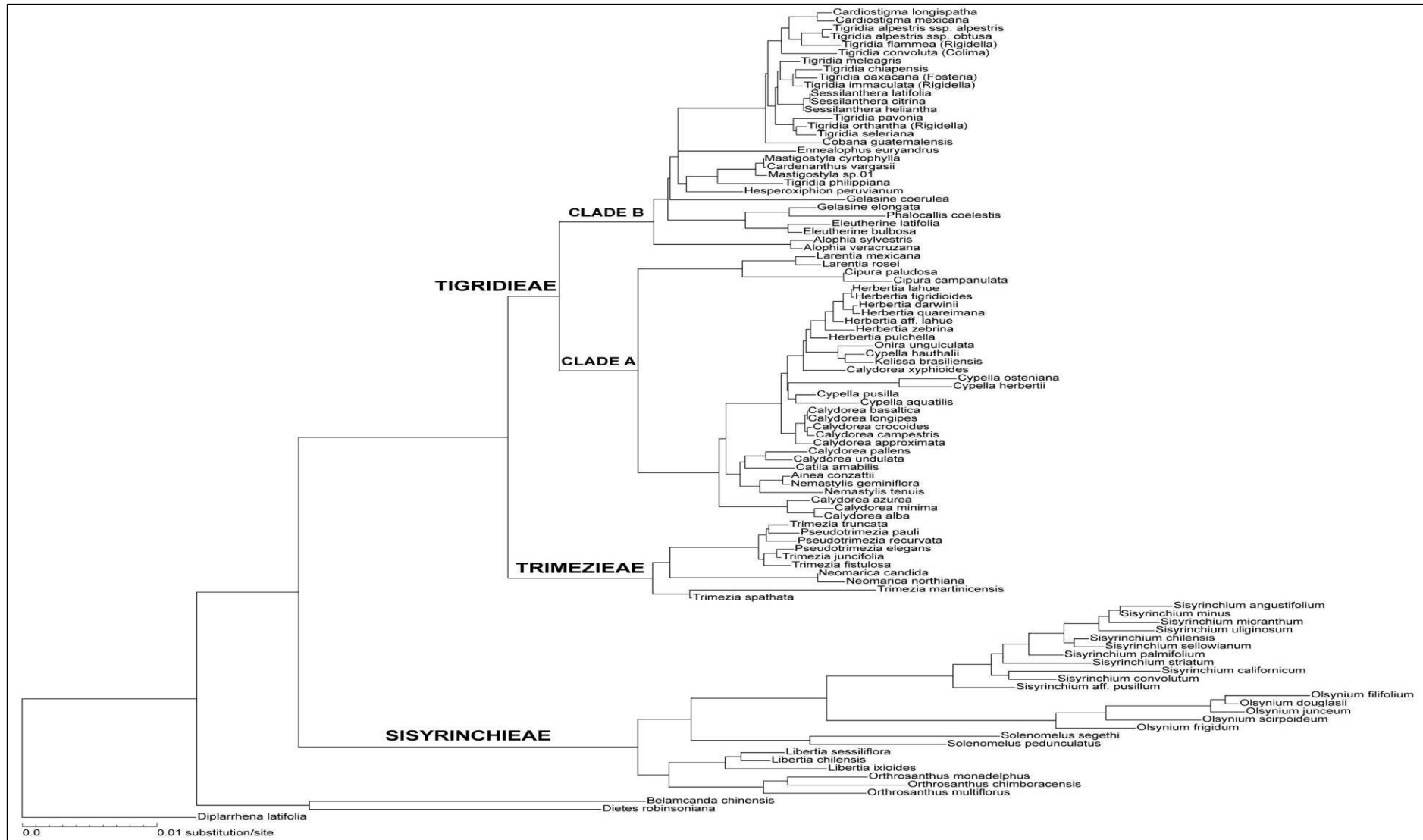


Figure 2. Maximum likelihood best-scoring topology obtained from the combined molecular dataset and generated under the BINGAMMA and GTRGAMMA models with RAxML 7.2.6 (Stamatakis, 2006) showing branch lengths ($-\ln$ likelihood = 30001). Tribes, and major clades within Tigridaeae, are labelled above the corresponding branches.

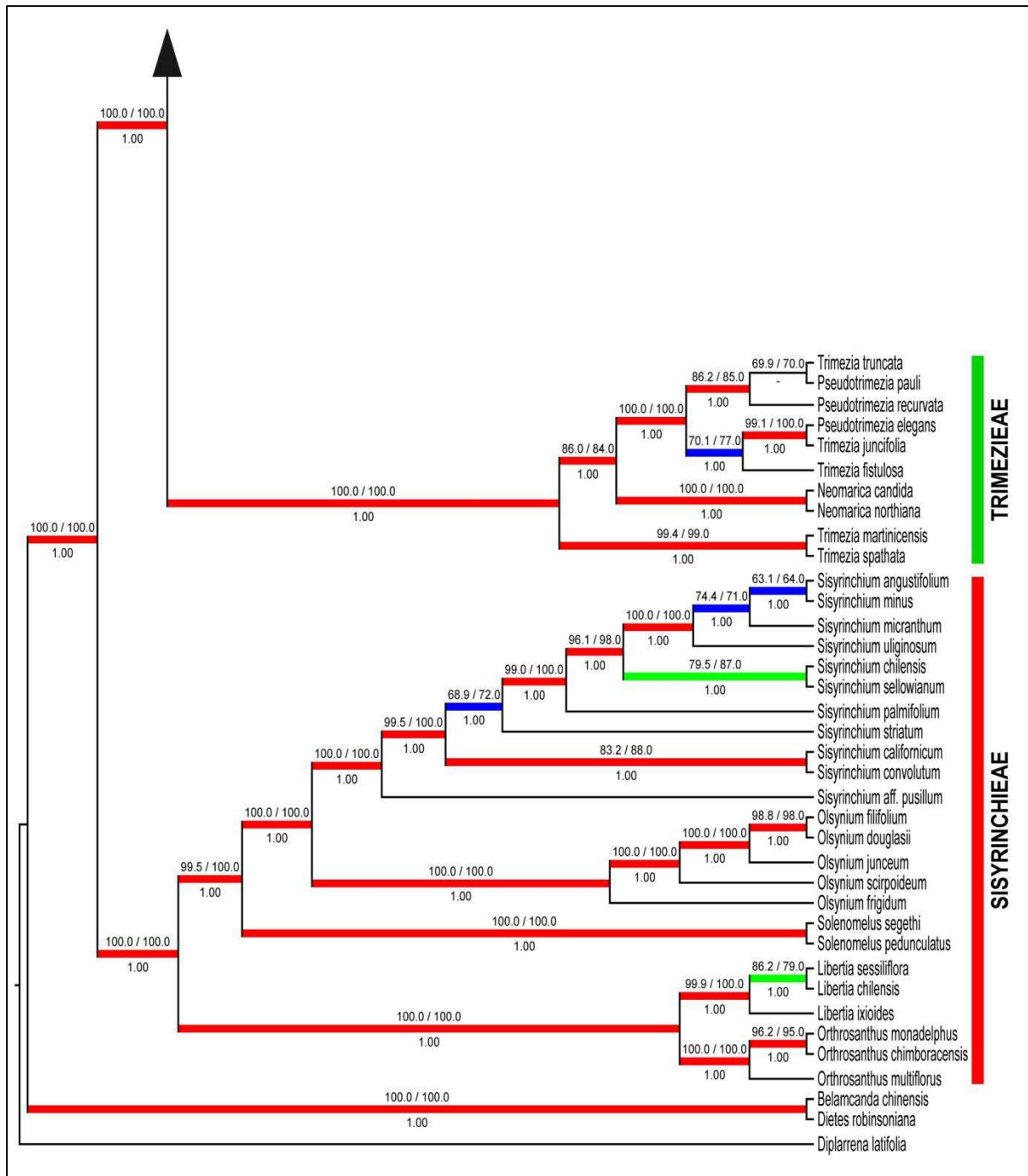


Figure 3. Maximum likelihood best-scoring topology obtained from the combined dataset and generated under the BINGAMMA and GTRGAMMA models with RAxML 7.2.6. Support values at nodes are Parsimony Bootstrap (PBS, on the left, above branches), Likelihood Bootstrap (LBS, on the right, above branches) and Bayesian Posterior Probability (PP, below branches). Thick red branches indicate support of at least 80 % (PBS), 80 % (LBS) and 0.95 (PP). Thick green lines indicate branches for which only two of the three support values reach these minimum values and the third support value is at least 50 % (PBS), 60 % (LBS) and 0.95 (PP). Thick blue lines indicate branches for which only one of the three support values reaches the minimum values set above while the two other support values are at least 50 % (PBS), 50 % (LBS) and 0.90 (PP).

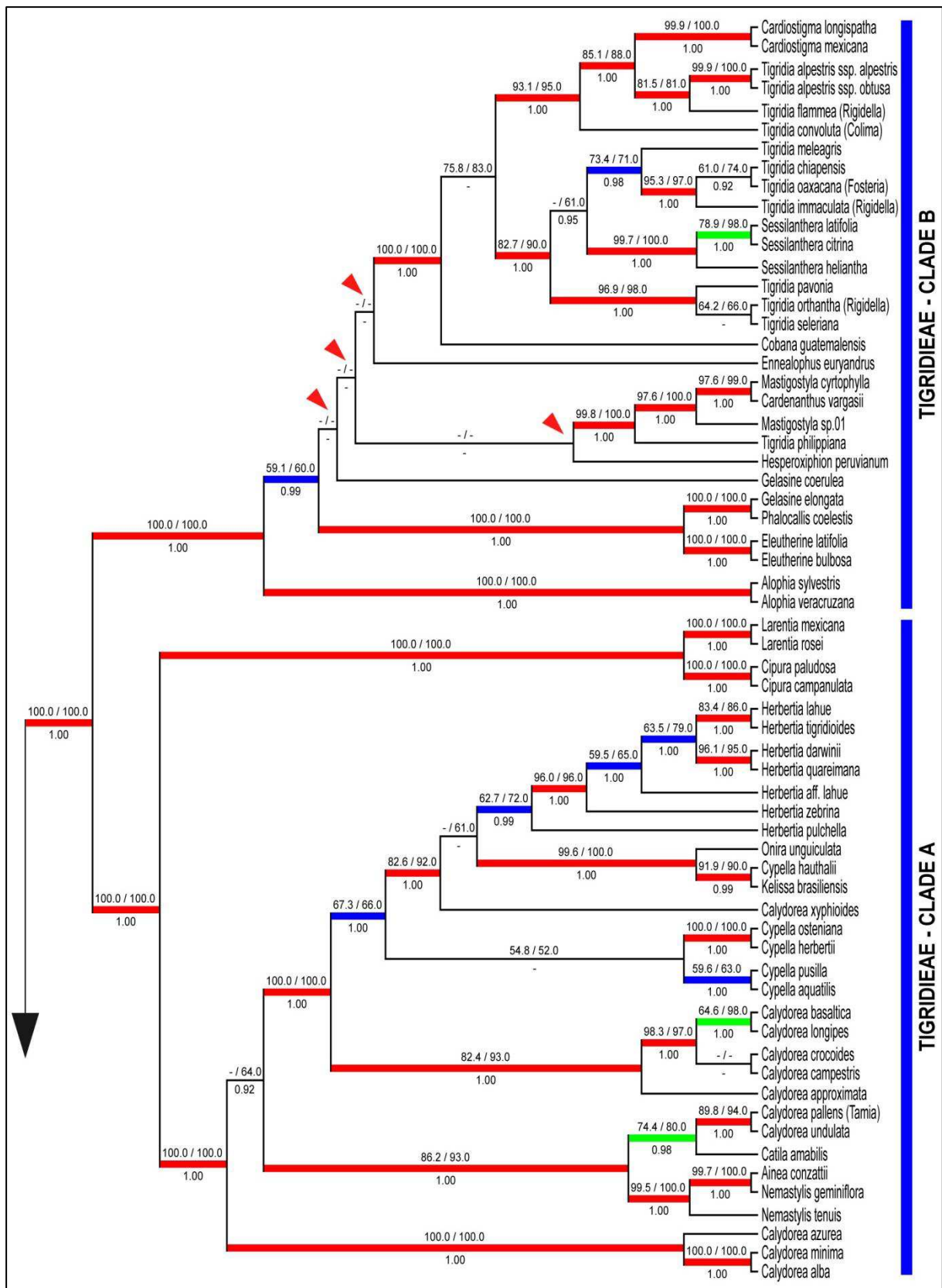


Figure 3. Continued. Red arrows indicate the nodes that are supported in none of the analyses.

Trimezieae. The genus *Trimezia* is clearly non monophyletic. The two species representative of *Neomarica* form a clade nested in the former genus and sister to the rest of the species of *Trimezia*, including all representatives of *Pseudotrimezia* scattered among them. All of these phylogenetic relationships are fully supported.

Tigridieae. A dichotomy is observed within the tribe, resulting in two fully supported clades hereafter named clade A and clade B. Clade A consists of genera exclusively included in the subtribe Cipurinae Benth. & Hook.f. (Goldblatt, 1990). *Cipura* and *Larentia* are sister to the rest of clade A with full support. The results reveal that two major genera within clade A, *Calydorea* and *Cypella*, are not monophyletic. *Calydorea* is split into three unrelated strongly supported clades within clade A, and *C. xyphioides*, the type species of the genus, is not closely related to the other representatives of the genus. Within one of these clades, *C. pallens*, *C. undulata* and the monospecific genus *Catila* are sister to two species of *Nemastylis* and the monospecific genus *Ainea*.

In the genus *Cypella*, *C. hauthalii* stands apart from the rest of the genus, closely related to *Onira unguiculata* and *Kelissa brasiliensis* into a strongly supported clade. The four other representatives of the genus are retrieved in another unrelated clade and our results strongly suggest that *Cypella* is not monophyletic. *Herbertia* appears as a moderately supported genus, with *H. pulchella* sister to the rest of the genus with a strong support. *Herbertia* is nested within the *Calydorea* and *Cypella* lineages.

Clade B comprises the remaining genera of Cipurinae (*Cardenanthus*, *Eleutherine*, *Ennealophus*, *Gelasine* and *Mastigostyla*) and all of the subtribe Tigridiinae Pax (Goldblatt, 1990). The phylogeny confirms that neither Cipurinae is monophyletic, as already suggested by Rodríguez and Sytsma (2006), nor Tigridiinae. *Alophia* is sister to the remaining genera included in clade B with full support. The representatives of the genus *Eleutherine* are sister to *Phalocallis coelestis* and *Gelasine elongata* within a fully supported clade. *Gelasine coerulea* stands apart from *G. elongata*, suggesting that *Gelasine* is not monophyletic. *Tigridia philippiana*, the only South American member of the genus *Tigridia* included in this study, is sister to the genera *Mastigostyla* and *Cardenanthus* within a strongly supported monophyletic group.

As suggested by earlier molecular and morphological studies (Rodríguez, 1999; Rodríguez and Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008), most of the genera grouped by Goldblatt et al. (2008) in *Tigridia* (namely *Cardiostigma*, *Colima*, *Fosteria*, *Rigidella*, *Sessilanthera*, and

Tigridia) are gathered in a monophyletic lineage, which forms with its sister genus *Cobana* a fully supported clade. *Cardiostigma* and *Sessilanthera* are both strongly supported clades nested within the *Tigridia* lineages. The species formerly included in the genus *Rigidella* are nested within different *Tigridia* lineages with strong support, confirming that this genus is not monophyletic. Likewise, the representatives of the monospecific genera *Colima* (*T. convoluta*) and *Fosteria* (*T. oaxacana*) are retrieved within two different *Tigridia* lineages. The monophyly of the two subgenera (*Tigridia* and *Hydrotaenia*) recognized by Molseed (1970) and accepted by Goldblatt et al. (2008) for the genus *Tigridia sensu stricto* is not supported by our study and the species included in each of the subgenus split into several unrelated clades among the *Tigridia* complex.

Evolution of nuptial glandular structures and trichomes

The MP optimisations of three aspects of nuptial glandular structures (Characters A: anatomical type, B: secretion type, and C: distribution within flowers) are shown on Figs 4 and 5. Values obtained from the ML optimisations of characters A to C are detailed in Figs S1 to S3 [Supplementary Information]. The numbers of transitions and reversions among characters states found with the MP and ML optimisations of characters A to C within each tribe are summarized in Table 1.

Character A: anatomical type of nuptial glandular structures. The MP optimisation shows that the state for the common ancestor of the three study tribes is the absence of nuptial glandular structures. The same ancestral state is found for the tribes Sisyrinchieae and Tigridieae, for the common ancestor of Trimezieae and Tigridieae, and for the clades A and B within Tigridieae. The results obtained from the ML optimisation (Figs S1-A and -B) are mostly ambiguous for these ancestral nodes, with two more likely states (absence of nuptial glandular structures and presence of nuptial unicellular trichomes), except for Sisyrinchieae, where the absence of nuptial glandular structures is the ancestral state with both methods (ML optimisation: $P_0 = 0.88$). For Trimezieae, the ancestral state is the presence of nuptial unicellular trichomes, with both MP and ML optimisations ($P_1 = 0.99$).

Both MP and ML optimisations suggest that nuptial unicellular trichomes evolved three times independently within Sisyrinchieae and that this character state is derived in *Sisyrinchium* and *Solenomelus*. A single transition from the absence of nuptial glandular structures towards epithelial glandular cells is reported in *Olsynium*, and pluricellular scales evolved once from an ambiguous ancestral state in *Solenomelus*.

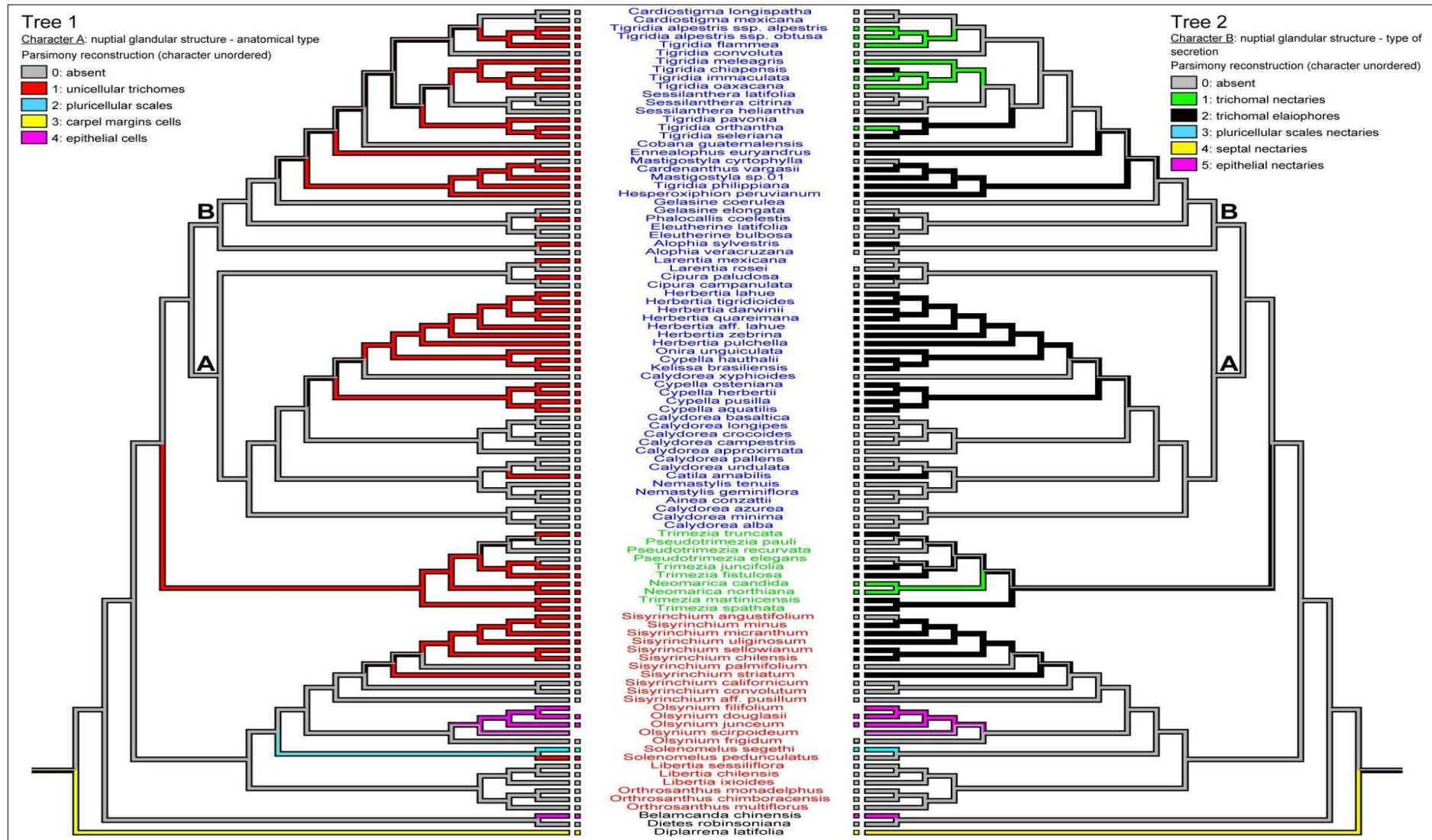


Figure 4. Mirror trees showing the optimisation of the anatomical type - character A (Tree 1) and the secretion type - character B (Tree 2) of nuptial glandular structures on the ML best-scoring tree, with maximum parsimony. External nodes are coloured according to the character state observed, internal nodes are coloured according to the ancestral state inferred. Multi-coloured branches show unresolved ancestral character states under parsimony analysis. The absence of a square in front of the external nodes corresponds to missing data. Major clades within Tigridaeae are labelled A and B above the corresponding branches. Species belonging to the study tribes are coloured in red (Sisyrrhynchieae), green (Trimezieae) and blue (Tigridaeae).

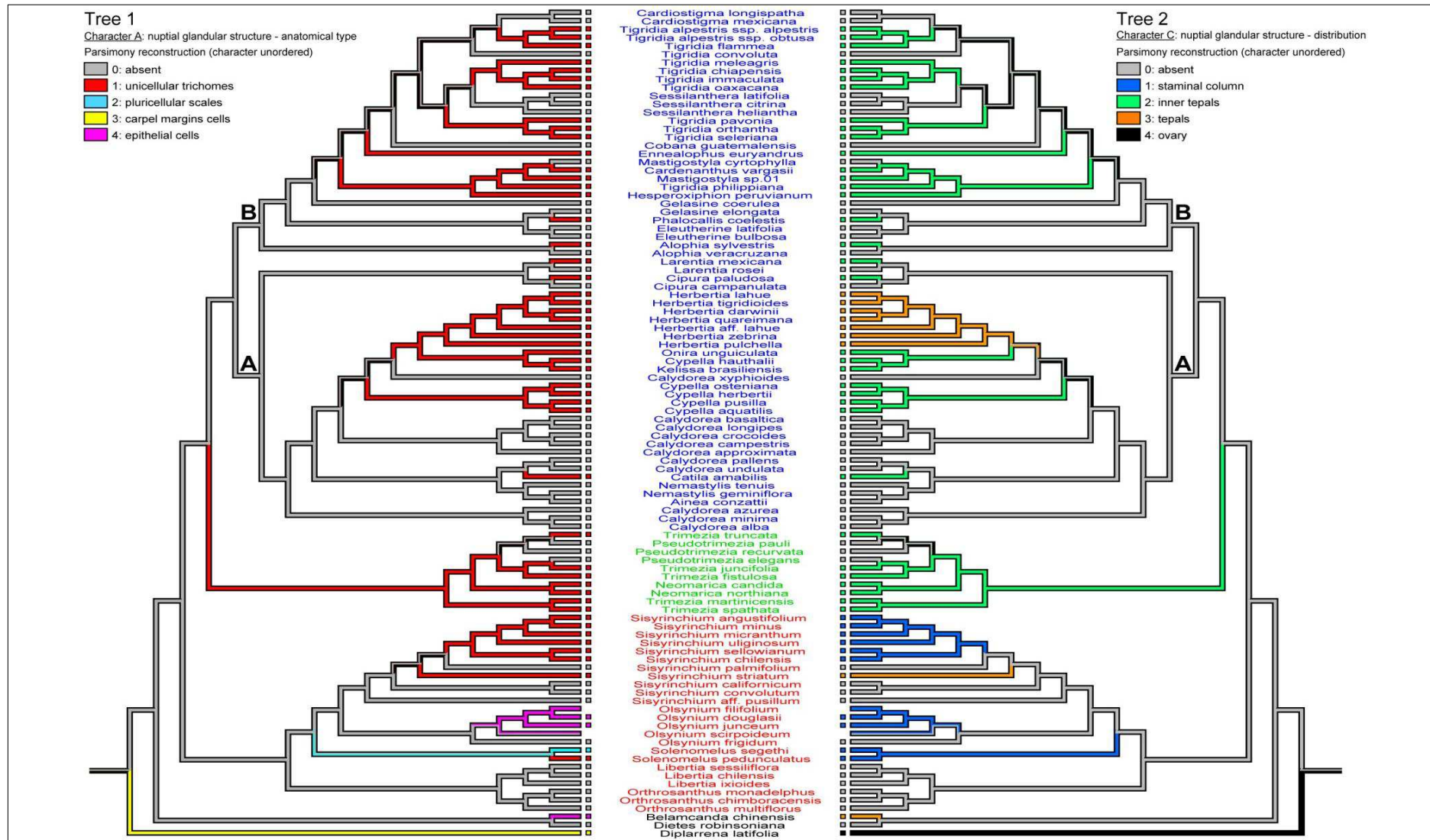


Figure 5. Mirror trees showing the optimisation of the anatomical type - character A (Tree 1) and the distribution within the flower - character C (Tree 2) of nuptial glandular structures on the ML best-scoring tree, with maximum parsimony. External nodes are coloured according to the character state observed, internal nodes are coloured according to the ancestral state inferred. Multi-coloured branches show unresolved ancestral character states under parsimony analysis. The absence of a square in front of the external nodes corresponds to missing data. Major clades within Tigridieae are labelled A and B above the corresponding branches. Species belonging to the study tribes are coloured in red (Sisyrinchieae), green (Trimezieae) and blue (Tigridieae).

Table 1. MP and ML optimisation results for character A (anatomical type of nuptial glandular structures), B (secretory type of nuptial glandular structures) and C (distribution of nuptial glandular structures): numbers of transitions and reversions observed within each tribe according to the different scenarios tested.

Taxon / Character A	Ancestral state		Transitions						Reversions	
	MP	ML	0 > 1		0 > 2		0 > 4		1 > 0	
			MP	ML	MP	ML	MP	ML	MP	ML
Sisyriinchieae	0	0	2 to 3	3	1	1	1	1	0 to 1	0
Trimezieae	1	1	0 to 1	0	0	0	0	0	1 to 3	3
Tigridieae (clade A)	0	0 or 1	4 to 5	2 to 3	0	0	0	0	0 to 1	3 to 4
Tigridieae (clade B)	0	0 or 1	3 to 7	2 to 4	0	0	0	0	1 to 5	5 to 8

Character states: (0) absent, (1) unicellular trichomes, (2) pluricellular scales, (3) carpel margin cells, (4) epithelial cells.

Taxon / Character B	Ancestral state		Transitions									Reversions				
	MP	ML	0 > 1		0 > 2		0 > 3		0 > 5		1 > 2		2 > 0		2 > 1	
			MP	ML	MP	ML	MP	ML	MP	ML	MP	ML	MP	ML	MP	ML
Sisyriinchieae	0	0	0	0	1 to 2	2	1	1	1	1	0	0	1 to 2	1	0	0
Trimezieae	0 or 2	2	0 to 1	0	0 to 4	0	0	0	0	0	0	0	0 to 3	3	0 to 1	1
Tigridieae (clade A)	0	0	0	0	3 to 4	3	0	0	0	0	0	0	0 to 1	2	0	0
Tigridieae (clade B)	0	0	2	2	4 to 5	4 to 5	0	0	0	0	1	1	1	1 to 2	1	1

Character states: (0) absent, (1) trichomal nectaries, (2) trichomal elaiophores, (3) pluricellular scales nectaries, (4) septal nectaries, (5) epithelial nectaries.

Taxon / Character C	Ancestral state		Transitions								Reversions	
	MP	ML	0 > 1		0 > 2		0 > 3		2 > 3		2 > 0	
			MP	ML	MP	ML	MP	ML	MP	ML	MP	ML
Sisyriinchieae	0	0	3	3	0	0	1	1	0	0	0	0
Trimezieae	2	2	0	0	0 to 1	0	0	0	0	0	1 to 3	3
Tigridieae (clade A)	0	0 or 2	0	0	4 to 5	2 to 3	0 to 1	0	0 to 1	1	0 to 1	3 to 4
Tigridieae (clade B)	0	0 or 2	0	0	3 to 7	2 to 4	0	0	0	0	1 to 5	5 to 8

Character states: (0) absent, (1) staminal column, (2) inner tepals, (3) tepals, (4) ovary

Within Trimezieae, the ML optimisation favours unequivocally that nuptial glandular structures were lost three times independently in *Pseudotrimezia*, although the MP optimisation results in a more ambiguous scenario with one to three reversions.

Within Tigridaeae, the MP and ML optimisations lead to two different scenarios: with MP, seven to eleven transitions towards nuptial unicellular trichomes are recorded among clades A and B with few reversions, while with ML only four to seven transitions are observed, with numerous reversions. The number of transitions and reversions with the ML optimisation varies according to the ancestral condition stated at the base of each clade. Whatever method is used, at least four transitions from the absence of nuptial glandular structures towards unicellular trichomes occurred within this tribe.

Character B: secretory type of nuptial glandular structures. Oil-producing flowers are widely distributed among the three tribes studied, and trichomal elaiophores are the most common secretory type of nuptial glandular structures within these clades (Table S4). The MP optimisation (Fig. 4) shows that the state for the common ancestor of the three study tribes, as well as for the tribes Sisyrinchieae and Tigridaeae, for the common ancestor of Trimezieae and Tigridaeae, and for clades A and B within the latter tribe, is the absence of nuptial secretory structures. All these results are congruent with the MP optimisation for character A. Similarly, the ML optimisation for character B (Figs S2-A and -B) favours the absence of nuptial secretory structures for most of these ancestral nodes, except for the common ancestor of the three study tribes and of Trimezieae and Tigridaeae, in which two states are more likely (absence of nuptial secretory structures and presence of trichomal elaiophores). For Trimezieae, the ancestral state is the presence of trichomal elaiophores, with the ML optimisation ($P_1 = 0.92$). Even though two ancestral states (absence of nuptial secretory structures or presence of trichomal elaiophores) are equally parsimonious for character B with the MP optimisation, the character state for the common ancestor of Trimezieae is probably the presence of trichomal elaiophores because the results obtained for character A with the MP and ML optimisations and for character B with ML optimisation favour this scenario.

Both MP and ML optimisations suggest that trichomal elaiophores are derived within *Sisyrinchium* and evolved probably two times independently, with one subsequent reversion. A single transition from the absence of nuptial secretory structures towards epithelial nectaries was recorded in *Olsynium*, and pluricellular scales nectaries evolved once from the absence of glandular secretory structures in *Solenomelus*.

Within Trimezieae, the ML optimisation favours unequivocally that trichomal elaiophores were lost three times independently within *Pseudotrimezia*. Flowers with trichomal nectaries evolved once from flowers with trichomal elaiophores in the ancestor of *Neomarica*. Although the MP optimisation results in a more ambiguous scenario, the most likely state for character B is the presence of trichomal elaiophores within the flowers of the common ancestor of Trimezieae. Then, the most parsimonious scenario is the evolution of trichomal nectaries from trichomal elaiophores within *Neomarica*, and flowers devoid of nuptial secretory structures evolved one to three times from flowers with trichomal elaiophores within *Pseudotrimezia*.

Both MP and ML optimisations suggest that trichomal elaiophores and trichomal nectaries are derived within clades A and B of Tigridieae. Multiple transitions, mainly towards trichomal elaiophores, are favoured with few reversions. Trichomal nectaries evolved only in clade B, twice from ancestors devoid of nuptial secretory structures, but also once from trichomal elaiophores (in *Tigridia orthantha*). Trichomal elaiophores evolved also once from trichomal nectaries (in *Tigridia chiapensis*). However, the major evolutionary events within Tigridieae are the transitions from flowers devoid of nuptial secretory structures towards flowers with trichomal elaiophores, which evolved at least seven times independently among the tribe.

Character C: distribution of nuptial glandular structures. Nuptial glandular structures are mainly distributed on the adaxial side of the inner tepals, except in Sisyrinchieae where the vast majority are located on the staminal column (Table S4). Similarly to the results obtained for characters A and B, the MP optimisation (Fig. 5) shows that the state for the common ancestor of the three study tribes is the absence of nuptial glandular structures, as well as for the tribes Sisyrinchieae and Tigridieae, for the common ancestor of Trimezieae and Tigridieae, and for the clades A and B within Tigridieae. The results obtained from the ML optimisation are mostly ambiguous for these ancestral nodes, with two more likely states (absence of nuptial glandular structures and presence of nuptial unicellular trichomes), except for Sisyrinchieae, where the absence of nuptial glandular structures is the ancestral state with both methods (ML optimisation: $P_0 = 0.88$). In Trimezieae, the ancestral state is the presence of nuptial glandular structures on the inner tepals, with both MP and ML optimisations ($P_2 = 0.99$).

Both MP and ML optimisations suggest that nuptial glandular structures located on the staminal column evolved three times independently among Sisyrinchieae (respectively, epithelial cells within *Olsynium*, glandular trichomes within *Sisyrinchium*, and both

pluricellular scales and glandular trichomes within *Solenomelus*). Furthermore, glandular trichomes located on tepals evolved once independently within *Sisyrinchium*.

In Trimezieae, the ML optimisation favours unequivocally that nuptial unicellular trichomes located on the inner tepals are ancestral and were lost three times independently in *Pseudotrimezia*. The MP optimisation results in an ambiguous scenario with one to three reversions.

Because unicellular secretory trichomes are distributed mostly on the inner tepals among Tigridaeae, except within *Herbertia* where they occur on both whorls of the perianth, the MP and ML optimisations for character C lead respectively to the same results as obtained for character A. The same pattern of transitions and reversions is observed and the only difference concerns the unusual distribution of trichomal elaiophores within *Herbertia*. The ML optimisation suggests that the ancestor possessed trichomal elaiophores only on the inner tepals. Even though two ancestral states (absence or presence of nuptial glandular structures on the inner tepals) are equally parsimonious for character C with the MP optimisation, the ancestral state for *Herbertia* and its sister clade is probably the presence of trichomal elaiophores because the results obtained for characters A and B with the MP and ML optimisations and for character C with the ML optimisation favour this scenario (Figs 4, 5 and S1 to S3).

Detection of differential diversification rates

The values of the different parameters, including the rates of net diversification and the speciation/extinction ratios obtained from the best ML BISSE model for lineages in the absence (state 0) or presence (state 1) of nuptial glandular trichomes (character D) on the one hand, and of trichomal elaiophores (character E) on the other hand, are indicated in Table 2. Detailed comparisons of BISSE models for characters D and E are respectively reported in Table S5 and S6 [Supplementary information], while results obtained with SymmeTREE are presented in Table S7 [Supplementary information].

The results of the six whole-tree statistics computed in SymmeTREE using the ML best-scoring tree topology reveal the presence of at least one significant shift in diversification rates within our study group. Because the P -values tend to decrease from I_c to M_Σ^* and then increase from M_Σ to B_1 (only I_c and B_1 statistical tests P -values are not significant), changes in diversification rate likely occur at an intermediate phylogenetic scale. Statistical tests

performed on the MP strict consensus tree and the Bayesian majority rule consensus tree are only marginally significant. However, the P -values tend to vary in the same way as previously described and diversification rate changes likely occur at the same phylogenetic scale. The Δ statistics implemented in SymmeTREE give statistical support (P -value = 0.05 for each tree) for a single shift point of diversification rate located at the base of the clade including *Cobana guatemalensis* and the *Tigridia* complex (*Cardiostigma*, *Colima*, *Fosteria*, *Rigidella*, *Sessilanthera* and *Tigridia*).

Table 2. The speciation rates (λ_0 and λ_1) in absence vs. presence of nuptial trichomes (character D) and trichomal elaiophores (character E) in the lineages, the extinction rates (μ_0 and μ_1), and forward and reverse transition rates (q_{01} and q_{10}) obtained from the best ML BISSE model for each character. The rates of net diversification ($r = \lambda - \mu$) and the speciation/extinction ratios ($a = \lambda/\mu$) are reported on the right.

Character D: nuptial trichomes (state 0: absent - state 1: present)											
Best model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	q_{01}	q_{10}	r_0	r_1	a_0	a_1
D-3	$\mu_0 = \mu_1$	129.	259.	80.3	80.33	70.6	149.	49.03	179.50	1.61	3.23
Character E: trichomal elaiophores (state 0: absent - state 1: present)											
Best model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	q_{01}	q_{10}	r_0	r_1	a_0	a_1
E-5	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	215.	215.	123.	123.2	126.	208.	92.0	92.0	1.75	1.75

Comparisons of BISSE models, from the fully relaxed model (model D-1) to models with one parameter equal for both types of lineage (models D-2 to D-4), were not significant. Because constraining extinction rates to be equal ($\mu_0 = \mu_1$) resulted in the smallest change in ln-likelihood, this model (D-3) was accepted as better than model D-1. Next, the model with extinction rates equal was compared to nested models with two parameters equal (models D-5 and D-7), testing for equal speciation rates and transitions rates, respectively. Both tests resulted in significant differences in ln-likelihood values, indicating that D-3 is the best model. Conversely, comparisons started from the most constrained model towards models with two parameters equal for both types of lineage showed that only the comparison with model D-7 ($\mu_0 = \mu_1$ and $q_{01} = q_{10}$) was marginally significant. This model was selected as a better model than the fully constrained one and compared to nested models D-3 and D-4 with only one parameter equal. Only model D-3 with equal extinction rates ($\mu_0 = \mu_1$) resulted in a significant improvement in likelihood, and was selected as the best model to evaluate the six parameters among lineages in the absence or presence of nuptial glandular trichomes.

Similarly, a range of constrained BISSE models were explored to test hypothesis regarding differential diversification of lineages in the absence (state 0) or presence (state 1) of trichomal elaiophores, the most diversified type of nuptial glandular trichomes among the

three tribes studied. The model constraining respectively speciation and extinction rates to be equal among the different lineages was selected to be the best model.

DISCUSSION

The results presented in this study are fully concordant with the current classification of the tribes Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridieae proposed by Goldblatt et al. (2008). The total evidence approach supports Sisyrinchieae as a monophyletic group and its sister group relationship with Trimezieae and Tigridieae. These two tribes are also clearly monophyletic, but within Tigridieae, the circumscription of the subtribes Cipurinae and Tigridiinae as monophyletic groups is not supported.

Phylogenetic relationships within the American tribes of Iridoideae

Sisyrinchieae - The phylogenetic relationships among genera of the Sisyrinchieae tribe proposed by the latest comprehensive phylogeny published (Chauveau et al., 2011) are fully confirmed by the present study, using different cpDNA regions. Our results also confirm, with a larger sampling, the sister group relationship between the *Libertia-Orthrosanthus* lineage and the clade including the three exclusively American genera, as suggested by Goldblatt et al. (2008). The present phylogeny includes Australasian and American species of *Libertia* and *Orthrosanthus* and confirms also that these two genera diverged from one to another before the separation of Antarctica from South America and Australasia.

Trimezieae - Within this tribe, the phylogenetic relationships observed raise important questions concerning the systematic of the genera *Pseudotrimezia* and *Trimezia*. The genus *Pseudotrimezia*, endemic from the Brazilian state of Minas Gerais (Central Brazil), is characterised by spiralling cataphylls, terete leaves, floral stems usually with two bracts, flat tepals and a style undivided or bifid (Chukr, 2001). *Trimezia* is characterised by spiralling cataphylls, linear or terete leaves, floral stems devoid of reduced leaves or with one terminal leaf-like bract, and flowers with curled tepals and forked styles, and was taxonomically subdivided into two sections (Chukr, 2001; Chukr and Giulietti, 2008). The section *Trimezia* includes all species with linear leaves, while the section *Juncella* Ravenna gathers all species with terete leaves. The centre of diversity of the genus is located in Central Brazil, but several species of section *Trimezia* occur from Central America to Argentina. Based on leaf anatomical traits, Rudall (1993) emphasized the evolutionary relationships between the genus

Pseudotrimezia and the species of *Trimezia* included in the section *Juncella*, suggesting that Trimezieae species with terete leaves evolved from species with linear leaves.

The phylogeny shows that the *Trimezia* species with linear leaves (*T. martinicensis* and *T. spathata*) are sister group to a clade including *Neomarica*, the *Trimezia* species with terete leaves (*T. fistulosa*, *T. juncifolia* and *T. truncata*), and *Pseudotrimezia*. Neither *Trimezia* nor *Pseudotrimezia* are monophyletic, (Fig. 3), which suggests that the generic delimitations of the genera *Trimezia* and *Pseudotrimezia* should be revised. The clade encompassing *Pseudotrimezia*, *Trimezia fistulosa*, *T. juncifolia* and *T. truncata* could be elevated to the generic level, since all these species share very similar vegetative features. The minor variation observed in a few floral traits, including nuptial glandular traits, are probably related to shifts in pollination strategies. Further phylogenetic and morphological investigations are obviously needed here.

Tigridieae - The generic delimitations in this tribe have already been widely debated, especially concerning the genera that were included in the *Tigridia* complex (Rodríguez and Sytsma, 2006; Goldblatt and Manning, 2008; Goldblatt et al., 2008), but also concerning several monospecific genera closely related to *Calydorea* (Goldblatt and Henrich, 1991; Ravenna, 2001) and *Cypella* (Goldblatt and Manning, 2008; Ravenna, 2009). The taxonomic treatment of *Tigridia* proposed by Goldblatt and Manning (2008) expanded the circumscription of the genus and encompassed a range of species displaying adaptations to various pollination strategies. This taxonomic treatment is consistent with treatments of the African genera of Iridaceae, which reflect natural relationships and are widely accepted. Among the subfamily Crocoideae, *Babiana* Ker Gawl., *Gladiolus* Tourn. ex L. and *Tritoniopsis* L. Bolus are striking examples of genera of Iridaceae that have undergone explosive adaptive radiation, leading to profound floral diversification (Goldblatt and Manning, 2006, 2008). Within Iridoideae, *Moraea* Mill. is another example of a genus encompassing small species clusters with derived floral morphology (Goldblatt and Bernhardt, 1999). Each of these Crocoideae and Iridoideae genera includes species showing floral morphological variations associated to various pollination systems (Goldblatt and De Vos, 1989; Goldblatt, 1990; Goldblatt et al., 2008).

The phylogenetic relationships observed among genera belonging to clade A, which includes a significant sample of species, suggest that several genera should be examined critically for alternative generic delimitations. The phylogenetic placement of *Ainea conzattii* nested in a clade with species of *Nemastylis* is quite unexpected, since it was nested in the *Tigridia*

complex in the phylogeny of Goldblatt et al. (2008). The inclusion of *Ainea* within *Tigridia* was supported by their identical basic chromosome number ($x = 14$) and bisulcate pollen grains (Goldblatt and Manning, 2008). However, *Ainea konzattii* appears morphologically intermediate between *Tigridia sensu stricto* and *T. oaxacana* on the one hand, and *Cardiostigma* and *Nemastylis* on the other hand (Ravenna, 1979). At least one species (*Cardiostigma longispatha*) nested within the *Tigridia* complex has monosulcate pollen grains, suggesting that pollen aperture type has weak systematic significance here (Goldblatt and Manning, 2008). Our results suggest that further investigations concerning *Ainea konzattii* are necessary to understand better the phylogenetic relationships between this species and the rest of Tigridieae. *Nemastylis* and *Ainea* form a clade, sister to a monophyletic group including *Calydorea undulata*, *C. pallens* and *Catila amabilis*. Maintaining a narrow generic concept, Ravenna (1983, 2001) referred respectively *C. pallens* and *Catila amabilis* to the monotypic genera *Tamia* and *Catila*, while other systematics studies reduced them to *Calydorea* (Goldblatt and Henrich, 1991; Goldblatt and Manning, 2008). The present phylogeny shows that *Calydorea* is clearly not monophyletic, and that the type species *C. xyphioides* is totally unrelated to the rest of *Calydorea*. Similar results are found for *Cypella*, which is split in two clades, *C. hauthalii* falling in a clade including the monospecific genera *Kelissa* and *Onira*, which is sister to the monophyletic genus *Herbertia*. The genera *Herbertia*, *Cypella*, *Kelissa* and *Onira* share similar features in vegetative habit, and the limits among these genera are mainly based on trivial perigonal, staminal or stylar differences as it has been observed for the various genera now reduced in *Tigridia*. Morphological observations showed that there is a trend in the genus *Cypella* towards reduction of the inner tepals, and in few species towards partial or complete fusion of the filaments, two morphological features that are characteristic of *Herbertia*, even though filaments are free in the upper half in *H. pulchella* (Goldblatt and Manning, 2008). All of these observations suggest that the generic circumscriptions of the genera *Calydorea*, *Cypella*, *Herbertia* and *Nemastylis* should be revised in order to maintain the principle of monophyly at the genus level. Although further investigations are required, especially concerning the pollination biology of these species in order to assess whether the floral variations observed are related to pollination adaptations, the taxonomic revision should encompass the monotypic genera *Kelissa* and *Onira*, closely related to *Cypella*, as well as *Catila* and *Tamia*, which were reduced within *Calydorea* by Goldblatt and Manning (2008).

Within clade B of Tigridaeae, the phylogenetic relationships of *Phalocallis coelestis*, long included in *Cypella*, suggest that *Phalocallis* should be regarded as a separate genus from *Cypella*. *Phalocallis coelestis* appears closely related to *Gelasine elongata*, and both species are sister to *Eleutherine* within a fully supported clade. *Gelasine elongata* and *G. coerulea* do not fall in the same clade, suggesting that the generic circumscription of this poorly understood genus should be revised. The phylogenetic relationships of *Cardenanthus* and *Mastigostyla* are evidenced for the first time here and support the reduction of *Cardenanthus* within *Mastigostyla* as it was proposed by Goldblatt and Manning (2008). Both are closely related to the South American *Tigridia philippiana*, falling outside the *Tigridia* clade. In spite of floral similarities, our results suggest that *T. philippiana* should not be longer retained in *Tigridia*.

The tree topology presented here is consistent with the phylogenetic analyses conducted by Rodríguez and Sytsma (2006) and Goldblatt et al. (2008) concerning the *Tigridia* lineages, the only exception being *Ainea conzattii*, which falls into clade A in the present phylogeny. Based on a larger sampling and several additional cpDNA regions, our results confirm that the genus *Tigridia* sensu stricto is not monophyletic. The reduction of the genera *Cardiostigma*, *Colima*, *Fosteria*, *Rigidella* and *Sessilanthera* within *Tigridia* proposed by Goldblatt and Manning (2008) is fully supported.

Nuptial glandular structures and trichomes evolution

More than 90% of the nuptial glandular structures identified among the species of the three tribes studied are unicellular glandular trichomes, mostly of the elaiophores type, which represent more than 77% of the glandular trichomal areas identified. These results illustrate the disproportionate development of oil secretion in the New World compared to the Old World, in which only one species of Crocoideae is known to secrete floral oils. Oil-secreting structures in numerous species of Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridaeae are born on either the perianth or the androecium. In Sisyrinchieae, trichomal elaiophores are present only within *Sisyrinchium* and they are mostly distributed on the staminal column, a unique distribution pattern in the family, although they can also be located on the basal part of the adaxial side of tepals in a few species (Chauveau et al., 2011). Trichomal elaiophores distributed on the staminal column are usually fully exposed, except in *S. micranthum* and its closely allied species where they are concealed by the base of the perianth (Cocucci and Vogel, 2001; Chauveau et al., 2011). Among Trimezieae and Tigridaeae, trichomal

elaiophores are exclusively located on the mid or lower part of the adaxial side of the inner tepals, and are usually concealed by folds or pockets of the tepal surface. The only exception concerns *Herbertia* (Tigridieae) where small areas of oil-producing trichomes occur also on the adaxial side of the outer tepals. Within both tribes, the glandular areas located on the inner tepals may consist also of trichomal nectaries, mainly within *Neomarica* (Trimezieae) and the *Tigridia* complex (Tigridieae). The optimisation of the different characters defined suggests that, in several cases, trichomal nectaries and trichomal elaiophores might share a common evolutionary history. Furthermore, it seems unlikely that nectar and oil secretions should be produced within similar glandular structures, unless they share a common developmental and evolutionary origin.

Our results show that nuptial glandular structures evolved multiple times among the three tribes studied and that the occurrence of trichomal elaiophores within each of these tribes results probably from unrelated origins. Within Sisyrinchieae, trichomal elaiophores evolved twice independently within the genus *Sisyrinchium*, as already suggested by a previous study focused on this genus (Chauveau et al., 2011). Trichomal elaiophores probably evolved only once at the base of the tribe Trimezieae, followed by one transition towards trichomal nectaries (in *Neomarica*) and several reversions (in *Pseudotrimezia*). The majority of the transitions towards trichomal elaiophores and trichomal nectaries occurs within Tigridieae, with respectively at least eight and three independent transitions. Although it is still impossible to estimate with a high level of confidence the exact number of transitions between the different states of each character studied for all tribes and genera, the pattern of evolution of nuptial glandular trichomes, and more specifically of trichomal elaiophores, among the New World tribes of Iridoideae indicates a high degree of lability between the different states. Among the 11 families of Angiosperms where elaiophores evolved, this pattern of evolution is highly unusual, except maybe for Orchidaceae, in which multiple transitions towards the presence of elaiophores probably occurred. Nuptial glandular trichomes, including trichomal elaiophores, evolved mostly from ancestral flowers devoid of nuptial glandular structures, and were lost several times. The occurrence of these glandular structures being generally related to specialised pollination systems, the lability of these character states might reflect frequent pollinator shifts among the three American tribes. It also suggests that the most frequent pollination systems are oil-bee pollination and a pollination system where pollen is the only reward available for pollinators.

Detection of differential diversification rates

We found a diversification rate 3.66 times higher within lineages with nuptial glandular trichomes than within the other lineages. Such difference in speciation rates between lineages devoid and with nuptial glandular structures does not necessarily indicate that the occurrence of nuptial glandular trichomes directly affects the speciation rates. It is possible that other floral characters having evolved in a coordinated manner with these glandular structures are causally responsible. The absence of variation in speciation and extinction rates between lineages with and without trichomal elaiophores suggests that oil-flowers alone cannot account for lineage diversification at the taxonomic level of the subfamily Iridoideae on the American continent. However, the results obtained by the topological method indicate that shifts in diversification rates occurred probably at an intermediate phylogenetic level among the three tribes studied and the only shift localised was at the base of a clade that holds numerous shifts of pollination systems, which is the reason why numerous small genera now reduced to synonymies in *Tigridia* were described. This body of observations leads us to assume that repeated shifts between pollination systems may have played a role in the diversification of the Iridoideae on the American continent and that nuptial glandular structures are among the characters involved in these processes of adaptation, a hypothesis that requires further investigations to be tested.

Conclusions

In this study, molecular and morphological evidences were used to clarify phylogenetic relationships among the American tribes of Iridoideae and provide insights into the evolutionary history of nuptial glandular structures, and more specifically of oil-producing trichomes in these tribes. Our results confirm the monophyly of each of the three New World tribes recognized in Iridoideae and allow us to identify for the first time two main clades within the tribe Tigridieae. We suggest that further taxonomical studies should be conducted to reflect the phylogenetic relationships observed in Tigridieae and Trimezieae, especially concerning the genera *Trimezia* and *Pseudotrimezia* within the tribe Trimezieae, and *Calydorea*, *Cypella* and *Herbertia* within the clade A of the tribe Tigridieae. Nuptial glandular structures evolved multiple times in the lineages studied, indicating that repeated shifts in pollination systems probably occurred among the three tribes. Two main categories of reward to pollinators were identified, namely pollen and oils secreted from trichomal elaiophores in the subfamily, and the optimisation of various floral characters showed that

transitions and reversions occurred mainly between these two categories. Nuptial nectaries were found in less than 15% of the species studied. Trichomal elaiophores evolved twice from trichomal nectaries with two reversions, suggesting that these two nuptial glandular structures might have a common developmental and evolutionary history. Differential diversification rates analyses suggest that nuptial glandular trichomes may have played a role in the diversification of the clade including the tribes Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridieae, increasing significantly the speciation rates within the lineages concerned. However, the analyses show that trichomal elaiophores, which are the most common secretory type of nuptial trichomes, do not affect the diversification rates. Further investigations are therefore needed to assess whether the repeated evolutionary shifts observed for this character are related to shifts in pollination systems and to understand how far the occurrence of nuptial glandular trichomes was involved in these adaptive processes.

This work provides a global framework for future studies on the evolution of relationships between species of the American Iridoideae and their pollinators. Further phylogenetic studies including nuclear molecular markers and floral morphological traits are needed to improve the resolution at the tribal level, especially in the Trimezieae and the two clades identified within the Tigridieae, and to further clarify the circumscription of genera within these clades. Information concerning the pollination biology of most of the species included in the American tribes of Iridoideae is scarce and often nothing is known about the range of pollinators involved in the reproduction process of these species. The secretion of floral oils related to specialised oil bee pollination, prevalent in Neotropical and Mexican Iridoideae, has opened pollination niches for Iridaceae outside of Africa. This study suggests that oil flowers may be one of the driving forces involved in the diversification of Iridaceae on the American continent, especially in the Neotropical area. The lability observed in the presence/absence of glandular trichomes may indicate that frequent evolutionary transformations from one pollination system to another have occurred during the course of evolution, reinforcing the capacity for adaptation to different environmental conditions.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary information is available online at www.aob.oxfordjournals.org and consists of the following. Table S1: Primers used for amplifying and sequencing. Table S2: PCR profiles for DNA amplification. Table S3: Data and models used in analyses. Table S4: Type and distribution of nuptial glandular structures among the genera and species studied, arranged

according to the classification of Goldblatt and Manning (2008). Figure S1 (A to B): Trees showing the ML optimisation of the anatomical type (character A) of nuptial glandular structures on the ML best-scoring tree. (A) Basal nodes, Sisyrinchieae and Trimezieae. (B) Tigridaeae - clades A and B. Figures S2 (A to B): Trees showing the ML optimisation of the secretory type (character B) of nuptial glandular structures on the ML best-scoring tree. (A) Basal nodes, Sisyrinchieae and Trimezieae. (B) Tigridaeae - clades A and B. Figure S3 (A to B): Trees showing the ML optimisation of the distribution (character C) of nuptial glandular structures within the flower on the ML best-scoring tree. (A) Basal nodes, Sisyrinchieae and Trimezieae. (B) Tigridaeae - clades A and B. Table S5: Comparison of full and constrained ML BISSE analyses in absence vs. presence of nuptial trichomes (character D) in the lineages. Table S6: Comparison of full and constrained ML BISSE analyses in absence vs. presence of trichomal elaiophores (character E) in the lineages. Table S7: Detection of diversification rate variations among the tribes Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridaeae using the SymmeTREE software.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to J. Lovo (University of São Paulo, Brazil) who provided the plant material for the genus *Pseudotrimezia* and most of the *Trimezia* species. We are also indebted to R. and E. Heaton (NCCPG Sisyrinchium National Collection, Newton Abbot, UK), S. Aubert and R. Douzet (Jardin Botanique de la Station Alpine du Lautaret, France) and F. Pautz (Jardin Botanique de Lyon, France) for generously providing seeds, exsiccates or leaf material for DNA extractions, and J.F. Bertrand for his investment in maintaining the living collection of Iridoideae developed in our University.

This work received funding from the French/Brazilian CAPES/COFECUB cooperation project Sv550/07 and from the IFR87 “La plante et son environnement”.

LITERATURE CITED

Buchmann SL. 1987. The Ecology of Oil Flowers and their Bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 343-369.

Chan KMA, Moore BR. 2002. Whole-tree methods for detecting differential diversification rates. *Systematic Biology* **51**: 855-865.

- Chan KMA, Moore BR. 2005.** SymmeTREE: whole-tree analysis of differential diversification rates. *Bioinformatics* **21**: 1709-1710.
- Chauveau O, Eggers L, Raquin C, et al. 2011.** Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany* **107**: 1287-1312.
- Chukr NS. 2001.** New species of *Pseudotrimezia* and *Trimezia* (Iridaceae) and the new *Trimezia*'s infra-generic treatment. *Coleção Cadernos de estudos e Pesquisas-UNIP* **7**: 1-12.
- Chukr NS, Giulietti AM. 2008.** Revisão de *Trimezia* Salisb. Ex Herb. (Iridaceae) para o Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas* **8**(1): 15-58.
- Delpino F. 1874.** Ulteriori osservazioni sulla dicogamia nel regno vegetale. *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali* **16**:151-349.
- Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792-1797.
- Fahn A. 2000.** Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* **31**: 37-75.
- Felsenstein J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Goldblatt P. 1990.** Phylogeny and classification of Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**(4): 607-627.
- Goldblatt P, Bernhardt P. 1999.** Pollination of *Moraea* species (Iridaceae) with a staminal column. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**: 47-56.
- Goldblatt P, De Vos MP. 1989.** The reduction of *Oenostachys*, *Homoglossum* and *Anomalesia*, putative sunbird pollinated genera, in *Gladiolus* L. (Iridaceae: Ixioideae). *Bulletin du Museum d'Histoire Naturelle, 4 sér., sect. B, Adansonia* **11**: 417-428.
- Goldblatt P, Henrich JE. 1991.** *Calydorea* Herbert (Iridaceae-Tigridieae): notes on this New World genus and reduction to synonymy of *Salpingostylis*, *Cardiostigma*, *Itysa*, and *Catila*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **78**: 504-511.
- Goldblatt P, Manning JC. 2006.** Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. *Annals of Botany* **97**: 317-344.

- Goldblatt P, Manning JC. 2008.** *The Iris family - natural history and classification*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, et al. 2008.** Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany* **33**: 495-508.
- 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.
- Maddison WP, Midford PE, Otto SP. 2007.** Estimating a binary character's effect on speciation and extinction. *Systematic Biology* **56**: 701-710.
- Maddison WP, Maddison DR. 2010.** *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 2.73, distributed by the authors, website: <http://mesquiteproject.org>
- Manning JC, Goldblatt P. 2002.** The pollination of *Tritionopsis parviflora* (Iridaceae) by the oil-collecting bee *Rediviva gigas* (Hymenoptera: Melittidae): the first record of oil-secretion in African Iridaceae. *South African Journal of Botany* **68**: 171-176.
- Michener C.D. 2007.** *The bees of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA.
- Neff JL, Simpson BB. 2005.** Other rewards: oils, resins, and gums. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC. eds. *Practical pollination biology*. Enviroquest, Cambridge, UK, 314-328.
- Nixon KC. 1999.** The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* **15**: 407-414.
- Nylander JAA. 2004.** MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oxelman B, Lidén M, Berglund D. 1997.** Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe *Sileneae* (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* **206**: 393-410.
- Page RDM. 1993.** On islands on trees and efficacy of different methods of branch swapping in finding most-parsimonious trees. *Systematic Biology* **42**: 200-210.
- Pagel M. 1999.** The maximum likelihood approach to reconstructing ancestral character states of discrete characters on phylogenies. *Systematic Biology* **48**(3): 612-622.

