



**HAL**  
open science

# Etude de l'appareil reproducteur des palmiers (Arecaceae) : évolution du système sexuel et du nombre d'étamines

Elodie Alapetite

► **To cite this version:**

Elodie Alapetite. Etude de l'appareil reproducteur des palmiers (Arecaceae) : évolution du système sexuel et du nombre d'étamines. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112063 . tel-01017166

**HAL Id: tel-01017166**

**<https://theses.hal.science/tel-01017166>**

Submitted on 2 Jul 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

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences du Végétal (ED 145)  
Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution (ESE)

**DISCIPLINE** : Biologie

### THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

soutenue le 17/05/2013

par

**Elodie ALAPETITE**

## ETUDE DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR DES PALMIERS (ARECACEAE) : EVOLUTION DU SYSTEME SEXUEL ET DU NOMBRE D'ETAMINES

**Directeur de thèse :** Sophie NADOT      Professeur (Université Paris-Sud Orsay)

**Composition du jury :**

<i>Rapporteurs :</i>	Jean-Yves DUBUISSON Porter P. LOWRY	Professeur (Université Pierre et Marie Curie - Paris VI) Professeur (Missouri Botanical Garden USA et Muséum National d'Histoire Naturelle Paris)
<i>Examineurs :</i>	Anders S. BARFOD Isabelle DAJOZ Michel DRON	Professeur (Aarhus University Danemark) Professeur (Université Paris Diderot - Paris VII) Professeur (Université Paris-Sud Orsay)









## Résumé

Les palmiers constituent une famille emblématique de monocotylédones, comprenant 183 genres et environ 2500 espèces distribuées sur tous les continents dans les zones tropicales et subtropicales. Leurs feuilles et leurs stipes, très caractéristiques, les rendent facilement reconnaissables dans la nature. En revanche leurs fleurs passent souvent inaperçues. Elles sont généralement petites (quelques centimètres), trimères, unisexuées, peu colorées (blanches ou vertes) et regroupées sur de grandes inflorescences. Cependant les palmiers présentent une diversité importante au niveau du système sexuel et du nombre d'étamines. Les trois systèmes sexuels principaux des angiospermes : hermaphrodisme, monoécie et dioécie, sont présents chez les palmiers. Le nombre d'étamines varie entre quelques unités (oligandrie) et des dizaines, voire centaines, d'unités (polyandrie) chez certains genres. Nous avons étudié l'évolution du système sexuel et du nombre d'étamines à l'échelle de la famille. Nous avons pour cela utilisé une phylogénie comprenant tous les genres de palmiers, bien résolue, datée et qui a été publiée récemment. Notre étude a montré que l'ancêtre commun à tous les palmiers était probablement monoïque et possédait des fleurs oligandres à 6 étamines. A partir de ces états ancestraux, plusieurs transitions ont eu lieu : vers l'hermaphrodisme et la monoécie d'une part, et vers la polyandrie d'autre part. Dans l'objectif d'initier une recherche sur une éventuelle explication fonctionnelle de l'augmentation du nombre d'étamines, nous avons comparé celui-ci à la production de pollen, en étudiant la quantité totale de pollen produite par les fleurs de 82 espèces. Notre étude a montré que, chez deux sous-familles, les fleurs ont tendance à produire plus de pollen quand le nombre d'étamines est plus élevé. Nous avons également réalisé la phylogénie moléculaire d'une sous-tribu (les Ptychospermatinae) dans laquelle la variation du nombre d'étamines est exceptionnelle. De futures études sur la génétique, le développement, l'écologie et la biologie de la pollinisation sont nécessaires.

**Mots clés :** Areaceae, évolution, morphologie de la fleur, nombre d'étamines, palmiers, production de pollen, phylogénie moléculaire, système sexuel

## **Reproductive structures in palms (Areaceae): evolution of sexual system and stamen number**

### **Abstract**

Palms (Areaceae) are an emblematic family of monocots of 183 genera and around 2500 species distributed on all continents, throughout tropical and subtropical areas. Their characteristic leaves and stems make palms immediately recognizable in the field. The inconspicuous palm flowers are usually considered as rather dull. They are usually small (a few centimetres), trimerous, often unisexual, colourless (white or greenish) and grouped into huge inflorescences. However palms exhibit a large diversity in sexual system and in stamen number, diversity that is still poorly understood. The three main sexual systems of angiosperm, hermaphroditism, dioecy and monoecy are present in palms. Stamen number ranges between a few units (oligandry) to several dozens and even several hundreds of units (polyandry) in some genera. We studied the evolution of sexual system and stamen number at the family level. We used as historical framework a well-supported and dated phylogeny, published recently. Our study showed that the putative ancestor of palms was monoecious and

bore oligandrous flowers with 6 stamens. From these ancestral states, several transitions occurred: towards hermaphroditism and dioecy and towards polyandry respectively. In order to initiate a research on a possible functional significance of increase in stamen number, we investigated the relationship between stamen number and pollen production, by extracting the total pollen content from flowers of 82 species. Our study showed a tendency towards higher pollen production when the number of stamen increases in two subfamilies. We also produced molecular phylogeny of a subtribe (Ptychospermatinae) in which the range of variation in stamen number is exceptional. Further investigations into genetic, developmental, ecology and pollination biology are needed.

**Keywords:** Arecaceae, palms, sexual system, stamen number, evolution, flower morphology, pollen production, molecular phylogeny

**Laboratoire :** UMR 8079 - Ecologie, Systématique et Evolution  
Université Paris-Sud, Bât. 360  
91405 Orsay cedex

## **Remerciements**

*Je tiens à remercier tout particulièrement Sophie NADOT, ma directrice de thèse, pour ses précieux conseils et encouragements ainsi que pour la généreuse confiance qu'elle m'a accordée. Merci de m'avoir permis de travailler sur les palmiers, un groupe de végétaux particulièrement intrigant et fascinant, qui a affermit mon gout pour la botanique. Je remercie Sophie également de m'avoir fait partager son expérience de l'enseignement et de m'avoir confié des TD et des TP si intéressants et enrichissants.*

*Je remercie tous les membres de l'équipe DEV : permanents Béatrice ALBERT, Hervé SAUQUET et non permanents Boris DOMENECH, Julien MASSONI, Charlotte PRIEU, Elisabeth REYES, Franck SIMONNET pour les discussions et la belle synergie scientifique qui règne dans notre équipe. Je remercie également ceux qui sont partis vivre de nouvelles aventures, Julie SANNIER et Olivier CHAUVEAU. Ils ont beaucoup aidé la novice que j'étais en biologie moléculaire.*

*Je remercie Christian RAQUIN et Yves LOUBLIER pour leur soutien et leur précieux conseils dans mes expériences sur le pollen.*

*Je remercie les spécialistes des palmiers qui m'ont conseillé et accompagné durant toute cette thèse : Anders BARFOD de l'Université d'Aarhus au Danemark, Bill BAKER des Jardins Botaniques Royaux de Kew, Jean-Christophe PINTAUD, Bertha LUDENA, James TREGGAR de l'IRD de Montpellier. Je tiens à remercier chaleureusement Lauren GARDINER et Laszlo CSIBA qui m'ont aidé pour les prélèvements de matériel à Kew.*

*Je remercie les stagiaires qui ont partagé mon travail et ont j'espère pris goût à la botanique et à la recherche, Nicolas MAINGRET, Aurélie NALIN, Vanessa VILARD, Gérard IMANI, Stéphanie VALLEE. Ils m'ont tous été d'une aide précieuse dans mes recherches.*

*Je remercie tous les membres du labo ESE pour leur accueil et leur soutien, avec une pensée spéciale pour celles et ceux qui ont partagé leur bureau et leurs pauses thé avec moi.*

*Je tiens finalement à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et je m'excuse pour tous ceux que j'ai sans doute oubliés.*



## Table des matières

Introduction .....	13
Partie I : L'évolution de la morphologie de l'inflorescence et de la fleur .....	15
Les plantes et l'évolution .....	15
L'évolution des traits morphologiques .....	15
Les Angiospermes .....	17
La fleur .....	21
Le contrôle génétique de la mise en place des organes floraux .....	26
La morphologie de la fleur et la pollinisation .....	27
Les inflorescences .....	29
Partie II : La famille des palmiers .....	31
Les habitats des palmiers.....	32
Particularités morphologiques et anatomiques.....	33
Des palmiers et des hommes : importance économique et conservation .....	38
Classification et relations phylogénétiques .....	40
Objectifs et méthodes .....	45
Organisation du manuscrit .....	47
Chapitre 1 : Evolution du système sexuel chez les palmiers.....	49
Contexte et objectifs de l'étude .....	51
Caractéristiques des inflorescences et des fleurs de palmiers .....	51
Synthèse des résultats.....	55
Article 1 .....	57
Chapitre 2 : Evolution du nombre d'étamines chez les palmiers.....	107
Contexte et objectifs de l'étude .....	109
Synthèse des résultats.....	111
Article 2 .....	113
Chapitre 3 : Evolution du nombre d'étamines chez les Ptychospermatinae .....	157
Contexte et objectifs de l'étude .....	159
Choix des marqueurs moléculaires .....	160
Synthèse des résultats.....	164
Article 3.....	165

Conclusion générale .....	217
Synthèse des résultats.....	219
Perspectives.....	220
L'évolution du système sexuel.....	220
L'évolution du nombre d'étamines .....	222
La relation entre système sexuel et nombre d'étamines.....	224
Références .....	225
Annexes.....	243
Annexe 1 : Reconstruction de l'évolution de l'organisation des fleurs sur l'inflorescence .....	245
Annexe 2 : protocoles utilisés pour la dissection des fleurs de palmier, l'extraction et le comptage des grains de pollen. ....	247
Annexe 3 : fichier de données PROTEUS .....	249
Annexe 4 : article présentant la phylogénie moléculaire des Archontophoenicinae.....	267

### **Avertissement**

Les figures présentées dans les articles font l'objet d'une numérotation particulière, indépendante de celle utilisée dans le manuscrit. Les références propres à chaque article sont présentées à la fin de ceux-ci.







# **Introduction**



## **Partie I : L'évolution de la morphologie de l'inflorescence et de la fleur**

### *Les plantes et l'évolution*

Les plantes, la diversité de leurs morphologies et de leurs propriétés, sont étudiées depuis l'Antiquité et encore aujourd'hui, dans une optique utilitaire et de connaissance fondamentale. Elles sont décrites et classées pour pouvoir être reconnues, étudiées et utilisées. En revanche le contexte théorique dans lequel elles sont étudiées a profondément changé à mesure que la vision du monde vivant se modifiait. Après une vision cyclique de la nature portée par les philosophes grecs dans laquelle tous les phénomènes naturels se répètent indéfiniment, après une vision fixiste du vivant influencée par le christianisme, une vision historique du monde a émergé. Les entités vivantes s'inscrivent alors dans une progression temporelle irréversible au cours de laquelle elles se modifient peu à peu. Dans *Les Animaux sauvages* (1756), Buffon écrit ainsi que « le grand ouvrier de la Nature est le temps ». Si la théorie transformisme de Lamarck a initié la formalisation de cette nouvelle vision (Corsi 2001), c'est Darwin qui dans son livre *L'Origine des espèces* (1859) définit les fondements de la théorie de l'évolution. Ce nouveau paradigme a profondément bouleversé les sciences biologiques. Les plantes et tous les autres organismes vivants actuels sont perçus comme les fruits d'une histoire qui a un commencement et un sens. Dire que l'évolution possède un sens signifie qu'elle est irréversible (tout comme l'Histoire humaine), mais n'implique pas qu'elle ait un but.

### *L'évolution des traits morphologiques*

La morphologie est définie comme la forme et la structure externe des êtres vivants (Larousse 2013). Lorsque l'on étudie la morphologie d'un organisme, on s'intéresse notamment à la quantité, à la forme, à la répartition et à l'organisation des éléments qui le composent. Ainsi pour décrire la morphologie d'une plante, on peut par exemple préciser la forme des feuilles, leur agencement par rapport à la tige (phyllotaxie) ou le nombre des pétales de la fleur. L'étude de la morphologie constitue l'un des fondements de la botanique. Depuis les débuts de cette discipline, les traits morphologiques ont toujours servi à décrire les espèces et à les classer (par exemple Linné 1753, Bentham & Hooker 1883 ou Cronquist 1981).

La théorie de l'évolution implique que les organismes se modifient au cours du temps, au point de former des espèces différentes. Ceci a ouvert de nouvelles perspectives à l'étude de la morphologie. Dans ce cadre théorique, la diversité morphologique des plantes est considérée comme le résultat d'un processus évolutif, l'adaptation (Bock & von Wahlert

1965). Les traits morphologiques les mieux adaptés à l'environnement ou à l'exécution d'une fonction précise dans cet environnement confèrent un avantage sélectif aux individus qui les présentent. Les gènes qui codent pour ces traits sont transmis aux descendants (hérédité) et sont donc davantage représentés dans les générations suivantes, provoquant ainsi une modification progressive de la morphologie des espèces. Lorsque ces modifications permettent aux individus d'occuper de nouvelles niches écologiques (nouveaux milieux, nouvelles interactions biotiques), un isolement reproductif peut survenir, favorisant l'émergence d'une nouvelle espèce (Levin 1971). La diversification des espèces est donc étroitement liée à celle des morphologies.

Cependant, la variabilité morphologique inter-individuelle sur laquelle s'exerce la sélection naturelle n'est pas infinie mais s'exprime entre les limites fixées par un patron de développement (Maynard-Smith et al. 1985). La notion de plan d'organisation, c'est-à-dire la place des organes les uns par rapport aux autres, a d'abord été mise en évidence chez les animaux (Geoffroy Saint-Hilaire 1829) et a été confortée par la découverte des gènes homéotiques (Lewis 1978). Ces gènes très conservés dans les différents règnes du vivant, déterminent les plans d'organisation des organismes, contraignant ainsi l'évolution des formes et structurant la diversité. Chez les plantes, des gènes contrôlant le développement ont été identifiés ; il s'agit des gènes à MADS-box (Purugganan et al. 1995 ; Becker & Theissen 2003 ; Smaczniak et al. 2012). Ces gènes sont connus notamment pour contrôler la mise en place des différents verticilles de pièces florales (modèle ABC entre autres), mais ils ont également été mis en évidence chez des groupes de végétaux ne possédant pas de fleur. Par exemple chez les mousses ils jouent potentiellement un rôle dans la mise en place des organes végétatifs et reproducteurs (Singer et al. 2007). L'adaptation des plantes au milieu terrestre et leur diversification est probablement liée à l'évolution de leur plan d'organisation (Kenrick & Crane 1997 ; Graham et al. 2000). La diversité des formes est donc permise par des modifications des réseaux de gènes ancestraux régulant le développement et par la génération de nouveaux processus de développement (Becker et al. 2000 ; Theissen et al. 2000). Cette relation entre développement et évolution a donné naissance à une nouvelle discipline appelée « Evo-Devo » (voir Goodman & Coughlin 2000 pour une description).

D'autres processus évolutifs peuvent influencer la morphologie des plantes. La transmission des caractères morphologiques d'une génération à l'autre est soumise à la sélection naturelle et à la sélection sexuelle (Grant 1995 ; Skogsmyr & Lankinen 2002). Mais le hasard joue également un rôle important. En 1968, Motoo Kimura a introduit la théorie neutraliste de l'évolution qui montre que de nombreux allèles ne sont ni avantageux, ni désavantageux, et

donc ne sont pas ou peu soumis à la sélection. Leur devenir au sein des populations ne dépend que du taux de mutation et de la dérive génétique. La dérive génétique est un processus qui participe à l'évolution des formes chez les plantes (Husband & Barrett 1992).

L'hybridation est également une composante importante de l'évolution des plantes (Rieseberg et al. 1993). Elle intervient lorsque la reproduction de deux plantes apparentées proches par flux de pollen donne une descendance fertile. On estime que plus de 70% des espèces naturelles de plantes proviennent d'hybrides (Rieseberg et al. 1993). Ces hybrides peuvent potentiellement présenter des caractères morphologiques nouveaux par rapport aux plantes parentes (Rieseberg & Wendel 1993 ; Morjan & Rieseberg 2004).

En résumé, parmi l'ensemble des possibilités permises par la génétique et le développement d'une lignée évolutive donnée (contraintes phylogénétiques), les traits morphologiques évoluent de manière neutre ou bien ceux qui sont les mieux adaptés sont sélectionnés (contraintes fonctionnelles et environnementales).

Si la théorie de l'évolution permet d'expliquer en grande partie la diversité des traits morphologiques, elle permet aussi de comprendre les ressemblances entre les organismes. La similitude des traits morphologiques chez différentes espèces peut être expliquée par le fait qu'elles ont hérité ces traits d'un ancêtre commun ou bien par le fait qu'elles partagent les mêmes conditions écologiques. Dans le premier cas, les traits morphologiques sont des homologies et peuvent être utilisés pour reconstruire les relations phylogénétiques entre les espèces. Dans le deuxième cas, il s'agit d'un phénomène de convergence. Les convergences sont fréquentes chez les plantes tant au niveau de leur morphologie que de leur fonctionnement (Reich et al. 1997).

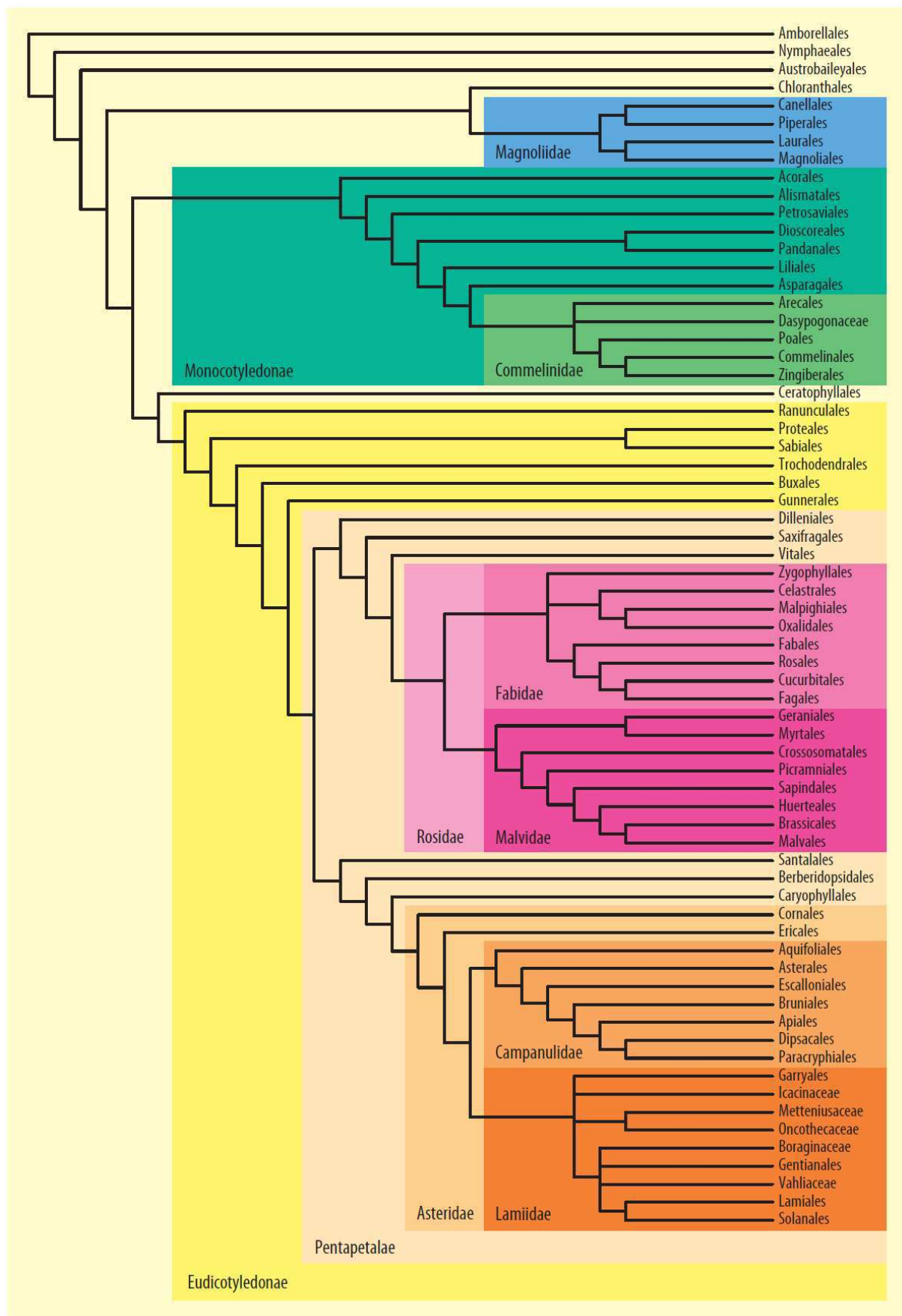
### *Les Angiospermes*

Les angiospermes constituent le groupe le plus important des plantes terrestres tant en nombre de taxons qu'en abondance. Près de 90% des espèces des plantes terrestres (embryophytes) sont des angiospermes (Crepet & Niklas 2009). Ces espèces occupent tous les types de milieux de la toundra aux forêts tropicales, à l'exception des plus arides. Elles constituent en outre les éléments de base de ces nombreux écosystèmes tant par la structuration du milieu que par la production primaire (Wing & Boucher 1998). Le nombre d'espèces connues actuellement est estimé à environ 352 000 espèces (Paton et al. 2008). Mais cette estimation varie selon les études en fonction du taux de synonymie (Scotland & Wortley 2003). De nouvelles espèces d'angiospermes sont encore découvertes aujourd'hui, notamment dans les

« hotspots » (Myers et al. 2000) de biodiversité (par exemple Baker & Heatubun 2012). Le nombre d'espèces encore inconnues correspondrait à environ 10 à 20% du nombre des espèces décrites (Joppa et al. 2010).

Les angiospermes (Fig. 1) constituent un groupe monophylétique (Angiosperms Phylogeny Group 2009). On peut distinguer au sein des angiospermes deux grands groupes monophylétiques, les monocotylédones et les eudicotylédones qui s'enracinent au sein d'un ensemble paraphylétique couramment nommé « angiospermes basales ». Les angiospermes se différencient des autres plantes à graines par un certain nombre de synapomorphies principalement associées à l'appareil reproducteur. Parmi celles-ci on trouve la condensation des organes reproducteurs dans la fleur (cf. description ci-dessous), qui leur donne leur nom de « plantes à fleurs ». Il y a aussi la présence d'une structure enveloppant les ovules qui se transforme en fruit : le carpelle. Le mot « angiosperme » signifie d'ailleurs « graine contenue dans un vase ou récipient ». La double fécondation (la cellule reproductrice contenue dans le grain de pollen se divise pour donner deux noyaux reproducteurs ; l'un fusionne avec l'oosphère pour donner le zygote tandis que l'autre fusionne avec les deux noyaux polaires pour former l'albumen, réserve nutritive pour l'embryon) et les étamines portant deux paires de sacs polliniques sont également des caractéristiques du groupe (Soltis et al. 2009).

L'origine des angiospermes est un sujet de recherche qui suscite de nombreuses études. En se basant sur des critères morphologiques, les Gnétales, un groupe de gymnospermes, ont longtemps été considérées comme le groupe frère des angiospermes. Certaines phylogénies moléculaires ont remis en cause cette hypothèse en montrant la monophylie des gymnospermes actuelles. Ils seraient donc les plus proches parents actuels des angiospermes (Bowe et al. 2000 ; Chaw et al. 2000). Cependant les études incluant les lignées fossiles, semblent montrer que le groupe frère des angiospermes serait constitué d'espèces aujourd'hui éteintes (discuté dans Mathews 2009). Finalement la phylogénie des plantes à graines est encore incertaine et varie considérablement selon les caractères étudiés et les marqueurs moléculaires (Doyle 2012). La période de divergence des angiospermes et des autres plantes à graines est donc encore controversée et pourrait avoir eu lieu au Jurassique moyen ou avant (Wikström et al. 2001 ; Clarke et al. 2011). La plupart du temps, la datation des phylogénies et l'estimation des périodes de divergence des lignées évolutives, sont difficiles à cause du manque de congruence entre les données moléculaires et paléontologiques, des éventuels



**Fig. 1** : Classification des Angiospermes basée sur les relations phylogénétiques (Sauquet & Nadot 2013 d'après Angiosperm Phylogeny Group 2009)



problèmes d'identification des fossiles et de la variété des méthodes que l'on peut utiliser (par exemple Wikström et al. 2001 ; Sauquet et al. 2012).

Peu de temps après leur apparition, les angiospermes ont connu une période de diversification très rapide au cours du Crétacé, comme le montre bien le registre fossile (Wing & Boucher 1998). Cette importante et rapide diversification était considérée par Darwin comme un « abominable mystère » (Friedman 2009) car elle n'était pas en adéquation avec sa théorie.

En effet la théorie de l'évolution des espèces telle qu'elle a été élaborée par Darwin propose que les caractéristiques des organismes évoluent graduellement et lentement en suivant les modifications du milieu. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer cette période de diversification rapide. Il semblerait que la duplication du génome entier (De Bodt et al. 2005), la possibilité de coloniser de nombreuses aires géographiques (Vamosi & Vamosi 2010), la capacité à utiliser les ressources plus efficacement que les autres végétaux (temps de génération court ; Berendse & Scheffer 2009) et surtout la capacité à développer des interactions mutualistes avec d'autres organismes soient autant de facteurs ayant permis une diversification rapide. Les angiospermes interagissent notamment avec des animaux disperseurs de graines (Herrera 2002), des champignons mycorhyziens (Selosse et al. 2006) et les bactéries (Friesen et al. 2011). Mais l'interaction des plantes avec les animaux pollinisateurs, notamment les insectes, semble être la plus importante pour expliquer le succès évolutif des angiospermes (Regal 1977 ; Pellmyr 2002). Cette hypothèse avait déjà été proposée à l'époque de Darwin, par Saporta (Saporta & Marion 1885, cité dans Friedman 2009) et a été largement étudiée depuis.

L'interaction plante-pollinisateur est étroitement liée à la morphologie de la fleur. D'une part les variations morphologiques de la fleur ont augmenté les possibilités d'isolement reproductif (changements dans l'identité des pollinisateurs, dans la localisation du dépôt de pollen sur le pollinisateur par exemple), permettant d'empêcher les croisements avec les individus apparentés. D'autre part de nombreuses structures florales ont été mises en place car elles rendaient la pollinisation plus ciblée et plus efficace, permettant la survie de populations à faibles effectifs. C'est entre autre pour ces raisons que la fleur dans son ensemble et certaines de ses caractéristiques sont considérées comme les principales innovations évolutives des angiospermes ayant contribué à leur succès et à leur taux de diversification élevé.

## *La fleur*

Le plan d'organisation de la fleur est conservé chez la majorité des angiospermes. Il est composé de quatre groupes d'organes presque toujours placés dans le même ordre sur un axe court. De l'extérieur vers l'intérieur, on trouve les sépales (calice), les pétales (corolle), les étamines (androcée) et les carpelles (gynécée ou pistil). La seule exception notable se retrouve chez *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae) où les étamines sont centrales et entourées par les carpelles (Ronse De Craene et al. 2003). Les pétales et les sépales forment le périanthe et ils sont appelés tépales lorsque leur aspect ne permet pas de les distinguer. Le gynécée est le lieu de formation des ovules qui donneront les graines après fécondation. Par analogie avec les modèles de reproduction animale, le gynécée est considéré comme l'appareil reproducteur « femelle » de la fleur. Les étamines, lieu de formation du pollen, sont considérées comme les organes « mâles » de la fleur. La fleur constitue donc le lieu de la reproduction sexuée des angiospermes. Certaines espèces possèdent des fleurs contenant les organes femelles et mâles. Ce sont des fleurs hermaphrodites. D'autres présentent des fleurs unisexuées, contenant uniquement les organes femelles ou les organes mâles. Deux types principaux de systèmes sexuels sont alors définis pour qualifier ces espèces, suivant la répartition des fleurs unisexuées sur les différents individus. Si les fleurs unisexuées des deux sexes sont portées par le même individu, le système sexuel est qualifié de monoïque. Si les fleurs unisexuées sont portées par des individus différents, femelles et mâles, le système sexuel est qualifié de dioïque. Si le plan d'organisation de la fleur est bien conservé, tant chez les fleurs hermaphrodites qu'unisexuées, en revanche il existe une incroyable diversité d'organisation, de forme, de couleur et de nombre de pièces au sein de chaque groupe d'organes.

*La phyllotaxie* : la phyllotaxie des organes floraux est l'angle qui sépare deux organes par rapport au centre de la fleur. On distingue trois grands types de phyllotaxie : spiralée (angle moyen de divergence est  $137.5^\circ$ , les organes de même catégorie tendent à suivre les nombres d'une série de Fibonacci garantissant la meilleure régularité), verticillée (angles de divergence égaux entre les organes d'un verticille mais différents avec l'organe d'un autre verticille) et irrégulière. Chez les angiospermes basales les phyllotaxies spiralées et verticillées coexistent et semblent avoir passé de l'une à l'autre plusieurs fois au cours de leur évolution (Endress 2011). Au contraire la phyllotaxie spiralée est absente chez les monocotylédones et chez la plupart des eudicotylédones (à l'exception de certaines Ranunculales et Rosidées ; Ronse De Craene & Smet 1998). La phyllotaxie irrégulière est courante chez les fleurs qui ont des organes floraux nombreux, notamment des étamines nombreuses (chez les Nymphaeales et les

Magnoliales parmi les angiospermes basales, chez les Arecales parmi les monocotylédones ou encore chez les Ranunculales parmi les eudicotylédones ; Ronce De Craene & Smet 1998 ; Dransfield et al. 2008 ; Endress 2011). Une phyllotaxie en verticilles plus ou moins complexe, s'accompagnant d'une modification éventuelle de la mérosité entre les verticilles (voir ci-dessous), est présente chez la majorité des angiospermes les plus dérivées (Endress 2011).

*La mérosité* : la mérosité (ou mérie) fait référence au nombre d'organes de chaque catégorie et par extension au nombre d'organes présents dans chaque verticille ou groupe. La mérosité est majoritairement de 3 (trimère) chez les monocotylédones et de 5 (pentamère) chez les eudicotylédones. Des variations autour de ce pattern de base ont eu lieu ; réduction du nombre d'organes par verticille (par exemple chez les Poaceae) ou augmentation (duplication des verticilles par exemple). Les rares cas de tétramérie (mérosité de 4) dérivent de la perte d'un organe dans deux verticilles de 3 organes (ex : Proteaceae) ou de la perte d'un organe dans un verticille pentamère (ex : Oleaceae). La mérosité est plus fluctuante chez les angiospermes basales. La trimérie se retrouve chez les Magnoliales, les Laurales et les Pipérales, la pentamérie uniquement chez les Canellaceae. Pour les fleurs à phyllotaxie spiralée, la mérosité au sein d'une série fluctue selon les fleurs en suivant un nombre des séries de Fibonacci (ex : Calycanthaceae). Ce phénomène se retrouve également chez les eudicotylédones basales notamment chez les Ranunculaceae. Dans ce dernier groupe on trouve également des fleurs pentamères alors que les fleurs de eudicotylodénes basales sont majoritairement dimères (mérosité de 2) ou trimères (Endress 2011).

*La symétrie* : deux grandes catégories de symétrie sont retrouvées au niveau de la fleur des angiospermes, la symétrie radiale ou actinomorphic (plusieurs plans de symétrie identiques) et la symétrie bilatérale ou zygomorphie (un seul plan de symétrie). La symétrie est en général définie à partir du périanthe mais l'androcée est également considéré dans certains cas. Quelques exceptions existent, avec des espèces présentant des fleurs dissymétriques (ex : au sein des Fumarioideae, une sous-famille des Papaveraceae) ou asymétriques (ex : certaines Fabaceae, Cannaceae). L'actinomorphic est considérée comme l'état ancestral de la symétrie chez les angiospermes. La zygomorphie apparait assez tard dans le registre fossile et a avoir évoluée à de nombreuses reprises indépendamment durant l'histoire évolutive des angiospermes (Jabbour et al. 2008 ; Citerne et al. 2010). On la retrouve ainsi chez les monocotylédones (ex : Zingiberales, Orchidaceae) et chez les eudicotylédones (ex : Fabaceae, Asteraceae). Au contraire les angiospermes basales présentent une symétrie radiale comme la plupart des eudicotylédones ayant divergé précocement (ex : Ranunculales ; Damerval &

Nadot 2007). La zygomorphie est considérée comme une innovation évolutive clé, promoteur de la diversification. En effet elle est associée à un positionnement plus précis du pollinisateur sur la fleur et ainsi une pollinisation plus efficace et un meilleur degré de spécificité. Ce degré de spécificité rend possible l'isolement reproducteur et ainsi la spéciation (Sargent 2004).

*Le périanthe* : Le plus souvent le périanthe est composé de deux verticilles d'organes différents, le plus externe est un verticille de sépales (calice) et le plus interne un verticille de pétales (corolle). Les pétales et les sépales présentent une organisation relative variée ; ils sont soit imbriqués (se recouvrant partiellement suivant un pattern fixé), valvés (jointifs sans se recouvrir) ou ouverts (séparés). Ils peuvent également être fusionnés, partiellement ou totalement. Il existe une très grande variabilité de formes pour les organes du périanthe et leurs fonctions peuvent également être différentes. Chez de nombreuses familles, les sépales sont plus petits et moins colorés que les pétales. Ils servent en grande partie à la protection du bouton floral. Au contraire les pétales sont souvent colorés et voyants, participant ainsi à la reconnaissance visuelle à longue distance des insectes ou animaux pollinisateurs (Thomson & Wilson 2008 ; Dyer et al. 2012). Dans certains cas, les sépales et les pétales ne peuvent pas être morphologiquement distingués, leurs aspects étant parfaitement similaire, on parle alors de tépales (ex. Magnolideae, Asparagales). Le périanthe est particulièrement modifié et complexe chez certaines espèces à symétrie bilatérale et à pollinisation très spécialisée (ex : Orchidaceae chez les monocotylédones ; Fabales, Lamiales chez les eudicotylédones). La modification peut aboutir par exemple à la formation d'un éperon, structure dédiée à la présentation de grandes quantités de nectar aux pollinisateurs. Les éperons sont considérés comme une innovation évolutive clé des angiospermes, favorisant l'isolement reproducteur et donc la spéciation (Hodges & Arnold 1995).

La disparition des sépales est un événement rare ; il intervient lorsque la fonction de protection du bouton floral a été transférée aux pétales (ex : Apiaceae, Rubiaceae) ou à la préfeuille florale (Acanthaceae ; Endress 2011). Les sépales sont parfois réduits et occupent une autre fonction que la protection, comme par exemple une fonction dans la dispersion des graines chez les Asteraceae (pappus). La disparition ou la réduction des pétales s'est produite plusieurs fois (ex : Cyperaceae, Fagales). Il semble, en fonction de la distribution de la présence ou de l'absence des pétales selon les groupes taxonomiques, que les pétales ont évolué, disparu et réapparu plusieurs fois au cours de l'histoire des angiospermes (Endress 2011). Chez certains groupes, le périanthe est perdu entièrement, le bouton floral étant protégé par les bractées ou les préfeuilles (ex : Chloranthaceae, Piperales, Poales, Betulaceae ;

Endress 2011). La simplification du périanthe, voir sa disparition, est souvent associée à une pollinisation par le vent (Linder 1998 ; Culley et al. 2002 ; Friedman & Barrett 2008). Une des conséquences de la perte du périanthe est que la position et le nombre des organes internes, notamment les étamines, deviennent très labiles (Endress 1990).

*L'androcée* : L'androcée est constitué de l'ensemble des étamines, lieu de production du pollen (D'Arcy 1996). Au sein de la fleur les étamines peuvent être arrangées en verticilles ou en spirale. Lorsque les étamines sont nombreuses l'arrangement peut être plus complexe et irrégulier (Ronse De Craene & Smets 1987 ; Ronse De Craene & Smets 1998).

Le nombre d'étamines est très variable chez les angiospermes et il a augmenté et diminué de très nombreuses fois au cours de l'histoire évolutive de ce groupe. Les fleurs possédant un grand nombre d'étamines sont qualifiées de « polyandres » tandis que par opposition, celles possédant un petit nombre d'étamines sont qualifiées d'« oligandre » (Ronse De Craene & Smets 1998). Plusieurs centaines ou plusieurs milliers d'étamines se retrouvent chez différentes familles (Arecaceae, Lecythidaceae ou Cactaceae par exemple). Une augmentation aussi importante du nombre d'étamines nécessite un réceptacle floral élargi par exemple chez *Tambourissa* (Monimiaceae ; Endress & Lorence 1983) ou des filets très fins. Certaines morphologies florales semblent incompatibles avec des étamines nombreuses. C'est notamment le cas de la zygomorphie (Jabbour et al. 2008) et des inflorescences très compactées des Asteraceae par exemple. L'évolution du nombre d'étamines est discutée plus en détails dans le chapitre 2 de cette thèse.

Certaines étamines peuvent être stériles, c'est-à-dire que les anthères ne produisent pas de pollen ou du pollen non fonctionnel, on parle alors de staminodes. Les staminodes peuvent se trouver dans les fleurs hermaphrodites côtoyant les étamines et dans les fleurs unisexuées femelles, constituant les vestiges des étamines. Les staminodes peuvent avoir différentes fonctions dans la pollinisation, telles que l'attraction des pollinisateurs ou la production de récompenses pour ces derniers (Walker-Larsen & Harder 2000 ; Ronse De Craene & Smets 2001).

*Le gynécée* : Le gynécée est composé de l'ensemble des carpelles qui contiennent les ovules. On distingue trois parties distinctes dans un carpelle, le stigmate, partie distale sur laquelle se posent les grains de pollen, le style, partie médiane dans laquelle progresse le tube pollinique et l'ovaire, partie basale qui renferme les ovules. Chez la majorité des angiospermes, les carpelles sont soudés (syncarpie) et les styles sont unifiés au moins sur une partie de leur

longueur. Les tubes polliniques sont ainsi répartis entre les différents carpelles même si les grains de pollen ont une répartition hétérogène sur les stigmates. Une sélection des meilleures cellules reproductrices mâles est alors effectuée à l'échelle du gynécée (Armbruster et al. 2002). La syncarpie est considérée comme une innovation évolutive clé des angiospermes et elle est apparue plusieurs fois au cours de leur histoire chez les monocotylédones et chez les eudicotylédones (Endress 2011). Chez la majorité des angiospermes basales, un seul carpelle est présent ou lorsqu'il y en a plusieurs, ils ne sont pas soudés (apocarpie). Chez les monocotylédones, le nombre de carpelles est le plus souvent 3 alors que chez la majorité des eudicotylédones il oscille entre 2 et 5. Chez les angiospermes basales et les eudicotylédones ayant divergé le plus précocement, le nombre de carpelles peut être plus élevé. Ils sont alors organisés en plusieurs verticilles ou en spirale. Les plus grands nombres de carpelles se retrouvent chez les Monimiaceae (2000 carpelles chez *Tambourissa ficus* ; Lorence 1985) et chez les Ranunculaceae (10 000 carpelles chez *Laccopetalum giganteum* ; Tamura 1995 cité dans Endress 2011). On observe une corrélation entre un grand nombre de carpelles et l'apocarpie et entre un nombre plus faible de carpelles et la syncarpie. Cette corrélation est probablement due à des contraintes architecturales qui ne permettent pas d'organiser un grand nombre de carpelles de manière à ce qu'ils puissent être fusionnés (Endress 2006). Une des caractéristiques morphologiques importantes du gynécée est la position de l'ovaire par rapport au réceptacle floral. Il est dit infère lorsqu'il est situé en dessous du plan d'insertion des pièces florales et donc inclus dans un réceptacle floral concave.

Il est dit supère lorsqu'il est situé au dessus du plan d'insertion des pièces florales et donc positionné au dessus d'un réceptacle floral convexe. Les ovaires infères sont supposés protéger les ovules de la prédation, notamment par les pollinisateurs pouvant être également phytophages tels que les coléoptères (Grant 1950).

*La « synorganisation » des organes floraux* : L'une des tendances évolutives majeures de la fleur des angiospermes est l'augmentation de la « synorganisation » des différents organes. La « synorganisation » est définie comme la connexion de deux ou plus éléments structurels pour former un système fonctionnel (Soltis et al. 2009). Elle résulte de l'imbrication ou de la fusion des organes au sein d'un verticille ou entre les verticilles. Nous avons vu notamment que les pièces de la corolle peuvent être soudées pour donner des structures morphologiquement complexes telles que l'éperon et qui jouent un rôle prépondérant dans la pollinisation par les animaux. Les carpelles sont également fréquemment soudés afin d'optimiser la reproduction (voir ci-dessus). La fusion des étamines, bien que plus rare que celle des pétales ou des

carpelles, se retrouve chez certains groupes et pourrait jouer un rôle dans l'optimisation du transfert du pollen par les pollinisateurs (Ren & Tang 2010). Chez les Asteraceae notamment, les anthères sont soudées et forment un tube autour du gynécée. La fusion d'organes appartenant à des verticilles différents intervient principalement entre les pétales et les étamines et entre les étamines et les carpelles. Dans le deuxième cas, la « synorganisation » permet la présentation secondaire du pollen sur le gynécée (Endress 2011). L'acquisition et la perte de la « synorganisation » des fleurs ont eu lieu plusieurs fois durant l'histoire évolutive des angiospermes (Soltis et al. 2009).

### *Le contrôle génétique de la mise en place des organes floraux*

Les nombreuses variations de la morphologie de la fleur décrites ci-dessus s'inscrivent dans un cadre développemental et sont régulées par des mécanismes génétiques dont l'étude est en plein essor. La découverte des gènes à MADS-box a ouvert la voie à la compréhension du contrôle génétique de la mise en place des organes floraux (Coen & Meyerowitz 1991). Le premier modèle proposé est connu sous le nom de « modèle ABC » et suggère que la détermination de l'identité des organes est réalisée par l'action de gènes appartenant à trois fonctions différentes A, B et C (Coen & Meyerowitz 1991). Selon ce modèle, l'action des gènes de la fonction A permet la mise en place des sépales et conjointement avec ceux de B la mise en place des pétales. L'action des gènes de la fonction C au centre de la fleur permet le développement des carpelles par arrêt de croissance du méristème et conjointement avec ceux de B, le développement des étamines. Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes de la fonction A sont *APETALA1* et *APETALA2*, ceux de la fonction B, *APETALA3* et *PISTILLATA* et *AGAMOUS* pour la fonction C. Par exemple, la mutation du gène *AGAMOUS* provoque le remplacement des étamines par des pétales. D'autres modèles ont été proposés par la suite, ajoutant par exemple des gènes de la fonction E (famille des gènes *SEPALLATA*) activant les gènes du modèle ABC (Pelaz et al. 2000 ; Honma & Goto 2001 ; Castillejo et al. 2005). Il a été proposé que les différentes protéines codées par ces gènes interagissent en quartets (Theissen & Melzer 2007). Un modèle alternatif au modèle ABC, FBC propose que la formation des sépales soit permise par l'absence d'expression des gènes B plutôt que par l'expression des gènes A. Les gènes de la fonction F s'exprimeraient dans toute la fleur pour permettre la formation du méristème floral (Schwarz-Sommer et al. 1990). Les autres caractéristiques de la morphologie de la fleur sont soumises au contrôle d'autres gènes. Par exemple la mise en place de la symétrie bilatérale est notamment contrôlée par les gènes *CYCLOIDEA*, *DICHOTOMA*, *RADIALIS* et *DIVARICATA* chez *Antirrhinum majus* et par des

orthologues de ces gènes chez d'autres espèces (Busch & Zachgo 2009 ; Preston et al. 2011). Chez *Linaria vulgaris*, un mutant naturel présentant une symétrie radiale au lieu de la symétrie bilatérale habituelle, présente une modification épigénétique de l'orthologue de *CYCLOIDEA* (Cubas et al. 1999). Le rôle de l'épigénétique dans l'évolution de la morphologie florale est un champ de recherche qui reste encore largement à explorer.

Si les gènes à MADS-box semblent être responsables du contrôle de la mise en place des organes floraux chez toutes les angiospermes (Bowman 1997), les limites de leurs zones d'activité au sein de la fleur en développement peuvent être un peu différentes suivant les groupes. Le modèle ABC proposé d'abord chez les eudicotylédones (*Arabidopsis* et *Antirrhinum*) présente des limites franches entre les zones d'expression des différents gènes, permettant une détermination forte des différents verticilles d'organes. En revanche, chez les angiospermes basales, il semble que les limites d'expression soient moins clairement définies, résultant en un gradient dans la morphologie des organes (voir Frohlich 2007). Chez le nénuphar par exemple, il y a une continuité entre les pétales et les étamines (continuité liée à l'organisation spiralée des organes floraux). Les modifications de limites des zones d'expression des gènes à MADS-box et les nouvelles interactions établies par les protéines qu'ils codent ont probablement participé à la diversification des angiospermes (Theissen et al. 2000).

### *La morphologie de la fleur et la pollinisation*

De nombreux traits morphologiques des fleurs sont des adaptations au processus de pollinisation, c'est-à-dire au transfert du pollen des anthères d'une fleur au pistil de la même ou d'une autre fleur pour permettre la reproduction sexuée. Ce transfert peut se faire passivement au sein d'une même fleur ou grâce à des agents de pollinisation entre des fleurs différentes. Lorsque le pollen fécondant provient du même individu que les ovules, on parle d'autogamie (autofécondation). Dans le cas contraire on parle d'allogamie.

Il est fréquent de rencontrer chez les angiospermes un système de reproduction mixte, autogamie et allogamie. Différentes stratégies évitant ou limitant l'autogamie ont été sélectionnées : la dioecie, l'auto-incompatibilité, la dichogamie mais aussi des adaptations morphologiques comme par exemple l'hétérostylie ou l'énantiostylie (Barrett 2002). L'autogamie peut néanmoins constituer un avantage en permettant le maintien de la reproduction dans les milieux pauvres en agents de pollinisation, où le transfert de pollen est limitant (Wilcock & Neiland 2002).



Les agents de pollinisation peuvent être abiotiques (vent et eau) ou biotiques (animaux). De nombreux traits floraux constituent des adaptations à l'interaction de la plante avec les agents de pollinisation, afin d'optimiser le transfert du pollen. Des modifications importantes de la morphologie en fonction des différents pollinisateurs ont ainsi été mises en évidence (par exemple Whittall & Hodges 2007 ; Thomson & Wilson 2008). Des expériences de modification de la morphologie dans des populations naturelles ont montré que certains traits floraux sont bien le résultat d'une adaptation (Campbell 2009). En revanche, un effet de la sélection sur les variations phénotypiques n'est pas toujours mis en évidence dans les populations actuelles. Il semble donc que la mise en place des traits floraux constituant une adaptation à la pollinisation se soit faite rapidement durant les périodes d'intense diversification et qu'en dehors de ces périodes la sélection intervienne peu (Harder & Johnson 2009).

Environ 90 % des angiospermes ont leur pollen transporté par des animaux (entomophilie), en grande majorité des insectes (Hyménoptères, Diptères, Lépidoptères et Coléoptères) mais aussi des oiseaux et des chauves-souris (Fleming et al. 2009). Dans ce cas, un certain nombre de traits floraux servent au signalement et à la reconnaissance des fleurs par les pollinisateurs : notamment la couleur, la symétrie, les guides nectarifères, les odeurs, le relief de la structure des pétales. Il semble que les premières espèces d'angiospermes aient déjà mis en place cette interaction plante-pollinisateur et que leur pollen était transporté par les insectes (Thien et al. 2000). Environ 10% des espèces d'angiospermes ont leur pollen transporté par le vent (anémophilie). Ce mode de pollinisation a évolué plusieurs fois à partir de la pollinisation par les insectes, dans des lignées indépendantes. Ce mode de transfert de pollen est souvent associé à de petites fleurs, peu voyantes, au périanthe réduit. Il est probablement avantageux pour assurer la reproduction dans des conditions environnementales où les pollinisateurs sont rares (Culley et al. 2002 ; Friedman & Barrett 2008 ; Friedman & Barrett 2009).

De nombreuses caractéristiques morphologiques des fleurs liées à la pollinisation sont apparues plusieurs fois dans l'histoire évolutive des angiospermes, dans des lignées parfois très éloignées phylogénétiquement. Cela peut s'expliquer par le fait que les pressions écologiques et environnementales étant très fortes sur la morphologie de la fleur, des morphologies identiques pourront être sélectionnées chez des espèces non apparentées mais vivant dans des conditions environnementales proches. Il en résulte que les convergences sont fréquentes dans l'histoire évolutive de la fleur et qu'il faut y être particulièrement attentif si l'on utilise ces caractères pour la phylogénie ou la classification.

L'optimisation du transfert de pollen et l'interaction avec l'agent de pollinisation ne sont pas les seules forces de sélection qui peuvent s'appliquer sur la morphologie florale. Par exemple la résistance aux herbivores ou à des stress environnementaux peut également exercer une contrainte sur l'évolution des traits (Strauss & Whittall 2006).

### *Les inflorescences*

Chez de nombreuses espèces d'angiospermes, les fleurs ne sont pas solitaires mais réunies en inflorescence. Différentes architectures d'inflorescences existent et leur classification est parfois difficile. En revanche leur organisation est souvent caractéristique d'un groupe taxonomique (Prenner et al. 2009). On distingue couramment les inflorescences dont l'axe principal est indéterminé (racèmes), de celles dont l'axe est déterminé (cymes). Les inflorescences peuvent être simples, c'est-à-dire ne comportant qu'un seul axe, ou bien porter de plus ou moins nombreux embranchements. L'existence et la position des bractées et bractéoles (aussi appelées préfeuilles) sont également des caractéristiques importantes de l'architecture des inflorescences. Par exemple, chez de nombreux eudicotylédones, une paire de bractées constitue les premiers organes d'un axe d'inflorescence alors que chez les monocotylédones il n'y en a qu'une (Prenner et al. 2009). La taille et le nombre d'inflorescences portées par un même pied sont variables en fonction notamment de stratégies de reproduction et des ressources disponibles (Shoen & Dubuc 1990).

La répartition des organes reproducteurs au sein des fleurs permet la mise en place d'un premier niveau de diversité dans les modes de reproduction. Les fleurs peuvent ainsi être hermaphrodites ou unisexuées. La répartition de ces fleurs hermaphrodites ou unisexuées sur les inflorescences permet la mise en place d'un deuxième niveau de diversité dans les modes de reproduction. Des associations complexes de fleurs unisexuées et hermaphrodites sur la même inflorescence, sur des inflorescences différentes ou sur des plantes différentes sont retrouvées chez certains groupes.

Des hypothèses sur la fonction des différentes architectures des inflorescences ont été proposées et concernent différents aspects de la reproduction (résumées dans Jordan & Harder 2006). Les différents types d'inflorescences pourraient influencer le comportement des agents de transport du pollen et ainsi la dispersion du pollen. Ils joueraient notamment un rôle dans l'attraction des pollinisateurs et leur comportement au sein de l'inflorescence. L'architecture de l'inflorescence influencerait également la répartition des ressources entre les fruits produits ainsi que la prédation et la dispersion des fruits et des graines.

Comme pour la morphologie des fleurs certaines caractéristiques des inflorescences ont été sélectionnées plusieurs fois au cours de l'histoire évolutive des angiospermes, suggérant à nouveau que les pressions environnementales sont fortes et conduisent à des phénomènes de convergence. Néanmoins la diversité des architectures des inflorescences est également le fruit d'une interaction entre l'adaptation et les processus de développement (Prusinkiewicz et al. 2007). Le contrôle génétique du développement des inflorescences est de plus en plus étudié. Il semble que des gènes tels que *LEAFY*, *APETALA1* et *TERMINAL FLOWER1* jouent un rôle important dans la mise en place de l'inflorescence chez *Arabidopsis thaliana* (Prenner et al. 2009).

## Partie II : La famille des palmiers

Les palmiers (Arecaceae ou Palmae) constituent une famille emblématique d'Angiospermes monocotylédones. Cette famille compte 183 genres et approximativement 2 500 espèces (Palmweb 2013), distribués dans toutes les zones tropicales et subtropicales du globe (Fig. 2). Les palmiers sont présents majoritairement dans la région Asie-Pacifique (environ 1 600 espèces), en Amérique centrale et du Sud (environ 730 espèces) et de manière moins diversifiée en Afrique (environ 65 espèces).

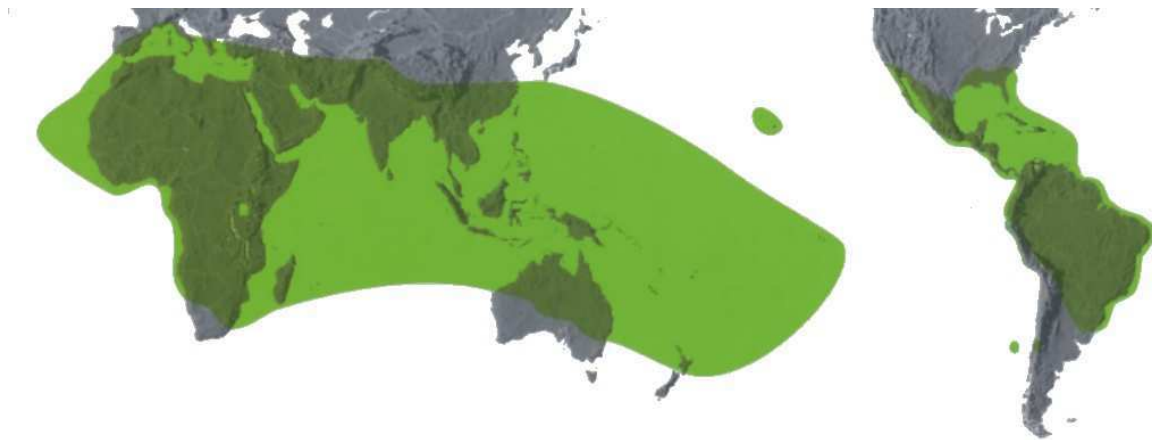


Fig. 2 : Distribution des espèces actuelles de palmiers (Dransfield et al. 2008)

Les palmiers constituent les seuls représentants de l'ordre des Arecales (Fig. 1). Selon la dernière classification APGIII (Angiosperm Phylogeny Group 2009), ils appartiennent au groupe des Commelinidae, au sein desquels néanmoins les relations phylogénétiques restent incertaines. Les palmiers pourraient ainsi être le groupe frère des Dasypogonaceae ou bien des autres membres des Commelinidae (Poales, Commelinales et Zingiberales).

La monophylie de la famille est bien soutenue tant par les caractères morphologiques que par les marqueurs moléculaires (Baker et al. 2009). Cependant peu de caractères morphologiques sont exclusifs aux palmiers et non partagés par d'autres membres des Monocotylédones. L'appareil végétatif des Cyclanthaceae est par exemple très similaire à celui des palmiers (Stevens 2001). C'est le mode de développement des feuilles (présenté plus loin) qui semble être la caractéristique majeure de la famille.

La diversification des différentes lignées de palmiers pourrait avoir commencé au milieu du Crétacé il y a environ 100 millions d'années sur le supercontinent Laurasie (représentant actuellement l'Amérique du Nord et l'Europe ; Couvreur et al. 2011). Baker et al. (2012a et b) suggèrent que la répartition actuelle des espèces est plus probablement le résultat de phénomènes de dispersion sur de longues distances plutôt que due au phénomène de vicariance.

La famille des palmiers a été largement étudiée et décrite. L'ensemble des travaux concernant son évolution et sa classification a été réuni dans un livre, *Genera Palmarum* (Dransfield et al. 2008). Une grande partie des informations présentée dans la suite de cette introduction fait référence à cet ouvrage.

### *Les habitats des palmiers*

Les palmiers occupent des habitats tropicaux et sub-tropicaux très diversifiés (Dransfield et al. 2008). Ils sont présents dans toutes les forêts tropicales humides (Fig. 3a et b), sous la forme d'arbustes de sous-bois, de grands arbres émergeant de la canopée ou de lianes (palmiers grimpants ou rotins tels que les espèces du genre *Calamus*) s'accrochant aux troncs des autres arbres. Ils constituent les végétaux les plus communs des zones montagneuses tropicales. On les trouve également dans les habitats humides tels que les mangroves (Fig. 3c) et les forêts inondées d'Amazonie (varzea), ils sont présents sur les littoraux (Fig. 3d), dans les forêts sèches, les savanes et les oasis (Fig. 3e). Dans les zones sub-tropicales, les habitats sont également variés. Par exemple, le genre *Serenoa* est présent dans les forêts de pins en Floride (Fig. 4a), *Rhopalostylis* dans les forêts légèrement tempérées de Nouvelle-Zélande, *Trachycarpus* dans les montagnes de l'Himalaya (Fig. 4b) et *Chamaerops* dans les végétations de type maquis en Afrique du Nord et en Méditerranée (Fig. 4c).

La principale limitation écologique à la distribution des palmiers est la température. En effet ces organismes ne peuvent pas entrer en dormance (cf. description morphologique ci-dessous) et ne peuvent donc pas survivre à de longues périodes de gel qui induisent des dommages irréversibles à leurs cellules (Tomlison 2006). La présence de palmiers dans un milieu semble également fortement corrélée à la disponibilité en eau (Bjorholm et al. 2005 ; Kreft et al. 2006) et en énergie (liée au rayonnement solaire ; Eiserhardt et al. 2011). Le genre *Nannorrhops* est le seul à présenter des conditions de vie réellement désertiques.



**Fig. 3 :** Illustration de la diversité morphologique des palmiers et de leurs habitats en zone tropicale, de gauche à droite et de bas en haut : (a) forêt tropicale humide en Amazonie, *Bactris*, *Attalea*, *Euterpe* et *Astrocaryum*, (b) *Howea fosteriana* à Lord Howe Island en Australie, (c) *Nypa fruticans* en Papouasie, (d) *Cocos nucifera* en Nouvelle Guinée, *Areca catechu* et (e) *Phoenix dactylifera* à Oman (photographies (a) Couvreur et al. 2011 (b-e) Palmweb)

La plus grande diversité spécifique de palmiers (90%) se trouve dans les forêts tropicales humides (Couvreur et al. 2011). Ils constituent l'un des membres les plus remarquables et les plus importants de ce biome. Par leur diversité et leur abondance, ils jouent des rôles écologiques majeurs entre autres dans la structuration et la composition des sols ou les interactions plantes-animaux (Henderson 2002 ; Dransfield 2008).

#### *Particularités morphologiques et anatomiques*

L'appareil végétatif de la majorité des palmiers présente une architecture caractéristique et aisément reconnaissable. Il se constitue d'un tronc, appelé stipe, pouvant être de grande taille et portant des feuilles palmées ou pennées (Fig. 5).

Les palmiers appartiennent au groupe des Monocotylédones dont les membres se caractérisent par l'absence de croissance secondaire. Si la majorité des Monocotylédones sont des

herbacées à faible longévité, certaines espèces sont néanmoins capables d'occuper la strate arborée et d'accroître leur durée de vie. C'est le cas chez les palmiers mais aussi chez les bambous, les pandanus et les Zingibérales (Stevens 2001). La transition vers des formes de vie arborées a eu lieu vraisemblablement plusieurs fois de manière indépendante dans ce groupe (Fig. 1). L'accroissement de la taille peut potentiellement constituer un avantage compétitif pour la photosynthèse mais aussi pour la dispersion du pollen et des graines. Une des principales caractéristiques des palmiers est donc leur capacité à former des organismes à port arboré, et ayant une longévité importante, uniquement à partir de processus de croissance primaire (Tomlison 2006). En effet tous les tissus d'un palmier sont issus de méristèmes primaires racinaires et apicaux en constant fonctionnement, complétés par des méristèmes intercalaires. Une fois établis, les tissus primaires ne pourront donc pas être remplacés et resteront actifs pendant la durée de vie du palmier, qui peut se mesurer en siècles. En ce sens les palmiers sont différents des arbres considérés comme « vrais » car produisant du bois, que l'on retrouve parmi les conifères et les eudicotylédones. Ces organismes produisent continuellement de nouveaux tissus vasculaires secondaires à partir du cambium. Celui-ci génère le bois (xylème) vers l'intérieur et le liber (phloème) vers l'extérieur. Ces tissus ne fonctionnent que durant quelques décennies, puis deviennent inactifs et conservent uniquement leurs propriétés mécaniques. Le bois ainsi formé permet le maintien du port érigé du tronc. Le constant renouvellement des tissus vasculaires rend possible la survie de l'individu pendant plusieurs siècles. L'absence de croissance secondaire pose donc un certain nombre de questions concernant la formation du stipe et la longévité des palmiers. Les stipes peuvent atteindre de grandes hauteurs et maintenir un port érigé en développant d'abondantes fibres lignifiées, associées ou non aux vaisseaux conducteurs (Tomlison et al. 2011). Ces fibres se retrouvent également dans les feuilles à qui elles confèrent leur résistance. Le système vasculaire et les fibres occupent l'intégralité du stipe en grands faisceaux verticaux. Lors de la croissance du jeune palmier, le stipe croît d'abord en diamètre jusqu'à atteindre la circonférence de maturité, avant de croître en hauteur. Le diamètre est donc fixé précocement. Chez certaines espèces néanmoins le stipe peut présenter une augmentation ultérieure du diamètre par l'augmentation de la taille et du nombre des fibres.

Compte-tenu des caractéristiques morphologiques et anatomiques présentées ci-dessus, le stipe des palmiers est le plus généralement non ramifié. En effet un axe dont les capacités mécaniques et de transport sont fixées et limitées par la croissance primaire ne peut pas porter de trop nombreux et volumineux embranchements. Certains palmiers néanmoins peuvent



avoir des bourgeons axillaires (à la base des feuilles) qui se développent pour former de nouveaux axes (ex : *Chamaedorea*) ou parfois présenter une division dichotomique du méristème apical (ex : *Nypa* ; Dransfield et al. 2008). Le développement des bourgeons et les divisions de l'apex sont le plus souvent situés à la base du stipe principal et chaque embranchement produit son propre système racinaire (Tomlinson et al. 2011). Cependant chez *Hyphaene coriacea*, les divisions de l'apex se font à différents niveaux du stipe, donnant un aspect général inhabituel à ce palmier.



Fig. 4 : Illustration de la diversité morphologique des palmiers et de leurs habitats en zone sub-tropicale, de gauche à droite: (a) *Serenoa repens* en Floride, (b) *Trachycarpus martianus* au Népal, (c) *Chamaerops humilis* à Majorque (photographies Palmweb)

La longévité des cellules du stipe, les mécanismes qui leur permettent de rester fonctionnellement et métaboliquement actives durant une très longue période sont encore mal connus et constituent un vaste champ de recherche pour l'avenir (Tomlinson et al. 2012). L'absence de croissance secondaire confère des avantages aux palmiers qui échappent ainsi à certaines limitations écologiques rencontrées par les arbres possédant un cambium. Ils sont plus résistants aux feux, aux pathogènes et au vent (Tomlinson 2006). L'activité permanente des tissus primaires leur enlève néanmoins la capacité à entrer en dormance, expliquant leur vulnérabilité au gel et ainsi leur répartition presque exclusivement tropicale et subtropicale.

Des modifications du stipe sont également observées chez une catégorie de palmiers présentant un mode de vie particulier, les palmiers grimpants ou rotins (ex : *Calamus*). Chez



ces espèces, le stipe est fortement allongé (jusqu'à plusieurs centaines de mètres) et porte des épines et des structures permettant de s'accrocher aux autres arbres (Sunderland 2012).

L'extrémité du stipe porte un méristème apical solitaire qui produit les feuilles. Chez la plupart des palmiers adultes, les feuilles sont arrangées en hélice ou en spirale et la phyllotaxie suit les séries de Fibonacci (Dransfield et al. 2008). Comme pour la majorité des Monocotylédones, la feuille se divise en trois parties : une partie basale pouvant entourer entièrement le stipe (cette structure est alors appelée la gaine), un pétiole et la partie terminale portant les folioles. Cette dernière présente deux grands types d'organisation, palmée ou pennée (Fig. 5). Contrairement aux feuilles palmées, les feuilles pennées possèdent un axe prolongeant le pétiole et portant les folioles. Observées en détail, les feuilles de palmiers sont extrêmement complexes. L'implantation des folioles peut suivre des patterns variés, en hélice, en spirale, avec des angles et des tailles d'«entre-nœuds » différents. Les folioles sont souvent pliées ou ondulées créant des feuillettes aux orientations et aux angles variés. Leur extrémité est parfois découpée de façon régulière ou irrégulière. Les combinaisons possibles de ces caractères expliquent la grande diversité morphologique des feuilles de palmiers. Leur mode de développement est unique parmi les plantes à fleurs. Les feuilles se développent en structure pliée mais non divisée lorsqu'elles sont en bouton et deviennent composées par la séparation des folioles durant l'expansion.



Fig. 5 : Illustration des deux principales morphologies de feuille, de gauche à droite : (a) palmée (*Licuala lauterbachii*) et (b) pennée (*Calamus gibbsianus*) (photographies Palmweb)

En période de floraison, le stipe produit une ou plusieurs unités reproductrices ou inflorescences. Celles-ci sont le plus souvent ramifiées et produisent de très nombreuses petites fleurs. Cependant chez certaines espèces, il existe un seul axe d'inflorescence, généralement en forme de pointe (ex : *Geonoma*). Les inflorescences sont positionnées par rapport aux feuilles de deux manières différentes en fonction de leur mode de développement. Dans un premier cas, les inflorescences se développent à la base des feuilles par transformation du bourgeon axillaire en axe reproducteur (en général un seul par feuille). Elles parviennent à maturité au milieu des feuilles ou bien en dessous après la chute des feuilles qui les soutenaient. Les feuilles et les inflorescences se développent en série, de manière indéfinie (situation qualifiée de pléonanthique). Dans un deuxième cas, le stipe poursuit sa croissance végétative sans produire d'inflorescence jusqu'au moment où le méristème apical se change en méristème d'inflorescence. Une panicule terminale et massive, située au dessus des feuilles, est alors produite entraînant la mort de l'axe, incapable de reprendre une croissance végétative. Cette situation qualifiée d'hapaxanthique est rare chez les palmiers (ex : *Corypha*, *Metroxylon* et *Tahina* ; Dransfield et al. 2008).

Les fleurs de palmiers sont généralement petites, de quelques millimètres à quelques centimètres. Les *Phytelephea*e constituent une exception au sein de la famille, avec des fleurs femelles pouvant atteindre une vingtaine de centimètres. Les fleurs de palmiers présentent le plan d'organisation trimère caractéristique de la plupart des Monocotylédones. Chez la majorité des espèces, les fleurs possèdent trois sépales, trois pétales et un ou trois ovules. Cependant le périanthe peut être parfois composé de six tépales (ex : *Nypa*, *Chelyocarpus* et *Elaeis*) ou réduit à un anneau avec des lobes (ex : *Thrinax* ou *Phytelephas*). Si le nombre de pièces du périanthe et du gynécée est très peu variable, en revanche il existe chez les palmiers une très grande variabilité dans le nombre d'étamines (Uhl & Moore 1980).

Les botanistes ont longtemps pensé que le pollen des palmiers était dispersé par le vent. Mais des études plus détaillées ont montré que la pollinisation se fait presque exclusivement par des insectes appartenant aux groupes des coléoptères, des hyménoptères et des diptères (Henderson 1986, 2002 ; Barfod et al. 2011).

La description de l'évolution des inflorescences et des fleurs chez les palmiers est l'un des objectifs de cette thèse, elle est étudiée en détail dans les Chapitres 1 et 2.

Les fruits des palmiers présentent une large diversité, entre autres, de forme, de taille, de texture, et d'organisation interne. La forme est la plus souvent obovoïde ou ellipsoïdale. La taille est très variable de quelques millimètres de diamètre chez les espèces de *Geonoma* à

près de 50 cm de long chez *Lodoicea maldivica* par exemple. La plupart sont lisses mais certaines peuvent porter des écailles (ex : *Raphia farinifera*) ou des poils (ex : *Wettinia quinaria*). Certains sont secs, d'autres charnus. La grande majorité des palmiers sont adaptés à une dispersion des graines par les animaux (Zona et Henderson 1989, Henderson 2002).

Les palmiers constituent des organismes uniques, par le mode de croissance de leur stipe et la morphologie de leurs feuilles mais ils sont aussi connus pour être la famille des records biologiques. Ceux-ci incluent le stipe le plus large (pouvant dépasser un mètre de diamètre chez *Jubaea chiliensis*) et le plus long (près de 200 m chez les palmiers grimpants tels *Calamus*), la plus grande feuille (25 m et plus chez *Raphia regalis*), la plus grande inflorescence (8 m de longueur et plus de 24 millions de fleurs chez *Corypha umbraculifera*), le plus grand fruit et la plus grande graine (jusqu'à 25 kg chez *Lodoicea maldivica*).

#### *Des palmiers et des hommes : importance économique et conservation*

Les palmiers fournissent de nombreux services écosystémiques et ont un intérêt économique important. Ils se classent troisièmes après les Poaceae et les Fabaceae, dans la liste des familles les plus importantes sur le plan de l'économie et de l'utilité alimentaire (Haynes et McLaughlin 2000). La majorité des ressources fournies par les palmiers sont exploitées dans le milieu naturel par les populations locales (exploitation de subsistance) mais quelques espèces constituent des cultures d'intérêt majeur, comme le cocotier (*Cocos nucifera* ; Fig. 3d), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* ; Fig. 3e) ou le palmier à huile (*Elaeis guineensis*). Les espèces de palmiers non domestiquées sont importantes pour les populations aux ressources souvent limitées, vivants à proximité des forêts tropicales. Ils fournissent des matériaux pour la construction des maisons, les outils, les meubles et les vêtements, ils sont utilisés comme combustible et constituent une source de nourriture et de substances médicinales. De nombreuses espèces de palmiers sont également utilisées comme plantes ornementales dans les jardins des zones tropicales et subtropicales et dans les serres des jardins botaniques du monde entier. Outre des qualités esthétiques indéniables, ils sont également appréciés pour leur haute résistance à la transplantation. Le stipe est en effet capable de retenir une grande quantité d'eau, ce qui les rend tolérants aux déplacements. Ils ont également une capacité illimitée à générer de nouvelles racines adventices par un mécanisme encore inconnu (Tomlinson et al. 2006).

Malgré l'importance des populations naturelles de palmiers pour le maintien des écosystèmes tropicaux (principalement les forêts humides) et pour la subsistance des populations humaines locales, un certain nombre d'espèces sont aujourd'hui menacées de disparition. Les effectifs des populations sont réduits principalement par la surexploitation et la destruction des habitats. La majorité de la diversité spécifique des palmiers se trouve dans les forêts tropicales humides qui connaissent aujourd'hui un déclin dû à la déforestation au profit de l'agriculture. L'effet négatif de la déforestation est double : un effet direct de destruction des individus et des habitats et un effet indirect de la fragmentation des habitats (Galetti et al. 2006). En effet, les petites populations isolées sont plus vulnérables à l'extinction. De plus, l'habitat fragmenté constitue un milieu défavorable pour les agents de dispersion, pollinisateurs et disséminateurs de graines, fragilisant un peu plus les populations de palmiers. Une quarantaine d'espèces de palmiers sont présents dans la Liste Rouge de l'IUCN (IUCN 2012). La plupart sont classées comme vulnérables ou ayant un risque d'extinction faible. Six espèces sont considérées comme en danger d'extinction et deux en danger critique, *Hyophorbe lagenicaulis* (Page 1998) et *Tahina spectabilis* (Rakotoarinivo et Dransfield 2012). Une espèce semble être aujourd'hui éteinte dans le milieu naturel, *Cryosophila williamsii* (Evans 1998). Le nombre important d'espèces dans la famille, leur vaste distribution et leur présence dans des zones parfois difficiles d'accès, rendent le suivi de la viabilité des populations de palmiers difficile. De nombreuses données concernant leur statut sont certainement à mettre à jour et à compléter et des espèces sont peut être en voie d'extinction sans qu'il soit possible de le détecter. Si certaines espèces font déjà l'objet de mesures de protection, comme par exemple *Livistona alfredii* dans le « Millstream National Park » (Australie ; Dowl 1998), la conservation des palmiers ne pourra être efficace que par la création de nouvelles aires protégées et l'éducation des autorités et des populations concernées. Sauvegarder ces espèces dans les jardins botaniques et les banques de graines ne peut constituer qu'une mesure provisoire.

Jusqu'à maintenant peu d'études ont été réalisées sur la capacité des palmiers à répondre aux changements climatiques. De nombreuses espèces insulaires ou de zones montagneuses pourraient être fortement menacées (Dransfield 2008). En revanche des déplacements d'aires de répartition en relation avec la hausse des températures ont déjà été observés. *Trachycarpus fortunei* voit ainsi son aire de répartition s'étendre vers le Nord en Europe au fur et à mesure des variations des minimums hivernaux de température (Walther et al. 2007).

### *Classification et relations phylogénétiques*

La taxonomie des palmiers est actuellement une discipline très dynamique et un effort considérable a été fourni durant les dernières décennies pour réaliser des révisions taxonomiques des différents genres et tribus. Ces travaux ont été synthétisés dans le livre de Dransfield et al. (2008) qui présente la classification et les caractéristiques des 183 genres. Ces genres sont répartis dans 5 sous-familles (les Calamoideae, les Nypoideae, les Coryphoideae, les Ceroxyloideae et les Arecoideae), 28 tribus (Fig. 6) et 27 sous-tribus. Cette classification se base sur les relations phylogénétiques mises en évidence par diverses études utilisant des caractères morphologiques et moléculaires. Les groupes (sous-familles, tribus et sous-tribus) ont été reconnus sur le critère de la monophylie. Notons que dans deux tribus, les Areceae et les Trachycarpeae, les preuves étaient insuffisantes pour inclure certains genres dans les sous-tribus. Ils sont considérés comme « non placés » (unplaced) dans la classification (Fig. 6).

Les Calamoideae regroupent environ un quart des espèces connues de palmier (21 genres et 645 espèces) et leur aire de répartition s'étend sur les zones tropicales d'Amérique, d'Afrique et de la région indopacifique. Les membres de cette sous-famille se distinguent par des écailles présentes sur le gynécée et sur le fruit (Dransfield et al. 2008). On trouve notamment dans cette sous-famille les genres de palmiers grimpants aussi appelés rotins (ex : *Calamus*). Comprenant 391 espèces, *Calamus* est le genre le plus diversifié des palmiers. Les Calamoideae se placent comme le groupe frère de tous les autres palmiers dans diverses études phylogénétiques (Asmussen et al. 2006 ; Baker et al. 2009).

La sous-famille Nypoideae est particulière au sein des palmiers car elle ne contient qu'un seul genre monospécifique (*Nypa fruticans*). *Nypa* est le palmier de mangrove dont l'aire de répartition s'étend en Asie et dans la zone ouest du Pacifique. Ce palmier présente une morphologie particulière, notamment au niveau de l'inflorescence, qui le distingue des autres sous-familles. Les études phylogénétiques placent généralement cette espèce comme groupe frère de tous les palmiers excepté les Calamoideae (Asmussen et al. 2006 ; Baker et al. 2009). Les Coryphoideae constituent une large sous-famille (45 genres et 519 espèces) incluant le genre très diversifié *Licuala* (153 espèces). Leur aire de répartition comprend toute la ceinture tropicale. La majorité des espèces (plus des 2/3) vivant en dehors des forêts tropicales humides appartiennent à cette sous-famille (Thomas et de Franceschi 2012). Ils se reconnaissent notamment à leurs feuilles palmées portées par la plupart des espèces. On

retrouve dans ce groupe le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* (tribu des Phoeniceae). Les Coryphoideae sont groupe frère du clade comprenant les Ceroxyloideae et les Arecoideae.

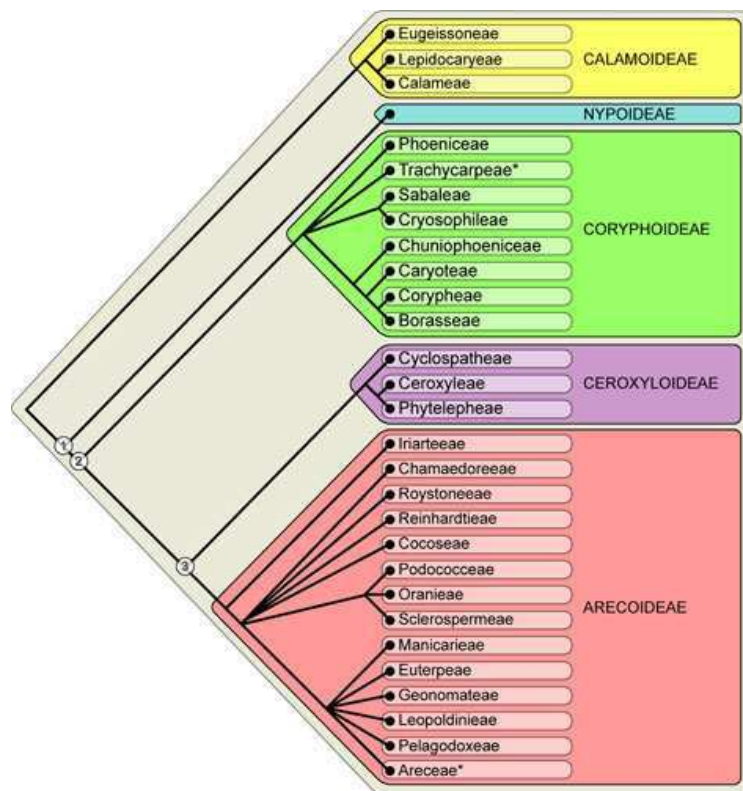


Fig. 6 : Classification des palmiers basée sur les études phylogénétiques (Dransfield et al. 2008)

Les Ceroxyloideae constituent une sous-famille de taille modeste mais dont l'aire de répartition est très diversifiée. Les 8 genres et 47 espèces sont répartis dans trois tribus. La tribu Cyclospatheae contient un seul genre présent uniquement dans les Caraïbes et en Amérique du Nord. Les Ceroxyleae regroupent des genres morphologiquement et génétiquement similaires mais éloignés géographiquement (l'un à Madagascar, un autre en Australie et deux autres dans les Andes). Les Phytelpeae sont originaires d'Amérique du Sud. Malgré une diversité morphologique (des structures végétatives et reproductives) importante entre les sous-tribus, la sous-famille apparaît monophylétique dans de nombreuses phylogénies moléculaires (Asmussen et Chase 2001 ; Asmussen et al. 2006 ; Savolainen et al. 2006 ; Trénel et al. 2007 ; Baker et al. 2009). Elle constitue le groupe frère des Arecoideae.