- Rasmussen C, Olesen JM. 2000.** Oil flowers and oil-collecting bees. *Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk Naturvidenskapelige Klasse, Skrifter* **39**: 23-31.
- Ravenna P. 1979.** *Ainea*, a new genus of iridaceae from Mexico. *Botaniska Notiser* **132**(4): 467-469.
- Ravenna P. 1981.** *Kelissa*, a new genus of Iridaceae from South Brazil. *Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle, 4 sér., sect. B, Adansonia* **3**(1):105-110.
- Ravenna P. 1983.** *Catila* and *Onira*, two new genera of South American Iridaceae. *Nordic Journal of Botany* **3**(2): 197-205.
- Ravenna P. 2001.** The Iridaceae of the Cuyo region-Argentina. *Onira Leaflets* **6**(1): 1-18.
- Ravenna P. 2009.** A survey in the genus *Cypella* and its allies (Iridaceae). *Onira Leaflets* **12**(1): 1-10.
- Reeves G, Chase MX, Goldblatt P, et al. 2001.** A phylogenetic analysis of Iridaceae based on four plastid sequence regions: *trnL* intron, *trnL-F* spacer, *rps4* and *rbcL*. *American Journal of Botany* **88**: 2074-2087.
- Renner SS, Schaefer H. 2010.** The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **365**: 423-435.
- Rodríguez A, Sytsma KJ. 2006.** Phylogenetics of the “Tiger-flower” group (Tigridieae: Iridaceae) based on molecular and morphological evidence. *Aliso* **22**: 412-424.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003.** MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**(12): 1572-1574.
- Rudall PJ. 1993.** Leaf anatomy and systematic of Mariceae (Iridaceae). *Kew Bulletin* **48**(1): 151-160.
- Rudall PJ, Manning JC, Goldblatt P. 2003.** Evolution of floral nectaries in Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **90**: 613-631.
- Schluter D, Price T, Mooers AO, Ludwig D. 1997.** Likelihood of ancestor states in adaptive radiation. *Evolution* **51**: 1699-1711.
- Shao KT, Sokal RR. 1990.** Tree balance. *Systematic Zoology* **39**: 266-276.

- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, et al. 2005.** The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **92**(1): 142-166.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* **94**(3): 275-288.
- Sikes DS, Lewis PO. 2001.** *PAUPRat: PAUP implementation of the parsimony ratchet*. Beta software, version 1, distributed by the authors, website: <http://www.ucalgary.ca/~dsikes/software2.htm>.
- Simmons MP, Ochoterena H. 2000.** Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* **49**(2): 369-381.
- Souza-Chies TT, Bittar G, Nadot S, et al. 1997.** Phylogenetic analysis of *Iridaceae* with parsimony and distance methods using the plastid gene *rps4*. *Plant Systematics and Evolution* **204**: 109-123.
- Stamatakis A. 2006.** RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**(21): 2688-2690.
- Steiner KE, Whitehead VB. 2002.** Oil secretion and the pollination of *Colpias mollis* (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution* **235**: 53-66.
- Swofford DL. 2002.** *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*, beta version 4.0. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- 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.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Yang Z, Rannala B. 1997.** Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* **14**(7): 717-724.
- Young ND, Healy J. 2003.** GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* **4**: 6.

APPENDIX 1

Taxa - identification number or literature information for all species of Iridaceae included in this study. G (2008): Goldblatt et al. (2008), geographic origin (specimens cultivated in the botanical garden of the Université Paris-Sud (UPSBG), in the botanical garden of Porto Alegre (PABG), or elsewhere are noted after the geographic origin information. The reference numbers for the specimens obtained from the RBG Kew DNA Bank (RBGK) are also indicated), vouchers (new voucher specimens are deposited in the following herbaria: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN), Université Paris-Sud (UPS). Two samples are only cultivated in the R. & E. Heaton (NCCPG) *Sisyrinchium* collection without voucher deposited), and GenBank accession number (*rps4* + spacer *rps4-trnS*, *rps16* intron, *matK* + *matK-5'trnK* intron, *rbcL*, *trnL-F* region). Names in parentheses are names that are not accepted by the world Checklist of Monocots (Barker, 2004). “na” indicates no sequence available for the accession.

Species; Geographic origin; *Voucher* (Herbarium); Genbank accessions: (*rps4* + spacer *rps4-trnS*, *rps16* intron, *matK* + *matK-5'trnK* intron, *rbcL*, *trnL-F* region).

(*Ainea konzattii* (R.C.Foster) Ravenna) - SP572; Mexico: Oaxaca (RBGK 21846); *Rodríguez & Ortiz-Catedral* 2948 (IBUG); -, AM940171, -, -, -. *Alophia silvestris* (Loes.) Goldblatt - SP587; Mexico: State of Mexico (RBGK 21847); *Rodríguez & Ortiz-Catedral* 3179 (IBUG); -, na, -, -, -. *Alophia veracruzana* Goldblatt & T.M.Howard - SP571; Mexico: Veracruz (RBGK: I-199); *Goldblatt & Howard* 9070 (MO); -, -, -, AJ309678, AJ409592. (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.) - G (2008); Z68235, AJ578794, AJ579961, AJ309694, GQ351358. *Calydorea alba* Roitman & A.Castillo - SP522; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers & Souza-Chies* 519 (ICN); -, -, -, -, -. *Calydorea approximata* R.C.Foster - SP516; Brazil: Paraná (PABG); *Eggers & Souza-Chies* 249 (ICN); -, -, -, -, -. *Calydorea azurea* Klatt - SP577; Argentina: Entre Ríos (RBGK 30880); *Roitman T-14* (no data); -, -, -, -, -. *Calydorea basaltica* Ravenna - SP890; Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies* 606 (ICN); -, -, -, -, -. *Calydorea campestris* (Klatt) Baker - SP526; Brazil: Paraná (PABG); *Eggers & Souza-Chies* 330 (ICN); -, -, -, -, -. *Calydorea crocoides* Ravenna - SP515; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers & Souza-Chies* 218 (ICN); -, -, -, -, -. *Calydorea longipes* Ravenna - SP588; Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies* 390 (ICN); -, -, -, -, -. *Calydorea minima* Roitman & J.A.Castillo - SP578; Argentina: Corrientes (RBGK 30875); *Roitman T-8* (no data); -, -, -, -, -. *Calydorea pallens* Griseb. - SP547; Argentina: Córdoba (RBGK I-200); *Goldblatt* 9579 (MO); -, -, -, AJ309682, AJ409596. *Calydorea undulata* Ravenna - SP576; Argentina

(RBGK 30878); *Roitman T-12* (no data); -, -, -, -, -. *Calydorea xyphioides* (Poepp.) Espinosa - SP875; Chile: Region VII (UPSBG); *Chauveau H11001* (ICN); -, -, -, -, -. (*Cardenanthus vargasii* R.C.Foster) - 025-2011; Peru: Cuzco; *Eggers et al.* 025-2011 (ICN, CUZ); -, -, -, -, -. (*Cardiostigma longispathum* (Herb.) Baker) - SP548; Mexico: Michoacán (RBGK 22039); *Rodríguez & Ortiz-Catedral 3050* (IBUG); -, -, -, -, -. (*Cardiostigma mexicanum* (R.C.Foster) Ravenna) - SP546; Mexico (RBGK 21848); *Rodríguez & Ortiz-Catedral 2993* (IBUG); -, AM940172, AM940207, AM940184, -. (*Catila amabilis* Ravenna) - SP503; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers 697* (ICN); -, -, -, -, -. *Cipura campanulata* Ravenna - SP569; Nicaragua: Estelí (RBGK I-201); *Henrich & Stevens 143* (MO); -, AJ578772, AJ579939, AJ309681, AJ409595. *Cipura paludosa* Aubl. - SP570; Bolivia: Santa Cruz (RBGK 37119); Huaylla 3231 (LPB); na, na, -, -, -. *Cobana guatemalensis* (Standl.) Ravenna - SP568; Guatemala: Guatemala (RBGK 21849); *Rodríguez et al.* 2831 (IBUG, WIS); -, -, AM940208, -, -. *Cypella aquatilis* Ravenna - SP565; Argentina (RBGK I-202); *Castillo s.n.* (MO); -, AJ578775, -, AJ309683, AJ409597. *Cypella hauthalii* (Kuntze) R.C.Foster - SP524; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers & Souza-Chies 541* (ICN); na, -, -, -, -. *Cypella herbertii* (Lindl.) Herb. - SP504; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers 698* (ICN); -, -, -, -, -. *Cypella osteniana* Beauverd - SP585; Uruguay: Lavalleja (RBGK 30882); RBGK living collection 1987-209); -, -, -, -, -. *Cypella pusilla* (Link & Otto) Benth. & Hook.f. - SP506; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers 700* (ICN); -, -, -, -, -. *Dietes robinsoniana* (F.Muell.) Klatt - SP564; Lord Howe Island (RBGK I-8); *Pickard 3377* (MO); -, -, -, AJ307080, AJ307237. *Diplarrena latifolia* Benth. - G (2008); Australia: Tasmania; *Chase I-220* (K); AJ409036, AJ578779, AJ579946, AJ309686, AJ409600. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. - SP575; Guatemala: Alta Verapaz (RBGK 22041); *Rodríguez 2830* (IBUG, WIS); -, -, -, -, -. *Eleutherine latifolia* (Standl. & L.O.Williams) Ravenna - G (2008); Mexico: San Luís Potosí; *Goldblatt 9072* (MO); AJ409031, AJ578782, AJ579949, Z77283, AJ409591. *Ennealophus euryandrus* (Griseb.) Ravenna - SP563; Bolivia: Santa Cruz (RBGK 30885); *Wood 20309* (no data); -, -, -, -, -. *Gelasine coerulea* (Vell.) Ravenna -SP519; Brazil: Paraná (PABG); *Eggers & Souza-Chies 335* (ICN); -, -, -, -, -. *Gelasine elongata* (Graham) Ravenna - SP560; Brazil (RBGK I-48); *Goldblatt 5925* (MO); -, AJ578787, -, AJ309674, AJ409587. *Herbertia darwinii* Roitman & J.A.Castillo - SP520; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers & Souza-Chies 502* (ICN); -, -, -, -, -. *Herbertia lahue* (Molina) Goldblatt - SP001; Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 211* (ICN); -, -, -, -, -. *Herbertia* aff. *lahue* (Molina) Goldblatt - SP518; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers 704* (ICN); -, -, -, -, -. *Herbertia pulchella* Sweet - SP002; Brazil: Rio

Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies* 260 (ICN); -, -, -, -, -. *Herbertia quareimana* Ravenna - SP505; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers* 699 (ICN); -, -, -, -, -. *Herbertia tigridioides* (Hicken) Goldblatt - SP586; Argentina (RBGK 30879); *Roitman T-13* (no data); na, -, -, -, -. *Herbertia zebrina* Deble - SP003; Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies* 179 (ICN); -, -, -, -, -. *Hesperoxiphion peruvianum* (Baker) Baker - SP527; Peru (UPSBG); *Chauveau H11002* (ICN); -, -, -, -, -. *Kelissa brasiliensis* (Baker) Ravenna - SP507; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers* 701 (ICN); -, -, -, -, -. (*Larentia mexicana* (C.V.Morton & R.C.Foster) Goldblatt) - SP566; Mexico: Jalisco (RBGK 21851); *Ortiz-Catedral 212* (IBUG); -, AM940175, AM94021, AM940187, -. *Larentia rosei* (R.C.Foster) Ravenna - SP567; Mexico: Jalisco (RBGK 22040); *Rodriguez & Martinelli* 2855 (IBUG, WIS); -, AM940174, AM940209, AM940186, -. *Libertia chilensis* (Molina) Gunckel - SP876; Chile: Region VII (UPSBG); *Chauveau H11003* (ICN); -, -, -, -, -. *Libertia ixioides* (G.Forst.) Spreng. - SP535; New Zealand: Stewart Island (RBGK I-218); *Chase I-218* (K); -, AJ578801, AJ579968, AJ309687, AJ409601. *Libertia sessiliflora* (Poepp.) Skotts. - SP877; Chile: Region V (UPSBG); *Chauveau H11004* (ICN); -, -, -, -, -. *Mastigostyla cyrtophylla* I.M.Johnst. - SP880; Chile: Region I (UPSBG); *Chauveau H11005* (ICN); -, -, -, -, -. *Mastigostyla* I.M.Johnst. sp.01 - 046-2011; Peru: Cuzco; *Eggers et al.* 046-2011 (ICN, CUZ); -, -, -, -, -. *Nemastylis geminiflora* Nutt. - SP557; USA (RBGK 22043); *Went s.n.* (Source: A. Rodríguez); -, -, -, -, -. *Nemastylis tenuis* (Herb.) S.Watson - SP559; Mexico: Jalisco (RBGK 22042); *Rodríguez* 2636 (IBUG, WIS); -, AM94017, AM940213, AM940190, AM940165. *Neomarica candida* (Hassl.) Sprague - SP500; Brazil (PABG); *Eggers* 694 (ICN); -, -, -, -, -. *Neomarica northiana* (Schneev.) Sprague - G (2008); Paraguay: Amambay; *Solomon* 6950 (MO); na, AJ578805, AJ579972, AJ309679, AJ409593. *Olsynium douglasii* (A.Dietr.) E.P.Bicknell - SP007; Canada: British Columbia (NCCPG); *R. & E. Heaton OLS100.02* (living collection); -, -, -, -, -. *Olsynium filifolium* (Gaudich.) Goldblatt - SP549; Falkland Islands; *Chase I-243* (K); -, AJ578807, AJ579974, AJ309688, AJ409602. (*Olsynium frigidum* (Poepp.) Goldblatt) - SP546; Chile: Region VII (UPSBG); *Chauveau H11006* (ICN); -, -, -, -, -. *Olsynium junceum* (E.Mey. ex C.Presl) Goldblatt - SP837; Argentina: Mendoza; *Chauveau & Aubert H09050* (ICN); -, -, -, -, -. *Olsynium scirpoideum* (Poepp.) Goldblatt - SP009; Chile: Region Metropolitana (NCCPG); *R. & E. Heaton OLS104.17* (living collection); -, -, -, -, -. *Onira unguiculata* (Baker) Ravenna - SP517; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers & Souza-Chies* 273 (ICN); -, -, -, -, -. *Orthrosanthus chimboracensis* (Kunth) Baker - SP532; Mexico: Oaxaca; *Chase I-231* (K); AJ409039, AJ578809, AJ579976, -, AJ409605. *Orthrosanthus monadelphus* Ravenna (SP174); Mexico:

Oaxaca (UPSBG); *Chauveau & Pautz H09049* (UPS); -, -, -, -, -. *Orthrosanthus multiflorus* Sweet - SP531; Australia (UPSBG); *Chauveau H11007* (ICN); -, -, -, -, -. *Phalocallis coelestis* (Lehm.) Ravenna - SP510; Brazil: Rio Grande do Sul (PABG); *Eggers 703* (ICN); -, -, -, -. *Pseudotrimezia elegans* Ravenna - SP538; Brazil: Minas Gerais; *Lovo 144* (SPF); -, -, -, -. *(Pseudotrimezia pauli* Chukr) - SP539; Brazil: Minas Gerais; *Lovo 152* (SPF); -, -, -, -. *Pseudotrimezia recurvata* Ravenna - SP540; Brazil: Minas Gerais; *Lovo 175* (SPF); -, -, -, -. *Sessilanthera citrina* Cruden - SP550; Mexico: Guerrero (RBGK 22044); *Rodríguez 2885* (IBUG, WIS); -, -, -, -, -. *Sessilanthera heliantha* (Ravenna) Cruden - SP579; Mexico: Guerrero (RBGK 22045); *Rodríguez 2892* (IBUG); -, -, -, -, -. *Sessilanthera latifolia* (Weath.) Molseed & Cruden - SP582; Mexico: Guerrero (RBGK 22046); *Rodríguez 2884* (IBUG); na, -, -, -, -. *Sisyrinchium angustifolium* Mill. - SP014; USA (UPSBG); *Chauveau H09002* (ICN); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium* aff. *pusillum* Kunth - SP237; Peru: Apumirac (UPSBG); *Chauveau & Heaton H09052* (UPS); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium californicum* (Ker Gawl.) Dryand.- SP022; USA (UPSBG); *Chauveau H09006* (ICN); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium chilense* Hook. - SP238; Peru: Apurimac (UPSBG); *Chauveau et al. H09054* (ICN); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium convolutum* Nocca - SP108; Mexico: Mexico (UPSBG); *Chauveau et al. H09019* (ICN); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium micranthum* Cav. - SP839; Uruguay: Colonia; *Chauveau & Aubert H09052* (ICN); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium minus* Engelm. & A.Gray - SP502; Brazil (PABG); *Eggers 696* (ICN); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium palmifolium* L. ssp. *palmifolium* - SP175; unknown origin, cultivated in UPS Bot. Gard.; *Chauveau H09020* (ICN); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium sellowianum* Klatt - SP091; Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 253* (ICN); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium striatum* Sm. - SP844; Chile: Región Metropolitana (UPSBG); *Chauveau H11008* (ICN); -, -, -, -, -. *Sisyrinchium uliginosum* Ravenna - SP154; Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 393* (ICN); -, -, -, -, -. *Solenomelus pedunculatus* (Gillies ex Hook.) Hochr. - SP221; Chile: Region V (UPSBG); *Chauveau H09044* (ICN); -, -, -, -, -. *Solenomelus segethi* (Phil.) Kuntze (SP005); Argentina: Neuquen; *Chauveau & Aubert H09001* (ICN); -, -, -, -, -. *Tigridia alpestris* Molseed ssp. *alpestris* - SP553; Mexico: Hidalgo (RBGK 22047); *Rodríguez 2768* (IBUG, WIS); -, AM940179, AM940214, AM940191, -. *Tigridia alpestris* ssp. *obtusa* Molseed - SP554; Mexico: Michoacán (RBGK 22048); *Rodríguez & Ortiz-Catedral, 3069* (IBUG); -, AM940180, -, AM940192, AM940167. *Tigridia chiapensis* Molseed - SP529; Mexico: Chiapas (UPSBG); *Chauveau H11009* (ICN); -, -, -, -, -. *Tigridia convoluta* (Ravenna) Goldblatt - SP558; Mexico: Jalisco (RBGK 21854); *Ramírez 3390* (IBUG); -, AM940177, AM940212, AM940189, -. *Tigridia flammea* (Lindl.) Ravenna - SP552; Mexico: Michoacán (RBGK

22062); *Rodríguez et al.* 2813 (IBUG, WIS); -, AM940181, -, -, AM940168. *Tigridia immaculata* (Herb.) Ravenna - SP581; Guatemala: Sacatepequez (RBGK 22067); *Rodríguez* 2832 (IBUG, WIS); -, -, -, -, -. *Tigridia meleagris* (Lindl.) G.Nicholson - SP580; Mexico: state of Mexico (RBGK 22070); *Rodríguez & Ramirez* 2903 (IBUG); -, -, -, -, -. *Tigridia oaxacana* (Molseed) Goldblatt - SP561; Mexico: Oaxaca (RBGK 21853); *Rodríguez* 2747 (IBUG, WIS); AM940199, AM940176, AM940211, AM940188, -. *Tigridia orthantha* (Lem.) Ravenna - SP556; Mexico: Oaxaca (RBGK 22235); *Rodríguez* 2836 (IBUG); -, AM940182, AM940217, AM940194, -. *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. - SP555; Mexico (RBGK I-242); *Chase I-242* (K); -, AJ57882, AJ579987, AJ309680, AJ409594. *Tigridia philippiana* I.M.Johnst. - SP530; Chile: Region II (UPSBG); *Chauveau H11010* (ICN); -, -, -, -, -. *Tigridia seleriana* (Loes.) Ravenna - SP551; Mexico: Oaxaca (RBGK 22238); *Rodríguez* 2835 (IBUG, WIS); -, -, -, -, -. *Trimezia fistulosa* R.C.Foster - SP542; Brazil: Minas Gerais; *Lovo 128* (SPF); -, -, -, -, -. *Trimezia juncifolia* (Klatt) Benth. & Hook.f. - SP573; Brazil: Minas Gerais; *Lovo 36* (SPF); -, -, -, -, -. *Trimezia martinicensis* (Jacq.) Herb. - G (2008); Venezuela; *Berry 3802* (MO); na, AJ578821, AJ579988, AJ30967, AJ409583. *Trimezia spathata* (Klatt) Baker - SP501; Brazil: Rio grande do Sul (PABG); *Eggers 695* (ICN); -, -, -, -, -. *Trimezia truncata* Ravenna - SP574; Brazil: Minas Gerais; *Lovo 47* (SPF); -, -, -, -, -.

1.3. Détail des informations supplémentaires utilisées dans l'article 1

Les tableaux et figures constituant les informations supplémentaires citées dans l'article sont récapitulés en annexe 1 située à la fin du présent manuscrit.

1.4. Résumé des principaux résultats de l'article 1

1.4.1. Phylogénie moléculaire et systématique

Les analyses en Maximum de Parcimonie comme en Maximum de Vraisemblance et en Inférence Bayésienne ont permis de confirmer les relations mises en évidence par Goldblatt et al. (2008) entre les trois tribus étudiées avec un fort soutien statistique. Néanmoins, le large échantillonnage réalisé pour cette étude apporte de nombreuses informations nouvelles quant aux relations phylogénétiques à l'intérieur des tribus des Trimezieae et des Tigridaeae.

Au sein de la première de ces deux tribus, les genres *Trimezia* et *Pseudotrimezia* ne sont pas monophylétiques. Deux clades peuvent être identifiés pour le genre *Trimezia*, les espèces se répartissant dans l'un et l'autre conformément aux sections *Trimezia* et *Juncella* définies antérieurement (Chukr, 2001; Chukr and Giulietti, 2008). Les espèces appartenant à la section *Juncella* forment un groupe monophylétique avec l'ensemble des espèces échantillonnées du genre *Pseudotrimezia*. Cependant, au sein de ce groupe le genre *Pseudotrimezia* n'est pas monophylétique. Le genre *Pseudotrimezia* et la section *Juncella* du genre *Trimezia* ne diffèrent que par des caractères morphologiques floraux mineurs (tépales subégaux versus inégaux, ramifications du style simples versus bilobées à trilobées et parfois pétaloïdes, absence de trichomes glandulaires sur les tépales versus présence d'élaiophores de type trichomes). Le genre *Pseudotrimezia* comprend une douzaine d'espèces dont l'aire de répartition est restreinte aux montagnes de grès rocailleuses de l'état du Minas Gerais au centre du Brésil, la plupart d'entre elles étant endémiques d'un seul massif montagneux à l'intérieur de cette zone (Chukr and Giulietti, 2003; Goldblatt and Manning, 2008), des conditions écologiques qu'elles ne partagent qu'avec quelques espèces de *Trimezia* de la section *Juncella*, ces dernières ayant une aire de répartition plus vaste (Chukr and Giulietti, 2000). Malgré l'absence de données concernant les insectes pollinisant ces différentes espèces, ces constatations pourraient néanmoins laisser supposer que les variations de la morphologie florale observées correspondent à des changements de système de pollinisation pouvant être liés à l'adaptation de ces espèces à de nouvelles conditions écologiques. La disparition des élaiophores au sein des espèces du genre *Pseudotrimezia* indiquerait alors une perte de la relation avec les abeilles spécialisées dans la collecte des lipides. Dans cette perspective, les

resultats obtenus suggèrent une révision taxonomique majeure des genres *Pseudotrimezia* et *Trimezia*.

Deux clades principaux ont été identifiés à l'intérieur de la tribu des Tigridaeae. Les genres qui composent le clade A décrit dans l'article sont distribués essentiellement à l'intérieur du bassin du Paraná, hormis *Nemastylis* dont l'aire de répartition couvre le Sud Est des États-Unis et le Nord Est du Mexique, le genre monospécifique *Ainea* dont la seule espèce est endémique de l'état de Oaxaca au Mexique et le genre *Larentia* qui comprend, outre une espèce dont l'aire de répartition s'étend du Venezuela au Brésil, deux espèces strictement mexicaines. Le clade B se partage presque exclusivement entre le Nord Ouest de l'Amérique du Sud et l'Amérique Centrale, la diversité du complexe d'espèces formé par le genre *Tigridia* et les genres récemment inclus par Goldblatt & Manning (2008) dans ce dernier (*Cardiostigma*, *Colima*, *Fosteria*, *Rigidella*, *Sessilanthera*) étant centrée sur le Mexique et le Guatemala. Deux sous-tribus ont été proposées antérieurement pour subdiviser les Tigridaeae (Goldblatt, 1982). La sous-tribu des Cipurinae se caractérise par un nombre chromosomique de base $x=7$, un pollen monosulqué et la présence de ramifications généralement simples sur le style, alors que la sous-tribu des Tigridiinae se distingue par un nombre chromosomique de base $x=14$, un pollen bisulqué et un style dont les ramifications sont profondément subdivisées (Goldblatt, 1990). Alors que le clade A est uniquement constitué de genres appartenant à la sous-tribu des Cipurinae, le clade B comprend des genres appartenant aux deux sous-tribus, et ni la monophylie des Cipurinae, ni celle des Tigridiinae ne sont soutenues par la phylogénie moléculaire obtenue dans le cadre de cette étude. Les synapomorphies morphologiques, anatomiques et/ou cytologiques permettant de caractériser ces deux clades restent encore à déterminer.

Au sein du clade A, les trois genres *Calydorea*, *Cypella* et *Herbertia* constituent plus de 65% de la richesse spécifique observée. *Calydorea* et *Cypella* ne sont pas monophylétiques et *Herbertia*, bien que monophylétique, est niché à l'intérieur d'un large clade comprenant l'ensemble des espèces de *Calydorea*, *Cypella* et *Nemastylis*, ainsi que les genres monospécifiques *Ainea*, *Catila*, *Kelissa* et *Onira*. Les observations morphologiques montrent que ces genres se distinguent par des variations mineures de la morphologie du périanthe, des étamines et du style (Ravenna, 1979, 1981c, 1983; Goldblatt & Hendrich, 1991; Goldblatt & Manning, 2008). Il existe de plus une tendance continue entre le genre *Calydorea* et le genre *Herbertia* vers une réduction de la taille des tépales internes et une fusion complète des filets des étamines, le genre *Cypella* constituant un état intermédiaire (Goldblatt & Manning, 2008).

Par ailleurs, l'absence d'élaïophores au sein des espèces du genre *Calydorea* et l'identification de la présence d'élaïophores de type trichomes sur les tépales internes des espèces du genre *Cypella* (y compris les espèces des genres *Kelissa* et *Onira*), et sur l'ensemble des tépales des espèces du genre *Herbertia*, semble indiquer une évolution corrélée entre systèmes de pollinisation et morphologie florale entre ces trois genres. Si l'on souhaite maintenir le principe de monophylie pour les genres au sein de la tribu des Tigridaeae, il existe deux solutions. La première consisterait à reconnaître chaque variation mineure de la morphologie florale pouvant constituer une synapomorphie pour chacun des groupes monophylétiques identifiés à l'intérieur du clade A et considérer que chacun de ces groupes devrait être élevé au niveau taxonomique du genre, comme ce fut le cas pour les genres monospécifiques *Catila*, *Kelissa* ou *Onira* par exemple. La solution alternative consisterait à considérer, comme cela a déjà été fait pour les Iridaceae africaines des genres *Babiana*, *Gladiolus*, *Moraea* ou *Tritionopsis*, que la notion de genre ne repose pas sur l'uniformité des stratégies de pollinisation à l'intérieur de celui-ci et qu'il peut exister au sein d'un même genre une variation des systèmes de pollinisation pouvant se traduire par une variation plus ou moins prononcée des caractères morphologiques floraux (Goldblatt et al., 2008). Le fait que la biologie de la pollinisation de la plupart des espèces incluses dans le clade A reste quasiment inexploree à ce jour et que pour un grand nombre d'espèces, notamment à l'intérieur du genre *Cypella*, les descriptions de la morphologie des pièces florales restent incomplètes, ne permet pas d'envisager une révision taxonomique selon cette dernière solution, qui consisterait à considérer que les variations de la morphologie florale entre les genres *Ainea*, *Calydorea*, *Catila*, *Cypella*, *Kelissa*, *Herbertia*, *Nemastylis* et *Onira* sont essentiellement liées à l'existence de changements de stratégies de pollinisation.

En revanche, les conclusions résultant des relations phylogénétiques observées à l'intérieur du clade B apportent de robustes éléments en faveur de la deuxième solution proposée. La délimitation du genre *Tigridia* a évoluée considérablement depuis les 40 dernières années. En 1970, Molseed proposa pour la première fois une description détaillée de 23 espèces de *Tigridia* distribuées au Mexique et au Guatemala. Celui-ci subdivisa le genre en deux sous-genres, *Tigridia* et *Hydrotaenia* Lindl., qui se différenciaient essentiellement par la présence d'élaïophores de type trichome sur les tépales internes des espèces du sous-genre *Tigridia*, alors que ces mêmes tépales possèdent des trichomes producteurs de nectar chez les espèces du sous-genre *Hydrotaenia*. Les informations phylogénétiques issues des analyses moléculaires réalisées au cours de ces 12 dernières années, complétées par les résultats de

cette étude indiquent que non seulement ces deux sous-genres ne sont pas monophylétiques mais que plusieurs autres genres sont nichés à l'intérieur du genre *Tigridia* (Rodríguez, 1999; Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008). Le genre *Rigidella* comprend quatre espèces dont les fleurs se distinguent par une coloration rouge soutenue et la présence de trichomes produisant de grandes quantités de nectar sur les tépales internes (Cruden, 1971). Ce nectar est collecté par des colibris, seuls pollinisateurs identifiés de ce genre non monophylétique, les différentes phylogénies moléculaires indiquant en outre que pour au moins trois de ces espèces, ce type de fleur avait évolué à partir d'ancêtres différents au sein du clade regroupant l'ensemble des espèces de *Tigridia*. Les espèces incluses dans les genres *Cardiostigma* et *Sessilanthera* forment deux clades sans relation phylogénétique directe, nichés à l'intérieur de ce vaste ensemble. Leurs fleurs se distinguent notamment par la présence de tépales subégaux et l'absence de nectaires ou d'élaïophores, la seule ressource disponible pour les pollinisateurs étant alors le pollen. Le fait que les variations observées en ce qui concerne la morphologie florale et la disponibilité de nectar ou de lipides floraux soient probablement reliées à l'existence de plusieurs stratégies de pollinisations alternatives à l'intérieur de ce complexe d'espèces a conduit Goldblatt & Manning (2008) à proposer une révision du genre *Tigridia*, incluant au sein de ce dernier l'ensemble des genres identifiés à l'intérieur du clade. Cette hypothèse est soutenue de manière robuste par les résultats obtenus dans le cadre de cette étude.

1.4.2. Histoire évolutive des structures glandulaires florales

En se basant sur la phylogénie et sur l'étude des structures glandulaires florales identifiées au sein des groupes taxonomiques échantillonnés, les observations suggèrent que des changements répétés de stratégies de pollinisation se sont produits au cours de l'histoire évolutive des Iridoideae sur le continent américain. Alors que la majorité des structures impliquées dans la production de récompenses et observées au sein des autres sous-familles d'Iridacées se sont développées sur les cloisons de l'ovaire et produisent du nectar, elles sont, dans le cas des Sisyrinchieae, des Trimezieae et des Tigridieae, essentiellement composées de trichomes glandulaires disposés sur les tépales ou la colonne staminale et plus des trois quarts de ces derniers sécrètent des lipides. Néanmoins, des nectaires de type épithélial sont apparus à deux reprises au sein des Sisyrinchieae et des trichomes sécrétant du nectar se sont développés au sein des genres *Neomarica* (Trimezieae) et *Tigridia* (Tigridieae), l'apparition de trichomes nectarifères s'étant produite indépendamment à trois reprises au sein de ce dernier genre. Comparativement, les élaïophores de type trichome ont évolué

indépendamment à de multiples reprises au sein des Sisyrinchieae (2 transitions), des Trimezieae (1 transition à la base de la tribu) et surtout des Tigridaeae (au minimum sept transitions identifiées). A l'exception d'une transition au sein des Tigridaeae, les élaïophores ont évolué à partir d'ancêtres dont les fleurs étaient dépourvues de structures glandulaires et dont la seule ressource probablement disponible pour les pollinisateurs était le pollen. Les résultats obtenus indiquent par ailleurs qu'au moins dans deux cas, les trichomes nectarifères sont apparus à partir de fleurs ancestrales portant des trichomes sécrétant des lipides, la situation inverse ayant été aussi observée dans un cas. Ces derniers résultats suggèrent qu'il pourrait exister un lien évolutif entre les deux types de structures.

Une estimation du nombre exact de transitions entre les différents états des structures glandulaires florales reste à ce stade impossible, l'échantillonnage ayant servi à établir la phylogénie ne représentant qu'un peu plus de 25% des espèces décrites au sein des groupes taxonomiques étudiés. Néanmoins, les analyses de reconstruction de l'histoire évolutive de ces structures effectuées dans le cadre de cette étude montrent que ce caractère a évolué à de nombreuses reprises, indiquant probablement que de multiples changements de stratégies de pollinisation se sont produits parmi les trois tribus d'Iridoideae américaines. Deux systèmes de pollinisation semblent prépondérants à l'intérieur de ce groupe : l'un où le pollen constitue la seule ressource offerte aux pollinisateurs et le second basé sur le développement de structures spécialisées à la fois au sein des fleurs qui produisent des lipides et des abeilles collectant cette ressource.

Les analyses réalisées dans le cadre de cette étude ont montré par ailleurs qu'il existait une hétérogénéité significative des taux de diversification entre les groupes d'espèces ayant développé des structures glandulaires florales de type trichomes et les groupes qui en sont dépourvus. Un taux de diversification global 3,66 fois supérieur a ainsi été détecté pour la première catégorie de taxons. Le même type d'analyse a été réalisé pour évaluer plus particulièrement si l'apparition des élaïophores de type trichome parmi les Iridoideae américaines avait entraîné un changement significatif des taux de diversification entre les groupes d'espèces concernées et les groupes qui sont dépourvus de ces structures glandulaires. L'absence de variation des taux de spéciation et d'extinction entre ces deux catégories indiquent que le développement des élaïophores n'a pas entraîné à lui seul, un changement de taux de diversification.

2. Conclusions du chapitre 1

Cette étude, incluant de nombreux taxons dont les relations phylogénétiques restaient encore mal connues à ce jour, a permis de mettre en évidence le fait que l'importance accordée aux variations mineures d'états de caractères morphologiques floraux qui furent à la base de la reconnaissance de nombreux genres au sein des Trimezieae et des Tigridieae ne respecte pas le principe de monophylie. A l'intérieur de ces deux tribus, l'évolution des caractères phénotypiques floraux semble beaucoup plus complexe que la systématique classique pouvait le laisser supposer.

L'étude de l'évolution des structures glandulaires florales a permis par ailleurs de mettre en évidence que des changements répétés d'états de ce caractère s'étaient produits au cours de l'histoire évolutive des trois tribus américaines d'Iridoideae, l'apparition de trichomes glandulaires au sein des fleurs de nombreux groupes d'espèces étant associée à une augmentation significative des taux de diversification à l'intérieur de ces groupes. Ces structures étant liées à la sécrétion de ressources potentiellement collectées par les pollinisateurs, les changements observés pourraient refléter l'existence de transitions multiples entre différents systèmes de pollinisation. Ces adaptations successives et répétées pourraient en outre être impliquées dans les variations mineures d'état de caractères morphologiques floraux observés.

Néanmoins, des études complémentaires sont indispensables afin de vérifier ces hypothèses. Bien que la phylogénie obtenue dans le cadre de cette étude apporte de nombreuses informations nouvelles, il serait nécessaire d'améliorer sa robustesse ainsi que la fiabilité des observations réalisées. L'utilisation de marqueurs nucléaires à copie unique ou à faible nombre de copies dont l'utilité pour résoudre les relations phylogénétiques entre espèces proches a été montrée (Sang, 2002; Small et al., 2004; Duarte et al., 2010) constituerait une stratégie d'approche. Celle-ci devrait être complétée par un échantillonnage plus large au sein des genres non monophylétiques afin de renforcer la robustesse des informations phylogénétiques obtenues.

Enfin, l'absence de données concernant la biologie de la reproduction et plus particulièrement la biologie de la pollinisation de la plupart des espèces appartenant aux tribus américaines de la sous-famille des Iridoideae constitue un handicap majeur pour comprendre l'histoire évolutive des structures sécrétrices de lipides et de nectar à l'intérieur des fleurs. Il semble donc indispensable de constituer un jeu de données fiable concernant les relations plantes

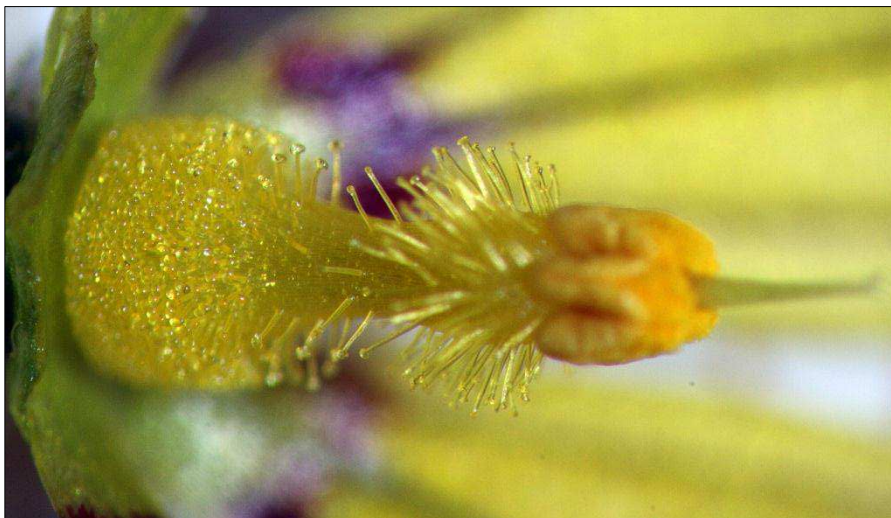
pollinisateurs afin de confirmer les hypothèses résultant des observations réalisées au cours de cette étude dans un cadre phylogénétique plus large et plus robuste.

CHAPITRE 2.

Phylogénie moléculaire, systématique et évolution du genre *Sisyrinchium*



Sisyrinchium soboliferum Ravenna : les élaïophores sont principalement localisés à la base de la colonne staminale. Specimen photographié au nord-est de l'état du Santa Catarina, Brésil.



Sisyrinchium claritae Herter : la position des élaïophores sur la colonne staminale est typique du genre. Specimen photographié au nord-est de l'état du Rio Grande do Sul, Brésil.

1. Phylogénie moléculaire et scénarios évolutifs

Ce second chapitre présente les travaux de phylogénie moléculaire et de reconstruction de l'histoire évolutive des structures glandulaires de type trichome au sein des fleurs à l'échelle du genre *Sisyrinchium*. Grâce à l'obtention et à l'analyse de jeux de données multi-marqueurs, ces travaux répondent à trois objectifs :

- (i) préciser les relations phylogénétiques infragénériques et clarifier la systématique du genre,
- (ii) identifier les transitions vers le développement de structures glandulaires de type trichome, productrices ou non de lipides floraux, ainsi que les éventuelles réversions qui se sont produites au cours de l'histoire évolutive du genre,
- (iii) évaluer le rôle joué par l'évolution de ces structures dans la diversification du genre à l'échelle du continent américain.

Les résultats obtenus lors de cette première étape ont donné lieu à la rédaction de l'article 2. Les méthodes d'estimation de l'évolution du taux de diversification utilisées à l'échelle des Iridoideae ont ensuite été appliquées à l'échelle du genre afin d'une part, de mettre en évidence l'existence éventuelle de variations au sein de la phylogénie, et d'autre part d'évaluer l'impact de la présence des élaïophores sur la diversification du genre *Sisyrinchium*.

Les observations réalisées sur les structures glandulaires identifiées au sein des genres *Sisyrinchium* et *Solenomelus* au cours de cette première étape ont ensuite été complétées afin non seulement de caractériser de manière plus détaillée leur micromorphologie ainsi que le type de sécrétion produit par ces structures, mais aussi d'identifier l'éventuelle présence d'autres microstructures susceptibles d'être impliquées dans la relation plante-pollinisateurs. Les résultats obtenus lors de cette seconde étape ont donné lieu à la rédaction de l'article 3.

1.1. Résumé du contexte et des méthodes de l'article 2

1.1.1. Echantillonnage taxinomique

Le choix du genre *Sisyrinchium* pour ce deuxième volet de l'étude s'est imposé pour trois raisons qui en font un cas exceptionnel parmi les genres américains de la sous-famille des Iridoideae. Avec environ 140 espèces, il constitue par le nombre d'espèces le genre le plus important, ce chiffre constituant une estimation certainement sous-évaluée de la richesse spécifique (Goldblatt & Manning, 2008). En outre, celles-ci sont dispersées sur la majeure partie du continent américain et plus d'un tiers des espèces qui le composent possèdent des

fleurs produisant des lipides impliqués dans un système spécialisé d'interaction plantes-pollinisateurs (Vogel, 1974; Cocucci & Vogel, 2001; Goldblatt & Manning, 2008).

Afin de répondre aux différents objectifs de cette partie de l'étude il a été nécessaire de réaliser un effort particulier d'échantillonnage, d'autant plus important que la diversité du genre reste difficile à évaluer, notamment en Amérique du Sud et au Mexique (Goldblatt & Manning, 2008). Quatre campagnes de terrain ont été menées dans le sud du Brésil (dans le cadre du projet CAPES/COFECUB Sv550/07), un des centres de diversité identifiés pour *Sisyrinchium*, entre 2007 et 2009 qui ont permis de collecter plus de 50 espèces dont une dizaine nouvelles pour la science et qui doivent faire l'objet de publications ultérieures. En parallèle un partenariat a été mis en place avec plusieurs jardins botaniques afin de réaliser des campagnes de collecte non seulement dans le sud des Andes, cette région constituant un second centre de diversité pour le genre, mais aussi en Amérique Centrale et aux États-Unis. Ces campagnes de collecte ont en outre permis de mettre en place une collection vivante de plus de 60 espèces, indispensable à la réalisation des observations menées dans le cadre de l'étude. Ainsi 85 espèces parmi celles déjà décrites ont été utilisées pour obtenir la phylogénie la plus exhaustive possible, reconstruire l'histoire évolutive des élaïophores à l'intérieur du genre et retracer l'histoire de son expansion géographique sur le continent américain.

1.1.2. Echantillonnage génétique

L'objectif de cette partie de l'étude était de clarifier les relations phylogénétiques à une échelle taxonomique infragénérique et de produire une phylogénie robuste pouvant être utilisée comme base de travail pour clarifier la systématique du genre et étudier l'évolution de caractères phénotypiques. Un jeu de marqueurs moléculaires couvrant les trois génomes et constitué à la fois de régions codantes et non-codantes a été sélectionné à partir des données disponibles dans la littérature, ces loci ayant démontré leur potentiel pour améliorer la résolution du signal phylogénétique à différents niveaux taxonomiques (Freudenstein & Chase, 2001; Chat et al., 2004; Kress et al., 2005; Shaw et al., 2005, 2007; Chase et al., 2007; Hollingsworth et al., 2009).

1.1.3. Étude des structures florales productrices de lipides

Afin de reconstruire l'histoire évolutive des structures glandulaires de type trichome au sein du genre *Sisyrinchium*, et plus particulièrement des élaïophores, les fleurs de chaque espèce échantillonnée ont fait l'objet d'observations au stéréomicroscope pour renseigner la présence, la forme, la position au sein de la fleur ainsi que la densité des trichomes glandulaires. Ces

données ont été complétées par des observations au microscope et au microscope électronique à balayage afin d'obtenir des informations plus détaillées concernant la microstructure des trichomes glandulaires. Pour mettre en évidence la présence et l'accumulation de lipides dans les trichomes glandulaires, le rouge de Nile a été utilisé. Ce colorant spécifique permet en effet de détecter la présence de lipides en fonction de leur degré d'hydrophobicité, son spectre d'émission variant du rouge en présence de lipides polaires au jaune en présence de lipides non polaires (Greenspan et al., 1985; Diaz et al., 2010).

L'étude de l'évolution de ces structures florales au sein du genre *Sisyrinchium* a été menée en codant les informations recueillies suivant deux caractères discrets, le type de trichomes glandulaires identifiés ainsi que leur localisation au sein de la fleur. La phylogénie moléculaire réalisée dans le cadre de l'étude a été utilisée pour inférer l'histoire évolutive des des trichomes floraux.

1.1.4. Étude de l'histoire évolutive de la distribution géographique du genre

À partir des observations disponibles dans la littérature concernant l'aire de répartition naturelle de chaque espèce échantillonnée, une matrice de données rassemblant les différents états observés suivant quatre domaines géographiques a été constituée. L'histoire évolutive de la distribution géographique de *Sisyrinchium* a ensuite été inférée en utilisant la phylogénie moléculaire afin d'estimer le rôle éventuel joué par l'apparition des élaïophores de type trichome dans la dispersion géographique du genre à l'échelle du continent américain.

1.2. Article 2

Original Article

Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogeny of the genus

Olivier Chauveau^{1,*}, Lilian Eggers², Christian Raquin³, Adriano Silvério^{1,2}, Spencer Brown⁴, Arnaud Couloux⁵, Corine Cruaud⁵, Eliane Kaltchuk-Santos⁶, Roxana Yockteng⁷, Tatiana T. Souza-Chies² and Sophie Nadot¹

¹Université Paris-Sud, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR 8079, Orsay, F-91405, France, ²Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43433, Brazil, ³CNRS, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR 8079, Orsay, F-91405, France, ⁴CNRS, Dynamique de la compartimentation cellulaire, Institut des Sciences du végétal, UPR 2355, Gif-sur-Yvette, F-91198, France, ⁵GENOSCOPE, Centre National de Séquençage, 2, rue Gaston Crémieux, CP5706, F-91057 Evry Cedex, France, ⁶Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323 M, CEP 91501-970, Porto Alegre, Brazil, ⁷MNHN, UMR 7205 Origine, Structure et Evolution de la Biodiversité, Paris, F-75005, France

* Corresponding author (e-mail: olivier.chauveau@u-psud.fr)

Cet article a été publié dans la revue *Annals of Botany* (**Chauveau O, Eggers L, Raquin C, et al. 2011**. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany* **107**: 1287-1312.).

Olivier Chauveau a réalisé le travail de laboratoire, les analyses, la rédaction de l'article, mis en place la collection nationale de *Sisyrinchium* utilisée dans le cadre de cette étude, et participé à la collecte des échantillons et aux identifications. Lilian Eggers a réalisé les identifications et participé à l'échantillonnage et à la rédaction de l'article. Christian Raquin a mis au point les protocoles de germination in vitro. Adriano Silveiro a participé à la

caractérisation des élaïophores. Spencer Brown a participé à la mise au point des protocoles d'observations des élaïophores. Arnaud Couloux et Corinne Cruaud ont réalisés le séquençage de l'ensemble des marqueurs moléculaires utilisés. Eliane Kaltchuk-Santos a participé à la collecte des échantillons. Roxana Yockteng, Tatiana T. Souza-Chies et Sophie Nadot ont initié le projet et participé à la rédaction de l'article.

Abstract

Background and aims

Sisyrinchium L. (Iridaceae: Iridoideae: Sisyrinchieae) is one of the largest, most widespread and most taxonomically complex genera in the Iridaceae, with all species except one native to the American continent. We investigated phylogenetic relationships within the genus and examined the evolution of oil-producing structures related to specialized oil bee pollination.

Methods

Phylogenetic analyses based on eight molecular markers obtained from 101 *Sisyrinchium* accessions representing 85 species were conducted to produce the first extensive phylogeny of the genus. Total evidence analyses confirmed the monophyly of the genus and retrieved nine major clades weakly connected to the subdivisions previously recognized. The phylogeny was used to reconstruct biogeographical patterns, and to trace the evolutionary origin of glandular trichomes present within the flowers of several species.

Key results and conclusions

Glandular trichomes evolved three times independently in the genus. In two cases these glandular trichomes are oil-secreting, suggesting that the corresponding flowers might be pollinated by oil bees. Biogeographical patterns indicate a first expansion from Central America and the Northern Andes to the subandean ranges between Chile and Argentina on one hand, and the extended area of the Paraná river basin on the other. The distribution of oil-flower species across the phylogeny suggests that oil-producing trichomes may have played a key role in the diversification of the genus, a hypothesis that requires future testing.

Key words: oil bee pollination; glandular trichomes; elaiophores; lipids; phylogeography; Sisyrinchieae; *Olsynium*; *Solenomelus*.

INTRODUCTION

During their evolution, flowering plants have developed a wide variety of strategies to attract and reward pollinators. Plant-pollinator interactions are key components of the dynamics of most terrestrial ecosystems and, in a world where biodiversity is jeopardized by anthropogenic changes, analyzing the evolutionary history of species and understanding the mechanisms involved in their evolution, such as plant-pollinator interactions, is crucial (Steffan Dewenter et al., 2006; Waser, 2006). Furthermore, since species interactions are considered to play a central role in many speciation events, studying the evolutionary history of traits closely linked to uncommon interactions could contribute to improve our knowledge of the mechanisms involved (Rieseberg and Willis, 2007).

Insects represent the largest group of animals visiting flowers to collect resources. Most of them visit flowers to collect pollen and nectar, but some insects seek other resources. Relations between oil-secreting flowers and oil-collecting bees constitute an example of a functional specialisation and uncommon interaction between plants and pollinators (Minckley and Roulston, 2006). Flowers offering oil resource are found in 11 families according to the APG system (APG III, 2009), distributed throughout the angiosperms among unrelated orders (Buchmann, 1987; Rasmussen and Olesen, 2000; Steiner and Whitehead, 2002; Neff and Simpson, 2005; Renner and Schaefer, 2010). The latest comprehensive study found that oil bee pollination evolved at least 28 times independently and 1500 to 1800 species have developed oil-producing organs called elaiophores (Renner and Schaefer, 2010). These structures, located on various floral parts, constitute local glandular fields within the flower and can be anatomically separated into two categories (Vogel, 1969, 1974, 2009). Epithelial elaiophores consist of glandular epithelial or epidermal cells and their oil secretions are stored below a protective cuticle, forming small blisters, while trichomatic elaiophores consist of hundreds to thousands of oil-producing glandular trichomes (Buchmann, 1987; Silvera, 2002; Machado, 2004). The latter produce oil continuously and secretion is often unprotected, however, oil can in some cases be accumulated in a subcuticular space at the tip of the trichome (Vogel, 1974; Buchmann, 1987; Cocucci and Vogel, 2001). Epithelial and trichomatic elaiophores produce non-volatile oils gathered by the females of specialized oil-collecting bees belonging to two families of Hymenoptera: Mellitidae and Apidae (Michener, 2007), which have developed morphological adaptations on their legs or abdomen to harvest and store lipids (Schlindwein, 1998; Cocucci et al., 2000; Vogel, 2009). Documented uses of floral lipids by oil-collecting bees show that females mix oils with pollen and use this mixture

to feed their larvae (Vogel, 1974; Simpson and Neff, 1981). In some species, it has been observed that females also cover the brood cell walls of their nest with a complex set of different substances that contains floral lipids (Buchmann, 1987; Cane et al., 1983; Alves-dos-Santos et al., 2002).

Sisyrinchium L. (Iridaceae: Iridoideae: Sisyrinchieae) is a large and complex genus with a distribution spanning the American continents from subarctic areas to Tierra del Fuego. Many taxonomical studies have already been conducted, mainly based on morphological traits (Klatt, 1861; Baker, 1878; Bentham and Hooker, 1883; Rudall et al., 1986; Goldblatt et al., 1990; Ravenna, 2000, 2002, 2003b), but the systematic of the genus remains poorly resolved. The number of recognized species varies from ca. 80 (Goldblatt et al., 1989) to ca. 200 (Rudall et al., 1986) and the subgeneric divisions are not defined accurately and are, as such, unsatisfactory (Goldblatt et al., 1990; Cocucci and Vogel, 2001; Ravenna, 2003b). Moreover, Central and South American representatives of the genus remain largely unknown: 24 % of the 206 taxa accepted by the World Checklist of Iridaceae were described from these areas during the past 10 years (Barker, 2004), suggesting that many species still remain to be described.

Approximately 35% of *Sisyrinchium* species produce flowers that possess elaiophores of the glandular trichome type called hereafter nuptial trichomes and located either on the staminal column or on the adaxial side of the tepals, sometimes on both parts. Species with elaiophores are almost exclusively distributed in South America. Species diversity in *Sisyrinchium* is estimated to be the highest in South America, mostly around the Paraná river basin and along the subandean ranges, which also corresponds to the range area where oil-collecting bees visiting oil-producing species of *Sisyrinchium* have been observed (Cocucci and Vogel, 2001). A number of *Sisyrinchium* species from North America bear stipitate glandular trichomes on their staminal column (Mcvaugh, 1989; Cholewa and Henderson, 2002). These trichomes are scarce, scattered towards the basal part of the staminal column, slender with a small blister of secretion towards the tip of the trichome head. However, no oil-collecting bee has ever been recorded to visit North American species with such glandular trichomes. These observations have led Cocucci and Vogel (2001) to propose an origin from Southern Neotropics for *Sisyrinchium*. The presence of glandular trichomes on several North American species might be a residual condition evolved from elaiophores (Cocucci and Vogel, 2001). Other species have pollen flowers, devoid of trichomes either on the filamental column or on

the adaxial side of tepals. Members of this third category are widely distributed throughout the whole range of the genus.

The goal of this study was to elucidate the phylogenetic relationships among *Sisyrinchium* species and genera of the Sisyrinchieae tribe (Fig. 1), using a total evidence approach, and test the monophyly of the subgeneric divisions defined in the existing classifications. The resulting historical framework was used to analyze geographical patterns, optimise the evolutionary history of elaiophores and make hypotheses about potential shifts in the pollination system.

MATERIALS AND METHODS

Taxonomic sampling

The list of taxa sampled, voucher information and GenBank accession numbers is given in Appendix 1. We sampled a total of 101 *Sisyrinchium* accessions from South and North American origins, representing 85 species covering the different subgeneric arrangements proposed in the literature. Except for *Sisyrinchium jamesonii* Baker, we were unable to obtain plant material from the section *Segetia* (Ravenna, 2003b), which includes approximately four Andean species from Argentina, Bolivia, Peru, Ecuador and Venezuela. Outgroups were selected from the genera *Olsynium* Raf. (five sp.), *Orthrosanthus* Sweet (one sp.) and *Solenomelus* Miers (two sp.), which are closely related to *Sisyrinchium* within the Sisyrinchieae tribe (Goldblatt et al., 2008). Plant material was sampled mostly from the wild, or from cultivated specimens obtained from seeds collected in the wild and held in botanical gardens or national collections. A special effort was put on the sampling of *Sisyrinchium micranthum* Cav., a species that exhibits a high level of morphological plasticity and is closely related to *S. laxum* Otto ex Sims and *S. rosulatum* E.P. Bicknell (Fig. S1 [Supplementary Information]). Previous attempts to generate a taxonomical classification for these variants have failed because plants often present contradictory combinations of character states (Johnston, 1938; Ravenna, 2001b). Since the species geographical distribution from Canada to South Chile (Ravenna, 2001a, 2001b) is probably the widest of all *Sisyrinchium* species, specimens were widely sampled to represent morphological variation and cover as much as possible its distribution range.



Figure 1. Floral morphology of the four genera in Tribe Sisyrinchieae included in the present study: (A) *Orthrosanthus monadelphus*. (SP174), (B) *Solenomelus pedunculatus* (SP221), (C) *Olsynium scirpoideum* (SP009), (D) *Sisyrinchium tinctorium* (SP240), (E) *S. convolutum* (SP108), (F) *S. cuspidatum* (SP038), (G) *S. scariosum* (SP087), (H) *S. micranthum* morphotype T (SP054) and (I) *S. demissum* (SP034).

DNA extraction, amplification and sequencing

Total DNA from fresh or silica gel-dried leaves was extracted using the NucleoSpin[®] Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) extraction kit, following manufacturer's instructions. A combination of fast and slowly-evolving coding and non-coding DNA regions were used to

infer phylogenetic relationships among the taxa sampled. We used three coding cpDNA regions (*rpoC1*, *rpoB* and *matK*), two cpDNA intergenic spacers (*trnH-psbA* and *trnQ-rps16*), two mtDNA introns (*nad1-2/3* and *nad4-1/2*) and the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region, including ITS1, ITS2 and the 5.8S gene. These loci have shown their potential to complement each other and improve the resolution of the phylogenetic signal at different taxonomic levels (Freudenstein and Chase, 2001; Chat et al., 2004; Kress et al., 2005; Shaw et al., 2005, 2007; Chase et al., 2007; Hollingsworth et al., 2009). Primers used to amplify each DNA region and additional primers used for sequencing are given in Table S1 [Supplementary Information]. The ITS region was first PCR-amplified for 10 different samples using primers ITS5 and ITS4 (White et al., 1990). The visualisation of PCR products on a 1% agarose gel revealed two different amplified fragments (~500 and 700 bp). Both PCR products were size selected on the agarose gel and extracted with the MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Australia). After sequencing and alignment, these regions were BLASTED against Genbank to verify their identity. The smaller fragment proved to be a contamination from fungal DNA. A semi-nested PCR amplifying only the 700 bp fragment was achieved using a specifically designed forward primer described in Table S1 [Supplementary Information]. PCR amplifications were performed using a PTC-100 MJ-Research thermal cycler in 30 µl total volume reaction with the following reaction components: 1.5 µl of genomic DNA (~15-50 ng), 1 µM of each primer, 250 µM of dNTP, 1x of *rTaq* buffer, 2.5 mM of MgCl₂, and 0.2 U of *Taq* polymerase (*Taq* CORE Kit 10, MP Biomedicals, Illkirch, France). The *rpoC1* and *rpoB* loci were successfully amplified with the addition of DMSO (1.2 µl) to the PCR mix. The detailed PCR conditions for each DNA locus used in this study are given in Table S2 [Supplementary Information]. Each DNA region was amplified as a single fragment except in a few cases where internal primers originally designed for sequencing were used to amplify the targeted region in smaller fragments. PCR products were purified and sequenced at the Genoscope (Centre National de Séquençage, 2, rue Gaston Crémieux, CP5706, 91057 Evry Cedex, France. www.genoscope.fr). Raw forward and reverse sequences for each sample were assembled with CodonCode Aligner 3.5.3 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA); ambiguous bases were corrected after examination of chromatograms, and consensus sequences were edited.

Phylogenetic analysis

Alignments were first produced using Clustal X (Thompson et al., 1997) and MUSCLE

(Edgar, 2004) and further improved manually using MEGA4 (Tamura et al., 2007). All detected polymorphisms (SNPs and insertion–deletions [indels]) were visually checked and further validated using a base quality threshold above 20. The indels of the non-coding regions (*trnH-psbA* and *trnQ-rps16* spacers, *nad1-2/3*, *nad4-1/2*, ITS1 and ITS2) shared by two or more taxa were coded as binary characters using GapCoder (Young and Healy, 2003), a program based on simple indel coding sensu Simmons and Ochoterena (2000). All eight DNA regions were first analysed independently (results not shown) and further combined according to the genome. Since the comparison of the resulting topologies of cpDNA and mtDNA regions revealed no instances of well-supported topological differences and provided a higher resolution when analysed together than separately they were combined and compared with the ITS results. Two minor topological incongruences were detected (see Results, *Combined cpDNA, mtDNA and nuclear DNA data set*). However, since no major topological conflict was detected, all data were combined into a single supermatrix for subsequent analysis.