Les Arecoideae constituent la plus large et la plus diversifiée sous-famille des palmiers. Ses représentants sont présents dans les régions tropicales du globe, en Amérique centrale et du Sud, en Afrique, à Madagascar et sont particulièrement nombreux dans la région

indopacifique. Ils se distinguent par des feuilles pennées et par l'organisation des fleurs sur les inflorescences (cf Chapitre 1). On trouve notamment dans ce groupe, le cocotier, *Cocos nucifera* et le palmier à huile, *Elaeis guineensis* (tribu des Cocoseae). La monophylie de ce groupe est bien soutenue par les études de phylogénie moléculaire (Asmussen et Chase 2001 ; Asmussen et al. 2006 ; Savolainen et al. 2006 ; Baker et al. 2009 ; Baker et al. 2011).

Les délimitations des genres au sein de la famille ont été fréquemment redéfinies. Des divisions taxonomiques ont parfois été réalisées à partir de variations morphologiques infimes ou bien à partir de spécimens incomplets. Les palmiers ayant des périodes de floraison aléatoires il est parfois difficile d'échantillonner les fleurs et les fruits, caractères pourtant essentiels pour différencier de nombreuses espèces de palmiers. Au fur et à mesure des nouvelles missions de terrain et des révisions taxonomiques, les contours des genres sont modifiés, de nouveaux sont créés et d'autres abandonnés. Par exemple, Jeanson (2011a) a suggéré de replacer les espèces du genre *Wallichia* au sein du genre *Arenga*. De nouvelles espèces sont encore régulièrement découvertes. Elles sont alors rattachées à un genre existant (par exemple *Adonidia matabongsi*, Baker et Heatubun 2012) ou bien classées dans un nouveau genre (par exemple, *Dransfieldia*, Baker et al. 2006 ou *Tahina*, Dransfield 2008). Les phylogénies moléculaires ont permis de progresser dans la compréhension des contours des genres en révélant la paraphylie de certains d'entre eux. Ainsi, le genre *Lanonia* a été créé pour accueillir 8 espèces qui semblaient appartenir au genre *Licuala* (Henderson & Bacon 2011) sur des critères morphologiques.

Les premières tentatives de classification des palmiers, rendant compte de leur évolution, ont été réalisées grâce à l'observation de grandes tendances évolutives mais sans reconstruction phylogénétique (notamment Moore 1973 ; Uhl et Dransfield 1987). De nombreuses études ont ensuite été menées pour élucider les relations phylogénétiques au sein de la famille, d'abord à partir de caractères morphologiques et anatomiques, puis très rapidement à partir de caractères moléculaires. Ces travaux ont permis de tester les premières classifications. Certains groupes ont été confortés, d'autres modifiés pour aboutir à la classification la plus récente, présentée en Fig. 6 et dont les subdivisions actuellement identifiées (sous-familles et tribus) ont été présentées ci-dessus (Dransfield et al. 2005 ; Dransfield et al. 2008). Les phylogénies basées sur les caractères morphologiques se sont d'abord concentrées sur des niveaux taxonomiques inférieur à celui de la famille (par exemple Henderson 1990 ; Barfod 1991 ; Zona 1999). La première étude à l'échelle de la famille a associé à des caractères

morphologiques, des caractères moléculaires, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN chloroplastique (RFLP ; Uhl et al. 1995). Des phylogénies moléculaires à l'échelle de la famille, s'appuyant sur des séquences d'ADN, ont été publiées par la suite. Elles ont pour la plupart utilisé des marqueurs chloroplastiques tel *trnL-trnF* (Baker et al. 1999 ; Asmussen et al. 2000 ; Amussen et Chase 2001 ; Asmussen et al. 2006), *rps16* (Asmussen et al. 2000 ; Amussen et Chase 2001 ; Asmussen et al. 2006), *rbcL* (Amussen et Chase 2001 ; Hahn 2002 ; Asmussen et al. 2006), *atpB* (Hahn 2002) ou *matK* (Asmussen et al. 2006). Deux marqueurs nucléaires ont été testés à l'échelle de la famille : une partie de l'ADN ribosomique (18S ; Hahn 2002) et le gène à faible nombre de copies codant pour la malate synthétase (MS ; Lewis et Doyle 2001). D'autres marqueurs nucléaires ont été développés chez les palmiers, mais utilisés à des niveaux taxonomiques inférieurs, pour résoudre les relations phylogénétiques au sein d'une sous-famille par exemple. Citons notamment les régions non-codantes de l'ADN ribosomique (ITS ; Baker et al. 2000) et deux gènes à faible nombre de copies (PRK et RPB2, codant respectivement pour la phosphoribulokinase et une sous-unité de l'ARN polymérase II ; Lewis & Doyle 2002 ; Roncal et al. 2005).

Les marqueurs chloroplastiques sont fréquemment utilisés car ils sont présents en de nombreuses copies identiques dans une même cellule et sont ainsi plus facilement amplifiés par PCR. Ils ont en outre prouvé leur efficacité à différents niveaux taxonomiques dans divers groupes de plantes. Cependant les palmiers ayant un temps de génération très long, il semble que l'évolution de leur génome chloroplastique soit lente (Asmussen & Chase 2001). Des études ont montré que le taux de substitution des nucléotides est plus faible chez les palmiers comparativement à d'autres Monocotylédones (Gaut et al. 1992 ; Gaut et al. 1996). Ces conclusions ont pourtant été remises en cause (notamment Cuenca & Asmussen-Lange 2007) et il semblerait plutôt que les taux de substitution soient variables au sein de la famille, selon la lignée et le marqueur.

Pour les reconstructions phylogénétiques, les marqueurs nucléaires sont en général plus délicats à utiliser que les marqueurs chloroplastiques, notamment lorsqu'ils sont présents en multiples copies divergentes (paralogues). Différentes copies assemblées dans une même étude et présentant des histoires évolutives différentes peuvent provoquer des confusions dans les relations phylogénétiques. Pour contourner ce problème les marqueurs sont choisis au sein de l'ADN ribosomique dont on pense que les multiples copies évoluent de manière concertée ou parmi des gènes à faible nombre de copies. Cependant des paralogues peuvent tout de



même exister dans certains groupes et gêner la reconstruction phylogénétique (Baker et al. 2000 ; Lewis & Doyle 2002 ; Feliner & Rossello 2007).

Le choix des marqueurs moléculaires à l'échelle des tribus et des sous-tribus est discuté dans le Chapitre 3 de cette thèse.

Comme pour de nombreux groupes d'Angiospermes (Angiosperm Phylogeny Group 2009), les phylogénies moléculaires ont apporté de grandes améliorations à la classification des palmiers. L'une des modifications les plus importantes suggérées par les phylogénies moléculaires concerne l'identité de la lignée groupe frère de tous les autres palmiers. Le genre *Nypa* a longtemps été considéré comme occupant cette place la plus à la base de l'arbre phylogénétique (Uhl et al. 1995). Il s'avère au vu des phylogénies moléculaires que ce sont les Calamoideae qui constituent le groupe frère de tous les autres palmiers (Asmussen et al. 2006 ; Baker et al. 2009).

Les phylogénies moléculaires ont également contribué à améliorer la compréhension de l'évolution de la famille et des biomes qui lui sont associés. En 2009, Baker et al. ont publié une synthèse de toutes les études phylogénétiques sous la forme d'un super-arbre (et d'une super-matrice). Cette phylogénie présente une résolution satisfaisante au niveau des genres, même si certaines relations ne sont pas encore bien résolues notamment au sein des Arecoideae. Elle a été datée (Couvreur et al. 2011) à l'aide de différents fossiles (les fossiles identifiés comme appartenant à la famille des palmiers sont passés en revue dans Dransfield et al. 2008). La phylogénie a ainsi permis d'estimer l'âge de diversification des différentes lignées, d'étudier les taux de diversification (Couvreur et al. 2011) mais aussi de commencer à expliquer la répartition géographique des espèces (Baker et al. 2012 a et b). Elle offre également un cadre et un support pour étudier l'évolution des caractères morphologiques (Nadot et al. 2011).

## Objectifs et méthodes

Mon travail s'inscrit dans une thématique générale de compréhension de l'évolution de la morphologie de la fleur des angiospermes. Celle-ci en effet présente une variabilité beaucoup plus importante que celle observée au niveau des organes reproducteurs d'autres groupes. La fleur est ainsi considérée comme étroitement liée au succès évolutif de ce groupe. Néanmoins, la compréhension des mécanismes évolutifs, souvent multiples et imbriqués, qui ont conduit à cette variabilité est délicate. En effet les seules données dont nous disposons sont le phénotype et le génotype (souvent partiel) des espèces actuelles, c'est-à-dire le résultat de l'évolution.

Depuis quelques décennies, nos connaissances des relations phylogénétiques dans les différents groupes du vivant ont considérablement progressé (voir par exemple, Tree of Life Web Project, Maddison et al. 2007). Des avancées ont été réalisées en biologie moléculaire permettant d'obtenir des données moléculaires pour un très grand nombre d'espèces et en informatique permettant de traiter ces larges jeux de données. Des phylogénies robustes et bien résolues sont maintenant disponibles pour des niveaux taxonomiques différents. Elles fournissent un excellent cadre théorique pour l'étude de l'évolution des caractères morphologiques. Regarder l'évolution d'un caractère dans un cadre phylogénétique constitue une des premières étapes de la compréhension des mécanismes qui ont conduit à sa diversité et à sa répartition actuelle chez différents organismes.

Si l'aspect général des palmiers, à travers la morphologie de leur appareil végétatif, est extrêmement reconnaissable et emblématique, leur appareil reproducteur et ses spécificités sont beaucoup moins connus. Les inflorescences et les fleurs des palmiers possèdent des caractères constants et d'autres extrêmement variables, pouvant parfois sembler labiles. Parmi les caractères qui varient peu à l'échelle de la famille, il y a notamment l'architecture des inflorescences. Celles-ci sont le plus souvent constituées d'un axe principal indéterminé, présentant des ramifications portant les fleurs. En revanche la répartition des organes reproducteurs entre les fleurs (hermaphrodite ou unisexuée) et l'organisation de ces fleurs sur les inflorescences sont des caractères variables. Il en résulte une grande diversité dans les systèmes sexuels au sein de la famille. Le périanthe trimère ou le nombre d'ovules (1 ou 3) sont également des caractères très bien conservés à l'échelle de la famille. Au contraire, le nombre d'étamines est l'un des traits floraux présentant la plus grande variabilité tant au niveau inter-générique qu'intra-générique.

L'objectif principal de ma thèse est d'étudier l'évolution du système sexuel et du nombre d'étamines, deux caractères liés à la morphologie de l'appareil reproducteur et qui sont particulièrement variables à l'échelle de la famille des palmiers.

Les caractéristiques des inflorescences et des fleurs des espèces de palmiers sont étudiées et constituent souvent des critères essentiels pour les divisions taxonomiques. Les descriptions morphologiques des différents genres et espèces de palmiers forment une littérature abondante et riche, en partie synthétisée dans un livre « *Genera Palmarum* » (Dransfield et al. 2008). Durant ma thèse j'ai rassemblé une partie de ces informations, en me concentrant sur les traits morphologiques liés au système sexuel et au nombre d'étamines, afin de les étudier dans un contexte phylogénétique. J'ai notamment étudié la distribution de la variabilité de ces traits le long de l'arbre phylogénétique, identifié les états ancestraux et les transitions qui ont eu lieu au cours de l'histoire évolutive du groupe. Afin de compléter les informations de la littérature concernant le nombre d'étamines et commencer à comprendre les mécanismes évolutifs qui ont contribué à la diversité de ce caractère, j'ai réalisé des observations sur des fleurs provenant de collections. Ainsi, pour 82 espèces le nombre d'étamines a été compté et la production de grains de pollen par fleur a été estimée.

D'importants progrès ont été réalisés dans les connaissances phylogénétiques de la famille des palmiers. De nombreuses phylogénies ont été publiées, se basant d'abord sur des caractères morphologiques, puis essentiellement sur des caractères moléculaires. Ces recherches ont abouti en 2009 à la parution d'une phylogénie incluant au moins un représentant de tous les genres de la famille (Baker et al. 2009). Cette phylogénie a été révisée et datée en 2011 (Couvreur et al. 2011) et offre un cadre solide pour notre étude. Cependant dans certains groupes, les relations phylogénétiques au niveau des genres et des espèces sont encore incertaines et demandent à être complétées. Durant ma thèse, j'ai donc réalisé une phylogénie au niveau spécifique d'une sous-tribu de 12 genres, dont les espèces présentent une variation particulièrement importante du nombre d'étamines.

## **Organisation du manuscrit**

Le premier chapitre est consacré à l'étude de l'évolution du système sexuel chez les palmiers. La morphologie des fleurs hermaphrodites et unisexuées et leur organisation sur les inflorescences sont détaillées en relation avec les différents systèmes sexuels présents dans la famille. L'évolution du système sexuel est reconstruite sur l'arbre phylogénétique des genres afin d'étudier les transitions qui ont eu lieu à l'échelle de la famille. Les relations entre les systèmes sexuels et la pollinisation, ainsi que les bases génétiques de la détermination des sexes sont également évoquées.

Le deuxième chapitre traite de l'évolution du nombre d'étamines à l'échelle de la famille. Cette étude se base sur les données de la littérature et sur des observations personnelles de fleurs provenant de collections. Afin d'appréhender les mécanismes évolutifs qui ont contribué à la diversité de ce caractère, le nombre d'étamines est confronté à la production de grains de pollen par fleur.

Dans un troisième chapitre est présentée une étude de l'évolution du nombre d'étamines à une échelle taxonomique inférieure. Une phylogénie moléculaire de la sous-tribu des Ptychospermatinae est réalisée et utilisée pour reconstruire l'évolution du nombre d'étamines. Les implications de cette phylogénie pour la taxonomie de ce groupe sont également discutées.

La synthèse des résultats et les perspectives sont présentées dans une conclusion générale.



**Chapitre 1 :**  
**Evolution du système sexuel**  
**chez les palmiers**



## **Contexte et objectifs de l'étude**

La répartition des fleurs hermaphrodites et/ou unisexuées dans les différents groupes de fleurs, au sein d'une inflorescence, entre les inflorescences et entre les individus, constitue un caractère très variable chez les palmiers. Cela aboutit à une grande variabilité dans la distribution spatiale des organes mâles et femelles qui est l'une des composantes principales du système sexuel au sens large. Les autres composantes impliquent notamment la temporalité de maturation des organes sexuels et les modalités de croisement (fécondation croisée ou auto-fécondation ; Barrett 2002).

Cette étude constitue un article de revue dont les objectifs sont : (1) de faire une synthèse de la répartition spatiale et temporelle des sexes au sein des fleurs, des inflorescences et des individus chez les palmiers ; (2) d'étudier la morphologie des fleurs hermaphrodites et unisexuées, et notamment le dimorphisme entre les fleurs mâles et femelles ; (3) de construire l'évolution des systèmes sexuels ; (4) d'étudier le lien entre la répartition des sexes et la pollinisation et (5) de faire une synthèse des connaissances sur les bases génétiques de la détermination du sexe.

## **Caractéristiques des inflorescences et des fleurs de palmiers**

La répartition des sexes chez une espèce est classiquement divisée en trois catégories : l'hermaphroditisme, la monoécie et la dioécie. Dans chacune de ces catégories, les fleurs hermaphrodites ou unisexuées peuvent être organisées de manière différente sur les inflorescences. Pour comprendre la diversité des systèmes sexuels chez les palmiers, il est nécessaire d'étudier la diversité des formes des inflorescences et la diversité des modes de répartition des fleurs sur ces inflorescences (la reconstruction de ce caractère est présentée en Annexe 1).

Les palmiers produisent de nombreuses fleurs (de plusieurs centaines à plusieurs millions) regroupées sur des inflorescences souvent massives. On retrouve ainsi chez *Corypha umbraculifera* l'une des plus grandes inflorescences des angiospermes (8 mètres de long et 24 millions de fleurs). Ces inflorescences constituent le plus souvent un système monopodial, indéterminé et ramifié. Elles sont formées d'un axe principal né à la base d'une feuille (ou plus rarement à la base d'une feuille modifiée ou d'une bractée). Cet axe ne porte pas de



ramification dans la partie proximale, appelé pédoncule, mais en porte dans la partie distale, appelé rachis (Fig. 7 ; Uhl & Dransfield 1984). Ces inflorescences sont parfois qualifiées de panicule, même si ce terme est le plus souvent réservé à des inflorescences déterminées (Prenner et al. 2009). Chez certaines espèces cependant les inflorescences ne possèdent qu'un axe principal et aucune ramification, elles sont en général en forme de pointe (qualifiées de « spicate » en anglais ; Dransfield et al. 2008).

La première bractée formée, appelée prophyll, englobe l'inflorescence en développement et parfois même l'inflorescence mature. Le pédoncule peut porter une ou plusieurs bractées vides tandis que le rachis présente une bractée à chaque insertion de ramification latérale. Ces ramifications peuvent elles-mêmes porter d'autres ramifications qui seront accompagnées par des bractées. Le pattern de ramification de l'axe principal se retrouve donc au niveau des embranchements latéraux et cela jusqu'à cinq ou six fois chez certaines espèces (ramification d'ordre cinq ou six). Toutes les ramifications, y compris l'axe principal, se terminent par une partie portant les fleurs, appelée rachilla. Cette architecture de l'inflorescence est ainsi bien conservée à l'échelle de la famille même si quelques variations sont apparues dans certains groupes (Uhl & Dransfield 1984).



Fig. 7 : Morphologie caractéristique des inflorescences de palmiers, système monopodial, indéterminé et ramifié ; à gauche *Prestoea acuminata* ; à droite *Archontophoenix myolensis* (photographies Palmweb)

Les fleurs peuvent être hermaphrodites (organes mâle et femelle dans la même fleur) ou unisexuées (organes mâle et femelle dans des fleurs différentes). Chez certaines espèces, les

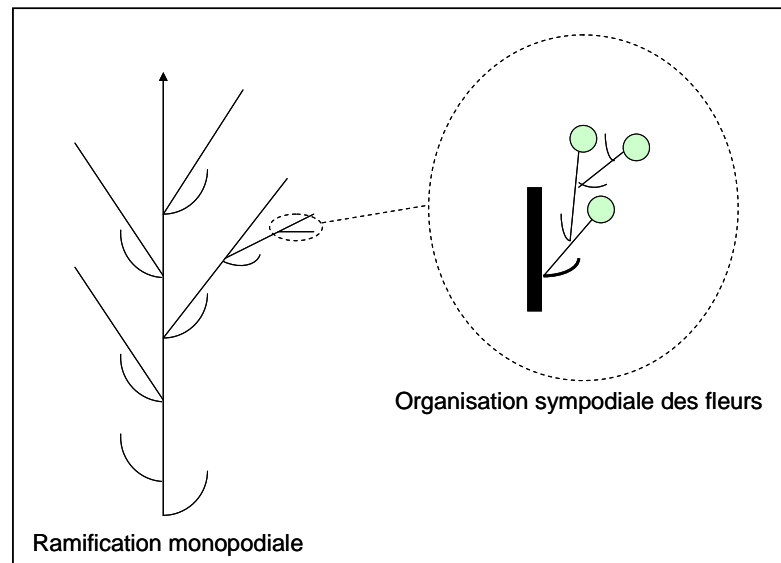
fleurs sont solitaires, accompagnées d'une bractée et d'un pédicelle portant une bractéole. Elles peuvent également être sessiles, la bractée et la bractéole étant alors réduites ou absentes. Chez certaines Calamoideae et Coryphoideae (Borasseae), les fleurs possèdent deux bractéoles alors que le cas le plus courant chez les monocotylédones est une seule (Prenner et al. 2009). Les fleurs peuvent également être réunies en groupes de différents types. Les plus courants sont des groupes à organisation sympodiale, aussi appelés cincinni, dans laquelle la bractéole d'une fleur porte une seconde fleur, dont la bractéole porte une troisième fleur et ainsi de suite (Uhl & Dransfield 1984 ; Dransfield et al. 2008). Dans ce cas l'inflorescence des palmiers est tout à fait particulière car elle réunit deux types d'organisations emboîtées, l'une ordonnant les ramifications de l'inflorescence et l'autre ordonnant les fleurs sur les rachillae (Fig. 8).

Les espèces hermaphrodites présentent souvent des fleurs solitaires (par exemple chez les Cryosophileae, Coryphoideae). Celles-ci peuvent être également organisées en cincinni de deux fleurs (Lepidocaryeae, Calamoideae) ou plus chez les Chuniophoeniceae, Corypheae et chez certains Trachycarpeae (Coryphoideae).

La répartition des fleurs unisexuées mâles et femelles chez les espèces monoïques est variable. Elles sont assez fréquemment réunies en groupes bisexués et ainsi placées sur le même rachilla. Chez la majorité des Arecoideae et chez les Caryoteae (Coryphoideae), les fleurs sont regroupées dans des cincinni de trois fleurs, appelés triades. Une triade est composée d'une fleur femelle entourée de deux fleurs mâles. Il est possible que des fleurs mâles en paires ou solitaires soient présentes dans la partie distale du rachilla, par formation de triades incomplètes. Chez les Chamaedoreae (Arecoideae), un groupement de fleurs particulier est présent : une rangée de fleurs dont la première est une fleur femelle et les suivantes des fleurs mâles, appelée acervulus. Chez les Calamoideae, on peut trouver des organisations différentes et atypiques. Chez *Oncocalamus* par exemple, un groupe central de 1 à 3 fleurs femelles est entouré de deux cincinni latéraux de 2 à 4 fleurs mâles, constituant un mode d'organisation des fleurs unique chez les palmiers. Chez *Raphia*, la partie proximale du rachilla porte les fleurs femelles tandis que la partie distale porte les fleurs mâles. La répartition des fleurs unisexuées sur des rachillae unisexués (Nypoideae) ou sur des inflorescences unisexuées (notamment Arecoideae) est relativement rare chez les palmiers.

Les fleurs unisexuées des espèces dioïques sont souvent solitaires. Chez les Calamoideae, chez les Borasseae (Coryphoideae), une différence d'organisation des fleurs entre les individus mâles et femelles est observée : les fleurs femelles sont solitaires (parfois accompagnées d'une fleur mâle stérile) et les fleurs mâles réunies en cincinni. Les

Phytelephea (Ceroxyloideae) constituent un groupe à part parmi les palmiers puisque ce sont les seuls à présenter une organisation monopodiale de leur groupe de fleurs unisexuées.



**Fig. 8 :** La double organisation des inflorescences de palmiers : système monopodial, indéterminé et ramifié des axes de l'inflorescence, organisation sympodiale des fleurs (schéma adapté à partir de Uhl & Dransfield 1984 et Dransfield et al. 2008)

Les fleurs unisexuées présentent fréquemment un dimorphisme qui s'exprime au niveau de la taille, de la morphologie globale et de celle des organes reproducteurs. Dans ces fleurs unisexuées, des organes stériles de l'autre sexe sont souvent présents (Nadot et al. 2011). Il s'agit du pistillode dans les fleurs mâles et des staminodes dans les fleurs femelles. La présence de ces organes stériles leur donnant un aspect structurel et morphologique de fleurs hermaphrodites. Les fleurs sont néanmoins fonctionnellement mâles ou femelles. Dans certains cas, les organes stériles sont très réduits ou absents et seuls les organes d'un sexe sont apparents dans les fleurs. Elles sont donc structurellement (morphologiquement) et fonctionnellement unisexuées. Le pistillode et les staminodes sont probablement des organes reliques (héritage d'un pattern de développement de fleur hermaphrodite) ou peuvent potentiellement jouer un rôle dans le processus de pollinisation (Walker-Larsen & Harder 2000 ; Ronse de Craene & Smet 2001). Ils participent à l'attraction visuelle des pollinisateurs. En effet Lorsque les récompenses ne sont présentes que dans un type de fleurs, les pollinisateurs sont capables de les identifier et de les visiter préférentiellement. Les organes stériles évitent ce processus et favorisent ainsi une pollinisation croisée efficace. Les

staminodes peuvent également être consommés par les pollinisateurs. Chez *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* par exemple, les chauves-souris pollinisatrices les consomment (Dransfield et al. 2008). Le pistillode peut également abriter des nectaires, presque équivalents à ceux présents au niveau du gynécée des fleurs femelles. De telles structures ont été trouvées par exemple chez *Euterpe precatoria* et *Dypsis befojo* (Dransfield et al. 2008).

## Synthèse des résultats

Il existe une grande diversité au niveau des systèmes sexuels chez les palmiers. Les trois systèmes principaux des angiospermes, hermaphrodisme, monoécie et dioécie sont représentés. Ils le sont néanmoins dans des proportions différentes que celles retrouvées à l'échelle des angiospermes. Ainsi la majorité des espèces de palmiers sont monoïques (52%) contre 3 à 19% seulement chez l'ensemble des angiospermes. Certains systèmes sexuels plus complexes, associant des fleurs hermaphrodites et unisexuées au sein de la même espèce, sont également représentés et le plus fréquent semble être l'andromonoécie.

Différentes organisations des fleurs sont associées à chaque système sexuel. Les fleurs peuvent être solitaires ou organisées en groupes. L'organisation des fleurs la plus répandue chez les espèces monoïques est le cincinnus. Il s'agit d'un système sympodial regroupant des fleurs unisexuées. Lorsque le cincinnus est composé d'une fleur femelle entourée de deux fleurs mâles, il est appelé triade. La grande majorité des espèces hermaphrodites et monoïques présentent un décalage temporel de maturation des sexes (dichogamie). La protandrie et la protogynie existent chez les palmiers, mais il semble que la protandrie soit plus fréquente.

Les fleurs unisexuées présentent, dans certains groupes, un dimorphisme important, au niveau de la taille, de la forme globale et des organes. Aucune tendance dans le dimorphisme de taille n'a été détectée ; les fleurs femelles peuvent être plus grandes que les fleurs mâles et inversement suivant les groupes. La présence d'organes infertiles (staminodes et pistillode) est également variable. Certaines espèces peuvent posséder les deux types d'organes alors que d'autres n'en possèdent qu'un ou en sont totalement dépourvues.

La reconstruction de l'évolution du système sexuel sur l'arbre phylogénétique des palmiers révèle que l'état ancestral est la monoécie. De nombreuses transitions entre les différents systèmes sexuels ont eu lieu au cours de l'histoire évolutive de la famille. Des transitions ont également eu lieu entre des fleurs fonctionnellement unisexuées mais structurellement

bisexuées (présentant des staminodes ou un pistillode) et des fleurs structurellement unisexuées.

Il semble évident que le système sexuel ait un effet sur la pollinisation et sur l'interaction avec les nombreux insectes qui visitent les inflorescences de palmiers (pollinisateurs et phytophages). Cependant cette relation est encore peu étudiée.

Des gènes MADS-box impliqués dans le modèle ABC ont été mis en évidence chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis*). Des hormones pourraient être impliquées dans la détermination des sexes au cours du développement des inflorescences et des fleurs. Le séquençage de génomes entiers ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension des bases génétiques qui sous-tendent la diversité des systèmes sexuels.

Cet article est le résultat de la mise en commun de travaux de plusieurs chercheurs. Ma participation à ce travail concerne essentiellement la répartition spatiale des organes sexuels et l'évolution du système sexuel. J'ai notamment contribué à la rédaction des parties « Sexual expression in space », « Morphology of sexual expression » et « Evolution of sexual expression ». J'ai effectué les recherches conduisant aux résultats présentés dans la Table 1 et la Figure 5, sur la fréquence et l'évolution des systèmes sexuels dans la famille. Les données utilisées pour la reconstruction du système sexuel sont disponibles dans l'Annexe 1 du manuscrit de thèse. J'ai conçu et réalisé certaines figures de l'article : Table 1 et Figures 3 à 6. L'article de revue présenté sera soumis très prochainement au journal « Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics ».

# **Article 1**



## **Diversity and evolution of sexual expression in palms (Arecaceae)**

Sophie Nadot<sup>1,5</sup>, Elodie Alapetite<sup>1</sup>, William J. Baker<sup>3</sup>, James W. Tregear<sup>4</sup>, Anders S Barfod<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Univ Paris-Sud, Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, UMR 9079, Orsay, F-91405, France

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Aarhus University, Ny Munkegade 114, DK-8000 Aarhus C, Denmark

<sup>3</sup>Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AB, UK,

<sup>4</sup>Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Palm Developmental Biology Group, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis BP 64501, 34394, Montpellier cedex 5, France

<sup>5</sup>Author for correspondence: [sophie.nadot@u-psud.fr](mailto:sophie.nadot@u-psud.fr)



## **Contents**

Introduction

Overview of sexual expression in palms

Sexual expression in space

Plasticity of sexual expression

Sexual expression in time

Morphology of sexual expression

The floral groundplan

Sexual dimorphism

Evolution of sexual expression

Evolutionary pathways leading to separate sexual expression

Hermaphroditic flowers: multiple gains or multiple losses?

Sex and pollination

Towards understanding the genetic basis of sexual separation in palms

Molecular regulation of palm flower development

Determination of flower and plant sexual dimorphism

How might dichogamy be achieved in palms?

Sexual expression in palms: immediate and long term prospects

Conclusions

Acknowledgements

Literature cited

## **Keywords**

Palms; Palmae; dioecy; monoecy; Sexual system; Evolution; Flower morphology; Phylogeny; Pollination;

## **Introduction**

The amazing diversity of reproductive structures and strategies in flowering plants has fascinated botanists and evolutionary biologists ever since (Darwin, 1877) first published on the subject. Although the floral groundplan is highly conserved, with a sterile perianth surrounding sexual organs in which female organs almost invariably occupy the centre of the flower, there is seemingly endless variation in the shape, size, colour and number of floral organs across angiosperms. The reasons for such extensive reproductive diversity remain a

major issue in evolutionary biology. In the broad sense sexual systems relate to sexual expression in space and time, as well as to mating strategies (outcrossing *vs.* selfing). The term ‘breeding system’ is sometimes employed to describe the spatial arrangement of sexes (both sexes within the same flower, in different flowers borne on the same plant or each sex on a different plant), although it usually refers more specifically to the mating system (i.e., degree of outcrossing). Sexual expression in flowering plants is classically broken down into three main categories: hermaphroditism (in which all flowers are bisexual), monoecy (male and female flowers borne on the same plant), and dioecy (male and female flowers borne on different plants), although occasionally, combinations of unisexual and bisexual flowers in variable proportions can occur. Hermaphroditism is the most common pattern across angiosperms and is generally considered as the ancestral state, although some uncertainty remains concerning the ancestral flower of all angiosperms (see Endress and Doyle 2009). (Renner and Ricklefs 1995) noted the existence of dioecy in almost half of the angiosperm families, 7% of the genera and 6% of the species. These figures are affected by major changes in angiosperm classification over the last 15 years (Angiosperm Phylogeny Group 1998; 2003; 2009), but are nevertheless still widely cited. Less attention has been paid to monoecy in comparison to hermaphroditism and dioecy. In a survey of various temperate and tropical floras it was estimated that monoecy occurred in 3 to 19% of angiosperm species (de Jong et al. 2008). Darwin (1877) considered monoecy an adaptation to favour out-crossing. More recently it has been considered a means to reduce pollen-stigma interference (Bertin and Newman 1993) and to allow flexible adjustment of sex allocation (Korpelainen 1998). (Renner and Ricklefs 1995) pointed to the fact that monoecy, like dioecy, is often associated with abiotic pollination. Besides these well-defined categories, a wide variety of sexual strategies exist in flowering plants, involving temporal separation of sexual phases (dichogamy) and various combinations of bisexual, male and female flowers that may even vary between populations of the same species.

Among the angiosperms, the palm family stands out as being particularly diverse in sexual expression both in space and time. The family is a relatively species-rich group comprising ca. 2500 species, of which more than 90% are found in tropical rainforest (Couvreur, Forest, and Baker, 2011). Palms are conspicuous, typically large-bodied organisms that often have major ecological impact in the plant communities where they occur (Peters et al., 2004). They are highly prized by rural dwellers as a source of food, shelter and many other services, in addition to including species of major economic importance (e.g., oil palm, date palm, coconut and rattan). Although somewhat constrained by their relatively simple

modular body plan, they display an impressive amount of variation in the architectural design of their leaf, stem and floral parts (Tomlinson, 2006). This huge diversity applies not least to sexual expression. Palm inflorescences range from unbranched, spicate structures to highly branched panicles, the ultimate branches (rachillae) bearing sessile flowers that are either solitary or grouped in sympodial clusters of two, three or more. Male and female functions are often separated in varied patterns in space and time, presumably to ensure cross-pollination in association with the pollinating vectors, and probably also to increase fitness by optimising the pollen/ovule ratio (Cruden, 2000).

The aim of this paper is: 1) to give a review of sexual expression across the palm family; 2) to summarize current knowledge of the developmental and genetic basis of sexual expression; 3) to reconstruct the evolution of some of the key characters leading to separation of male and female functions; and 4) to discuss putative evolutionary pathways of sexual expression in the family.

## Overview of sexual expression in palms

### *Sexual expression in space*

As mentioned above, sexual expression is unusually diversified in palms. Hermaphroditism, dioecy and monoecy are by far the most common states, but the so-called condition of “polygamy” (i.e., various combinations of bisexual and unisexual flowers on the same individual or on separate plants) also occurs (Dransfield et al., 2008). At both the genus and species level the prevalence of monoecy is highly pronounced, occurring in 61% and 52% of all genera and species respectively (Table 1). The spatial distribution of male and female functions takes place at various structural levels: within flowers (between floral organs) in hermaphroditic species; within flower clusters (between flowers), within inflorescences (between regions of the inflorescence); within individuals (between inflorescences) in some monoecious species; and between individuals in dioecious species (Fig. 1).

*Monoecy* - Monoecy in palms is found in several tribes of the family, and is achieved through various ways. Of the 54% of monoecious palm species, the vast majority is found in the species-rich Arecoideae, the largest subfamily of palms with more than half of all palm species (phylogenetic relationships among tribes and subfamilies of palms are shown on Fig. 2). In this almost entirely monoecious clade, most species are characterized by having flowers gathered in triads or clusters derived from triads. The triad is a highly condensed cincinnus consisting of a female flower, flanked by two, male flowers (Fig. 1). Male and female functions may be further separated by the concentration of fully developed triads at the base of the rachillae, with partially developed “triads” of 1-2 male flowers being produced distally. Monoecy with flowers organized in triads (consisting of one female flower flanked by two male flowers) also occurs in tribe Caryoteae in subfamily Coryphoideae (tribe Caryoteae), although the three genera vary in sexual expression. *Caryota* and some species of *Arenga* bear complete triads comprising both sexes, whereas remaining *Arenga* species and *Wallichia* present unisexual inflorescences by reduction of triads to pairs of male flowers or solitary female flowers (Dransfield and Mogeia 1984)(Jeanson, 2011), resulting in monoecy at the individual level or, apparently, dioecy in some instances (Dransfield et al., 2008). A comparable phenomenon occurs in some Arecoideae (*Elaeis* and *Attalea* (tribe Cocoseae), *Lepidorrhachis* and *Marojeya* (tribe Areceae), and *Wettinia* (tribe Iriarteae)), where reduction

of triads results in unisexual inflorescences, with both male and female inflorescences occurring on the same individual (Baker and Hutton, 2006).

The tribe Chamaedoreeae stands out in that in most genera flowers are grouped in rows along the rachillae, the so-called acervulus which is a specialized inverted type of cincinnus (Uhl and Moore 1978; Dransfield, Uhl et al. 2008). Each row has one proximal female flower followed by distal male flowers, the distal ones maturing first. Developmental studies (Ortega-Chavez and Stauffer 2011) studied the acervulus in *Hyophorbe* and provided insight into how this develops by a combination of rapid development and adnation, reminiscent of what is found in the unrelated genus *Cordia* (Boraginaceae).

Other types of spatial arrangements of male and female flowers are found elsewhere in the palm family. For example, species of the African genus *Raphia* (tribe Lepidocaryeae, subfamily Calamoideae) bear solitary female flowers on the proximal parts of the rachillae and solitary male flowers on the distal parts, with dyads of one of each sex sometimes found at the junction, the sympodial dyad being a synapomorphy for the Calamoideae. In *Oncocalamus*, another member of the same tribe, the complex sympodial flower clusters consist of up to 11 flowers. The central 1-3 flowers are female and flanked by two cincinni of 2-4 male flowers. In the monotypic genus *Nypa* (Nypoideae), the solitary female flowers are borne on the club-shaped apex of the inflorescence, whereas the likewise solitary male flowers are densely packed on catkin-like rachillae, which are borne on lateral branching systems.

*Dioecy* - Complete separation of sexes on different individuals is observed in almost one third (29%) of palm species. Dioecy is the predominant sexual system in Calamoideae and Ceroxyloideae, where it occurs in 87% and 91% of the species respectively. In Calamoideae, flowers are borne in dyads (or apparent derivatives thereof) that display complex patterns of shifts between sexes as well as floral sterilisation and loss. In the species rich genus *Calamus* (tribe Calameae) for example, female plants carry dyads combining a sterile male flower and a functional female flower, and male plants bear solitary flowers, whereas in *Mauritiella* (tribe Lepidocaryeae) both female and male plants carry solitary flowers. In all dioecious Ceroxyloideae, flowers are solitary. Remarkable arrangements occur in the ceroxylid tribe Phytelepheeae, where the large male flowers are clustered in groups of a few flowers along the rachis and the solitary female flowers are spirally arranged along the rachis.

In the otherwise monoecious Arecoideae, the tribe Chamaedoreae is notable in that it includes the only two truly dioecious genera present in the entire subfamily, namely *Chamaedorea* (the only genus of the tribe with solitary flowers) and *Wendlandiella*. In this latter genus, male flowers are arranged in rows (acervuli), like in the monoecious members of the tribe whereas the female flowers are solitary.

Approximately 10% of the species in Coryphoideae are dioecious, the rest of the species bearing hermaphroditic flowers or being monoecious. In the otherwise hermaphroditic genus *Licuala* dioecy may occur in a few species (e.g. the Moluccan *L. adscendens*; Barfod and Heatubun 2009). Recently, Henderson and Bacon (2011) erected a genus to accommodate a group of dioecious species, most from Vietnam, hitherto referred to *Licuala*. Important fruit crops are found among the dioecious coryphoids in tribes Phoeniceae (date palm) and Borasseae (palmyra). In the date palm *Phoenix dactylifera* (tribe Phoeniceae), experiments have shown that female flowers can be induced to become functionally bisexual by hormonal in-vitro treatment (Masmoudi-Allouche et al. 2009). In cultivated collections of *Phoenix* species, hermaphroditic flowers are also sometimes seen to form *in planta* (Demason and Tisserat, 1980). Dioecy is also present in the tribe Chuniophoeniceae, which includes four genera among which *Kerriodoxa* (a monotypic genus endemic from peninsular Thailand) is strictly dioecious,

*Hermaphroditism* - Strictly hermaphroditic palms are most numerous in the Coryphoideae where they represent more than three quarters of the 453 species included in the subfamily in 28 of the 46 genera. Coryphoideae have hermaphroditic flowers with little variation in flower structure and flower size. The flowers of these species are either solitary or in cincinni of up to ten flowers (*Corypha*). Two other subfamilies also contain hermaphroditic species, to a lesser extent. Within Ceroxyloideae, *Pseudophoenix*, which is sister to the rest of the subfamily (Baker et al. 2009), is the only genus having hermaphroditic flowers. In this genus, the same inflorescence carries hermaphroditic flowers on the proximal part of the rachillae and male flowers with reduced gynoecia towards the apex (Dransfield et al. 2008). In Calamoideae, three genera are hermaphroditic, namely *Eremospatha* and *Laccosperma* (tribe Lepidocaryeae) and *Korthalsia* (tribe Calameae). In the first two genera the flowers are borne in dyads, in contrast to the latter one where flowers are solitary, although evidence from bracteoles suggests a possible reduction from dyads.

“Polygamy” - A handful of unrelated palm genera, found in Calamoideae and Coryphoideae, harbour complex combinations of bisexual and unisexual flowers, and are gathered under the vague term “polygamy”. The two polygamous genera of the subfamily Calamoideae, namely *Eugeissona* (tribe Eugeissoneae) and *Metroxylon* (tribe Calameae) from SE Asia and the Pacific region, display dyads composed of one male flower and one hermaphroditic flower, which corresponds to andromonoecy. A more complex situation has been described in two species of the tribe Trachycarpeae (Coryphoideae). Hermaphroditic flowers are found in association with male flowers in *Rhapis laosensis*, a species of the otherwise dioecious genus *Rhapis* (Giddey, Spichiger, and Stauffer, 2009). A detailed study of *Trachycarpus takil* (tribe Trachycarpeae) revealed an unstable sexual system with age-related changes from mainly male expression to mainly female expression (Kholia 2009). Cryptic andromonoecy/dioecy has also been reported in certain Australian and New Guinean species of *Livistona* and *Saribus* (Dowe 2001; Dowe 2009). In these species the flowers of all individuals are morphologically similar at anthesis. However, some trees never carry fruits and are therefore functionally male. Whether the fruit carrying palms are able to produce viable pollen grains remains to be demonstrated and thus the sexual system could either be functionally androdioecious or dioecious. The inflorescences are sometimes sexually dimorphic such as in *L. concinna* where the non-fruit carrying inflorescences are branched to one order higher than the fruit carrying inflorescences (Dowe and Barfod 2001). *Chuniophoenix* (two or three species distributed in Southern Asia) is occasionally andro- or gynodioecious, although most individuals bear bisexual flowers (Dransfield et al. 2008).

#### *Plasticity in sexual expression*

Little is known about gender plasticity in angiosperms in general, and palms make no exception. One study conducted on the andromonoecious palm *Attalea speciosa* (tribe Cocoseae, Arecoideae) showed considerable reproductive plasticity according to the environment. In pastures and groves, male reproduction started at significantly smaller heights of the palm than female reproduction, but not so in the forest (Barot, Mitja et al. 2005). Plasticity in the expression of male vs. female function was also noted in androgynomonoecious *Attalea funifera* (Voeks, 1988, , 2002). Although alterations in reproductive strategy by sex allocation may influence palm-pollinator interactions, they may also be regarded in some cases as a side effect of changes in resource allocation by the plant and not necessarily linked to pollination.

Changes in sexual expression have been observed in the African oil palm *Elaeis guineensis*, which produces female and male inflorescences in cycles (Adam et al., 2005; Adam et al., 2011). The length of these cycles are influenced by soil and light conditions and consequently the number of female inflorescences produced relative to male inflorescences is a variable feature that reflects forest dynamics, a factor that is exploited in oil palm plantations for obtaining higher yields (Freeman et al. 1981). In the dioecious species *Chamaedorea tepejilote* the number of inflorescences produced per plant was found to be positively correlated with height (age) in both male and female plants, but males produced significantly more inflorescences than females (Oyama and Mendoza 1990), this difference likely to be explained by resource allocation or pollination-related factors.

### *Sexual expression in time*

Temporal separation of sexual expression operates at various spatial levels: flower level in the case of hermaphroditic flower (dichogamy *sensu stricto*), flower cluster level and inflorescence level in the case of monoecious taxa, plant level and population level in the case of dioecious taxa (Fig. 1). In many palm inflorescences sexual expression occurs in pulses or cycles, probably as an adaptation to the behavioural characteristics of the pollinating vector (pollination is discussed later in this review).

*Flower level* – In palms bearing only hermaphroditic flowers, both protandry (male function matures before female function) and protogyny (the opposite) can be found, with no clear phylogenetic trend. (Barfod et al. 2003), reported a shift in sexual expression in two hermaphroditic species of *Licuala* distributed in Peninsular Thailand. In *L. spinosa* opening of the flowers along the rachillae is erratic where as in *L. peltata* flowering proceeds in pulses. Each pulse lasts 4-5 days. The flowers are protandrous and both the male and female phases last approximately one day. The distal tier of flowers on one 40-60 cm long rachilla initiates male anthesis on day one, and passes into the female phase on day two; the mid tier initiates male anthesis on day two and female anthesis on day three; the proximal tier initiates male anthesis on day three and female anthesis on day four.

*Flower cluster level* – In monoecious taxa, most often there is a difference in anthesis between male and female flowers. This applies for example to Arecoideae and Caryoteae, in which the majority of species have protandrous triads. This may be due to architectural constraints of the sympodial triad, in which the female occupies the lateralmost position in the cincinnus and is therefore most likely to be the last to develop (Loo et al., 2006). In many



cases, the male and female antheses are separated by only a matter of days, but often the development of the female flower is substantially delayed. For example, in the extreme case of *Howea*, an entire year elapses between male and female anthesis (Savolainen et al., 2006). Nevertheless, several genera of Arecoideae are protogynous, despite the constraints of the triad. In the case of *Pinanga* and protogynous species of *Hydriastele* and *Areca*, this is achieved by the female flowers being congenitally open inside the inflorescence bud, the stigma being receptive as soon as the inflorescence expands (Loo et al., 2006). Female anthesis is of short duration and the male flowers, which are already fully developed, open shortly afterwards. Protogyny is also reported in *Nypa*, in which the female flowers, borne in a head at the apex of the main inflorescence axis, reach anthesis before the male flowers on highly branched lateral axes become exposed.

The initiation of flowering along the rachillae is also quite variable. In *Hyospathe elegans* (tribe Euterpeae, Arecoideae) flowering is erratic in flowers of both sexes in the triad, and as a consequence male and female flowers at anthesis are interspersed along the rachillae without a clear pattern (Skov and Balslev 1989; Listabarth 2001). Opening of the flowers is also scattered throughout the rachillae even when flowers are not in triads, like in *Licuala spinosa* (Coryphoideae; Barfod, Burholt et al. 2003) or in *Mauritia flexuosa* (Calamoideae; Ervik 1993). In contrast, the initiation of flowering along the rachillae can be highly organized like for instance in *Geonoma irina* (Borchsenius 1997), in which a first pulse lasting 7-9 weeks is generated by the opening of the first-formed male flowers of each of the sunken triads. A second pulse of equal duration is initiated about three weeks later by opening of the second-formed male flowers. Lastly, three weeks later, the opening of the third and last formed, female flowers of each triad generates a pulse lasting 4-8 weeks.

*Inflorescence level* – Some palms go through gender phases as a consequence of sexual separation at the inflorescence level. This applies to hapaxanthic (i.e., flowering only once in their whole lifetime) members of the genus *Arenga* (tribe Caryoteae, Coryphoideae), which produce inflorescences in a basipetal sequence (Dransfield and Mogege 1984), the distal inflorescences entering anthesis before the proximal. In a few species, inflorescences bear flowers of both sexes, with triads of female and male flowers. However, towards the end of the lifecycle of the palm, inflorescences at the proximal and often naked part of the stem become male, by suppression of the female flower of the triad. For this reason, fruits are only produced in the uppermost inflorescences (Jeanson, 2011). Another example of temporal separation of sexual expression is the cyclic flowering of the African oil palm *Elaeis*

*guineensis*, and its South American congener *E. oleifera* (tribe Cocoseae). Male and female inflorescences are alternately produced, in cycles of varying duration, resulting in temporal dioecy. The inflorescences that open during male phases of flowering bear single functional male flowers, while the inflorescences that open during female phases carry triads composed of a female flower flanked by two abortive male flowers (Adam et al. 2005). The individual staminate flowers of the male inflorescence have been proposed to be structurally equivalent to the triad unit of the female inflorescence (Van Heel, Breure, and Menendez, 1987).

The diversification of the palm family has led to an unusually high diversity in sexual expression (Fig. 1). Most combinations of the phenomena we have dealt with in the preceding paragraphs are in fact represented in palms. However, a few never occur most likely due to low fitness and ontogenetic constraints. This applies for example to homogamous (non-dichogamous), hermaphroditic flowers which would be selected against due to risk of autogamy and resulting inbreeding.

## **Morphology of sexual expression**

### *The floral groundplan*

The groundplan of the palm flower (Fig. 3) is typical of the monocots and is characterized by relatively few innovations as compared to other monocots and flowering plants in general. It is considered likely that trimerous-pentacyclic flowers are plesiomorphic for the Arecaceae, along with the other commelinid lineages (Remizowa, Sokoloff, and Rudall, 2010). Palm flowers have generally an actinomorphic perianth, contrary to the highly elaborate zygomorphic flowers of other Commelinid taxa such as found in the Zingiberales and Commelinales. The perianth is present, though often inconspicuous, with usually differentiated calyx and corolla, free or fused, but no functional alteration of floral organs such as in the ginger order (Zingiberales) and the iris family (Iridaceae). All palms have superior ovaries with a single ovule per locule. The morphology of palm flowers may, however, vary in size, organ numbers and organ fusion. Thus the male flowers of *Synechanthus warscewicsianus* are no more than a few millimetres long, whereas the female flowers of *Aphandra natalia* are up to 25 cm long, which is the record in the family and among the longest flowers in the monocotyledons. Particularly the number of stamens is highly variable from sometimes just one in *Dypsis lantzeana* (Rudall et al., 2003) and J.

Dransfield pers com.) to over one thousand in *Ammandra decasperma* (Barfod 1991). From an ancestral androecium composed of six stamens like in most monocots, transitions towards more stamens have occurred repeatedly throughout the family, with a particularly high variation in the Arecoideae (Nadot et al., 2011). Organ fusion may be more or less complete and comprise either the fusion of organs within the same whorl (connation) and or the fusion of organs among whorls (adnation). Compared to other monocotyledonous taxa, the gynoecium is unusually variable, from three fused carpels (the most common situation in monocots), three free carpels, pseudomonometry (three carpels are formed in the early developmental stages but only one fully develops), to a single carpel (Rudall, Ryder, and Baker, 2011). The floral receptacle is rather uniform except in the extreme case of the tribe Phytelephteae. In this group the floral receptacle of male flowers is enlarged to accommodate the hundreds of stamens produced.

### *Sexual dimorphism*

If separation in space and time are two important dimensions in the description of sexual expression in palms, floral dimorphism certainly is the third factor needed to fully appreciate its huge diversity (Fig. 1). Indeed floral dimorphism can be considered in some respects to be a sub-component of spatial separation. In unisexual flowers the degree of reduction of the non-functional sexual organs is highly variable. At one extreme, male and female flowers may be morphologically identical, such as in certain Australian and New Guinean representatives of *Livistona* (tribe Trachycarpeae) (Dowe 2009). At the other extreme they may be strongly dimorphic such as in the dioecious tribes Phytelephteae (Barfod 1991) and Borasseae (Dransfield, Uhl et al. 2008). In the following section we give an account of the morphological differences between male and female flowers in palms broken down into size, number of floral parts, and structural attributes.

*Size* – Although in palms female flowers tend to be slightly larger than male flowers, the difference in size seldom exceeds a factor of two, and several groups actually display male flowers that are larger than the female ones. This occurs in particular in some taxa from the predominantly monoecious subfamily Arecoideae, such as the tribe Iriarteae and the genera *Pinanga*, *Nenga*, *Hydriastele* (tribe Areceae), *Geonoma* (tribe Geonomateae), *Gaussia* (tribe Chamaedoreae) and *Hyospathe* (tribe Euterpeae). The most noticeable contrast of size is observed in the tribe Phytelephteae (Ceroxyloideae). In *Aphandra natalia*, the enormous female flowers are up to 25 cm long, narrow, with strap-shaped perianth parts and bunched

within a partly enveloping peduncular bract whereas the male flower remains relatively small in spite of the huge number of stamens densely packed on the enlarged floral receptacle (Barfod and Uhl 2001). In certain palms of the tribe Borasseae, there is also pronounced size difference between the female flower and male flowers such as in *Lodoicea maldivica*, which has rounded female flowers up to 5 cm across and narrow male flowers less than twice this length. Conversely, in cryptic unisexual flowers such as those described for *Livistona* there is no morphological difference at the time of anthesis between functional male and functional hermaphroditic flowers. It should be noted however that the inflorescences of functionally male palms are branched to one order higher and are therefore relatively distinct.

In species with pollination by deceit such as suggested for four species of *Calamus* in peninsular Thailand (Boegh 1996) a size difference between male and female flowers may have been selected against due to the behaviour of the pollinating bees. They are attracted to inflorescences by visual cues and able to detect and remember even minor morphological differences between male and female flowers (Barfod, Hagen et al. 2011).

In male and female flowers, non-functional organs of the opposite sex (pistillode in male flowers and staminodes in female flowers) vary in size and shape, between almost identical to extreme reduction or even absence (Fig. 4). There is one exception in *Chamaedorea* (Arecoideae), where the pistillode of the male flower is larger than the pistil of the female flower and may play an important role in interactions with pollinating insects (Askgaard, Stauffer et al. 2008).

*Number of floral organs* – In palms the number of parts in the perianth whorls are invariably the same in male and female flowers. The number of functional stamens in male flowers may differ however from the number of staminodes in corresponding female flowers in some lineages. This applies to several lineages of the monoecious Arecoideae where almost all western Pacific members of the tribe Areceae bear female flowers with three staminodes on one side of the gynoecium (Baker et al., 2011; Nadot et al., 2011) whereas the number of fertile stamens ranges from six to up to more than a hundred. The same applies to several members of the tribe Cocoseae characterised by the presence of a staminodial ring in their female flowers and some dioecious members of the Coryphoideae (Nadot, Sannier et al. 2011). In the tribe Phytelepheae the female flowers have fewer, but larger staminodes compared to the huge number of functional stamens in male flowers. The staminodes originate in two whorls, the first whorl surrounding the carpel primordia and a second outside the first (Uhl and Moore 1977; Barfod and Uhl 2001).

In several unrelated lineages with unisexual flowers, the pistillode is completely lacking in male flowers whereas staminodes are present in the female flowers (e.g., *Chambeyronia* and *Howea* in the subfamily Arecoideae, *Phytelephas* in the Ceroxyloideae, *Guihaia* and *Caryota* in the Coryphoideae, or *Eleiodoxa* in the Calamoideae). This likely reflects the differential expression of the floral genes that control the development of floral organs (see section “Towards understanding the genetic basis of sexual separation in palms” below). In this context it is interesting to note that the reverse situation, where staminodes are absent in the female flowers and pistillodes are present in the male flowers, is much rarer and concerns only a few lineages, e.g., *Neonicholsonia* or *Euterpe* (Arecoideae). The complete absence of non functional organs in both female and male flowers of the same species is even rarer. It is found in *Pinanga* (Arecoideae), in members of the tribe Caryoteae (Coryphoideae) and in *Nypa* (Nypoideae).

*Structural attributes* – Extreme morphological differences between male and female flowers can be observed in many groups in addition to size and numerical differences. Noteworthy examples are found in Borasseae, Phytelepheeae, *Nypa* and many arecoids. In *Hydriastele*, for example, female flowers are typically low, rounded and symmetrical with a short, leathery perianth, whereas male flowers are at least twice as long, asymmetrical, with long, often irregular petals and a low calyx. Female petal morphology is also correlated with dichogamy in *Hydriastele*, the protandrous species bearing a triangular lobe at the petal apex, which remains closed over the stigma during male anthesis, the protogynous species lacking such a lobe and leaving the stigmas congenitally exposed in bud.

At the perianth level, corolla aestivation varies between sexes in some tribes of the Arecoideae (e.g., Areceae and Cocoseae), where it is imbricate in female flowers vs. valvate in male flowers (Dransfield et al., 2008). Anatomical sections of the flowers of *Bactris major* revealed how the male petals differ from the female ones by being relatively fleshy and having a single row of bundles located near the inner surface. (Uhl and Moore 1977) interpreted their function as a protection of the stamens. After female flower anthesis, the male flowers open and quickly disperse their pollen grains. Similarly, in ten species of *Chamaedorea* (Askgaard, Stauffer et al. 2008) revealed small-sized, densely staining cells in the outer layers of the male petals. They pointed out that detailed studies of the pollination mechanism in these species are needed to gain insight in their putative role in the interaction with the pollinators.

*A note on self-incompatibility* – Palms are regarded as self-compatible REF. We are not aware of reports of gametophytic or sporophytic self-incompatibility in the family. Experience from horticulture indicates that palms readily set fruit in cultivation, even when only single individuals are present in a particular garden, although interventions, such as saving pollen and subsequent hand-pollination, may be required to overcome dichogamy. We note, however, that some hermaphroditic and monoecious species display poor fertility when cultivated in isolation, the best known example being the Mauritian palm *Hyophorbe amaricaulis* (Maunder et al., 2002), which is extinct in the wild, persisting as a single individual in a botanic garden where it fails to set fruit.

## **Evolution of sexual expression**

### *Evolutionary pathways leading to separate sexual expression*

Hermaphroditism is considered as the ancestral condition in angiosperms. Advantages include the sharing by male and female functions of costs for the production of non-sexual organs (sepals, petals, rewards), and it allows self-fertilization when pollen transfer is inefficient. Conversely unisexual flowers, especially in the case of monoecy, allow dimorphism and consequently specialization in shape, size and positioning of male and female flowers. It has been argued that monoecy could have been selected because it favours outcrossing, reduced interference between pollen and stigmas, or allows control of sex allocation. Several hypotheses have been suggested to explain the transition from hermaphroditism to monoecy. The most likely pathway is hermaphroditism to andromonoecy and then to monoecy (de Jong, Shmida, and Thuijsman, 2008). Strangely, relatively little attention has been paid to the evolution of monoecy, compared to dioecy.

Various hypotheses have been proposed to account for the origin of dioecy in angiosperms, focusing on different evolutionary drivers such as pollination mechanisms (Ashman, 2000) ecological factors (Vamosi, Otto, and Barrett, 2003) Distinction has been made between two main evolutionary pathways leading to separation of genders on separate plants. One such involves monoecy and hypothesizes a gradual transition in the relative proportion of male to female flowers respectively, eventually leading to a complete separation between male and female plants (Charlesworth and Charlesworth 1978). Evidence for evolution of dioecy through monoecy has been found in *Cotula* (Asteraceae; Lloyd 1975), Siparunaceae (Renner and Won 2001) and *Sagittaria latifolia* (Alismataceae; Dorken and

Barrett, 2004) among others. The other hypothetical pathway leading to dioecy in angiosperms proceeds through gynodioecy, which involves male sterility mutations, invasion of hermaphrodite populations by female individuals and further selection of the male such as in *Mercurialis* (Euphorbiaceae; Harris and Pannell 2008; Pannell, Dorken et al. 2008). Interestingly there are no documented cases of androdioecy as an intermediate stage in the evolution of dioecy. Very few reports of reversal from dioecy to other sexual systems exist. A case have been described in *Cotula* with a transition back to monoecy (Lloyd 1975) and in *Mercurialis annua* in which androdioecy most probably evolved from dioecy (Pannell, Dorken et al. 2008). A phylogenetic analysis of dioecy in monocots suggested that dioecy probably evolved more often directly from hermaphroditism than from monoecy (Weiblen, Oyama, and Donoghue, 2000).

#### *Hermaphroditic flowers: multiple gains or multiple losses?*

The question whether the ancestor of all palms had unisexual or bisexual flowers is pertinent in view of the diversity of sexual systems in the family and the predominance, in terms of number, of species with unisexual flowers. It has been suggested that the ancestral palm flower is hermaphroditic. However, the diversity of sexual systems in the early-diverging subfamilies of palms challenges this hypothesis. To investigate the evolutionary pathways leading to different sexual expression in palms we used a phylogenetic approach, relying on a comprehensive genus-level phylogeny of the palm family (Baker et al., 2009) (including the novel genus *Tahina*, but not *Lanonia*). Using an exemplar approach, we conducted a survey of 183 species, one for each genus included this phylogeny, which represent all of the genera recognized (Dransfield et al., 2008; Couvreur, Forest, and baker, 2011). Descriptions of the species were obtained from the literature and recorded in the database PROTEUS (see <http://eflower.myspecies.info/proteus>). The species vs. genus approach avoids the problem of coding polymorphisms whenever they occur within a genus. PROTEUS allows precise and complete tracking of the source information. Mesquite (Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>) was used to perform maximum parsimony optimization of the character “sexual system”, presented on Fig. 5A and 5B. We coded the character as multistate, with three different states representing the three major sexual systems, namely hermaphroditism, dioecy and monoecy. Andromonoecy was defined as a fourth additional state, to represent the dominant system among the so-called “polygamous” species.

The optimization of sexual system evolution with a three-state coding led to an ambiguous state for the common ancestor of the whole palm family, as well as for the common ancestor of subfamilies Calamoideae and Ceroxyloideae. The common ancestor of palms could have been hermaphroditic or monoecious, the two hypotheses being equally parsimonious. The relationship between *Nypa* and the other members of the family is still poorly supported, making it difficult to ascertain whether monoecy in this subfamily is derived or ancestral. *Nypa* is exceptional among monoecious palms, being one of the very few species with “perfectly unisexual” flowers, completely devoid of either staminodes or a pistillode.

Hermaphroditism is inferred as the ancestral state for the Coryphoideae, and has been inherited by the majority of species (see Table 1), dioecy and monoecy being clearly derived in this subfamily. Monoecy is unsurprisingly inferred as the ancestral state of the Arecoideae where it is found in the vast majority of species (see Table 1).

Interestingly, when the fourth character state (andromonoecy) was taken into account in the optimization, monoecy was unambiguously inferred as the ancestral state for the whole family. From this state, dioecy and hermaphroditism evolved several times throughout the family. Andromonoecy evolved either from dioecy, hermaphroditism or monoecy. Dioecy evolved either directly from monoecy, in Arecoideae (within Chamaedoreae), and in Calamoideae (Calameae and Lepidocaryeae), or from hermaphroditism in Coryphoideae (Borasseae and Trachycarpeae). Monoecy evolved secondarily once from hermaphroditism in Coryphoideae (Caryoteae).

Within Calamoideae, the inferred ancestral state is monoecy, from which transitions towards the three other states occurred. There are two independent transitions towards hermaphroditism in Lepidocaryeae and in Calameae. Dioecy evolved twice independently in Calamoideae, once in Lepidocaryeae and once in Calameae. The placement of the andromonoecious genus *Metroxylon* nested within the clade of dioecious species in Calameae is intriguing, but could be accounted for by an exceptional lability in sexual system in Calamoideae, as suggested by the overall variation observed in this clade. Andromonoecy is also observed in *Eugeissona*, which is sister to all other Calamoideae. It should be noted that in all species with unisexual flowers, male and female flowers bear well-developed non-functional organs of the opposite sex.

The inferred ancestral state is hermaphroditism in Coryphoideae, with here also transitions towards the three other states. Dioecy evolved in Borasseae and Trachycarpeae, with structurally bisexual flowers (i.e. containing non-functional organs) except in the derived



*Guihaia* (Trachycarpeae) where the male flowers have no pistillode. Two other independent transitions towards dioecy occurred, one in *Phoenix* (Phoeniceae) where evidence for sexual chromosomes has been obtained (Siljak-Yakovlev et al., 1996), and the other in *Kerriodoxa* (Chuniophoeniceae) which produces male flowers totally devoid of a pistillode. Monoecy evolved only once, in the common ancestor of Caryoteae, with male flowers devoid of a pistillode in *Caryota*, and both male and female flowers devoid of non-functional organs in *Wallichia*. Andromonoecy is reported in the monotypic genus *Schippia*, a member of the hermaphroditic tribe Cryosophileae (Dransfield et al., 2008).

In Ceroxyloideae, the ancestral state is ambiguous and might be monoecy, andromonoecy or functional dioecy (male and female flowers bearing non functional organs evolved. The pistillode was secondarily lost within Phytelephea (in *Aphandra* and *Phytelephas*).

In Arecoideae, the ancestral state is clearly monoecy, with flowers of both sexes bearing non-functional organs. Dioecy evolved in two genera of the Chamaedoreae, namely *Chamaedorea* and *Wendlandiella*. Renner and Ricklefs (1995) proposed that dioecy may evolve from monoecy through divergent adjustments of sex ratios between individuals (Fig 6). The pistillode was lost independently several times in unrelated genera of the subfamily, in *Synechanthus* (Chamedoreae), in *Iriartella* (Iriarteeae), and in four genera of the Cocoseae. Staminodes were lost in *Socratea* (Iriarteeae) and in Euterpeae. The complete absence of non-fertile organs, leading to “perfectly unisexual” flowers (structural monoecy, Fig 6), is clearly derived in palms. However, the losses appear to have occurred almost randomly in terms of their phylogenetic distribution and no prior reductions of non-functional organs can be inferred from observations of the extant clades. Unisexuality in flowers can result from abortion, loss of organ initiation or replacement of organs of one sex (Mitchell and Diggle, 2005). In palms, developmental studies conducted on the dioecious *Phoenix dactylifera* (Coryphoideae), have shown that flower unisexuality results from the abortion of organs of the opposite sex associated with an arrest in cell division activity (Daher et al., 2010). The developmental pattern of unisexual flowers in the monoecious *Nypa fruticans*, in which non-functional organs of the opposite sex are lacking, suggests that sexual dimorphism is achieved in this species through the absence of organ initiation (Uhl, 1972). In *Caryota mitis* (Coryphoideae), male flowers bear numerous stamens and no pistillode, but a stamen develops at the apex of the floral meristem, suggesting homeotic replacement of the pistillode by a male organ (Uhl and Moore, 1980). Although data on the floral ontogeny of palms is still too scarce to provide an in-depth understanding of the developmental mechanisms involved in

flower unisexualisation, it is obvious that different mechanisms are at play in different lineages of the family.

### **Sex and pollination**

The role of sexual expression as a driving force in the co-evolution of palm-pollinator relationships is poorly understood. Palm inflorescences are typically visited by a large variety of insects differing both in specificity and behaviour. Some insects mainly provide services to the plant in terms of transferring pollen grains, whereas others have a negative effect *e.g.* by damaging vital organs in the flower or preying on potential pollinators. There is no doubt that sexual expression may affect interactions between palms and their floral visitors and that the spatial and temporal separation of sexual expression may increase the fitness of the palm both in mutualistic and antagonistic relationships. (Anstett 1999) and (Dufay and Anstett 2004) demonstrated a nursery-deceit pollination mechanism in the dioecious (sometimes polygamous) species *Chamaerops humilis* in the Catalonia region of Spain. The main weevil pollinator, *Derelomus chamaeropsis*, depends completely on the palm to complete its life cycle. It oviposits in both male and female flowers, but larval development is suppressed in part of the female flowers, which therefore end up producing fruits (Anstett 1999). Thus in this well-documented case the main pollinating insect species is engaging in a relationship with the palm that can be viewed as being both mutualistic (transfer of pollen *vs.* oviposition site) and antagonistic (suppression of larval development *vs.* destruction of reproductive organ). Sexual expression varies in *C. humilis* from polygamous to dioecious, but it is unknown whether these differences are related to a trade-off between floral protection and attraction of pollinators. It should be borne in mind that other visiting insects may also play a role in optimizing reproductive success, and that this role may vary greatly in both time and space. In members of the dioecious tribe Phytelepheeae (Ceroxyloideae), male flowers serve as oviposition sites for the visiting staphylinid and curculionid beetles, whereas the gynoecium is deeply buried within the long bunched petals outside the reach of many insects (Barfod, Henderson et al. 1987; Bernal and Ervik 1996). The identity of the highly dimorphic flowers is disguised by the similar odour emitted by flowers of both sexes, misleading beetles for which odours are the most important cue. On the other hand, bees respond mainly to visual cues and can distinguish and memorize morphological differences. In the female inflorescences of most species in the dioecious subtribes Salaccinae and Calaminae (subfamily Calamoideae), the female flowers are coupled with a sterile male flower, whereas

the male inflorescences carry only solitary (Calaminae) or paired (Salaccinae) male flowers. Boegh (1996) and Aroonrat and McKey (2012) have suggested that the sterile male flower may disguise the identity of the female inflorescence and trick the bees to visit flowers with little or no reward.

A few studies provide insight into the connection between temporal separation of sexual expression and pollination mode. An association between protogyny and beetle pollination (Bertin & Newman 1993, Henderson 2002) although exceptions do exist such as *Oenocarpus bataua*, which is protandrous but beetle-pollinated (Kuchmeister, Silberbauer Gottsberger et al. 1997; Garcia, 1988). These generalisations could be tested using groups in which shifts between protogyny and protandry have taken place. For example, a shift from protandry to protogyny has occurred in *Pinanga* in the Arecinae, a genus that is reported to be beetle-pollinated. In *Hydriastele*, multiple shifts between protandry and protogyny have occurred and beetle pollination has been observed in some protogynous species. These genera may hold exciting clues to the evolution of sexual expression and pollination, and the role of these factors in promoting diversification.

In the dioecious species *Phytelephas seemannii* sexual expression is displaced within the flowering population with typically a diurnal onset of male anthesis and nocturnal onset of female anthesis. (Bernal and Ervik 1996) considered this an adaptation to minimize the competition for pollinators between male and female plants. Displacement of sexual expression has also been recorded on more extended time scales in the wind-pollinated dioecious palm *Howea forsteriana*. In populations of this species, endemic of Lord Howe Island, male palms were shown to initiate flowering before female palms (Savolainen, Anstett et al. 2006). This phenological difference may have arisen as a physiological response to the edaphic stress that led to sympatric speciation of *H. forsteriana* and *H. belmoreana* (Savolainen et al., 2006).

General conclusions regarding ecological correlates of sexual expression in palms (and other species) should be drawn with caution due to the limited number of studies and the complexity of plant-animal interactions. The extreme spatial separation of sexual functions in dioecious flowering plants thus cannot be explained simply as a means of achieving outbreeding in plants that lack self-incompatibility (Renner and Ricklefs 1995). Sexual expression in palms should instead be regarded as a result of the dynamic interplay of many selective forces during the diversification of the family. Throughout the distributional range of a single palm species selection pressures probably vary greatly depending on plant-pollinator network interactions. Some insect visitors and potential pollinators may be highly

specific for a given palm species and play a key role in the co-evolutionary relationship. Other visitors are generalists and although they theoretically may transfer large amounts of pollen grains they have little consequence for the evolution of sexual expression in the flower because their presence is too opportunistic.

## **Towards understanding the genetic basis of sexual separation in palms**

### *Molecular regulation of palm flower development*

Much progress has been made in the last two decades in understanding the molecular mechanisms underlying flower development in plants. A major milestone was reached in the form of the ABC model published in 1991 by Coen and Meyerowitz (Coen and Meyerowitz, 1991) to explain the genetic determination of flower structure in two different eudicot species (*Arabidopsis thaliana* and *Antirrhinum majus*). This model, based on the homeotic activities of specific genes grouped into A, B and C classes, was later extended to include D and E functions (Angenent, Colombo, 1996; Pelaz *et al.*, 2000). A large body of data has been obtained to suggest that the ABC model can also be applied, to a fairly large extent, to monocots. Initial investigations tended to focus on species of the Poaceae such as maize (Ambrose *et al.*, 2000) and rice (Chung *et al.*, 1995); however, other studies were reported for non-grass monocots, including members of the Asparagales (Park *et al.*, 2003), Liliales (Kanno *et al.*, 2003) and Commelinales (Ochiai T, 2004). As regards the palm family, data obtained with the African oil palm *Elaeis guineensis* provided evidence for a general conservation of the ABC model with distinct molecular identities for petals and sepals (Adam *et al.*, 2007). Since most ABC homeotic genes encode MADS box transcription factors, much interest lies in the study of the diversity, expression and functional activities of this gene family in palms in order to understand the important role that they have probably played in the structural diversification of the flower and inflorescence. In the case of *E. guineensis*, a total of 24 MADS box genes were described in 2006 by (Adam *et al.*, 2006) and (Alwee *et al.*, 2006); other unpublished MADS box gene sequences from this species figure in the public databases. Palms present a technical challenge to researchers due to the lack of tools available to investigate gene function in this group. This problem is compounded by their phylogenetic distance from model plants, making it difficult to extrapolate data from non-palm species. Despite the apparent conservation of certain ABC functions controlling the development of the flower in palms, it seems likely that the regulatory pathways determining the structure of the inflorescence will have diverged to a greater extent, given the rich

morphological diversity of inflorescences not only in palms, but in monocotyledons as a whole. From a genetic point of view, much of this diversity is likely to have resulted from gene duplications and neo-functionalizations, as has been suggested for the family Poaceae (Cacharrón *et al.*, 1999; Theissen *et al.*, 1996).

#### *Determination of flower and plant sexual dimorphism*

As mentioned in the introduction, dioecy and monoecy collectively account for only a little over 10% of angiosperm species; however, the distribution of sexually dimorphic lineages within the angiosperm phylogenetic tree is very scattered. This suggests that unisexual flowers evolved from perfect flowers on a number of occasions since the separation of angiosperms from gymnosperms (Charlesworth, 2002). It also implies that the exact mechanism of sex determination will differ between different sexually dimorphic lineages (Diggle *et al.*, 2011; Tanurdzic, Banks, 2004), even if a partially conserved angiosperm-wide framework for flower development exists. Thus it is necessary to carry out studies of each lineage in order to determine the exact genetic basis of sex determination for the clade in question. In the case of dioecious plants, systematic genetics-based approaches have led to the identification of sex-linked markers for a number of different species, examples including *Actinidia chinensis* (kiwi fruit; (Fraser *et al.*, 2009)) and *Bryonia dioica* (Oyama *et al.*, 2009). A structural approach based on the availability of sequenced genomes is also now possible and has been applied to the cases of *Carica papaya* (papaya; (Wang *et al.*, 2012)) and, of special note here, date palm (Cherif *et al.*, 2013). In the case of *Silene latifolia*, X ray-induced deletions (Lebel-Hardenack *et al.*, 2002) and C-ion beam radiation (Koizumi *et al.*, 2010) were used to obtain sex determination mutants, confirming the classical genetic prediction of three Y chromosome-located loci controlling carpel suppression, early stamen development and late stamen development respectively. At present, the only two species for which sex determination genes have been identified and characterised are maize and melon. In the case of the polygamous species melon (*Cucumis melo*), sex ratios are controlled by allelic compositions at two different loci, controlling the andromonoecious and gynodioecious (gynomonoecious) characters respectively. Data obtained by (Boualem *et al.*, 2008) revealed that the A allele present at the androdioecious locus encoded an ethylene biosynthesis enzyme, CmACS-7, that repressed stamen development in female flowers when active. (Martin *et al.*, 2009) showed that the transition from male to female flowers in gynodioecious lines resulted from the inactivation of a zinc finger transcription factor gene, *CmWIP1*, that was necessary

for carpel abortion in the male flower, and which indirectly inhibited expression of the *A* gene. In the case of maize, which produces morphologically distinct male and female inflorescences on the same plant, the characterisation of *tasselseed* mutants displaying feminised male flowers allowed the identification of several different sex determination genes and an associated signalling pathway (Calderon-Urrea, Dellaporta, 1999). *TASSELSEED1* was found to be involved in jasmonic acid biosynthesis and to regulate *TASSELSEED2*, encoding a steroid dehydrogenase (Acosta *et al.*, 2009; DeLong *et al.*, 1993). Both genes are required for the programmed death of pistil cells in the male flower. A third as yet uncharacterised gene, *SILKLESS1*, blocks *tasselseed*-induced cell death in the pistil primordia of primary ear florets. Other genetic studies have provided evidence for the involvement of epigenetic factors (Parkinson *et al.*, 2007), microRNAs (Chuck *et al.*, 2007) and brassinosteroid hormones (Hartwig T, 2011).

The *tasselseed* sex determination pathway in maize is an interesting example from an evolutionary point of view, since studies were performed to assess whether a similar signalling system might be used to determine flower sex in other plant groups. Although orthologues of the *TASSELSEED* genes were easily identifiable in other plants, the available data suggested that there was no functional conservation in sex determination beyond the subfamily Panicoideae of the Poaceae (Malcomber, Kellogg, 2006; Zaitchik *et al.*, 2000). In palms, the existence of multiple independent dioecious and monoecious lineages suggests that the situation might be similar, with each group of species possessing a distinct mechanism to determine unisexuality, as also suggested by the variation observed in the relative development of non-functional organs (see paragraph “Hermaphroditic flowers: multiple gains or multiple losses?” above).

Although no specific genes have as yet been implicated in sex determination in palms, there is some evidence to suggest that hormones are likely to play a role in at least some species. In the case of date palm, it has been demonstrated that a specific cytokinin/auxin application can alter the developmental fate of the staminodes of female flowers when cultured *in vitro* so that they develop into functional stamens (Faïza Masmoudi-Allouche, 2009). In the case of oil palm, gibberellic acid treatment was shown to increase the ratio of male to female inflorescences (Corley, 1976). These data provide a mere hint of what may well be an important role for hormones in palm sex determination, a question that is being addressed in ongoing research programmes (Adam *et al.*, 2011).

### *How might dichogamy be achieved in palms?*

Although some data exist to demonstrate that dichogamy may be influenced by environmental factors such as light availability (Friedman, Barrett, 2011), the underlying genetic basis of this phenomenon in flowering plants is even less well understood than that of sexual dimorphism. Nevertheless, it is interesting to note that in the case of *Carya illinoensis* (pecan nut), a single genetic locus appears to control dichogamy, with protogyny being dominant over protandry (Beedanagari *et al.*, 2005). From an evolutionary point of view, dichogamy might in some instances be a facilitator of evolution towards sexual dimorphism. (Pannell, Verdú, 2006) suggested from population modelling that androdioecy in particular can evolve more easily from a heterodichogamous population than from a monomorphic hermaphroditic population. From a functional point of view, it seems probable that dichogamy, like monoecy or dioecy, will have arisen from occasional mutations within the gene network controlling inflorescence and flower development, with different mechanisms operating in different lineages. Given that dichogamy does not affect male or female fertility, it can be speculated that some of the mutations causing this condition occur in the regulatory regions of developmental genes rather than in their coding regions. Mutations of this type could result in delayed (or accelerated) development of specific floral organs through altered gene promoter activity so as to produce protandry or protogyny. No genes controlling dichogamy have as yet been identified in flowering plants, although it has been suggested that the floral symmetry gene network might play a role in some cases (Kalisz, Ree, and Sargent, 2006).

### **Sexual expression in palms: immediate and long term prospects**

Although many long term obstacles to understanding sexual expression in palms remain, an exciting range of new tools centred around Next Generation Sequencing (NGS) technologies has become available in recent years (Varshney *et al.*, 2009) with potential extending far beyond the scope of the traditionally studied genetic models. In the context of the Arecaceae, NGS sequencing has already allowed sequencing of much of the date palm genome (Al-Dous *et al.*, 2011) and genome sequence comparisons between female and male genomes have led to the characterisation of Y chromosome-specific regions for this species (Cherif *et al.*, 2013). Other palm genome sequences are expected to follow in the near future. Genome-wide association mapping and other related techniques show great potential for the

elucidation of genes that control flowering and indeed just about any plant character of interest. Given the rapid progress being made in the development of genomic techniques, it seems likely that the availability of reliable phenotypic data will quickly become a limiting factor. Exploring, cataloguing and understanding the great phenotypic diversity of palms and its ecological correlates will therefore become all the more important.