Maximum Parsimony analysis

Data sets including indels coded with GapCoder were analysed using the parsimony criterion in PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2002). All our Maximum Parsimony (MP) analyses used heuristic searches with 1000 random addition replicates, tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping and multrees on, with all character states unordered and equally weighted, and indels coded as previously described. Strict and majority-rule consensus trees were calculated from all most parsimonious trees. The robustness of nodes was evaluated using MP with 1000 bootstrap replicates of new heuristic searches (100 random addition replicates, TBR branch swapping, multrees off). Our computer ran out of memory during heuristic searches for five datasets (*psbA-trnH*, *trnQ-rps16*, *nad1-2/3*, *nad4-1/2* and ITS), leading us to conduct analyses for these regions and the combined datasets using a method developed for this paper and the parsimony ratchet (Nixon, 1999), described in Appendix S1 [Supplementary Information].

Maximum likelihood and Bayesian analysis

Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981) and Bayesian MCMC (Yang and Rannala, 1997) analyses were performed. Model parameters listed in Table S3 [Supplementary Information] were set to those calculated by MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). The Akaike information

criterion was chosen to select the most appropriate model of DNA substitution for each data set or data partition used in the analyses. Maximum Likelihood (ML) analyses were performed using PhyML 3.0 online web server (Guindon et al., 2005) on data matrices excluding the coded indels, since indels cannot be dealt with in PhyML. The reliability of ML topologies was assessed by non-parametric bootstrap tests using 200 pseudo-replicates.

Bayesian analyses were run using MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) with the data partitioned and the most appropriate evolutionary model implemented for each partition as indicated in Table S3 [Supplementary Information]. Coded indels were included in a separate data matrix and treated using a simple model with variable rates. Two independent runs, each comprising four Markov chains (one cold and three heated) and starting with a random tree, were performed simultaneously for 10^7 generations, sampling trees at every 100^{th} generation. Convergence diagnostic was calculated every 10^4 generation and its critical value was set in order to automatically stop the analysis when the standard deviation of the split frequencies had reached the value defined by the stopval command (stoprule=yes stopval=0.01). In all analysis, the first 25% trees from each run were discarded as burnin. Resulting trees from the two independent runs were then pooled to produce one 50% majority rule consensus tree and Bayesian posterior probabilities were generated for the resulting tree.

Combined datasets phylogenies

Phylogenetic trees resulting from all three analyses (MP, ML and Bayesian) were combined to manually build a consensus tree. For each tree, a given node was kept in the consensus tree only if the bootstrap support for MP or ML was higher than 80%, or if the posterior probability (PP) was higher than 0.95. Consensus trees were assembled for each genome dataset and for the combined cpDNA + mtDNA dataset in order to identify potential topological conflicts among these different combinations. The consensus tree based on the whole dataset analyses was constructed accordingly.

Trichome characterisation

Glandular trichomes are present in the flowers of numerous *Sisyrinchium* species and for several South American species it has been documented that they secrete oil collected by the pollinating bees (Cocucci and Vogel, 2001). These trichomes are located on the stamens and the adaxial side of tepals but the nature of their secretion has not yet been identified for many species, especially the North American ones. Following the definition of nuptial-nectaries by

Delpino (1874) and Fahn (2000) these trichomes will be called nuptial trichomes in the present study to emphasize the difference between them and glandular trichomes that can be located elsewhere on the flower. Among the 85 species of *Sisyrinchium* included in this work, 54 bear nuptial trichomes and 50 of which were studied for oil producing trichomes. Fresh flowers at anthesis were observed under a Zeiss Stemi SV6 stereomicroscope (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany) in order to record the shape, position and density of glandular trichomes. Detailed observations of the morphological structure of nuptial trichomes were carried out directly on fresh flower buds and fresh flowers at anthesis, with a scanning electron microscope (SEM Hitachi S-3000N, Tokyo, Japan). Dissected organs were mounted on an aluminium specimen holder and observed under low partial vacuum and Peltier cooling stage. SEM pictures were taken using an environmental secondary electron detector (ESED). Nile Red staining, which allows the detection of lipids according to their hydrophobicity (Greenspan et al, 1985; Diaz et al, 2008), was used to obtain information about the oil content of fresh flowers at anthesis. The emission spectrum of Nile Red shifts from red in the presence of polar lipids to yellow when they are combined with non-polar lipids. Observations were made using a Nikon AZ100 macroscope (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France). Nile Red yellow emission was observed with 450-500 nm excitation and 535 ± 20 emission filters; red emission was observed with 450-500 excitation and 610 long pass emission filters.

For character optimisation, nuptial trichomes were coded using two discrete characters, respectively the type (A) and localisation (B) of nuptial trichomes. Three states were defined for the first character, namely (0) absent, (1) oil-producing trichomes and (2) non oil-producing trichomes. Nuptial trichome localisation was coded as follows: (0) not applicable (i.e., absence of trichomes), (1) present on the filamental column or filaments (depending on the degree of fusion), (2) present on the filamental column and adaxial side of tepals and (3) present on the adaxial side of tepals only. We considered that the presence of trichomes on both the filamental column and the adaxial side of tepals should not be treated as a polymorphism but as a separate character state, with potentially different functional implications in the plant-insect interaction, due to the extended surface covered by the trichomes. The consensus trees resulting from the cpDNA + mtDNA analysis on the one hand, from the ITS analysis on the other hand (results not shown), and from combined (supermatrix) analysis were used for character optimisation with the MP and ML methods implemented in MESQUITE 2.73 (Maddison and Maddison, 2010). With MP, character states

were treated as unordered, allowing any transition among states. ML optimisation was conducted using the MK1 model of evolution (Schluter et al., 1997; Pagel, 1999), which gives equal probability for changes between all character states.

Biogeographical patterns and inference of ancestral distribution

Ancestral patterns of geographical distribution were inferred using the same phylogenetic trees as in the above paragraph. The four main geographical areas defined as character states (Fig. 2) represent the overall distribution of *Sisyrinchium* species (plus the outgroups) on the American continent. A fifth character state was defined for *S. acre* H. Mann which is found on the island of Maui in the Hawaii archipelago.

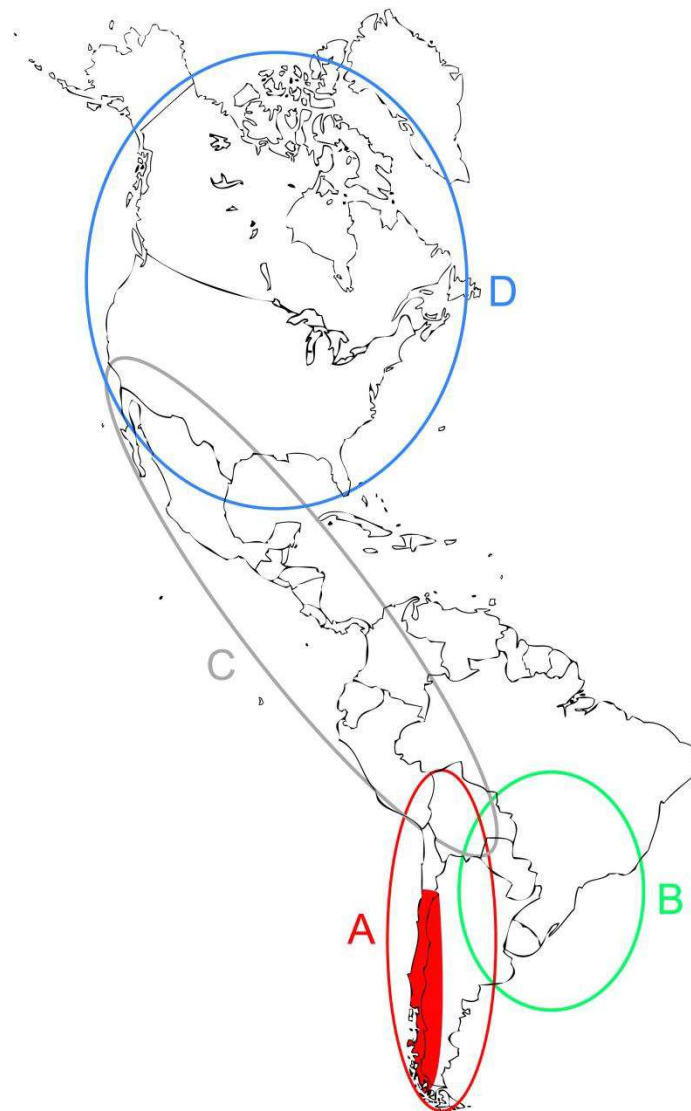


Figure 2. Main geographical patterns of distribution within the range area of *Sisyrinchium*: (A) subandean ranges, between Argentina and Chile; (B) extended Paraná river basin area; (C) central area circumscribed between the south-western United States to Bolivia; (D) North American area. The red area included in Area A corresponds to the distribution areas of *S. arenarium*, *S. chapelcoense*, *S. convallium*, *S. cuspidatum*, *S. graminifolium*, *S. macrocarpum*, *S. nervosum*, *S. papillosum*, *S. pearcei* and *S. striatum*.

The distribution area of each species included in the study was verified (Barker, 2004) and further literature-based investigations were conducted to obtain information on the distribution of species not accepted by the World Checklist of Iridaceae. Detailed descriptions of the way character states were defined are given in Appendix S2 [Supplementary Information]. The distribution area of the genus was optimized similarly to what is described in the above paragraph except that character states were treated alternatively as unordered or ordered, with a step matrix which allowed a penalty for changes between non-adjacent areas. Due to the presence of several multi-state taxa, only MP optimisation was performed. Unfortunately, since the tree used was not fully resolved we could not infer the biogeographic history using the parsimony-based dispersal-vicariance method (Ronquist, 1996, 1997).

RESULTS

Phylogenetic analyses

Chloroplast and mitochondrial data. Alignments of coding regions of both chloroplast and mitochondrial regions were straightforward because insertion/deletion (indel) events were absent. The recently discovered *rps19* gene was present in the spacer region between the *trnH* and *psbA* genes in all four genera included in the present study, as in most monocots (Wang et al., 2008). Alignments were manually improved in intronic regions. MP, ML and Bayesian analyses were conducted independently for each cpDNA and mtDNA regions. Table 1 gives the number of parsimony informative characters, number of most parsimonious trees, tree lengths, as well as the consistency (CI) and retention (RI) indices for the strict consensus trees resulting from MP analyses of the separate and combined datasets. There was little homoplasy in four of the cpDNA datasets ($CI \geq 0.80$), except for *psbA-trnH* ($CI = 0.65$). In the same way, the level of homoplasy was relatively low for the two mtDNA datasets ($CI \geq 0.76$). Trees were rooted with *Orthrosanthus* as sister to all other genera, according to the latest phylogeny of Iridaceae (Goldblatt et al., 2008). The trees resulting from the MP, ML and Bayesian analyses on separate datasets showed nearly identical topologies for each genome. All chloroplast-based analyses but one resulted in trees displaying three strongly supported clades (parsimony and likelihood bootstrap supports (PBS and LBS) $> 80\%$ and posterior probability (PP) > 0.95), each corresponding to a monophyletic genus, respectively *Solenomelus*, *Olsynium* and *Sisyrinchium*. The ML analysis of the *psbA-trnH* locus supported the

Table 1. Comparison of lengths and indices for the resulting strict consensus tree in parsimony analysis of separated and combined data sets. CI and RI are respectively the consistency and retention indices.

Data partition	Number of				Tree length	CI	RI
	Characters	Variable characters (%)	Parsimony informative characters (%)	Most parsimonious trees			
rpoC1	508	38 (7.5%)	26 (5.1%)	4	50	0.80	0.96
rpoB	472	55 (11.6%)	33 (6.7%)	1	56	0.96	0.99
matK	1024	159 (15.5%)	95 (9.3%)	105	189	0.83	0.96
<u>trnH-psbA + [coded indels]</u>	667 + [36]	68 + [36] (14.8%)	38 + [26] (9.1%)	3809*	171	0.65	0.90
psbA	53	8 (15.1%)	5 (9.4%)				
psbA-rps19 spacer	160	39 (24.4%)	19 (11.9%)				
rps19 (negative strand)	279	10 (3.6%)	6 (2.1%)				
rps19-trnH spacer	175	11 (6.3%)	8 (4.6%)				
trnQ-rps16 + [coded indels]	1929 + [209]	287 + [208] (23.1%)	167 + [109] (12.9%)	3693*	638	0.81	0.94
cpDNA combined matrix	4600 + [245]	607 + [244] (17.6%)	359 + [135] (10.2%)	3912*	1132	0.78	0.94
<u>nad1-2/3 + [coded indels]</u>	1657 + [39]	93 + [39] (7.8%)	39 + [33] (4.2%)	3954*	154	0.88	0.97
5'-nad1-exon2	59	5 (8.5%)	1 (1.7%)				
nad1-exon2	82	1 (1.2%)	0 (0%)				
nad1-intron2	1516	87 (5.7%)	38 (2.5%)				
<u>nad4-1/2 + [coded indels]</u>	1683 + [23]	61 + [23] (4.9%)	44 + [18] (3.6%)	4019*	115	0.76	0.95
nad4-intron1	1406	55 (3.9%)	40 (2.8%)				
nad4I-exon2	277	6 (2.2%)	4 (1.4%)				
mtDNA combined matrix	3340 + [62]	154 + [62] (6.3%)	83 + [51] (3.9%)	3962*	276	0.81	0.95
<u>ITS + [coded indels]</u>	665 + [50]	367 + [50] (58.3%)	276 + [36] (43.6%)	4012*	916	0.63	0.87
ITS1	225	151 (67.1%)	113 (50.2%)				
5.8S	165	48 (29.1%)	28 (17%)				
ITS2	234	152 (64.9%)	122 (52.1%)				
28S	41	16 (39%)	13 (31.7%)				
Global combined matrix	8605 + [357]	1128 + [356] (16.5%)	718 + [222] (10.5%)	3340*	2462	0.68	0.90

Notes: numbers into brackets are numbers of characters resulting from indel-coding. *: number of most parsimonious trees in parsimony ratchet analysis.

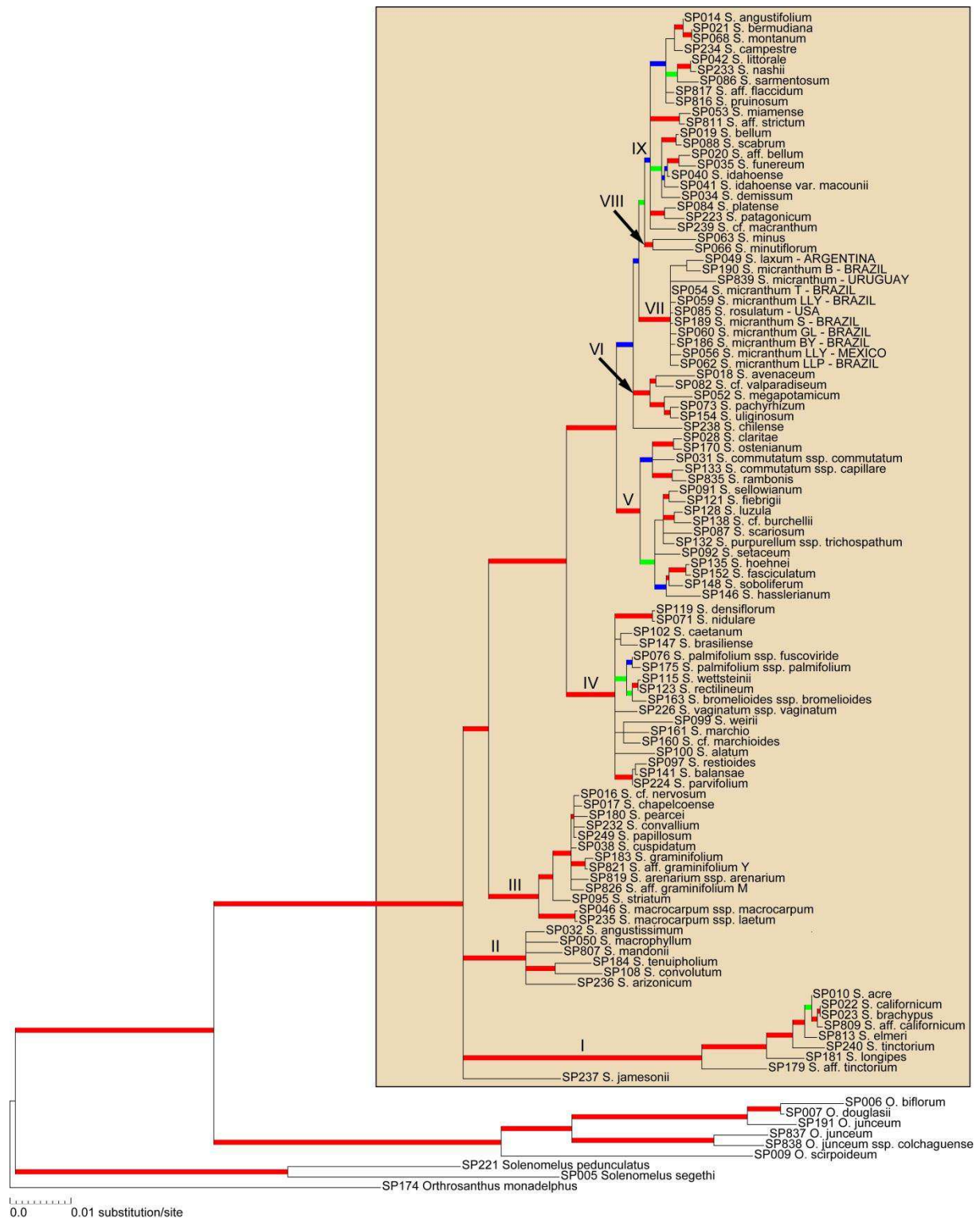
monophyly of *Sisyrrinchium* only moderately (LBS = 57.6). Analyses based on the *rpoB*, *matK*, *psbA-trnH* and *trnQ-rps16* loci confirmed the position of *Olsynium* as sister taxon to *Sisyrrinchium* and *Solenomelus* as sister taxon to *Olsynium*+*Sisyrrinchium* with strong supports. The only exception was the moderate support obtained for the sister group relationship between *Olsynium* and *Sisyrrinchium* in the ML analysis of the *psbA-trnH* locus (LBS=58.8). The mitochondrial-based analyses gave identical results with strong support for the monophyly and the relationships of the three genera, except for the clade *Solenomelus* in the

MP analysis of the *nad4-1/2* locus (PBS = 63.8). Almost all analyses resulted in the monophyly of *Solenomelus*, *Olsynium* and *Sisyrrinchium*, confirming their respective positions in the phylogeny. Since no incongruence was detected among tree topologies, chloroplast and mitochondrial markers were combined into a single matrix for each genome.

Nuclear data. PCR amplification of the ITS region failed for two samples (*Orthrosanthus monadelphus* Ravenna and *Olsynium douglasii* (A.Dietr.) E.P.Bicknell), which were therefore not available for the subsequent analyses of the nuclear data set. The alignment included 715 characters (665 from sequences and 50 from coded indels) of which 312 (43.6%) were phylogenetically informative. The parsimony ratchet yielded 4012 equally most parsimonious trees (details are given in Table 1) of 916 steps, CI (excluding uninformative characters) = 0.63 and RI = 0.87. Tree topologies resulting from MP, ML and Bayesian analyses showed no major incongruence. The monophyly of *Olsynium* (PBS = 100%, LBS = 100%, PP = 1) and *Sisyrrinchium* (PBS = 88.7%, LBS = 88.0%, PP = 0.98) was strongly supported, as was the position of *Olsynium* as sister to *Sisyrrinchium* (PBS = 98.1%, LBS = 99.0%, PP = 1). Detailed results are given in Fig. S2 [Supplementary Information].

Combined plastid, mitochondrial and nuclear DNA data set. No major incongruence was detected among topologies based on the separate analyses, allowing us to combine the datasets. Chloroplast markers were combined into a single matrix totalling 4845 characters (including the 245 coded indels), of which 494 (10.2%) were phylogenetically informative. Most of the parsimony informative characters (66.5%) belonged to the spacers of the *psbA-trnH* and *trnQ-rps16* regions. There were 3402 characters in the total mtDNA matrix (including 62 coded indels), of which 144 (3.9%) were phylogenetically informative. Parsimony informative characters were mainly found in the introns of the mtDNA regions studied (89.5%). Results obtained with the chloroplast and the mitochondrial matrices respectively are given in Figs S3 and S4 [Supplementary Information].

Parsimony ratchet analysis of all eight DNA regions representing all three genomes yielded 3340 equally most parsimonious trees of 2462 steps, CI (excluding uninformative characters) = 0.68 and RI = 0.90. Maximum likelihood searches produced a best ML tree with $-\ln L = 25978$ (Fig. 3). The 30901 trees retained after the burn-in from the two runs of the Bayesian analysis were summarized into a 50% majority rule consensus tree. Tree topologies resulting from the total evidence analyses with parsimony ratchet, likelihood and Bayesian approaches were largely congruent as shown by the number of shared nodes in the consensus tree (Fig. 4). The monophyly of the three genera *Solenomelus*, *Olsynium* and *Sisyrrinchium* identified with



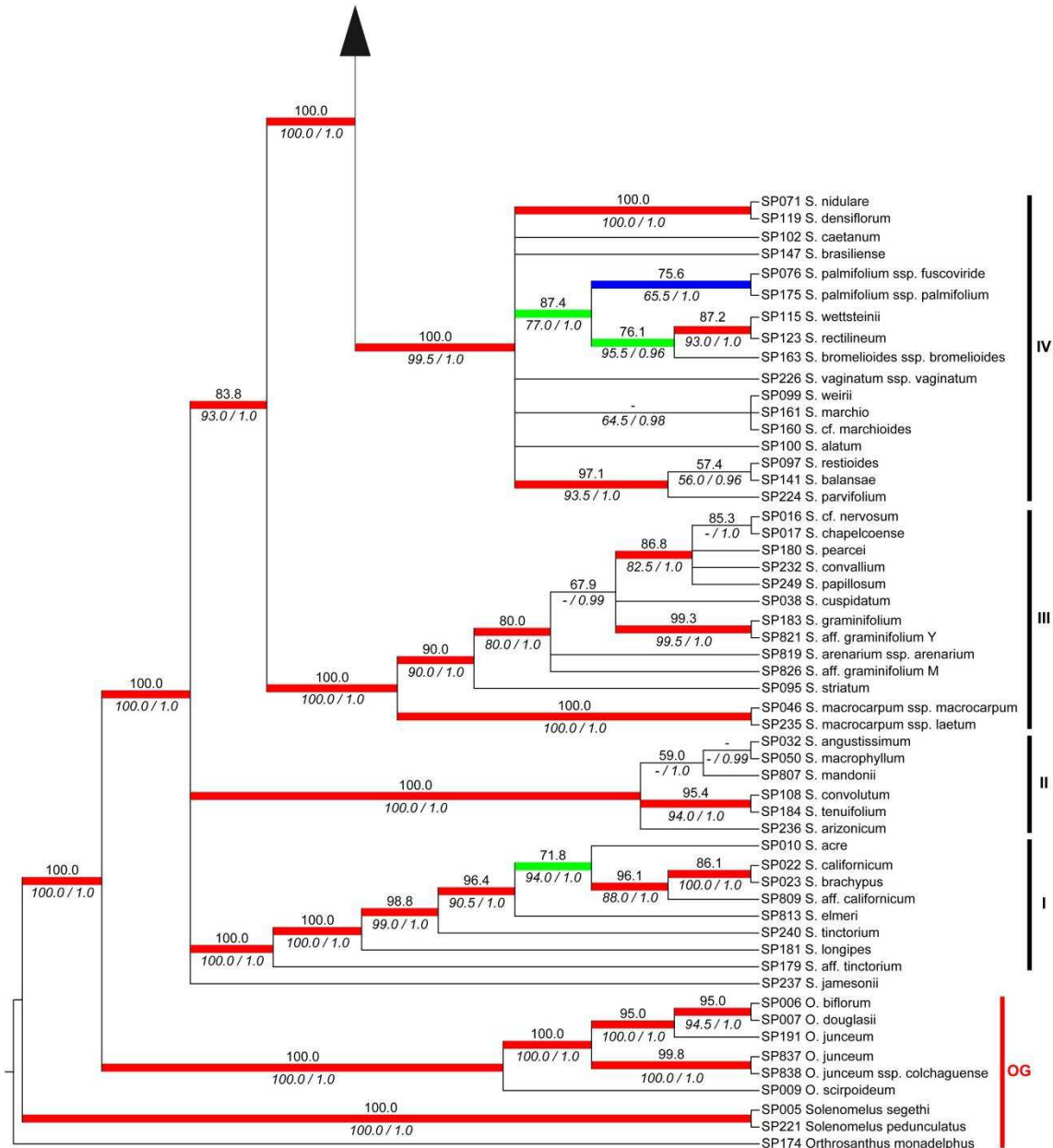


Figure 4. Consensus tree based on the strict consensus tree of the parsimony ratchet, the estimated maximum likelihood tree and the Bayesian 50% majority rule consensus tree obtained from the analysis of the full molecular data set. Support values along nodes are parsimony bootstrap (PBS, above branches), likelihood bootstrap (LBS, on the left, below branches) and Bayesian posterior probability (PP, on the right, below branches). The major clades are labelled I to IX. Thick red branches indicate support of at least 80% (PBS), 80% (LBS) and 0.95 (PP). Thick green lines indicate branches in which only two of the three support values reach these minimum values while the third support value is at least 50% (PBS), 60% (LBS) and 0.95 (PP). Thick blue lines indicate branches in which only one of the three support values reaches the minimum values set above while the two other support values are at least 50% (PBS), 55% (LBS), 0.95 (PP).

the separate analyses is strongly supported in the consensus tree (PBS = 100%, LBS = 100%, PP = 1 for each genus), and the placement of *Olsynium* as sister genus to *Sisyrinchium* was also strongly supported (PBS = 100%, LBS = 100%, PP = 1). According to the topology and node supports observed, we identified nine monophyletic groups within *Sisyrinchium*, namely

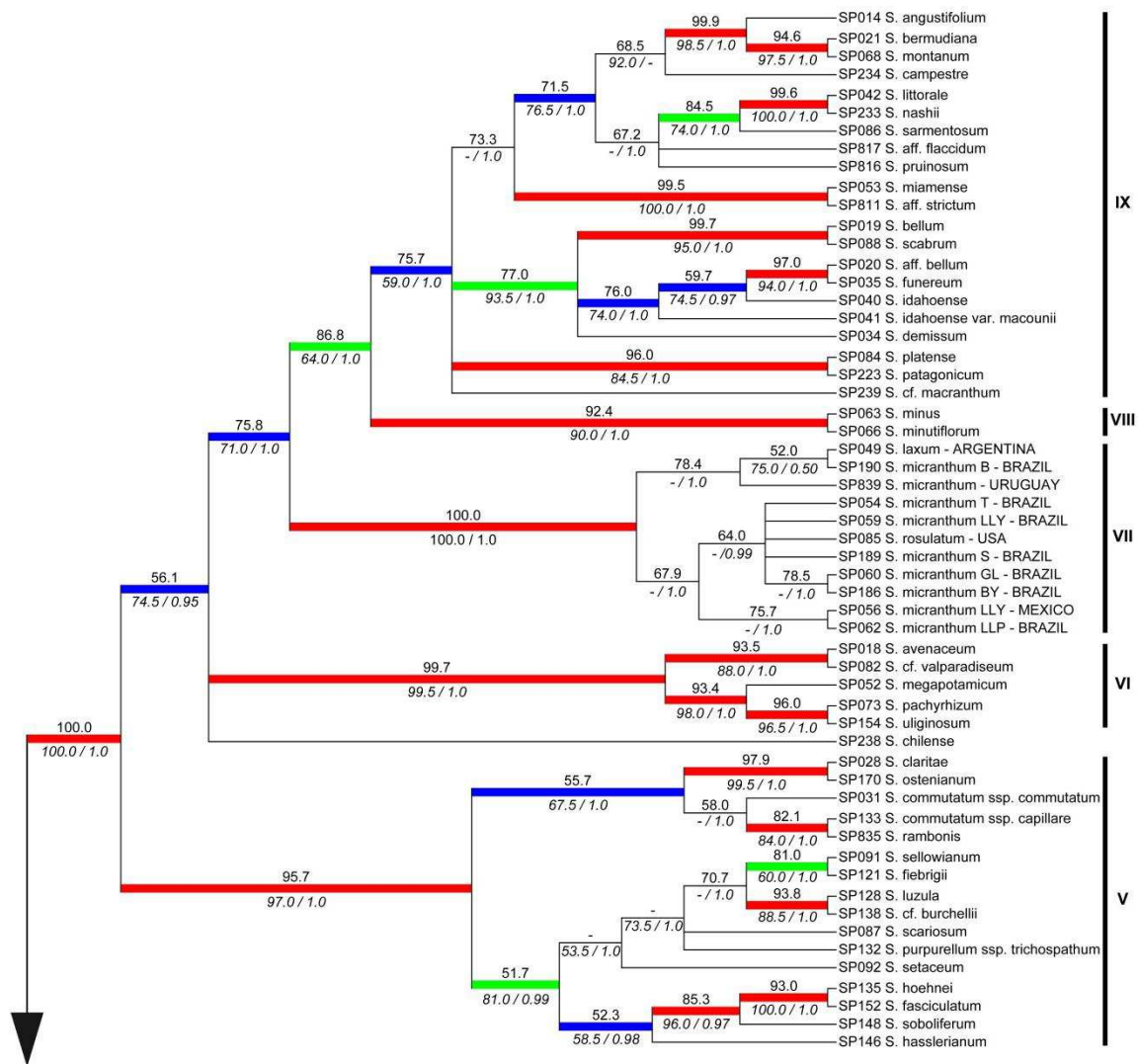


Figure 4. Continued

clades I to IX, all well supported in all of our analyses (PBS \geq 90%, LBS \geq 90%, PP = 1), except clade IX which was strongly supported only in the Bayesian analysis (PP = 1), while moderately supported in the MP and ML analyses (PBS = 75.7%, LBS = 59%). All internal nodes concerning the relative placement of the clades appeared highly supported in the Bayesian analysis but the results obtained with the parsimony and likelihood analyses were more contrasted. The sister group relationship of clades I and II with the rest of the genus was strongly supported (PBS = 100%, LBS = 100%). High support was also found for the respective sister relationships of clade III (PBS = 83.8%, LBS = 93%), clade IV (PBS = 100%, LBS = 100%) and clade V (PBS = 100%, LBS = 100%) to the rest of the genus. Moderate to weak supports were obtained for the respective sister relationships of clade VI

(PBS = 56.1%, LBS = 74.5%), clade VII (PBS = 75.8%, LBS = 71%) and clade VIII (PBS = 86.8%, LBS = 64%) with the remaining species.

The separate cpDNA + mtDNA and ITS analyses resulted in only two conflicting nodes which concerned only one species each time (Fig. 5). In the cpDNA + mtDNA phylogeny, *S. jamesonii* was sister to all other *Sisyrrinchium* species, although this relationship appeared strongly supported only in the Bayesian analysis (PBS = 64.1%, LBS = 74.0%, PP = 0.97), whereas in the ITS phylogeny the species is found with clade II within a polytomy and clade I is sister to all other *Sisyrrinchium* species with strong support in each analysis (PBS = 88.7%, LBS = 88.0%, PP = 0.98).

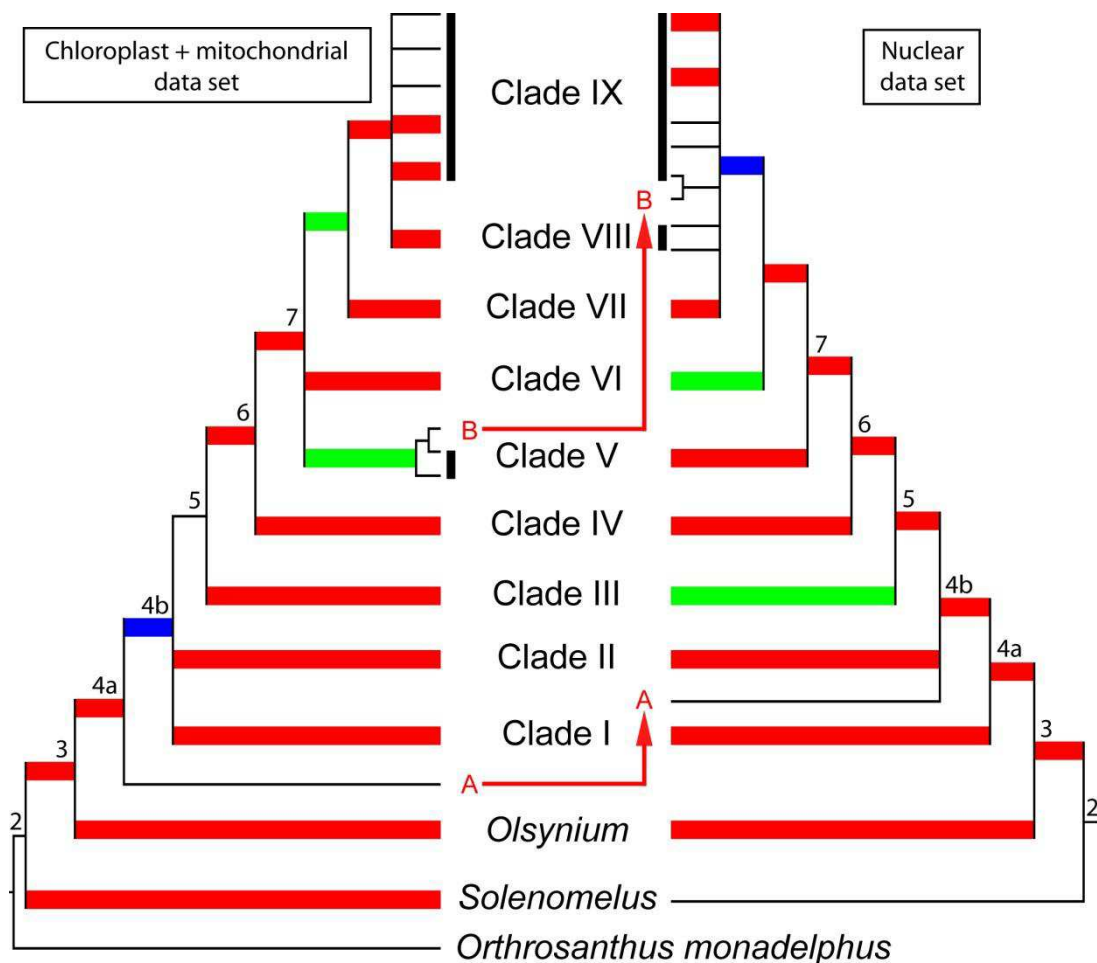


Figure 5. Consensus trees based on the strict consensus tree of the parsimony ratchet, the estimated maximum likelihood tree and the Bayesian 50% majority rule consensus tree resulting from the analysis of the plastid + mitochondrial datasets on one hand (left tree) and the nuclear dataset on the other hand (right tree). The major clades are labelled I to IX. Red lines connect *S. jamesonii* (A) and *S. chilense* (B) whose placement differs between the two topologies. Thick red branches indicate support of at least 80% parsimony bootstrap (PBS), 80% likelihood bootstrap (LBS) and 0.95 posterior probability (PP). Thick green lines indicate branches in which only two of the three support values reach these minimum values while the third support value is at least 50% (PBS), 60% (LBS) and 0.95 (PP). Thick blue lines indicate branches in which only one of the three support values reaches the minimum values set above while the two other support values are at least 50% (PBS), 55% (LBS), 0.95 (PP).

Relationships among clades I, II and *S. jamesonii* appeared as unresolved in the total evidence analyses, and were consequently represented with a polytomy in our consensus tree of all total evidence analyses. The only noticeable incongruence concerned the position of *S. chilense* Hook., which varied greatly between the topologies obtained after analysis of the combined cpDNA + mtDNA data set, and the ITS data matrix. In the first case *S. chilense* fell within clade V with relatively strong supports (PBS = 81.5%, LBS = 75.5%, PP = 1), whereas in the ITS phylogeny *S. chilense* fell within clade IX, which is only distantly related to clade V, also with strong support (PBS = 97.9%, LBS = 95%, PP = 1). This incongruence led to the placing of *S. chilense* at an intermediate position in our consensus tree of total evidence analyses.

Nuptial trichome observations

The character optimisations on the tree obtained from the full molecular dataset are reported in Fig. 6: tree A shows the type of trichomes while tree B indicates their localisation. Our observations confirmed that *Orthosanthus monadelphus* and all *Olsynium* species included in the present study were devoid of nuptial trichomes. Within the genus *Solenomelus* which comprises only *S. segethi* (Phil.) Kuntze and *S. pedunculatus* (Gillies ex Hook.) Hochr., two different types of nuptial structures were identified. The filamental column of *S. pedunculatus* was entirely covered by unicellular glandular trichomes without any secretion outside the trichomes or any associated secretory cavity, while *S. segethi* presented multicellular scales all along the column, covered by secretions towards the lower part of the column. No oil secretion was detected using Nile Red for either species. All nuptial trichomes observed within *Sisyrrinchium* were glandular and unicellular, except in *S. minutiflorum* Klatt (see description below). We observed that the nuptial glandular trichomes of *Sisyrrinchium* always produced a blister filled with secretions towards the tip (Figs. 7, 8 and 9), except for two species: *S. hasslerianum* Baker and *S. hoehnei* I.M. Johnst. Secretions were stored below the cuticle, which is pulled away from the primary wall to form a subcuticular space. The thickness of the cuticle varies across species.

Sisyrrinchium jamesonii and clade I (Fig. 6). All species were completely devoid of nuptial trichomes.

Clade II (Figs 6 and 8). While three species included in clade II are devoid of nuptial trichomes (*S. convolutum* NoCCA, *S. mandonii* Baker and *S. angustissimum* (B.L.Rob. &

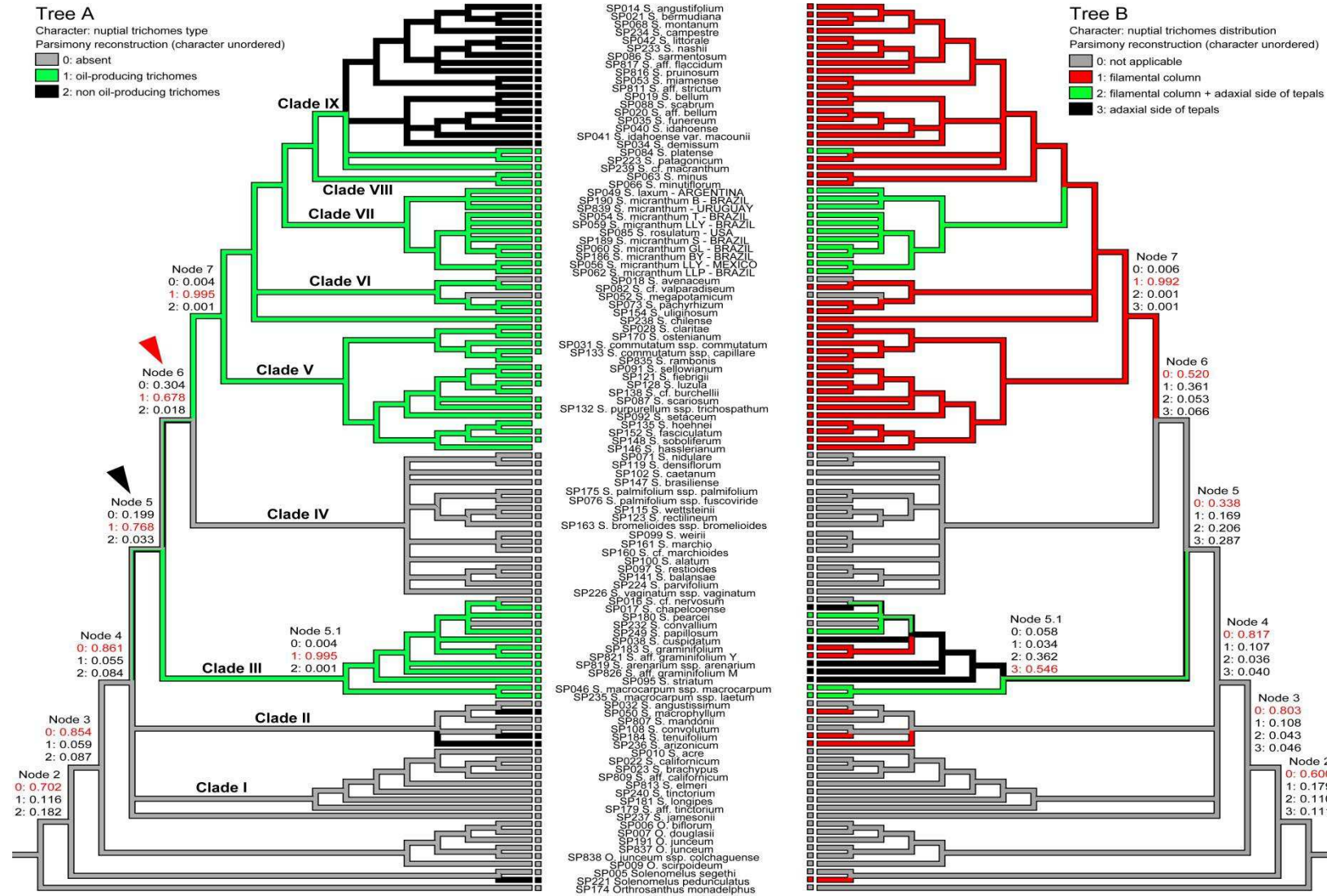


Figure 6. Mirror trees showing the optimisation of the type of nuptial glandular trichomes (tree A) and the distribution of nuptial trichomes (tree B) on the consensus tree (see Fig. 4), with Maximum Parsimony. External nodes are coloured according to the character state observed, internal nodes are coloured according to the ancestral state inferred. Multicoloured branches correspond to unresolved ancestral character states under parsimony analysis. The evolutionary history of both characters was also traced using Maximum Likelihood. Likelihood supports are indicated for seven internal nodes (2-7 and 5.1). The absence of a square in front of the external nodes corresponds to missing data.

Greenm.) Greenm. & C.H.Thomps.), the other three species within this clade exhibited nuptial trichomes sparsely located all along the filamental column. These trichomes were very scarce, with a slender stalk, a small blister of non-oil secretion with a particularly thin and weak cuticle.

Clade III (Figs 6, 7 and 8). All species except two (*S. convallium* Ravenna and *S. cf. nervosum* Phil.) bore nuptial trichomes and all states defined for the localisation of nuptial trichomes were present within the clade. No general pattern of trichome distribution on the filamental column could be drawn from our observations. Trichomes were densely distributed all along the column as well as on the free part of the filaments for *S. macrocarpum* Hieron., they densely covered only the lower two-thirds of the filamental column of *S. pearcei* Phil. and *S. papillosum* R.C. Foster., while *S. graminifolium* Lindl. and *S. aff. graminifolium* bore trichomes sparsely distributed all along the column. On the other hand, when nuptial trichomes were distributed on the adaxial side of tepals, they were always concentrated at their base.

Whatever their location, all nuptial trichomes in this clade produced oil. Apart from *S. graminifolium* and affine samples, which had trichomes resembling those of clade II, clade III trichome cells exhibited a short thick stalk and the secretory cavity is larger, enclosed in a thinner cuticle, than in the other clades including species bearing oil-producing trichomes.

Clade IV (Fig. 6). All species were completely devoid of nuptial trichomes.

Clade V (Figs 6, 8 and 9). All members of this clade bore nuptial trichomes on the filamental column and oil secretion was detected using Nile Red for all the species tested. The distribution pattern of trichomes was very similar for almost all the species observed: trichomes were densely tufted along the lower third of the column and sparsely distributed on the upper two-thirds. The trichome stalk was long and slender and the blister size varied along the column: trichomes on the lower third exhibiting a larger blister than those on the upper two-thirds. Four species within this clade showed different distribution patterns of their trichomes: *S. fasciculatum* Klatt, *S. hasslerianum* Baker and *S. hoehnei* I.M. Johnst. bore reflexed trichomes densely tufted along the upper two-thirds of the filamental column and sparsely distributed on the lower third, whereas few trichomes were present only at the base of the column of *S. rambonis* R.C. Foster.

Clade VI (Fig. 6). Two species were devoid of nuptial trichomes but the other species forming this clade exhibited dense nuptial trichomes along the lower third of the filamental column.

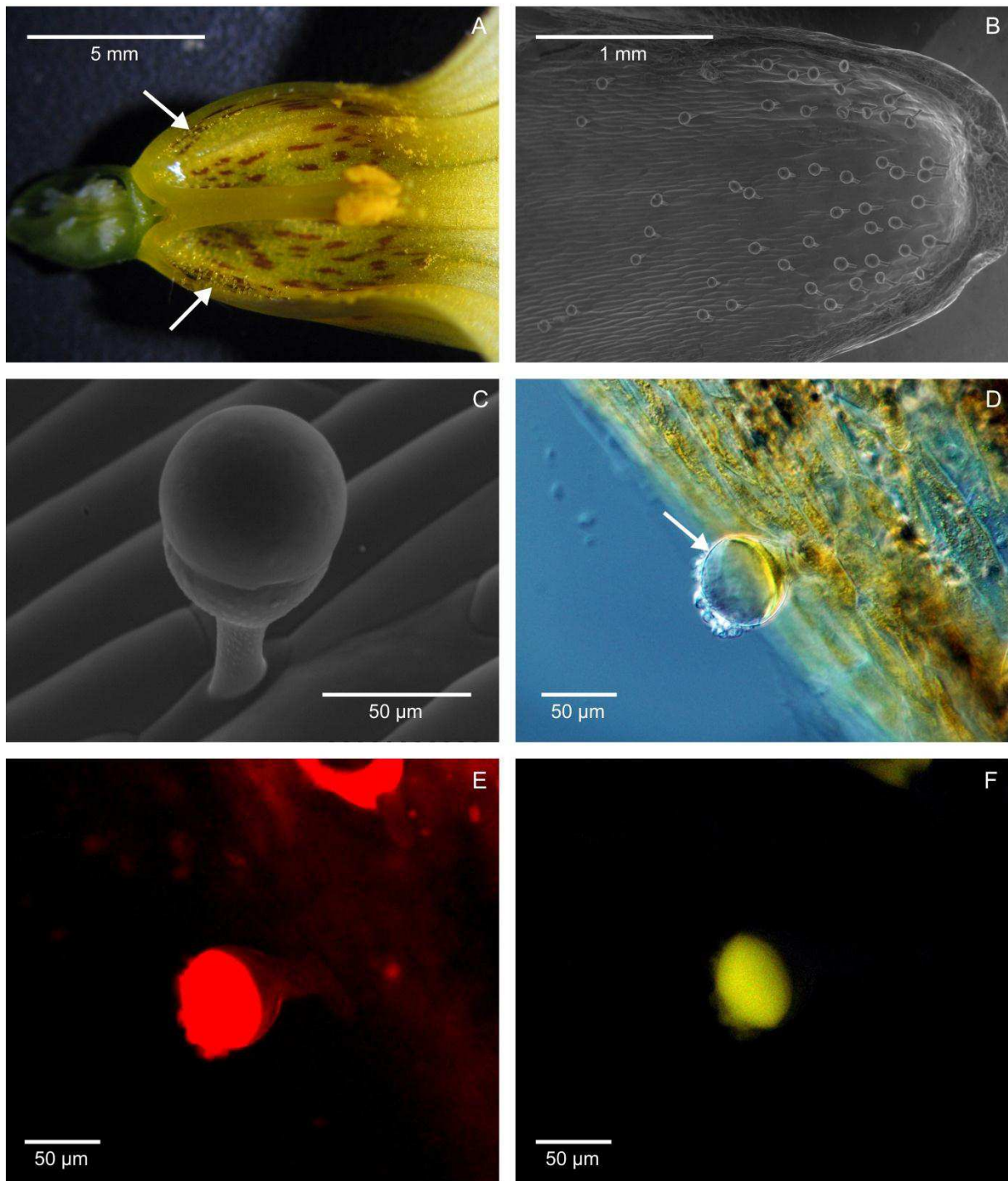


Figure 7. Nuptial trichomes of *Sisyrinchium striatum* (clade III). (A) Cross-section of the flower showing the glabrous staminal column and the distribution of oil-glandular trichomes on the adaxial surface of tepals (arrows). (B and C) SEM micrographs showing the distribution and the morphology of oil-glandular trichomes on tepals at anthesis (adaxial surface): (B) overview of the basal part of the inner tepal; (C) oil-glandular trichome topped by the secretory cavity. (D) Differential interference contrast imaging of a nuptial trichome showing the oil blister (arrow). (E and F) Fluorescence micrographs under 450-500 nm light excitation of the same trichome stained with Nile Red: (E) red emission observed with a 610 LP emission filter showing accumulation of polar lipids in a subcuticular space (oil blister); (F) yellow emission observed with a 535 ± 20 emission filter - neutral lipids are concentrated in the oil blister.



Figure 8. Nuptial trichomes of *S. tenuifolium* (A and B), *S. macrocarpum* subsp. *macrocarpum* (C and E) and *S. claritae* (F and G). (A) Flower of the Central American *S. tenuifolium* (clade II). (B) Distribution of nuptial glandular trichomes (devoid of lipidic secretions) along the filamental column. (C) Overview of the andro-gynoecial apparatus of *S. macrocarpum* subsp. *macrocarpum* (clade III): oil-glandular trichomes are located all along the fused and free parts of the filaments. (D) Nile Red fluorescence (red emission) observed on trichomes with a 610 LP emission filter (polar lipids are concentrated in the oil blister). (E) Nile Red yellow emission observed on trichomes with a 535 ± 20 emission filter (neutral lipids). (F) Arrangement of oil-glandular trichomes along the filamental column of *S. claritae* (clade V). (G) Nile Red fluorescence (red emission) observed on trichomes located on the lower part of the filamental column with a 610 LP emission filter (polar lipids).

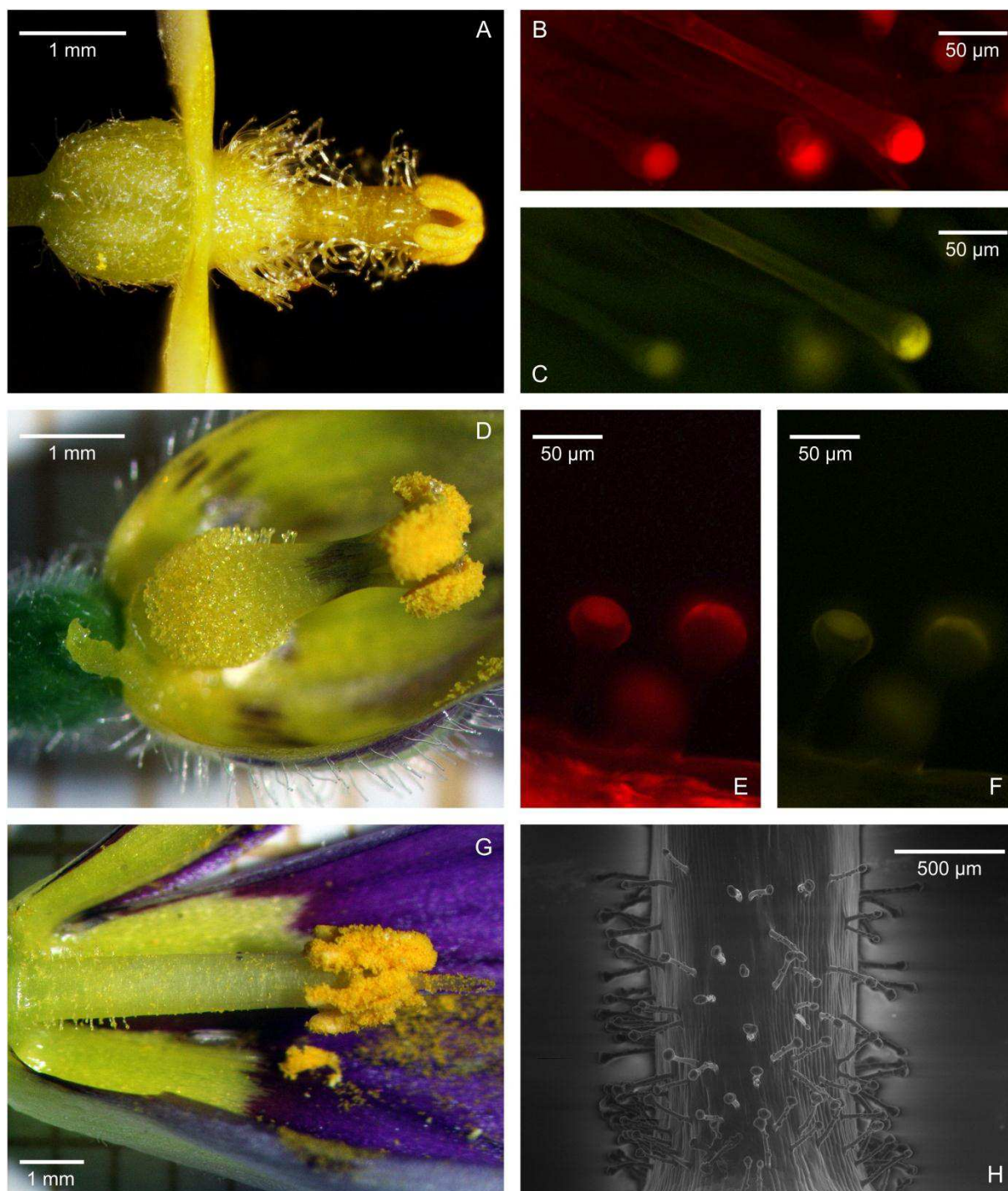


Figure 9. Nuptial trichomes of *S. setaceum* (A and C), *S. micranthum* (D and F) and *S. angustifolium* (G and H). (A) Lateral view of the *S. setaceum* (clade V) flower showing the distribution of oil-glandular trichomes along the filamental column. (B) Nile Red fluorescence (red emission) observed on trichomes with a 610 LP emission filter showing polar lipids accumulation in the oil blister. (C) Nile Red yellow emission observed on trichomes with a 535 ± 20 emission filter showing neutral lipids accumulation in the oil blister. (D) Arrangement of oil-glandular trichomes along the carboy-shaped filamental column of *S. micranthum* (clade VII). (E) Trichomes stained with Nile Red: polar lipids observed with a 610 LP emission filter are concentrated in the oil blister. (F) Nile Red yellow emission observed on trichomes with a 535 ± 20 emission filter showing neutral lipids accumulation in the oil blister. (G) Location of nuptial trichomes (devoid of lipidic secretions) on the lower half part of the filamental column of *S. angustifolium* (clade IX). (H) SEM micrograph showing the arrangement and the morphology of glandular trichomes on the filamental column.

All nuptial trichomes observed in this clade produced oil that accumulated in the secretory cavity.

Clade VII (Figs 6 and 9). The different morphotypes of *S. micranthum* and the closely related species gathered in this clade possessed dense oil-producing trichomes on the lower thickened part of the filamental column. This thickened area varied in extent from just the lower half to the entire length of the fused part of the filaments among the different samples. Taxa included in clade VII exhibited an unusual feature in the genus: oil-producing trichomes formed a row along the middle vein of each tepal. This line usually ended at the lower third of the patent disposition of tepals.

Clade VIII (Fig. 6). The two species forming this clade bore oil-producing trichomes concentrated on the lower quarter of the filamental column. The remainder of the filamental column of *S. minus* Engelm. & A. Gray was covered by sparse and scattered trichomes while the middle half part of the column of *S. minutiflorum* Klatt was glabrous and the upper quarter was covered by reflexed multicellular deep purple trichomes. Located just below the anthers, they exhibited a multicellular stalk and terminated in a glandular cell (as already shown by Cocucci and Vogel, 2001).

Clade IX (Figs 6 and 9). Based on geographical distribution and trichome secretion, species of this clade could be separated into two groups. Species from South America bore oil-producing trichomes on the filamental column. Trichomes were densely arranged on the lower third part of the column in *S. patagonicum* Phil. ex Baker and *S. cf. macranthum* Griseb., while they extended onto the thickened lower two-thirds of the column in *S. platense* I.M. Johnst., with few scattered trichomes on the upper part. Furthermore, this latter species exhibited a row of very sparse oil-producing trichomes along the lower third of the middle vein of tepals.

All other species were from North America. Nuptial trichomes with a long and slender stalk were always present on the filamental column but, even if they were topped by a small blister of secretion, they did not produce oil. The trichomes were always scarce to very scarce and were sparsely distributed from just around the column base to the entire lower two-thirds, depending on the species.

Trichome evolution

The MP optimisation of two aspects of trichome evolution is shown in Fig. 6. Values obtained from the ML optimisations are indicated for the most internal nodes of the mirror trees. These results show that the ancestral state for *Solenomelus*, *Olsynium* and *Sisyrrinchium* was the absence of trichomes. They are absent from the early diverging groups of *Sisyrrinchium*. Non-oil producing trichomes appeared several times on the filamental column within clade II. The ancestral state for clade III is unambiguously the presence of oil-producing trichomes but their ancestral localisation is ambiguous with both MP and ML optimisation: trichomes first appearing on both the filamental column and the adaxial side of tepals or only on the tepals is equally parsimonious and more likely than the other states. The ancestral state for clade IV was the absence of trichomes. Oil-producing trichomes evolved in the common ancestor of clade V to clade IX and, except for clade VII, the ancestral localisation was on the filamental column. For clade VII, the ancestral localisation was on both the filamental column and the adaxial side of tepals. The number of origins of oil-producing trichomes (one single origin or two separate origins) is ambiguous with the MP optimisation, but the ML optimisation suggests that a single origin is more likely.

Biogeographical patterns and optimisation of ancestral distribution

The optimisation of biogeographical patterns on the phylogeny revealed the existence of a strong phylogenetic signal for this character in *Sisyrrinchium* as well as in the two closely related genera *Olsynium* and *Solenomelus* (Fig. 10). *Solenomelus* is restricted to the central and Southern part of Area A, while *Olsynium* is distributed throughout Area A and the Southern part of Area C, except *O. douglasii* which has a range area extending towards the Western United States. Within *Sisyrrinchium*, *S. jamesonii*, clades I and II are restricted to Area C, except *S. acre* which is endemic to the Hawaii archipelago. The distribution area of clade III covers the central and Southern parts of Area A (Chile and Argentinean Andes) and corresponds to the red coloured part within this area (Fig. 2). Most of the species within clades IV and V occur only within Area B (Southern Brazil, Paraguay, Northern Argentina and Uruguay), except *S. alatum* Hook., *S. palmifolium* subsp. *palmifolium* and *S. vaginatum* subsp. *vaginatum* which are also distributed in the Southern part of Area C (Venezuela, Ecuador, Peru and Bolivia). *Sisyrrinchium chilense* is distributed mainly in Area B (Chile, Argentina and Falkland Islands) but is also present in the Southern part of Area C (Ecuador, Peru and Bolivia). Except *S. cf. valparadiseum* which is found only in the central part of Area

A, all species within clade VI are distributed within Area B (Southern Brazil, Paraguay, Northern Argentina and Uruguay). The range registered in the World Checklist of Iridaceae for *S. micranthum* (Barker, 2004) was applied similarly to all morphotypes of the complex, because their respective ranges were impossible to determine accurately from the existing data. Most taxa of clade VII are distributed in Areas A, B and C, with *S. laxum* restricted to Areas A and B (Southern Brazil, Paraguay, Argentina and Uruguay), and *S. rosulatum* restricted to Area D (South-eastern U.S.A. to North-eastern Mexico). The two species grouped in clade VIII are restricted to Area B. More than 80% of clade IX is exclusively North American (Area D), except *S. cf. macranthum* and *S. patagonicum* which are native to Area A (Chile and Western Argentina), and *S. platense* to Area B (Southern Brazil, Paraguay, Northern Argentina and Uruguay). Although ancestral nodes were well resolved for the genera *Solenomelus* and *Sisyrinchium*, and for clades I to VIII within *Sisyrinchium*, deeper nodes and ancestral state for clade IX were mostly ambiguous, preventing us from making solid hypotheses about the evolutionary history of the geographic distribution of the genus *Sisyrinchium*. Results were identical whether character states were treated as unordered or with a step matrix which allowed a double weight for changes between the non-adjacent areas.