## **Conclusions**

Sexual expression is one of the most striking characters underlying the biodiversity of the palm family and doubtless fulfils a much wider variety of purposes than simply promoting outbreeding. Indeed The plethora of sexual expression patterns seen in palms, of which an overview is given here, bears witness to the important role that this feature of the plant has probably played in the evolutionary radiation of the family. Continued research in this area will help to improve our understanding of the evolutionary processes that underlie the diversification of sexual systems, in both palms and flowering plants as a whole.

## **Acknowledgements**

The authors are grateful to Hervé Sauquet for PROTEUS database. Jürg Schönenberger and the University of Vienna are also gratefully acknowledged for funding the eFLOWER server hosting the PROTEUS database.



## References

- Acosta, I. F., Laparra, H., Romero, S. P., Schmelz, E., Hamberg, M., Mottinger, J. P., Moreno, M. A. & Dellaporta, S. L. 2009. *tasselseed1* is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science*, **323**, 262-265.
- Adam, H., Collin, M., Richaud, F., Beulé, T., Cros, D., Omore, A., Nodichao, L., Nouy, B. & Tregear, J. W. 2011. Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species. *Annals of Botany*, **108**, 1529-1537.
- Adam, H., Jouannic, S., Escoute, J., Duval, Y., Verdeil, J. L. & Tregear, J. W. 2005. Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Areaceae). *American Journal of Botany*, **92**, 1836-1852.
- Adam, H., Jouannic, S., Morcillo, F., Orioux, Y., Duval, Y. & Tregear, J. W. 2007. Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 1245-1259.
- Adam, H., Jouannic, S., Morcillo, F., Richaud, F., Duval, Y. & Tregear, J. W. 2006. MADS box genes in oil palm (*Elaeis guineensis*): patterns in the evolution of the *SQUAMOSA*, *DEFICIENS*, *GLOBOSA*, *AGAMOUS* and *SEPALLATA* subfamilies. *Journal of Molecular Evolution*, **62**, 15-31.
- Al-Dous, E. K., George, B., Al-Mahmoud, M. E., Al-Jaber, M. Y., Wang, H., Salameh, Y. M., Al-Azwani, E. K., Chaluvadi, S., Pontaroli, A. C., Debarry, J., Arondel, V., Ohlrogge, J., Saie, I. J., Suliman-Elmeer, K. M., Bennetzen, J. L., Kruegger, R. R. & Malek, J. A. 2011. *De novo* genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Nature Biotechnology*, **Advance online publication 29 May 2011**, doi:10.1038/nbt.1860.
- Al-Ghazi, Y., Muller, B., Pinloche, S., Tranbarger, T. J., Nacry, P., Rossignol, M., Tardieu, F. & Doumas, P. 2003. Temporal responses of Arabidopsis root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant Cell and Environment*, **26**, 1053-1066.
- Alwee, S. S., Linden, C. G. V. d., Schoot, J. V. d., Folter, S. d., Angenent, G. C., Cheah, S.-C. & Smulders, M. J. M. 2006. Characterization of oil palm MADS box genes in relation to the mantled flower abnormality. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **85**, 331-344.
- Ambrose, B. A., Lerner, D. R., Ciceri, P., Padilla, C. M., Yanofsky, M. F. & Schmidt, R. J. 2000. Molecular and genetic analyses of the *Silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Molecular Cell*, **5**, 569-579.

- Angenent, G. C. & Colombo, L. 1996. Molecular control of ovule development. *Trends in Plant Science*, **1**, 228-232.
- Angiosperm Phylogeny Group. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **85**, 531-553.
- Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **141**, 399-436.
- Angiosperm Phylogeny Group. 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.
- Anstett, M. C. 1999. An experimental study of the interaction between the dwarf palm (*Chamaerops humilis*) and its floral visitor *Derelomus chamaeropsis* throughout the life cycle of the weevil. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, **20**, 551-558.
- Ashman, T.-L. 2000. Pollinator selectivity and its implications for the evolution of dioecy and sexual dimorphism. *Ecology*, **81**, 2577-2591.
- Askgaard, A., Stauffer, F., Hodel, D. F. R. & Barfod, A. S. 2008. Floral structure in the neotropical palm genus *Chamaedorea* (Arecoideae, Arecaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **65**, 197-210.
- Asmussen, C. B., Dransfield, J., Deickmann, V., Barfod, A. S., Pintaud, J. C. & Baker, W. J. 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): Evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151**, 15-38.
- Baker, W. J., Savolainen, V., Asmussen-Lange, C. B., Chase, M. W., Dransfield, J., Forest, F., Harley, M. M., Uhl, N. W. & Wilkinson, M. 2009. Complete Generic-Level Phylogenetic Analyses of Palms (Arecaceae) with Comparisons of Supertree and Supermatrix Approaches. *Systematic Biology*, **58**, 240-256.
- Barfod, A., Henderson, A. & Balslev, H. 1987. A note on the pollination of *Phytelephas microcarpa* (Palmae). *Biotropica*, **19**, 191-192.
- Barfod, A. S. 1991. A monographic study of the subfamily Phytelephantoideae (Arecaceae). *Opera Botanica*, **105**, 5-73.
- Barfod, A. S., Burholt, T. & Borchsenius, F. 2003. Contrasting pollination modes in three species of *Licuala* (Arecaceae: Coryphoideae). *Telopea*, **10**, 207-223.
- Barfod, A. S., Hagen, M. & Borchsenius, F. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). *Annals of Botany*, **108**, 1503-1516.

- Barfod, A. S. & Heatubun, C. D. 2009. Two new species of *Licuala* Thunb. (Arecaceae: Coryphoideae) from North Moluccas and Western New Guinea. *Kew Bulletin*, **64**, 553-557.
- Barfod, A. S. & Uhl, N. W. 2001. Floral development in *Aphandra* (Arecaceae). *American Journal of Botany*, **88**, 185-195.
- Barot, S., Mitja, D., Miranda, I., Meija, G. D. & Grimaldi, M. 2005. Reproductive plasticity in an Amazonian palm. *Evolutionary Ecology Research*, **7**, 1051-1065.
- Barrett, S. Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**, 99-109.
- Barrett, S. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 274-284.
- Barrett, S. 2008. Major Evolutionary Transitions in Flowering Plant Reproduction: An Overview. *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 1-5.
- Bawa, K. S. 1980. Evolution of Dioecy in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 15-39.
- Beedanagari, S. R., Dove, S. K., Wood, B. W. & Conner, P. J. 2005. A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**, 1127-1137.
- Bernal, R. & Ervik, F. 1996. Floral biology and pollination of the dioecious palm *Phytelephas seemanii* in Colombia: An adaptation to staphylinid beetles. *Biotropica*, **28**, 682-696.
- Bertin, R. 1993. Incidence of Monoecy and Dichogamy in Relation to Self-Fertilization in Angiosperms. *American Journal of Botany*, **80**.
- Bertin, R. I. & Newman, C. M. 1993. Dichogamy in Angiosperms. *The Botanical Review*, **59**, 112-152.
- Bhandari, N. N. & Venkataraman, R. 1968. Embryology of *Drymis winteri*. *J. Arnold Arb. Harv. Univ.*, **49**, 509-524.
- Bhojwani, S. S. & Bhatnagar, S. P. 1974. *The embryology of Angiosperms*. Dehli: Vikas Publishing House.
- Boegh, A. 1996. The Reproductive Phenology and Pollination ecology of Four *Calamus* (Arecaceae) Species in Thailand. *Principes*, **40**, 5-15.
- Borchsenius, F. 1997. Flowering biology of *Geonoma irena* and *G-cuneata* var. *sodiroi* (Arecaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **208**, 187-196.
- Boualem, A., Fergany, M., Fernandez, R., Troadec, C., Martin, A., Morin, H., Sari, M. A., Collin, F., Flowers, J. M., Pitrat, M., Purugganan, M. D., Dogimont, C. &

- Bendahmane, A. 2008. A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science*, **321**, 836-838.
- Brick, D. J., Brumlik, M. J., Buckley, J. T., Cao, J. X., Davies, P. C., Misra, S., Tranbarger, T. J. & Upton, C. 1995. A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize. *Febs Letters*, **377**, 475-480.
- Cacharrón, J., Saedler, H. & Theissen, G. 1999. Expression of the MADS-box genes *ZMM8* and *ZMM14* during inflorescence development of *Zea mays* discriminates between the upper and the lower floret of each spikelet. *Development Genes and Evolution*, **209**, 411–420.
- Calderon-Urrea, A. & Dellaporta, S. L. 1999. Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development*, **126**, 435-441.
- Case, A., Graham, S., Macfarlane, T. & Barrett, S. 2008. A Phylogenetic Study of Evolutionary Transitions in Sexual Systems in Australasian *Wurmbea* (Colchicaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 141-156.
- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity*, **88**, 94-101.
- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity*, **88**, 94–101.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1978. Population genetics of partial male-sterility and the evolution of monoecy and dioecy. *Heredity*, **41**, 137-153.
- Chase, M., Soltis, D., Olmstead, R., Morgan, D., Les, D., Mishler, B., Duvall, M., Price, R., Hills, H., Qiu, Y., Kron, K., Rettig, J., Conti, E., Palmer, J., Manhart, J., Sytsma, K., Michaels, H., Kress, J., Karol, K., Clark, D., Hedren, M., Gaut, B., Jansen, R., Kim, K., Wimpee, C., Smith, J., Furnier, G., Strauss, S., Xiang, Q., Plunkett, G., Soltis, P., Swensen, S., Williams, S., Gadek, P., Quinn, C., Eguiarte, L., Golenberg, E., Jr, Graham, S., Barrett, S., Dayanandan, S. & Albert, V. 1993. Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80**.
- Chatthai, M., Kaukinen, K. H., Tranbarger, T. J., Gupta, P. K. & Misra, S. 1997. The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: Regulation by ABA, osmoticum, and metal ions. *Plant Molecular Biology*, **34**, 243-254.
- Chatthai, M., Kaukinen, K. H., Tranbarger, T. J., Gupta, P. K. & Misra, S. 1997. The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: Regulation by ABA, osmoticum, and metal ions. *Plant Physiology*, **114**, 901-901.

- Chen, X. S. & Li, Q. J. 2008. Sexual Systems and Ecological Correlates in an Azonal Tropical Forests, SW China. *Biotropica*, **40**, 160-167.
- Cherif, E., Zehdi, S., Castillo, K., Chabrilange, N., Abdoukader, S., Pintaud, J. C., Santoni, S., Salhi-Hannachi, A., Glemin, S. & Aberlenc-Bertossi, F. 2013. Male-specific DNA markers provide genetic evidence of an XY chromosome system, a recombination arrest and allow the tracing of paternal lineages in date palm. *New Phytologist*, **197**, 409-415.
- Chuck, G., Meeley, R., Irish, E., Sakai, H. & Hake, S. 2007. The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1*. *Nature Genetics*, **39**, 1517-1521.
- Chung, Y.-Y., Kim, S.-R., Kang, H.-G., Noh, Y.-S., Park, M.-C., Finkel, D. & An, G. 1995. Characterization of two rice MADS box genes homologous to *GLOBOSA*. *Plant Science*, **109**, 45-56.
- Corley, R. H. V. 1976. Sex differentiation in oil palm: effects of growth regulators. *Journal of Experimental Botany*, **27**, 553-558.
- Couvreur, T. L., Forest, F. & Baker, W. J. Origin and global diversification patterns of tropical rain forests: inferences from a complete genus-level phylogeny of palms. *BMC Biol*, **9**, 44.
- Daher, A., Adam, H., Chabrilange, N., Collin, M., Mohamed, N., Tregear, J. W. & Aberlenc-Bertossi, F. Cell cycle arrest characterizes the transition from a bisexual floral bud to a unisexual flower in *Phoenix dactylifera*. *Annals of Botany*, **106**, 255-266.
- Damerval, C. & Nadot, S. 2007. Evolution of perianth and stamen characteristics with respect to floral symmetry in Ranunculales. *Annals of Botany*, **100**, 631-640.
- Darilek, G. & Tranbarger, O. 1978. Try a Wien-Bridge Network Instead of a Twin-T in Your Next Analog Filter Design - Advantages Begin with a Filter You Can Design in 5 Fast Steps. *Electronic Design*, **26**, 80-81.
- Darwin, C. R. 1877. *The different forms of flowers on plants of the same species*. London: John Murray.
- de Jong, T. J., Shmida, A. & Thuijisman, F. 2008. Sex allocation in plants and the evolution of monoecy. *Evolutionary Ecology Research*, **10**, 1087-1109.
- Dellaporta, S. L. & Calderon-Urrea, A. 1993. Sex Determination in Flowering Plants. *Plant Cell*, **5**, 1241-1251.

- DeLong, A., Claderon-Urrea, A. & Dellaporta, S. 1993. Sex determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell*, **74**, 757-768.
- Devey, D. S., Leitch, I., Rudall, P. J., Pires, J. C., Pillon, Y. & Chase, M. W. 2006. Systematics of Xanthorrhoeaceae sensu lato, with an emphasis on Bulbine. In: *Monocots: Comparative Biology and Evolution* (Ed. by Columbus, J. T., Friar, E. A., Porter, J. M., Prince, L. M. & Simpson, M. G.), pp. 345-351: RSABG.
- Diggle, P. K., Stilio, V. S. D., Gschwend, A. R., Golenberg, E. M., Moore, R. C., Russell, J. R. & Sinclair, J. P. 2011. Multiple developmental processes underlie sex differentiation in angiosperms. *Trends in Genetics*, **27**, 368-376.
- Dinis, A. M. & Mesquita, J. F. 1993. The F-actin distribution during microsporogenesis in *Magnolia soulangeana* Soul. (Magnoliaceae). *Sexual Plant Reproduction*, **6**, 57-63.
- Dorken, M. E. & Barrett, S. C. H. 2004. Sex determination and the evolution of dioecy from monoecy in *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **271**, 213-219.
- Dowe, J. L. 2001. Studies in the Genus *Livistona* (Coryphoideae: Arecaceae). Â James Cook University, Townsville.
- Dowe, J. L. 2009. A taxonomic account of *Livistona* R. Br. (Arecaceae). *The Garden Bulletin Singapore*, **60**, 185-344.
- Doyle, J. A. & Hotton, C. L. 1991. Diversification of early angiosperms pollen in a cladistic context. In: *Pollen and spores, patterns of diversification* (Ed. by Blackmore, S. & Barnes, S. H.), pp. 69-195. Oxford: Clarendon Press.
- Dransfield, J. & Moge, J. P. 1984. The flowering behaviour of *Arenga* (Palmae, Caryotoideae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **88**, 1-10.
- Dransfield, J., Uhl, N. W., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M. & Lewis, C. E. 2008. *Genera Palmarum - The evolution and classification of palms*. Royal Botanic Gardens Kew: Kew Publishing.
- Dufay, M. & Anstett, M. C. 2004. Cheating is not always punished: killer female plants and pollination by deceit in the dwarf palm *Chamaerops humilis*. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 862-868.
- Edwards, P. J., Kollmann, J. & Fleischmann, K. 2002. Life history evolution in *Lodoicea maldivica* (Arecaceae). *Nordic Journal of Botany*, **22**, 227-237.
- Endress, P. K. & Doyle, J. A. 2009. Reconstructing the ancestral angiosperm flower and its initial specializations. *Am J Bot*, **96**, 22-66.

- Erdtmann, G. 1952. *Pollen morphology and plant taxonomy-angiosperms*. Stockholm: Almqvist & Wiksell.
- Ervik, F. 1993. Pollination of the dioecious palms *Mauritia flexuosa*, *Aphandra natalia*, *Phytelephas aequatorialis* and *Phytelephas macrocarpa* in Ecuador. Department of Biological Sciences, University of Aarhus.
- Faïza Masmoudi-Allouche, A. C.-R., Walid Kriaâ, Radhia Gargouri-Bouزيد, Shri Mohan Jain and Noureddine Drira. 2009. In vitro hermaphroditism induction in date palm female flower. *Plant Cell Reports*, **28**, 1-10.
- Forward, B. S., Tranbarger, T. J. & Misra, S. 1997. Subcellular fractionation and characterization of the proteolytic activity in Douglas-fir seeds following stratification and germination. *Plant Physiology*, **114**, 1522-1522.
- Forward, B. S., Tranbarger, T. J. & Misra, S. 2001. Characterization of proteinase activity in stratified Douglas-fir seeds. *Tree Physiology*, **21**, 625-629.
- Fraser, L., Tsang, G., Datson, P., De Silva, H., Harvey, C., Gill, G., Crowhurst, R. & McNeilage, M. 2009. A gene-rich linkage map in the dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex-determining chromosomes. *BMC Genomics*, **10**, 102.
- Freeman, D. C., McArthur, E. D., Harper, K. T. & Blauer, A. C. 1981. Influence of environment on the floral sex-ratio of monoecious plants. *Evolution*, **35**, 194-197.
- Friedman, J. & Barrett, S. C. 2011. Genetic and environmental control of temporal and size-dependent sex allocation in a wind-pollinated plant. *Evolution*, **65**, 2061-2074.
- Grimes, H. D., Tranbarger, T. J. & Franceschi, V. R. 1993. Expression and Accumulation Patterns of Nitrogen-Responsive Lipoxigenase in Soybeans. *Plant Physiology*, **103**, 457-466.
- Gueye, B., Morcillo, F., Collin, M., Gargani, D., Overvoorde, P., Aberlenc-Bertossi, F., Tranbarger, T. J., Sane, D., Tregear, J. W., Borgel, A. & Verdeil, J. L. 2009. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **99**, 35-45.
- Harris, M. S. & Pannell, J. R. 2008. Roots, shoots and reproduction: sexual dimorphism in size and costs of reproductive allocation in an annual herb. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **275**, 2595-2602.
- Hartwig T, C. G., Fujioka S, Klempien A, Weizbauer R, Potluri DP, Choe S, Johal GS, Schulz B. 2011. Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*. , **108**, 19814-19819.

- Henderson, A. 2002. *Evolution and Ecology of Palms*. New York, USA: NYBG Press.
- Henderson, A., Lixiu, G. & Barfod, A. S. 2007. A new, dioecious, dimorphic species of *Licuala* (Palmae) from Hainan, China. *Systematic Botany*, **32**, 718-721.
- Kalisz, S., Ree, R. & Sargent, R. 2006. Linking floral symmetry genes to breeding system evolution. *Trends in Plant Science*, **11**, 568-573.
- Kanno, A., Seaki, H., Kameya, T., Saedler, H. & Theissen, G. 2003. Heteropic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). *Plant Molecular Biology*, **52**, 831 – 841.
- Kaukinen, K. H., Tranbarger, T. J. & Misra, S. 1995. The Molecular Characterization of 2 Cdnas Encoding Low-Molecular-Weight Heat-Shock Proteins during Douglas-Fir Seed-Germination and Stress Treatment. *Plant Physiology*, **108**, 20-20.
- Kaukinen, K. H., Tranbarger, T. J. & Misra, S. 1996. Post-germination-induced and hormonally dependent expression of low-molecular-weight heat shock protein genes in Douglas fir. *Plant Molecular Biology*, **30**, 1115-1128.
- Kholia, B. S. 2009. Gender variation in a threatened and endemic palm *Trachycarpus takil* Becc. *Current Science*, **96**, 144-148.
- Koizumi, A., Yamanaka, K., Nishihara, K., Kazama, Y., Abe, T. & Kawano, S. 2010. Two separate pathways including SICLV1, SISTM and SICUC that control carpel development in a bisexual mutant of *Silene latifolia*. *Plant and Cell Physiology*, **51**, 282-293.
- Korpelainen, H. 1998. Labile sex expression in plants. *Biological Reviews*, **73**, 157-180.
- Kuchmeister, H., SilberbauerGottsberger, I. & Gottsberger, G. 1997. Flowering, pollination, nectar standing crop, and nectaries of *Euterpe precatoria* (Arecaceae), an Amazonian rain forest palm. *Plant Systematics and Evolution*, **206**, 71-97.
- Lebel-Hardenack, S., Hauser, E., Law, T. F., Schmid, J. & Grant, S. R. 2002. Mapping of sex determination loci on the white campion (*Silene latifolia*) Y chromosome using amplified fragment length polymorphism. *Genetics*, **160**, 717-725.
- Lin, H. C., Morcillo, F., Dussert, S., Tranchant-Dubreuil, C., Tregear, J. W. & Tranbarger, T. J. 2009. Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot *Elaeis guineensis*: evidence for conserved gene functions in early development. *Plant Molecular Biology*, **70**, 173-192.
- Listabarth, C. 2001. Palm pollination by bees, beetles and flies: why pollinator taxonomy does not matter. The case of *Hyospathe elegans* (Arecaceae, Arecoideae, Areceae, Euterpeinae). *Plant Species Biology*, **16**, 165-181.



- Lloyd, D. 1972. Breeding Systems in *Cotula* L. (Compositae, Anthemideae). I. The Array of Monoclinous and Diclinous Systems. *New Phytologist*, **71**.
- Lloyd, D. 1975. Breeding Systems in *Cotula*. III. Dioecious Populations. *New Phytologist*, **74**.
- Lloyd, D. 1980. The Distributions of Gender in Four Angiosperm Species Illustrating Two Evolutionary Pathways to Dioecy. *Evolution*, **34**.
- Loo, A. H. B., Dransfield, J., Chase, M. W. & Baker, W. J. 2006. Low-copy nuclear DNA, phylogeny and the evolution of dichogamy in the betel nut palms and their relatives (Arecinae; Areaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**, 598-618.
- Maddison, W. P. & Maddison, D. R. 2006. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis.
- Malcomber, S. T. & Kellogg, E. A. 2006. Evolution of unisexual flowers in grasses (Poaceae) and the putative sex-determination gene, *TASSELSEED2* (*TS2*). *New Phytologist*, **170**, 885-899.
- Mantelin, S., Desbrosses, G., Larcher, M., Tranbarger, T. J., Cleyet-Marel, J. C. & Touraine, B. 2006. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting Phyllobacterium sp. *Planta*, **223**, 591-603.
- Martin, A., Troadec, C., Boualem, A., Rajab, M., Fernandez, R., Morin, H., Pitrat, M., Dogimont, C. & Bendahmane, A. 2009. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature*, **461**, 1135-8113.
- Masmoudi-Allouche, F., Chaari-Rkhis, A., Kriaa, W., Gargouri-Bouزيد, R., Jain, S. M. & Drira, N. 2009. In vitro hermaphroditism induction in date palm female flower. *Plant Cell Reports*, **28**, 1-10.
- Matzkanin, G. A., Fountain, L. S. & Tranbarger, O. 1984. Nondestructive Evaluation of Infrastructure Conditions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **431**, 268-303.
- Nadot, S., Sannier, J., Barfod, A. S. & Baker, W. J. Evolution of the palm androecium as revealed by character mapping on a supertree. In: *Flowers on the tree of life* (Ed. by L, W. L. a. R. d. C.), pp. 156-180: Cambridge University Press.
- Nazoa, P., Vidmar, J. J., Tranbarger, T. J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P., Zhuo, D. G., Glass, A. D. M. & Touraine, B. 2003. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Molecular Biology*, **52**, 689-703.
- Ochiai T, N. T., Mashiko Y, Fukuda T, Yokoyama J, Kanno A. 2004. The differentiation of sepal and petal morphologies in Commelinaceae. *Gene*, **343**, 253–262.

- Ortega-Chavez, N. & Stauffer, F. W. Ontogeny and structure of the acervulate partial inflorescence in *Hyophorbe lagenicaulis* (Arecaceae; Arecoideae). *Annals of Botany*, **108**, 1517-1527.
- Oyama, K. & Mendoza, A. 1990. Effects of defoliation on growth, reproduction, and survival of a neotropical palm, *Chamaedorea tepejilote*. *Biotropica*, **22**, 119-123.
- Oyama, R., Volz, S. & Renner, S. 2009. A sex-linked SCAR marker in *Bryonia dioica* (Cucurbitaceae), a dioecious species with XY sex-determination and homomorphic sex chromosomes. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 214-224.
- Pannell, J. R., Dorken, M. E., Pujol, B. & Berjano, R. 2008. Gender variation and transitions between sexual systems in *Mercurialis annua* (Euphorbiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 129-139.
- Pannell, J. R. & Verdú, M. 2006. The evolution of gender specialization from dimorphic hermaphroditism: paths from heterodichogamy to gynodioecy and androdioecy. *Evolution*, **60**, 660-673.
- Park, J. H., Ishikawa, Y., Yoshida, R., Kanno, A. & Kameya, T. 2003. Expression of *AODEF*, a B-functional MADS-box gene, in stamens and inner tepals of the dioecious species *Asparagus officinalis* L. *Plant Molecular Biology*, **51**, 867-875.
- Parkinson, S. E., Gross, S. M. & Hollick, J. B. 2007. Maize sex determination and abaxial leaf fates are canalized by a factor that maintains repressed epigenetic states. *Developmental Biology*, **308**, 462-473.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E. & Yanofsky, M. F. 2000. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, **405**, 200-203.
- Peters, H. A., Pauw, A., Silman, M. R. & Terborgh, J. W. 2004. Falling palm fronds structure amazonian rainforest sapling communities. *Proc Biol Sci*, **271 Suppl 5**, S367-9.
- Remizowa, M. V., Sokoloff, D. D. & Rudall, P. J. 2010. Evolutionary History of the Monocot Flower. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **97**, 617-645.
- Renner, S. S. & Ricklefs, R. E. 1995. Dioecy and its correlations in the flowering plants. *American Journal of Botany*, **82**, 596-606.
- Renner, S. S. & Won, H. S. 2001. Repeated evolution of dioecy from monoecy in Siparunaceae (Laurales). *Systematic Biology*, **50**, 700-712.
- Ronce de Craene, L. P. 2010. *Floral diagrams, an aid to understanding flower morphology and evolution*. Cambridge University Press.
- Roongsattham, P., Morcillo, F., Jantasuriyarat, C., Pizot, M., Moussu, S., Jayaweera, D., Collin, M., Gonzalez-Carranza, Z. H., Amblard, P., Tregear, J. W., Tragoonrung, S.,

- Verdeil, J. L. & Tranbarger, T. J. 2012. Temporal and spatial expression of polygalacturonase gene family members reveals divergent regulation during fleshy fruit ripening and abscission in the monocot species oil palm. *Bmc Plant Biology*, **12**.
- Savolainen, V., Anstett, M. C., Lexer, C., Hutton, I., Clarkson, J. J., Norup, M. V., Powell, M. P., Springate, D., Salamin, N. & Baker, W. J. 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature*, **441**, 210-213.
- Scariot, A. O., Lleras, E. & Hay, J. D. 1991. Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. *Biotropica*, **23**, 12-22.
- Schoenberg, F. P. & Tranbarger, K. E. 2008. Description of earthquake aftershock sequences using prototype point patterns. *Environmetrics*, **19**, 271-286.
- Skov, F. & Balslev, H. 1989. A revision of *Hyospathe* (Arecaceae). *Nordic Journal of Botany*, **9**, 189-202.
- Stevens, P. F. 2001. *Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008*.
- Tanurdzic, M. & Banks, J. A. 2004. Sex-Determining Mechanisms in Land Plants. *The Plant Cell*, **16**, S61-S71.
- Theissen, G., Kim, J. T. & Saedler, H. 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box gene families in the morphological evolution of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, **43**, 484-516.
- Tomlinson, P. B. 1982. *Á Anatomy of the monocotyledons. VII. Helobiae (Alismatidae) (including the seagrasses)*. Oxford: Clarendon Press.
- Tomlinson, P. B. 2006. The uniqueness of palms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151**, 5-14.
- Tranbarger, O. 1983. A High-Resolution Temperature Logging Probe for Salt Brine Cavities. *Geophysics*, **48**, 458-458.
- Tranbarger, O. 1985. Fm Radar for Inspecting Brick and Concrete Tunnels. *Materials Evaluation*, **43**, 1254-&.
- Tranbarger, R. E. 1980. Current Perspectives in Nursing Management - Marriner,A. *American Journal of Nursing*, **80**, 74-74.
- Tranbarger, R. E. 1980. Leadership in Nursing - Beyers,M. *American Journal of Nursing*, **80**, 74-74.
- Tranbarger, R. E. 1980. Maintaining Cost-Effectiveness - Schmied,E. *American Journal of Nursing*, **80**, 74-74.
- Tranbarger, R. E. 1980. Mcgraw-Hill Handbook of Clinical Nursing - Armstrong,Me, Dickason,Ej, Howe,J, Jones,Da, Snider,Mj. *American Journal of Nursing*, **80**, 74-74.

- Tranbarger, R. E. 1980. Understanding Hospital Financial Management - Herkimer, Ag. *American Journal of Nursing*, **80**, 74-74.
- Tranbarger, R. E. 1994. More on Men. *Nursing Outlook*, **42**, 246-246.
- Tranbarger, T. J., Al-Ghazi, Y., Muller, B., de la Serve, B. T., Doumas, P. & Touraine, B. 2003. A macro-array-based screening approach to identify transcriptional factors involved in the nitrogen-related root plasticity response of *Arabidopsis thaliana*. *Agronomie*, **23**, 519-528.
- Tranbarger, T. J., Al-Ghazi, Y., Muller, B., De la Serve, B. T., Doumas, P. & Touraine, B. 2003. Transcription factor genes with expression correlated to nitrate-related root plasticity of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment*, **26**, 459-469.
- Tranbarger, T. J., Dussert, S., Joet, T., Argout, X., Summo, M., Champion, A., Cros, D., Omore, A., Nouy, B. & Morcillo, F. 2011. Regulatory Mechanisms Underlying Oil Palm Fruit Mesocarp Maturation, Ripening, and Functional Specialization in Lipid and Carotenoid Metabolism. *Plant Physiology*, **156**, 564-584.
- Tranbarger, T. J., Forward, B. S. & Misra, S. 2000. Regulation of NADPH-cytochrome P450 reductase expressed during Douglas-fir germination and seedling development. *Plant Molecular Biology*, **44**, 141-153.
- Tranbarger, T. J., Franceschi, V. R., Hildebrand, D. F. & Grimes, H. D. 1991. The Soybean 94-Kilodalton Vegetative Storage Protein Is a Lipoxygenase That Is Localized in Paravenous Mesophyll Cell Vacuoles. *Plant Cell*, **3**, 973-987.
- Tranbarger, T. J., Kluabmongkol, W., Sangsakru, D., Morcillo, F., Tregear, J. W., Tragoonrung, S. & Billotte, N. 2012. SSR markers in transcripts of genes linked to post-transcriptional and transcriptional regulatory functions during vegetative and reproductive development of *Elaeis guineensis*. *Bmc Plant Biology*, **12**.
- Tranbarger, T. J. & Misra, S. 1995. The molecular characterization of a set of cDNAs differentially expressed during Douglas-fir germination and early seedling development. *Physiologia Plantarum*, **95**, 456-464.
- Tranbarger, T. J. & Misra, S. 1996. The isolation, regulation and expression of a cDNA encoding a NADPH-cytochrome P-450 reductase from Douglas-fir seedlings. *Plant Physiology*, **111**, 60-60.
- Tranbarger, T. J. & Misra, S. 1996. Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotzain) from Douglas fir. *Gene*, **172**, 221-226.

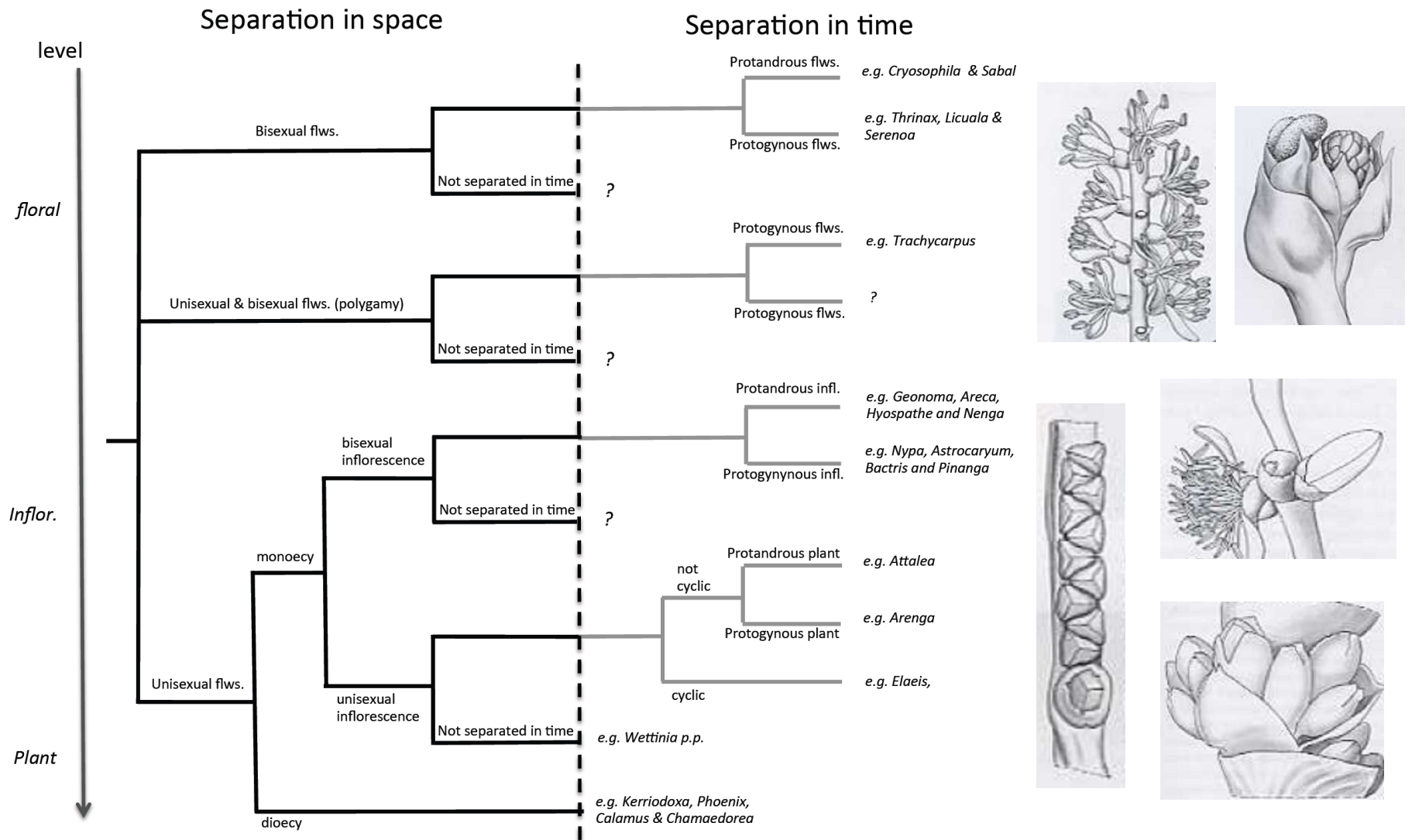
- Uhl, N. W. & Moore, H. E. 1977. Centrifugal stamen initiation in Phytelephantoid palms. *American Journal of Botany*, **64**, 1152-1161.
- Uhl, N. W. & Moore, H. E. 1978. Structure of acervulus, flower cluster of Chamaedoreoid palms. *American Journal of Botany*, **65**, 197-204.
- Vamosi, J., Otto, S. & Barrett, S. 2003. Phylogenetic analysis of the ecological correlates of dioecy in angiosperms. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 1006–1018.
- Van Heel, W. A., Breure, C. J. & Menendez, T. 1987. The early development of inflorescences and flowers of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seen through the scanning electron microscope. *Blumea*, **32**, 67-78.
- Varshney, R., Nayak, S., May, G. & Jackson, S. 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*, **27** 522-530.
- Verdeil, J. L., Alemanno, L., Niemenak, N. & Tranbarger, T. J. 2007. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science*, **12**, 245-252.
- Wang, J., Na, J., Yu, Q., Gschwend, A., Han, J., Zeng, F., Aryal, R., Vanburen, R., Murray, J., Zhang, W., Navajas-Pérez, R., Feltus, F., Lemke, C., Tong, E., Chen, C., Wai, C. M., Singh, R., Wang, M., Min, X., Alam, M., Charlesworth, D., Moore, P., Jiang, J., Paterson, A. & Ming, R. 2012. Sequencing papaya X and Yh chromosomes reveals molecular basis of incipient sex chromosome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, 13710-13715.
- Weiblen, G. D., Oyama, R. K. & Donoghue, M. J. 2000. Phylogenetic Analysis of Dioecy in Monocotyledons. *The American naturalist*, **155**, 46-58.
- Zaitchik, B. F., LeRoux, L. G. & Kellogg, E. A. 2000. Development of male flowers in *Zizania aquatica* (North American wild-rice; Gramineae). *International Journal of Plant Sciences*, **161**, 345-351.

## Tables and Figures

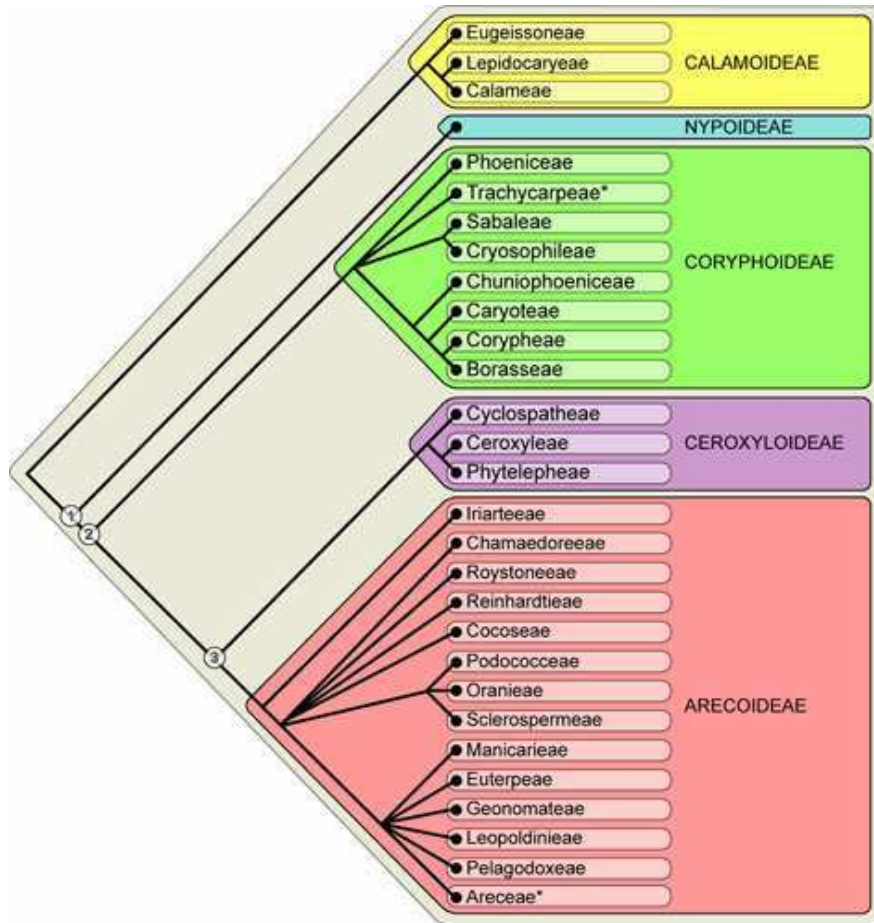
**Table 1** – Genus and species-level survey of sexual system in palms. The first column indicates the total number of genera (in bold) and species (in italics). The other columns show the occurrences of the four designated types of sexual system. Subfamilies are assigned according to (Dransfield et al., 2008). Within the Coryphoideae some genera are polymorphic; the different sexual systems are taken into account in the percentages shown in brackets.