DISCUSSION

The phylogeny presented here includes the most extensive sampling of *Sisyrinchium* and its two closest relatives *Olsynium* and *Solenomelus* performed so far. A total evidence approach was used to infer phylogenetic relationships within *Sisyrinchium*, the most speciose genus of Iridaceae on the American continent. Data from the three genomes (chloroplast, mitochondrial and nuclear) were combined after checking that there was only minor incongruence among them, which might be related to gene flow or possibly hybrid origin of the concerned taxa. Indeed, limited breeding studies (Cholewa and Henderson, 1984; Henderson, 1976) concerning 10 North American species have shown that several species are genetically compatible, producing fertile hybrids. The total evidence approach allowed us to identify eight well-supported and one moderately-supported clades within *Sisyrinchium*. Most of the phylogenetic information came from the non-coding regions of all three genomes, and the information contained in indels had a major impact on tree topology. However, although coding regions were highly conserved, they were useful for resolving the most internal nodes of the phylogeny.

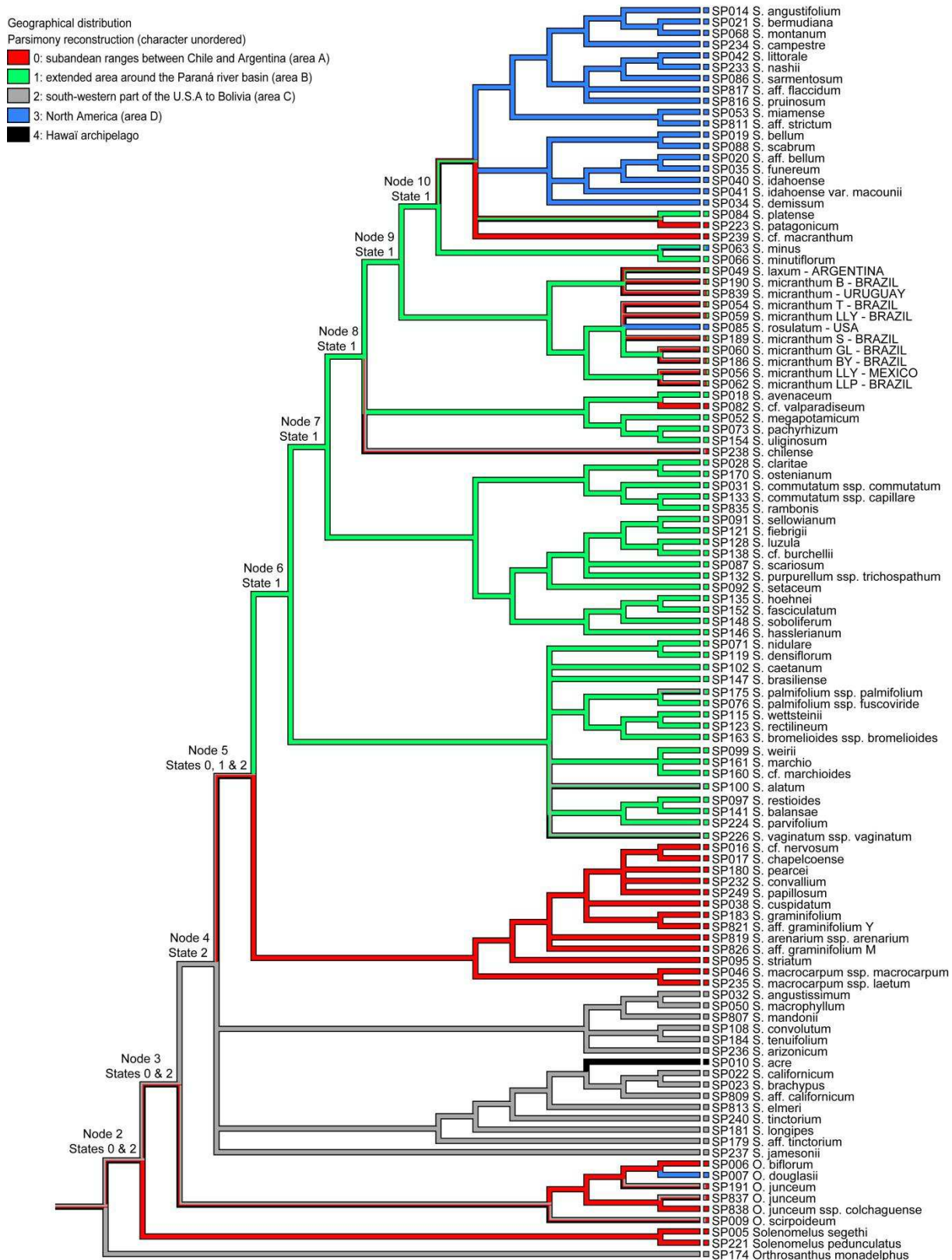


Figure 10. Optimisation of geographic distribution on the consensus tree (see Fig. 4), with maximum parsimony. External nodes are coloured according to the state observed for the current distribution area of each sample, internal nodes are coloured according to the ancestral state inferred. Multicoloured branches correspond to unresolved ancestral states. The most parsimonious states are indicated above nine internal nodes (2-10).

Phylogenetic relationship within Sisyrinchium and infrageneric groupings

The most comprehensive infrageneric classification performed so far was proposed by Bentham and Hooker (1883) who recognized 4 sections within *Sisyrinchium* (Rudall et al., 1986). Recently, two subgenera named *Echtronema* and *Sisyrinchium* were retained as subdivisions within *Sisyrinchium*, excluding two sections (*Eriphilema* and *Nuno*) previously included in the genus by Bentham and Hooker (1883) and now grouped with the genera *Phaiophleps* and *Chamelum* under the genus name of *Olsynium* (Goldblatt et al., 1990). The phylogenetic study of Goldblatt et al. (1990), based on morphological, leaf anatomical and basic chromosome number characters detailed in Table 2, suggested that species classified within the subgenus *Sisyrinchium* were actually more closely related to the genera *Solenomelus* and *Olsynium* than the species composing the subgenus *Echtronema*. Nevertheless, the trait differences used to discriminate between the two subgenera are unclear and the subgenus *Echtronema* is actually regarded as a heterogeneous group of species (Goldblatt and Manning, 2008). The present study shows that neither *Echtronema* nor *Sisyrinchium* are monophyletic. Most species included in subgenus *Echtronema* are more closely related to the genera *Olsynium* and *Solenomelus* than those of the subgenus *Sisyrinchium* (Fig. 11).

An alternative proposal to subdivide the genus *Sisyrinchium sensu stricto* (excluding *Olsynium*), into eight sections has been advanced lately by Ravenna (2000, 2002, 2003b) on the basis of morphological characters (Table 2). The subdivisions recognised in this classification are partly supported by our results, with some exceptions (Fig. 11). Species from the section *Hydastylus* are distributed among clades I and IV, the latter including also the species forming the section *Viperella*. This was unanticipated since this latter section is characterised by distinctive morphological characters, such as absent or highly reduced basal leaves, and caulescent plants bearing many short caulinate leaves (Ravenna, 2003b). The present results suggest, however, that section *Hydastylus* should be restricted to the species of clade I, which corresponds to the initial morphological definition of *Hydastylus* as genus distinct from *Sisyrinchium* (Bicknell, 1900). The most evident morphological differences reside in the ancipital stem (simple and scapose, terminated by a spathe of two conduplicate bracts) and in the yellow flowers. Tepals are obtuse or acute but neither aristate nor emarginate, filaments are more or less adherent below but free and spreading for more than half their length, anthers are versatile, slender style branches are divergent and ovary is strictly glabrous. This set of morphological characters differentiates species of clade I from all

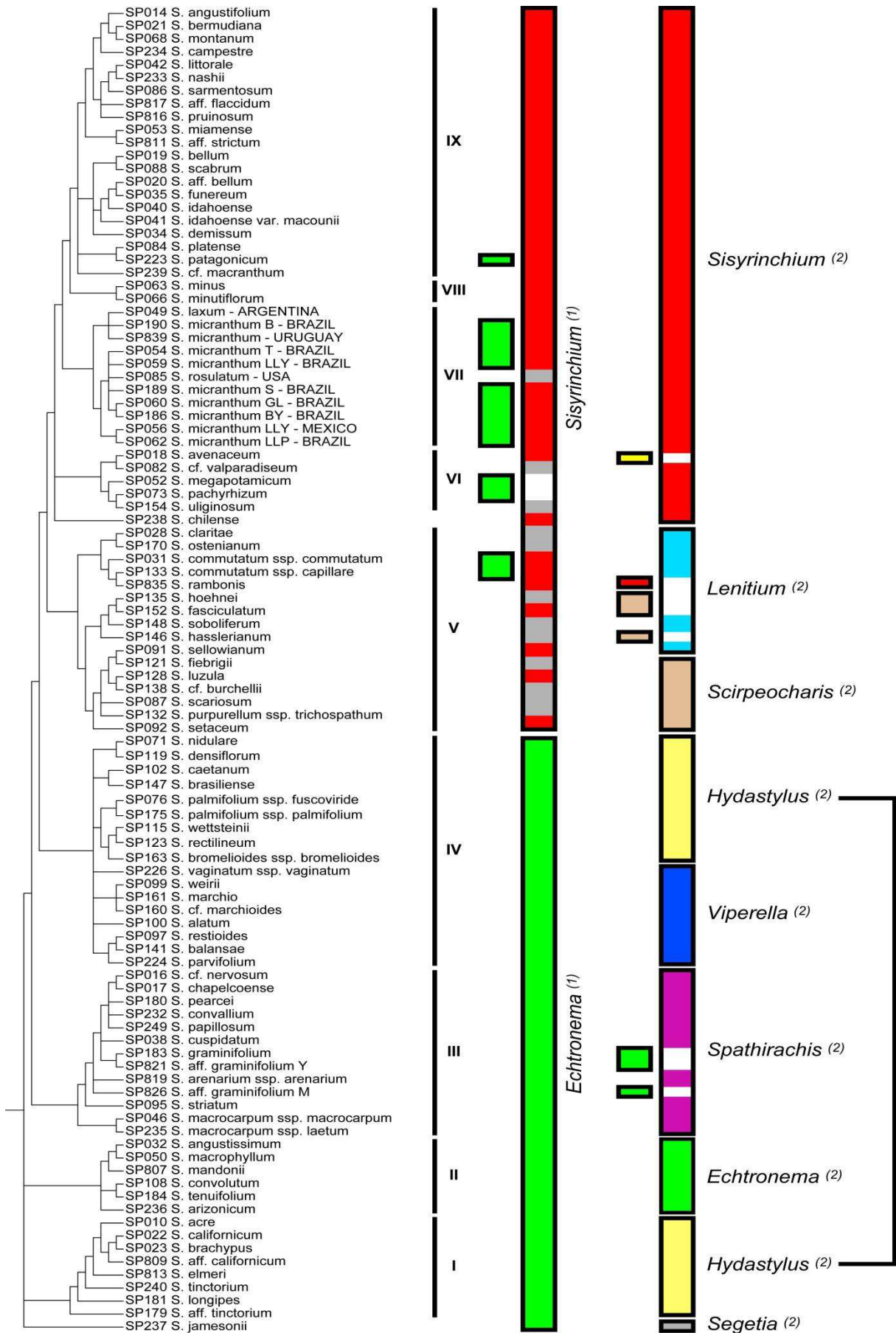


Figure 11. Major clades (I to IX) identified within the consensus phylogenetic tree for *Sisyrinchium* (see Fig. 4). The subgenera (1) proposed by Goldblatt *et al.* (1990) and the sections (2) defined as subdivisions of the genus by Ravenna (2000, 2002, 2003b) are indicated on the right side of the figure. Species are designated for subgenus *Sisyrinchium* (red colour) and subgenus *Echtronema* (green colour), according to Bentham and Hooker (1883), Cholewa and Henderson (1984), Kenton *et al.* (1986), Rudall *et al.* (1986), Goldblatt *et al.* (1989, 1990) and Cocucci and Vogel (2001). Species labelled with the two colours were alternatively classified in the two subgenera. Uncertainties are coloured in grey.

Table 2. (1) Characters used by Goldblatt *et al.* (1990) to define *Sisyrinchium* and *Echtronema* subgenera; (2) Key to the sections of the genus *Sisyrinchium* established from the morphological characters used by Ravenna (2003b).

(1) Character states	Subgenus
Perianth outspread or rather rarely cupped. Filaments connate in a cylindrical tube almost to the end. Anthers almost sessile, short, tightly appressed to the style. Perianth blue to purplish or rarely whitish with purple veins. Leaf mesophyll not axially elongated and unlobed. Bundle fibers when present located at the xylem pole. Basic chromosome number $x=8$.	<i>Sisyrinchium</i>
Perianth outspread. Filaments base connate or filaments often connate to the middle in a cylindrical tube, then free, spreading. Anthers versatile. Style arms long, slender, often canaliculated above. Perianth yellow. Leaf mesophyll axially elongated and lobed. Bundle fibers located at the phloem pole. Basic chromosome number $x=9$, secondary base numbers $x=8$ and 17.	<i>Echtronema</i>
(2) Character states	Section
A. Plant bearing basal leaves	
B. Stem leafy. Inflorescence not pseudolateral.	
C. Filaments connate nearly to the top, or rarely half way up.	<i>Sisyrinchium</i>
CC. Filaments connate at different lengths but never to the top, rarely entirely free.	
D. Lateral spathes, or at least most of them, pedunculated, all of them herbaceous.	<i>Echtronema</i>
DD. Lateral spathes sessile, membranous, hyaline, conforming a spiciform inflorescence, rarely absent.	<i>Spathirhachis</i>
BB. Stem scapiform with a single apical reduced leaf or bract at the apex. Inflorescence pseudolateral, often congested.	
C. Stem ancipitate, winged.	
D. Filaments almost completely connate into an elongate column, densely glandular near the base and hairy upwards or sometimes only hairy.	<i>Lenitium</i>
DD. Filaments glandless and glabrous, connate halfway down or less, the free portion patent or spreading obliquely.	<i>Hydastylus</i>
CC. Stem cylindrical, rarely slightly compressed, not winged.	
D. Filaments almost completely connate into an elongate column, densely glandular near the base and hairy upwards or sometimes only hairy.	<i>Scirpeocharis</i>
DD. Filaments glandless and glabrous, connate half way down or less, the free portion patent or spreading obliquely.	<i>Segetia</i>
AA. Basal leaves absent. Plant caulescent bearing very many short leaves.	<i>Viperella</i>

other *Sisyrinchium* species. Similarly, since clade IV is very well supported, its status as a section should be considered. However, further investigations are needed to identify morphological synapomorphies for this group. The section *Echtronema* corresponds almost entirely to clade II, except for *S. graminifolium* which belongs to clade III. The species of section *Spathirachis*, characterized by sessile lateral inflorescences with membranous spathes along the floral stem (Goldblatt *et al.*, 1990; Ravenna, 2003b), are found in clade III. However, this clade includes *S. graminifolium*, a species with pedunculate lateral spathes classified in section *Echtronema*, whereas *S. brasiliense* (Ravenna) Ravenna and *S. avenaceum* Klatt, with sessile lateral spathes, have been classified in the section *Hydastylus* by Ravenna (2000) on the basis of the herbaceous nature of the spathes, and belong to clades IV and VI respectively. The present results suggest, therefore, that the presence of sessile lateral spathes, on which section *Spathirachis* is mainly based, is a homoplasious and non-discriminating trait in the framework of a natural classification. Species classified in sections *Lenitium* and *Scirpeocharis* are grouped together in clade VII, with a monophyletic group of four species of section *Lenitium* (ancipitate, winged stems) and one species of section *Sisyrinchium* (*S. rambonis*) sister to a clade which includes all species of section *Scirpeocharis* (cylindrical stems) and two species of the former section, *S. sellowianum* Klatt and *S. soboliferum* Ravenna, nested among species belonging to section *Scirpeocharis*. These results strongly suggest that the two sections are not two clades but only a single natural group. The presence of *S. rambonis* in clade VII suggests that the traits used to discriminate this section should also be questioned. Apart from *S. rambonis*, the section *Sisyrinchium sensu* Ravenna consists of clades VI to IX, which form a monophyletic group on the basis of ITS, with strong support (results not shown): PBS = 97.9%, LBS = 95.0%, PP = 1. This group is only moderately supported in the total evidence analyses, the supports obtained from the Maximum likelihood and Bayesian analyses being moderate (LB = 74.5%, PP = 0.95) and that from the MP analysis being weak (PB = 56.1%). The phylogenetic pattern corresponding to this section (three well supported clades, VI to VIII, and clade IX moderately supported) suggests the section needs to be revised, all the more since combined morphological and geographical features discriminate among the four clades.

Section *Segetia* was represented in our study by a single accession (*S. jamesonii*), making an assessment of the monophyly of this section impossible. Furthermore, *S. jamesonii* is unplaced with regard to clades I and II.

Nuptial trichome evolution

The optimisation of nuptial trichomes on a phylogenetic tree (Fig. 6; Tree A) clearly shows that the presence of glandular trichomes on the stamens and/or the adaxial side of tepals is derived in *Sisyrinchium* (with probably three independent origins). The results show that the presence of nuptial trichomes along the filamental column of *Solenomelus pedunculatus* results from an independent transition. In the same way, an independent transition led to the presence of nuptial trichomes on the filamental column in species of clade II and, although they were secretory, they produced no oil. The results suggest that these trichomes evolved several times within clade II but since this hypothesis is well supported only in the Bayesian analysis, we considered only one transition. In contrast, it is unclear whether the oil-producing trichomes have a single or two evolutionary origins, both scenarios being equally parsimonious on strongly supported internal nodes. The ML optimisation favours a single origin for oil-producing trichomes, since the probability of state 1 (presence) at the corresponding node indicated by a black arrow in Fig. 6 (Tree A) is higher than the probability of state 0 (absence) ($P_1=0.768$ vs. $P_0=0.199$). However, optimisation on trees based on separate datasets (plastid DNA + mitochondrial DNA on the one hand, ITS on the other hand) favours two independent origins. For both the probabilities associated with absence of oil-producing trichomes at the relevant node are higher than the probability for their presence, respectively $P_0 = 0.659$ and $P_1 = 0.304$ for the plastid + mitochondrial dataset, and $P_0 = 0.638$ and $P_1 = 0.342$ for the ITS dataset. The probability values obtained for each state under ML analyses vary in the same way at the following node indicated by a red arrow in Fig. 6 (Tree A): $P_0 = 0.304$ and $P_1 = 0.678$ on the phylogenetic tree from the full molecular dataset and $P_0 = 0.633$ or 0.638 and $P_1 = 0.350$ or 0.342 when optimisation is performed on trees based on the separate datasets.

The species in clade III are distributed from northern-central Chile to Tierra del Fuego, along the southern Andes (Fig. 2). They share this distribution area with only a few other oil-producing *Sisyrinchium* species: *S. valparadiseum* (clade VI), *S. chilense* and *S. patagonicum* (clade IX) which are not phylogenetically related to clade III, and the range area of this clade is totally disconnected from those of clades IV and V. Furthermore, all states for the distribution of nuptial glandular trichomes, are represented in clade III (Fig. 6; Tree B) and this combination is unique among the clades identified within the genus. The comparative observation of trichome morphology in almost all species included in the present study revealed several distinctive features for the species of clade III: the stalk of nuptial glandular

trichomes is short and thick and the secretory cavity is proportionately larger with a thinner cuticle (Figs 7, 8 and 9) than observed in the other clades. It is interesting to note that the distribution area of species forming clade III is included within the range of oil-collecting bees belonging to the genus *Chalepogenus*, while species of clade V are present within the range area of oil-collecting bees from the genus *Lanthanomelissa*. It has been shown that several species of bees belonging to these two genera collect oil from *Sisyrinchium* species (Vogel, 1974; Cocucci and Vogel, 2001). This body of observations leads us to suggest that oil-producing trichomes might have appeared at least twice independently within the genus. The present observations, compared with those previously published (Cocucci and Vogel, 2001), suggest that shifts in the pollination system occurred between the species originating from areas where oil-collecting bees are scarce or absent and species located in areas where oil-collecting bees are known to collect oil on flowers of *Sisyrinchium*. Thus, the shift from an ancestral state devoid of nuptial trichomes towards the presence of oil-producing trichomes in clades III and IV, or the loss of oil production within clade IX in the North American species, is probably related to the occurrence of tropical oil-collecting bees which are able to forage for oil on *Sisyrinchium*. These are absent from the central part (area C) and from the northernmost part (area D) and present in the two other subareas of the distribution range of the genus (Cocucci and Vogel, 2001).

It is important to note that our analyses of trichome evolution are preliminary because the content of secretory trichomes was only tested for oil and not for other types of chemicals. As a result, the scenarios for trichome evolution proposed in our study are over-simplified, but still provide a first insight into general trends for the genus *Sisyrinchium*.

Biogeographical patterns and optimisation of ancestral distribution

A South-American origin for *Sisyrinchium* is suggested by the location of the centres of diversity of the genus (Cocucci and Vogel, 2001) and phylogenetic studies of Iridaceae (Goldblatt *et al.*, 2008) and of Sisyrinchieae (Goldblatt *et al.*, 1990). Although the phylogenetic relationships between *S. jamesonii* and the species grouped in clades I and II is unresolved in our tree, the results suggest that the genus arose somewhere between Bolivia and south-western USA. The polytomy at the base of the tree, due perhaps to the poor sampling in section *Segetia*, does not allow us to suggest a more precise area for the geographical origin of the genus. Based on our results, two dispersal events might have occurred toward the subandean ranges of Area A (clade III) and the Paraná river basin (Area

B) at the base of clades IV to VIII. Unresolved nodes within clade IX prevent us from proposing a geographical origin for this clade.

Conclusions

In this study, molecular, morphological and biogeographical evidences were used to clarify phylogenetic relationships in *Sisyrrinchium* and provide a first insight into the evolutionary history of oil-producing trichomes in this genus. The results confirm the monophyly of the genus and the relative positions of the genera *Olsynium* and *Solenomelus*. Several main clades were identified within *Sisyrrinchium* which are only partially congruent with the subdivisions recognised in the most recent infrageneric classification. Nuptial glandular trichomes evolved at least twice, more probably three times, independently during the evolutionary history of the genus. While the first transition, occurring toward the basal part of the tree, concerns a limited number of extant species, we place the two following transitions to oil-producing trichomes occurred at the base of two speciose clades, so these transitions were associated with major biogeographical and ecological changes in the resulting clades. These observations suggest that the acquisitions of oil-producing trichomes and the subsequent loss of the trichome ability to produce oil among most of the North American species may well have played a key role in patterns of speciation in *Sisyrrinchium*. This work provides an essential framework for future studies on the relationship between oil-secreting flowers and oil-collecting bees in the Iridaceae, but a specific effort concerning the sampling of the species closely related to *S. jamesonii* and the basal clades I and II remain particularly crucial for improving the resolution at this phylogenetic level. Further phylogenetic studies that incorporate additional molecular markers as well as morphological, cytological and ecological characters are also needed to define more clearly the circumscription of taxonomic subdivisions within the genus, as well as to obtain a better understanding of speciation patterns. Studying the evolutionary history of oil-secreting structures in detail within *Sisyrrinchium*, which is one of the largest genera of angiosperms involved in specialized oil bee pollination, could help us to understand to which extent species diversification of a plant lineage has been driven by this particular pollination system.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary information is available online at www.aob.oxfordjournals.org and consists of the following. Figure S1: Illustrations of the morphological plasticity observed within *S. micranthum* and the closely related species. Table S1: Primers used for amplifying and sequencing. Table S2: PCR profiles for DNA amplification. Appendix S1: Alternative methods used for the Maximum Parsimony analyses. Table S3: Data and models used in analyses. Appendix S2: Method used to define geographical areas as character states to infer the ancestral patterns of distribution. Figure S2: Consensus tree based on the strict consensus tree of the parsimony ratchet, the estimated maximum likelihood tree and the Bayesian 50% majority rule consensus tree obtained from the analysis of the nuclear data set. Figure S3: Consensus tree based on the strict consensus tree of the parsimony ratchet, the estimated maximum likelihood tree and the Bayesian 50% majority rule consensus tree obtained from the analysis of the chloroplast data set. Figure S4: Consensus tree based on the strict consensus tree of the parsimony ratchet, the estimated maximum likelihood tree and the Bayesian 50% majority rule consensus tree obtained from the analysis of the mitochondrial data set.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to R. and E. Heaton (NCCPG *Sisyrinchium* National Collection, Newton Abbot, UK) who provided an important part of the plant material. We deeply thank them for their continuous help, kindness and availability. We are also indebted to S. Aubert and R. Douzet (Jardin Botanique de la Station Alpine du Lautaret, France) and F. Pautz (Jardin Botanique de Lyon, France) for generously providing seeds, exicates and leaf material for DNA extractions, and J.F. Bertrand, A. Dubois, T. Genevet and L. Saunois (Université Paris-Sud, France) for their investment in maintaining the living collection of *Sisyrinchium* developed in our University. M-N. Soler (IFR87) generously undergirded our light microscopy with competence.

This work received funding from the French/Brazilian CAPES/COFECUB cooperation project Sv550/07, from the IFR87 "La plante et son environnement", from the "Consortium National de Recherche en Génomique", and the "service de systématique moléculaire" of the Muséum National d'Histoire Naturelle (IFR 101). It is part of the agreement n°2005/67

between the Genoscope and the Muséum National d'Histoire Naturelle on the project "Macrophylogeny of life" directed by G. Lecointre.

LITERATURE CITED

Alves-Dos-Santos I, Melo GAR, Rozen JG. 2002. Biology and immature stages of the bee tribe Tetrapediini (Hymenoptera: Apidae). *American Museum Novitates* **3377**: 1-45.

APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105-121.

Baker JG. 1878. Systema Iridaceanum. *Botanical Journal of the Linnean Society* **16**: 61–180.

Bentham G, Hooker JD. 1883. Irideae: no.29. *Sisyrinchium*. In: Bentham G, Hooker JD, eds. *Genera Plantarum*. L. Reeve and Co., London, UK, **3**(2): 698-699.

Barker C. 2004. *World Checklist of Iridaceae*. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on Internet; <http://www.kew.org/wcsp/> accessed 05 November 2009.

Bicknell EP. 1900. Studies in *Sisyrinchium* VIII. *Sisyrinchium californicum* and related species of the neglected genus *Hydastylus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **27**: 373-387.

Buchmann SL. 1987. The Ecology of Oil Flowers and their Bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 343-369.

Cane JH, Eickwort GC, Wesley FR, Spielholz J. 1983. Foraging, grooming, and mate-seeking behaviors of *Macropis nuda* (Hymenoptera, Melittidae) and use of *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) oils in larval provisions and cell linings. *The American Midland Naturalist*. **110**: 257-264.

Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, et al. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* **56**: 295-299.

Chat J, Jauregui B, Petit RJ, Nadot, S. 2004. Reticulate evolution in kiwifruit (*Actinidia*, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies. *American Journal of Botany* **91**(5): 736-747.

Cholewa AF, Henderson DM. 1984. Biosystematics of *Sisyrinchium* section *Bermudiana* (Iridaceae) of the Rocky Mountains. *Brittonia* **36**(4): 342-363.

- Cholewa AF, Henderson DM. 2002.** *Sisyrinchium* Linnaeus. In: Flora of North America Editorial Committee, eds. 1993+. *Flora of North America North of Mexico*. New York and Oxford, **26**: 351-371.
- Cocucci AA, Sércic A, Roig-Alsina AH. 2000.** Oil-collecting structures in Tapinotaspidini: their diversity, function, and probable origin. *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* **90**: 51-74.
- Cocucci AA, Vogel S. 2001.** Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora* **196**(1): 26-46.
- Delpino F. 1874.** Ulteriori osservazioni sulla dicogamia nel regno vegetale. *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali* **16**:151-349.
- Diaz G, Melis M, Batetta B, Angius F, Falchi AM. 2008.** Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron* **39**: 819-824.
- Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792-1797.
- Fahn A. 2000.** Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* **31**: 37-75.
- Felsenstein J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Freudenstein JV, Chase MW. 2001.** Analysis of mitochondrial *nad1b-c* intron sequences in Orchidaceae: utility and coding of length-change characters. *Systematic Botany* **26**(3): 643-657.
- Goldblatt P, Henrich JE, Keating RC. 1989.** Seed morphology of *Sisyrinchium* (Iridaceae – Sisyrinchieae) and its allies. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **76**: 1109-1117.
- Goldblatt P, Rudall P, Henrich JE. 1990.** The genera of the *Sisyrinchium* alliance (Iridaceae: Iridoideae): Phylogeny and relationships. *Systematic Botany* **15**(3): 497-510.
- Goldblatt P, Manning JC. 2008.** *Sisyrinchium* Linnaeus. In: Goldblatt P, Manning JC, eds. *The Iris family - natural history and classification*. Timber Press, Portland, Oregon, USA, 221-224.

- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, et al. 2008.** Iridaceae ‘Out of Australasia’? Phylogeny, Biogeography, and Divergence Time Based on Plastid DNA Sequences. *Systematic Botany* **33**: 495-508.
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. 1985.** Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipids droplets. *The Journal of Cell Biology* **100**: 965-973.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. 2005.** PHYML Online-a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* **33**(Web Server issue): W557-W559.
- Henderson DM. 1976.** A Biosystematic study of Pacific Northwestern blue-eyed grasses (*Sisyrinchium*, Iridaceae). *Brittonia* **28**(2): 149-176.
- Hollingsworth ML, Clark A, Forrest LL, et al. 2009.** Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources* **9**: 439-457.
- Johnston IM. 1938.** The species of *Sisyrinchium* in Uruguay, Paraguay and Brazil. *Journal of the Arnold Arboretum* **19**: 376-401.
- Kenton AY, Rudall PJ, Johnson AR. 1986.** Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Botanical Gazette* **147**(3): 342-354.
- Klatt FW. 1861.** Monographia generis *Sisyrinchium*. *Linnaea* **31**: 61-100.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. 2005.** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**(23): 8369-8374.
- Machado IC. 2004.** Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. In: B. Freitas B, Pereira JOP, eds., *Solitary Bees, Conservation, Rearing and Management for Pollination*. Editora Universitária: Fortaleza, BR, 255-280.
- Maddison WP, Maddison DR. 2010.** *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 2.73, distributed by the authors, website: <http://mesquiteproject.org>
- McVaugh R. 1989.** Bromeliaceae to Dioscoreaceae. In: McVaugh R, ed. *Flora Novogaliciana. A descriptive account of the vascular plants of the western Mexico*. The University of Michigan Herbarium, Ann Arbor, Michigan, **15**: 294-347.

- Michener C.D. 2007.** *The bees of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA.
- Minckley RL, Roulston TH. 2006.** Incidental mutualisms and pollen specialization among bees. In: Waser NM, Ollerton J. eds. *Plant-Pollinator Interactions: from Specialisation to Generalisation*. University of Chicago Press, London, UK, 69-98.
- Neff JL, Simpson BB. 2005.** Other rewards: Oils, resins, and gums. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC. eds. *Practical pollination biology*. Enviroquest, Cambridge, UK, 314-328.
- Nixon KC. 1999.** The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* **15**: 407-414.
- Nylander JAA. 2004.** MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Pagel M. 1999.** The maximum likelihood approach to reconstructing ancestral character states of discrete characters on phylogenies. *Systematic Biology* **48**(3): 612-622.
- Rasmussen C, Olesen JM. 2000.** Oil flowers and oil-collecting bees. *Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk Naturvidenskapelige Klasse , Skrifter* **39**: 23-31.
- Ravenna P. 2000.** Revisional studies in the genus *Sisyrrinchium* (Iridaceae) VI. *Onira Leaflets* **5**(4): 13-19.
- Ravenna P. 2001a.** Revisional studies in the genus *Sisyrrinchium* (Iridaceae) VII. *Onira Leaflets* **5**(12): 54-61.
- Ravenna P. 2001b.** The Iridaceae of the Cuyo region Argentina. *Onira Leaflets* **6**(1): 1-18.
- Ravenna P. 2002.** Revisional studies in the genus *Sisyrrinchium* (Iridaceae) IX. *Onira Leaflets* **7**(6): 20-41.
- Ravenna P. 2003a.** Revisional studies in the genus *Sisyrrinchium* (Iridaceae) X. *Onira Leaflets* **8**(6): 20-24.
- Ravenna P. 2003b.** Revisional studies in the genus *Sisyrrinchium* (Iridaceae) XI. *Onira Leaflets* **8**(13): 48-54.
- Renner SS, Schaefer H. 2010.** The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **365**: 423--435.
- Rieseberg LH, Willis JH. 2007.** Plant speciation. *Science* **317**: 910-914.

Ronquist F. 1996. DIVA version 1.1, distributed by the author, website:

<http://www.ebc.uu.se/systzoo/research/diva/diva.html>

Ronquist F. 1997. Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* **46**(1): 195-203.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**(12):1572-1574.

Rudall P, Kenton AY, Lawrence TJ. 1986. An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied general. *Botanical Gazette* **147**(4): 466-477.

Schlindwein C. 1998. Frequent oligolecty characterizing a diverse bee-plant community in a xerophytic bushland of subtropical Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **33**(1): 46-59.

Schluter D, Price T, Mooers AO, Ludwig D. 1997. Likelihood of ancestor states in adaptive radiation. *Evolution* **51**: 1699-1711.

Shaw J, Lickey EB, Beck JT, et al. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **92**(1): 142-166.

Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* **94**(3): 275-288.

Silvera K. 2002. Adaptive radiation of oil-reward compound among Neotropical orchid species (Oncidiinae). MSc Thesis, University of Florida, USA.

Simpson BB, Neff JL. 1981. Floral rewards: Alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 301-322.

Simmons MP, Ochoterena H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* **49**(2): 369-381.

Starr JF, Naczi RFC, Chouinard BN. 2009. Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (Carex, Cyperaceae). *Molecular Ecology Resources* **9**: 151-163.

Steffan-Dewenter I, Klein AM, Gaebele V, Alfert T, Tschardt T. 2006. Bee diversity and plant-pollinator interactions in fragmented landscapes. In: Waser NM, Ollerton J, eds.

Plant-Pollinator Interactions: from Specialisation to Generalisation. University of Chicago Press, London, UK, 387-407.

Steiner KE, Whitehead VB. 2002. Oil secretion and the pollination of *Colpias mollis* (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution* **235**: 53-66.

Swofford DL. 2002. *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*, beta version 4.0. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.

Vogel S. 1969. Flowers offering fatty oil instead of nectar. In Starr RC, ed. *XI International Botanical Congress: proceedings*. University of Washington, Seattle, Washington D.C., USA, 229.

Vogel S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Abhandlungen Akademie Wissenschaften Mathematisch-Naturwissenschaften Klasse, Tropische und Subtropische Pflanzenwelt* **7**: 1-267.

Vogel S. 2009. The non-African oil-flowers and their bees: A brief survey. SAAB Annual Meeting Abstract. *South African Journal of Botany* **75**(2): 389-390.

Wang RJ, Cheng CL, Chang CC, Wu CL, Tu TM, Chaw SM. 2008. Dynamics and evolution of the inverted repeat-large single copy junction in the chloroplast genomes of monocots. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 36.

Waser NM. 2006. Specialization and generalization in plant-pollinator interactions: a historical perspective. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-Pollinator Interactions: from Specialisation to Generalisation*. University of Chicago Press, London, UK, 3-17.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of Fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academy Press Inc., San Diego, USA, 315-322.

Yang Z, Rannala B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* **14**(7): 717-724.

Young ND, Healy J. 2003. GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 4: 6.

APPENDIX 1

Taxa (identification number), geographic origin (specimens cultivated in the greenhouse at Université Paris-Sud 11 or elsewhere are noted after the geographic origin information), vouchers (voucher specimens are deposited in the following herbaria: Universidade Federal do Rio Grande do Sul = ICN, Université Paris-Sud = UPS. Thirteen samples are only cultivated in the R. & E. Heaton NCCPG *Sisyrinchium* collection without voucher deposited), and GenBank accession number (*rpoC1*, *rpoB*, *matK*, *trnH-psbA*, *trnQ-rps16*, *nad1-2/3*, *nad4-1/2*, ITS). Names in parentheses are names that are not accepted by the world Checklist of Monocots (Barker, 2004). “na” indicates no sequence available for the accession.

Species; Geographic origin; *Voucher* (Herbarium); Genbank accessions: *rpoC1*, *rpoB*, *matK*, *trnH-psbA*, *trnQ-rps16*, *nad1-2/3*, *nad4-1/2*, ITS.

Orthrosanthus monadelphus Ravenna (SP174); Mexico: Oaxaca (cultivated); *Chauveau & Pautz H09049* (UPS); HQ606558, HQ606668, HQ606778, HQ606888, HQ606998, HQ607216, HQ607326, na. *Solenomelus pedunculatus* (Gillies ex Hook.) Hochr. (SP221); Chile: Region V (cultivated); *Chauveau H09044* (UPS); HQ606679, HQ606789, HQ606899, HQ607009, HQ607227, HQ607337, HQ607117. *Solenomelus segethi* (Phil.) Kuntze (SP005); Argentina: Neuquen; *Chauveau & Aubert H09001* (ICN); HQ606486, HQ606596, HQ606706, HQ606816, HQ606926, HQ607144, HQ607254, HQ607036. *Olsynium biflorum* (Thunb.) Goldblatt (SP006); Argentina: Santa Cruz (cultivated); R. & E. Heaton OLS100.03 (living collection); HQ606487, HQ606597, HQ606707, HQ606817, HQ606927, HQ607145, HQ607255, HQ607037. *Olsynium douglasii* (A.Dietr.) E.P.Bicknell (SP007); Canada: British Columbia (cultivated); R. & E. Heaton OLS100.02 (living collection); HQ606488, HQ606598, HQ606708, HQ606818, HQ606928, HQ607146, HQ607256, na. *Olsynium junceum* (E.Mey. ex C.Presl) Goldblatt (SP191); Argentina: Chubut; *Chauveau & Aubert H09026* (ICN); HQ606568, HQ606678, HQ606788, HQ606898, HQ607008, HQ607226, HQ607336, HQ607116. *Olsynium junceum* (E.Mey. ex C.Presl) Goldblatt (SP837); Argentina: Mendoza; *Chauveau & Aubert H09050* (ICN); HQ606593, HQ606703, HQ606813, HQ606923, HQ607033, HQ607251, HQ607361, HQ607141. *Olsynium junceum* ssp. *colchaguense* (Phil.) J.M.Watson & A.R.Flores (SP838); Argentina: Rio Negro;

Chauveau & Aubert H09051 (ICN); HQ606594, HQ606704, HQ606814, HQ606924, HQ607034, HQ607252, HQ607362, HQ607142. *Olsynium scirpoideum* (Poepp.) Goldblatt (SP009); Chile: Region Metropolitana (cultivated); *R. & E. Heaton OLS104.17* (living collection); HQ606489, HQ606599, HQ606709, HQ606819, HQ606929, HQ607147, HQ607257, HQ607038. *Sisyrrinchium acre* H.Mann (SP010); USA: Hawaii (cultivated); *Chauveau & Heaton H09053* (UPS); HQ606490, HQ606600, HQ606710, HQ606820, HQ606930, HQ607148, HQ607258, HQ607039. (*Sisyrrinchium alatum* Hook.) (SP100); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 232* (ICN); HQ606536, HQ606646, HQ606756, HQ606866, HQ606976, HQ607194, HQ607304, HQ607085. *Sisyrrinchium angustifolium* Mill. (SP014); USA (cultivated); *Chauveau H09002* (ICN); HQ606491, HQ606601, HQ606711, HQ606821, HQ606931, HQ607149, HQ607259, HQ607040. *Sisyrrinchium angustissimum* (B.L.Rob. & Greenm.) Greenm. & C.H.Thomps. (SP032); Guatemala (cultivated); *Chauveau H09008* (UPS); HQ606502, HQ606612, HQ606722, HQ606832, HQ606942, HQ607160, HQ607270, HQ607051. *Sisyrrinchium arenarium* Poepp. (SP819); Chile: Region VII (cultivated); *Chauveau H09047* (UPS); HQ606589, HQ606699, HQ606809, HQ606919, HQ607029, HQ607247, HQ607357, HQ607137. *Sisyrrinchium arizonicum* Rothr. (SP236); USA (cultivated); *Chauveau H09032* (UPS); HQ606577, HQ606687, HQ606797, HQ606907, HQ607017, HQ607235, HQ607345, HQ607125. *Sisyrrinchium avenaceum* Klatt (SP018); Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 280* (ICN); HQ606494, HQ606604, HQ606714, HQ606824, HQ606934, HQ607152, HQ607262, HQ607043. *Sisyrrinchium balansae* Baker (SP141); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 364* (ICN); HQ606548, HQ606658, HQ606768, HQ606878, HQ606988, HQ607206, HQ607316, HQ607097. *Sisyrrinchium bellum* S.Watson (SP019); USA: California (cultivated); *Eggers, Chauveau & Heaton H09055* (UPS); HQ606495, HQ606605, HQ606715, HQ606825, HQ606935, HQ607153, HQ607263, HQ607044. *Sisyrrinchium* aff. *bellum* S.Watson (SP020); USA (cultivated); *Chauveau H09005* (UPS); HQ606496, HQ606606, HQ606716, HQ606826, HQ606936, HQ607154, HQ607264, HQ607045. *Sisyrrinchium bermudiana* L. (SP021); Bermuda (cultivated); *R. & E. Heaton SIS156.00* (living collection); HQ606497, HQ606607, HQ606717, HQ606827, HQ606937, HQ607155, HQ607265, HQ607046. (*Sisyrrinchium brachypus* (E.P.Bicknell) J.K.Henry) (SP023); USA: California (cultivated); *R. & E. Heaton SIS102.01* (living collection); HQ606499, HQ606609, HQ606719, HQ606829, HQ606939, HQ607157, HQ607267, HQ607048. *Sisyrrinchium brasiliense* (Ravenna) Ravenna (SP147); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 379* (ICN); HQ606550, HQ606660, HQ606770, HQ606880, HQ606990,

HQ607208, HQ607318, HQ607099. *Sisyrinchium bromelioides* R.C.Foster ssp. *bromelioides* (SP163); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 410* (ICN); HQ606556, HQ606666, HQ606776, HQ606886, HQ606996, HQ607214, HQ607324, HQ607105. (*Sisyrinchium* cf. *burchellii* Baker) (SP138); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 361* (ICN); HQ606547, HQ606657, HQ606767, HQ606877, HQ606987, HQ607205, HQ607315, HQ607096. *Sisyrinchium caeteanum* Ravenna (SP102); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 224* (ICN); HQ606537, HQ606647, HQ606757, HQ606867, HQ606977, HQ607195, HQ607305, HQ607086. *Sisyrinchium californicum* (Ker Gawl.) Dryand.(SP022); USA (cultivated); *Chauveau H09006* (ICN); HQ606498, HQ606608, HQ606718, HQ606828, HQ606938, HQ607156, HQ607266, HQ607047. *Sisyrinchium* aff. *californicum* (Ker Gawl.) Dryand. (SP809); Mexico (cultivated); *Eggers, Chauveau & Heaton H09040* (ICN); HQ606584, HQ606694, HQ606804, HQ606914, HQ607024, HQ607242, HQ607352, HQ607132. *Sisyrinchium campestre* E.P.Bicknell (SP234); USA (cultivated); *Chauveau H09030* (UPS); HQ606575, HQ606685, HQ606795, HQ606905, HQ607015, HQ607233, HQ607343, HQ607123. *Sisyrinchium chapelcoense* Ravenna (SP017); Argentina: Neuquen; *Chauveau & Aubert H09004* (ICN); HQ606493, HQ606603, HQ606713, HQ606823, HQ606933, HQ607151, HQ607261, HQ607042. *Sisyrinchium chilense* Hook. (SP238); Peru: Apurimac (cultivated); *Eggers, Chauveau & Heaton H09054* (UPS); HQ606579, HQ606689, HQ606799, HQ606909, HQ607019, HQ607237, HQ607347, HQ607127. *Sisyrinchium claritae* Herter (SP028); Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 267* (ICN); HQ606500, HQ606610, HQ606720, HQ606830, HQ606940, HQ607158, HQ607268, HQ607049. *Sisyrinchium commutatum* Klatt ssp. *commutatum* (SP031); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 245* (ICN); HQ606501, HQ606611, HQ606721, HQ606831, HQ606941, HQ607159, HQ607269, HQ607050. (*Sisyrinchium commutatum* ssp. *capillare* (Baker) Ravenna) (SP133); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 351* (ICN); HQ606545, HQ606655, HQ606765, HQ606875, HQ606985, HQ607203, HQ607313, HQ607094. *Sisyrinchium convallium* Ravenna (SP232); Argentina: Chubut; *Chauveau & Aubert H09028* (ICN); HQ606573, HQ606683, HQ606793, HQ606903, HQ607013, HQ607231, HQ607341, HQ607121. *Sisyrinchium convolutum* Nocca (SP108); Mexico: Mexico (cultivated); *Eggers, Chauveau & Heaton H09019* (UPS); HQ606538, HQ606648, HQ606758, HQ606868, HQ606978, HQ607196, HQ607306, HQ607087. *Sisyrinchium cuspidatum* Poepp. (SP038); Chile: Region IV (cultivated); *Eggers, Chauveau & Aubert H09011* (ICN); HQ606505, HQ606615, HQ606725, HQ606835, HQ606945, HQ607163, HQ607273, HQ607054. *Sisyrinchium demissum* Greene (SP034); USA: Arizona; *Chauveau H09009* (ICN);

HQ606503, HQ606613, HQ606723, HQ606833, HQ606943, HQ607161, HQ607271, HQ607052. *Sisyrinchium densiflorum* Ravenna (SP119); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 321* (ICN); HQ606540, HQ606650, HQ606760, HQ606870, HQ606980, HQ607198, HQ607308, HQ607089. *Sisyrinchium elmeri* Greene (SP813); USA: California (cultivated); *Chauveau & Heaton H09042* (UPS); HQ606586, HQ606696, HQ606806, HQ606916, HQ607026, HQ607244, HQ607354, HQ607134. (*Sisyrinchium fasciculatum* Klatt) (SP152); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 391* (ICN); HQ606552, HQ606662, HQ606772, HQ606882, HQ606992, HQ607210, HQ607320, HQ607101. *Sisyrinchium fiebrigii* I.M.Johnst. (SP121); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 325* (ICN); HQ606541, HQ606651, HQ606761, HQ606871, HQ606981, HQ607199, HQ607309, HQ607090. (*Sisyrinchium* aff. *flaccidum* E.P.Bicknell) (SP817); USA (cultivated); *Eggers, Chauveau & Heaton H09043* (ICN); HQ606588, HQ606698, HQ606808, HQ606918, HQ607028, HQ607246, HQ607356, HQ607136. *Sisyrinchium funereum* E.P.Bicknell (SP035); USA: California (cultivated); *R. & E. Heaton SIS126.00* (living collection); HQ606504, HQ606614, HQ606724, HQ606834, HQ606944, HQ607162, HQ607272, HQ607053. *Sisyrinchium graminifolium* Lindl. (SP183); Chile: Region VII (cultivated); *Eggers & Chauveau H09024* (UPS); HQ606563, HQ606673, HQ606783, HQ606893, HQ607003, HQ607221, HQ607331, HQ607111. *Sisyrinchium* aff. *graminifolium* Lindl. (SP821); Chile: Region V (cultivated); *Chauveau H09046* (UPS); HQ606590, HQ606700, HQ606810, HQ606920, HQ607030, HQ607248, HQ607358, HQ607138. *Sisyrinchium* aff. *graminifolium* Lindl. (SP826); Chile: Region IV (cultivated); *Chauveau H09045* (UPS); HQ606591, HQ606701, HQ606811, HQ606921, HQ607031, HQ607249, HQ607359, HQ607139. *Sisyrinchium hasslerianum* Baker (SP146); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 377* (ICN); HQ606549, HQ606659, HQ606769, HQ606879, HQ606989, HQ607207, HQ607317, HQ607098. *Sisyrinchium hoehnei* I.M.Johnst. (SP135); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 355* (ICN); HQ606546, HQ606656, HQ606766, HQ606876, HQ606986, HQ607204, HQ607314, HQ607095. *Sisyrinchium idahoense* E.P.Bicknell (SP040); USA: California (cultivated); *R. & E. Heaton SIS183.00* (living collection); HQ606506, HQ606616, HQ606726, HQ606836, HQ606946, HQ607164, HQ607274, HQ607055. *Sisyrinchium idahoense* var. *macounii* (E.P.Bicknell) Douglass M.Hend. (SP041); USA (cultivated); *R. & E. Heaton SIS180.01* (living collection); HQ606507, HQ606617, HQ606727, HQ606837, HQ606947, HQ607165, HQ607275, HQ607056. *Sisyrinchium jamesonii* Baker (SP237); Peru: Apumirac (cultivated); *Chauveau & Heaton H09052* (UPS); HQ606578, HQ606688, HQ606798, HQ606908, HQ607018, HQ607236, HQ607346, HQ607126. *Sisyrinchium laxum* Otto ex Sims (SP049); Argentina:

Neuquen; *Chauveau & Aubert H09014* (ICN); HQ606510, HQ606620, HQ606730, HQ606840, HQ606950, HQ607168, HQ607278, HQ607059. *Sisyrinchium littorale* Greene (SP042); Canada (cultivated); *Chauveau H09012* (ICN); HQ606508, HQ606618, HQ606728, HQ606838, HQ606948, HQ607166, HQ607276, HQ607057. *Sisyrinchium longipes* (E.P.Bicknell) Kearney & Peebles (SP181); USA (cultivated); *Chauveau H09023* (ICN); HQ606562, HQ606672, HQ606782, HQ606892, HQ607002, HQ607220, HQ607330, HQ607110. *Sisyrinchium luzula* Klotzsch ex Klatt (SP128); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 341* (ICN); HQ606543, HQ606653, HQ606763, HQ606873, HQ606983, HQ607201, HQ607311, HQ607092. *Sisyrinchium* cf. *macranthum* Griseb. (SP239); Argentina (cultivated); *R. & E. Heaton SIS900.166* (living collection); HQ606580, HQ606690, HQ606800, HQ606910, HQ607020, HQ607238, HQ607348, HQ607128. *Sisyrinchium macrocarpum* Hieron. ssp. *macrocarpum* (SP046); Argentina (cultivated); *Chauveau H09013* (UPS); HQ606509, HQ606619, HQ606729, HQ606839, HQ606949, HQ607167, HQ607277, HQ607058. (*Sisyrinchium macrocarpum* ssp. *laetum* Ravenna – unplaced name) (SP235); Argentina (cultivated); *Chauveau H09031* (UPS); HQ606576, HQ606686, HQ606796, HQ606906, HQ607016, HQ607234, HQ607344, HQ607124. *Sisyrinchium macrophyllum* Greenm. (SP050); Mexico: Mexico (cultivated); *Chauveau & Heaton H09015* (UPS); HQ606511, HQ606621, HQ606731, HQ606841, HQ606951, HQ607169, HQ607279, HQ607060. *Sisyrinchium mandonii* Baker (SP807); Venezuela (cultivated); *Chauveau & Heaton H09039* (ICN); HQ606583, HQ606693, HQ606803, HQ606913, HQ607023, HQ607241, HQ607351, HQ607131. (*Sisyrinchium marchio* (Vell.) Steud.) (SP161); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 407* (ICN); HQ606555, HQ606665, HQ606775, HQ606885, HQ606995, HQ607213, HQ607323, HQ607104. *Sisyrinchium* cf. *marchioides* Ravenna (SP160); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 406* (ICN); HQ606554, HQ606664, HQ606774, HQ606884, HQ606994, HQ607212, HQ607322, HQ607103. *Sisyrinchium megapotamicum* Malme (SP052); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 236* (ICN) ; HQ606512, HQ606622, HQ606732, HQ606842, HQ606952, HQ607170, HQ607280, HQ607061. *Sisyrinchium miamense* E.P.Bicknell (SP053); USA: Florida (cultivated); *R. & E. Heaton SIS176.00* (living collection); HQ606513, HQ606623, HQ606733, HQ606843, HQ606953, HQ607171, HQ607281, HQ607062. *Sisyrinchium micranthum* Cav. (SP839); Uruguay: Colonia; *Chauveau & Aubert H09052* (ICN); HQ606595, HQ606705, HQ606815, HQ606925, HQ607035, HQ607253, HQ607363, HQ607143. *Sisyrinchium micranthum* Cav. Type B (SP190); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 251* (ICN); HQ606567, HQ606677, HQ606787, HQ606897, HQ607007,

HQ607225, HQ607335, HQ607115. *Sisyrinchium micranthum* Cav. Type BY (SP186); Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 266-F (ICN)*; HQ606565, HQ606675, HQ606785, HQ606895, HQ607005, HQ607223, HQ607333, HQ607113. *Sisyrinchium micranthum* Cav. Type GL (SP060); Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 261-K (ICN)*; HQ606517, HQ606627, HQ606737, HQ606847, HQ606957, HQ607175, HQ607285. *Sisyrinchium micranthum* Cav. Type LLP (SP062); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 234 (ICN)*; HQ606518, HQ606628, HQ606738, HQ606848, HQ606958, HQ607176, HQ607286, HQ607067. *Sisyrinchium micranthum* Cav. Type LLY (SP059); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 244-E (ICN)*; HQ606516, HQ606626, HQ606736, HQ606846, HQ606956, HQ607174, HQ607284, HQ607065. *Sisyrinchium micranthum* Cav. Type LLY (SP056); Mexico, Chiapas (cultivated); *Chauveau & Heaton H09054 (UPS)*; HQ606515, HQ606625, HQ606735, HQ606845, HQ606955, HQ607173, HQ607283, HQ607064. *Sisyrinchium micranthum* Cav. Type S (SP189); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 229-A (ICN)*; HQ606566, HQ606676, HQ606786, HQ606896, HQ607006, HQ607224, HQ607334, HQ607114. *Sisyrinchium micranthum* Cav. Type T (SP054); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 242-A (ICN)*; HQ606514, HQ606624, HQ606734, HQ606844, HQ606954, HQ607172, HQ607282, HQ607063. *Sisyrinchium minus* Engelm. & A.Gray (SP063); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 230 (ICN)*; HQ606519, HQ606629, HQ606739, HQ606849, HQ606959, HQ607177, HQ607287, HQ607068. *Sisyrinchium minutiflorum* Klatt (SP066); Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 285 (ICN)*; HQ606520, HQ606630, HQ606740, HQ606850, HQ606960, HQ607178, HQ607288, HQ607069. *Sisyrinchium montanum* Greene (SP068); Canada: British Columbia (cultivated); *R. & E. Heaton SIS114.02* (living collection); HQ606521, HQ606631, HQ606741, HQ606851, HQ606961, HQ607179, HQ607289, HQ607070. *Sisyrinchium nashii* E.P.Bicknell (SP233); unknown origin, cultivated in UPS Bot. Gard.; *Chauveau H09029 (ICN)*; HQ606574, HQ606684, HQ606794, HQ606904, HQ607014, HQ607232, HQ607342, HQ607122. (*Sisyrinchium* cf. *nervosum* Phil.) (SP016); Argentina: Neuquen; *Chauveau & Aubert H09003 (ICN)*; HQ606492, HQ606602, HQ606712, HQ606822, HQ606932, HQ607150, HQ607260, HQ607041. *Sisyrinchium nidulare* (Hand.-Mazz.) I.M.Johnst. (SP071); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 240 (ICN)*; HQ606522, HQ606632, HQ606742, HQ606852, HQ606962, HQ607180, HQ607290, HQ607071. *Sisyrinchium ostenianum* Beauverd (SP170); Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 434 (ICN)*; HQ606557, HQ606667, HQ606777, HQ606887, HQ606997, HQ607215, HQ607325, HQ607106. *Sisyrinchium pachyrhizum* Baker (SP073); Brazil: Rio

Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 281* (ICN); HQ606523, HQ606633, HQ606743, HQ606853, HQ606963, HQ607181, HQ607291, HQ607072. *Sisyrinchium palmifolium* L. ssp. *palmifolium* (SP175); unknown origin, cultivated in UPS Bot. Gard.; *Chauveau H09020* (UPS); HQ606559, HQ606669, HQ606779, HQ606889, HQ606999, HQ607217, HQ607327, HQ607107. *Sisyrinchium palmifolium* ssp. *fuscoviride* (Ravenna) Ravenna (SP076); Argentina (cultivated); R. & E. Heaton *SIS199.00* (living collection); HQ606524, HQ606634, HQ606744, HQ606854, HQ606964, HQ607182, HQ607292, HQ607073. *Sisyrinchium papillosum* R.C.Foster (SP249); Chile (cultivated); *Chauveau H09037* (ICN); HQ606582, HQ606692, HQ606802, HQ606912, HQ607022, HQ607240, HQ607350, HQ607130. *Sisyrinchium parvifolium* Baker (SP224); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 237-C* (ICN); HQ606571, HQ606681, HQ606791, HQ606901, HQ607011, HQ607229, HQ607339, HQ607119. *Sisyrinchium patagonicum* Phil. ex Baker (SP223); Chile (cultivated); *Chauveau H09027* (ICN); HQ606570, HQ606680, HQ606790, HQ606900, HQ607010, HQ607228, HQ607338, HQ607118. *Sisyrinchium pearcei* Phil. (SP180); Chile: Region IX (cultivated); *Chauveau H09022* (ICN); HQ606561, HQ606671, HQ606781, HQ606891, HQ607001, HQ607219, HQ607329, HQ607109. *Sisyrinchium platense* I.M.Johnst. (SP084); Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 187* (ICN); HQ606526, HQ606636, HQ606746, HQ606856, HQ606966, HQ607184, HQ607294, HQ607075. *Sisyrinchium pruinosum* E.P.Bicknell (SP816); USA: Texas (cultivated); *Eggers, Chauveau & Heaton H09048* (UPS); HQ606587, HQ606697, HQ606807, HQ606917, HQ607027, HQ607245, HQ607355, HQ607135. *Sisyrinchium purpurellum* ssp. *trichospathum* Ravenna (SP132); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 350* (ICN); HQ606544, HQ606654, HQ606764, HQ606874, HQ606984, HQ607202, HQ607312, HQ607093. *Sisyrinchium rambonis* R.C.Foster (SP835); Brazil: Rio Grande do Sul; *Eggers & Souza-Chies 571* (ICN); HQ606592, HQ606702, HQ606812, HQ606922, HQ607032, HQ607250, HQ607360, HQ607140. *Sisyrinchium rectilineum* Ravenna (SP123); Brazil: Paraná; *Eggers & Souza-Chies 332* (ICN); HQ606542, HQ606652, HQ606762, HQ606872, HQ606982, HQ607200, HQ607310, HQ607091. *Sisyrinchium restioides* Spreng. (SP097); Brazil: Santa Catarina; *Eggers & Souza-Chies 252* (ICN); HQ606534, HQ606644, HQ606754, HQ606864, HQ606974, HQ607192, HQ607302, HQ607083. *Sisyrinchium rosulatum* E.P.Bicknell (SP085); USA: Georgia (cultivated); *ICN 187084* (ICN); HQ606527, HQ606637, HQ606747, HQ606857, HQ606967, HQ607185, HQ607295, HQ607076. *Sisyrinchium sarmentosum* Suksd. ex Greene (SP086); USA (cultivated); *Chauveau H09017* (ICN); HQ606528, HQ606638, HQ606748, HQ606858, HQ606968, HQ607186, HQ607296,

HQ607077. *Sisyrinchium scabrum* Schltl. & Cham. (SP088); cultivated (material provided by the Royal Botanic Gardens, Kew - 05259); R. & E. Heaton SIS114.02 (living collection); HQ606530, HQ606640, HQ606750, HQ606860, HQ606970, HQ607188, HQ607298, HQ607079. *Sisyrinchium scariosum* I.M.Johnst. (SP087); Brazil: Rio Grande do Sul; Eggers & Souza-Chies 277 (ICN); HQ606529, HQ606639, HQ606749, HQ606859, HQ606969, HQ607187, HQ607297, HQ607078. *Sisyrinchium sellowianum* Klatt (SP091); Brazil: Santa Catarina; Eggers & Souza-Chies 253 (ICN); HQ606531, HQ606641, HQ606751, HQ606861, HQ606971, HQ607189, HQ607299, HQ607080. *Sisyrinchium setaceum* Klatt (SP092); Brazil: Rio Grande do Sul; Eggers & Souza-Chies 214 (ICN); HQ606532, HQ606642, HQ606752, HQ606862, HQ606972, HQ607190, HQ607300, HQ607081. *Sisyrinchium soboliferum* Ravenna (SP148); Brazil: Paraná; Eggers & Souza-Chies 381 (ICN); HQ606551, HQ606661, HQ606771, HQ606881, HQ606991, HQ607209, HQ607319, HQ607100. *Sisyrinchium striatum* Sm. (SP095); Chile (cultivated); Chauveau H09018 (ICN); HQ606533, HQ606643, HQ606753, HQ606863, HQ606973, HQ607191, HQ607301, HQ607082. *Sisyrinchium* aff. *strictum* E.P.Bicknell (SP811); USA (cultivated); Chauveau & Heaton H09041 (UPS); HQ606585, HQ606695, HQ606805, HQ606915, HQ607025, HQ607243, HQ607353, HQ607133. *Sisyrinchium tenuifolium* Humb. & Bonpl. ex Willd. (SP184); Mexico: Veracruz (cultivated); Chauveau & Pautz H09025 (ICN); HQ606564, HQ606674, HQ606784, HQ606894, HQ607004, HQ607222, HQ607332, HQ607112. *Sisyrinchium tinctorium* Kunth (SP240); Ecuador (cultivated); Chauveau & Heaton H09034 (ICN); HQ606581, HQ606691, HQ606801, HQ606911, HQ607021, HQ607239, HQ607349, HQ607129. *Sisyrinchium* aff. *tinctorium* Kunth (SP179); cultivated in UPS Bot. Gard. (material provided by MNHN Bot. Gard. 46620); Eggers & Chauveau H09021 (UPS); HQ606560, HQ606670, HQ606780, HQ606890, HQ607000, HQ607218, HQ607328, HQ607108. *Sisyrinchium uliginosum* Ravenna (SP154); Brazil: Paraná; Eggers & Souza-Chies 393 (ICN); HQ606553, HQ606663, HQ606773, HQ606883, HQ606993, HQ607211, HQ607321, HQ607102. *Sisyrinchium vaginatum* Spreng. ssp. *vaginatum* (SP226); Brazil: Rio Grande do Sul; Eggers & Souza-Chies 263 (ICN); HQ606572, HQ606682, HQ606792, HQ606902, HQ607012, HQ607230, HQ607340, HQ607120. *Sisyrinchium* cf. *valparadiseum* Ravenna (SP082); Argentina, Rio Negro; Chauveau & Aubert H09016 (ICN); HQ606525, HQ606635, HQ606745, HQ606855, HQ606965, HQ607183, HQ607293, HQ607074. *Sisyrinchium weirii* Baker (SP099); Brazil: Paraná; Eggers & Souza-Chies 248 (ICN); HQ606535, HQ606645, HQ606755, HQ606865, HQ606975, HQ607193, HQ607303, HQ607084. *Sisyrinchium wettsteinii* Hand.-Mazz. (SP115); Brazil: Santa Catarina; Eggers &

1.1. Détail des informations supplémentaires utilisées dans l'article 2

Les tableaux et figures constituant les informations supplémentaires citées dans l'article sont présentés en annexe 2.