	Number	Monoecy %	Dioecy %	Hermaphroditism %	Polygamy %
<b>Arecaceae</b>	<b>183</b>	<b>61%</b>	<b>22%</b>	<b>16%</b>	<b>5%</b>
	<i>ca 2500</i>	52%	30%	17%	1%
Calamoideae	<b>21</b>	<b>&lt;10%</b>	<b>67%</b>	<b>14%</b>	<b>&lt;10%</b>
	<i>645</i>	4%	87%	7%	2%
Nypoideae	<b>1</b>	<b>100%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>
	<i>1</i>	100%	0%	0%	0%
Coryphoideae	<b>46</b>	<b>&lt;5% (&lt;7%)</b>	<b>24% (37%)</b>	<b>50% (56%)</b>	<b>9% (13%)</b>
	<i>503</i>	10%	13%	76%	<2%
Ceroxyloideae	<b>8</b>	<b>0%</b>	<b>87%</b>	<b>0%</b>	<b>13%</b>
	<i>47</i>	0%	91%	0%	9%
Arecoideae	<b>107</b>	<b>98%</b>	<b>2%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>
	<i>1376</i>	92%	8%	0%	0%

**Fig 1** Overview of sexual expression in palms ; illustration of the diversity in flowers distribution, top to bottom, left to right *Sabal palmetto* (solitary hermaphroditic flowers), *Nypa fructicans* (heads of pistillate and staminate flowers), *Synechanthus warscewiczianus* (monoecious flowers in acervulus), *Ponapea ledermanniana* (monoecious flowers in triads) and *Oncocalamus macrospathus* (monoecious flowers in cluster); Drawings from Dransfield et al. (2008).



**Fig 2** Summary tree showing relationships among subfamilies and tribes of the Arecaceae (Dransfiel et al. 2008)

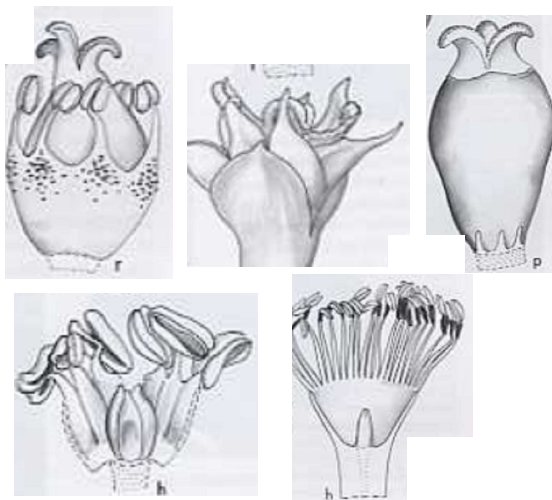




**Fig 3** Palm flower ground plan; floral diagrams of two different species (modified from Ronce de Craene 2010(Ronce de Craene, 2010)). (A) *Corypha* sp. (Coryphoideae) hermaphroditic flower. (B) *Ptychosperma gracile* (Areceae) unisexual flowers, female on the left and male on the right.

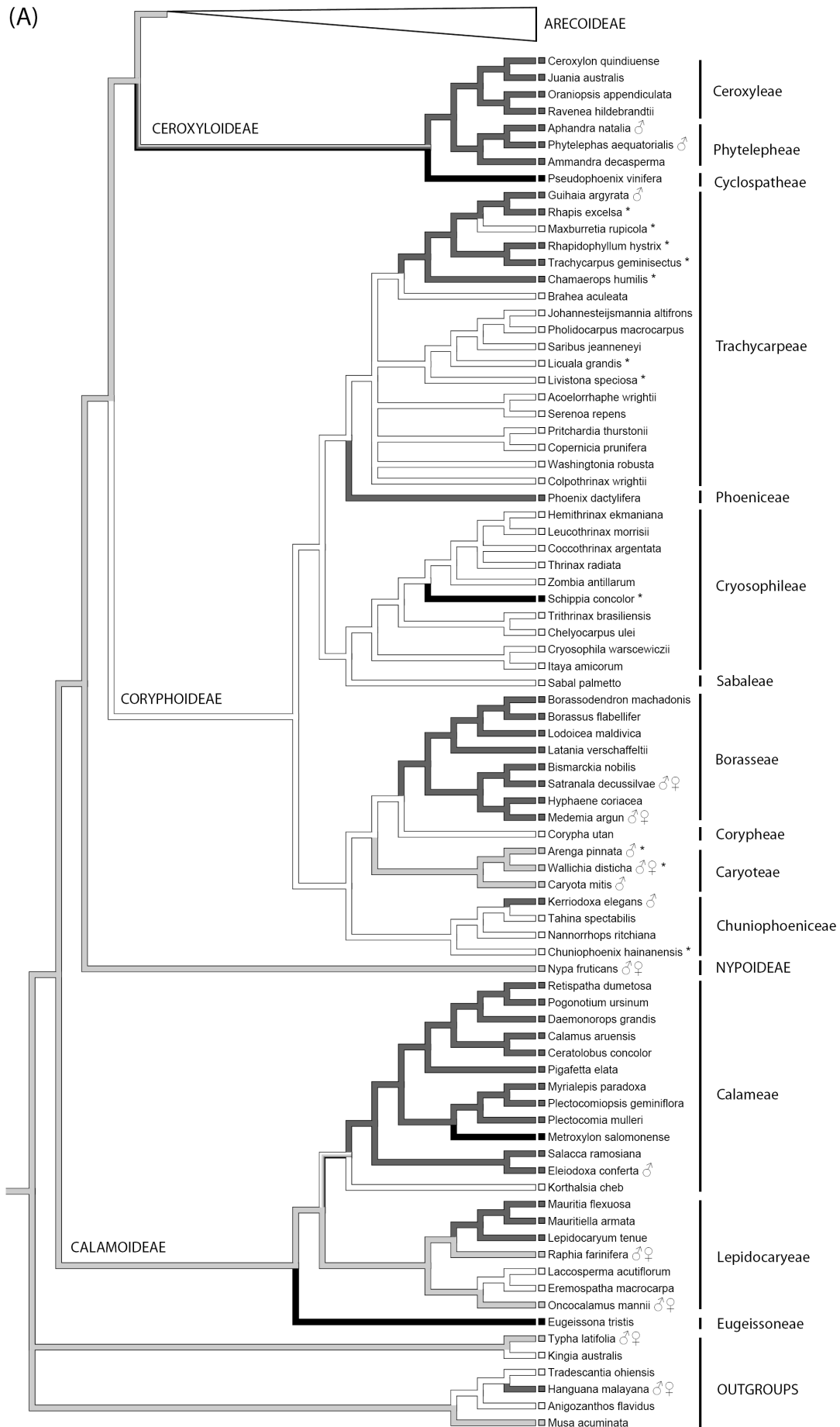


**Fig 4** Non-functional sexual organs in palms; illustration of the morphological diversity. (A) staminodes, left to right stamen like (*Acrocomia* sp.), slightly modified (*Pholidostachys pulchra*) and highly modified (*Actinorhytis calapparia*); (B) pistillode, left slightly reduced (*Elaeis oleifera*), right highly reduced (*Asterogyne spicata*).

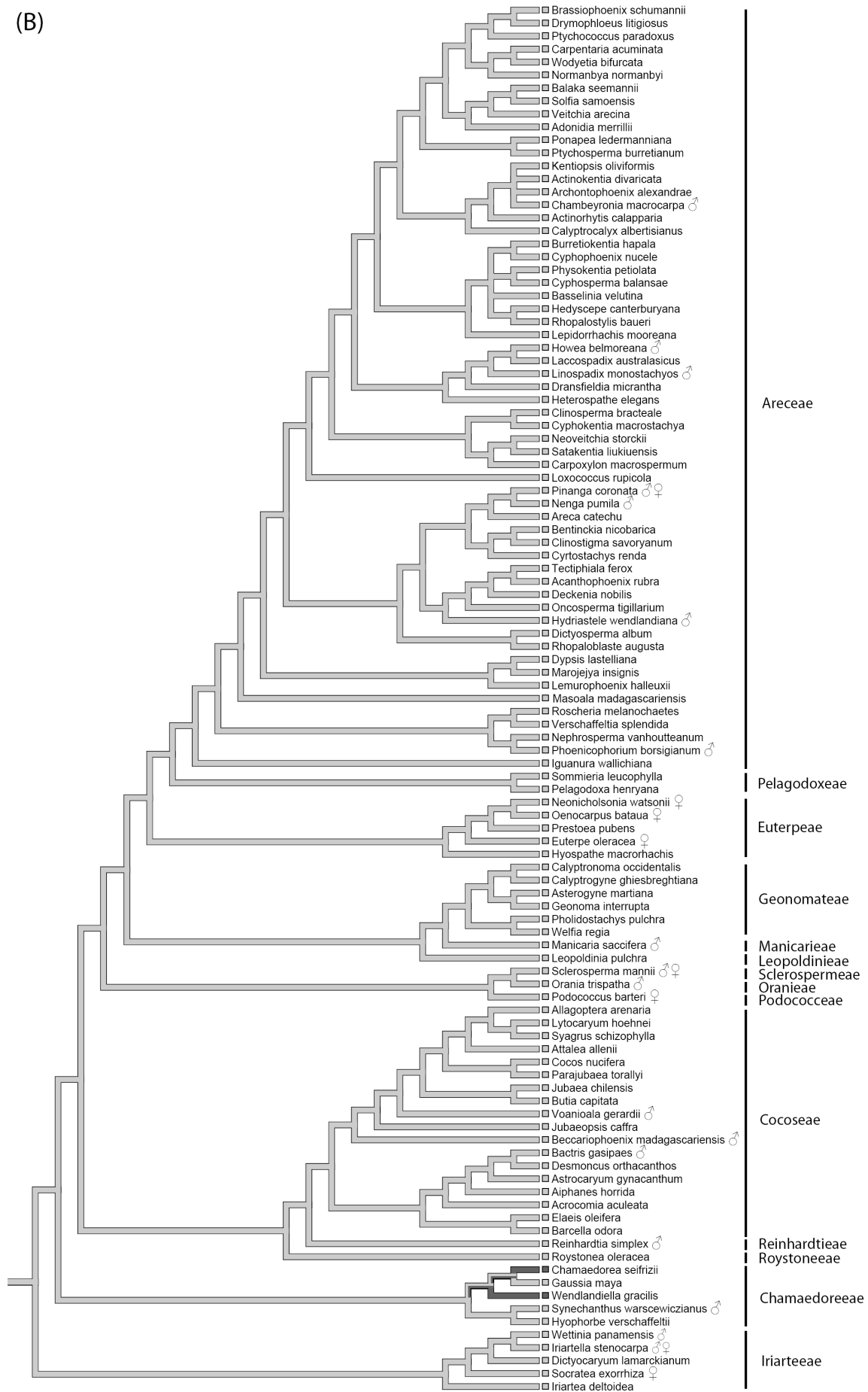


**Fig 5** Supertree from the analysis of Baker et al. (2009) showing the evolution of sexual system in palms optimized using Maximum Parsimony. (A) all subfamilies except Arecoideae. (B) Arecoideae (continuation of (A)). Boxes at the tip of branches are coloured according to the actual character state: White = hermaphroditism, Light Grey = monoecy, Dark Grey = dioecy, Black = andromonoecy. Branches colours correspond to the inferred ancestral state. Several colours on the same branch denote ambiguity in the ancestral state. ♂ indicates that a pistillode is lacking in this species and ♀ that staminodes are lacking. The sexual system of each species used in the optimization is typical of the sexual system of its genus; exceptions (polymorphism within the genera and/or within the species) are highlighted by stars. Phylogenetic relationships and tribe names are as indicated by Baker et al. (2009).

(A)



(B)









**Chapitre 2 :**  
**Evolution du nombre d'étamines**  
**chez les palmiers**





## Contexte et objectifs de l'étude

Les étamines sont les organes de la fleur portant les anthères, lieu de production des gamétophytes mâles : les grains de pollen. Le nombre de ces organes est très variable à l'échelle des angiospermes, allant de un à plusieurs milliers chez certains groupes. Lorsque les espèces présentent un nombre élevé d'étamines, elles sont qualifiées de « polyandres ». Au contraire lorsque le nombre est plus faible, les espèces sont qualifiées d'« oligandres ». La limite entre oligandrie et polyandrie est parfois délicate à déterminer. Elle peut ainsi varier selon les groupes taxonomiques, suivant la mérosité et les mécanismes de développement. Ainsi certaines eudicotylédones présentant une mérosité de cinq (le nombre de pièces du périanthe), la limite entre oligandrie et polyandrie est fixée à dix (c'est-à-dire plus de fois le nombre de pièces du périanthe ; Jabbour et al. 2008). Les fleurs présentant une phyllotaxie spiralée possèdent souvent un grand nombre d'étamines et sont donc considérées comme polyandres (Ronse de Craene et Smet 1998).

Les mécanismes de développement permettant la mise en place des nombreuses étamines chez les espèces polyandres ont été étudiés dans différents groupes. Ces études ont révélé que l'insertion des étamines nombreuses était permise par l'expansion du réceptacle floral ou par la diminution du diamètre de filets (Endress 2011). En revanche l'action de la sélection et les bases du contrôle génétique sont encore mal connues.

Les palmiers constituent un groupe particulièrement intéressant pour l'étude du nombre d'étamines puisque celui-ci varie de un à mille au sein de la famille (Fig. 9). Les fleurs de palmiers sont généralement petites, souvent de forme arrondie lorsqu'elles sont en boutons. Il existe néanmoins une diversité de formes, de tailles et de couleurs selon les groupes. Les pièces du périanthe et du gynécée varient peu en nombre. Le périanthe est trimère : trois sépales et trois pétales. Chez certaines espèces, leur morphologie ne permet pas de les distinguer. Ils sont alors considérés comme des tépales. Le gynécée est également trimère chez la majorité des espèces. Chaque carpelle contient un ovule. Dans certains cas, seul un ovule sur les trois se développe. Chez certaines espèces, des espaces entre les carpelles peuvent abriter des nectaires (Schmid 1983). Au contraire le nombre d'étamines est extrêmement variable et cela dans la majorité des sous-familles.

Dans ce groupe la limite entre l'oligandrie et la polyandrie a également été déterminée en fonction de la mérosité. Les espèces sont considérées comme polyandres lorsqu'elles

possèdent plus de six étamines (c'est-à-dire plus de deux fois le nombre de pièces du périanthe). Il a été montré que l'oligandrie à six étamines constitue l'état ancestral du caractère et qu'à partir de celui-ci de nombreuses transitions vers la polyandrie ont eu lieu durant l'histoire évolutive de la famille (Nadot et al. 2011). En revanche l'ampleur des transitions entre les taxons oligandres et polyandres (pouvant posséder de sept à mille étamines) et entre les taxons polyandres est encore mal connue.



**Fig. 9 :** Illustration de la diversité morphologique de l'androcée des palmiers et notamment du nombre d'étamines ; de gauche à droite et de bas en haut : *Aphandra natalia*, *Dictyosperma album*, *Arenga brevipes*, *Hedyscepe canterburyana*, *Calamus spectatissimus*, *Orania ravaka*, *Lodoicea maldivica*, *Ptychosperma sp.*, *Nypa fruticans*, *Veitchia sp.*, *Welfia regia*, *Dypsis baronii*, *Aiphanes chiribogensis*, *Heterospathe delicatula*, *Ptychococcus paradoxus*, *Pinanga aristata*, *Burretiokentia grandiflora*, *Phytelephas macrocarpa*, *Bismarckia sp.*, *Jubaeopsis caffra*, *Wodyetia sp.*, *Daemonorops verticillaris*, *Caryota rumphiana*, *Eugeissona utilis* (photographies Sophie Nadot ; Julie Sannier et Palmweb)

La polyandrie a été étudiée chez les palmiers en ce qui concerne le développement (notamment Uhl & Moore 1980) mais les éventuelles pressions de sélection ayant pu influencer sur ce caractère ainsi que le contrôle génétique du nombre des organes sont encore inconnus. Il a été suggéré que les espèces présentant un grand nombre d'étamines pourraient être pollinisées par les insectes, notamment des coléoptères et des abeilles (Uhl et Moore 1977). L'augmentation du nombre d'étamines dans de nombreux groupes de palmiers pourrait donc constituer une adaptation aux pollinisateurs. Les étamines nombreuses seraient ainsi plus attractives pour les pollinisateurs fournissant plus de ressources. Cependant cette hypothèse reste à tester. Nous proposons notamment d'étudier si l'augmentation du nombre d'étamines est corrélée avec une augmentation de la production de grains de pollen.

Cette étude constitue un article de recherche dont les objectifs sont : (1) d'étudier l'évolution du nombre d'étamines à l'échelle de la famille des palmiers, en se focalisant sur les transitions vers la polyandrie et entre les taxons polyandres ; (2) de tester un lien potentiel entre le nombre d'étamines et la production de pollen.

## **Synthèse des résultats**

Le caractère « nombre d'étamines » a été codé sous la forme d'un caractère discret son évolution a été étudié en se basant sur la phylogénie de l'ensemble des genres de palmiers. L'état ancestral du caractère est « six étamines » et la détermination de celui-ci est confortée par le signal phylogénétique fort présent dans le caractère. A partir de cet état ancestral, de nombreuses transitions vers des nombres élevés d'étamines ont eu lieu. La reconstruction de l'évolution du caractère montre que l'augmentation du nombre d'étamines est rarement progressive. Certaines transitions vers une forte polyandrie se font directement à partir d'un état oligandre et impliquent probablement des changements importants dans les processus de développement des étamines.

La production de pollen, estimée chez 82 individus de palmiers, représentant 82 espèces et 59 genres, se révèle très variable. Elle varie entre une centaine de grains et plus de deux millions de grains par fleur. Il existe une corrélation entre le nombre d'étamines et la production de pollen, mais cette relation n'est pas linéaire. Tous les individus appartenant aux Coryphoideae testés dans cette étude possèdent six étamines. Aucune corrélation ne peut donc être identifiée dans ce groupe. Cependant on remarque que même si le nombre d'étamines est constant, la

production de pollen varie. La variation dans la production de pollen est plus grande chez les Calamoideae que chez les Arecoideae qui pourtant présentent une plus grande variation dans le nombre d'étamines. Dans les deux cas, néanmoins la production de pollen a tendance à être plus importante quand le nombre d'étamines augmente. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour comprendre si les augmentations répétées du nombre d'étamines chez les palmiers sont le résultat de la sélection ou d'un relâchement de contraintes phylogénétiques. Dans le premier cas la polyandrie constituerait une convergence résultant d'une adaptation à un environnement similaire (par exemple un type de pollinisateur). Des expériences dans des populations naturelles permettraient d'estimer si des étamines nombreuses associées ou non à une production de pollen élevée, confèrent un avantage sélectif aux individus. Nous proposons notamment de comparer la fitness d'individus présentant des phénotypes différents au niveau du nombre d'étamines et de la production de pollen. Notre étude a mis en évidence des groupes taxonomiques pour lesquels cette variabilité est naturelle et qui constituent donc de bons groupes d'étude. Pour le nombre d'étamines, la variabilité pourrait être accentuée expérimentalement en enlevant des étamines. Les fleurs de palmiers étant regroupées en grande inflorescences, il est possible que l'unité de pollinisation ne soit pas la fleur mais l'inflorescence. L'évolution du nombre d'étamines et de la production de pollen pourrait être étudiée également à l'échelle de l'inflorescence.

Cet article est encore une ébauche. Pour cette étude j'ai conçu et mis en place un protocole d'extraction du pollen adapté aux fleurs de palmiers et à notre problématique. Mon choix s'est porté sur une extraction mécanique et non pas chimique pour limiter les pertes de pollen (les protocoles sont présentés en Annexe 2 du manuscrit). Cette technique présente l'avantage de ne pas être toxique pour l'expérimentateur. Les expériences ont été réalisées en partie avec l'aide des stagiaires M1 et M2, Stéphanie Vallée, Vanessa Vilard et Gérard Imani.

## **Article 2**



# Variation of stamen number in palms: evolutionary history and glimpse into pollen production

Elodie Alapetite<sup>1</sup>, Gérard Imani<sup>1</sup>, Stéphanie Vallée<sup>1</sup>, Vanessa Vilard<sup>1</sup>, Hervé Sauquet<sup>1</sup>, Anders Barfod<sup>2</sup>, Sophie Nadot<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Univ Paris-Sud, Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, UMR 9079, Orsay, F-91405, France

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Aarhus University, Ny Munkegade 114, DK-8000 Aarhus C, Denmark

<sup>3</sup>Author for correspondence: [sophie.nadot@u-psud.fr](mailto:sophie.nadot@u-psud.fr)

## Abstract

The androecium of palms (Arecaceae) exhibits a large diversity in stamen number. From an ancestral state with 6 stamens, both reduction and increase have occurred. Eighty-three genera belonging to all subfamilies (except Nypoideae) include species displaying more than 6 stamens (polyandry). The number of stamens in polyandrous species ranges from dozens to hundreds units. Understanding this huge variation in stamen number has implications for our knowledge of the evolution of flower and pollination mechanisms in palms.

In this study we surveyed the literature to obtain data on stamen number for the 183 genera of the family, using an exemplar approach. We also observed flowers from living and spirit collection. We further used these data to optimize the character on the generic-level phylogeny, focusing on transitions towards polyandry and between polyandrous species. In order to initiate a research on a possible functional significance of increase in stamen number, we investigate the relationship between stamen number and pollen production. We extracted



the total pollen content from flowers of 82 species, representative of the various palm tribes and compared it to stamen number.

A strong phylogenetic signal was found in stamen number allowing us to make optimization of this character on the generic-level palm supertree. Many transitions towards polyandry occurred from an ancestral state of six stamens during the evolutionary history of the family. Stamen number seems to have increase in abrupt and repeated way. Transitions between six stamens and a high number of stamens are frequent. Pollen production in palms is highly variable and ranges from hundreds to millions grains. We showed that a relationship between stamen number and pollen production exist in our sampling. There is a tendency towards higher pollen production when the number of stamen increases in Coryphoideae and Arecoideae. However it is still difficult to understand the evolutionary processes underlying the evolution of these two characters. Based on our results, we proposed some improvements of the experiment and some hypotheses that could be further tested to investigate evolutionary history of stamen number in palms.

## Introduction

Stamens are floral organs that bear fertile pollen-producing structures, the anthers. These structures are analogous in flowering plants to male sex organs in animals. They play a fundamental role in sexual reproduction and were thus considered by botanists as an important character in classifying plants (e.g. Linné 1753). The set of stamens (androecium) is one of the four categories of the largely conserved ground plan of angiosperm flower (sepals, petals, stamens and carpels, from outside to inside). It exhibits a large diversity in organ number, arrangement, shape and synorganization (D’Arcy 1996; Soltis et al. 2009; Endress 2011). The number of stamens increased and decreased repeatedly during the evolutionary history of the flowering plants (reviewed in Endress 2011). Flowers bearing many stamens are traditionally called “polyandrous”, vs. “oligandrous” when they have few stamens (Ronse Decraene and Smets 1998). The ancestral stamen number for angiosperms is controversial and strongly dependent to the accuracy of phylogenetic reconstruction among basal angiosperms (Ronse Decraene and Smets 1998; Endress and Doyle 2009; Goremykin et al. 2013). Stamen number is highly variable in most basal lineages. For example, it varies from one stamen in Hydatellaceae (Williamson and Schneider 1993), to 12-21 in Amborellaceae (Endress and Igersheim 2000) and up to 200 in Nympheaceae (Schneider and Williamson 1993). In magnoliids, stamen number varies from very low values in Piperaceae (2-3; Endress 2011) to huge values in Monimiaceae (around 1800; Lorence 1985). Most monocot flowers have six stamens, however increases occurred in Alismatales (up to more than 30; Salisbury 1926), Pandanales (up to many hundreds; Huynh 1991), Poales (up to 120; Soderstrom and Londono 1988) and Arecales (up to more than 900; Dransfield et al. 2008). There is also a wide range of variation in the eudicots. In Ranunculales (basal eudicots), numerous stamens are found in Papaveraceae, Menispermaceae, Berberidaceae and Ranunculaceae with up to more than 2000 in the latter family (Tamura 1995; Damerval and Nadot 2007). Many rosids have high

numbers of stamens, particularly in Malpighiales (up to 750; Prance 1976) and Malvales (up to 1000; Janka et al. 2008). In asterids, flowers with a huge number of stamens are found in Caryophyllales (up to 4000 in Cactaceae, Barthlott and Hunt 1993) and Ericales (up to 1200; Prance and Mori 2004).

The variation in stamen number has been thoroughly studied from a morphological and developmental point of view (Ronse Decraene and Smets 1987; Ronse Decraene and Smets 1998), but little is known about the potential functional significance of such variation. Polyandry characterizes the so-called brush flowers which are pollinated by large animals (sphingids, birds, bats; Endress 2011) and the beetle-pollinated systems (Bernhardt 2000). Pollen and stamen tissues are a potential source of food for insects and were probably critical rewards in the development of the plant-pollinator mutualism, like nectar (Barrera and Nobel 2004). Crepet and Nixon (1996) suggested that increase in stamen number could be the prelude to the transformation of stamens into attractive or reward-providing structures. Supernumerary stamens could provide attractants and rewards for pollinators that consume flower tissues and pollen. They can also represent a protection against herbivores. This strategy could have promoted reproduction under these conditions (pollen-eating pollinators and/or herbivores attacks) and thus could have been selected many times in angiosperms.

The palms (Arecaceae) are an emblematic family of monocotyledonous species that play a crucial ecological role in species-rich tropical ecosystems, mainly rain forests (Peters et al. 2004). They comprise 183 genera and around 2400 species distributed worldwide in tropical and subtropical areas. These genera are divided into five subfamilies, Calamoideae, Nypoideae, Coryphoideae, Ceroxyloideae and Arecoideae (Dransfield et al. 2008). Palm flowers are usually small (generally less than 1 cm across) and have the typical trimerous ground plan of most monocot flowers, with three sepals, three petals and one or three carpels

(Dransfield et al., 2008). The androecium however exhibits a large diversity in stamen number, among genera. From an ancestral state with six stamens, both reduction and increase have occurred (Nadot et al. 2011). Ten of the 183 genera include species in which the androecium is reduced to three stamens. Flowers with a single stamen have even been observed in *Dypsis lantzeana* (Rudall et al. 2003). Eighty-three genera belonging to all subfamilies (except Nypoideae) include species displaying more than 6 stamens. The number of stamens ranges from seven, eight and nine to many (Dransfield et al. 2008). The largest number of stamens is found in the tribe Phytelephea where almost a thousand stamens have been recorded in *Phytelephas* (Barfod 1991). If the transitions towards polyandry from the ancestral state with six stamens are now identified among genera, the patterns of transitions within polyandrous genera are still almost unknown. Like in many other angiosperm groups, the link between stamen number and pollination is still poorly understood. A relationship between numerous stamens and pollination by beetles and bees in palms has been showed in some species (e.g. *Ptychosperma*; Uhl and Moore 1977b). This suggests that the repeated increase in stamen number throughout the family could be the result of a selection for an increased pollen production, used as reward for pollinators. However the relationship between stamen number and pollen production in palms has never been tested so far.

The aims of our study were (1) to examine the evolution of stamen number within the palm family at the species level, focusing on transitions from oligandry towards polyandry and among polyandrous species, and (2) to investigate the link between stamen number and pollen production in palms. We conducted a survey of the diversity of stamen numbers in the family, using an exemplar approach, based on data obtained from the literature and from direct observation of flowers from living and spirit collections. The number of stamens was optimised on a phylogeny of the family to identify evolutionary patterns in the variation of

this character. We quantified pollen production for a total 82 species, and further compared this pollen production with stamen number. This constitutes a first step in identifying whether there might be a link between stamen number and pollination, and investigating the potential functional significance of stamen number variation in palms.

## Material and methods

### Stamen number optimization

#### *Taxonomic sampling, stamen number data and phylogenetic background*

Using an exemplar approach, we recorded stamen number for 183 species representing all of the genera recognized in Arecaceae (Dransfield et al. 2008), and six species of commelinid monocots chosen as outgroups. The species vs. genus approach avoids the problem of coding polymorphism whenever it occurs within a genus. This approach is particularly useful in our case, since stamen number can be highly variable within genera. Data were mostly obtained from taxonomic treatments available in the literature. Information on stamen number was also obtained from direct observation of flowers from spirit collections (Aarhus University; Royal Botanic Gardens, Kew; Supplementary Tables 1 and 2). Flowers were dissected under a Zeiss Stemi SV6 stereomicroscope (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany) to count the stamens. The optimization of the character ‘stamen number’ was performed on the complete generic-level supertree of the family (Baker et al. 2009). This tree was slightly modified (Couvreur et al. 2011) by considering only accepted genera according to Dransfield et al. (2008) and adding the recently discovered genus *Tahina*. This latter version of the supertree was used in this study. The original supertree included 13 outgroup species of commelinid monocots from which we selected the following six: *Anigozanthos flavidus* (Haemodoraceae), *Hanguana malayana* (Hanguanaceae), *Kingia australis* (Dasypogonaceae), *Musa acuminata* (Musaceae),

*Tradescantia ohiensis* (Commelinaceae), and *Typha latifolia* (Typhaceae). Whenever possible, we chose to record stamen number for the species included in the study of Couvreur et al (2011) (Supplementary Table 2). This approach avoids misleading information due to potential non-monophyletic genera.

#### *Character coding and character optimization*

Stamen number ranges between 1 and approximately 1000 in palms. The exact range in stamen number per species was recorded in the database PROTEUS (Sauquet 2013). PROTEUS allows precise and complete tracking of the source information. Data recorded and references used are presented in Supplementary Table 2. Defining character states for stamen number proved problematic due to the high inter- and intra-specific variability. Converting continuous data into discrete classes makes information easier to analyse in a phylogenetic context, provided that classes are judiciously chosen. In order to define meaningful classes, we used the agglomerative hierarchical clustering, a statistical tool implemented in the R software (R Development Core Team 2007). The first step consisted in calculating distances between pairs of values with the function *dist* and the method *euclidian*. The function *hclust* included in the package *ade4* was used to group the resulting distances in dendrograms that allow determining the classes that best fit the data. Five classes (or character states) emerged for the character ‘stamen number’: **(0)** less than 6 stamens (corresponding to a reduction in stamen number from the ancestral state), **(1)** 6 stamens (the known ancestral state of the family; states 0 and 1 correspond to oligandrous species as defined by Nadot et al. (2011)); **(2)** 7 to 22 stamens (we called it low polyandry); **(3)** 23 to 114 stamens (called moderate polyandry); **(4)** more than 114 stamens (called high polyandry).

The character was optimised using the MP (Maximum Parsimony) method implemented in Mesquite 2.75 (Maddison and Maddison, 2011), with the default settings. Character states were treated as unordered, allowing any transition among states.

## **Correlation between stamen number and pollen production**

### *Taxonomic sampling*

We sampled flower buds from 82 species of palms, representing 59 genera of the family. Three of the five subfamilies are represented, with 10 species (8 genera) from the Calamoideae, 14 species (14 genera) from the Coryphoideae and 58 species (37 genera) from the Arecoideae (Supplementary Table 1). We were unable to find plant material representing Ceroxyloideae and Nypoideae, but nevertheless our sampling is representative of the and diversity in stamen number at the scale of the family, and mostly represents the taxonomic diversity since the two unrepresented subfamilies are the smallest of palms (Nypoideae is monotypic and Ceroxyloideae includes 47 species). Flower buds were obtained from spirit collections (Aarhus University; Royal Botanic Gardens, Kew) and from living collection (Jardin Botanique de la Ville de Paris; Botanischer Garten Berlin-Dahlem; Supplementary Table 1). Pollen production was estimated from well-preserved and closed hermaphroditic or male flower buds (for monoecious and dioecious species). We selected flower buds in which the anthers had not yet dehisced, so that the pollen content was intact. These constraints considerably limited the amount of material from which the number of pollen grains could be evaluated with confidence. In most cases, we found only one individual per species whose flowers matched all these criteria. In the following we will use the term ‘individual’ to refer to both the individual and the corresponding species.

### *Pollen grains extraction and counting*

Three flowers per individual were sampled (rarely two; see Supplementary Table1). Flowers were dissected under a Zeiss Stemi SV6 stereomicroscope (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany). The exact number of stamens was determined for each flower bud dissected. Six anthers per flowers were taken, dried overnight at 30°C and grinded in a MM300 mixer mill (Retsh, Germany). Pollen grains were resuspended in 300µL of Alexander's stain (Alexander 1980). Three aliquots of the solution (3 x 5 µL) were sampled to count pollen grains under an Olympus BH-2 microscope (Olympus, USA). When flowers had 6 or less stamens, these stamens were all used to count pollen grains. When flowers had more than six stamens, in order to avoid counting an excessive number of pollen grains we chose to sample 6 stamens. In this case, we selected stamens along a transect from outer part of the androecium to the inner part, in order to overcome the potential problem of differences in pollen production according to stamen position. The mean number of pollen grains counted in the 3\*5µL aliquots was used as an approximation of the overall production of each flower. In the case of flowers with more than six stamens, this mean number was divided by six and multiplied by the number of stamens.

### *Statistical analyses*

We calculated the average pollen production per individual (mean of the values for the three flowers and for the three counts per flower). We checked if calculating a mean value had a sense in our experiment by comparing between-individuals variability and within-individuals variability. We also calculated the average stamen number per individual (mean of the values for the three flowers). Four datasets were constructed, one per subfamily (Calamoideae dataset, Coryphoideae dataset, Arecoideae dataset) and one including all the data (total dataset). We tested the correlation between our two variables, the average pollen production



and the average stamen number, using the Spearman's *rho* test (Hollander and Wolfe 1973; Best and Roberts 1975). Spearman's *rho* is a nonparametric, rank-based measure of statistical dependence. This test was used because our data do not fit a bivariate normal distribution (even after a log-transformation). Our datasets also have strong outliers that are in the tails of both samples, and the Spearman correlation is known to be less sensitive to this phenomenon than other correlation tests. We used the R software (R Development Core Team 2007) for all the analyses.

### **Phylogenetic signal in stamen number and pollen production**

Because observations on stamen number and pollen production were made on phylogenetically related species, our data may be statistically non-independent due to common ancestry (Felsenstein 1985; Harvey and Pagel 1991). We tested the presence of a phylogenetic signal (Blomberg et al. 2003) in the two characters, in order to investigate a tendency of related species to resemble each other more than expected randomly. Estimating the presence of a phylogenetic signal is a prerequisite in phylogenetic comparative analyses. We chose an approach that expresses the topological properties of the phylogenetic tree via an orthonormal basis, which is further used to decompose the character variance. This decomposition provides a structure function, called “orthogram”, which leads to characterize the dependence of character values on the topology of the tree (Ollier et al. 2006). Three different characters were tested: (1) stamen number at the level of the palm family (183 palms species, one per genera, plus the outgroups), (2) stamen number and (3) pollen production from the correlation experiment (59 values, one per genus). When data were generated for several species within a genus (correlation experiment), mean values were calculated in order to match with the generic-level supertree. The tree from Couvreur et al. (2011) with branch lengths was modified to include only taxa for which data were available. Taxa with missing

data were removed. We found data on pollen production for one outgroup species, *Zea mays* (Emberlin et al. 1999).

Analyses were conducted using the R software (R Development Core Team 2007). Complementary test statistics were generated to diagnose the intensity and the nature of phylogenetic signal: R2Max (significant change in character appeared at one or several nodes), *D* max (Kolmogorov-Smirnov statistic on uniform distribution of variance), SkR2k (variance distribution across the tree is rather skewed to the root or to the tips) and SCE (average local variation of the orthogram values; Ollier et al. 2006). These tests were performed with 999 Monte Carlo permutations of tips values.

## Results

### **Stamen number optimization**

Figure 1 shows the MP optimization of the character ‘stamen number’ on the palm supertree. The majority of species have six stamens (oligandry) and it is the most common character state in Calamoideae and part of Coryphoideae (Trachycarpeae). The ancestral state in the palm family is six stamens and it is also the ancestral state in all subfamilies, except Nypoideae where the single species *Nypa fructicans* has three stamens (also oligandry). According to the optimization, transitions toward polyandry occurred several times independently in all subfamilies (except Nypoideae). The most common transitions are from six stamens to low polyandry and from six stamens to moderate polyandry. Transitions toward high polyandry are only found in the tribes Phytelephea and Areceae. Transitions toward moderate and high polyandry occurred often directly from oligandry with an exceptions in tribe Areceae, where moderate polyandry evolved from low polyandry in *Howea belmoreana*, and high polyandry evolved from moderate polyandry in *Brassiophoenix schumanni*.

### **Correlation between stamen number and pollen production**

Stamen number and pollen production (number of pollen grains) for each flower of the 82 individuals included in our sampling are presented in Supplementary Table 1. The average pollen production per individual ranged from ~ 100 grains in *Sabal bermudana* (Coryphoideae) to ~ 2 600 000 grains in *Caryota urens* (Coryphoideae). The average pollen production for all the individuals was ~ 170 000 pollen grains (standard deviation around 355 000). The average stamen number per individual ranges from 3 in *Areca triandra*, *Dypsis mirabilis* and *Dypsis ambilaensis* (Arecoideae) to 190 in *Ptychococcus sp.* (Arecoideae). Among the 82 individuals, 47 had 6 stamens, 4 had less than 6 and 31 had more than 6.

The inter-individual variability (standard deviation of mean amount of pollen grains per flower per individual) was 354943.9 pollen grains per flower per individual and the intra-individual variability (mean of standard deviation per flower per individual) was 37201.14 pollen grains per flower per individual for the total dataset. Differences of the same order were observed for each subfamily dataset. The significantly lower value of intra- vs. inter-individual variability allowed us to use the mean value of pollen production per individual in the rest of our analyses.

The graphical relationship between stamen number and pollen is presented in Figure 2. There was no apparent linear relationship. All individuals of the subfamily Calamoideae (blue dots) that were included in our dataset had 6 stamens and pollen production in this subfamily was moderate (between ~ 2000 and ~ 400 000 grains). The greatest range of variation in stamen number was found in the subfamily Arecoideae (from 3 to 190 stamens) where pollen production ranged between ~ 190 and ~ 900 000 grains. The greatest range of variation in pollen production was found in the subfamily Coryphoideae (between ~ 100 and ~ 2 600 000 grains) where stamen number ranged from 6 to 47 stamens.

Results of correlation test are presented in Table 1. A correlation was found between stamen number and pollen production within Arecoideae, Coryphoideae, and at the family level, but not within Calamoideae where only species with six stamens were sampled. The stronger relationship was found in Arecoideae, with a Spearman's  $\rho$  of 0.71 ( $P$ -value = 3.849e-10) which is a good value for this kind of test. The correlation was weaker in Coryphoideae with a Spearman's  $\rho$  of 0.65 ( $P$ -value = 0.0127).