1.2. Résumé des principaux résultats de l'article 2

1.2.1. Phylogénie moléculaire

La phylogénie moléculaire produite dans le cadre de cette étude confirme la monophylie du genre *Sisyrrinchium* ainsi que la position relative des genres *Olsynium* et *Solenomelus*. Neuf clades majeurs ont été identifiés au sein du genre *Sisyrrinchium*, remettant en cause les subdivisions infragénériques proposées antérieurement.

1.2.2. Histoire évolutive des trichomes glandulaires

La reconstruction de l'histoire évolutive des trichomes glandulaires floraux indique sans ambiguïté que leur présence sur la colonne filamentaire et/ou sur la face adaxiale des tépales de plus de 60% des espèces incluses dans l'étude est dérivée à l'intérieur du genre *Sisyrrinchium*. Elle résulte probablement de trois transitions indépendantes, deux d'entre elles ayant conduit à l'apparition d'élaïophores de type trichomes au sein de clades dont la richesse spécifique remarquable pourrait indiquer que ces structures glandulaires ont joué un rôle majeur dans la diversification du genre.

1.2.3. Biogéographie du genre *Sisyrrinchium*

Bien que l'aire d'origine du genre *Sisyrrinchium* n'ait pu être déterminée précisément, celle-ci s'étendant de l'Amérique Centrale au nord des Andes, deux événements majeurs de dispersion ont été identifiés. Ces deux zones de dispersion se situent en Amérique du Sud, l'une couvrant le bassin versant du fleuve Paraná en incluant le nord de l'Argentine, le sud du Brésil, le Paraguay et l'Uruguay, alors que la seconde s'étend la long de la chaîne montagneuse des Andes entre l'Argentine et le Chili. Les deux transitions ayant conduit à l'apparition des élaïophores au sein du genre sont associées à ces changements biogéographiques et écologiques majeurs.

1.3. Variation du taux de diversification au sein du genre *Sisyrinchium*

Afin d'évaluer la valeur des hypothèses émises dans le cadre de l'article 2 concernant l'importance du rôle joué par l'acquisition des élaïophores dans la diversification du genre *Sisyrinchium* sur le continent américain, les deux méthodes d'estimation de l'évolution du taux de diversification au sein de la phylogénie précédemment mises en œuvre à l'échelle des Iridoideae (cf. article 1 - Materials and methods: *Detection of differential diversification rates*) ont été utilisées. L'objectif de ces méthodes d'estimation est de mettre en évidence l'existence éventuelle de variations au sein de la phylogénie, et d'évaluer l'impact de la présence des trichomes glandulaires floraux (caractère A), et plus particulièrement des élaïophores (caractère B), sur la diversification du genre *Sisyrinchium*.

1.3.1. Résultats

L'ensemble des six méthodes d'analyse statistique implémentées dans SymmeTREE indiquent pour chacune des phylogénies testées l'existence d'au moins un changement significatif du taux de diversification à l'intérieur du genre *Sisyrinchium* (Tableau 6).

Tableau 6. Detection of diversification rate variations among the genus *Sisyrinchium* using the SymmeTREE software. Uncertainties associated with polytomies within the strict consensus tree (MP analysis) and the 50 % majority rule (MR) consensus tree (Bayesian analysis) were assessed by generating 100 000 random resolutions under the TSS ERM algorithm, providing upper and lower bounds on the confidence interval. These 'high' and 'low' asymmetry values correspond to the tail probabilities for the .025 and .975 frequentiles, respectively. The sensitivity of the whole-tree statistics to large-scale diversification rate variation decreases to the right across a given row (i.e., $I_c > M_{\pi}^* > M_{\pi} > M_{\Sigma}^* > M_{\Sigma} > B_1$).

<u>Fully resolved tree</u>	I_c	M_{π}^*	M_{π}	M_{Σ}^*	M_{Σ}	B_1
ML best-scoring tree	< 0.000001	<u>< 0.000001</u>	<u>< 0.000001</u>	<u>< 0.000001</u>	<u>< 0.000001</u>	<u>0.00106</u>
<u>Tree with polytomies</u>	I_c	M_{π}^*	M_{π}	M_{Σ}^*	M_{Σ}	B_1
	high	high	high	high	high	high
	low	low	low	low	low	low
Strict consensus tree (MP)	<u>0,00001</u>	<u>0,00002</u>	<u>0,00008</u>	<u>0,00003</u>	<u>0,00011</u>	<u>0,00372</u>
MR consensus tree (Bayesian analysis)	<u>0,00006</u>	<u>0,00079</u>	<u>0,00675</u>	<u>0,00220</u>	<u>0,02610</u>	0,21537
MR consensus tree (Bayesian analysis)	<u>0,00002</u>	<u>0,00004</u>	<u>0,00006</u>	<u>0,00076</u>	<u>0,00105</u>	<u>0,00493</u>
(Bayesian analysis)	<u>0,00014</u>	<u>0,00098</u>	<u>0,00917</u>	<u>0,00271</u>	<u>0,03115</u>	0,26156

Note: significant *P*-values are underlined.

Le fait que les valeurs de probabilités obtenues tendent à croître du test statistique I_c vers le test B_1 (toutes les valeurs de probabilités sont significatives et seules les valeurs du test B_1 sont marginalement significatives dans le cas de l'arbre consensus strict obtenu par la méthode du Maximum de parcimonie et de l'arbre consensus majoritaire obtenu par la méthode Bayésienne) indique qu'il est probable que le ou les changements de taux de diversification se

sont produits à une grande échelle phylogénétique. Le test statistique Δ implémenté dans SymmeTREE et permettant d'identifier la position d'éventuels changements de taux de diversification à l'intérieur de la phylogénie a fourni un soutien significatif (valeur de probabilité = 0,05 pour chacun des arbres) pour l'existence d'un unique changement. Ce dernier se serait produit de manière concomitante avec l'apparition des élaïophores à la base du clade V (cf. Fig. 6 de l'article 2).

Les comparaisons détaillées des différents modèles obtenus par la méthode du Maximum de Vraisemblance BISSE (Maddison et al., 2007) pour les caractères A et B sont récapitulées respectivement dans les Tableaux 7 et 8. Les valeurs des différents paramètres (y compris les taux de diversification nets et les ratios des taux de spéciation/extinction) calculés à partir du meilleur modèle pour les lignées en absence (état de caractère 0) ou en présence (état de caractère 1) de trichomes glandulaires floraux (caractère A) d'une part, et des élaïophores de type trichome (caractère B) d'autre part, sont reportés dans le Tableau 9.

Tableau 7. Comparison of full and constrained ML BISSE analyses for character A (nuptial trichomes) within the genus *Sisyrinchium*. The six BISSE parameters are the speciation rates (λ_0 and λ_1) in absence vs. presence of nuptial trichomes in the lineages, the extinction rates (μ_0 and μ_1), and forward and reverse transition rates (q_{01} and q_{10}). Nested models were compared with likelihood ratio tests with 1 degree of freedom; the comparison is given in the comparison column. *P*-values are bolded when significant ($P \leq 0.05$).

Model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	q_{01}	q_{10}	ln L	Comparison	<i>P</i>
A-1	None	414.43	705.44	349.48	231.34	7.17	51.85	-834.12		
A-2	$\lambda_0 = \lambda_1$	551.58	551.58	499.40	9.00 E-5	3.78	68.44	-832.47	vs. A-1	0.0693
A-3	$\mu_0 = \mu_1$	408.88	756.42	341.28	341.28	8.71	48.29	-834.07	vs. A-1	0.7421
A-4	$q_{10} = q_{01}$	409.80	949.48	319.34	808.91	27.40	27.40	-833.06	vs. A-1	0.1453
A-5	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	677.06	677.06	596.10	596.10	18.78	39.12	-827.40	vs. A-3	0.0002
A-6	$\lambda_0 = \lambda_1, q_{10} = q_{01}$	584.86	584.86	518.09	190.03	9.54	9.54	-826.50	vs. A-3	0.0001
A-7	$\mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	394.34	743.06	315.30	315.30	14.21	14.21	-831.66	vs. A-3	0.0282
A-8	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1,$	677.07	677.07	596.11	596.11	23.96	23.96	-826.67		
A-7	$\mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	394.34	743.06	315.30	315.30	14.21	14.21	-831.66	vs. A-8	0.0015
A-6	$\lambda_0 = \lambda_1, q_{10} = q_{01}$	584.86	584.86	518.09	190.03	9.54	9.54	-826.50	vs. A-8	1
A-5	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	677.06	677.06	596.10	596.10	18.78	39.12	-827.40	vs. A-8	0.2270
A-4	$q_{10} = q_{01}$	409.80	949.48	319.34	808.91	27.40	27.40	-833.06	vs. A-7	0.0942
A-3	$\mu_0 = \mu_1$	408.88	756.42	341.28	341.28	8.71	48.29	-834.07	vs. A-7	0.0281
A-1	None	414.43	705.44	349.48	231.34	7.17	51.85	-834.12	vs. A-3	0.7518

Tableau 8. Comparison of full and constrained ML BISSE analyses for character B (trichomal elaiophores) within the genus *Sisyrinchium*. The six BISSE parameters are the speciation rates (λ_0 and λ_1) in absence vs. presence of trichomal elaiophores in the lineages, the extinction rates (μ_0 and μ_1), and forward and reverse transition rates (q_{01} and q_{10}). Nested models were compared with likelihood ratio tests with 1 degree of freedom; the comparison is given in the comparison column. P -values are bolded when significant ($P \leq 0.05$).

Model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	q_{01}	q_{10}	ln L	Comparison	P
B-1	None	513.76	649.49	453.25	30.70	1.54	120.56	-838.11		
B-2	$\lambda_0 = \lambda_1$	590.89	590.89	535.24	1.96 E-4	1.31	127.75	-831.43	vs. B-1	0.0002
B-3	$\mu_0 = \mu_1$	494.52	844.07	430.21	430.21	2.61	93.09	-837.56	vs. B-1	0.2950
B-4	$q_{10} = q_{01}$	455.07	1225.84	355.87	1148.03	30.55	30.55	-829.13	vs. B-1	< 1E-5
B-5	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	677.07	677.07	596.11	596.11	4.66	75.88	-829.36	vs. B-3	< 1E-5

Model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	q_{01}	q_{10}	ln L	Comparison	P
B-8	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	677.07	677.07	596.11	596.11	23.35	23.35	-819.77		
B-7	$\mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	474.146	777.51	393.06	393.06	14.08	14.08	-822.46	vs. B-8	0.0203
B-6	$\lambda_0 = \lambda_1, q_{10} = q_{01}$	681.18	681.18	594.59	627.50	25.59	25.59	-819.93	vs. B-8	0.5760
B-5	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	677.07	677.07	596.11	596.11	4.66	75.88	-829.36	vs. B-8	< 1E-5
B-3	$\mu_0 = \mu_1$	494.52	844.07	430.21	430.21	2.61	93.09	-837.56	vs. B-5	< 1E-5
B-1	None	513.76	649.49	453.25	30.70	1.54	120.56	-838.11	vs. B-3	0.2435

Tableau 9. Values of the different parameters obtained from the best ML BISSE model for character A (nuptial trichomes) and character B (trichomal elaiophores). Parameters are reported as follow from the left to the right: the speciation rates (λ_0 and λ_1) in absence (state 0) vs. presence (state 1) of nuptial trichomes or trichomal elaiophores in the lineages, the extinction rates (μ_0 and μ_1), the forward and reverse transition rates (q_{01} and q_{10}), the rates of net diversification ($r = \lambda - \mu$) and the speciation/extinction ratios ($a = \lambda/\mu$).

Character A: nuptial trichomes (state 0: absent - state 1: present)									
Best model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	r_0	r_1	a_0	a_1
A-3	$\mu_0 = \mu_1$	408.88	756.42	341.28	341.28	67.60	415.14	1.20	2.21
Character B: trichomal elaiophores (state 0: absent - state 1: present)									
Best model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	r_0	r_1	a_0	a_1
B-3	$\mu_0 = \mu_1$	494.52	844.07	430.21	430.21	64.31	413.86	1.15	1.97

Le meilleur modèle déterminé pour le caractère A comme pour le caractère B est celui pour lequel seuls les taux d'extinction sont contraints à l'égalité entre les deux états de caractère ($\mu_0 = \mu_1$).

1.3.2. Discussion

Les taux de diversification calculés à partir des valeurs des paramètres de speciation et d'extinction du meilleur modèle BISSE indiquent que ce taux est 6,15 fois supérieur au sein des lignées où les trichomes glandulaires se sont développés par rapport à ce que l'on observe au sein des lignées dépourvues de ces structures glandulaires. Les valeurs obtenues pour les

deux états du caractère B (élaïophores de type trichome) montrent elles aussi que le taux de diversification des lignées ayant développées ce type de structure est 6,45 fois supérieur à celui que l'on observe dans celles qui en sont dépourvues. Ces différences importantes indiquent que l'apparition et le développement de ces structures au sein du genre *Sisyrinchium*, et plus particulièrement des élaïophores, a certainement joué un rôle majeur dans la diversification de ce groupe taxonomique sur le continent américain.

Les résultats obtenus grâce à la méthode SymmeTREE, basée sur l'analyse de la topologie de la phylogénie, viennent renforcer ce constat en indiquant non seulement que un ou plusieurs changements de taux de diversification se sont produits au cours de l'évolution du genre *Sisyrinchium*, et que l'un de ces changements s'est produit simultanément avec une des deux apparitions des élaïophores identifiées, à la base d'un clade dont la richesse spécifique est remarquable.

L'ensemble de ces observations vient conforter l'hypothèse émise dans le cadre de l'article 2 quant à l'importance du rôle joué par l'apparition des trichomes glandulaires, et plus particulièrement des élaïophores, au cours de l'histoire évolutive du genre *Sisyrinchium*.

2. Identification des ressources offertes aux pollinisateurs au sein de la tribu des Sisyrinchieae

2.1. Résumé du contexte et des objectifs de l'article 3

Les nectaires et les élaïophores qui sont apparus sur les pièces florales de nombreuses espèces de Sisyrinchieae ont pour particularité d'être localisés essentiellement sur la colonne staminale, alors qu'au sein des autres tribus qui composent la sous-famille des Iridoideae, ces structures sont généralement distribuées sur les tépales. Comprenant plus de 45% de la richesse spécifique connue au sein des trois tribus constituant l'ensemble des espèces d'Iridoideae distribuées dans la région néotropicale et les zones tempérées immédiatement adjacentes, les Sisyrinchieae constituent la plus importante tribu de la famille présente sur le continent américain. Le développement particulièrement important d'élaïophores de type trichome au sein du genre *Sisyrinchium* a certainement joué un rôle prépondérant dans la diversité exceptionnelle observée au sein de ce clade. Néanmoins, la connaissance de ces structures ainsi que de celles susceptibles de fournir d'autres types de ressources aux pollinisateurs reste limitée à l'échelle de la tribu.

Malgré des similitudes développementales importantes, il n'a pas été possible jusque là d'établir s'il existait ou non un lien entre l'évolution des différents types de structures glandulaires identifiées au sein de la tribu. Cette partie de l'étude avait donc pour objectif d'améliorer notre connaissance de ces structures, ainsi que de caractériser l'éventuelle production d'autres ressources pour les pollinisateurs, et non identifiées jusqu'alors. Des observations structurelles ainsi que plusieurs types de tests histochimiques ont été réalisés afin d'identifier et de caractériser les structures glandulaires existantes ainsi que les ressources polliniques éventuellement disponibles au sein des fleurs de plusieurs espèces des genres *Orthrosanthus*, *Sisyrrinchium* et *Solenomelus*.

Ces observations, ainsi que celles disponibles dans la littérature concernant les pollinisateurs et la production de ressources au sein de la tribu, ont été utilisées dans le contexte phylogénétique établi précédemment afin d'apporter de nouvelles informations concernant l'histoire évolutive de ces structures à l'échelle des Sisyrrinchieae.

2.2. Article 3

Original Article

<p>Floral rewards in the tribe Sisyrinchieae (Iridaceae): oil as an alternative to pollen and nectar?</p>
--

Adriano Silvério^{1,2,*,**}, **Olivier Chauveau**^{2,*}, Tatiana T. Souza-Chies¹, Sophie Nadot²

¹*Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, 91501-970, Brazil.*

²*Université Paris-Sud, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR 8079, Orsay, 91405, France*

** These authors have contributed equally to this work and should be considered sharing first authorship.*

*** Corresponding author (e-mail: adriano.silverio@ufrgs.br, telephone: 55 51 3308-7634)*

Cet article est en préparation et sera soumis à la revue *Sexual Plant Reproduction*. Adriano Silvério a collecté les échantillons, effectué le travail de laboratoire, les analyses, et participé à la rédaction de l'article. Olivier Chauveau a réalisé les identifications, participé au travail de laboratoire, aux analyses et réalisé la rédaction de l'article. Tatiana T. Souza-Chies et Sophie Nadot ont initié le projet et participé à la rédaction de l'article.

Abstract

Iridaceae is one of the few families in which floral oils, in addition to pollen and nectar, are produced and collected by pollinators as a resource. In this family, perigonal nectaries and trichomal elaiophores are restricted to the subfamily Iridoideae, the only exception being the perigonal nectaries observed for one species of *Aristea* Aiton (Aristeioideae). Nectaries and elaiophores are highly unusual within the tribe Sisyrinchieae in that both structures occur mainly on the staminal column, while they are usually distributed on the tepals in the other tribes of the subfamily. Sisyrinchieae is the largest tribe of Iridaceae present on the American continent. It includes more than 45 % of the species richness identified among the three mostly New World tribes of the subfamily (Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridieae). The high diversity observed may be related to the exceptional development of trichomal elaiophores within the species rich genus *Sisyrinchium*, but the knowledge concerning the other types of nuptial glandular structures within the tribe is still limited, preventing us to estimate the role played by these structures in species diversification.

Structural observations and histochemical tests were performed to identify and characterize glandular structures and pollen rewards within the flowers of the genera *Orthrosanthus*, *Sisyrinchium* and *Solenomelus*. Among the species studied, perigonal nectaries were detected only in *Solenomelus segethi*, and trichomal elaiophores were characterized only within *Sisyrinchium*. All species showed large amounts of additional resources available for pollinators in the form of pollenkitt and polysaccharides present in the cytoplasm of the pollen grains. The results are discussed in a phylogenetic context, with regard to pollinators and floral rewards reported for the tribe Sisyrinchieae.

Key words: *Orthrosanthus*, perigonal nectaries, pollenkitt, *Sisyrinchium*, *Solenomelus*, trichomal elaiophores.

INTRODUCTION

In flowering plants, resources sought by pollinators are predominantly pollen and nectar, which provide proteins and carbohydrates. However, a handful of families includes species that produce floral oils collected by specialised bees, which use these lipids to feed their larvae and build their nests. Iridaceae is one of the few families including both nectar-producing and oil-producing species, in addition to species providing only pollen as a resource for pollinators. Within Iridaceae, floral oil glands called elaiophores are exclusively observed among the American tribes of Iridoideae, except *Tritoniopsis parviflora* (Jacq.) G.J. Lewis, a species from South Africa belonging to Crocoideae (Goldblatt and Manning, 2008). Oil foraging by specialized oil-collecting bees is a widely exploited pollination strategy in the Neotropics and hundreds of Iridaceae secrete floral oils in the New World (Rudall et al., 2003). Based on the topology of the latest comprehensive phylogeny of the family (Goldblatt et al., 2008), the most parsimonious explanation for the distribution of oil glands is that they evolved once in the common ancestor of the Trimezieae and Tigridae tribes, with at least six reversions, and twice within the genus *Sisyrinchium* L. (Sisyrinchieae) with at least one subsequent reversion (Renner and Schaefer, 2010; Chauveau et al., 2011).

The tribe Sisyrinchieae is sister to the entirely New World tribes Trimezieae and Tigridae. It includes four strictly American genera, namely *Olsynium* Raf. (c. 12 sp.), *Sisyrinchium* (c. 140 sp.), *Solenomelus* Miers (2 sp.) and *Tapinia* Juss. (1 sp.) (Goldblatt et al., 2008; Goldblatt and Manning, 2008), and 13 Australasian species within the genera *Orthrosanthus* Sweet (9 sp.) and *Libertia* Spreng. (16 sp.). *Sisyrinchium*, with more than 77% of the species richness of the tribe is the central genus of Sisyrinchieae. Beside pollen, oils are the second major reward produced by numerous *Sisyrinchium* species (Chauveau et al., 2011). Documented uses of floral lipids by oil collecting bees from the Tapinotaspini tribe (Apidae) show that females mix oils with pollen during their visit and subsequently use this mixture to feed their larvae (Vogel, 1974; Cocucci and Vogel, 2001; Truylio et al., 2002). These floral oils are secreted by trichomal elaiophores distributed either on the staminal column or on the adaxial side of tepals (Cocucci and Vogel, 2001; Chauveau et al., 2011). Except for two species, nuptial trichomes among the genus are always glandular and secretory, but they do not always produce oils, and the secretions of numerous species from Central and North America have not yet been identified (Chauveau et al., 2011). Elaiophores have never been observed in any other genus of the tribe (Goldblatt and Manning, 2008), although nuptial trichomes were identified on the filamental column of *Solenomelus*

pedunculatus (Gillies ex Hook.) Hochr. and multicellular scales covered by secretions are present all along the column of *Solenomelus segethi* (Phil.) Kuntze (Chauveau et al., 2011). Within the tribe, sugar rewards produced by perigonal nectaries are known for only two species of *Olsynium* (*O. junceum* (E.Mey ex Presl) Goldblatt and *O. douglasii* (A.Dietr.) E.P.Bicknell), and nectar is probably secreted from cells of the swollen filamental column (Forcone et al., 1997; Cocucci and Vogel, 2001; Rudall et al., 2003) and not from nuptial trichomes, which are entirely missing in *Olsynium*, *Libertia*, *Orthrosanthus* and *Tapeinia* (Cocucci and Vogel, 2001; Rudall et al., 2003; Chauveau et al., 2011). Since neither elaiophores nor sugar nectaries have been identified within these genera, the only reward offered by their flowers to pollinators is probably the pollen itself (Rudall et al., 2003; Goldblatt and Manning, 2006; Chauveau et al., 2011).

This study aims at identifying and characterizing pollination rewards within the tribe Sisyrinchieae. Floral secretory structures, pollen and pollenkitt contents were investigated intensively for the first time within the genera *Sisyrinchium*, *Solenomelus* and *Orthrosanthus*. The results allowed us to make hypotheses about the evolution of pollination rewards within the whole tribe, in a phylogenetic context.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Fresh flowers at anthesis were collected from plants grown in the botanical garden of the Université Paris-Sud (Table 1) and obtained mostly from seeds collected in the wild. A total of 22 *Sisyrinchium* species covering the different clades proposed in the literature (Chauveau et al., 2011) were sampled. In addition, two *Solenomelus* and one *Orthrosanthus* species were included to complete this sampling.

Inclusion and light microscopy

Fresh flowers at anthesis were dissected under a Zeiss Stemi SV6 stereomicroscope (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany) and mounted in glycerin-gelatin (Johansen, 1940). For structural observations, the samples were fixed with 1% glutaraldehyde and 4% formaldehyde (McDowell and Trump, 1976) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2; then washed in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, and lastly with distilled water. They were immediately dehydrated in a graded series of ethanol solutions and embedded in hydroxyethylmetacrylate (Gerrits & Smid, 1983). Semi-thin sections (3 to 5 μ m) obtained with a Leica RM 2165

Table 1. List of species examined, with distribution of nuptial trichomes and other floral secretory structures, sources of plant material and voucher informations.

Taxon	Distribution			Source of plant material (*)	Voucher (**)
	Nuptial trichomes		Other nuptial secretory structures		
	Staminal column	Adaxial side of tepals			
<i>Orthrosanthus monadelphus</i> Ravenna	0	0	0	Mexico: Oaxaca	Chauveau & Pautz H09049 (ICN)
<i>Sisyrinchium alatum</i> Hook.	0	0	0	Brazil: Santa Catarina	Eggers & Souza-Chies 232 (ICN)
<i>Sisyrinchium angustifolium</i> Mill.	1	0	0	Cultivated in UPS Bot. Gard.	Chauveau H09002 (ICN)
<i>Sisyrinchium chilense</i> Hook.	1	0	0	Peru: Apumirac	Chauveau et al. H09054 (ICN)
<i>Sisyrinchium claritae</i> Herter	1	0	0	Brazil: Rio Grande do Sul	Eggers & Souza-Chies 267 (ICN)
<i>Sisyrinchium commutatum</i> Klatt	1	0	0	Brazil: Paraná	Eggers & Souza-Chies 265 (ICN)
<i>Sisyrinchium cuspidatum</i> Poepp.	0	1	0	Chile: Region IV	Chauveau & Aubert H09011 (ICN)
<i>Sisyrinchium demissum</i> Greene	1	0	0	USA: Arizona	Chauveau H09009 (ICN)
<i>Sisyrinchium elmeri</i> Greene	0	0	0	USA: California	Chauveau H09042 (ICN)
<i>Sisyrinchium foliosum</i> I.M.Johnst.	1	0	0	Brazil: Rio Grande do Sul	Eggers & Souza-Chies 281 (ICN)
<i>Sisyrinchium idahoense</i> E.P. Bicknell	1	0	0	Cultivated in UPS Bot. Gard.	Chauveau H09055 (ICN)
<i>Sisyrinchium limarinum</i> Ravenna	0	1	0	Chile: Region IV	Chauveau H09056 (ICN)
<i>Sisyrinchium macrocarpum</i> Hieron	1	1	0	Cultivated in UPS Bot. Gard.	Chauveau H09013 (ICN)
<i>Sisyrinchium micranthum</i> Cav.	1	1	0	Brazil: Paraná	Eggers & Souza-Chies 242-A (ICN)
<i>Sisyrinchium palmifolium</i> L.	0	0	0	Cultivated in UPS Bot. Gard.	Chauveau H09020 (ICN)
<i>Sisyrinchium patagonicum</i> Phil. ex Baker	1	0	0	Cultivated in UPS Bot. Gard.	Chauveau H09027 (ICN)
<i>Sisyrinchium platense</i> I.M.Johnst.	1	0	0	Brazil: Rio Grande do Sul	Eggers & Souza-Chies 187 (ICN)
<i>Sisyrinchium setaceum</i> Klatt	1	0	0	Brazil: Rio Grande do Sul	Eggers & Souza-Chies 214 (ICN)
<i>Sisyrinchium striatum</i> Sm.	0	1	0	Chile: Región Metropolitana	Chauveau H09018 (ICN)
<i>Sisyrinchium tenuifolium</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.	1	0	0	Mexico: Veracruz	Chauveau & Pautz H09025 (ICN)
<i>Sisyrinchium</i> aff. <i>tinctorium</i> Kunth.	0	0	0	Cultivated in UPS Bot. Gard.	Chauveau & Eggers H09021 (ICN)
<i>Sisyrinchium</i> cf. <i>tofoense</i> Ravenna	0	1	0	Chile: Region IV	Chauveau H09057 (ICN)
<i>Sisyrinchium</i> sp. <i>nova</i> 05 (aff. <i>vaginatum</i>)	0	0	0	Brazil: Paraná	Eggers & Souza-Chies 383 (ICN)
<i>Solenomelus segethi</i> Kuntze	0	0	1	Argentina: Neuquen	Chauveau & Aubert H09001 (ICN)
<i>Solenomelus pedunculatus</i> (Gillies ex Hook.) Hochr.	1	0	0	Chile: Region V	Chauveau H09044 (ICN)

Notes: character states are absent (0) or present (1). (*): the geographical origin of each specimen is reported. Subsequently, they were cultivated in the greenhouse at Université Paris-Sud 11. (**): voucher specimens are deposited in the following herbarium: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

microtome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) were stained for general histology using 1% toluidine blue in 1% sodium borate solution (Mercer, 1963). Observations were carried out using an optical microscope Reichert-Jung Polyvar MET (Polyvar Met, Reichert-Jung, Germany) equipped with a digital camera.

Histochemistry

The histochemical tests for lipids were performed on fresh material with Sudan Red 7B (Brundrett et al., 1991) and Nile Red (Greenspan et al., 1985; Diaz et al., 2008). Sudan Red 7B staining, which allows the detection of total lipids content, was used on fresh flowers sections including nuptial trichomes, contents being stained pink-red in the presence of lipids. Anthers were also dissected at anthesis for each species studied and stained with Sudan Red 7B to detect lipids in the pollenkit. Nile Red staining, which allows the detection of lipids according to their hydrophobicity, was used to detect lipids in nuptial trichomes of fresh flowers at anthesis and to discriminate between polar and non-polar lipids. Nile Red yellow emission specific to non-polar lipids was observed with 450–500 nm excitation and 535 ± 20 emission filters; red emission detecting the presence of polar lipids was observed with 450–500 excitation and 610 long-pass emission filters. All observations were made using a Nikon AZ100 macroscope (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France) equipped with digital Nikon DS-ri1. Achieving and compressing images with different focal planes was performed using the software Nikon NIS-Element D, version 3.0.

Semi-thin sections obtained with the microtome were submitted to the following histochemical tests to detect other classes of chemical compounds produced by floral glands or accumulated in pollen grains: Lugol solution was used to detect starch (Johansen, 1940), periodic acid - Schiff (PASS reaction) for total polysaccharides (O'Brien and McCully, 1981), Ruthenium Red for mucilage and pectins (Johansen, 1940), and all images were captured using the optical microscope. For all histochemical tests, appropriate controls were run simultaneously.

RESULTS

Five species of *Sisyrinchium* (*S. alatum*, *S. elmeri*, *S. palmifolium*, *S. aff. tinctorium* and *S. sp. nova* 05, affine to *S. vaginatum*), as well as *Orthrosanthus monadelphus* and *Solenomelus segethi*, had flowers completely devoid of nuptial trichomes. The surface of the adaxial face of the tepals and of the staminal column was smooth (Fig. 1a), except for the staminal column of *S. segethi*.

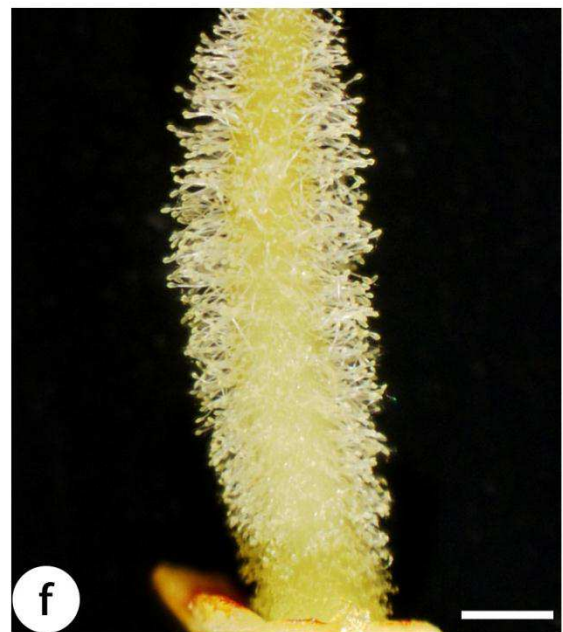
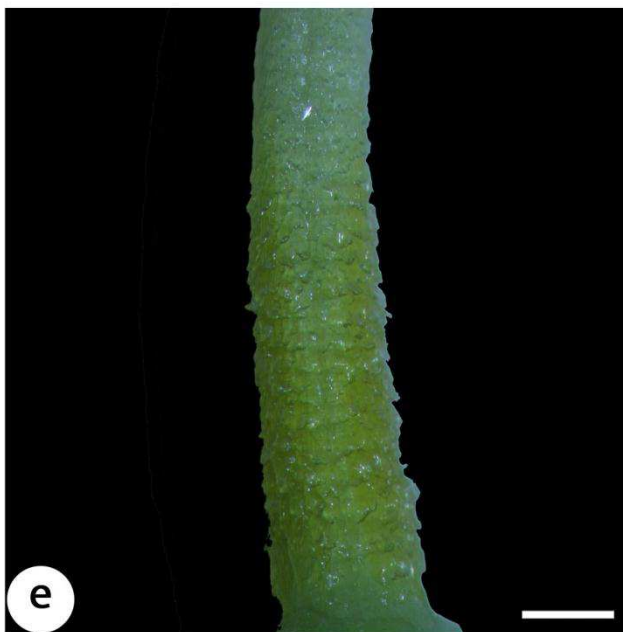
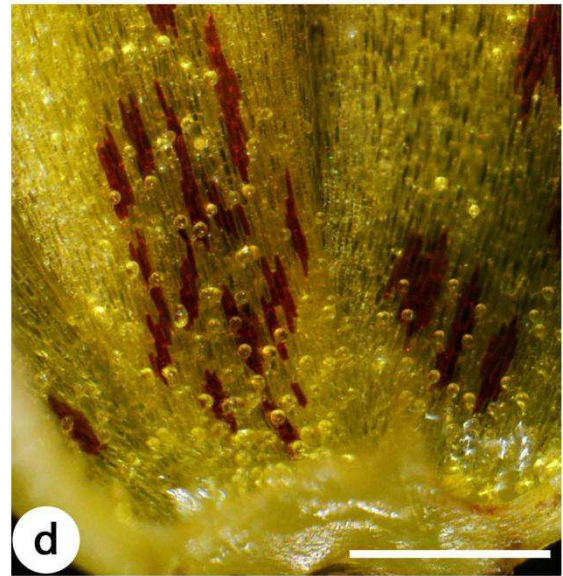
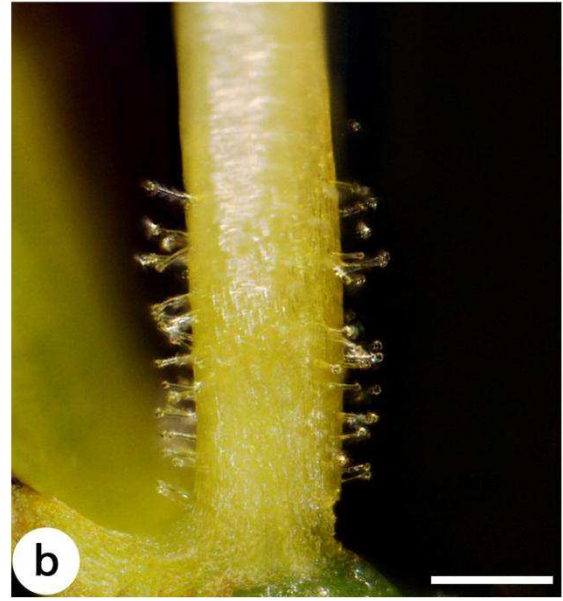
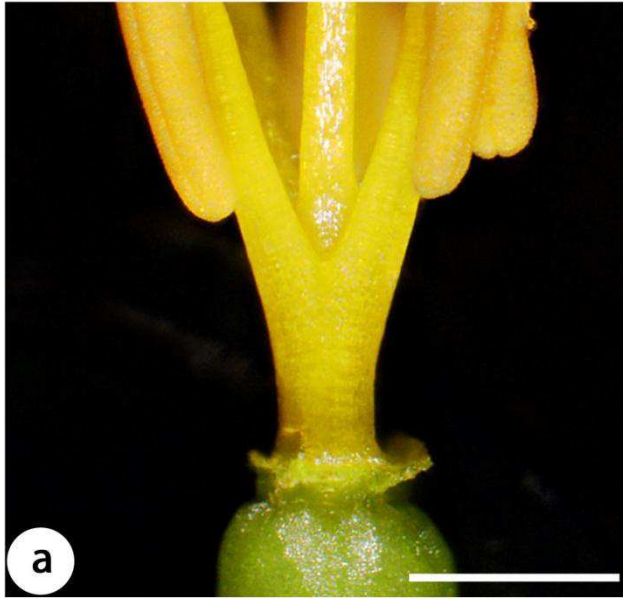


Figure 1. Staminal column and distribution of trichomes among *Sisyrinchium* and *Solenomelus* flowers. **a** Staminal column devoid of trichomes: *Sisyrinchium elmeri*. **b** Lower half part of the staminal column of *S. angustifolium* showing nuptial non oil-secreting trichomes. **c** Top view of the andro-gynoecium of *S. macrocarpum*: oil-producing glandular trichomes are located all along the fused and free parts of the filaments. **d** Close-up of a tepal of *S. striatum* showing the distribution of oil-glandular trichomes at the base of the adaxial surface. **e** Staminal column of *Solenomelus segethi* covered with multicellular secretory scales. **f** Staminal column of *Solenomelus pedunculatus* entirely covered with unicellular non-secreting trichomes. Scale bars: **a, d** = 1000 μm ; **b, c, e** and **f** = 500 μm .

Within *Solenomelus*, the filaments are entirely fused, forming an elongated and cylindrical staminal column, which exhibits nuptial glandular structures significantly different for each species included in this small genus. The surface of the staminal column of *S. segethi* presented a rugulate aspect (Fig. 1e), decreasing from the lower half to the top. These structures formed multicellular scales on the surface of the staminal column, distinctively covered by secretions in the lower half. The staminal column of *S. pedunculatus* is densely covered from the base to the top by numerous unicellular glandular capitate trichomes formed by a long a thin stalk distinctively overtopped by an enlarged part (Fig. 1f) devoid of any blister of secretion.

Among the *Sisyrinchium* species bearing nuptial glandular trichomes, the distribution and anatomical features of trichomes were already described for most of the species included in this study (Chauveau et al., 2011), but two species (*S. limarinum* and *S. cf. tofoense*) and several new distinctive features concerning *S. macrocarpum* were observed for the first time. In the two strictly Chilean species, *S. limarinum* and *S. cf. tofoense*, the staminal column was smooth and cylindrical, and nuptial unicellular and glandular trichomes overtopped by a blister of secretion were observed at the base of the adaxial side of tepals. A similar distribution pattern was observed in *S. cuspidatum* and *S. striatum* (Fig. 1d), in which the shape of the perianth was hypocrateriform, contrary to the flat perianth of the two former species. In *S. macrocarpum*, few unicellular glandular trichomes topped with a blister of secretion were detected on the inner side of the staminal column as well as on the adaxial side of the inner tepal, close to the base of the staminal column. The flowers of this South Andean species exhibit an unusual distribution pattern of trichomes, which were densely distributed all along the staminal column and on the free parts of the filaments (Fig. 1c). Various distribution patterns of trichomal elaiophores on the staminal column are illustrated in Fig. 2, showing variation in the size of the elaiophores area and in the shape of the staminal column among *Sisyrinchium* species.

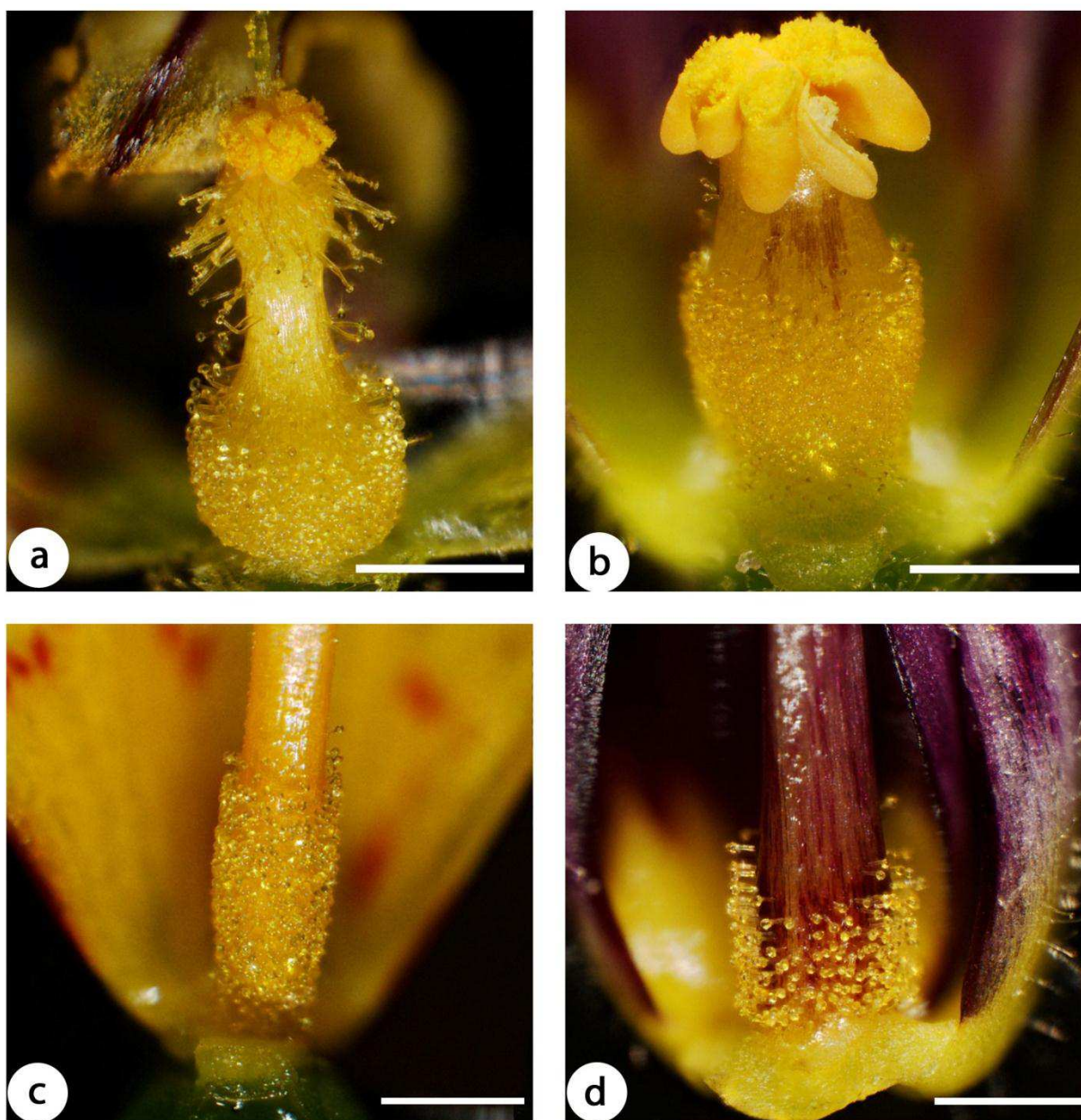


Figure 2. Distribution of oil-producing trichomes (trichomal elaiophores) on the staminal column of different *Sisyrrinchium* species. **a** Column of *S. commutatum* showing densely packed elaiophores on the lower half. **b** Thickened staminal column of *S. platense* with densely packed elaiophores on the lower two thirds. **c** Cylindrical column of *S. foliosum* covered with densely packed elaiophores on the lower third part. **d** Column of *S. chilense* with elaiophores located on the lower quarter part. Scale bars: **a-d** = 1000 μ m.

The floral chemical compounds identified in the nuptial trichomes and other putative floral glandular structures observed for each sample are reported in Table 2.

Nuptial glandular structures in Sisyrrinchium

The structural observations and histochemical tests showed that nuptial glandular structures were always epidermal unicellular trichomes when they were present in flowers of *Sisyrrinchium* species. Except for the North American species *S. angustifolium* (Fig. 1b), *S.*

demissum and *S. idahoense*, as well as the Central American species *S. tenuifolium*, these trichomes were oil secreting and possessed a dense, intensively staining and highly granular cytoplasm (Fig. 3b, d).

Table 2. Chemical compounds identified by histochemical tests in nuptial trichomes and other putative floral secretory structures.

Taxon	Oil		Starch	Total polysaccharides	Acidic polysaccharides
	Sudan Red 7B	Nile Red	Lugol	Schiff-PAS	Ruthenium Red
<i>Orthrosanthus monadelphus</i>	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
<i>Sisyrinchium alatum</i>	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
<i>S. angustifolium</i>	-	-	-	-	-
<i>S. chilense</i>	++	++	-	-	-
<i>S. claritae</i>	++	++	-	-	-
<i>S. commutatum</i>	++	++	-	-	-
<i>S. cuspidatum</i>	++	++	-	-	-
<i>S. demissum</i>	-	-	-	-	-
<i>S. elmeri</i>	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
<i>S. foliosum</i>	++	++	-	-	-
<i>S. idahoense</i>	-	-	-	-	-
<i>S. limarinum</i>	++	++	-	-	-
<i>S. macrocarpum</i>	++	++	-	-	-
<i>S. micranthum</i>	++	++	-	-	-
<i>S. palmifolium</i>	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
<i>S. patagonicum</i>	++	++	-	-	-
<i>S. platense</i>	++	++	-	-	-
<i>S. setaceum</i>	+	+	-	-	-
<i>S. striatum</i>	++	++	-	-	-
<i>S. tenuifolium</i>	-	-	-	-	-
<i>S. aff. tinctorium</i>	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
<i>S. cf. tofoense</i>	++	++	-	-	-
<i>S. sp. nova 05 (aff. vaginatum)</i>	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
<i>Solenomelus segethi</i>	- (0)	- (0)	- (0)	++ (0)	++ (0)
<i>Solenomelus pedunculatus</i>	-	-	-	-	-

Notes: species devoid of nuptial trichomes are indicated (0) and histochemical tests were performed for these samples on the epidermal cells of the staminal column. (-) corresponds to the absence of a significant amount of each chemical compound tested. The detection of a significant amount of each chemical compound is reported with (+) and (++) , (+) indicating a lower amount of the corresponding compound than (++) .

Numerous mitochondria and plastids lacking starch grains but often containing lipid droplets occurred within the cytoplasm, and the nucleus was not enlarged in most cases. Although a blister of secretion was always present in a subcuticular space at the tip of the trichomes observed, variation in size were observed, and blisters of oil-producing trichomes (Fig. 3a, c; Fig. 4a, b) were always bigger than the blisters of trichomes that did not secrete oil (Fig. 4c,

d), indicating that the amount of secretion accumulated between the cell wall and the cuticle was higher in the case of oil-producing trichomes.

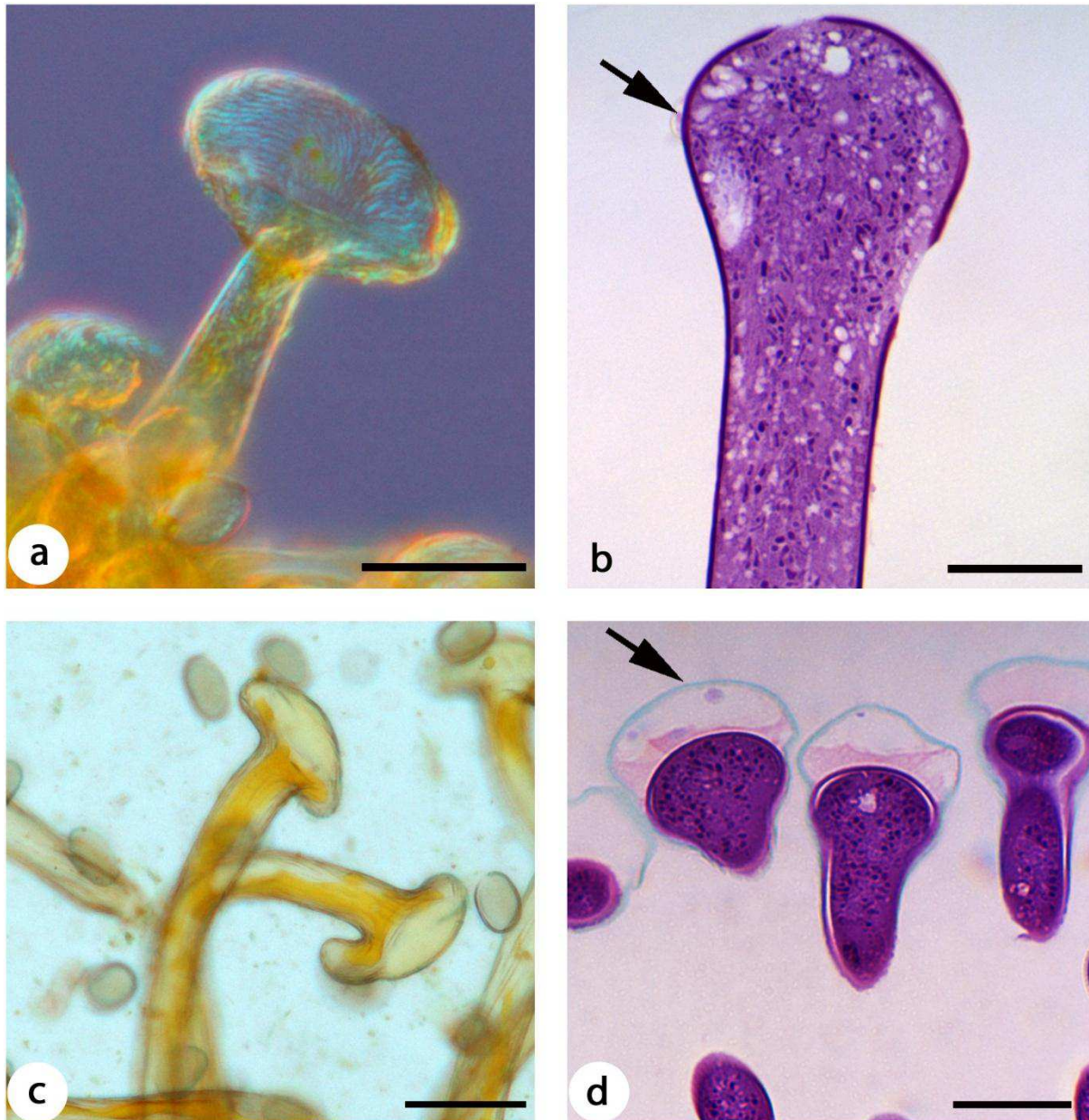


Figure 3. Trichomal elaiophores of *Sisyrrinchium claritae* (a), *S. macrocarpum* (b), *S. setaceum* (c) and *S. micranthum* (d). **a** Differential interference contrast imaging (DIC) of a trichome located on the lower half of the staminal column, showing the oil blister covered with the striate cuticle. **b** Longitudinal section of a trichome located on the staminal column, showing the apical portion stained with Toluidine Blue. The cuticle was ruptured during the process; the arrow indicates a remaining portion. **c** Trichomes on the lower half of the staminal column showing the blister of oil secretion and the striate cuticle. **d** Longitudinal section of trichomes located on the staminal column stained with Toluidine Blue. The thick cuticle of the oil blister is indicated by the arrow. Scale bars: **a**, **c** = 50 μm ; **b**, **d** = 20 μm .

Oil accumulation within the subcuticular space of oil-producing trichomes was detected with Sudan Red 7B and Nile Red stainings, the latter indicating that both polar and non-polar lipids were highly accumulated (Fig. 5a-d). The aspect of the cuticle surface and its thickness were

variable among species. Among species with trichomal elaiophores, the trichomes cuticle of *S. claritae* (Fig. 3a, 4b), *S. commutatum*, *S. foliosum* and *S. setaceum* was striate and thick, while for *S. chilense*, *S. micranthum* (Fig. 3d), *S. patagonicum*, *S. platense* (Fig. 4a) and *S. tenuifolium* (Fig. 4c), a Central American species bearing non oil-secreting trichomes, striations were not observed even though the thickness of the cuticle was comparable to the previous species.

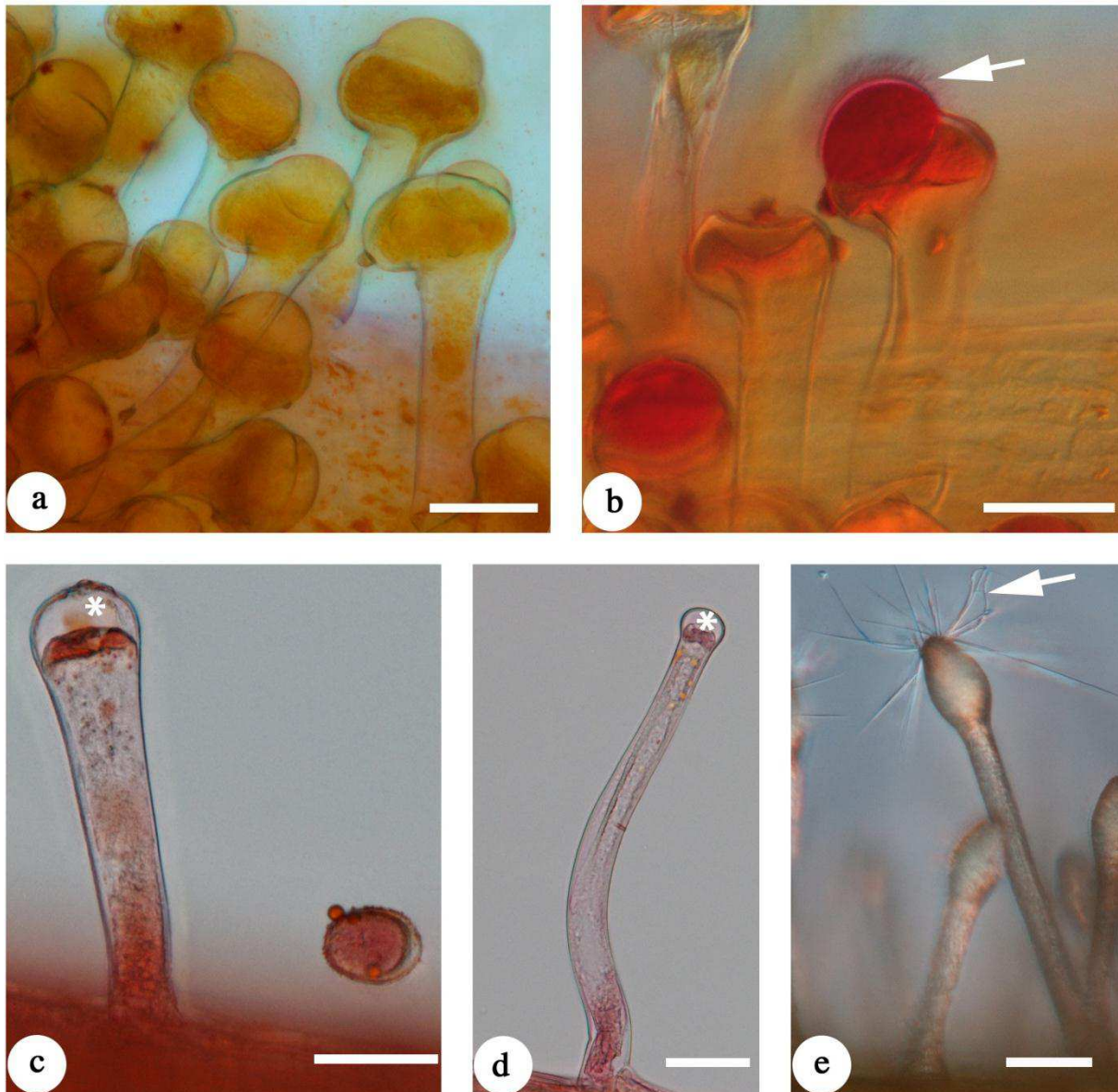


Figure 4. Morphology of nuptial trichomes among Sisyrinchieae. **a** Oil-producing trichomes on the staminal column of *Sisyrrinchium platense*. **b** DIC imaging of oil-producing trichomes of *S. claritae* stained with Sudan Red 7B, showing the oil accumulated in the blister of secretion (arrow). **c** Trichome of *S. tenuifolium* stained with Sudan Red 7B (*: blister without oil accumulation). **d** Trichome of *Sisyrrinchium demissum* stained with Sudan Red 7B (*: blister without oil accumulation). **e** DIC imaging of one trichome of *Solenomelus pedunculatus*; the arrow indicates the presence of very thin elongated structures on the enlarged apical part of the trichome. Scale bars: a-d = 50 μ m.

Thin cuticles without striations on the surface were observed for the non oil-secreting trichomes of the North American species (*S. angustifolium*, *S. demissum* and *S. idahoense*) and for the oil-producing trichomes of the South Andean species (*S. cuspidatum*, *S. limarinum*, *S. macrocarpum*, *S. striatum* and *S. cf. tofoense*).

The structural observations did not indicate the presence of secretory cells within the staminal column of the species sampled. Furthermore, no polysaccharides were detected within the staminal column for the species with or without nuptial trichomes, indicating that none of the species of *Sisyrinchium* sampled produced nectar.

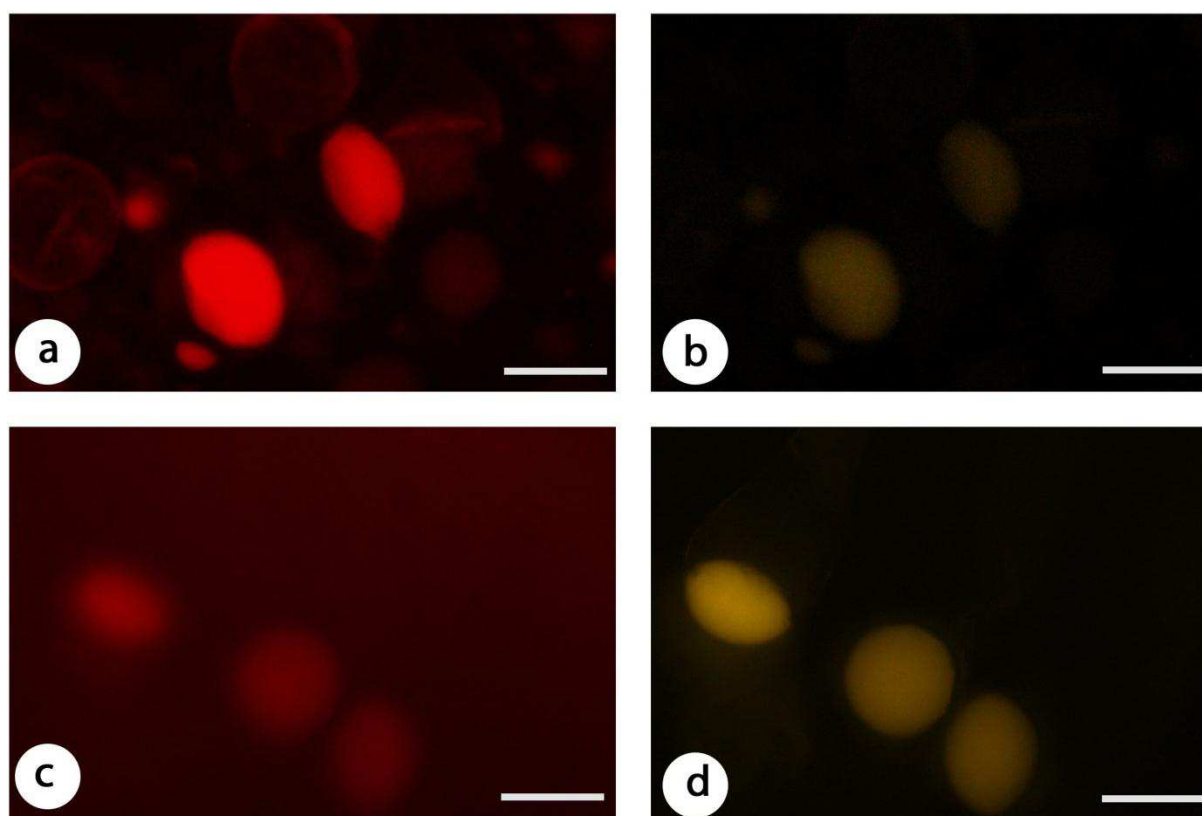


Figure 5. Fluorescence micrographs of oil-producing trichomes stained with Nile Red. **a, b** *Sisyrinchium commutatum*. **c, d** *S. limarinum*. **a** and **c** Red emission showing the accumulation of polar lipids in the oil blister. **b** and **d** Yellow emission showing the accumulation of non-polar lipids in the same blisters of secretion. *Scale bars: a-d = 50 μm.*

Starch was never detected within nuptial glandular trichomes. Among species devoid of nuptial trichomes (Fig. 6a), as well as those with trichomal elaiophores (Fig. 6d), starch was only observed in the cells of the staminal column of *S. setaceum*, where starch grains were detected within the cytoplasm in the epidermal layer and the inner tissues (Fig. 6c). Numerous starch grains were observed within the cytoplasm of cells mainly distributed around the vascularized tissues (Fig. 6b) of the staminal column in North and Central American species bearing non oil-producing nuptial trichomes.

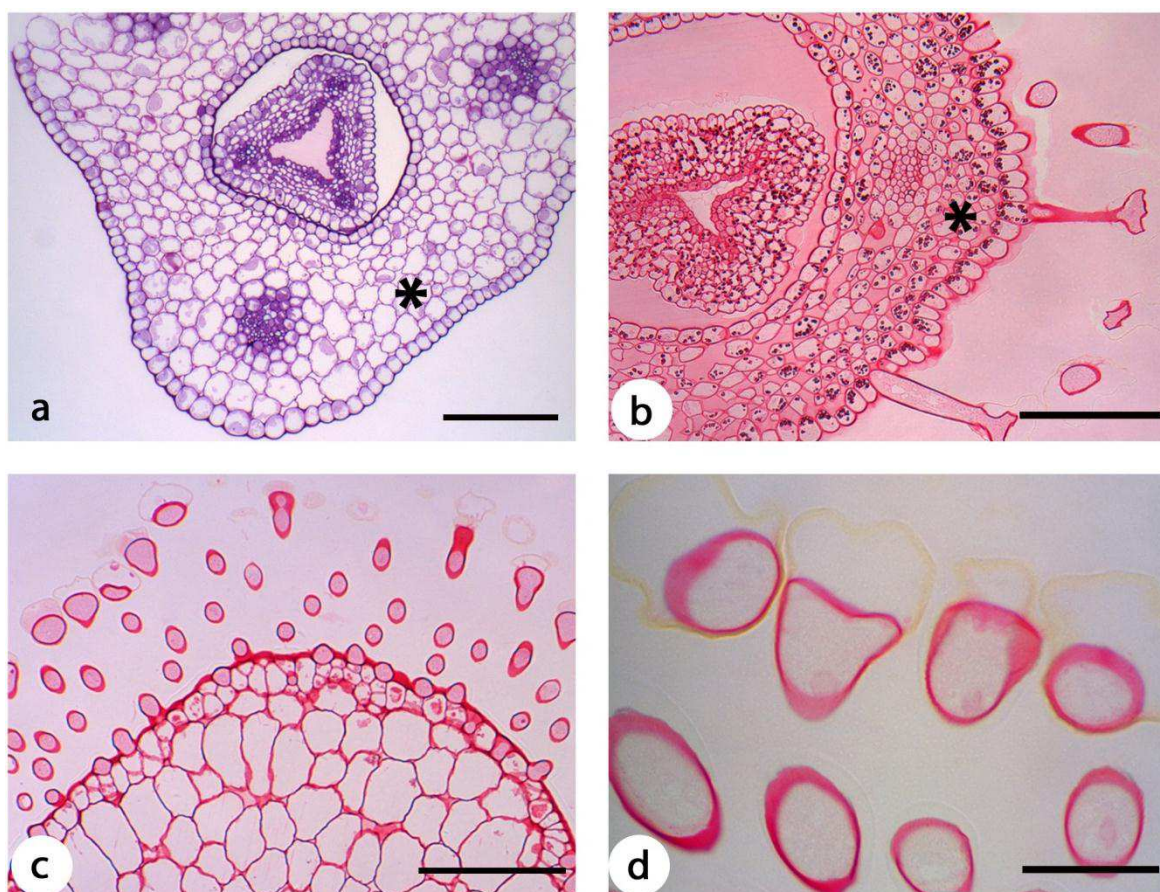


Figure 6. Transverse sections of the staminal column of four *Sisyrinchium* species. **a** *S. elmeri*: Starchless tissue (*) of the staminal column devoid of nuptial trichomes stained with Toluidine Blue. **b-d** Staminal tissue stained with PAS-Schiff. **b** *S. angustifolium*: starch grains are present mostly around the vascular tissues (*) **c** *S. setaceum*: starch was detected within the cytoplasm of the epidermal cells and the inner tissues of the staminal column (*). **d** Transverse sections of the staminal column and the oil-producing trichomes of *S. platense*. No starch accumulation was detected in these tissues. Scale bars: **a-d** = 100 μm .

Nuptial glandular structures in Orthrosanthus and Solenomelus

Structural observations and results of each histochemical test were negative for the tissues of the staminal column of *Orthrosanthus monadelphus*, indicating the absence of nectaries or elaiophores.

Neither secretory cells nor polysaccharides production and accumulation were detected in the staminal column of *Solenomelus pedunculatus*, indicating no nectar production. Sudan Red 7B and Nile Red tests were negative for oil accumulation within trichomes and other tissues of the staminal column and tests were also negative for starch accumulation. Structural observations of trichomes showed that these cells were highly vacuolated and lacked any secretory cavity at anthesis (Fig. 4e, 7d). The cuticle had a striate surface, suggesting a reinforced resistance compared to a smooth surface.

The staminal column of *S. segethi* was covered by a layer of longitudinally elongated

epidermal cells forming multicellular scales at the surface (Fig. 7a-c), mainly on the lower half of the column. PAS-Schiff and Ruthenium Red tests showed that secretions of pectin mucilage mixed with polysaccharides were accumulated mainly within intercellular spaces between the outer epithelial layer and the subepithelial cells (Fig. 7b, c). The outer surface of the staminal column with large epidermal cells secreting a high amount of polysaccharides was characteristic of epithelial nectaries, nectar being presumably accumulated in the subepidermal spaces in this region. Sudan Red 7B and Nile Red tests were negative for oil accumulation within epithelial cells and other tissues of the staminal column. No starch accumulation was detected with Lugol at anthesis.

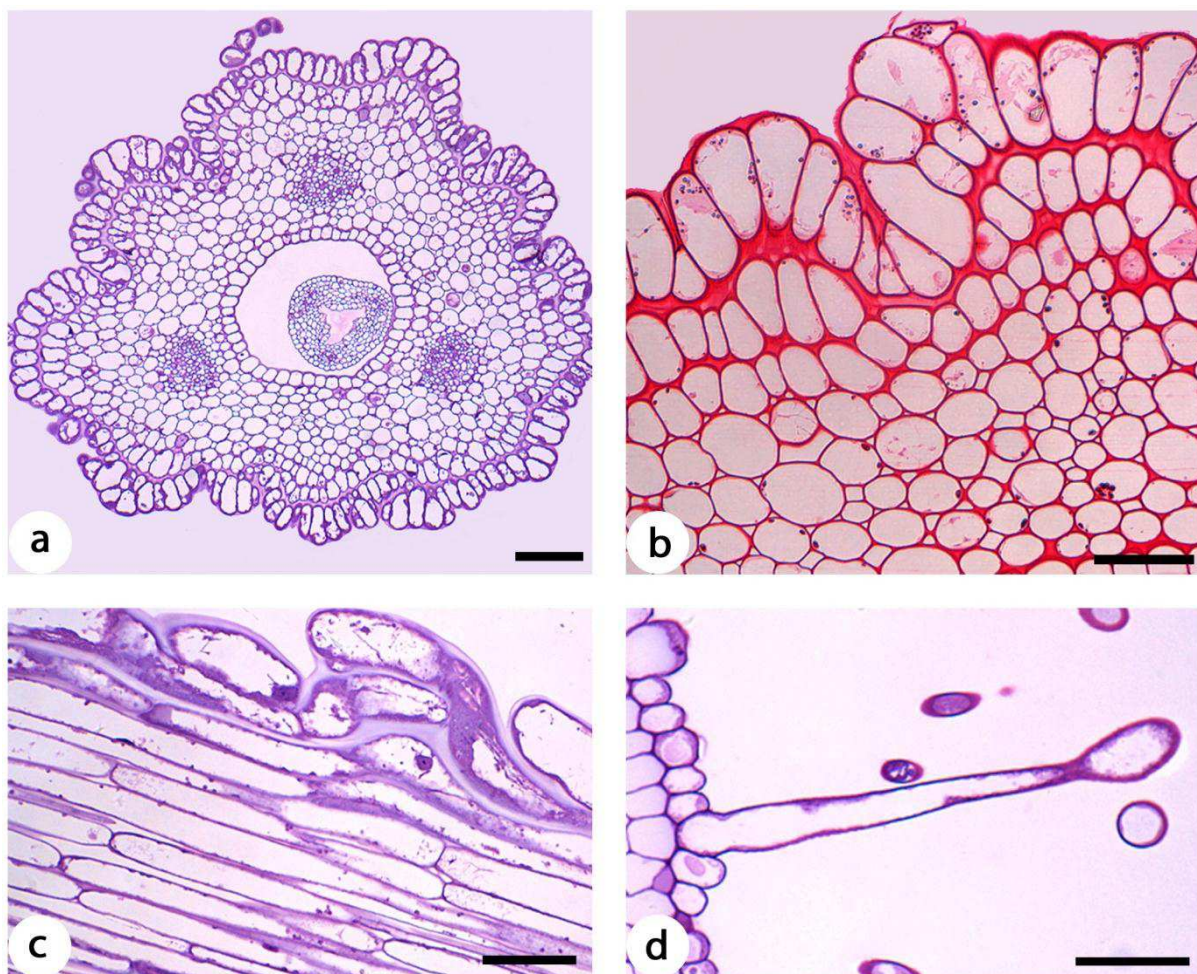


Figure 7. Sections of the staminal column of *Solenomelus* species. **a-c** *S. segethi*. **a** Transverse section (TS) stained with Toluidine Blue, showing the outer epidermal layer of elongated secretory cells. **b** TS stained with PAS-Schiff, showing polysaccharides secretions (red) accumulated within the intercellular spaces and on the outer surface of the staminal column. **c** Longitudinal section stained with Ruthenium Red, showing the pectin mucilage (purple) covering the secretory cells and within the intercellular spaces below the outer epidermal layer. **d** TS of the staminal column of *S. pedunculatus* stained with Toluidine Blue, showing the highly vacuolated cytoplasm of the nuptial trichomes. Scale bars: **a** = 100 μm ; **b-d** = 50 μm .

Pollenkitt and pollen cytoplasm content

Observations on fresh material and Sudan red 7B histochemical tests showed that high amounts of pollenkitt were present in the pollen of each species sampled and numerous lipids droplets were always detected, often glued to the pollen grain external surface (Fig. 8a-f). Tests with PAS-Schiff on the pollen cytoplasm content revealed the presence of high amounts of dissolved polysaccharides within the cytoplasm for all samples (Fig. 8g-i). Starch grains were detected in the pollen cytoplasm of only two species: *Sisyrinchium chilense* and *Solenomelus pedunculatus* (Fig. 8h, i).

DISCUSSION

The genus *Sisyrinchium* is the most species rich genus among Neotropical Iridoideae, and numerous species have developed trichomal elaiophores related to specialized oil-bee pollination (Goldblatt and Manning, 2008). Chauveau et al. (2011) showed that these glandular structures probably evolved twice independently within the genus, leading to two distinct lineages. One of these lineages is distributed in the South Andean region while the other one has its centre of origin and diversity in the Paranaensic region with subsequent dispersal events through South America towards North America. Among our study species, *S. cuspidatum*, *S. limarinum*, *S. macrocarpum*, *S. cf. tofoense* and *S. striatum* belong to the first lineage. *Sisyrinchium claritae*, *S. commutatum*, *S. setaceum* are included in one of the two major clades forming the second lineage, while *S. chilense*, *S. foliosum*, *S. micranthum*, *S. patagonicum* and *S. platense* are included in the other clade with the North American species *S. angustifolium*, *S. demissum* and *S. idahoense*.

The species belonging to the first lineage are distributed in the range area of the specialized oil-bee pollinators of the genus *Chalepogenus* (Holmberg, 1903), subgenus *Chalepogenus* (Apidae: Tapinotaspidini), which are the main known pollinators of the oil-producing species of *Sisyrinchium* within this range area (Cocucci et al., 2000; Cocucci and Vogel, 2001). The species of *Chalepogenus* involved in *Sisyrinchium* pollination have specialized oil-collecting structures that are mainly formed of outstandingly developed absorbing leg pads, while presenting reduced abrasive structures on the forelegs (Roig-Alsina, 1997; Cocucci et al., 2000; Cocucci and Vogel, 2001). The thin cuticle observed in species of the South Andean lineage of *Sisyrinchium* ruptures very easily during manipulations, a fact that could be related to the particular morphological features of the oil-collecting structures of their pollinators.

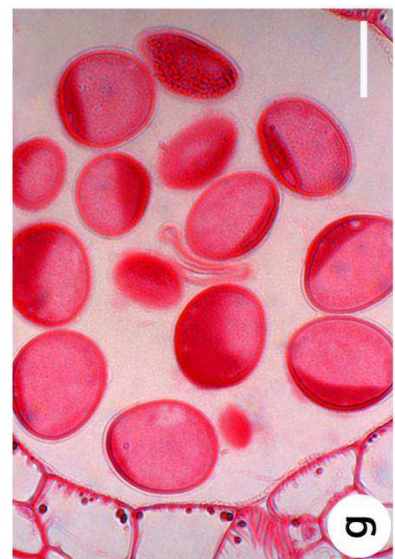
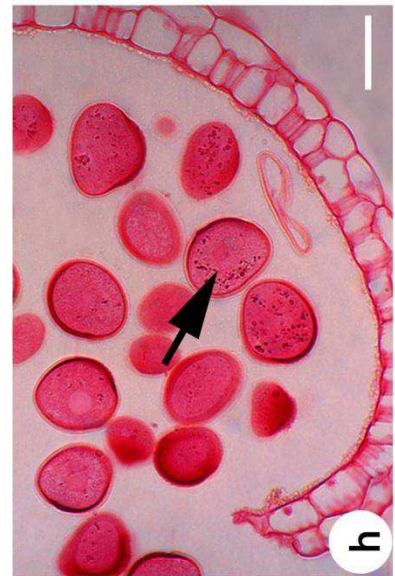
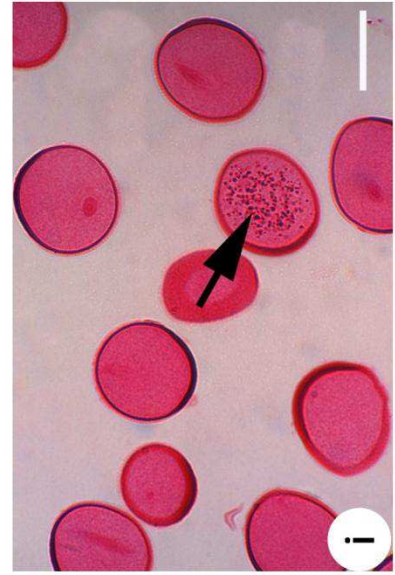
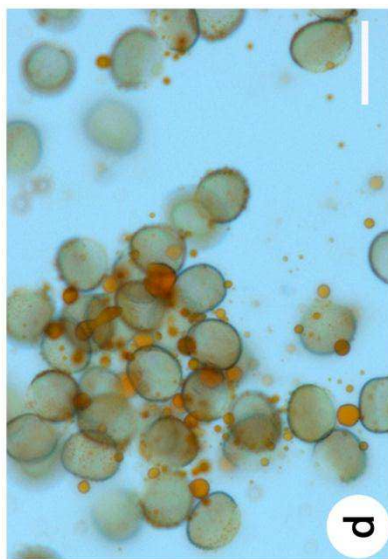
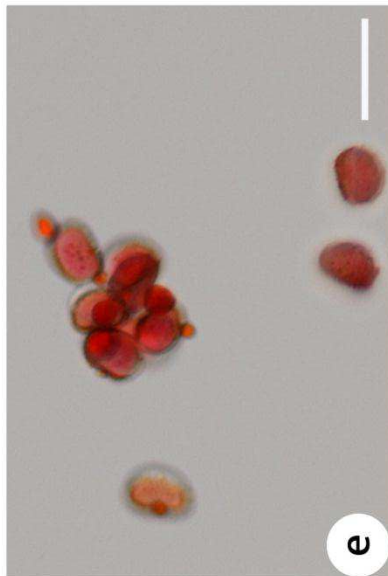
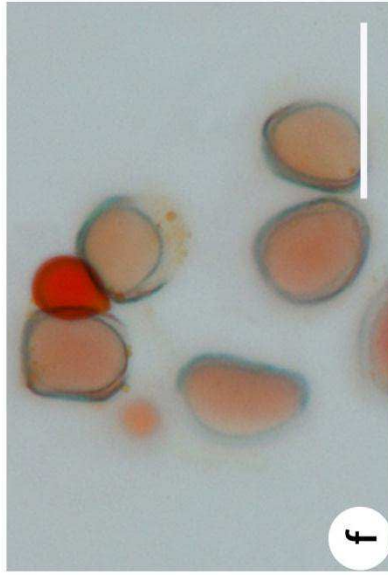
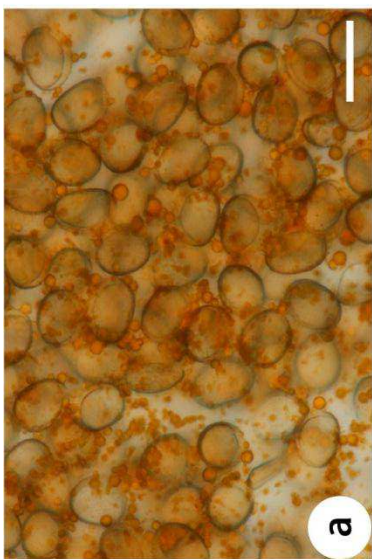
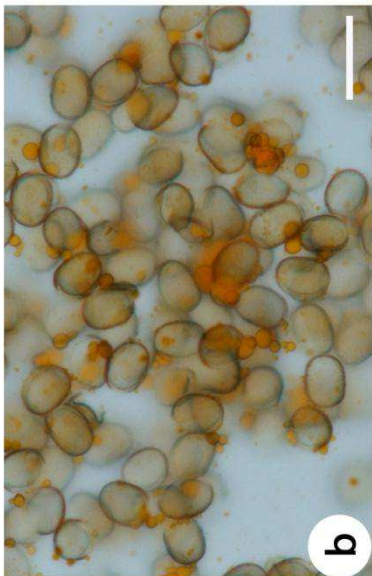
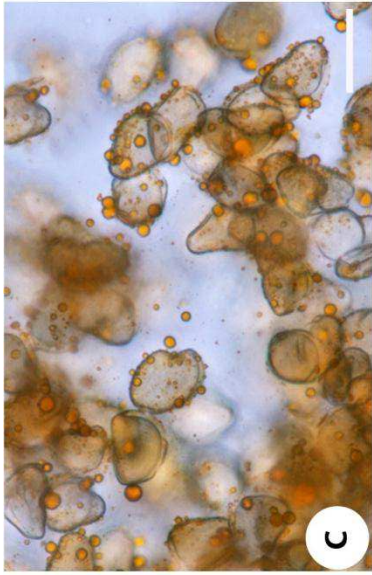


Figure 8. Pollenkitt and pollen grain contents. **a-d** Light micrographs of fresh material. **a** *Sisyrinchium tenuifolium*. **b** *S. micranthum*. **c** *S. angustifolium*. **d** *S. limarium*. **e-f** Light micrographs with Sudan Red 7B showing oil content in pollenkitt. **e** *S. limarium*. **f** *S. tenuifolium*. **g-i** Pollen grains stained with PAS-Schiff showing the total polysaccharides content. **g** *S. elmeri*. **h** *S. chilense*. **i** *Solenomelus segethi*. Arrows indicate starch grains within the cytoplasm of few pollen grains of *S. chilense* and *Solenomelus segethi*. Scale bars: **a-f** = 50 μm ; **g-i** = 20 μm .

Within the second lineage, several species sampled (*S. chilense*, *S. micranthum*, *S. platense*, *S. setaceum*) are almost exclusively pollinated by specialized oil bees of the genus *Chalepogenus*, subgenus *Lanthanomelissa* (Holmberg, 1903), which were observed foraging oil only on *Sisyrinchium* species (Cocucci et al., 2000; Cocucci and Vogel, 2001, Machado, 2004). The bees of this subgenus have evolved abrasive and absorbing forelegs pads, potentially allowing them to rupture the thick cuticle observed on the trichomal elaiophores of these species (Fig. 3d) and then collect the oil released (Cocucci et al., 2000; Cocucci and Vogel, 2001).

Neither structural observations nor histochemical tests detected nectaries or nectar within the staminal tissues of the study species, and compounds which were neither oil nor sugar were observed within the trichomal elaiophores of the North American species of the second lineage. It should be noted that the number and density of nuptial glandular trichomes on the staminal column, as well as the amount of compounds accumulated in the subcuticular space, were much lower than those observed among the South American species of the same lineage. These results, together with the fact that bees of the Tapinotaspidini tribe are absent in North America (Cocucci and Vogel, 2001), suggest that the association with specialized oil-collecting pollinators was lost during the northward dispersion of the genus. The occurrence of few nuptial trichomes on the staminal column would then be a vestigial condition, and at least one major shift of pollination strategy would have occurred during the dispersal event. Since these trichomes are sterile, it is likely that the only reward available for pollinators among the North American species of this lineage is pollen, even though the chemical compounds accumulated in the blister of these trichomes still need to be characterized. Among the North American species, some are mainly pollinated by solitary bees of the family Halictidae that collect pollen, and even if insect pollination is generally thought to promote outcrossing, observations of their behaviour and the rate of self-compatibility observed for several North American *Sisyrinchium* species suggest that these pollinators may increase self-pollination (Cholewa and Henderson, 1984; Montgomery, 2009). Although most of the North American species studied are thought to be self-compatible, it has been shown that *S. idahoense* is nearly unable to be self-pollinated, since it is characterised by a high degree of

protandry and physical separation of the stigmas and anthers (Henderson, 1976; Cholewa and Henderson, 1984). Further investigations are needed concerning the pollination biology of these species of *Sisyrinchium* in order to determine the range of biotic vectors involved in their pollination, to estimate the relative extent of effective self-pollination and to determine whether pollen is indeed the only reward collected.

In *S. tenuifolium*, few nuptial trichomes located on the staminal column were also observed. This species is distributed from Mexico to Panama and is nested within a clade that includes only Central American species. Non oil-secreting glandular trichomes evolved independently within this clade, where both species with and without nuptial trichomes occur (Chauveau et al., 2011). Structural observations and histochemical tests conducted on this species gave similar results to those obtained for the three North American species *S. angustifolium*, *S. demissum* and *S. idahoense*, even though they are not closely phylogenetically related to *S. tenuifolium*. In this latter species, the cuticle is significantly thinner than in the three other species. Since the flowers of *S. tenuifolium* produce no oil and no nectar, it seems likely that the only reward offered to pollinators is pollen, and nuptial trichomes might therefore play another role in pollination. Further investigations concerning the identification of the chemical compounds secreted by the nuptial trichomes and the biotic vectors involved in the pollination of this species are obviously necessary.

No nuptial secretory structure and no accumulation of starch were detected within the staminal tissues of the different species of *Sisyrinchium* devoid of nuptial trichomes, suggesting that pollen is likely the only reward available for pollinators in these species.

The presence of starch is characteristic of many nectary and osmophore cells, generally at the presecretory stage, and it has been suggested that it could be a source of energy for intensive metabolic processes, or indirectly a nectar sugar component (Pacek and Stpiczyńska, 2007). The difference observed in the presence/absence of starch between non oil-producing trichomes and elaiophores could be accounted for by a difference in starch use. At the anthesis stage, oil is already widely accumulated in the blister of secretion of trichomal elaiophores, and if starch was used during the metabolic process of production of lipids, it may explain why starch was not detected at this stage for species bearing trichomal elaiophores. On the contrary, the presence of numerous starch grains within the cytoplasm of cells distributed around the vascularized tissues of the species bearing non oil-producing nuptial glandular trichomes at the anthesis stage may indicate that starch is not used. The accumulation of starch observed for the North American species *S. angustifolium*, *S.*

demissum and *S. idahoense* might be a vestigial condition related to the ancestral oil-producing state of the nuptial trichomes.

In the same way, the occurrence of few starch grains within the cytoplasm of the epidermal cells and the staminal column cells of *S. setaceum*, might be related to the lower amount of oil secretions observed at the anthesis stage within the trichomal elaiophores of this species, compared to the amount of oil accumulation detected in the other species with trichomal elaiophores. The reduced consumption of starch would explain why starch grains are still present at anthesis.

The results of the present study are in agreement with previous observations suggesting that oil-producing trichomes are present in a wide range of species within *Sisyrrinchium*, distributed almost only in the Neotropical region (Chauveau et al., 2011). We show here that these trichomes produce either exclusively oil, or no reward for pollinators. In oil-producing trichomes, non-polar and polar lipids are accumulated in the subcuticular space. The higher intensity of specific fluorescence observed for polar lipids suggests that they are probably secreted in higher amounts than non-polar ones. Nectaries were not detected in the species sampled, suggesting that oils and pollen are likely to be the only rewards available for the biotic pollinators within the genus.

Pollenkitt abundance and pollenkitt lipid content were examined for each of our study species, together with the presence of total polysaccharides within the pollen grain cytoplasm. Starch grains were only detected in few pollen grains (Fig. 8h, i) of two species. In starchless pollen grains, starch is assumed to be totally hydrolysed during the final phase of maturation into glucose, fructose, sucrose, pectins and other types of cytoplasmic carbohydrates and the pollen cytoplasm is therefore stained with PAS-Schiff (Pacini et al., 2006). The occurrence of these highly energetic compounds in the pollen of our study species suggests that pollen might play a major role in the pollination strategies of the species of the tribe Sisyrrinchieae. The role of pollenkitt in attaching pollen to pollinators, and the ability of pollen-consuming insects to cue in on pollen lipids has already been widely demonstrated in many Angiosperms, where pollen provides numerous other nutriments, including carbohydrates (Hesse, 1979a, b, c; Dobson, 1987, 1988; Pacini and Hesse, 2005; Roulston and Cane, 2000). Specialized oil-bees involved in the pollination of species of *Sisyrrinchium* bearing trichomal elaiophores also collect pollen, which is mixed with oil to feed their larvae (Cocucci and Vogel, 2001; Truylio et al., 2002). Observations of the behaviour of the specialized oil-bee *Chalepogenus betinae* (Urban, 1995) on *Sisyrrinchium micranthum* flowers show that pollen attracts primarily

females bees (Truylio et al., 2002), suggesting an essential role of pollen in oil-bee pollination, in addition to oil. Truylio et al. (2002) showed that *Sisyrinchium micranthum* is also actively visited by pollen collecting bees of the family Apidae, suggesting that several pollination systems may occur simultaneously among oil-producing species of *Sisyrinchium*.

Elaiohores and nectaries were not detected within the staminal tissues of the species of *Orthrosanthus* and *Solenomelus* observed, indicating that pollen might be the only resource available for pollinators in these species, except for *S. segethi* where nectaries were found on the staminal column. The results obtained for *O. monadelphus* are congruent with previous observations made on flowers of *O. laxus* (Endl.) Benth., a species distributed in Australia (Rudall et al., 2003). Nuptial trichomes were only observed on the staminal column of *S. pedunculatus* but they were not secretory at the anthesis stage and structural observations showed that the cytoplasm was highly vacuolated and presented none of the characteristics of secretory cells (dense, intensively stained and granular cytoplasm). The latest comprehensive phylogeny of the tribe showed that the nuptial trichomes of *S. pedunculatus* evolved independently from those observed among the genus *Sisyrinchium* (Chauveau et al., 2011) and our observations suggest that they are structurally and anatomically not related. Their function remains to be identified.

The staminal secretory structures reported for *S. segethi* are characterized as nectaries for the first time here, but it is important to note that they are structurally different from those observed within the genus *Olsynium* by Rudall et al. (2003). While nectar is secreted from cells forming scales on the outer epidermal layer of the staminal column of *S. segethi*, observations in *O. douglasii* suggested that nectar was secreted from highly vascularized tissue beneath the epidermal layer, and from anticlinally elongated epidermal cells on the inner and outer surfaces of a swollen part of the staminal column in *O. junceum* (Forcone et al., 1997; Rudall et al., 2003). A similar swollen base was observed in several other species of *Olsynium*, suggesting that these species might produce nectar similarly to what was found for *O. douglasii* and *O. junceum*. Further investigations are necessary to determine whether nectaries occur among these species, although it is already known that *O. philippi* (Klatt) Goldblatt, which exhibits a swollen staminal column, does not produce nectar (Cocucci and Vogel, 2001). Then, even though the perigonal nectaries exhibit topological similarities between *Olsynium* and *Solenomelus* and these two genera are phylogenetically closely related, it is impossible to make hypotheses about the evolutionary pattern of these secretory structures within the tribe without conducting further studies in *Olsynium*. However, our

observations within the genus *Sisyrinchium* combined with the results of the latest comprehensive phylogeny of the tribe (Chauveau et al., 2011) suggest that the absence of perigonal nectaries or elaiophores is the plesiomorphic condition for *Sisyrinchium* and it seems likely that the trichomal elaiophores identified in this genus did not evolved from perigonal nectaries.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to M.-N. Soler and S. Brown (IFR87) for their continuous help during the light microscope studies, and to Celine Charon (Institut de Biologie des Plantes - Université Paris Sud - UMR 8618) and Juliana Troleis (Laboratório de Anatomia Vegetal “LAVeg” - Universidade Federal do Rio Grande do Sul) for additional supports.

This work received funding from the French/Brazilian CAPES/COFECUB cooperation project Sv550/07 and from the IFR87 'La plante et son environnement'. The first author was sponsored by a CAPES scholarship (process 3703/09-6).

LITERATURE CITED

- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**(3): 111-116.
- Chauveau O, Eggers L, Raquin C, et al. 2011.** Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany* **107**: 1287-1312.
- Cholewa AF, Henderson DM. 1984.** Biosystematics of *Sisyrinchium* section *Bermudiana* (Iridaceae) of the Rocky Mountains. *Brittonia* **36**(4): 342-363.
- Cocucci AA, Vogel S. 2001.** Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora* **196**(1): 26-46.
- Cocucci AA, Sérsic A, Roig-Alsina A. 2000.** Oil-collecting structures in Tapinotaspidini: their diversity, function and probable origin. *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* **90**: 51-74.

- Diaz G, Melis M, Batetta B, Angius F, Falchi AM. 2008.** Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron* **39**: 819-824.
- Dobson HEM. 1987.** Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia* **72**: 618-623.
- Dobson HEM. 1988.** Survey of pollen and pollenkitt lipids - Chemical cues to flower visitors? *American Journal of Botany* **75**:170-182.
- Forcone A, Galetto L, Bernardello L. 1997.** Floral nectar chemical composition of some species from Patagonia. *Biochemical Systematics and Ecology* **25**(5): 395-402.
- Gerrits PO, Smid L. 1983.** A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* **132**: 81-85.
- Goldblatt P, Manning JC. 2006.** Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. *Annals of Botany* **97**: 317-344.
- Goldblatt P, Manning JC. 2008.** *The Iris family - natural history and classification*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, et al. 2008.** Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, Biogeography, and Divergence Time Based on Plastid DNA Sequences. *Systematic Botany* **33**: 495-508.
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. 1985.** Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipids droplets. *The Journal of Cell Biology* **100**: 965-973.
- Henderson DM. 1976.** A Biosystematic study of Pacific Northwestern blue-eyed grasses (*Sisyrinchium*, Iridaceae). *Brittonia* **28**(2): 149-176.
- Hesse M. 1979a.** Development and ultrastructure of the exine and the sticky substance of the pollen in closely related entomophilous and anemophilous angiosperms: Salicaceae, Tiliaceae and Ericaceae [German]. *Flora* **168**: 540-557.
- Hesse M. 1979b.** Development and ultrastructure of the exine and sticky substance of the pollen in closely related entomophilous and anemophilous angiosperms: Polyganaceae [German]. *Flora* **168**: 558-577.
- Hesse M. 1979c.** Ultrastructure and distribution of pollenkitt in insect- and wind-pollinated *Acer*. [German]. *Plant Systematics and Evolution* **131**: 277-289.

Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, USA.

Machado IC. 2004. Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. In: Freitas B, Pereira JOP, eds., *Solitary Bees, Conservation, Rearing and Management for Pollination*. Editora Universitária: Fortaleza, BR, 255-280.

McDowell EM, Trump BF. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **100**(8): 405-414.

Mercer EH. 1963. A scheme for section staining in electron microscopy. *Journal of the Royal Microscopical Society* **81**: 179-186.

Montgomery BR. 2009. Pollination of *Sisyrinchium campestre* (Iridaceae) in prairies invaded by the introduced plant *Euphorbia esula* (Euphorbiaceae). *The American Midland Naturalist* **162**: 239-252.

O'Brien TP, McCully ME. 1981. *The study of plant structure principles and selected methods*. Termarcarphi Pty Ltd., Australia.

Pacek A, Stpiczyńska M. 2007. The structure of elaiophores in *Oncidium cheiroporum* Rchb.f. and *Ornithocephalus kruegeri* Rchb.f. (Orchidaceae). *Acta Agrobotanica* **60**(2): 9-14.

Pacini E, Hesse M. 2005. Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora* **200**: 399-415.

Pacini E, Guarnieri M, Nepi M. 2006. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma* **228**: 73-77.

Renner SS, Schaefer H. 2010. The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **365**: 423-435.

Roig-Alsina A. 1997. A generic study of the bees of the tribe Tapinotaspidini, with notes on the evolution of their oil-collecting structures. *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* **87**: 3-21.

Roulston TH, Cane JH. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 187-209.

Rudall PJ, Manning JC, Goldblatt P. 2003. Evolution of floral nectaries in Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **90**: 613-631.

Truylio B, Harter-Marques B, Engels W. 2002. Biologia floral e polinização de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) na região do planalto das araucarias do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* **10**(1): 11-24.

Vogel S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Abhandlungen Akademie Wissenschaften Mathematisch-Naturwissenschaften Klasse, Tropische und Subtropische Pflanzenwelt* **7**: 1-267.

3. Conclusions du chapitre 2

L'ensemble des observations réalisées dans le cadre de cette partie de l'étude a permis de mettre en évidence les principaux points suivants :

- La monophylie du genre *Sisyrrinchium* est fortement soutenue mais les principaux clades observés au sein de la phylogénie du genre indiquent que la classification infragénérique actuelle devrait faire l'objet d'une révision majeure. En effet, les résultats indiquent que de nombreux états de caractères morphologiques utilisés pour établir les subdivisions à l'intérieur du genre sont homoplasiques.

- Pollen et lipides sont les seules ressources disponibles pour les pollinisateurs au sein du genre *Sisyrrinchium*. Il ne semble pas qu'il existe de différence majeure en ce qui concerne la présence de pollenkitt et le contenu en sucres des grains de pollen entre les espèces possédant des élaïophores et celles qui en sont dépourvues.

- L'apparition des élaïophores de type trichome à l'intérieur du genre *Sisyrrinchium* a joué un rôle majeur dans la diversification de ce clade sur le continent américain. Ceux-ci ont évolué à deux reprises indépendamment à l'intérieur du genre. Chacune de ces évolutions est associée à des changements écologiques et géographiques majeurs et a certainement contribué à la dispersion du genre à l'intérieur des deux zones principales de diversité identifiées en Amérique du Sud : le bassin du Paraná d'une part et les sud de la chaîne des Andes d'autre part. La dispersion de *Sisyrrinchium* en Amérique du Nord s'est accompagnée de la perte de la capacité des trichomes floraux à produire des lipides et il ne s'est pas produit de transition vers la production de nectar parmi les espèces concernées.

- Des nectaires épithéliaux se sont développés sur la colonne staminale de plusieurs espèces au sein du genre *Olsynium* et d'une seule des deux espèces du genre *Solenomelus*. Les nectaires observés au sein de ces deux genres résultent de phénomènes évolutifs indépendants et apparemment sans rapport avec l'apparition des élaïophores de type trichome à l'intérieur du genre *Sisyrrinchium*.

Néanmoins, des études complémentaires sont indispensables afin de compléter ces conclusions. En effet, la phylogénie obtenue dans le cadre de cette étude n'a pas permis d'identifier avec précision la zone géographique correspondant au centre d'origine du genre *Sisyrrinchium* et la résolution des polytomies observées au niveau du nœud le plus profond ainsi qu'à l'intérieur de plusieurs clades majeurs est indispensable afin de reconstruire de manière plus précise l'histoire évolutive du genre. L'utilisation de marqueurs nucléaires à

copie unique ou à faible nombre de copies particulièrement utiles pour résoudre les relations phylogénétiques entre espèces proches constituerait une stratégie d'approche. Celle-ci devrait être menée de manière concomitante avec la constitution d'un échantillonnage plus large au sein de la vaste zone géographique couvrant l'Amérique Centrale et le nord des Andes afin d'identifier de manière plus précise le centre d'origine du clade et d'affiner le scénario de dispersion du genre à travers le continent américain. Par ailleurs, la constitution de ce nouveau jeu de données devra s'accompagner d'une étude approfondie des états de caractères morphologiques, anatomiques et cytologiques au sein du genre afin de définir les synapomorphies qui serviront de base à l'établissement d'une nouvelle classification infragénérique mais qui pourront aussi être utilisés pour tester l'existence de corrélations entre l'apparition des élaïophores et le changement d'état d'autres caractères qui pourraient aussi avoir joué un rôle sur l'évolution des taux de diversification à l'intérieur du genre et l'émergence de ce système de pollinisation spécialisé.

Enfin, la rareté des données concernant la biologie de la reproduction et plus particulièrement la biologie de la pollinisation de la plupart des espèces de la tribu des *Sisyrinchieae* constitue un handicap majeur pour la comprendre l'histoire évolutive des structures sécrétrices de lipides et de nectar à l'intérieur des fleurs de ce groupe taxonomique. De même que cela a été constaté à l'échelle des *Iridoideae*, il semble donc indispensable de constituer un jeu de données fiable concernant les relations plantes pollinisateurs afin de confirmer les hypothèses résultant des observations réalisées au cours de cette étude dans un cadre phylogénétique plus large et plus robuste.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1. Conclusion générale

Au cours de son histoire évolutive, la dispersion de la famille des Iridaceae à l'intérieur de la zone néotropicale et des régions tempérées adjacentes s'est accompagnée de l'apparition chez de nombreuses espèces de structures florales sécrétrices de lipides collectés par des abeilles spécialisées de la famille des Apidae. Ces structures, appelées élaïophores et formées de trichomes glandulaires, constituent une des caractéristiques principales de trois des cinq tribus qui composent la sous-famille des Iridoideae. En outre, parmi les 11 familles d'angiospermes où ce type de structure glandulaire s'est développé, les Iridaceae se distinguent par l'existence de multiples évolutions indépendantes ayant conduit à l'apparition des élaïophores, caractéristique que cette famille semble ne partager qu'avec les Orchidaceae. Parmi les genres d'Iridoideae où se sont produites ces transitions, *Sisyrinchium*, de par sa richesse spécifique remarquable au sein de la famille et son extension à travers une grande partie du continent américain, constitue probablement un cas exceptionnel au sein des Iridaceae. En effet, regroupant à lui seul plus du tiers de l'ensemble des espèces où se sont développés des élaïophores chez les Iridaceae, les relations plantes-pollinisateurs spécialisées qui sont associées à l'existence de ces structures pourraient avoir joué un rôle prépondérant dans le succès évolutif de ce genre à l'échelle continentale.

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse apporte un éclairage nouveau sur l'évolution et la diversité des élaïophores, mais aussi des autres structures glandulaires florales susceptibles d'être impliquées dans la pollinisation, aussi bien à l'échelle de la sous-famille des Iridoideae qu'à celle du genre *Sisyrinchium*.

Le premier objectif de cette thèse était d'éclaircir, à ces deux échelles taxonomiques, les relations phylogénétiques de nombreux taxons mal connus ou dont la position phylogénétique n'avait jamais été testée au moyen de phylogénies moléculaires. La production de phylogénies robustes à ces deux échelles taxonomiques devait servir d'une part à clarifier la systématique des groupes taxonomiques étudiés et d'autre part à disposer d'un cadre phylogénétique permettant de réaliser l'ensemble des autres objectifs poursuivis.

Les résultats confirment sans équivoque la monophylie des trois tribus Tigridaeae, Trimezieae et Sisyrinchieae, cette dernière constituant le groupe frère du clade formé par les deux précédentes. Alors que les subdivisions génériques sont fortement soutenues à l'intérieur de la tribu des Sisyrinchieae, la phylogénie indique que ce n'est pas le cas pour les Trimezieae et les Tigridaeae.

En établissant la classification la plus récente de la famille, Goldblatt & Manning (2008) avaient déjà souligné que la circonscription des genres à l'intérieur de ces deux tribus, en prenant en compte des variations mineures de caractères morphologiques floraux, ne reflétait pas les liens de parenté entre espèces regroupées au sein d'un même genre. Ces auteurs soulignaient notamment que le nombre de genres reconnus à l'intérieur de la tribu des Tigridaeae, devrait probablement être fortement réduit à l'avenir. L'absence de consensus en ce qui concerne les caractères diagnostiques qui devraient être retenus pour définir les genres et l'absence d'information phylogénétique pour de nombreux taxons à l'intérieur de ces deux tribus ne permettaient pas jusqu'à aujourd'hui de proposer une classification respectant le principe de monophylie.

De ce point de vue, la phylogénie réalisée dans cette thèse fournit un cadre de réflexion beaucoup plus solide que ce qui existait jusqu'à maintenant et les observations qui en découlent viennent renforcer le constat qui avait été fait, tout en soulignant que les problèmes de systématique diffèrent entre les Trimezieae et les Tigridaeae.

Dans le premier cas, la subdivision de la tribu en trois genres (*Neomarica*, *Pseudotrimezia* et *Trimezia*) n'est pas remise en cause. Par contre, les espèces de la section *Juncella* appartenant au genre *Trimezia* s'avèrent plus proches phylogénétiquement des espèces du genre *Pseudotrimezia* que de celles formant la section *Trimezia*. Ces dernières sont en effet rassemblées dans un clade nettement séparé du clade englobant le genre *Pseudotrimezia* et les espèces de la section *Juncella* du genre *Trimezia*. Afin de respecter le principe de monophylie, les résultats suggèrent une révision de ces deux genres afin que leurs délimitations correspondent à celles des clades identifiés.

L'examen de la phylogénie des Tigridaeae révèle que les sous-tribus antérieurement définies (Cipurinae et Tigridiinae) ne sont pas monophylétiques. Néanmoins, deux clades ont été identifiés (clades A et B) dont le rang taxonomique pourrait correspondre à celui de sous-tribu car ils forment la dichotomie majeure au sein de la tribu des Tigridaeae.

A l'intérieur de ces deux clades, les relations phylogénétiques déterminées lors de cette étude ont montré que les six genres (*Calydorea*, *Cypella*, *Gelasine*, *Mastigostyla*, *Nemastylis* et *Tigridia*) qui représentent plus de 70% de la richesse spécifique de la tribu ne sont pas monophylétiques. A partir de ces résultats, nous suggérons que les divisions génériques fassent l'objet d'une révision à l'échelle de la tribu en adoptant la même philosophie que celle qui a été retenue pour la révision de genres majeurs au sein de la sous-famille des Crocoideae (Goldblatt & Manning, 2002, 2007; Manning & Goldblatt, 2005) et des Iridoideae (Goldblatt et al., 2002), qui considère que des variations mineures de la morphologie florale ne peuvent à elles seules constituer des états de caractère diagnostiques à l'échelle du genre.

Enfin, la phylogénie produite à l'échelle du genre *Sisyrinchium* a permis de mettre en évidence 9 clades majeurs dont le rang taxinomique se situe entre le genre et l'espèce. Leur existence invalide l'existence des sous-genres et sections définies dans les classifications antérieures (Goldblatt et al., 1990; Ravenna, 2000, 2002, 2003) et ouvre la voie à la définition de nouvelles subdivisions respectant le principe de monophylie.

Le second objectif de cette thèse consistait à retracer l'histoire évolutive des structures florales productrices de lipides et de nectar aux deux échelles taxonomiques. A partir de ces données, le troisième objectif était de tester si l'évolution des élaïophores, et plus largement des structures florales productrices de ressources susceptibles d'être utilisées par les pollinisateurs, avait pu jouer un rôle dans la diversité spécifique aujourd'hui observée.

A l'échelle des Iridoideae, deux principales informations caractérisent l'évolution de ces structures glandulaires. L'existence d'apparitions multiples, suivies de nombreuses reversions, essentiellement à l'intérieur de la tribu des Tigridaeae, mais aussi au sein des Trimezieae et des Sisyrinchieae, constitue la première d'entre elles. La seconde information essentielle est l'augmentation du taux de diversification des lignées dans lesquelles les trichomes producteurs de nectar ou de lipides, constituant l'essentiel des structures glandulaires identifiées, sont présents. Les analyses ont de plus montré que l'apparition des élaïophores de type trichome ne semblait pas avoir entraîné à elle seule de changements de taux de diversification.

Cet ensemble de constatations nous a permis de formuler une nouvelle hypothèse quant aux facteurs qui pourraient avoir été à l'origine de la diversification de la sous-famille sur le continent américain. Les structures glandulaires sécrétrices de nectar ou de lipides étant généralement associées à différents types de stratégies de pollinisation, la labilité importante

de ce caractère pourrait être corrélée avec l'existence de multiples changements de système de pollinisation au cours de l'histoire évolutive des Iridoideae, conférant aux membres de cette sous-famille une capacité accrue d'adaptation et de dispersion au sein de la zone néotropicale et des zones tempérées immédiatement adjacentes. L'apparition de trichomes glandulaires sécrétant du nectar ou des lipides au sein des fleurs d'un grand nombre d'espèces ne serait dans ce contexte qu'un des facteurs ayant joué un rôle dans le succès évolutif de ce groupe de végétaux.

Le scénario évolutif le plus probable à l'échelle du genre *Sisyrinchium* présente des caractéristiques différentes. L'apparition de trichomes glandulaires floraux se serait produite à trois reprises de manière indépendantes, deux de ces apparitions ayant conduit au développement d'élaïophores. Ces événements seraient associés à la dispersion du genre dans le sud des Andes d'une part et le bassin du Paraná d'autre part. Ces deux régions constituent les deux centres majeurs de diversité de *Sisyrinchium* en Amérique du Sud. Une réversion majeure se serait ensuite produite lors de la dispersion du genre en Amérique du Nord, les trichomes encore présents sur les fleurs des espèces de cette région ne produisant ni nectar ni lipides.

Le taux de spéciation au sein des lignées où sont présents les élaïophores est en outre significativement supérieur à celui des lignées qui en sont dépourvues, cet accroissement ayant pour conséquence une augmentation d'un facteur supérieur à six du taux de diversification.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'apparition des élaïophores a certainement joué un rôle prépondérant dans la diversification du genre *Sisyrinchium* à l'intérieur des deux zones principales de diversité identifiées en Amérique du Sud.

En dehors des résultats proprement dits, le travail réalisé a permis de mettre en évidence qu'au regard des objectifs de cette thèse, la rareté des données disponibles concernant non seulement les caractéristiques morphologiques, anatomiques ou cytologiques, mais aussi la biologie de la pollinisation de la majorité des espèces incluses dans les différents volets de cette étude, constituait un handicap majeur. Ces données sont en effet indispensables afin de poursuivre la démarche engagée pour mieux comprendre la systématique des différents groupes taxonomiques étudiés, et évaluer la robustesse des hypothèses qui ont été émises concernant l'importance de l'évolution des stratégies de pollinisation à différentes échelles taxonomiques.

2. Perspectives

La construction d'une banque de données incluant un large échantillonnage des caractères susmentionnés constituerait un outil indispensable en vue non seulement de répondre aux questions de systématique mais aussi de mieux comprendre l'histoire évolutive des Iridaceae sur le continent américain. En effet, cela permettrait d'identifier les changements d'états de caractère associé à l'apparition de tel ou tel clade et ainsi de définir les synapomorphies qui les caractérisent. Le programme PROTEUS (<http://eflower.myspecies.info/proteus>) constitue à cet égard un outil particulièrement performant. A partir de ces données, il serait aussi envisageable d'observer la manière dont ces caractères ont évolué au cours du temps les uns par rapport aux autres et, par le biais des outils d'analyse comparative, de tester l'existence de corrélations entre les états de différents caractères.

En parallèle, le rôle supposé des changements de stratégies de pollinisation à l'échelle des Iridoideae et celui de la pollinisation avec récompense lipidique à l'échelle du genre *Sisyrinchium* doivent être confirmés par une caractérisation beaucoup plus fine des relations plantes-pollinisateurs sur une gamme d'espèces suffisamment large à ces deux échelles taxonomiques pour pouvoir en tirer des informations statistiquement fiables. Outre les données concernant les pollinisateurs (identification, comportement, fréquences de visite), les informations recueillies devront aussi concerner la biologie reproductive des espèces végétales étudiées (degré d'autocompatibilité, taux de fécondité, production et viabilité du pollen, production de ressources, émission d'odeurs, phénologie de la floraison) afin de pouvoir évaluer de manière plus précise le degré de complexité des interactions plantes-pollinisateurs et d'évaluer le rôle éventuel des changements de systèmes de pollinisation sur le processus de radiation. Ces observations pourraient aussi permettre de déterminer le rôle de la relation interspécifique dans l'évolution des caractères floraux associés aux pressions de sélection exercés par les pollinisateurs.

Enfin, l'échantillonnage et la robustesse des phylogénies constituent deux aspects fondamentaux qui devront faire l'objet d'améliorations. En premier lieu, cela permettrait de connaître de manière plus précise le nombre de transitions et de réversions vers les différents états de caractère des structures glandulaires florales qui se sont produites, essentiellement parmi les Trimezieae et les Tigridieae, où la majeure partie des interrogations demeurent. A l'échelle des Iridoideae, l'effort d'échantillonnage devrait se porter sur la représentativité des principaux genres non monophylétiques afin de vérifier la validité des observations qui ont été formulées au cours de cette étude en ce qui concerne la systématique mais aussi l'histoire

évolutive des structures glandulaires florales. A l'échelle du genre *Sisyrinchium*, la constitution d'un échantillonnage plus large au sein de la zone géographique couvrant l'Amérique Centrale et le Nord des Andes serait un élément indispensable pour inférer une histoire biogéographique complète et cohérente de ce clade. L'amélioration de la résolution et de la robustesse des phylogénies moléculaires aux échelles taxinomiques auxquelles ce travail devrait être réalisé nécessite probablement le développement dans un premier temps d'un jeu de marqueurs nucléaires à copie unique ou à faible nombre de copies. Bien que plus difficiles à isoler et à caractériser que celles des génomes chloroplastiques, mitochondriaux ou de l'ADN ribosomique, couramment utilisées en systématique moléculaire, ces régions du génome nucléaire ont démontré leur utilité pour améliorer la résolution et la robustesse des reconstructions phylogénétiques aux rangs taxinomiques auxquels ce travail devrait être réalisé (Small et al., 2004). Les deux régions nucléaires à faible copie *agt1* intron 2/3 et *SQD1* déjà séquencées chez *Crocus vernus* (L.) Hill (Iridaceae: Crocoideae), ainsi que les gènes *PhyB* et *PhyC*, qui ont montré un haut degré de résolution chez les angiospermes basales, les *Areaceae*, les *Poaceae*, les *Malpighiaceae* et les *Fabaceae*, pourraient constituer dans ce cadre un premier jeu de régions candidates (Samuel et al., 2005; Li et al., 2008; Ludena et al., 2011).

BIBLIOGRAPHIE

- Aguiar AJC, Melo GAR. 2009.** Notes on oil sources for the bee genus *Caenonomada* (Hymenoptera, Apidae, Tapinotaspidini). *Revista Brasileira de Entomologia* **53(1)**: 154-156.
- Alberch P, Gould SJ, Oster F, Wake DB. 1979.** Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology* **5**: 296-317.
- Albuquerque PMC, Rego MMC. 1989.** Fenologia de abelhas visitantes de murici (*Byrsonima crassifolia*, Malpighiaceae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Sér. Zool.* **5**: 163-178.
- Aliscioni SS, Torretta JP, Bello ME, Galati BG. 2009.** Elaiophores in *Gomesa bifolia* (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams (Oncidiinae: Cymbidieae: Orchidaceae): structure and oil secretion. *Annals of Botany* **104**: 1141-1149.
- Alves-dos-Santos I. 1999.** Abelhas e plantas melíferas da mata Atlântica, restingas e dunas do litoral norte do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* **43**: 191-223.
- Alves-dos-Santos I, Melo GAR, Rozen JG. 2002.** Biology and immature stages of the bee tribe Tetrapediini (Hymenoptera: Apidae). *American Museum Novitates* **3377**: 1-45.
- Alves-dos-Santos I, Naxara SRC, Patrício ELFRA. 2006.** Notes on the morphology of *Tetrapedia diversipes* Klug 1810 (Tetrapediini, Apidae), an oil-collecting bee. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* **23(3-4)**: 425-430.
- Anderson WR. 1979.** Floral conservatism in Neotropical Malpighiaceae. *Biotropica* **11**: 219-223.
- Anderson WR. 1990.** The origin of the Malpighiaceae - The evidence from morphology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **64**: 210-224.
- Arroyo MTK, Primack R, Amersto 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.
- Bascompte J, Jordan P, Melian CJ, Olesen JM. 2003.** The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100(16)**: 9383-9387.

- Bateman RM. 1994.** Evolutionary-developmental change in growth architecture of fossil rhizomorphic lycopsids: scenarios constructed on cladistics foundations. *Biological Reviews* **69**(4): 527-597.
- Baum D, Donoghue MJ. 2002.** Transference of function, heterotopy and the evolution of plant development. In: Cronck QCB, Bateman RM, Hawkins JA. eds. *Developmental genetics and plant evolution*. Francis & Taylor, London, UK, 52-69.
- Bragança Gil AS, Bittrich V, Amaral MCE. 2009.** Seven new combinations in the genus *Neomarica* (Trimezieae-Iridaceae). *Harvard Papers in Botany* **14**(2): 97-99.
- Bronstein JL. 1994.** Our current understanding of mutualism. *The Quarterly Review of Biology* **69**(1): 31-51.
- Buchmann SL. 1983.** Buzz pollination in angiosperms. In Jones CE, Little RJ, eds. *Handbook of experimental pollination biology*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 73-113.
- Buchmann SL. 1987.** The Ecology of Oil Flowers and their Bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 343-369.
- Camillo E. 2005.** Nesting biology of four *Tetrapedia* species in trap-nests (Hymenoptera: Apidae: Tetrapediini). *Revista de Biología Tropical* **53**(1-2): 175-186.
- Cane JH, Eickwort GC, Wesley FR, Spielholz J. 1983.** Foraging, grooming, and mate-seeking behaviors of *Macropis nuda* (Hymenoptera, Melittidae) and use of *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) oils in larval provisions and cell linings. *The American Midland Naturalist*. **110**: 257-264.
- Celary W. 2004.** A comparative study on the Biology of *Macropis fulvipes* (Fabricius, 1804) and *Macropis europaea* Warcke, 1973 (Hymenoptera: Apoidea: Melittidae). *Folia Biologica* **52**(1-2): 81-85.
- Chan KMA, Moore BR. 2005.** SymmeTREE: whole-tree analysis of differential diversification rates. *Bioinformatics* **21**: 1709-1710.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, et al. 2007.** A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* **56**: 295-299.