### **Phylogenetic signal in stamen number and pollen production**

A phylogenetic signal was detected for the character 'stamen number' when the 183 species (one per genera) were considered. This character can be considered as shaped by phylogenetic history because the four test statistics were significant (Table 2) and the cumulative orthogram had most of its values outside the confidence envelopes (Figure 3A). The R2Max statistics shows that significant changes in the character state appeared at several nodes of the trees. The SkR2k statistics shows changes in stamen number seem to have occurred relatively recently since variance distribution across the tree is rather skewed to the tips. When the tree including only the 59 species for which both stamen number and pollen production were recorded was considered, the test behaved in the same way (even if the first test statistics was not significant; Table 2), confirming the existence of a phylogenetic signal in stamen number. No phylogenetic signal was detected in pollen production. None of the four tests rejected the null hypothesis of a uniform distribution of orthogram values (Table 2) and values of the cumulated orthogram remained within the confidence envelopes (Figure 3B).

For this reason, phylogenetic comparative analyses were not further conducted.

## Discussion

### **Stamen number evolution**

Our study at the species level confirms what had been shown before: six stamens is the ancestral state of palms (Nadot et al. 2011). The presence of a phylogenetic signal (Figure 3A) in the character ‘stamen number’ at the level of the family gives even more support to this inferred ancestral state (Laurin 2004). From this ancestral state repeated transitions towards polyandry occurred (Figure 1). Interestingly, transitions towards moderate and high polyandry occurred quite often from the ancestral state, showing that the evolution of stamen number is not a gradual phenomenon with progressive increase from the ancestral state.

This phenomenon may be linked to the developmental pathways of stamen initiation. Within Angiosperms, not all polyandrous forms are homologous since they are associated with different floral organizations, but also result from different developmental pathways (e.g., spiral vs. whorled phyllotaxis or centripetal vs. centrifugal stamen inception). In monocots, stamens are commonly arranged in one or two whorls (Endress 2011). In this clade, increase in stamen number can take place by the insertion of more primordia coinciding with an expansion of the receptacle, or by secondary divisions of primordia (Ronse Decraene and Smets 1987). Polyandry thus results from the addition of stamens within a whorl and/or addition of whorls of stamens. This situation is described as numerous stamens in whorls or polycycly (Ronse Decraene and Smets 1998), whereas numerous and spirally arranged stamens is considered by some authors as “true polyandry” (Ronse Decraene and Smets 1987). However, in polycycly like in spiral polyandry, arrangement patterns can be irregular and lead to “chaotic” polyandry at anthesis (Ronse Decraene and Smets 1998; Endress 2011). These two kinds of polyandry (polycycly and spiral) are found in palms and arose from an ancestral state of six stamens in two whorls, an outer whorl of three stamens opposite the sepals and an inner whorl of stamens opposite the petals (Uhl and Moore 1980). All

polyandrous taxa studied for androecial development, except Phytelepheeae, exhibit basic trimery in the androecium. Most of the time increase in stamen number occurred by the addition of whorls and/or addition of stamens within a whorl, thus leading to polycyclus. Enlarged primordia producing more than one stamen, as well as the addition of whorls are linked to apex expansion. After petal inception, the floral apex expands in diameter and/or height to accommodate the large number of stamens. The variability in stamen number thus depends on apex expansion which will allow increase in whorl number or increase in primordia size and division (number of stamens within a whorl). In all cases, stamens develop in different arrangements but always in antesealous (AS) and antepetalous (AP) positions. For example, in *Lodoicea*, *Caryota* (Coryphoideae) and *Ptychosperma* (Arecoideae), the first AS whorl has always three stamens whereas the first AP whorl can have more than three stamens. When more inner whorls are present, they have mostly three stamens and alternate AS and AP positions (Uhl 1976; Uhl and Moore 1980). There is a slight difference in the developmental pathway in *Socratea*, *Wettinia* and *Welfia* (Arecoideae), where several stamens appear opposite each sepal (Uhl and Moore 1980). In *Eugeissona* (Calamoideae) and *Ceroxylon* (Ceroxyloideae), there are no additional whorls. In the first genus, the AP whorl has enlarged primordia that produce each several stamens (Uhl and Dransfield 1984). In the second genus, both AS and AP primordia produce several stamens (Uhl and Moore 1980). In Phytelepheeae, stamens arise in a spirally arrangement, with a centrifugal initiation (Uhl and Moore 1977a; Barfod and Uhl 2001). This transition between six stamens in two whorls and spiral polyandry is unique in palms.

Studying the genetic control underlying these different developmental pathways will be useful to understand stamen number evolution. Genes controlling apex expansion as well as the number and size of primordia need to be identified and their evolution studied. Orthologues of genes already identified in *Arabidopsis thaliana* could be good candidates. For example, it has

been shown that SUPERMAN (Bowman et al. 1992) and FON1 (Huang and Ma 1997) play a role in controlling floral meristem activity and organ number. Our study on stamen number evolution could help selecting taxa on which conduct developmental and genetic analysis. The comparison between sister groups with contrasted character states for stamen number could help understanding how transitions from oligandry to polyandry or among the different polyandrous states may have taken place.. In particular, it would be of great interest to unravel the genetic control of stamen initiation in Phytelephea, with their intriguing highly polyandrous androecium, unique among palm from a morphological and a developmental point of view,

Inflorescence and floral structure can constrain the development of stamens. Endress (2001) linked the two kinds of floral phyllotaxis (spiral vs. whorled) with floral organization. When the organs are spirally arranged, the number is not fixed and leads to an “open” organization. When the organs are whorled, the organization is “closed” and allows a higher level of synorganization (Soltis et al. 2009). Both “open” and “closed” floral organizations allow increase in stamen number. However, complex synorganization, like zygomorphy is known to possibly limit stamen number (Jabbour et al. 2008). Lack of space due to interactions with the female organs, the functional gynoecium in hermaphroditic flowers or the pistillode in staminate unisexual flower, could limit the number of stamens (Ronse Decraene and Smets 1995). Zygomorphy is absent in palms (although some species have slightly asymmetric flowers prior anthesis) and several polyandrous species have a more or less developed pistillode. The mode of apical expansion and the form of the primordia appear to depend on pressure imposed on the floral apices, suggesting that modification of inflorescence bracts and perianth could have preceded the evolution of polyandry (Uhl and Moore 1980). This hypothesis remains to be tested by developmental studies at family level and within a phylogenetic framework.

### **Estimation of pollen production**

Our results suggest that pollen production in palm flowers is highly variable, with a number of pollen grains ranging between a few hundreds and several millions per flower. Retrieving the total amount of pollen grains produced within an anther without any loss is a delicate process. Pollen grains are usually extracted by a chemical treatment, called acetolysis (Erdtman 1943). With this method, anther tissues are digested by a mixture of acetic anhydride and concentrated sulphuric acid. Pollen grains need to be washed before observation, and during this step part of them are often lost (personal observation). This is not a problem if the purpose of the experiment is simply morphological observation; however it could false the results if the purpose is to retrieve the total amount of pollen grains present in the anthers. In order to reduce losses of pollen grains as much as possible, we used a simple protocol in which the anthers were dried, powdered, and the pollen grains were directly resuspended afterwards. The only disadvantage of this technique is the presence of numerous anther fragments with the pollen grains. That forces the observer to discriminate and count visually the pollen grains under a microscope. However a particle counter could easily be used with our extraction technique.

Another issue in estimating the pollen production of a flower is to discriminate viable grains. Some methods exist but can only be used on fresh flowers. Most of our sampling was flowers in alcohol; we were thus unable to estimate the percentage of viable pollen grains. Complementary experiment on fresh flower will be a useful improvement to our results.

### **Correlation between stamen number and pollen production**

We evidence for the first time in the palm family a correlation between the number of stamens and the number of pollen grains produced per flower. However, this relationship is not linear. Within two subfamilies, Coryphoideae and Arecoideae, the number of pollen grains produced



per individual tends to be higher when the number of stamens increases). It is notably the case in the Arecoideae (see Figure 2, red dots), especially in the tribe Areceae. However when the number of stamen is six, the ancestral state of the family, pollen production can be also variable. It is the case in the three subfamilies examined. In palms, increase in pollen production seems therefore to be achieved in two different ways: increase in stamen number and/or increase in pollen grains production within an anther.

We identified a strong phylogenetic signal in the character stamen number but not in pollen production. This suggested that stamen number could be evolutionarily conserved whereas pollen production could be a more labile character. However, these interpretations must be taken with caution. Evolutionary conservatism could imply either strong stabilizing selection or a low rate of evolutionary change. Moreover rapid evolutionary change (lability) could occur under different process as genetic drift or natural selection (Revell et al. 2008).

The work presented here is a first step in the understanding of the link between stamen number and pollen production. One drawback of our study is that we quantified pollen production for only one individual per species. This value represents the production at the time and location of sampling, which means that the potential variability of pollen production among individuals of the same species and according to different environmental conditions was not taken into account. Moreover the position of the sampled flowers along the inflorescence is unknown. This may be of importance since the position of the flower on the inflorescence is thought to influence pollen production, as resources available decline distally (Cao et al. 2011). Population-level studies on pollen production could provide useful information on the respective part of environment (resources) and phylogeny in the variability of this character.

### **Future prospects for the study of stamen number evolution**

Our study revealed the existence of a link between stamen number and pollen production in some groups of palms. In these cases, a high stamen number could have been selected because of the greatest quantity of pollen produced. Whether a high pollen production has a positive impact on fitness needs to be tested. Modification in pollen production may reflect a modification of the investment in reproduction (production of pollen grains and ovules) and/or in male function only. This could be evaluated by comparing pollen/ovule (P/O) ratios, but the diversity in sexual system found in palms (Nadot et al. in prep) makes this type of approach relatively difficult. Traditionally, the P/O ratio is used with hermaphroditic species (Cruden 1977) and is calculated within a flower. In this case it reflects pollination efficiency, i.e. the likelihood of a pollen grain to reach a stigma, and it is correlated with the breeding system (the P/O ratio is generally lower in autogamous vs. allogamous species; Cruden 1977; Cruden 2000). However most palm species are monoecious (see Supplementary Figure 1) and bear unisexual male and female flowers grouped in clusters or on different inflorescences. For monoecious species, the investment in reproduction and P/O ratio should be estimated at the level of the flower cluster or the inflorescence. The number of male and female flowers has to be taken into account, as well as pollen and ovule production. In dioecious species, the investment in male and female functions is allocated between individuals. Pollen production therefore reflects the investment in reproduction of male individuals.

A higher investment in male function could have been selected if it promotes pollination efficiency. For example, both beetles and bees, which are the predominant pollinators of palms (Barfod et al. 2011), are attracted by flowers producing copious amount of pollen. Individuals that produce more pollen could be better competitors than other individuals within a species, but also than individuals of co-flowering species (Mitchell et al. 2009). Palm flowers are usually small and grouped in huge inflorescences. Henderson (2002) observed a

high level of correlation between inflorescence architecture (size, proximity of flowers) and types of pollinators. Considering the high level of compaction of the inflorescences in many palm species, it is possible that inflorescences act as the main pollination unit instead of flowers, as observed in Araceae (Chouteau et al. 2006). Pollen production should be therefore investigated at the inflorescence level and related to the type of pollen vector.

The evolution of stamen number may also be independent of a potential selection on pollen production. The link between stamen number and pollen production observed in our experiment could also be due to constraints on pollen development. If the production of pollen grains per anther is constrained (genetically or architecturally, by the size of anthers in the latter case), more stamens lead mechanically to more pollen grains. Whether numerous stamens (considering or not pollen production) is a floral trait under selection remains to be tested. Repeated increases in stamen number from an ancestral state of six during the evolutionary history of the family may be due to local relaxation of phylogenetic constraints. The potential adaptive value of numerous stamens could be tested by experimental study of phenotype modification (Harder and Johnson 2009), by removing stamens from flowers on individuals in natural population and investigating the effect on performance in reproduction, as well as the effect on the behaviour of visitors (pollinators and predators) to determine if numerous stamens could be an attractive and/or a defence trait.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Lauren Gardiner and Elizabeth Woodgyer (Kew Gardens, “Palm section” and Collection Management Unit), Vincent Lipa (Serres d’Auteuil – Mairie de Paris), Aarhus University herbarium and Botanischer Garten Berlin-Dahlem which provided the plant material. Jürg Schönenberger and the University of Vienna are also gratefully

acknowledged for funding the eFLOWER server hosting the PROTEUS database. SN received a research grant from Aarhus University to conduct part of this research. EA received a financing from Centre de Recherche sur la Paléobiodiversité et les Paléoenvironnements (UMR 7207 CNRS - MNHN - UPMC) to sample material in Kew.

## References

- Alexander, M. P. 1980. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, **55**, 13-18.
- Baker, W. J., Savolainen, V., Asmussen-Lange, C. B., Chase, M. W., Dransfield, J., Forest, F., Harley, M. M., Uhl, N. W. & Wilkinson, M. 2009. Complete generic-level phylogenetic analyses of palms (Arecaceae) with comparisons of supertree and supermatrix approaches. *Systematic Biology*, **58**, 240–256.
- Barfod, A. S. 1991. A monographic study of the subfamily Phytelephantoideae (Arecaceae). *Opera Botanica*, **105**, 1-73.
- Barfod, A. S., Hagen, M. & Borchsenius, F. 2011. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). *Annals of Botany*, **108**, 1503-1516.
- Barfod, A. S. & Uhl, N. W. 2001. Floral development in *Aphandra* (Arecaceae). *American Journal of Botany*, **88**.
- Barrera, E. & Nobel, P. S. 2004. Nectar: properties, floral aspects, and speculation on origin. *TRENDS in plant Sciences*, **9**, 65-69.
- Barthlott, W. & Hunt, D. R. 1993. Cactaceae. In: *The families and genera of vascular plants* (Ed. by Kubitzki, K., Rohwer, J. G. & Bittrich, V.), pp. vol. 2, 161 – 197. Berlin, Germany: Springer.
- Bernhardt, P. 2000. Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. *Plant Systematics and Evolution*, **222**, 293-320.
- Best, D. J. & Roberts, D. E. 1975. Algorithm AS 89: The Upper Tail Probabilities of Spearman's rho. *Applied Statistics*, **24**, 377–379.
- Blomberg, S. P., Garland, T. & Ives, A. R. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, **57**, 717-745.
- Bowman, J. L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U. & Meyerowitz, E. M. 1992. SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development*, **114**, 599-615.
- Cao, G., Xue, L., Li, Y. & Pan, K. 2011. The relative importance of architecture and resource competition in allocation to pollen and ovule number within inflorescences of *Hosta ventricosa* varies with the resource pools. *Annals of Botany*, **107**, 1413-1419.

- Chouteau, M., Barab&, D. & Gibernau, M. 2006. A comparative study of inflorescence characters and pollen-ovule ratios among the genera *Philodendron* and *Anthurium* (Araceae). *International Journal of Plant Sciences*, **167**, 817-829.
- Couvreur, T. L. P., Forest, F. & baker, W. J. 2011. Origin and global diversification patterns of tropical rain forests: inferences from a complete genus-level phylogeny of palms. *BMC Biology*, **9**, doi:10.1186/1741-7007-9-44.
- Crepet, W. L. & Nixon, K. C. 1996. The fossil history of stamens. In: *The anther form, function and phylogeny* (Ed. by D'Arcy, W. G. & Keating, R. C.): Cambridge University Press.
- Cruden, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, **31**, 32-46.
- Cruden, R. W. 2000. Pollen grains: Why so many? *Plant Systematics and Evolution*, **222**, 143-165.
- D'Arcy, W. G. 1996. Anthers and stamens and what they do. In: *The anther form, function and phylogeny* (Ed. by D'Arcy, W. G. & Keating, R. C.): Cambridge University Press.
- Damerval, C. & Nadot, S. 2007. Evolution of perianth and stamen characteristics with respect to floral symmetry in Ranunculales. *Annals of Botany*, **100**, 631-640.
- Dransfield, J., Uhl, N. W., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M. & Lewis, C. E. 2008. *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. Royal Botanic Gardens, Kew: Kew Publishing.
- Emberlin, J., Adams-Groom, B. & Tidmarsh, J. 1999. A Report on the Dispersal of Maize Pollen. National Pollen Research Unit University College Worcester WR2 6 AJ
- Endress, P. K. 2001. Origins of flower morphology. *Journal of experimental zoology*, **291**, 105-115.
- Endress, P. K. 2011. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. *American Journal of Botany*, **98**, 370-396.
- Endress, P. K. & Doyle, J. A. 2009. Reconstructing the ancestral angiosperm flower and its initial specilization. *American Journal of Botany*, **91**, 22-66.
- Endress, P. K. & Igersheim, A. 2000. The reproductive structures of the basal angiosperm *Amborella trichopoda* (Amborellaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **161**, S237 – S248.

- Erdtman, G. 1943. *An introduction to pollen analysis*. Waltham, Mass., USA: Chronica Botanica Company.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*, **125**, 1-15.
- Goremykin, V. V., Nikiforova, S. V., Biggs, P. J., Zhong, B., Delange, P., Martin, W. & etal. 2013. The evolutionary root of flowering plants. *Systematic Biology*, **62**, 50-61.
- Harder, L. D. & Johnson, S. D. 2009. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist*, **183**, 530-545.
- Harvey, P. H. & Pagel, M. D. 1991. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Henderson, A. 2002. *Evolution and ecology of palms*. Bronx, New York: The New York Botanical Garden Press.
- Hollander, M. & Wolfe, D. A. 1973. *Nonparametric statistical inference*. New York: John Wiley & Sons.
- Huang, H. & Ma, H. 1997. FON1, an Arabidopsis gene that terminates floral meristem activity and controls flower organ number. *The Plant Cell*, **9**, 115-134.
- Huynh, K.-L. 1991. The flower structure in the genus Freycinetia, Pandanaceae (part 1) — Potential bisexuality in the genus Freycinetia. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, **112**, 295 – 328.
- Jabbour, F., Damerval, C. & Nadot, S. 2008. Evolutionary trends in the flowers of Asteridae: is polyandry an alternative to zygomorphy? *Annals of Botany*, **102**, 153-165.
- Janka, H., vonBalthazar, M., Alverson, W. S., Baum, D. A., Semir, J. & Bayer, C. 2008. Structure, development and evolution of the androecium in Adansonieae (core Bombacoideae, Malvaceae s.l.). *Plant Systematics and Evolution*, **275**, 69 – 91.
- Laurin, M. 2004. The evolution of body size, Cope's rule and the origin of Amniotes. *Systematic Biology*, **53**, 594-622.
- Linné, C. v. 1753. Species Plantarum. <http://www.biodiversitylibrary.org/item/13829>
- Lorence, D. H. 1985. A monograph of the Monimiaceae (Lauraceae) in the Malagasy region (Southwest Indian Ocean). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **72**, 1 – 165.

- Maddison, W. P. & Maddison, D. R. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>.
- Mitchell, R. J., Flanagan, R. J., Brown, B. J., Waser, N. M. & Karron, J. D. 2009. New frontiers in competition for pollination. *Annals of Botany*, **103**.
- Nadot, S., Sannier, J., Barfod, A. S. & Baker, W. J. 2011. Evolution of the palm androecium as revealed by character mapping on a supertree. In: *Flowers on the tree of life* (Ed. by Wanntorp, L. & RoncedoCraene, L. P.): Cambridge University Press.
- Ollier, S., Couteron, P. & Chessel, D. 2006. Orthonormal transform to decompose the variance of a life-history trait across a phylogenetic tree. *Biometrics*, **62**, 471-477.
- Peters, H. A., Pauw, A., Silman, M. R. & Terborgh, J. W. 2004. Falling palm fronds structure amazonian rainforest sapling communities. *Proc Biol Sci*, **271 Suppl 5**, S367-9.
- Prance, G. T. 1976. Family 120. Caryocaraceae (Flora of Panama). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **63**, 541 – 546.
- Prance, G. T. & Mori, S. A. 2004. Lecythidaceae. In: *The families and genera of vascular plants* (Ed. by Kubitzki, K.), pp. vol. 6, 221 – 232. Berlin, Germany: Springer.
- RDevelopmentCoreTeam. 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Revell, L. J., Harmon, L. J. & Collar, D. C. 2008. Phylogenetic signal, evolutionary process and rate. *Systematic Biology*, **57**, 591-601.
- RoncedoCraene, L. P. & Smets, E. 1987. The distribution and the systematic relevance of the androecial characters oligomery and polymery in the Magnoliophytina. *Nordic Journal of Botany*, **7**, 239-253.
- RoncedoCraene, L. P. & Smets, E. 1995. The distribution and systematic relevance of the androecial character oligomery. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **118**, 193-247.
- RoncedoCraene, L. P. & Smets, E. F. 1998. Notes on the evolution of androecial organisation in the Magnoliophytina (angiosperms). *Botanica Acta*, **111**, 77-86.



- Rudall, P. J., Abranson, K., Dransfield, J. & Baker, W. J. 2003. Floral anatomy in *Dypsis* (Arecaceae-Areaceae): a case of complex synorganisation and stamen reduction. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **143**, 115-133.
- Salisbury, E. J. 1926. Floral construction in the Helobiales. *Annals of Botany*, **40**, 419 – 445.
- Sauquet, H. 2013. PROTEUS: A database for recording morphological data and creating NEXUS matrices. Version 1.17. <http://eflower.myspecies.info/proteus>.
- Schneider, E. L. & Williamson, P. S. 1993. Nymphaeaceae. In: *The families and genera of vascular plants* (Ed. by Kubitzki, K., Rohwer, J. G. & Bittrich, V.), pp. vol. 2; 487 – 493. Berlin, Germany: Springer.
- Soderstrom, T. R. & Londoño, X. 1988. A morphological study of *Alvimia* (Poaceae: Bambuseae), a new Brazilian bamboo genus with fleshy fruits. *American Journal of Botany*, **75**, 819 – 839.
- Soltis, P. S., Brockington, S. F., Yoo, M.-J., Piedrahita, A., Latvis, M., Moore, M. J., Chanderbali, A. S. & Soltis, D. E. 2009. Floral variation and floral genetics in basal angiosperms. *American Journal of Botany*, **91**, 110-128.
- Tamura, M. 1995. Ranunculaceae. In: *Die natürlichen Pflanzenfamilien* (Ed. by Engler, A. & Prantl, K.), pp. vol. 17a, part IV. Berlin, Germany: Ducker & Humblot.
- Uhl, N. & Moore, H. E. 1980. Androecial development in six polyandrous genera representing five major groups of palms. *Annals of Botany*, **45**, 57-75.
- Uhl, N. W. 1976. Developmental studies in *Ptychosmerpa* (Palmae). II. The Staminate and Pistillate Flowers. *American Journal of Botany*, **63**, 97-109.
- Uhl, N. W. & Dransfield, J. 1984. Development of the inflorescence, androecium and gynoecium with reference to palms. In: *Contemporary problems in plant anatomy* (Ed. by White, R. A. & Dickinson, W. C.). New York: Academic Press.
- Uhl, N. W. & Moore, H. E. 1977a. Centrifugal stamen initiation in Phytelphantoid palms. *American Journal of Botany*, **64**, 1152-1161.
- Uhl, N. W. & Moore, H. E. 1977b. Correlation of inflorescence, flower structure, and floral anatomy with pollination in some palms. *Biotropica*, **9**, 170-190.
- Williamson, P. S. & Schneider, E. L. 1993. Cabombaceae. In: *The families and genera of vascular plants* (Ed. by Kubitzki, K., Rohwer, J. G. & Bittrich, V.), pp. vol. 3; 157 – 161. Berlin, Germany: Springer.

## Tables and Figures

**Table 1** Correlation test between stamen number and pollen production within subfamilies Arecoideae, Calamoideae and Coryphoideae, and at the level of the family.

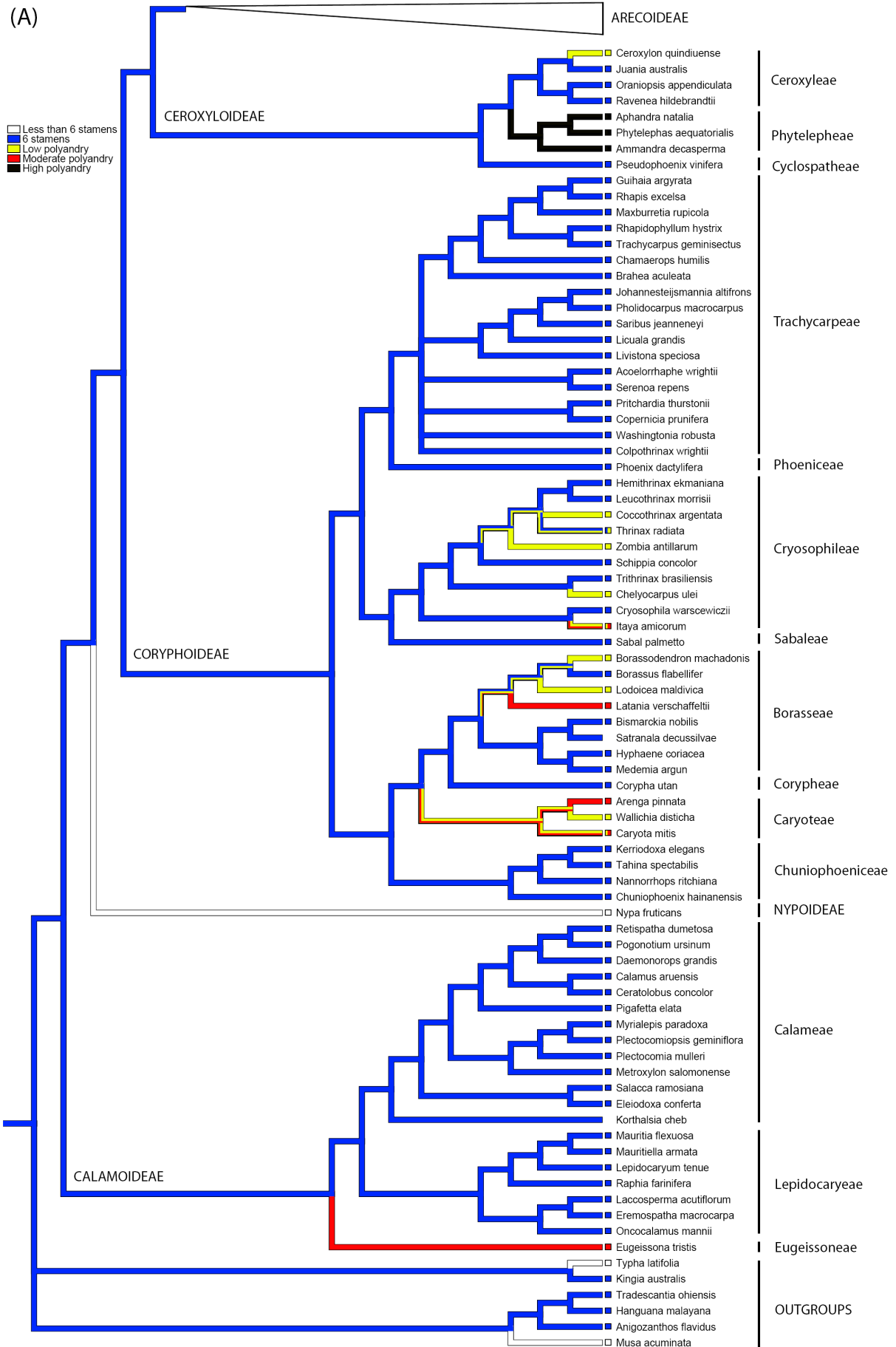
Dataset	Number of individuals	Spearman's $\rho$	Statistic	P-value
Arecoideae	58	0.7115013	9378.804	3.849e-10***
Calamoideae	10	NA	NA	NA
Coryphoideae	14	0.645272	161.4012	0.0127*
Total	82	0.6491594	32235.59	4.213e-11***

\*  $\leq 5\%$ ; \*\*  $\leq 1\%$ ; \*\*\*  $\leq 0.1\%$ .

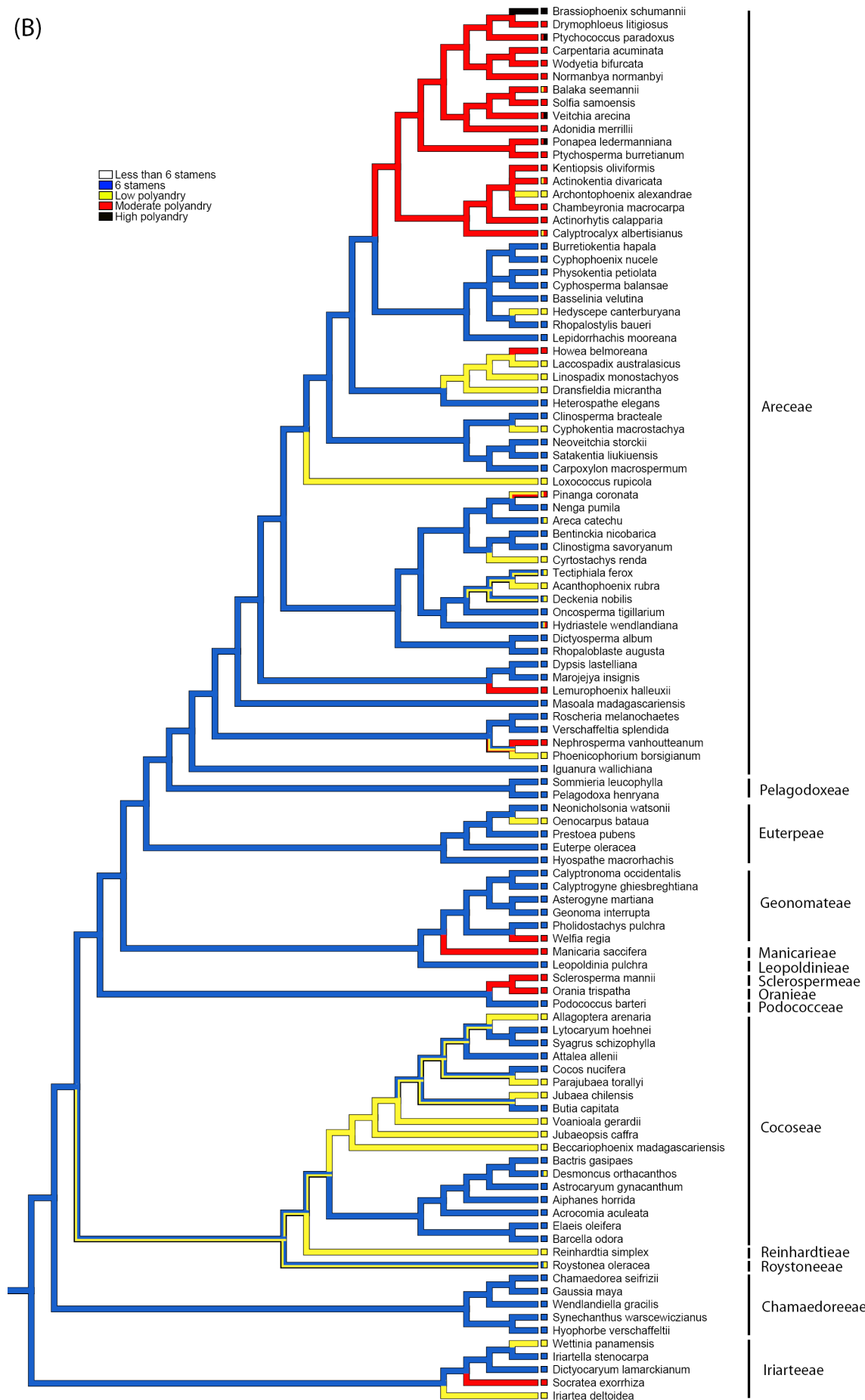
**Table 2** Observed values and P-values for the four test statistics (999 Monte Carlo permutations of tips values): R2Max (significant change in character appeared at one or several nodes),  $D$  max (Kolmogorov-Smirnov statistic on uniform distribution of variance), SkR2k (variance distribution across the tree is rather skewed to the root or to the tips) and SCE (average local variation of the orthogram values; Ollier et al. 2006). Three different characters were tested: stamen number at the level of the palm family (183 palms species, one per genera, plus the outgroups), stamen number and pollen production from the correlation experiment (59 values, one per genus).

	R2Max	SkR2k	Dmax	SCE
<b>Stamen number</b> (183 genera + outgroup)	0.1840802 $P$ -value = 0.002	49.7784145 $P$ -value = 0.001	0.4297263 $P$ -value = 0.001	12.1236578 $P$ -value = 0.001
<b>Stamen number</b> (59 genera + outgroup)	0.1166519 $P$ -value = 0.891	21.6065310 $P$ -value = 0.019	0.3166157 $P$ -value = 0.014	1.8175951 $P$ -value = 0.017
<b>Pollen production</b> (59 genera + outgroup)	0.1407943 $P$ -value = 0.487	26.9638366 $P$ -value = 0.155	0.1646906 $P$ -value = 0.345	0.3829492 $P$ -value = 0.347

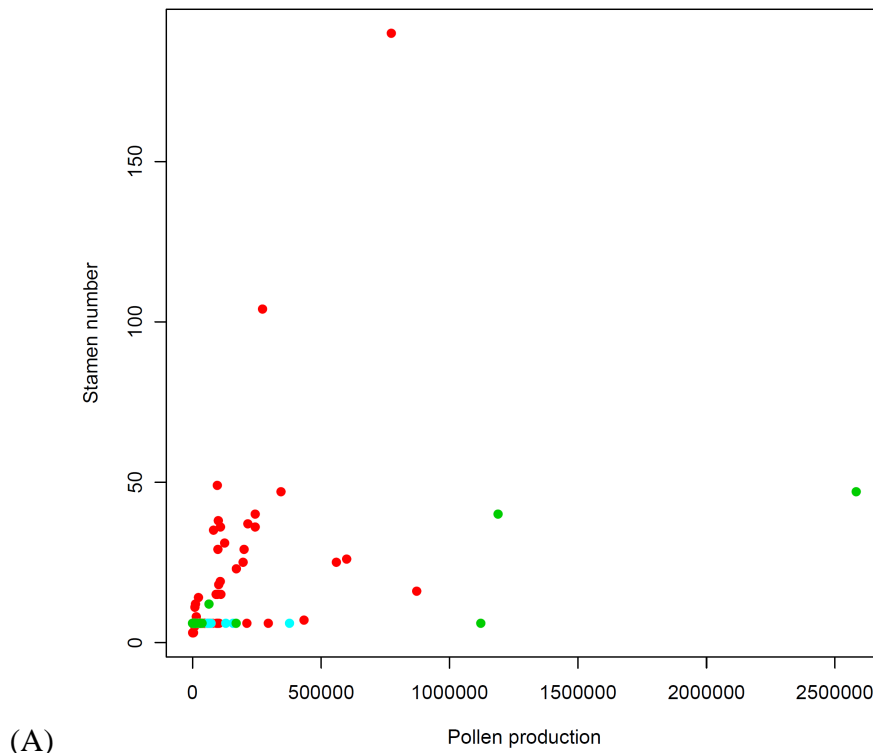
**Fig 1** Supertree from the analysis of Baker et al. (2009) showing the evolution of stamen number in palms optimized using Maximum Parsimony. (A) All subfamilies except Arecoideae. (B) Arecoideae (continuation of (A)). Boxes at the tip of branches are coloured according to the character state: White = less than 6 stamens, Blue = 6 stamens, Yellow = low polyandry (7-22 stamens), Red = moderate polyandry (23-114 stamens) and Black = high polyandry (more than 114 stamens). Branch colours correspond to the inferred ancestral state. Several colours on the same branch denote ambiguity in the ancestral state. Genera included, phylogenetic relationships and tribe names are according to Baker et al. (2009) and Couvreur et al (2011).



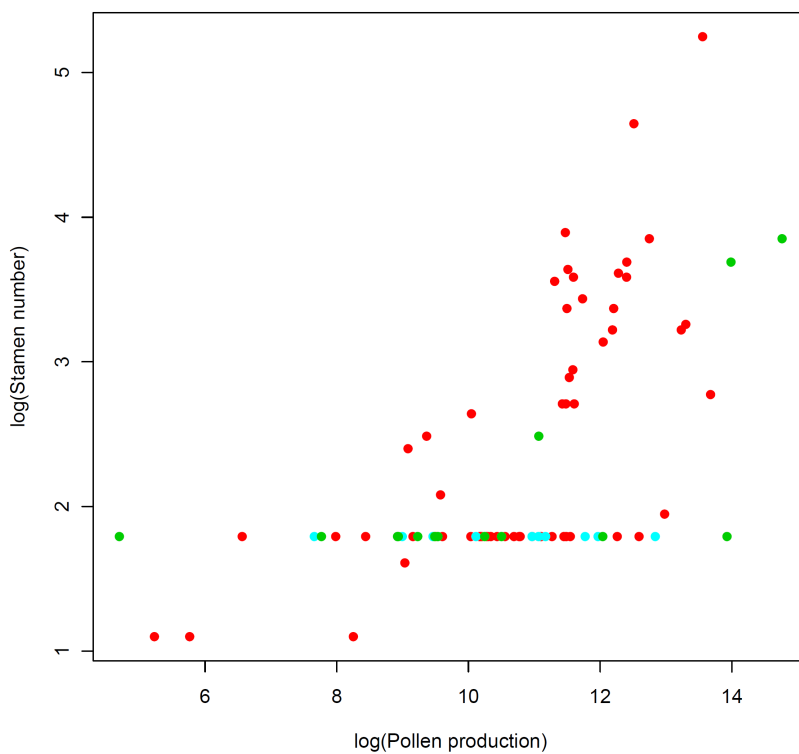
(B)



**Fig 2** Relationship between stamen number and pollen production (number of pollen grains); (A): untransformed data showing ranges and strong outliers; (B): log-transformed data. Blue dots correspond to individuals belonging to subfamily Calamoideae, green dots to subfamily Coryphoideae and red dots to subfamily Arecoideae.