- Chase MW, Williams NH, de Faria AD, et al. 2009.** Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany* 104: 387-402.
- Chat J, Jauregui B, Petit RJ, Nadot, S. 2004.** Reticulate evolution in kiwifruit (*Actinidia*, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies. *American Journal of Botany* 91(5): 736-747.
- van der Cingel NA. 2001.** *An atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia*. Rotterdam: AA. Balkema.
- Chukr NS. 2001.** New species of *Pseudotrimezia* and *Trimezia* (Iridaceae) and the new *Trimezia*'s infra-generic treatment. *Coleção Cadernos de estudos e Pesquisas-UNIP* 7: 1-12.
- Chukr NS, Giuliatti AM. 2001.** New combinations in the genus *Neomarica* (Iridaceae) and its segregation from *Trimezia* on the basis of morphological features. *Novon* 11: 376-380.
- Chukr NS, Giuliatti AM. 2003.** Revisão de *Pseudotrimezia* Foster (Iridaceae). *Sitientibus Série Ciências Biológicas* 3(1/2): 44-80.
- Chukr NS, Giuliatti AM. 2008.** Revisão de *Trimezia* Salisb. Ex Herb. (Iridaceae) para o Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas* 8(1): 15-58.
- Cocucci AA. 1991.** Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 174: 17-35.
- Cocucci AA, Sérsic A, Roig-Alsina A. 2000.** Oil-collecting structures in Tapinotaspidini: their diversity, function and probable origin. *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* 90: 51-74.
- Cocucci AA, Vogel S. 2001.** Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora* 196(1): 26-46.
- Cosacov A, Sérsic AN, Sosa V, et al. 2009.** New insights into the phylogenetic relationships, character evolution, and phytogeographic patterns of *Calceolaria* (Calceolariaceae). *American Journal of Botany* 96(12): 2240-2255.
- Cruden RW. 1971.** The systematics of *Rigidella* (Iridaceae). *Brittonia* 23: 217-225.
- Daumann E. 1935.** Die systematische bedeutung des blutenektariums der gattung *Iris*. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* 53B: 525-625.

- Daumann E. 1970.** Das blütennektarium der monocotyledonen unter besonderer berücksichtigung seiner systematischen und phylogenetischen bedeutung. *Feddes Repertorium* **80**(7-8): 463-590.
- Davies TJ, Barraclough TG, Savolainen V, Chase MW. 2004.** Environmental causes for plant biodiversity gradients. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* **359**: 1645-1656.
- Davies KL. 2009.** Food-hair form and diversification in Orchids. In: Kull T, Arditti J, Wong SM, eds. *Orchid biology: reviews and perspectives, X*. Springer Science + Business Media B.V., USA, 159-184.
- Davies KL, Stpiczyńska M. 2009.** Comparative histology of floral elaiophores in the orchids *Rudolfiella picta* (Schltr.) Hoehne (Maxillariinae *sensu lato*) and *Oncidium ornithorhynchum* H.B.K. (Oncidiinae *sensu lato*). *Annals of Botany* **104**: 221-234.
- Davis CC, Fritsch PW, Bell CD, Mathews S. 2004.** High latitude tertiary migrations of an exclusively tropical clade: evidence from Malpighiaceae. *International Journal of Plant Sciences* **165**: S107-S121.
- Devoto M, Medan D. 2008.** Expected mating system, floral diversity and flower visitors of five species of Iridaceae of the Argentine pampas. *Acta Botánica Venezuelica* **31**(2): 425-434.
- Diaz G, Melis M, Batetta B, Angius F, Falchi AM. 2008.** Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron* **39**: 819-824.
- Dötterl S, Schäffler I. 2007.** Flower scent of floral oil-producing *Lysimachia punctata* as attractant for the oil-bee *Macropis fulvipes*. *Journal of Chemical Ecology* **33**:441-445.
- Duarte JM, Wall PK, Edger PP, et al. 2010.** Identification of shared single copy nuclear genes in *Arabidopsis*, *Populus*, *Vitis* and *Oryza* and their phylogenetic utility across various taxonomic levels. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 61.
- Dumri MSK. 2008.** Chemical analyses of non-volatile flower oils and related bee nest cell linings. PhD Thesis, Naturwissenschaftlich Fakultät II - Chemie und Physik der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, Germany.
- Dumri K, Seipold L, Schmidt J, et al. 2008.** Non-volatile floral oils of *Diascia* spp. (Scrophulariaceae). *Phytochemistry* **69**: 1372-1383.

- Emms SK, Arnold ML. 2000.** Site-to-site differences in pollinator visitation patterns in a Louisiana iris hybrid zone. *Oikos* **91**: 568-578.
- Endress, P. K. 1995.** *Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Freitas L. 2002.** Biologia da polinização em campos de altitude no Parque Nacional da Serra da Bocaina, São Paulo. PhD thesis. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.
- Freitas L, Sazima M. 2003.** Daily blooming pattern and pollination by syrphids in *Sisyrinchium vaginatum* (Iridaceae) in southeastern Brazil. *Journal of the Torrey Botanical Society* **130**(2): 55-61.
- Freudenstein JV, Chase MW. 2001.** Analysis of mitochondrial *nad1b-c* intron sequences in Orchidaceae: utility and coding of length-change characters. *Systematic Botany* **26**(3): 643-657.
- Gaglianone MC. 2000.** Interações de *Epicharis* (Apidae, Centridini) e flores de Malpighiaceae em um ecossistema de cerrado. In: Bitondi MMG, Hartfelder K, eds. *Anais do 4º. Encontro sobre Abelhas*. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Brasil, 246-252.
- Gimenes M, Lobão CS. 2006.** A polinização de *Krameria bahiana* B.B. Simpson (Krameriaceae) por abelhas (Apidae) na Restinga, BA. *Neotropical Entomology* **35**(4): 440-445.
- Glover, JG. 2007.** *Understanding flowers and flowering*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Goldblatt P. 1982.** Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of neotropical Iridaceae. *Systematic Botany* **7**: 186-198.
- Goldblatt P. 1990.** Phylogeny and classification of Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**(4): 607-627.
- Goldblatt P. 1991.** An overview of the systematics, phylogeny and biology of the southern African Iridaceae. *Contributions from the Bolus Herbarium* **13**: 1-74.
- Goldblatt P. 1993.** *The woody Iridaceae: systematics, biology and evolution of Nivenia, Klattia and Witsenia*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.

- Goldblatt P, Bernhardt P. 1999.** Pollination of *Moraea* species (Iridaceae) with a staminal column. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**: 47-56.
- Goldblatt P, Henrich JE. 1991.** *Calydorea* Herbert (Iridaceae-Tigridieae): notes on this New World genus and reduction to synonymy of *Salpingostylis*, *Cardiostigma*, *Itysa*, and *Catila*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **78**: 504-511.
- Goldblatt P, Manning JC. 2002.** Evidence for moth and butterfly pollination in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**: 758-774.
- Goldblatt P, Manning JC. 2006.** Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. *Annals of Botany* **97**: 317-344.
- Goldblatt P, Manning JC. 2007.** A revision of the southern African genus *Babiana* (Iridaceae: Crocoideae). *Strelitzia* **18**.
- Goldblatt P, Manning JC. 2008.** *The Iris family - natural history and classification*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- Goldblatt P, Henrich JE, Rudall P. 1984.** Occurrence of crystals in Iridaceae and allied families and their phylogenetic significance. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **71**(4): 1013-1020.
- Goldblatt P, Rudall P, Henrich JE. 1990.** The genera of the *Sisyrinchium* alliance (Iridaceae: Iridoideae): phylogeny and relationships. *Systematic Botany* **15**(3): 497-510.
- Goldblatt P, Manning JC, Bernhardt P. 1999.** Evidence of bird pollination in the Iridaceae of southern Africa. *Adansonia, 3 séries* **21**: 25-40.
- Goldblatt P, Bernhardt P, Manning JC. 2000a.** Adaptive radiation of pollination mechanisms in *Ixia* (Iridaceae: Crocoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **87**: 564-577.
- Goldblatt P, Manning JC, Bernhardt P. 2000b.** Adaptive radiation of pollination mechanisms in *Sparaxis* (Iridaceae: Ixioideae). *Adansonia* **22**: 243-262.
- Goldblatt P, Manning JC, Bernhardt P. 2001.** Radiation of pollination systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae): a progression from a generalist to a specialist pollination system. *Adansonia* **24**: 243-262.

- Goldblatt P, Savolainen V, Porteous O, et al. 2002a.** Radiation in the Cape flora and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. *Molecular Phylogeny and Evolution* **25**: 341-360.
- Goldblatt P, Bernhardt P, Manning JC. 2002b.** Floral biology of *Romulea* (Iridaceae: Crocoideae) in Southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**: 713-734.
- Goldblatt P, Bernhardt P, Manning JC. 2009.** Adaptative radiation of the putrid perianth: *Ferraria* (Iridaceae: Irideae) and its unusual pollinators. *Plant Systematics and Evolution* **278**(1-2): 53-65.
- Goldblatt P, Nänni I, Bernhardt P, Manning JC. 2004.** Floral biology of *Hesperantha* (Iridaceae: Crocoideae): how minor shifts in floral presentation change the pollination system. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **91**: 186-206.
- Goldblatt P, Davies TJ, Manning JC, van der Bank M, Savolainen V. 2006.** Phylogeny of Iridaceae subfamily Crocoideae based on plastid DNAs. *Aliso* **22**: 399-411. In: Columbus JT, Friar EA, Porter JM, Prince LM, Simpson MG, eds. *Monocots: comparative biology and evolution 2*. Claremont: Rancho Santa Ana Botanic Garden.
- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, et al. 2008.** Iridaceae ‘Out of Australasia’? Phylogeny, Biogeography, and Divergence Time Based on Plastid DNA Sequences. *Systematic Botany* **33**: 495-508.
- Gottsberger G. 1996.** Some pollination strategies in neotropical savannas and forests. *Plant Systematics and Evolution* **152**: 29-45.
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. 1985.** Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipids droplets. *The Journal of Cell Biology* **100**: 965-973.
- Henrich JE, Goldblatt P. 1987.** The Mesoamerican *Neomarica* (Iridaceae). *N. variegata* Henrich & Goldblatt, comb. nov. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **74**: 911.
- Henrich JE, Goldblatt P. 1994.** In: Davidse G, Sousa M, Charter AQ (Eds.). *Flora Mesoamericana: Alismataceae a Cyperaceae*. Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden and The Natural History Museum. Vol. 6. México, D.F., Mexico, 71-80.
- Hollingsworth ML, Clark A, Forrest LL, et al. 2009.** Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources* **9**: 439-457.

- Johnson SD, Bond WJ. 1994.** Red flowers and butterfly pollination in the fynbos of South Africa. In: Arianoutsou M, Groves RH. eds. *Plant-animal interactions in Mediterranean-type ecosystems*. The Hague: Kluwer Academic Publishers, London, UK, 137-148.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. 2005.** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**(23): 8369-8374.
- Lee J. 1994.** Fatty oil production by *Alophia drummondii* (Iridaceae) and modified oil collecting behavior of *Centris* (Centridini-Apidae). Master's thesis, University of Texas, Austin, USA.
- Li M, Wunder J, Bissoli G, et al. 2008.** Development of COS genes as universally amplifiable markers for phylogenetic reconstructions of closely related plant species. *Cladistics* **24**: 727-745.
- Ludeña B, Chabrilla N, Aberlenc-Bertossi F, Adam H, Tregear JW, Pintaud JC. 2011.** Phylogenetic utility of the nuclear genes AGAMOUS 1 and PHYTOCHROME B in palms (Arecaceae): an example within Bactridinae. *Annals of Botany*, in press. doi: 10.1093/aob/mcr191.
- Machado IC. 2004.** Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. In: Freitas B, Pereira JOP, eds., *Solitary Bees, Conservation, Rearing and Management for Pollination*. Editora Universitária: Fortaleza, BR, 255-280.
- Machado IC, Vogel S, Lopes AV. 2002.** Pollination of *Angelonia cornigera* Hook. (Scrophulariaceae) by long-legged, oil-collecting bees in NE Brazil. *Plant Biology* **4**: 352-359.
- Maddison WP, Midford PE, Otto SP. 2007.** Estimating a binary character's effect on speciation and extinction. *Systematic Biology* **56**: 701-710.
- Manning JC, Goldblatt P. 1990.** Endothecium in Iridaceae and its systematic implications. *American Journal of Botany* **77**: 527-532.
- Manning JC, Goldblatt P. 2002.** The pollination of *Tritionopsis parviflora* (Iridaceae) by the oil-collecting bee *Rediviva gigas* (Hymenoptera: Melittidae): the first record of oil-secretion in African Iridaceae. *South African Journal of Botany* **68**: 171-176.

- Manning JC, Goldblatt P. 2005.** Radiation of pollination systems in the Cape genus *Tritionopsis* (Iridaceae: Corcoideae) and the development of bimodal pollination strategies. *International Journal of Plant Sciences* **166**(3): 459-474.
- Maulau U. 1988.** Scrophulariaceae-Part I. Calceolarieae. *Flora Neotropica* **47**: 1-326.
- Melo GAR, Gaglianone MC. 2005.** Females of *Tapinotaspoides*, a genus in the oil-collecting bee tribe Tapinotaspidini, collect secretions from non-floral trichomes (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia* **49**(1): 167-168.
- Memmot J. 1999.** The structure of a plant-pollinator food web. *Ecology letters* **2**(5): 276-280.
- Mickeliunas L, Pansarin E, Sazima M. 2006.** Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucessoreprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 251–258.
- Michener C.D. 2007.** *The bees of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA.
- Minckley RL, Roulston TH. 2006.** Incidental mutualisms and pollen specialization among bees. In: Waser NM, Ollerton J. eds. *Plant-Pollinator Interactions: from Specialisation to Generalisation*. University of Chicago Press, London, UK, 69-98.
- Molseed E. 1968.** *Fosteria*, a new genus of Mexican Iridaceae. *Brittonia* **20**: 232-234.
- Molseed E. 1970.** The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. *University of California Publications in Botany* **54**: 1-126.
- Molseed E, Cruden RW. 1969.** *Sessilanthera*, a new genus of American Iridaceae. *Brittonia* **21**: 191-193.
- Neff JL, Simpson BB. 1981.** Oil-collecting structures in the Anthophoridae (Hymenoptera): morphology, function, and use in systematics. *Journal of the Kansas Entomological Society* **54**(1): 95-123.
- Ollerton J, Armbruster WC, Vásquez DP. 2006.** The ecology and evolution of specialized and generalized pollination. In: Waser NM, Ollerton J. eds. *Plant-Pollinator Interactions: from Specialisation to Generalisation*. University of Chicago Press, London, UK, 19-22.

- Oxelman B, Kornhall ER, Olmstead RG, Bremer B. 2005.** Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon* **54**: 411-425.
- Pacek A, Stpiczyńska M. 2007.** The structure of elaiophores in *Oncidium cheirophorum* Rchb.f. and *Ornithocephalus kruegeri* Rchb.f. (Orchidaceae). *Acta Agrobotanica* **60(2)**: 9-14.
- Pansarin ER, Pansarin LM. 2011.** Reproductive biology of *Trichocentrum pumilum*: an orchid pollinated by oil-collecting bees. **13**: 576-581.
- Pansarin LM, De Moraes Castro M, Sazima M. 2009.** Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 408-415.
- Rasmussen C. 1999.** Coevolution of the oil bee-*Calceolaria* system in the Andes of Peru. Master of Science Thesis, University of Aarhus, Denmark, IV + 87 pp.
- Rasmussen C, Olesen JM. 2000.** Oil flowers and oil-collecting bees. *Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk Naturvidenskapelige Klasse, Skrifter* **39**: 23-31.
- Ravenna P. 1977.** Neotropical species threatened and endangered by human activity in the Iridaceae, Amaryllidaceae and allied bulbous families. In: Prance, GT, Elias TS. Eds. *Extinction is forever*. New York Botanical Garden, New York, USA, 257-263.
- Ravenna P. 1979.** *Ainea*, a new genus of iridaceae from Mexico. *Botaniska Notiser* **132(4)**: 467-469.
- Ravenna P. 1981a.** Eight new species and two new subspecies of *Cypella* (Iridaceae). *Wrightia* **7(1)**: 13-22.
- Ravenna P. 1981b.** A submerged new species of *Cypella* (Iridaceae), and a new section for the genus (s.str.). *Nordic Journal of Botany* **1**: 489-492.
- Ravenna P. 1981c.** *Kelissa*, a new genus of Iridaceae from South Brazil. *Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle, 4 sér., sect. B, Adansonia* **3(1)**:105-110.
- Ravenna P. 1983.** *Catila* and *Onira*, two new genera of South American Iridaceae. *Nordic Journal of Botany* **3(2)**: 197-205.
- Ravenna P. 1984.** Notes on Iridaceae. VI. *Phytologia* **56(4)**: 193.
- Ravenna P. 1988.** New species and miscellaneous notes in the genus *Trimezia* (Iridaceae)-II. *Onira Leaflets* **1(1)**: 1-15.

- Ravenna P. 1989.** A new species of *Herbertia* (Iridaceae) from SE South America. *Nordic Journal of Botany* **9**(1): 55-56.
- Ravenna P. 2000.** Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) VI. *Onira Leaflets* **5**(4): 13-19.
- Ravenna P. 2001.** The Iridaceae of the Cuyo region - Argentina. *Onira Leaflets* **6**(1): 1-18.
- Ravenna P. 2002.** Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) IX. *Onira Leaflets* **7**(6): 20-41.
- Ravenna P. 2003.** Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) XI. *Onira Leaflets* **8**(13): 48-54.
- Ravenna P. 2009.** A survey in the genus *Cypella* and its allies (Iridaceae). *Onira Leaflets* **12**(1): 1-10.
- Reeves G, Chase MX, Goldblatt P, et al. 2001.** A phylogenetic analysis of Iridaceae based on four plastid sequence regions: *trnL* intron, *trnL-F* spacer, *rps4* and *rbcL*. *American Journal of Botany* **88**: 2074-2087.
- Reis MG, de Faria AD, Bittrich V, Amaral MCE, Marsaioli AJ. 2000.** The chemistry of flower rewards-*Oncidium* (Orchidaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **11**: 600-608.
- Reis MG, Singer RB, Gonçalves R, Marsaioli AJ. 2006.** The chemical composition of the floral oils of *Phymatidium delicatulum* and *Phymatidium tillandsioides* (Orchidaceae). *Natural Products Communication* **1**: 757-761.
- Renner SS, Schaefer H. 2010.** The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **365**: 423-435.
- Rodríguez A. 1999.** Molecular and morphological systematics of the “tiger flower” group (tribe Tigridieae: Iridaceae), biogeography and evidence for the adaptative radiation of the subtribe Tigridiinae. PhD Thesis, University of Wisconsin, Madison, USA.
- Rodríguez A, Sytsma KJ. 2006.** Phylogenetics of the “Tiger-flower” group (Tigridieae: Iridaceae) based on molecular and morphological evidence. *Aliso* **22**: 412-424.

- Roig-Alsina A. 1997.** A generic study of the bees of the tribe Tapinotaspidini, with notes on the evolution of their oil-collecting structures. *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* **87**: 3-21.
- Roig-Alsina A. 1999.** Revisión de las abejas colectoras de aceites del género *Chalepogenus* Holmberg (Hymenoptera, Apidae, Tapinotaspidini). *Revista do Museo Argentino de Ciencias Naturais* n.s. **1**: 67-101.
- Roubik DW. 1989.** *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press, New York, USA.
- Rozen JG, Melo GAR, Aguiar JC, Alves-dos-Santos I. 2006.** Nesting biologies and immature stages of the Tapinotaspidine bee genera *Monoeca* and *Lanthanomalissa* and their osirine cleptoparasites *Protosiris* and *Parepeolus* (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *American Museum Novitates* **3501**: 1-60.
- Rudall P. 1995.** *Anatomy of the monocotyledons. VIII. Iridaceae*. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Rudall PJ, Bateman RM. 2002.** Roles of synorganisation, zygomorphy and homeosis in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. *Botanical Reviews* **77**: 403-441.
- Rudall PJ, Goldblatt P. 2000.** Floral anatomy and systematic position of *Diplarrhena* (Iridaceae): a new tribe Diplarrheneae. *Annali di Botanica* **58**: 60-66.
- Rudall PJ, Kenton AY, Lawrence TJ. 1986.** An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Botanical Gazette* **147**(4): 466-477.
- Rudall PJ, Manning JC, Goldblatt P. 2003.** Evolution of floral nectaries in Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **90**: 613-631.
- Sacchetti G, Romagnoli C, Nicolette M, et al. 1999.** Glandular trichomes of *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae): histochemistry, development and ultrastructure. *Annals of Botany* **83**: 87-92.
- Samuel R, Kathriarachchi H, Hoffmann P, Barfuss MHJ, Wurdack KJ, Davis CC, Chase MW. 2005.** Molecular phylogenetics of Phyllanthaceae: evidence from plastid matK and nuclear PHYC sequences. *American Journal of Botany* **92**(1): 132-141.

- Sang T. 2002.** Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **37**(1): 121-147.
- Sapir Y, Schmida A, Ne'eman G. 2005.** Pollination of *Oncocyclus* irises (*Iris*: Iridaceae) by night sheltering male bees. *Plant Biology* **7**: 417-424.
- Sapir Y, Schmida A, Ne'eman G. 2006.** Morning floral heat as a reward to the pollinators of the *Oncocyclus* irises. *Oecologia* **147**: 53-59.
- Sazima M, Sazima I. 1989.** Oil-gathering bees visit flowers of eglandular morphs of the oil-producing Malpighiaceae. *Botanica Acta* **102**: 106-111.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, et al. 2005.** The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **92**(1): 142–166.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* **94**(3): 275–288.
- Schlindwein C. 1995.** Wildbienen und ihre trachtpflanzen in einer südbrasilianischen buschlandshaft: fallstudie Guaritas, bestäubung bei kakteen und loasaceen. Ph.D dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Biology. Ulrich E. Grauer Verlag, Tübingen, Germany.
- Schlindwein C. 1998.** Frequent oligolecty characterizing a diverse bee-plant community in a xerophytic bushland of subtropical Brazil. *Studies on Neotropical Fauna & Environment* **33**: 46-59.
- Sigrist MR, Sazima M. 2004.** Pollination and reproductive biology of twelve species of Neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. *Annals of Botany* **94**: 33-41.
- Silvera K. 2002.** Adaptive radiation of oil-reward compound among Neotropical orchid species (Oncidiinae). MSc Thesis, University of Florida, USA.
- Simpson BB. 1982.** *Krameria* (Krameriaceae) flowers: orientation and elaiophore morphology. *Taxon* **31**(3): 517-528.
- Simpson BB. 1989.** Krameriaceae. *Flora Neotropica* **49**: 1-109.

- Simpson BB, Neff JL. 1981.** Floral rewards: Alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 301-322.
- Simpson BB, Neff JL, Seigler DS. 1983.** Floral biology and floral rewards of *Lysimachia* (Primulaceae). *The American Midland Naturalist* **110**(2): 249-256.
- Simpson BB, Neff JL, Dieringer G. 1990.** The production of floral oils by *Monttea* (Scrophulariaceae) and the function of tarsal pads in *Centris* bees. *Plant Systematics and Evolution* **173**: 209-222.
- Simpson BB, Salywon A. 1999.** Krameriaceae ratany family. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science* **32**(1): 57-61.
- Simpson BB, Weeks A, Helfgott DM, Larkin LL. 2004.** Species relationships in *Krameria* (Krameriaceae) based on ITS sequences and morphology: implications for character utility and biogeography. *Systematic Botany* **29**(1): 97-108.
- Singer RB, Cocucci AA. 1999.** Pollination mechanisms in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. *Lyndleyana* **14**: 47-56.
- Singer RB, Marsaioli AJ, Flach A, Reis MG. 2006.** The ecology and chemistry of pollination in Brazilian orchids: recent advances. In: Teixeira da Silva J, ed. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*, Vol. IV. Isleworth, Middlesex: Global Science Books, 569-582.
- Small RL, Cronn RC, Wendel JF. 2004.** Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Australian Systematic Botany* **17**: 145-170.
- Sung IH, Dubitzky A, Eardley C, Yamane S. 2009.** Descriptions and biological notes of *Ctenoplectra* bees from Southeast Asia and Taiwan (Hymenoptera Apidae: Ctenoplectrini) with a new species from North Borneo. *Entomological Science* **12**: 324-340.
- Steiner KE. 1989.** A second species of the amphi-atlantic genus *Alonsoa* (Scrophulariaceae) in South Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **76**(4): 1152-1159.
- Steiner KE. 1998.** The evolution of beetle pollination in a South African Orchid. *American Journal of Botany* **85**(9): 1180-1193.
- Steiner KE, Whitehead VB. 1988.** The association between oil-producing flowers and oil-collecting bees in the Drakensberg of southern Africa. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **25**: 259-277.

- Steiner KE, Whitehead VB. 1990.** Pollinator adaptation to oil-secreting flowers - *Rediviva* and *Diascia*. *Evolution* **44**(6): 1701-1707.
- Steiner KE, Whitehead VB. 1991.** Oil flowers and oil bees: further evidence for pollination adaptation. *Evolution* **45**(6): 1493-1501.
- Steiner KE, Whitehead VB. 1996.** The consequences of specialization for pollination in a rare South African shrub, *Ixianthes retzioides* (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution* **201**: 131-138.
- Steiner KE, Whitehead VB. 2002.** Oil secretion and the pollination of *Colpias mollis* (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution* **235**: 53-66.
- Stpiczyńska M, Davies KL, Gregg A. 2007.** Elaiophore diversity in three contrasting members of the Oncidiinae Benth. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **155**: 135-148.
- Stpiczyńska M, Davies KL. 2008.** Elaiophore structure and oil secretion in flowers of *Oncidium trulliferum* Lindl. and *Ornithophora radicans* (Rchb.f.) Garay & Pabst (Oncidiinae: Orchidaceae). *Annals of Botany* **101**: 375-384.
- Texeira LAG, Machado IC. 2000.** Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* **14**(3): 347-357.
- Thompson JN. 1999.** The evolution of species interactions. *Science* **284**: 2116-2118.
- Toscano de Brito AVL. 2001.** Systematic review of the *Ornithocephalus* group (Oncidiinae; Orchidaceae) with comments on *Hofmeisterella*. *Lindleyana* **16**: 157-217.
- Truylio B, Harter-Marques B, Engels W. 2002.** Biologia floral e polinização de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) na região do planalto das araucarias do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* **10**(1): 11-24.
- Vinson SB, Frankie GW, Williams HJ. 1996.** Chemical ecology of bees of the genus *Centris* (Hymenoptera: Apidae). *Florida Entomologist* **79**(2): 109-129.
- Vogel S. 1966.** Parfümsammelnde bienen als bestäuber von Orchidaceen und Gloxinia. *Österreichischen Botanischen Zeitschrift* **133**: 302-361.
- Vogel S. 1969.** Flowers offering fatty oil instead of nectar. In Starr RC, ed. *XI International Botanical Congress: proceedings*. University of Washington, Seattle, Washington D.C., USA, 229.

- Vogel S. 1974.** Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Abhandlungen Akademie Wissenschaften Mathematisch-Naturwissenschaften Klasse, Tropische und Subtropische Pflanzenwelt* **7**: 1-267.
- Vogel S. 1976.** *Lysimachia*: ölblumen der holarktis. *Naturwissenschaften* **63**: 44.
- Vogel S. 1981a.** Trichomatische blütennektarien bei Cucurbitaceen. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen* **55**: 325–353.
- Vogel S. 1981b.** Abdominal oil-mopping - a new type of foraging in bees. *Naturwissenschaften* **68**(12): 627-628.
- Vogel S. 1984.** The *Diascia* flower and its bee - an oil-based symbiosis in Southern Africa. *Acta Botanica Neerlandica* **33**: 509-518.
- Vogel S. 1986.** Ölblumen und ölsammelnde Bienen - Zweite Folge: *Lysimachia* und *Macropis*. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt* **54**: 147-312.
- Vogel S. 1988.** Die ölblumensymbiosen - Parallelismus und andere aspekten ihrer entwicklung in raum und zeit. *Journal of Zoological Systematic and Evolutionary Research* **26**(5): 341-362.
- Vogel S. 1990a.** Ölblumen und ölsammelnde bienen - Dritte folge, *Momordica*, *Thladiantha* und die Ctenoplectridae. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt* **73**: 1-186.
- Vogel S. 1990b.** History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **55**: 130-142.
- Vogel S, Machado IC. 1991.** Pollination of four sympatric species of *Angelonia* (Scrophulariaceae) by oil-collecting bees in NE. Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **178**: 153-178.
- Waser NM. 2006.** Specialization and generalization in plant-pollinator interactions: a historical perspective. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-Pollinator Interactions: from Specialisation to Generalisation*. University of Chicago Press, London, UK, 3-17.
- Waser NM, Chittka K, Price MV, et al. 1996.** Generalization in pollination systems and why it matters. *Ecology* **77**: 1043-1060.
- Wesselingh RA, Arnold ML. 2000.** Nectar production in Louisiana *Iris* hybrids. *International Journal of Plant Sciences* **161**: 245-251.

ANNEXES

Annexe 1 - Informations supplémentaires de l'article 1

Table S1. Primers used for amplifying and sequencing.

Primer name	Directio	PCR, sequencing	Primer sequence 5'-3'	Source
<u><i>rps4</i> + spacer <i>rps4-trnS</i></u>				
<i>rps4</i> -f	Forward	PCR,Seq	ATGTCCCGTTATCGAGGACCT	(Souza-Chies et al., 1997)
<i>trnS</i> -r	Reverse	PCR,Seq	TACCGAGGGTTTCGAATC	(Souza-Chies et al., 1997)
<u><i>rps16</i> Intron</u>				
<i>rps16</i> -f	Forward	PCR,Seq	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACT	(Oxelman et al., 1997)
<i>rps16</i> -r2	Reverse	PCR,Seq	TCGGGATCGAACATCAATTGCAA	(Oxelman et al., 1997)
<u><i>matK</i> + <i>matK</i>-5' <i>trnK</i> intron</u>				
<i>matK</i> -f1	Forward	PCR,Seq	ATGGAAGAATTACAAGGATAT	This study
<i>trnK</i> -2r	Reverse	PCR,Seq	AACTAGTCGGATGGAGTAG	(Johnston and Soltis, 1995)
<i>matK</i> -f2	Forward	Seq	CATATAAACCAATTATCAAAC	This study (internal primer)
<i>matK</i> -f3	Forward	Seq	CTTGTCTAAAGCTCAATTTTG	This study (internal primer)
<i>matK</i> -r1	Reverse	Seq	ATCCTGTACGATTGATAACC	This study (internal primer)
<i>matK</i> -r2	Reverse	Seq	AGTTTGATAATTGGTTTATATG	This study (internal primer)
<u><i>rbcL</i></u>				
<i>rbcL</i> -1f	Forward	PCR,Seq	ATGAGTTGTAGGGAGGGACT	(Reeves et al., 2001)
<i>rbcL</i> -1360r	Reverse	PCR,Seq	CTTCACAAGCAGCAGCTAGTTC	(Reeves et al., 2001)
<i>rbcL</i> -656f	Forward	Seq	TGCGTTGGAGAGACCGTTTC	This study (internal primer)
<i>rbcL</i> -675r	Reverse	Seq	GAAACGGTCTCTCCAACGC	This study (internal primer)
<u><i>trnL-F</i> region</u>				
c B49317	Forward	PCR,Seq	CGAAATCGGTAGACGCTACG	(Taberlet et al. 1991)
f A50272	Reverse	PCR,Seq	ATTTGAACTGGTGACACGAG	(Taberlet et al. 1991)
e B49873	Forward	Seq	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	(Taberlet et al. 1991)
d A49855	Reverse	Seq	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	(Taberlet et al. 1991)

Notes: Seq = sequencing

Table S2. PCR profiles for DNA amplification. (1) Initial denaturation; (2) Number of cycles; (3) Denaturation, annealing, and elongation steps for each cycle; (4) final elongation step. Temperature and duration are indicated for each step.

Locus	PCR profiles
<i>rps4</i> + spacer <i>rps4-trnS</i>	(1) 94°C-3 mn; (2) 40; (3) 94°C-1 mn, 56°C - 40 s, 72°C-1:30 mn; (4) 72°C-5 mn
<i>rps16</i> intron	(1) 94°C-3 mn; (2) 40; (3) 94°C-1 mn, 58°C - 40 s, 72°C-1:30 mn; (4) 72°C-5 mn
<i>matK</i> + <i>matK-5'trnK</i> intron	(1) 94°C-3 mn; (2) 40; (3) 94°C-1 mn, 53°C - 40 s, 72°C-2 mn; (4) 72°C-5 mn
<i>rbcL</i>	(1) 94°C-3 mn; (2) 40; (3) 94°C-1 mn, 55°C - 40 s, 72°C-2 mn; (4) 72°C-5 mn
<i>trnL-F</i> region	(1) 94°C-3 mn; (2) 40; (3) 94°C-1 mn, 56°C - 40 s, 72°C-1:40 mn; (4) 72°C-5 mn

Table S3. Data and models used in Maximum Likelihood (ML) and Bayesian analyses (BI).

Data partition	No. of positions (without primers)	Partition by codon position	Model		
			ML	BI	
<u>DNA partition</u>					
Spacer <i>rps4-trnS</i>	378			GTR+G	
<i>rps16</i> exon 2	42	X		K80	
<i>rps16</i> intron	976			GTR+G	
<i>matK</i>	1624	X		GTR+I+G	
<i>matK-5'trnK</i> intron	309			GTR+G	
<i>rbcL</i>	1360	X		GTR+I+G	
<i>trnL</i> intron	629			GTRGAMMA	GTR+G
<i>trnL</i> exon 2	50				K80
Spacer <i>trnL-trnF</i>	477				GTR+G
<u>Coded indels partition (binary character)</u>					
Spacer <i>rps4-trnS</i>	62				
<i>rps16</i> intron	66				
<i>matK-5'trnK</i> intron	73				
<i>trnL-F</i> region	129				BINGAMMA

Notes: partition by codon position = partition treated as a coding partition.

Table S4. Type and distribution of the floral glandular structures among the genera and species studied, arranged according to the classification of Goldblatt and Manning (2008).

Taxon	Floral glandular structure			Source
	Anatomical type	Secretory type	Distribution	
<i>Sisyrrhinchieae</i>				
<i>Libertia</i>	0	0	0	Goldblatt and Manning (2006, 2008)
<i>Olsynium douglasii</i>	4	5	1	Rudall et al. (2003), Chauveau et al. (2011)
<i>Olsynium filifolium</i>	Unknown	Unknown	Unknown	This study (presence of a swollen staminal colum, nectar presence not tested)
<i>Olsynium frigidum</i>	0	0	0	This study (absence of swollen staminal colum)
<i>Olsynium junceum</i>	4	5	1	Forcone et al. (1998), Chauveau et al. (2011)
<i>Olsynium scirpoideum</i>	Unknown	Unknown	Unknown	Chauveau et al. (2011) / this study (presence of a swollen staminal colum, nectar presence not tested)
<i>Orthrosanthus</i>	0	0	0	Rudall et al. (2003), Goldblatt and Manning (2006, 2008), Chauveau et al. (2011)
<i>Sisyrrinchium angustifolium</i>	1	0	0	Chauveau et al. (2011) and Silveiro, A., personal communication.
<i>Sisyrrinchium californicum</i>	0	0	0	Chauveau et al. (2011)
<i>Sisyrrinchium chilense</i>	1	2	1	Chauveau et al. (2011)
<i>Sisyrrinchium convolutum</i>	0	0	0	Chauveau et al. (2011)
<i>Sisyrrinchium micranthum</i>	1	2	1	Chauveau et al. (2011)
<i>Sisyrrinchium minus</i>	1	2	1	Chauveau et al. (2011)
<i>Sisyrrinchium palmifolium</i>	0	0	0	Chauveau et al. (2011)
<i>Sisyrrinchium aff.pusillum</i>	0	0	0	Chauveau et al. (2011) / this study
<i>Sisyrrinchium sellowianum</i>	1	2	1	Chauveau et al. (2011)
<i>Sisyrrinchium striatum</i>	1	2	3	Chauveau et al. (2011)
<i>Sisyrrinchium uliginosum</i>	1	2	1	Chauveau et al. (2011)
<i>Solenomelus pedunculatus</i>	1	0	1	Chauveau et al. (2011) and Silveiro, A., personal communication.
<i>Solenomelus segethii</i>	2	3	1	Chauveau et al. (2011) and Silveiro, A., personal communication.
<i>Trimezieae</i>				
<i>Neomarica candida</i>	1	1	2	Vogel (1974)
<i>Neomarica northiana</i>	1	1	2	Vogel (1974)
<i>Pseudotrimezia</i>	0	0	0	Chukr and Giulietti (2003), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Trimezia</i>	1	2	2	Simpson and Neff (1981), Ravenna (1988), Goldblatt and Manning (2008)

Table S4. Continued

Taxon	Floral glandular structure			Source
	Anatomical type	Secretory type	Distribution	
<i>Tigridieae</i>				
<i>Ainea</i>	0	0	0	Ravenna (1979a)
<i>Alophia sylvestris</i>	1	2	2	Henrich and Goldblatt (1994), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Alophia veracruzana</i>	0	0	0	Goldblatt and Howard (1992)
<i>Calydorea alba</i>	0	0	0	Roitman and Castillo (2005) / this study
<i>Calydorea approximata</i>	0	0	0	Goldblatt and Henrich (1991)
<i>Calydorea azurea</i>	0	0	0	Goldblatt and Henrich (1991)
<i>Calydorea basaltica</i>	0	0	0	Ravenna (2005) / this study (very few trichomes at the base of the adaxial face of tepals)
<i>Calydorea campestris</i>	0	0	0	Goldblatt and Henrich (1991) / this study (very few trichomes at the base of the adaxial face of tepals)
<i>Calydorea crocoides</i>	0	0	0	Goldblatt and Henrich (1991) / this study (very few trichomes at the base of the adaxial face of tepals)
<i>Calydorea longipes</i>	0	0	0	Ravenna (2005) / this study (very few trichomes at the base of the adaxial face of tepals)
<i>Calydorea minima</i>	0	0	0	Roitman and Castillo (2007)
<i>Calydorea pallens</i>	0	0	0	Goldblatt and Henrich (1991), Ravenna (2001)
<i>Calydorea undulata</i>	0	0	0	Ravenna (2001)
<i>Calydorea xyphioides</i>	0	0	0	Goldblatt and Manning (2008)
<i>Cardenanthus vargasii</i>	1	2	2	Goldblatt and Manning (2008) / this study
<i>Cardiostigma</i>	0	0	0	Foster (1945)
<i>Catila amabilis</i>	1	2	2	Ravenna (1983)
<i>Cipura campanulata</i>	0	0	0	Henrich and Goldblatt (1994)
<i>Cipura paludosa</i>	1	2	2	Henrich and Goldblatt(1994), (Goldblatt and Manning (2008)
<i>Cobana</i>	0	0	0	Ravenna (1974), Henrich and Goldblatt (1994), Goldblatt and manning (2008)
<i>Cypella</i>	1	2	2	Vogel (1974), Ravenna (1981a, 1981b), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Eleutherine</i>	0	0	0	Goldblatt and Manning (2008)
<i>Ennealophus euryandrus</i>	1	2	2	Vogel (1974), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Gelasine coerulea</i>	0	0	0	This study
<i>Gelasine elongata</i>	0	0	0	This study

Table S4. Continued

Taxon	Floral glandular structure			Source
	Anatomical type	Secretory type	Distribution	
<i>Herbertia</i>	1	2	3	Vogel (1974), Ravenna (1989), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Hesperoxiphion</i>	1	2	2	Ravenna (1979b), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Kelissa brasiliensis</i>	1	2	2	Ravenna (1981c)
<i>Larentia mexicana</i>	1	Unknown	2	Foster (1950), Espejo-Serna and Lopez-Ferrari (1996)
<i>Larentia rosei</i>	0	0	0	Espejo-Serna and Lopez-Ferrari (1996)
<i>Mastigostyla cyrtophylla</i>	0	0	0	This study
<i>Mastigostyla sp.01</i>	1	2	2	Goldblatt and Manning (2008) / this study
<i>Nemastylis</i>	0	0	0	Manning and Goldblatt (2008)
<i>Onira unguiculata</i>	1	2	2	Ravenna (1983)
<i>Phalocallis</i>	1	2	2	Ravenna (2009) / this study
<i>Sessilanthera</i>	0	0	0	Molseed and Cruden (1969), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Tigridia philippiana</i>	1	2	2	Ravenna (1969) for <i>T. minuta</i> , Vogel (1974) for <i>T. lutea</i> / this study
<i>Tigridia</i> (subgenus <i>Tigridia</i>)	1	2	2	Molseed (1970), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Tigridia</i> (subgenus <i>Hydrotaenia</i>)	1	1	2	Molseed (1970), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Tigridia (Rigidella)</i>	1	1	2	Cruden (1971), Goldblatt and Manning (2008)
<i>Tigridia (Colima)</i>	1	1	2	Molseed and Cruden (1968), Goldblatt and Manning (2008)

Floral glandular structure. Anatomical type: (0) absent, (1) unicellular trichomes, (2) pluricellular scales, (3) carpel margin cells, (4) epithelial cells. Secretory type: (0) absent, (1) trichomal nectaries, (2) trichomal elaiophores, (3) pluricellular scales nectaries, (4) septal nectaries, (5) epithelial nectaries. Distribution: (0) absent, (1) staminal column, (2) inner tepals, (3) tepals, (4) ovary.

Literature cited in Table S4:

Chauveau O, Eggers L, Raquin C, et al. 2011. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany* **107**: 1287-1312.

Chukr NS, Giulietti AM. 2003. Revisão de *Pseudotrimezia* Foster (Iridaceae). *Sitientibus Série Ciências Biológicas* **3(1/2)**: 44-80.

Cruden RW. 1971. The systematics of *Rigidella* (Iridaceae). *Brittonia* **23**: 217-225.

- Espejo-Serna A, Lopez-Ferrari AR. 1996.** Comentarios florístico-ecológicos sobre las iridáceas mexicanas. *Acta Botánica Mexicana* **34**: 25-47.
- Forcone A, Galetto L, Bernardello L. 1997.** Floral nectar chemical composition of some species from Patagonia. *Biochemical Systematics and Ecology* **25**(5): 395-402.
- Foster RC. 1945.** Studies in Iridaceae III. *Contributions from the Gray Herbarium* **155**: 1-54.
- Foster RC. 1950.** Studies in the Iridaceae VI. Miscellaneous novelties and transfers. *Contributions from the Gray Herbarium* **171**: 22-28.
- Goldblatt P, Hendrich JE. 1991.** *Calydorea* Herbert (Iridaceae – Tigridieae): Notes on this New World genus and reduction to synonymy of *Salpingostylis*, *Cardiostigma*, *Itysa*, and *Catila*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **78**: 504-511.
- Goldblatt P, Howard TM. 1992.** Notes on *Alophia* (Iridaceae) and new species, *A. veracruzana*, from Vera Cruz, Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **79**: 901-905.
- Goldblatt P, Manning JC. 2006.** Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. *Annals of Botany* **97**: 317-344.
- Goldblatt P, Manning JC. 2008.** *The Iris family - natural history and classification*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- Henrich JE, Goldblatt P. 1994.** In: Davidse G, Sousa M, Charter AQ (Eds.). *Flora Mesoamericana: Alismataceae a Cyperaceae*. Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden and The Natural History Museum. Vol. 6. D.F., Mexico, 71-80.
- Molseed E, Cruden RW. 1968.** A new species of *Nemastylis* (Iridaceae) from Mexico. *Brittonia* **20**(3): 235-237.
- Molseed E, Cruden RW. 1969.** *Sessilanthera*, a new genus of American Iridaceae. *Brittonia* **21**: 191-193.
- Ravenna P. 1969.** Notas sobre Iridaceae. IV. *Revista del Instituto Municipal de Botánica* **3**(2): 25-38.
- Ravenna P. 1974.** *Cobana*, a new genus of Central American Iridaceae. *Botaniska Notiser* **127**: 104-108.
- Ravenna P. 1979a.** *Ainea*, a new genus of Iridaceae from Mexico. *Botaniska Notiser* **132**(4): 467-469.

- Ravenna P. 1979b.** New species of Iridaceae from Galápagos and Colombia. *Botaniska Notiser* **132**(4): 463-466.
- Ravenna P. 1981a.** Eight new species and two new subspecies of *Cypella* (Iridaceae). *Wrightia* **7**: 13-22.
- Ravenna P. 1981b.** A submerged new species of *Cypella* (Iridaceae) and a new section for the genus (s.str.). *Nordic Journal of Botany* **1**: 489-492.
- Ravenna P. 1981c.** *Kelissa*, a new genus of Iridaceae from South Brazil. *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle. Section B, Adansonia* **3**(1): 105–110.
- Ravenna P. 1983.** *Catila* and *Onira*, two new genera of South American Iridaceae. *Nordic Journal of Botany* **3**(2): 197-205.
- Ravenna P. 1988a.** New species and miscellaneous notes in the genus *Trimezia* (Iridaceae) – II. *Onira Botanical Leaflets* **1**(1): 1-15.
- Ravenna P. 1989.** A new species of *Herbertia* (Iridaceae) from SE South America. *Nordic Journal of Botany* **9**(1): 55-56.
- Ravenna P. 2001.** The Iridaceae of the Cuyo region Argentina. *Onira Botanical Leaflets* **6**(1): 1-18.
- Ravenna P. 2005.** New species of South American bulbous Iridaceae. *Onira Botanical Leaflets* **10**(13): 39-45.
- Roitman G, Castillo A. 2005.** *Calydorea alba* (Iridaceae: Tigridieae), a new species from Uruguay. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **40**(3-4): 311-312.
- Roitman G, Castillo A. 2007.** *Calydorea minima* (Iridaceae, Tigridieae), a new species from South America. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **42**(3-4): 321-323.
- Rudall PJ, Manning JC, Goldblatt P. 2003.** Evolution of floral nectaries in Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **90**: 613-631.
- Simpson BB, Neff JL. 1981.** Floral rewards: Alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 301-322.
- Vogel S. 1974.** Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Abhandlungen Akademie Wissenschaften Mathematisch-Naturwissenschaften Klasse, Tropische und Subtropische Pflanzenwelt* **7**: 1-267.

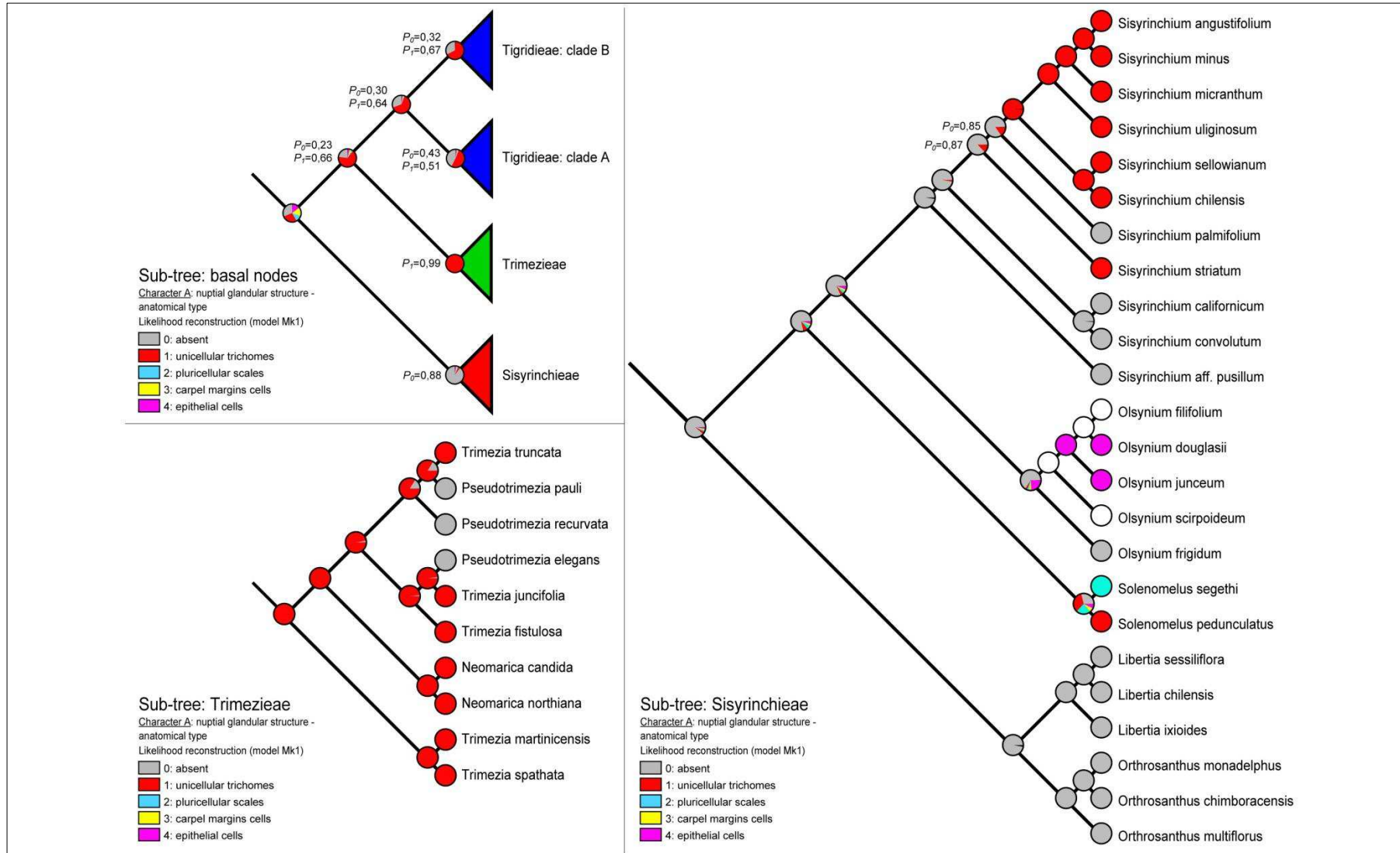


Figure S1-A. Trees showing the ML optimisation of the anatomical type (character A) of nuptial glandular structures on the ML best-scoring tree for the ancestral nodes of the three study tribes, and for Sisyrrinchieae and Trimezieae. Relative likelihoods corresponding to the likelihood values calculated for each character state are reported on nodes.

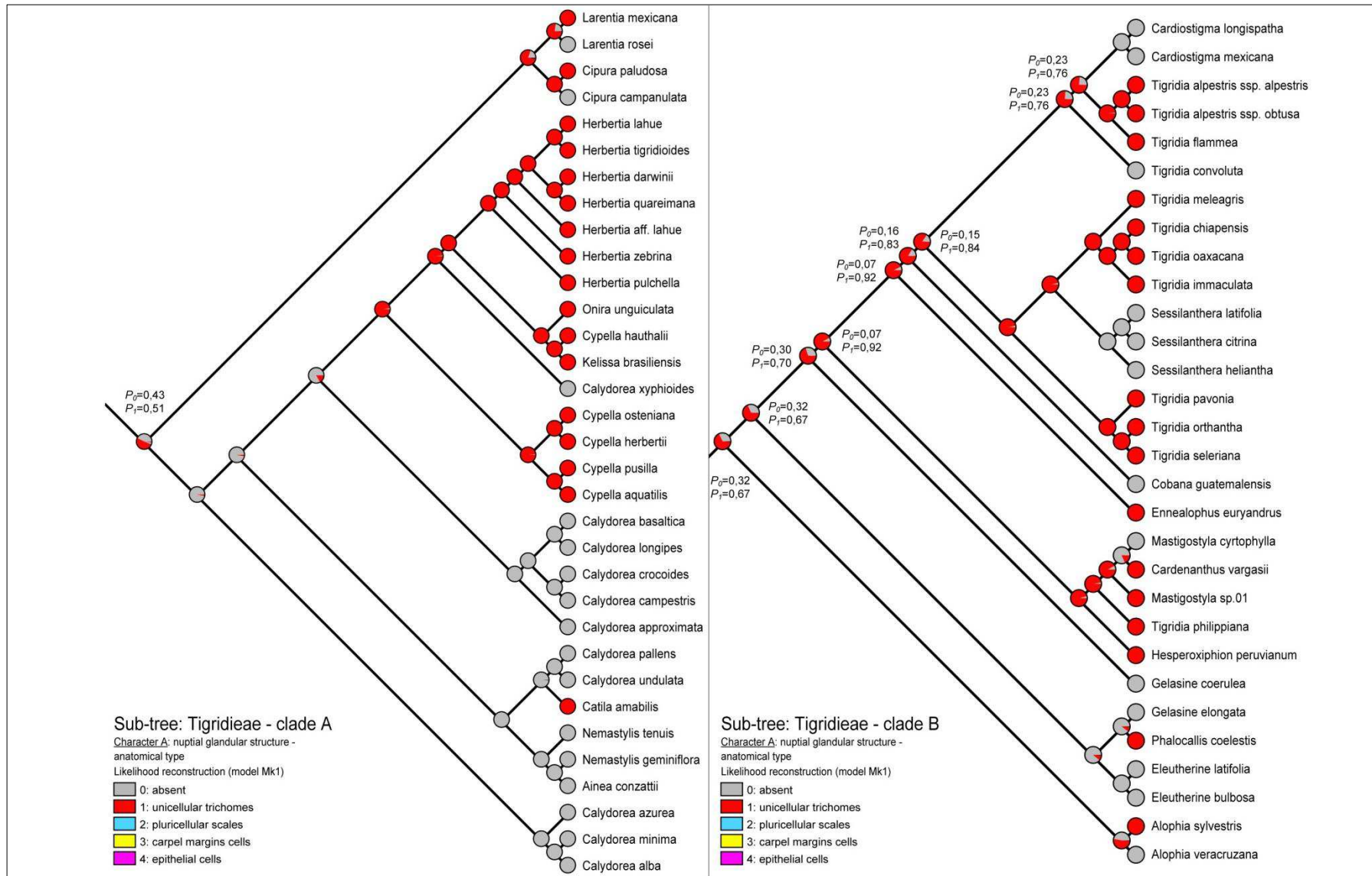


Figure S1-B. Trees showing the ML optimisation of the anatomical type (character A) of nuptial glandular structures on the ML best-scoring tree for clades A and B of Tigridieae. Relative likelihoods corresponding to the likelihood values calculated for each character state are reported on nodes.

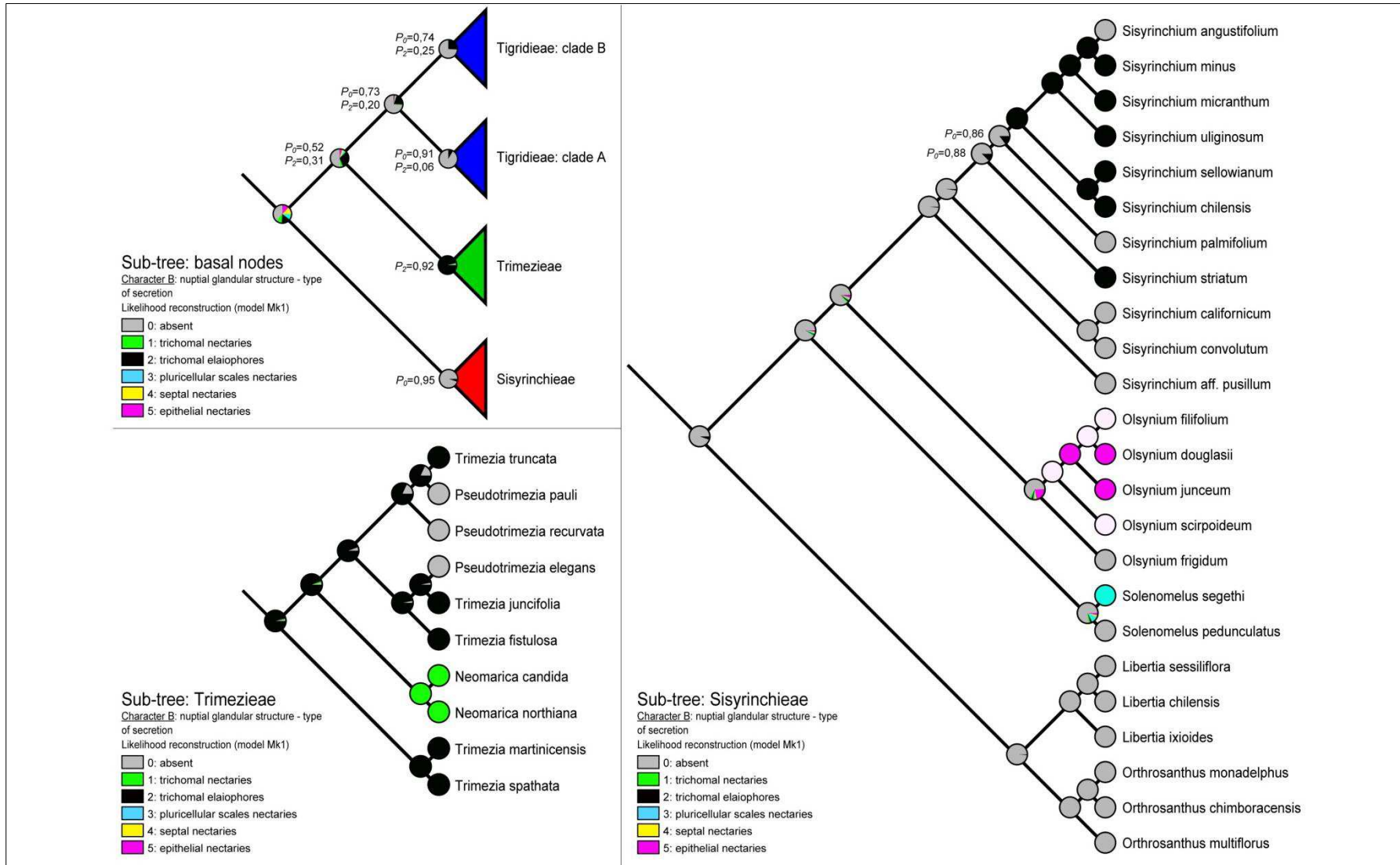


Figure S2-A. Trees showing the ML optimisation of the secretory type (character B) of nuptial glandular structures on the ML best-scoring tree for the ancestral nodes of the three study tribes, and for Sisyrrinchieae and Trimezieae. Relative likelihoods corresponding to the likelihood values calculated for each character state are reported on nodes.

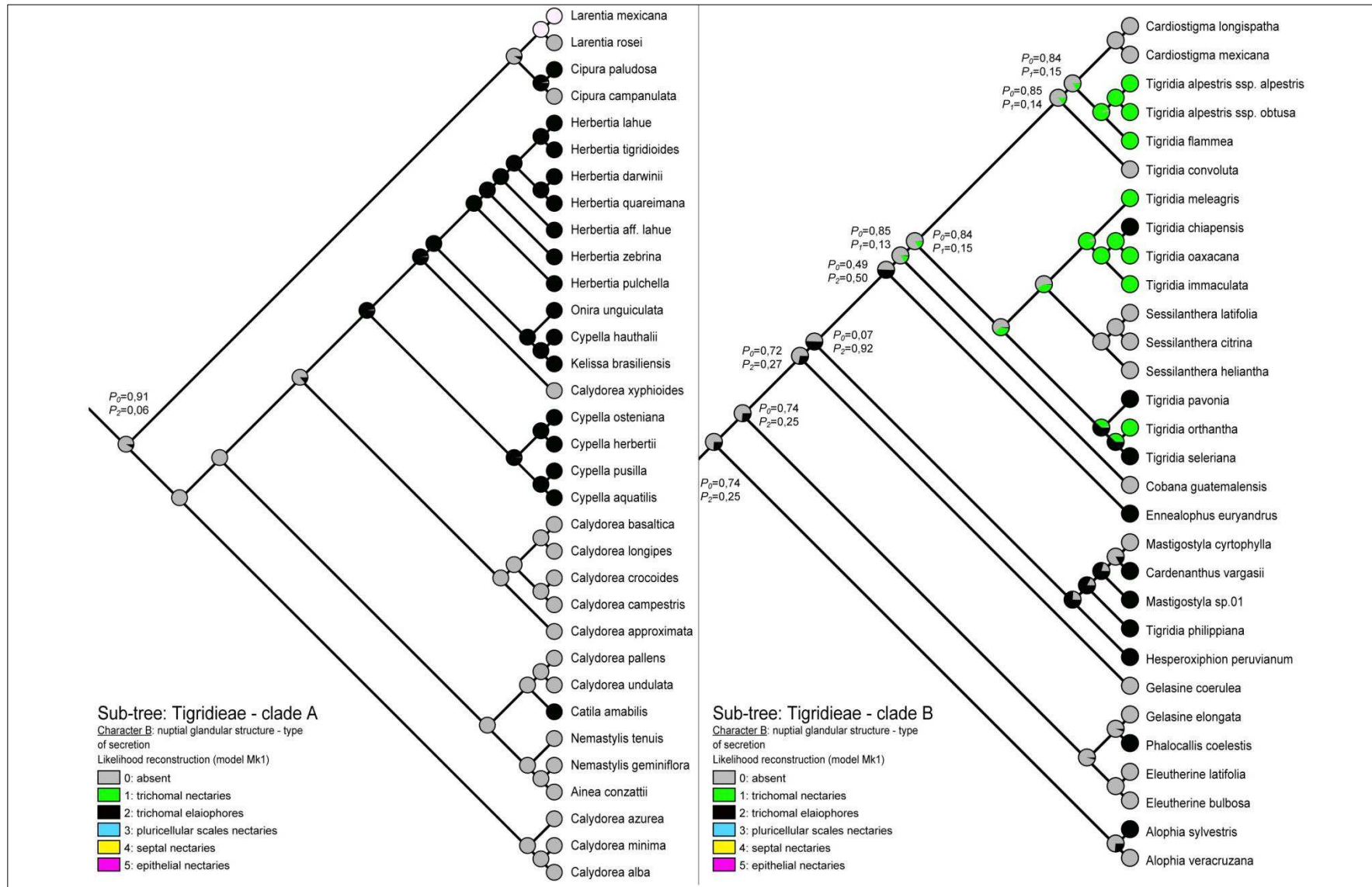


Figure S2-B. Trees showing the ML optimisation of the secretory type (character B) of nuptial glandular structures on the ML best-scoring tree for clades A and B of Tigridae. Relative likelihoods corresponding to the likelihood values calculated for each character state are reported on nodes.

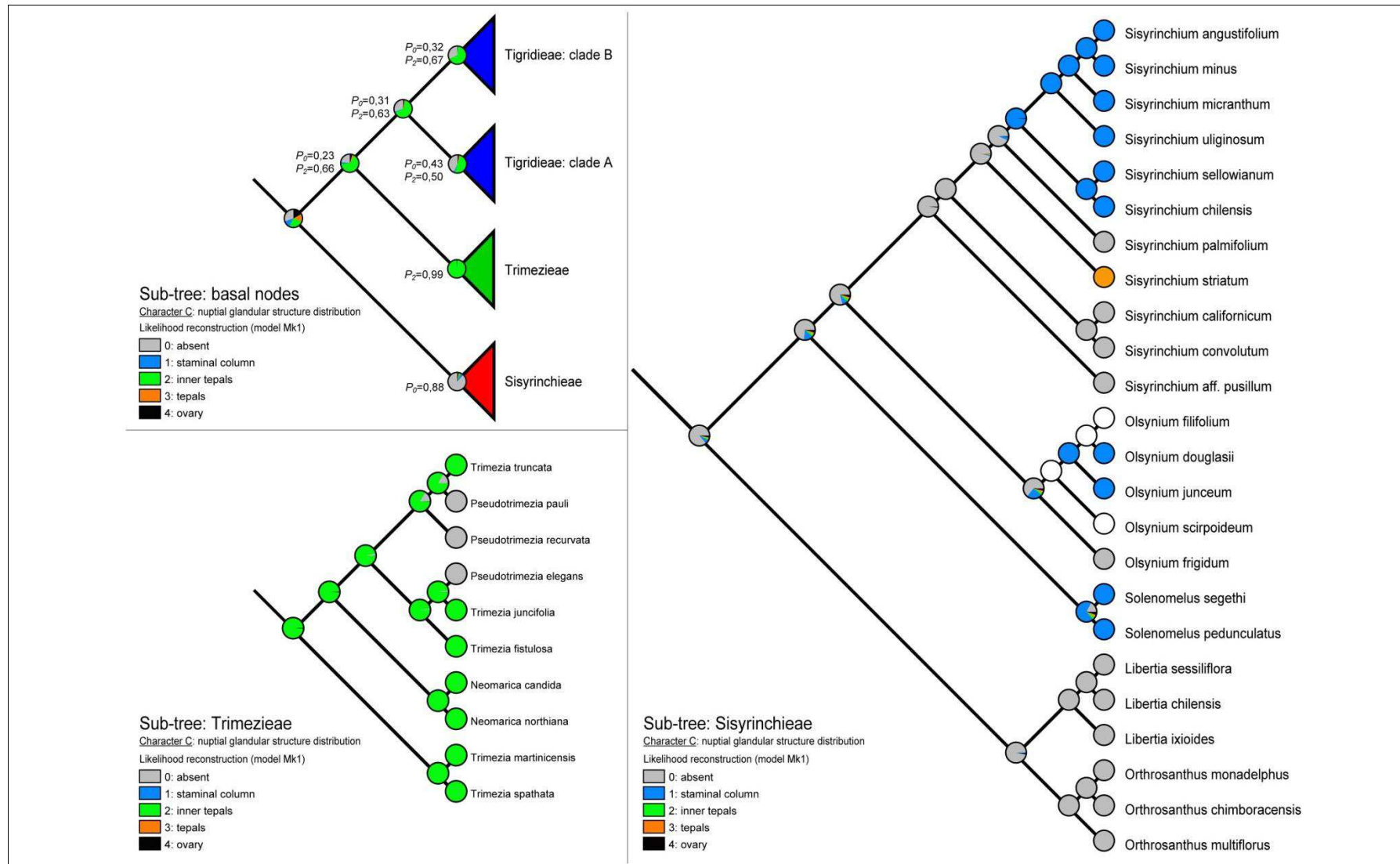


Figure S3-A. Trees showing the ML optimisation of the distribution (character C) of nuptial glandular structures within the flower on the ML best-scoring tree for the ancestral nodes of the three study tribes, and for Sisyrinchieae and Trimezieae. Relative likelihoods corresponding to the likelihood values calculated for each character state are reported on nodes.

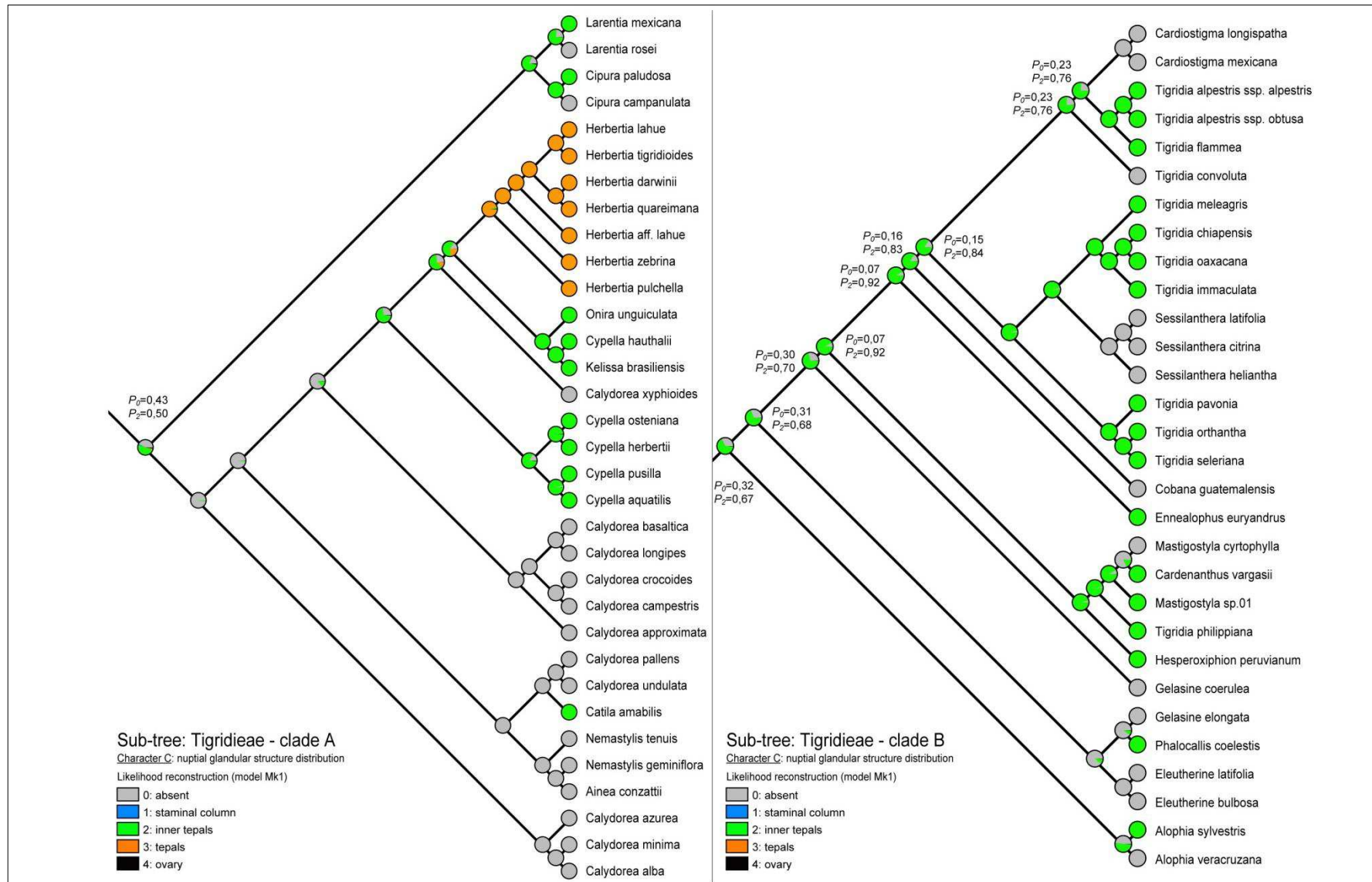


Figure S2-B. Trees showing the ML optimisation of the distribution (character C) of nuptial glandular structures within the flower on the ML best-scoring tree for clades A and B of Tigridae. Relative likelihoods corresponding to the likelihood values calculated for each character state are reported on nodes.

Table S5. Comparison of full and constrained ML BISSE analyses. The six BISSE parameters are the speciation rates (λ_0 and λ_1) in absence vs. presence of nuptial trichomes (character D) in the lineages, the extinction rates (μ_0 and μ_1), and forward and reverse transition rates (q_{01} and q_{10}). Nested models were compared with likelihood ratio tests with 1 degree of freedom; the comparison is given in the comparison column. *P*-values are bolded when significant ($P \leq 0.05$) and underlined when marginally significant.

Model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	q_{01}	q_{10}	ln L	Comparison	<i>P</i>
D-1	None	128.54	261.79	77,82	84,59	71,82	148,54	-333.11		
D-2	$\lambda_0 = \lambda_1$	213.06	213.06	219.03	2.97 E-	52.42	187.58	-332.10	vs. D-1	0.155
D-3	$\mu_0 = \mu_1$	129.36	259.83	80.33	80.33	70.62	149.50	-333.11	vs. D-1	0.975
D-4	$q_{10} = q_{01}$	112.66	317.31	6.40	210.23	126.74	126.74	-332.72	vs. D-1	0.378
D-5	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	215.25	215.25	123.28	123.28	125.47	155.49	-329.79	vs. D-3	0.009
D-6	$\lambda_0 = \lambda_1, q_{10} = q_{01}$	215.16	215.16	132.12	114.67	162.05	162.05	-329.53	vs. D-3	0.007
D-7	$\mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	155.01	251.21	111.71	111.71	173.86	173.86	-330.99	vs. D-3	0.039

Model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	q_{01}	q_{10}	ln L	Comparison	<i>P</i>
D-8	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	215.25	215.25	123.28	123.28	158.32	158.32	-329.50		
D-7	$\mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	155.01	251.21	111.71	111.71	173.86	173.86	-330.99	vs. D-8	<u>0.084</u>
D-6	$\lambda_0 = \lambda_1, q_{10} = q_{01}$	215.16	215.16	132.12	114.67	162.05	162.05	-329.53	vs. D-8	0.806
D-5	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	215.25	215.25	123.28	123.28	125.47	155.49	-329.79	vs. D-8	0.446
D-4	$q_{10} = q_{01}$	112.66	317.31	6.40	210.23	126.74	126.74	-332.72	vs. D-7	0.062
D-3	$\mu_0 = \mu_1$	129.36	259.83	80.33	80.33	70.62	149.50	-333.11	vs. D-7	0.039

Table S6. Comparison of full and constrained ML BISSE analyses. The six BISSE parameters are the speciation rates (λ_0 and λ_1) in absence vs. presence of trichomal elaiophores (character E) in the lineages, the extinction rates (μ_0 and μ_1), and forward and reverse transition rates (q_{01} and q_{10}). Nested models were compared with likelihood ratio tests with 1 degree of freedom; the comparison is given in the comparison column. P -values are bolded when significant ($P \leq 0.05$) and underlined when marginally significant.

Model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	q_{01}	q_{10}	ln L	Comparison	P
E-1	None	190.92	231.14	161.63	29.26	86.91	252.58	-331.16		
E-2	$\lambda_0 = \lambda_1$	212.02	212.02	191.51	7.00	82.20	259.62	-331.09	vs. E-1	0.713
E-3	$\mu_0 = \mu_1$	179.48	260.20	116.63	116.63	102.40	214.43	-331.08	vs. E-1	0.690
E-4	$q_{10} = q_{01}$	168.18	309.26	31.46	275.47	155.57	155.57	-330.44	vs. E-1	0.229
E-5	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	215.25	215.25	123.28	123.28	126.40	208.21	-330.41	vs. E-2	0.243
E-6	$\lambda_0 = \lambda_1, q_{10} = q_{01}$	213.67	213.67	72.86	188.06	177.18	177.18	-329.50	vs. E-2	0.074
E-7	$\mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	223.06	205.13	122.60	122.60	171.45	171.45	-328.57	vs. E-2	0.024
E-8	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	215.25	215.25	123.28	123.28	168.40	168.40	-328.53	vs. E-5	<u>0.052</u>

Model	Constraints	λ_0	λ_1	μ_0	μ_1	q_{01}	q_{10}	ln L	Comparison	P
E-8	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	215.25	215.25	123.28	123.28	168.40	168.40	-328.53		
E-7	$\mu_0 = \mu_1, q_{10} = q_{01}$	223.06	205.13	122.60	122.60	171.45	171.45	-328.57	vs. E-8	0.777
E-6	$\lambda_0 = \lambda_1, q_{10} = q_{01}$	213.67	213.67	72.86	188.06	177.18	177.18	-329.50	vs. E-8	0.163
E-5	$\lambda_0 = \lambda_1, \mu_0 = \mu_1$	215.25	215.25	123.28	123.28	126.40	208.21	-330.41	vs. E-8	<u>0.052</u>
E-4	$q_{10} = q_{01}$	168.18	309.26	31.46	275.47	155.57	155.57	-330.44	vs. E-5	0.806
E-3	$\mu_0 = \mu_1$	179.48	260.20	116.63	116.63	102.40	214.43	-331.08	vs. E-5	0.247
E-2	$\lambda_0 = \lambda_1$	212.02	212.02	191.51	7.00	82.20	259.62	-331.09	vs. E-5	0.243

Table S7. Detection of diversification rate variations among the tribes Sisyrinchieae, Trimezieae and Tigridaeae using the SymmeTREE software. Uncertainties associated with polytomies within the strict consensus tree (MP analysis) and the 50 % majority rule (MR) consensus tree (Bayesian analysis) were assessed by generating 100 000 random resolutions under the TSS ERM algorithm, providing upper and lower bounds on the confidence interval. These 'high' and 'low' asymmetry values correspond to the tail probabilities for the .025 and .975 frequentiles, respectively. The sensitivity of the whole-tree statistics to large-scale diversification rate variation decreases to the right across a given row (i.e., $I_c > M_\pi^* > M_\pi > M_\Sigma^* > M_\Sigma > B_1$).

<u>Fully resolved tree</u>	I_c	M_π^*	M_π	M_Σ^*	M_Σ	B_1
ML best-scoring tree	0.09759	<u>0.02394</u>	<u>0.01775</u>	<u>0.00904</u>	<u>0.0211</u>	0.20651
<u>Tree with polytomies</u>	I_c	M_π^*	M_π	M_Σ^*	M_Σ	B_1
	high	high	high	high	high	high
	low	low	low	low	low	low
Strict consensus tree (MP)	0.10084	<u>0.02631</u>	<u>0.01705</u>	<u>0.00893</u>	<u>0.0136</u>	0.10804
	0.26363	0.18538	0.19139	0.13653	0.19749	0.53232
MR consensus tree (Bayesian analysis)	0.101	<u>0.02637</u>	<u>0.01493</u>	<u>0.00668</u>	<u>0.0105</u>	0.0916
	0.36135	0.27515	0.23865	0.19169	0.20363	0.44118

Note: significant P -values are underlined.

Annexe 2 - Informations supplémentaires de l'article 2

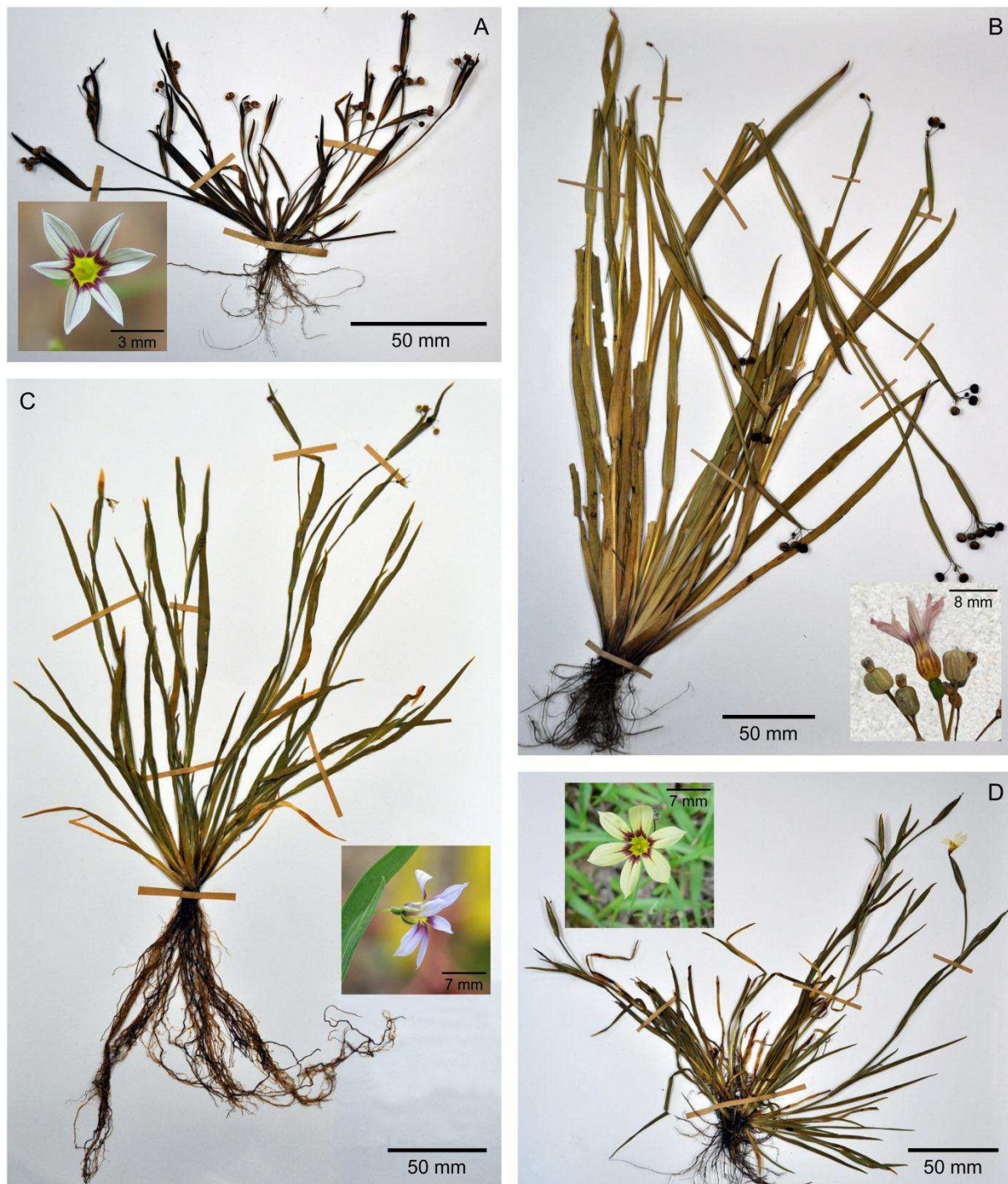


Figure S1. Illustrations of the morphological plasticity observed within *S. micranthum* and the closely related species. Voucher and flower view. (A) *S. micranthum* morphotype LLY (SP059). (B) *S. micranthum* morphotype GL (SP060). (C) *S. rosulatum* (SP085). (D) *S. micranthum* morphotype BY (SP186).

Table S1. Primers used for amplifying and sequencing.

Primer name	Direction	PCR, sequencing	Primer sequence 5'-3'	Source
<u>rpoC1</u>				
rpoC1-1f	Forward	PCR,Seq	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	http://www.kew.org/barcoding/protocols.html
rpoC1-3r	Reverse	PCR,Seq	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	http://www.kew.org/barcoding/protocols.html
<u>rpoB</u>				
rpoB-1f	Forward	PCR,Seq	AAGTGCATTGTTGGAACCTGG	http://www.kew.org/barcoding/protocols.html
rpoB-4r	Reverse	PCR,Seq	GATCCCAGCATCACAAATTC	http://www.kew.org/barcoding/protocols.html
<u>matK</u>				
matK-Xf	Forward	PCR,Seq	TAATTTACGATCAATTCATTC	http://www.kew.org/barcoding/update.html
matK-3.2r	Reverse	PCR,Seq	CTTCCTCTGTAAAGAATTC	http://www.kew.org/barcoding/protocols.html
matK-S571f	Forward	Seq	CATATAAACCAATTATCAAAC	This study (internal primer)
matK-S571r	Reverse	Seq	AGTTTGATAATTGGTTTATATG	This study (internal primer)
<u>trnH-psbA</u>				
psbA	Forward	PCR,Seq	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	(Shaw et al. 2005)
trnH ^{GUG}	Reverse	PCR,Seq	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	(Shaw et al. 2005)
<u>trnQ-rps16</u>				
trnQ-S1f	Forward	PCR,Seq	GCGTGGCCAAGTGGTAAGGC	modified from trnQ ^(UUG) (Shaw et al. 2007)
rps16-S1r	Reverse	PCR,Seq	GTTGCTTTCTACCACATCGTTT	modified from rps16x1 (Shaw et al. 2007)
trnQ-S801f	Forward	Seq	AACTCTTGATACTCGAGAAGAAGTG	this study (internal primer for Sisyrinchium)
trnQ-S493r	Reverse	Seq	TACGCCCGTTATTTGGACTTTC	this study (internal primer for Sisyrinchium)
trnQ-OS896f	Forward	Seq	TTTCGGTTAAGTCAAAGGAGG	this study (internal primer for outgroups)
trnQ-O343r	Reverse	Seq	GTACAAGCATGCCCTGAATG	this study (internal primer for Olsynium)
trnQ-So874r	Reverse	Seq	CCCTTTGAGTTAACCGAAAGGCATTG	this study (internal primer for Solenomelus)
<u>nad1-2/3</u>				
nad1E2-1f	Forward	PCR,Seq	ACAGAGGATGTGCTCGTACGG	this study
nad1I2-465r	Reverse	Seq	TCGTCCATTCGTTGGGTGATC	this study (internal primer)
nad1I2-871r	Reverse	Seq	GCCCTAAGAAGCAGAACGCAC	this study (internal primer)
nad1I2-801f	Forward	Seq	CGTTTTTCATTTCTGTTGGAAGTCC	this study (internal primer)
nad1E3-1r	Reverse	PCR,Seq	GCGCCATGACAATCTCACTCG	this study
<u>nad4-1/2</u>				
nad4E1-1f	Forward	PCR,Seq	GAAAGCGTGCCAATCCCTATG	this study
nad4I1-400r	Reverse	Seq	CCTGGTCGGGTACAGTTTCC	this study (internal primer)
nad4I1-936r	Reverse	Seq	CGGCCTGTAGAGCACATGTAAG	this study (internal primer)
nad4I1-824f	Forward	Seq	GCGGACCATAACATAAGGCAATG	this study (internal primer)
nad1I1-1283f	Forward	Seq	CCTGAGAAGGGAGTGGCTACC	this study (internal primer)
nad4E2-1r	Reverse	PCR,Seq	GCCAAGATGACGGATCCTGC	this study
<u>ITS</u>				
ITS5b	Forward	PCR,Seq	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG	modified from ITS5 (White et al., 1990)
ITS-38f	Forward	PCR,Seq	CTGCGGAAGGATCATTGTC	this study
ITS4	Reverse	PCR,Seq	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White et al., 1990)

Notes: Seq = sequencing

Table S2. PCR profiles for DNA amplification.

Locus	PCR profiles
rpoC	Initial denaturation at 94°C for 1 mn followed by 40 cycles of 94°C denaturation for 30 s, 53°C annealing for 40 s and
rpoB	72°C elongation for 40 s, followed by a final elongation step of 5 mn at 72°C.
matK	(http://www.kew.org/barcoding/protocols.html).
psbA-trnH	
trnQ-rps16	Initial denaturation at 94°C for 5 mn followed by 40 cycles of 94°C denaturation for 30 s, 62°C annealing for 40 s and elongation for 1 mn 30 s, followed by a final elongation step of 5 mn at 72°C. (http://www.kew.org/barcoding/protocols.html).
nad1-2/3	Initial denaturation at 94°C for 5 mn followed by 40 cycles of 94°C denaturation for 1 mn, 65°C annealing for 40 s and elongation for 2 mn, followed by a final elongation step of 5 mn at 72°C.
nad4-1/2	Initial denaturation at 94°C for 5 mn followed by 40 cycles of 94°C denaturation for 1 mn, 64°C annealing for 40 s and elongation for 2 mn, followed by a final elongation step of 5 mn at 72°C.
ITS	Initial denaturation at 94°C for 5 mn followed by 40 cycles of 94°C denaturation for 1 mn, 58°C annealing for 1 mn and elongation for 1 mn, followed by a final elongation step of 5 mn at 72°C.

APPENDIX S1. Alternative methods used for the Maximum Parsimony analyses.

Searching for all of the islands of most parsimonious trees is an important step in any analysis that uses parsimony as the optimal criterion (Maddison, 1991; Page, 1993), but the time necessary to conduct such tree-space's explorations increases logarithmically with the size of the data matrix (Nixon, 1999). If the trees found with the branch swapping algorithm are all kept and swapped themselves, the search often aborts because the computer runs out of memory. In order to avoid this problem and to limit the number of trees swapped during each replicate while maximizing exploration of the tree-space for islands of equally parsimonious trees, two independent methods were used for the analysis of the *psbA-trnH*, *trnQ-rps16*, *nad1-2/3*, *nad4-1/2* and ITS regions and for the combined dataset. First, heuristic searches were modified to keep only the 500 first most parsimonious trees of each replication (nchuck = 500 chucksore = 1). Second, parsimony ratchet (Nixon, 1999) searches consisting of 20 independent replicates of 200 iterations with 15% of characters reweighted per iteration were scripted using the program PAUPRat (Sikes and Lewis, 2001) and run in the program PAUP*. In both cases, strict and majority-rule consensus trees were calculated from all most parsimonious trees and the robustness of nodes was evaluated using MP with 1000 bootstrap replicates of new heuristic searches (100 random addition replicates, TBR branch swapping, multrees off).

LITERATURE CITED

Maddison DR. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. *Systematic zoology* **40**(3): 315–328.

Nixon KC. 1999. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* **15**: 407–414.

Page RDM. 1993. On islands of trees and the efficacy of different methods of branch swapping in finding most-parsimonious trees. *Systematic Biology* **42**(2): 200–210.

Sikes DS, Lewis PO. 2001. *PAUPRat: PAUP implementation of the parsimony ratchet*. Beta software, version 1, distributed by the authors, website: <http://www.ucalgary.ca/~dsikes/software2.htm>.

Table S3. Data and models used in analysis.

Data partition	No. of positions without primers	Partition by codon position	Model	
			ML	BI
rpoC1	508	X	GTR+I	GTR+I
rpoB	472	X	GTR	GTR
matK	1024	X	GTR+G	GTR+G
<u>trnH-psbA</u>	667		HKY+I+G	
psbA	53	X		K80
psbA-rps19 spacer	160			GTR+G
rps19 (negative strand)	279	X		HKY+I
rps19-trnH spacer	175			F81+I
trnQ-rps16	1929		GTR+G	GTR+G
cpDNA combined matrix			GTR+I+G	
nad1-2/3	1657		GTR+I	
5'-nad1-exon2	59			F81
nad1-exon2	82	X		HKY
nad1-intron2	1516			GTR+I
nad4-1/2	1683		GTR+I+G	
nad4-intron1	1406			GTR+I+G
nad4-exon2	277	X		HKY+I
mtDNA combined matrix			GTR+I+G	
<u>ITS</u>	665		GTR+I+G	
ITS1	225			GTR+G
5.8S	165			K80
ITS2	234			GTR+G
28S	41			K80+I
Global combined matrix			GTR+I+G	

Notes: partitioned by codon position = partition treated as a coding partition in bayesian analysis.

Species were grouped firstly in accordance to the two major centers of diversity already identified for the genus *Sisyrinchium* (Cocucci and Vogel, 2001): the area A was defined along the subandean ranges, between Chile and Argentina, and the area B was delimited around the Paraná river basin. The remaining species were divided in two major areas, according to morphological similarities showed by most of the species included in these geographical subdivisions. The vast majority of the *Sisyrinchium* species described between the south-western part of the United States and Bolivia (area C) are included in the subgenus *Echtronema* and are morphologically closely related (Klatt, 1861; Baker, 1892; Bicknell, 1900; Macbride, 1936; Rudall et al., 1986; Henrich and Goldblatt, 1987, Calderón de Rzedowski, 1988; McVaugh, 1989; Goldblatt et al., 1990; Espejo and López Ferrari, 1996; Cholewa and Henderson, 2002; Barker, 2004), even if morphological, anatomical and cytological discordances emerge in this subdivision. The area D was delimited in order to cover the distribution area of North American species gathered in the subgenus *Sisyrinchium* (Goldblatt et al., 1990) and represents the vast majority of the *Sisyrinchium* species distributed in the area thus defined. These species exhibit a strongly homogeneous morphological pattern and they are often not easily distinguished from each other apparently because of the phenotypic plasticity within species which conduct the discriminatory morphological characters to overlap (Cholewa and Henderson, 2002). Almost all of them bear few stipitate glandular trichomes on the lower half-part of the filamental column and although their secretion content is still unknown, no oil-collecting bees have been recorded to pollinate or visit *Sisyrinchium* species in that area (Cocucci and Vogel, 2001). This body of evidence features a well discriminated group of species.

LITERATURE CITED

- Baker JG. 1892.** 29. *Sisyrinchium* Linn. In: George Bell & Sons eds. *Handbook of the Irideae*. London, UK, 121–133.
- Barker C. 2004.** *World Checklist of Iridaceae*. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on Internet; <http://www.kew.org/wcsp/> accessed 05 November 2009.

- Bicknell EP. 1900.** Studies in *Sisyrinchium* VIII. *Sisyrinchium californicum* and related species of the neglected genus *Hydastylus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **27**: 373–387.
- Calderón de Rzedowski G. 1988.** Algunas consideraciones acerca de la familia Iridaceae en el valle de México. *Acta Botánica Mexicana* **1**: 21–27.
- Cholewa AF, Henderson DM. 2002.** *Sisyrinchium* Linnaeus. In: Flora of North America Editorial Committee, eds. 1993+. *Flora of North America North of Mexico*. New York and Oxford, **26**: 351–371.
- Cocucci AA, Vogel S. 2001.** Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora* **196**(1): 26–46.
- Espejo-Serna A, López-Ferrari AR. 1996.** Comentarios florístico-ecológicos sobre las iridáceas mexicanas. *Acta Botánica Mexicana* **34**: 25–47.
- Goldblatt P, Rudall P, Henrich JE. 1990.** The genera of the *Sisyrinchium* alliance (Iridaceae: Iridoideae): Phylogeny and relationships. *Systematic Botany* **15**(3): 497–510.
- Henrich JE, Goldblatt P. 1987.** Mesoamerican *Sisyrinchium* (Iridaceae): new species and records, and notes on typification. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **74**: 903–910.
- Klatt FW. 1861.** Monographia generis *Sisyrinchium*. *Linnaea* **31**: 61–100.
- Macbride JF. 1936.** Flora of Peru. *Field Museum of Natural History, Botanical Series* **13**(1/3): 707–717.
- McVaugh R. 1989.** Bromeliaceae to Dioscoreaceae. In: Anderson WR, ed. *Flora Novogaliciana. A descriptive account of the vascular plants of the western Mexico*. The University of Michigan Herbarium, Ann Arbor, Michigan, **15**: 294–347.
- Rudall P, Kenton AY, Lawrence TJ. 1986.** An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied general. *Botanical Gazette* **147**(4): 466–477.

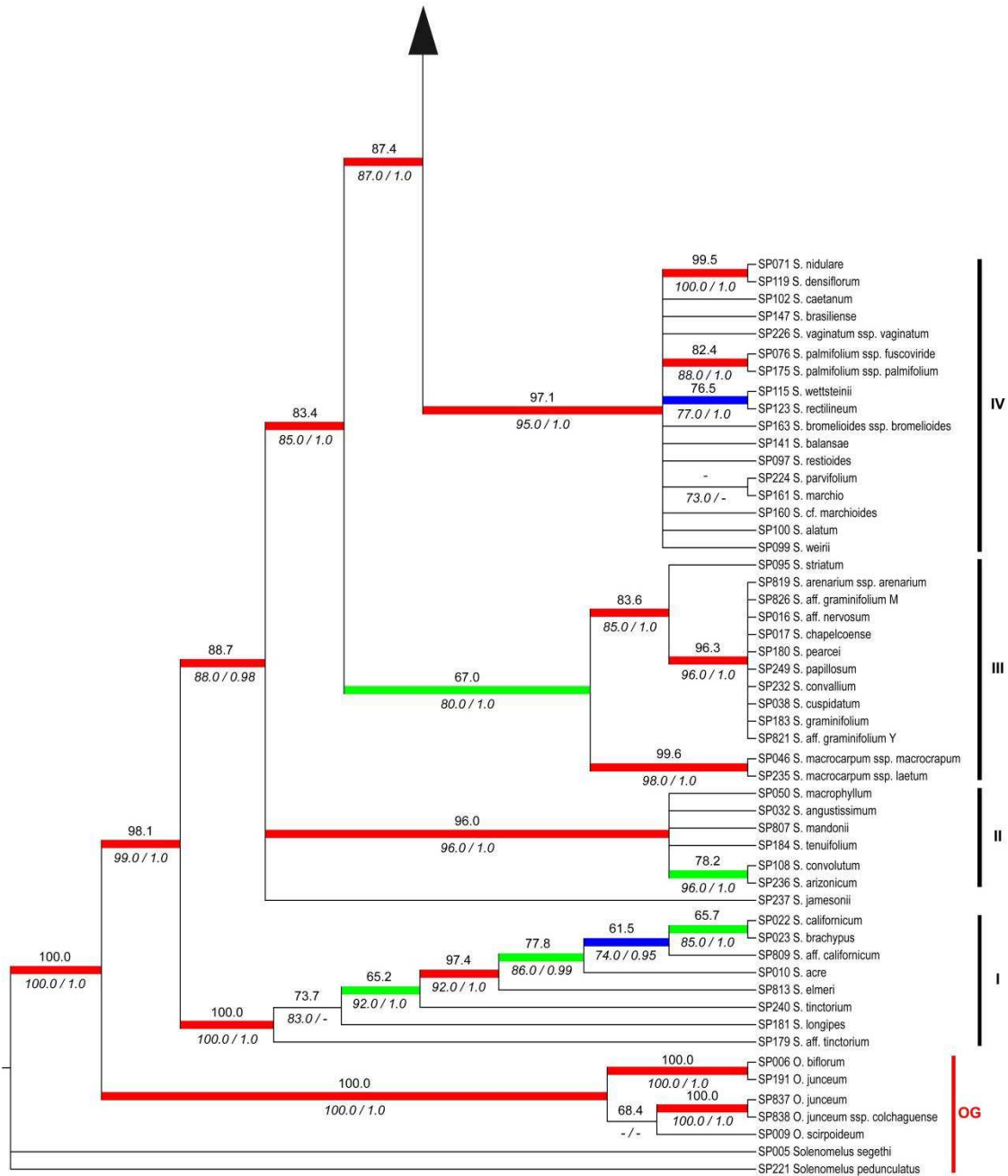


Figure S2. Consensus tree based on the strict consensus tree of the parsimony ratchet, the estimated maximum likelihood tree and the Bayesian 50% majority rule consensus tree obtained from the analysis of the nuclear data set. Support values along nodes are parsimony bootstrap (PBS, above branches), likelihood bootstrap (LBS, on the left, below branches) and Bayesian posterior probability (PP, on the right, below branches). The major clades are labelled I to IX. Thick red branches indicate support of at least 80% (PBS), 80% (LBS) and 0.95 (PP). Thick green lines indicate branches in which only two of the three support values reach these minimum values while the third support value is at least 50% (PBS), 60% (LBS) and 0.95 (PP). Thick blue lines indicate branches in which only one of the three support values reach the minimum values set above while the two other support values are at least 50% (PBS), 55% (LBS), 0.95 (PP).

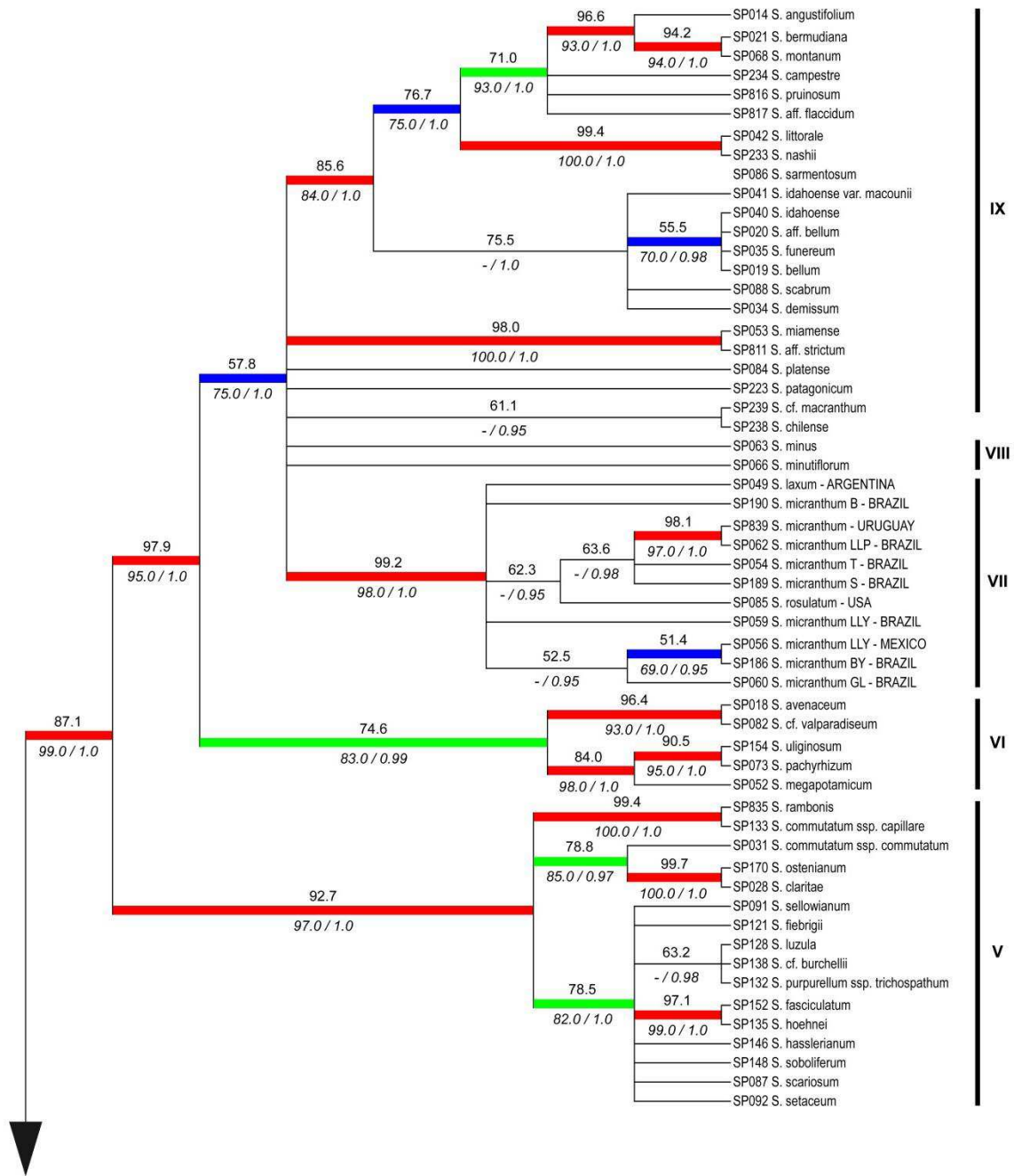


Figure S2. Continued

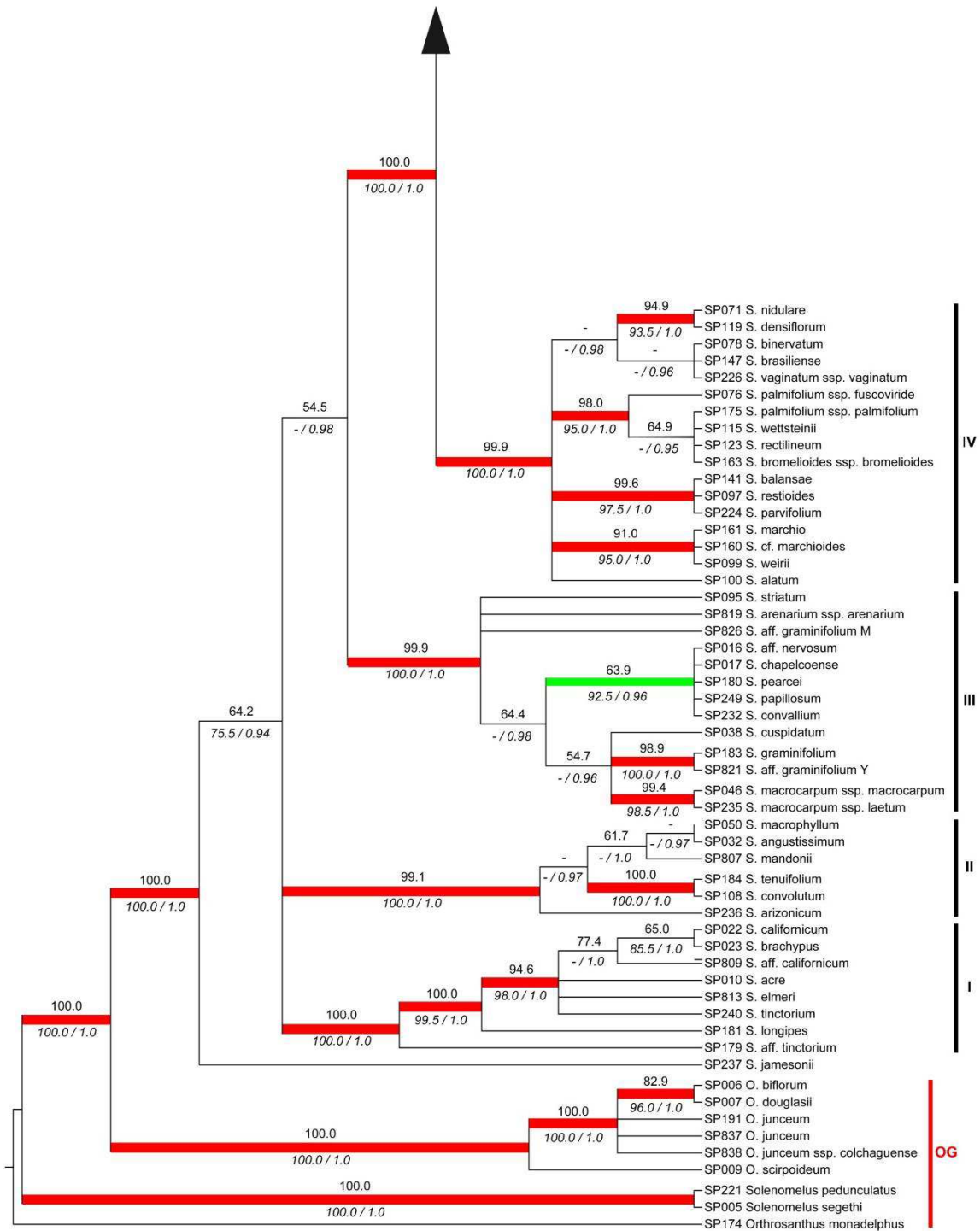


Figure S3. Consensus tree based on the strict consensus tree of the parsimony ratchet, the estimated maximum likelihood tree and the Bayesian 50% majority rule consensus tree obtained from the analysis of the chloroplast data set. Support values along nodes are parsimony bootstrap (PBS, above branches), likelihood bootstrap (LBS, on the left, below branches) and Bayesian posterior probability (PP, on the right, below branches). The major clades are labelled I to IX. Thick red branches indicate support of at least 80% (PBS), 80% (LBS) and 0.95 (PP). Thick green lines indicate branches in which only two of the three support values reach these minimum values while the third support value is at least 50% (PBS), 60% (LBS) and 0.95 (PP). Thick blue lines indicate branches in which only one of the three support values reach the minimum values set above while the two other support values are at least 50% (PBS), 55% (LBS), 0.95 (PP).

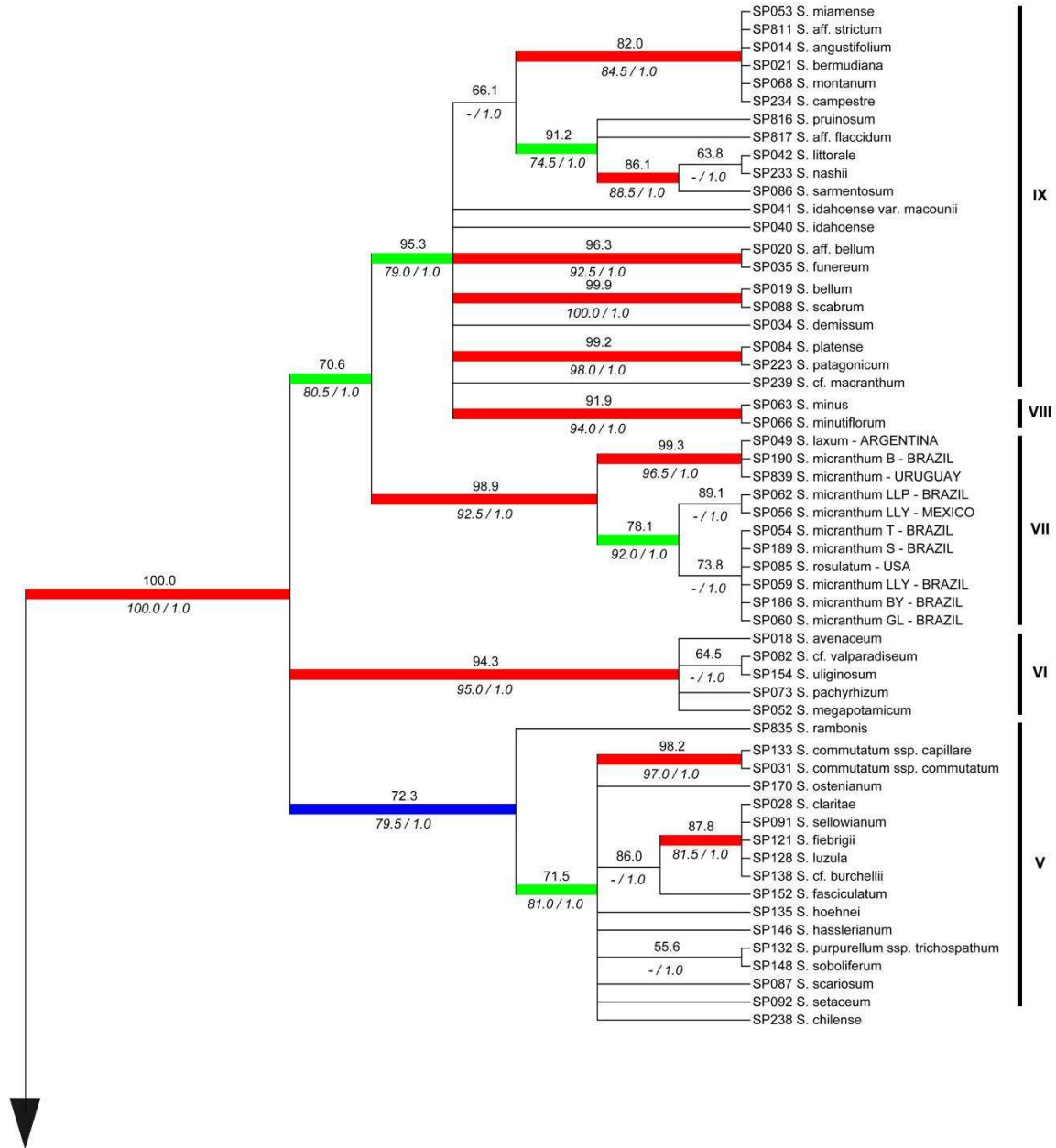


Figure S3. Continued

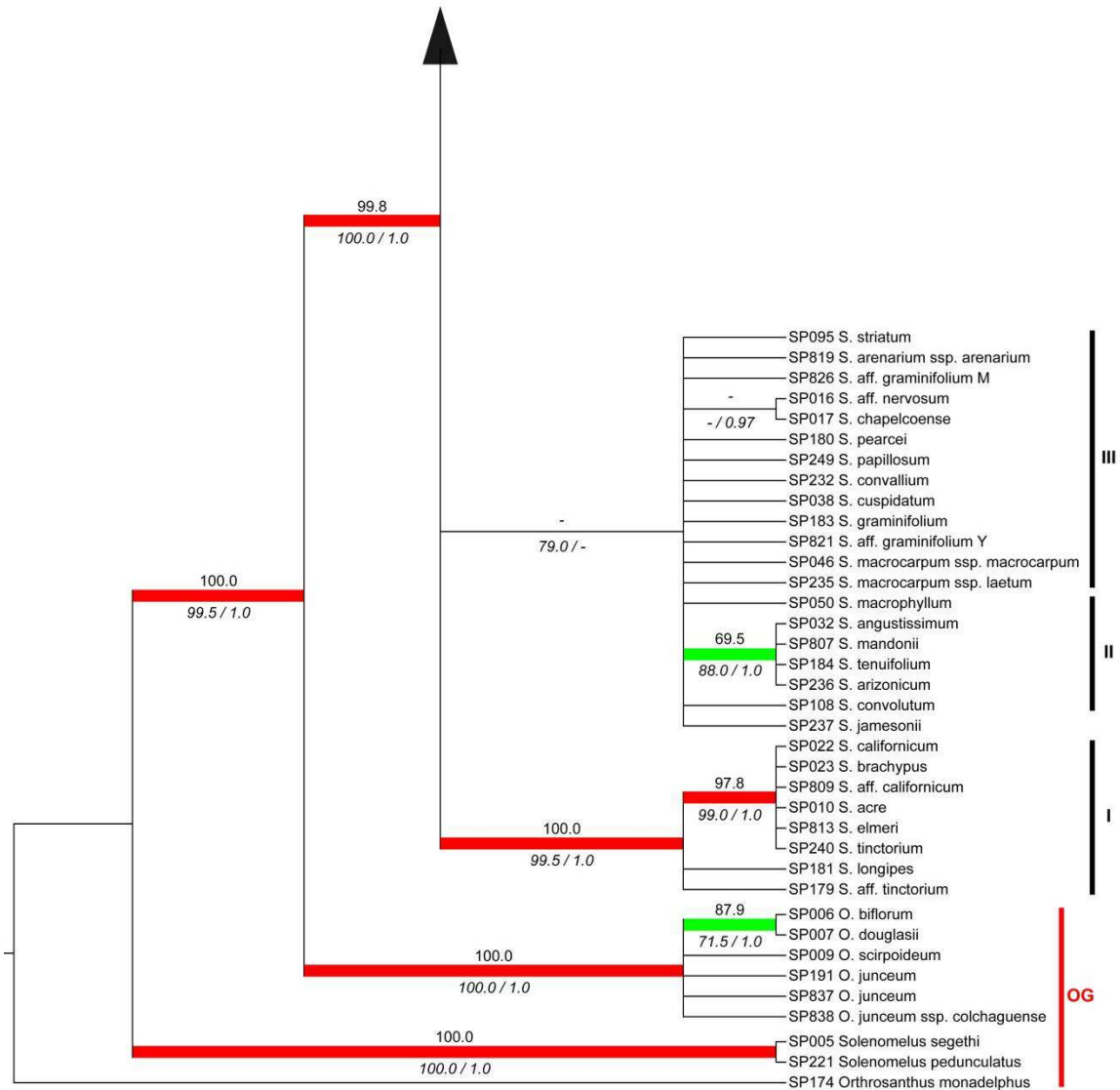


Figure S4. Consensus tree based on the strict consensus tree of the parsimony ratchet, the estimated maximum likelihood tree and the Bayesian 50% majority rule consensus tree obtained from the analysis of the mitochondrial data set. Support values along nodes are parsimony bootstrap (PBS, above branches), likelihood bootstrap (LBS, on the left, below branches) and Bayesian posterior probability (PP, on the right, below branches). The major clades are labelled I to IX. Thick red branches indicate support of at least 80% (PBS), 80% (LBS) and 0.95 (PP). Thick green lines indicate branches in which only two of the three support values reach these minimum values while the third support value is at least 50% (PBS), 60% (LBS) and 0.95 (PP). Thick blue lines indicate branches in which only one of the three support values reach the minimum values set above while the two other support values are at least 50% (PBS), 55% (LBS), 0.95 (PP).

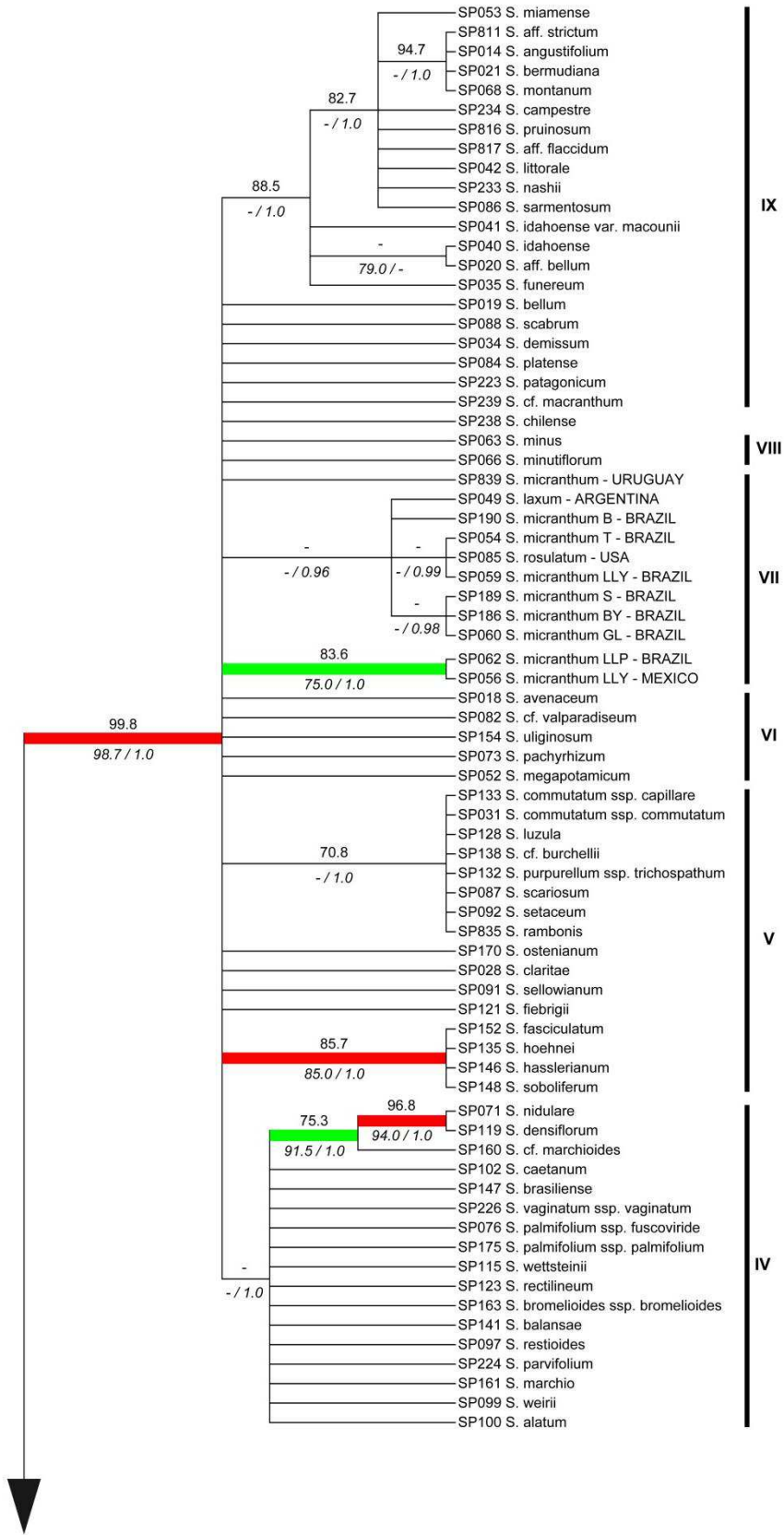


Figure S4. Continued