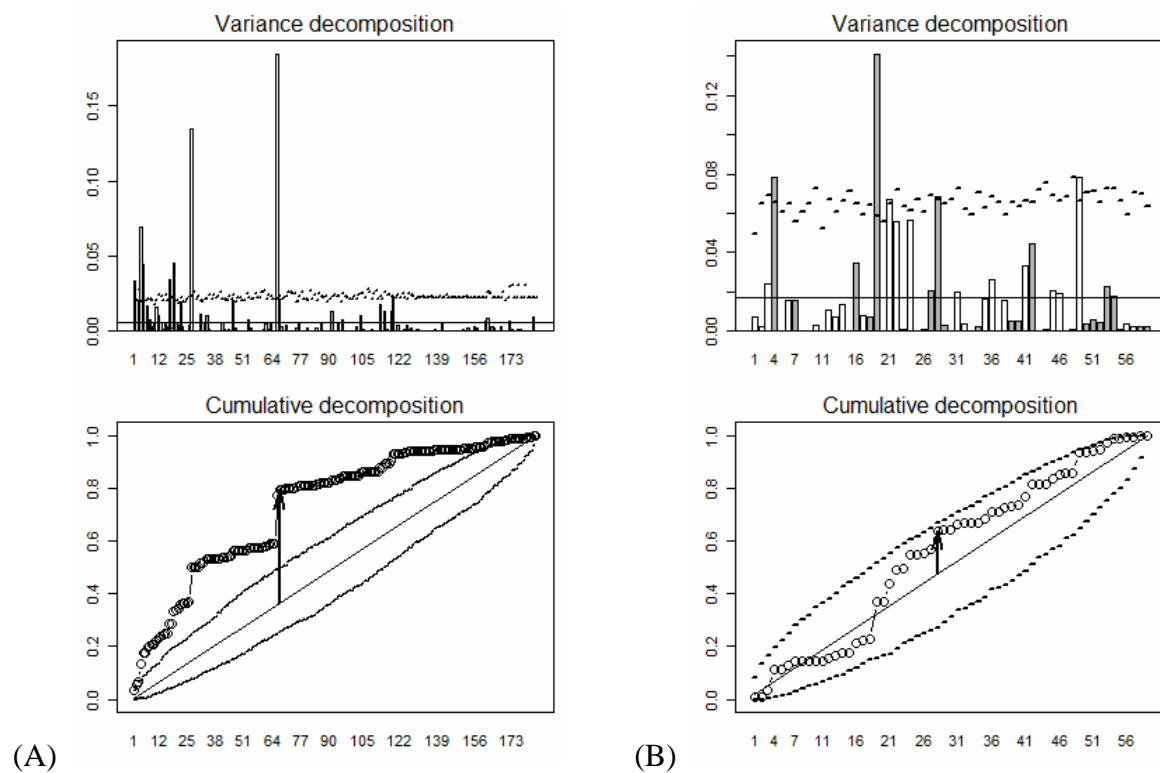


(A)



(B)

**Fig 3** (A) analysis of stamen number for 183 species (one per genera) of palms. (B) Analysis of pollen production for 59 species (one per genus). Top: variance decomposition orthogram plots; bottom: cumulative decomposition orthogram plots. In the orthogram plots bars are proportional to the squared coefficients (white and gray bars stand for positive and negative coefficients, respectively); the dashed line is the upper confidence limit at 5%, deduced from 999 Monte Carlo permutations (mean value indicated by the horizontal solid line). In the cumulative orthogram plots circles represent observed values of cumulated squared coefficients, expected values under H0 are along the straight line, and dashed lines stand for the bilateral confidence interval.



## Supplementary material

**Table 1** Taxonomic sampling for the correlation test between stamen number and pollen production. Sexual expression is specified. Stamen number and pollen production (number of pollen grains) for each flower of the 82 individual/species are presented. The last two columns give the mean value and standard-deviation for pollen production within an individual/species. AAU: Aarhus University herbarium; KEW: Royal Botanic Gardens Kew herbarium and spirit collection; Auteuil: Jardin Botanique de la Ville de Paris; Berlin: Botanischer Garten Berlin-Dahlem.



Subfamily	Genera	species	Reference	Sexual expression	Flower	Stamen Number	Number of pollen grains	Mean	Standard-deviation
Arecoideae	<i>Adonidia</i>	<i>merrillii</i>	KEW 54459	monoecious	1	43	95173	96097	22073
					2	55	118617		
					3	50	74500		
	<i>Adonidia</i>	<i>maturbongsii</i>	KEW Heatubum906	monoecious	1	26	32240	81828	46006
					2	43	123123		
					3	36	90120		
	<i>Aiphanes</i>	<i>erinacea</i>	AAU 62007	monoecious	1	6	15040	14860	610
					2	6	14180		
					3	6	15360		
	<i>Aiphanes</i>	<i>eggersii</i>	AAU 62012	monoecious	1	6	119480	97627	19229
					2	6	90100		
					3	6	83300		
	<i>Aiphanes</i>	<i>aculeata</i>	AAU 1956	monoecious	1	6	100300	66660	34705
					2	5	30980		
					3	6	68700		
	<i>Aiphanes</i>	<i>ulei</i>	AAU 62200	monoecious	1	6	12460	13427	2214
					2	6	11860		
					3	6	15960		
	<i>Aiphanes</i>	<i>verrucosa</i>	AAU 60179	monoecious	1	6	26880	26107	2511
					2	6	28140		
					3	6	23300		
<i>Archontophoenix</i>	<i>cunninghamiana</i>	KEW 18253	monoecious	1	10	1680	8823	10102	
				2	12	15967			
				NA	NA	NA			
<i>Areca</i>	<i>triandra</i>	AAU 41767	monoecious	1	3	4080	3840	216	
				2	3	3660			
				3	3	3780			
<i>Bactris</i>	<i>sp.</i>	AAU 60110	monoecious	1	12	12240	11702	2295	
				2	12	9185			
				3	12	13680			
<i>Bactris</i>	<i>setosa</i>	AAU 97661	monoecious	1	8	16460	14420	1816	
				2	8	13820			
				3	8	12980			
<i>Beccariophoenix</i>	<i>alfredii</i>	KEW 74668	monoecious	1	16	166187	110029	68896	
				2	15	130750			
				3	13	33150			
<i>Calyptrocalyx</i>	<i>leptostachys</i>	AAU 388	monoecious	1	13	26540	23100	4844	
				2	13	25200			
				3	15	17560			

Subfamily	Genera	species	Reference	Sexual expression	Flower	Stamen Number	Number of pollen grains	Mean	Standard-deviation	
Arecoideae	<i>Carpentaria</i>	<i>acuminata</i>	KEW 46653	monoecious	1	40	448533	215197	212177	
					2	36	33840			
					3	35	163217			
	<i>Chamaedorea</i>	<i>oblongata</i>	Auteuil		dioecious	1	6	40940	29053	10771
						2	6	19940		
						3	6	26280		
	<i>Chamaedorea</i>	<i>seifrizii</i>	Auteuil		dioecious	1	6	99440	94193	5517
						2	6	88440		
						3	6	94700		
	<i>Cocos</i>	<i>nucifera</i>	AAU 60025		monoecious	1	6	301200	211733	77518
						2	6	169400		
						3	6	164600		
	<i>Dictyosperma</i>	<i>album</i>	KEW 62141		monoecious	1	6	34720	27060	11173
						2	6	32220		
						3	6	14240		
	<i>Dypsis</i>	<i>pembana</i>	KEW 22418		monoecious	1	6	45660	38527	6199
						2	6	35480		
						3	6	34440		
	<i>Dypsis</i>	<i>pusilla</i>	KEW 55818		monoecious	1	6	2720	2933	908
						2	6	1560		
						3	6	3460		
					monoecious	4	6	4220		
						5	6	2480		
						6	6	3160		
	<i>Dypsis</i>	<i>mirabilis</i>	KEW 56118		monoecious	1	3	220	187	58
						2	3	220		
						3	3	120		
<i>Dypsis</i>	<i>baronii</i>	KEW 56129		monoecious	1	6	36680	31007	7234	
					2	6	33480			
					3	6	22860			
<i>Dypsis</i>	<i>bejofo</i>	KEW 54543		monoecious	1	6	52040	48427	3190	
					2	6	46000			
					3	6	47240			
<i>Dypsis</i>	<i>ambilaensis</i>	KEW 54871		monoecious	1	3	120	320	183	
					2	3	360			
					3	3	480			
<i>Euterpe</i>	<i>precatória</i>	AAU 6557		monoecious	1	6	45760	44100	1570	
					2	6	42640			
					3	6	43900			

Subfamily	Genera	species	Reference	Sexual expression	Flower	Stamen Number	Number of pollen grains	Mean	Standard-deviation
Arecoideae	<i>Geonoma</i>	<i>camana</i>	AAU 67212	monoecious	1	5	7200	8393	1105
					2	5	9380		
					3	5	8600		
	<i>Geonoma</i>	<i>densa</i>	AAU 67246	monoecious	1	6	29400	34093	4981
					2	6	33560		
					3	6	39320		
	<i>Heterospathe</i>	<i>dransfieldii</i>	KEW 47993	monoecious	1	6	1240	22850	30561
					2	6	44460		
					NA	NA	NA		
	<i>Howea</i>	<i>belmoreana</i>	KEW 43747	monoecious	1	42	323540	343957	50295
					2	54	307080		
					3	45	401250		
	<i>Hydriastele</i>	<i>valida</i>	AAU 389	monoecious	1	16	115000	91953	33858
					2	15	53080		
					3	15	107780		
	<i>Hyospathe</i>	<i>macrorhachis</i>	AAU 60647	monoecious	1	6	9400	9513	306
					2	6	9280		
					3	6	9860		
	<i>Iguanura</i>	<i>wallichiana</i>	AAU 41329	monoecious	1	6	38840	47610	12403
					2	6	56380		
					NA	NA	NA		
<i>Iriartea</i>	<i>deltoidea</i>	AAU 60097	monoecious	1	15	877800	872267	134985	
				2	16	734600			
				3	17	1004400			
<i>Nenga</i>	<i>pumila</i>	AAU 43826	monoecious	1	6	57520	58170	919	
				2	6	58820			
				NA	NA	NA			
<i>Oenocarpus</i>	<i>mapora</i>	AAU 60102	monoecious	1	6	241400	294533	61036	
				2	6	281000			
				3	6	361200			
<i>Orania</i>	<i>longisquama</i>	KEW 29047.86†	monoecious	1	15	118950	96900	19097	
				2	15	86100			
				3	15	85650			
<i>Orania</i>	<i>ravaka</i>	KEW 55916	monoecious	1	26	620100	599697	24009	
				2	25	605750			
				3	26	573240			
<i>Phoenicophorium</i>	<i>borsigianum</i>	KEW 22900	monoecious	1	18	112440	101960	16718	
				2	18	110760			
				3	18	82680			

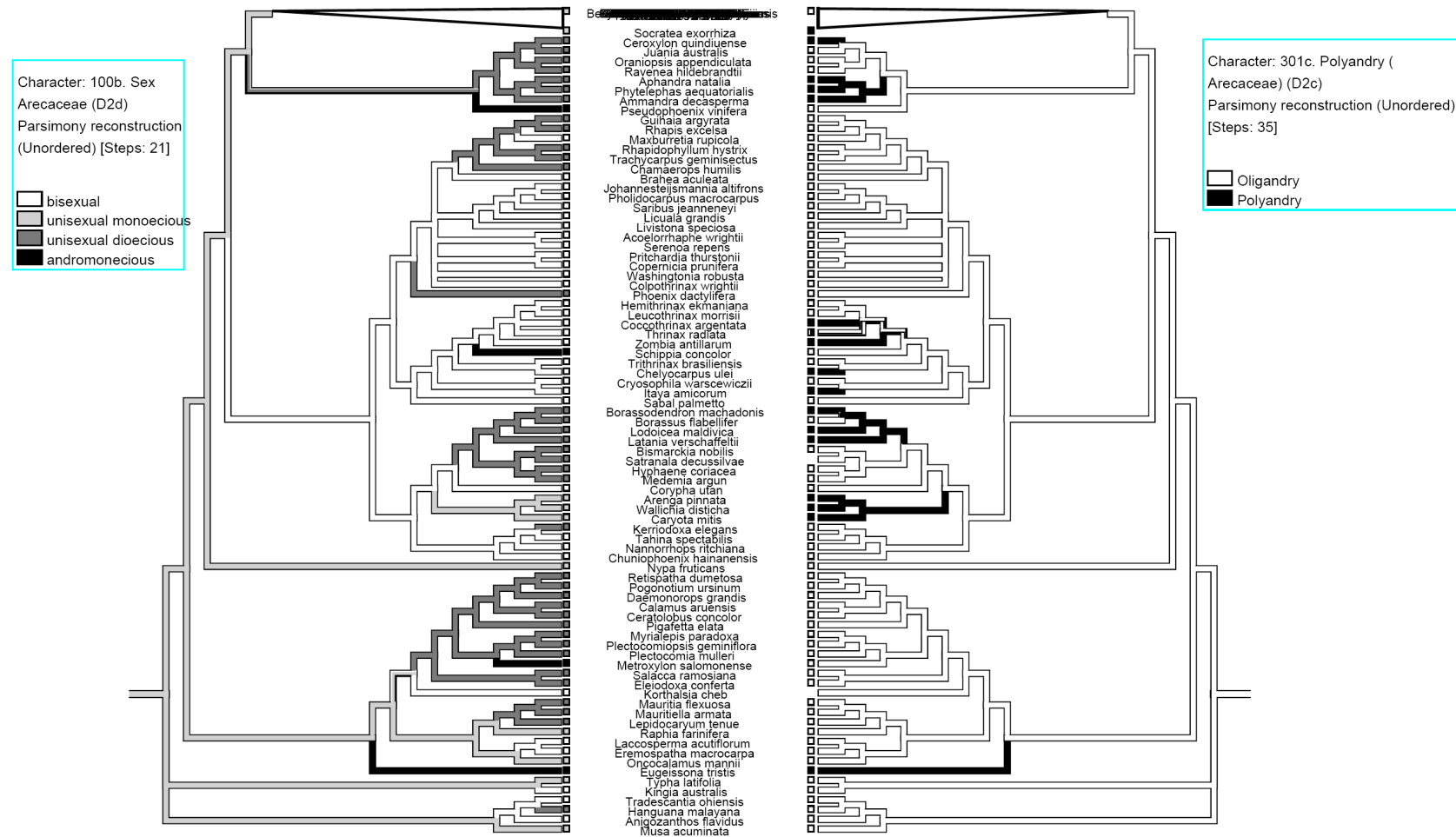
Subfamily	Genera	species	Reference	Sexual expression	Flower	Stamen Number	Number of pollen grains	Mean	Standard-deviation
Arecoideae	<i>Pholidostachys</i>	<i>dactyloides</i>	AAU 60677	monoecious	1	6	115360	103540	14990
					2	6	108580		
					3	6	86680		
	<i>Pinanga</i>	<i>disticha</i>	KEW 53741	monoecious	1	21	122220	107882	15939
					2	16	90720		
					3	19	110707		
	<i>Pinanga</i>	<i>curranii</i>	KEW 48207	monoecious	1	21	114800	170606	57064
					2	23	228850		
					3	25	168167		
	<i>Pinanga</i>	<i>coronata</i>	KEW 29047.96†	monoecious	1	25	228667	196902	28852
					2	24	172320		
					3	27	189720		
	<i>Ponapea</i>	<i>ledermanniana</i>	KEW 64789	monoecious	1	109	349890	272142	97176
					2	102	163200		
					3	101	303337		
	<i>Prestoea</i>	<i>decurrens</i>	AAU 48354	monoecious	1	6	69800	78520	7553
					2	6	82740		
					3	6	83020		
	<i>Ptychococcus</i>	sp.	KEW 64051	monoecious	1	178	656820	773883	158631
					2	211	954423		
					3	182	710407		
	<i>Ptychosperma</i>	<i>lineare</i>	KEW 63986	monoecious	1	29	208413	200624	45473
					2	28	151760		
					3	30	241700		
	<i>Ptychosperma</i>	<i>waitianum</i>	KEW Gardiner292	monoecious	1	38	258907	243802	14095
					2	35	241500		
					3	35	231000		
<i>Ptychosperma</i>	<i>gracile</i>	KEW Gardiner298	monoecious	1	34	146313	125071	19215	
				2	27	108900			
				3	32	120000			
<i>Ptychosperma</i>	<i>elegans</i>	KEW 48132	monoecious	1	28	103787	98596	15372	
				2	30	110700			
				3	30	81300			
<i>Ptychosperma</i>	<i>salomonense</i>	KEW Gardiner296	monoecious	1	38	176573	108742	59250	
				2	37	67093			
				3	32	82560			
<i>Ptychosperma</i>	<i>schefferii</i>	KEW 75021	monoecious	1	38	82333	99982	15284	
				2	38	108807			
				3	38	108807			

Subfamily	Genera	species	Reference	Sexual expression	Flower	Stamen Number	Number of pollen grains	Mean	Standard-deviation
Calamoideae	<i>Oncocalamus</i>	<i>mannii</i>	KEW 64216	monoecious	1	6	11820	12860	3075
					2	6	10440		
					3	6	16320		
	<i>Pigafetta</i>	<i>filaris</i>	KEW 48699	dioecious	1	6	65720	64020	7085
					2	6	70100		
					3	6	56240		
	<i>Plectocomia</i>	<i>elongata</i>	KEW 45827	dioecious	1	6	151320	158020	5897
					2	6	160320		
					3	6	162420		
	<i>Plectocomiopsis</i>	<i>geminiflora</i>	KEW 45928	dioecious	1	6	2140	2120	28
					2	6	2100		
					NA	NA	NA		
Coryphoideae	<i>Arenga</i>	<i>listeri</i>	KEW 53951	monoecious	1	42	1278760	1188907	126567
					2	32	1044160		
					3	45	1243800		
	<i>Caryota</i>	<i>urens</i>	Berlin	monoecious	1	43	1874800	2582933	766369
					2	44	2477400		
					3	54	3396600		
	<i>Chuniophoenix</i>	<i>nana</i>	KEW 63005	hermaphroditic	1	6	6180	7600	1711
					2	6	9500		
					3	6	7120		
	<i>Hyphaene</i>	<i>coriacea</i>	KEW 26158	dioecious	1	6	6480	7520	1471
					2	6	8560		
					NA	NA	NA		
	<i>Johannesteijsmannia</i>	<i>altifrons</i>	KEW 45897	hermaphroditic	1	6	178060	169840	9824
					2	6	158960		
					3	6	172500		
	<i>Licuala</i>	<i>glabra</i>	AAU 43893	hermaphroditic	1	6	10420	10227	1063
					2	6	11180		
					3	6	9080		
	<i>Livistona</i>	<i>chinensis</i>	AAU 43885	hermaphroditic	1	6	3080	2367	631
					2	6	1880		
					3	6	2140		
	<i>Nannorrhops</i>	<i>ritchiana</i>	KEW 29047.34	hermaphroditic	1	6	28980	13247	14206
					2	6	1360		
					3	6	9400		
<i>Phoenix</i>	<i>paludosa</i>	AAU 45207	dioecious	1	6	1328800	1122067	259249	
				2	5	1206200			
				3	6	831200			

Subfamily	Genera	species	Reference	Sexual expression	Flower	Stamen Number	Number of pollen grains	Mean	Standard-deviation
Coryphoideae	<i>Pritchardia</i>	<i>mitiaroana</i>	KEW 62013	hermaphroditic	1	6	10420	13873	3460
					2	6	13860		
					3	6	17340		
	<i>Rhapis</i>	<i>excelsa</i>	KEW 51382	dioecious	1	6	35860	28207	7022
					2	5	22060		
					3	6	26700		
	<i>Sabal</i>	<i>bermudana</i>	KEW 74899	hermaphroditic	1	6	120	110	17
					2	6	90		
					3	6	120		
	<i>Trachycarpus</i>	<i>fortunei</i>	KEW 62808	dioecious	1	6	34620	36460	2511
					2	6	39320		
					3	6	35440		
	<i>Wallichia</i>	<i>caryotoides</i>	KEW 63061	monoecious	1	12	34280	64187	31898
					2	12	97760		
					3	12	60520		

**Table 2 Proteus file (voir Annexe 3 du manuscrit)**

**Figure 1: Mirror trees showing the MP optimisation of the evolution of stamen number (left) and sexual system (right) (A) All subfamilies except Arecoideae. (B) Subfamily Arecoideae.**









**Chapitre 3 :**  
**Evolution du nombre d'étamines**  
**chez les Ptychospermatinae**



## Contexte et objectifs de l'étude

Notre étude sur le nombre d'étamines à l'échelle de la famille des palmiers (présentée dans le chapitre 2), a mis en évidence des groupes de taxons dans lesquels le caractère évolue de manière intéressante à étudier. C'est le cas notamment pour une partie de la tribu des Areceae (Arecoideae), la sous-tribu des Ptychospermatinae, originaires de la région Sud-Ouest de l'océan pacifique (Fig. 10).

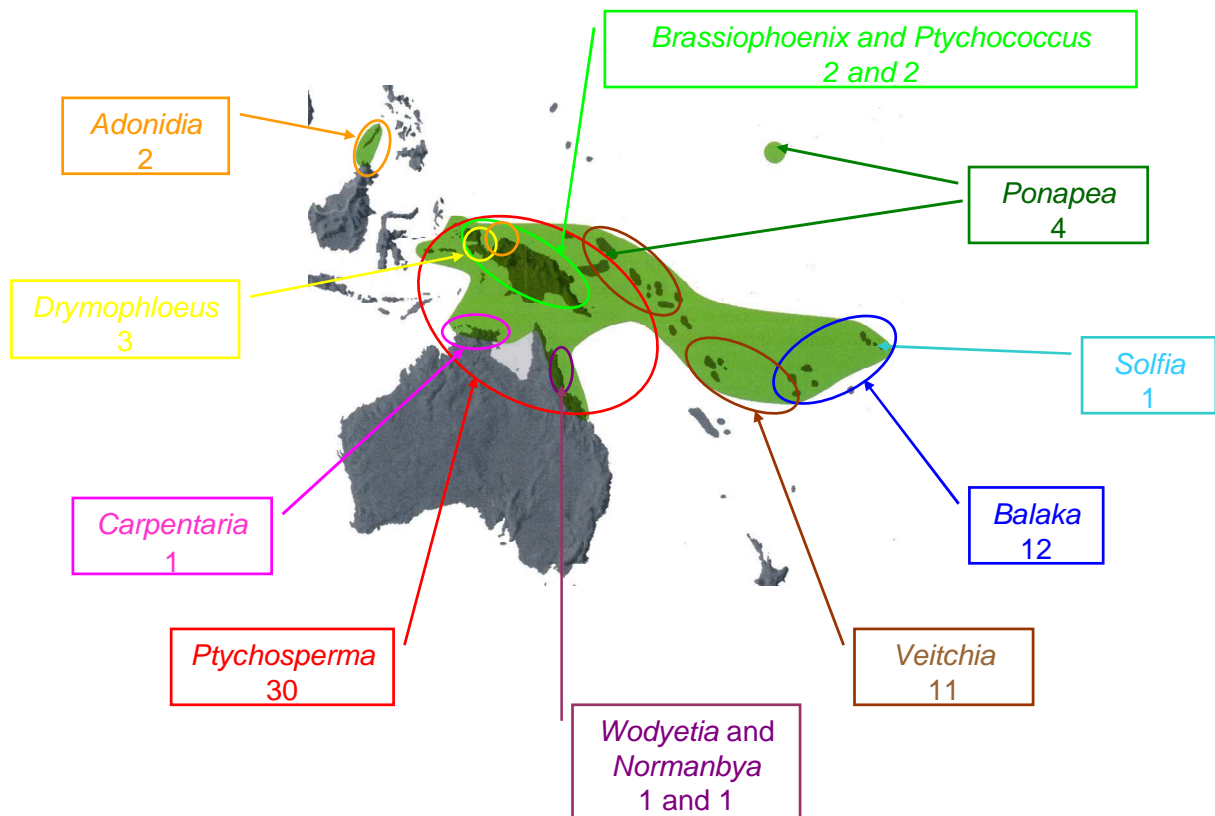


Fig. 10 : Distribution de la sous-tribu des Ptychospermatinae dans la région Sud-Ouest de l'océan pacifique (modifié à partir de Dransfield et al. 2008)

Elle regroupe douze genres et environ soixante espèces qui sont toutes polyandres. Pour reconstruire l'évolution du nombre d'étamines au sein de cette sous-tribu un cadre phylogénétique était nécessaire. Une phylogénie moléculaire incluant 60% des espèces a précédé notre étude (Zona et al. 2011). Néanmoins certaines relations phylogénétiques n'étaient pas encore bien résolues. Nous avons donc réalisé une phylogénie moléculaire de cette sous-tribu, basée sur différents marqueurs nucléaires et chloroplastiques.

Cette étude constitue un article de recherche dont les objectifs sont : (1) d'améliorer la résolution des relations phylogénétiques entre les espèces et les genres de la sous-tribu des Ptychospermatinae ; (2) d'utiliser le cadre phylogénétique ainsi obtenu pour reconstruire l'histoire évolutive du caractère « nombre d'étamines » à l'échelle de la sous-tribu.

## **Choix des marqueurs moléculaires**

Le choix des marqueurs moléculaires est une étape cruciale des analyses phylogénétiques. Suivant leur niveau de variabilité ils fournissent les informations nécessaires pour réaliser des phylogénies à différents niveaux taxonomiques, ordres, familles, genres ou espèces. Il est donc important de choisir des marqueurs adaptés à la phylogénie que l'on veut réaliser, dans notre cas une phylogénie au niveau espèce incluant douze genres.

*Les marqueurs chloroplastiques* : chez les palmiers, les séquences d'ADN semblent évoluer relativement lentement par rapport à d'autres familles. Un certain nombre de marqueurs qui sont informatifs chez d'autres groupes d'Angiospermes, se révèlent insuffisants pour réaliser des phylogénies résolues au niveau des espèces. C'est notamment le cas des marqueurs issus du génome chloroplastique. Plusieurs études ont montré que les séquences d'ADN chloroplastique évoluent plus lentement chez les palmiers que chez les autres groupes de monocotylédones (Gaut et al. 1992). Ces études basées sur le gène *rbcl* ont montré notamment que le taux de substitutions moyen était environ cinq fois plus important chez les Poaceae que chez les palmiers (huit fois plus s'il on considère la troisième position des codons). Ceci pourrait s'expliquer par la très grande différence de temps de génération entre les Poaceae et les Arecoaceae. Ces études ne se basant que sur un seul gène, n'ont pas dissuadé les chercheurs de trouver d'autres gènes ou des séquences non codantes chloroplastiques pouvant être suffisamment variables. Les premières phylogénies à l'échelle de la famille des palmiers ont ainsi utilisé des marqueurs chloroplastiques tels que l'intron *rps16*, les régions *trnL-trnF* (Asmussen et Chase 2001) ou *matK* (Asmussen et al. 2006), en plus du gène *rbcl*. Ces études ont montré que si en moyenne les séquences chloroplastiques codantes et non codantes présentaient le même nombre de sites informatifs, les dernières étaient caractérisées par un taux d'homoplasie plus faible et devaient donc être préférées aux premières. Elles ont aussi démontré que ces marqueurs sont peu informatifs, produisant des phylogénies au niveau genre avec de nombreuses polytomies, notamment au sein de la sous-famille des Arecoideae. Cependant une étude de la tribu des Chamaedoreae (Cuenca et Asmussen-Lange 2007) a

obtenu une même qualité de résolution avec des marqueurs chloroplastiques non-codant (*matK*, l'intron *rps16*, *ndhF* et *trnD-trnT*) qu'une autre étude avec des marqueurs nucléaires (Thomas et al. 2006). En 2009, les marqueurs *matK* et *rbcl* ont été choisis comme marqueurs de base pour le barcode chez les plantes (CBOL 2009). Récemment une étude à l'échelle des monocotylédones a visé à sélectionner de nouveaux marqueurs chloroplastiques potentiellement intéressants pour renouveler le petit nombre de marqueurs communément utilisés (Scarcelli et al. 2011). Ils ont ainsi développé 100 paires de primers utilisables chez la plupart des monocotylédones et explorant les différentes parties du génome chloroplastique. Ces nouveaux marqueurs offrent la possibilité d'améliorer la résolution des phylogénies en apportant l'information de nouveaux sites variables.

*Les marqueurs nucléaires* : les premiers marqueurs nucléaires largement utilisés chez les plantes sont issus des gènes codant pour les sous-unités des ribosomes et des séquences avoisinantes (région 18S-5.8S-26S). Si les séquences codant pour les séquences d'ARN fonctionnel ont été modérément utilisées, les séquences codant pour l'ARN non-fonctionnel (internal transcribed spacer ou ITS) sont à l'origine de très nombreuses études phylogénétiques (Hughes et al. 2006). Chez les palmiers la région 18S a été le support d'une des premières études à l'échelle de la famille (Hahn 2002) sans apporter une résolution suffisante pour une phylogénie au niveau espèce. La région ITS se divise en deux parties suivant sa position de part et d'autre de la séquence du 5.8S : 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S. Le séquençage des deux régions ITS est parfois difficile (Hollingsworth 2011) ; il est alors possible de ne séquencer que la partie ITS2 qui semble la plus informative pour discriminer les relations phylogénétiques entre espèces (Chen et al. 2010). Cette séquence est ainsi de plus en plus proposée pour compléter *matK* et *rbcl*, les deux marqueurs de base du barcode, et cela notamment chez les palmiers (Chen et al. 2010 ; Jeanson et al. 2011b). Chez ces derniers, les séquences ITS ont été utilisées dans trois sous-familles, les Calamoideae (Baker et al. 2000), les Coryphoideae (Jeanson et al. 2011b) et les Arecoideae (Eiserhardt et al. 2011). Chez les Calamoideae un fort taux de polymorphisme intra-individuel a été identifié, rendant le clonage de différentes versions de la séquence nécessaire. En effet, la région codant pour les ARN ribosomiaux est présente en plusieurs centaines ou milliers de copies qui sont répétées en tandem sur une ou plusieurs régions chromosomiques. Ces différentes copies évoluent en générale de façon identique (« concerted evolution ») par des mécanismes tels que des crossing-over inégaux et un fort taux de conversion génique qui aboutissent à la réduction ou la disparition des variations entre les séquences d'une même famille multigénique. Mais

parfois lorsque l'homogénéisation n'est pas terminée des copies divergentes peuvent constituer des orthologues et des paralogues. Ce réseau de paralogues peut alors poser des problèmes de séquençage et de reconstruction phylogénétique (Alvarez et Wendel 2003 ; Bailey et al. 2003). Chez les Coryphoideae, l'absence d'un double signal sur les résultats de séquençage, laisse penser qu'il n'existe pas dans ce groupe de paralogues divergent (Jeanson et al. 2011b).

Ces incertitudes concernant la fiabilité des informations fournies par la région ITS, ont poussé les scientifiques à concentrer leurs recherches vers des gènes nucléaires possédant une ou un faible nombre de copies (single copy or low-copy nuclear genes ; Alvarez et Wendel 2003, Hughes et al. 2006). Puisqu'ils sont présent en faible nombre de copies ces gènes sont parfois plus difficile à amplifier mais plus fiable concernant l'interprétation de leur évolution. Très tôt dans l'histoire des phylogénies des palmiers, les gènes nucléaires à faible nombre de copies ont été considérés comme la source la plus importante et la plus intéressante de marqueurs moléculaires (Lewis et Doyle 2001). Lewis et Doyle (2001, 2002) ont caractérisé deux marqueurs, une portion du gène de la malate synthase (MS) et du gène de la phosphoribulokinase (PRK). Ce dernier à été le plus utilisé, souvent en association avec une portion de la séquence codant pour la deuxième sous-unité de l'ARN polymérase II (RPB2). Ils ont particulièrement contribué à améliorer des connaissances des relations phylogénétiques au sein de la famille (Roncal et al. 2005, Loo et al. 2006, Savolainen et al. 2006, Norup et al. 2006, Thomas et al. 2006, Trénel et al. 2007, Cuenca et al. 2008, Roncal et al. 2008, Baker et al. 2011, Zona et al. 2011). Récemment, de nouveaux marqueurs ont été caractérisés chez les palmiers pour leurs fonctions liées à la morphogénèse et à la réponse à un stimulus environnemental, respectivement AGAMOUS (AG1) et PHYTOCHROME B (PHYB ; Ludena et al. 2011). Leur histoire évolutive pourrait refléter l'existence de réponses adaptatives particulières, testés chez les Cocoseae.

De nouvelles approches ont été développées pour identifier des séquences non codantes du génome nucléaire pouvant être d'intéressants marqueurs phylogénétiques et notamment une méthode dans laquelle des génomes entiers d'organismes modèles sont comparés pour identifier des régions conservées (« CATS » pour « comparative anchor tagged sequences »). Des primers sont dessinés à partir de ces séquences et testés sur des représentants du groupe d'intérêt pour estimer le niveau de variabilité de ces séquences (Hughes et al. 2006). Cette méthode a été utilisée chez les palmiers avec des primers dessinés à partir de génomes de monocotylédones (Bacon et al. 2007). Elle a permis d'identifier sept marqueurs permettant de reconstruire des phylogénies à l'échelle des sous-familles et quatre marqueurs à l'échelle de

genres apparentés. D'autres méthodes existent, décrites par Hughes et al. (2006), mais n'ont pas, à notre connaissance, été mises en œuvre chez les palmiers.

*Choix des marqueurs pour la phylogénie des Ptychospermatinae* : lorsque nous avons commencé notre étude, une phylogénie des Ptychospermatinae avait déjà été réalisée à partir de deux marqueurs nucléaires PRK et RPB2 (Zona et al. 2011). Celle-ci était assez bien résolue au niveau genre, mais de nombreux clades n'étaient pas soutenus, notamment au niveau de relation entre espèces. Il était donc nécessaire d'ajouter des marqueurs pour améliorer la résolution. Il nous semblait intéressant de tester des marqueurs chloroplastiques, ce qui n'avait jamais été fait sur un large échantillon de la sous-tribu. En outre le génome chloroplastique étant transmis d'un seul tenant et uniquement par la graine, il ne subit pas de recombinaison et peut ainsi révéler une histoire évolutive un peu différente de celle des séquences nucléaires. Il est ainsi intéressant de les comparer et de combiner les informations qu'ils apportent. Nous avons donc choisi les deux marqueurs qui s'étaient révélés les plus informatifs dans l'étude des Chamaedoreae (Cuenca et Asmussen-Lange 2007), *matK* et *ndhF*. Après une analyse préliminaire sur 14 espèces, *ndhF* a été abandonné en raison de son très faible taux de sites variables (4 sites variables sur 615) étaient variables. Nous avons donc décidé de le remplacer par deux marqueurs récemment identifiés, l'intron de *ndhA* et l'intron de *rps15-ycf1* (Scarcelli et al. 2011). La plupart des marqueurs chloroplastiques auparavant sélectionnés, dont *matK* et *ndhF*, sont situés dans une région du génome appelée « Large Single Copy » (LSC) alors que ces nouveaux marqueurs sont situés dans la région « Small Single Copy » (SSC) et semblent plus variables.

L'intérêt des marqueurs nucléaires ayant été largement démontré dans le passé, nous les avons logiquement inclus dans notre étude. Nous avons tout d'abord décidé de compléter le jeu de donner de Zona et al. (2011), en séquençant PRK et RPB2 pour les nouvelles espèces de notre étude. Cependant l'important taux d'échec pour l'amplification de RPB2 nous a contraints à abandonner ce marqueur. Un autre gène nucléaire à faible nombre de copies, a été sélectionné parmi les nouveaux identifiés, AGAMOUS (AG1 ; Ludena et al. 2011). Nous l'avons choisi pour son taux de variabilité chez les Bactridinae (6.1% de sites informatifs).



## Synthèse des résultats

La combinaison de l'information de quatre marqueurs nucléaires (AGAMOUS 1, BRSC10, nrITS2 et PRK) et de trois marqueurs chloroplastiques (*matK*, *ndhA*, *rps15-ycf1*) a permis d'améliorer la résolution des relations phylogénétiques entre les espèces des Ptychospermatinae. Les marqueurs chloroplastiques se révèlent néanmoins beaucoup moins informatifs que les marqueurs nucléaires dans cette sous-tribu. Notre étude a confirmé la monophylie des Ptychospermatinae et a permis de distinguer sept grands clades. En revanche, certaines relations phylogénétiques ne sont pas encore résolues, notamment entre les espèces du genre *Ptychosperma*. L'utilisation de marqueurs de type microsatellites dans une approche de génétique des populations pourrait peut-être permettre de comprendre la très faibles variation des séquences étudiés entre ces espèces.

La phylogénie obtenue a été utilisé pour reconstruire l'évolution du caractère « nombre d'étamines » dans cette sous-tribu. Les données sur le nombre d'étamines des différentes espèces, disponibles dans la littérature, ont été rassemblées. Des observations ont été également réalisées sur des fleurs provenant d'herbiers. La reconstruction du caractère révèle une grande variabilité inter-spécifique. A partir d'un ancestral modérément polyandre (entre 20 et 60 étamines), plusieurs augmentations vers un nombre plus important d'étamines (autour d'une centaine) ont eu lieu durant l'histoire évolutive de la sous-tribu. Ce travail constitue un cadre phylogénétique pour de futures études sur le développement, le contrôle génétique des étamines nombreuses, mais aussi sur l'écologie et notamment la pollinisation de ces espèces.

L'article de recherche présenté dans ce chapitre sera soumis très prochainement au journal « Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics ».

Une étude similaire a été effectuée chez une autre sous-tribu des Areceae : les Archontophoenicinae. Les résultats de ce travail font l'objet d'un autre article qui est présenté en Annexe 4 du manuscrit.

## **Article 3**



# **Evolution of stamen number in Ptychospermatinae (Arecaceae): insights from a new molecular phylogeny of the subtribe.**

Elodie Alapetite<sup>1</sup>, William J. Baker<sup>2</sup>, Sophie Nadot<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Univ Paris-Sud, Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, UMR 9079, Orsay, F-91405, France

<sup>2</sup>Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AB, UK,

<sup>3</sup>Author for correspondence: [sophie.nadot@u-psud.fr](mailto:sophie.nadot@u-psud.fr)

## **Abstract**

The subtribe Ptychospermatinae (palm family) is naturally distributed in the South West Pacific area and contains 12 genera and around 60 species, including numerous popular ornamentals. Like many palms, Ptychospermatinae flowers are small, trimerous, unisexual and always grouped into inflorescences of various sizes. However they exhibit a wide diversity in stamen number (a few units to several dozens or even hundreds of units) that is poorly understood from an evolutionary point of view. Although advances have been made in elucidating phylogenetic relationships within Ptychospermatinae, some relationships among and within genera still remain to be clarified. Here we used a combination of four nuclear markers (nrITS2, the conserved nuclear intron BRSC10 and two low copy genes, PRK and AGAMOUS) and three chloroplast markers (*matK*, *ndhA* and *rps15-ycf1*) to propose a new phylogenetic hypothesis for the subtribe. The combination of all these markers improved the resolution and robustness of phylogenetic relationships within the subtribe, allowing us to identify seven major clades. This phylogenetic framework was used to examine the evolution of stamen number in the clade. The optimisation of stamen number on the phylogeny

highlighted the high level of inter-specific variability, showing that the character is highly labile and raising questions about the evolutionary and functional significance of this lability.

**Keywords:** androecium, Arecaceae, Areceae, phylogeny, palms, Palmae, Ptychospermatinae, stamen number, AGAMOUS, PRK, low-copy nuclear DNA

## Introduction

Over the last few decades, thanks to easy access to molecular characters, our knowledge of phylogenetic relationships between species has increased, providing useful frameworks to study evolutionary trends in morphological and ecological traits. In particular, the evolution of floral morphology has provoked great interest (e.g., Endress, 2011) since the flower is considered to be the key to the evolutionary success of Angiosperms.

In Palms (Arecaceae) flowers are usually small (generally less than 1 cm across) and have the typical trimerous groundplan of most monocot flowers, with three sepals, three petals and one or three carpels (Dransfield et al., 2008). There is a wide variation in androecium features and especially in stamen number. A recent study optimized the character “stamen number” on the genus-level phylogeny of the palm family (Nadot et al., 2011). From an ancestral state with six stamens (twice the perianth merism), both reduction and increase have occurred. Ten genera (of 183) include species with the number reduced to 3 stamens, and 84 genera include species displaying more than 6 stamens. Polyandry (more than 6 stamens) is thus quite common in palms and stamen number can reach large values (several dozen to several hundreds). If the transitions towards polyandry from the ancestral state with 6 stamens are now identified among genera, the patterns of transitions among polyandrous species are still poorly understood. Within Arecoideae (the largest subfamily of palms), the subtribe Ptychospermatinae (tribe Areceae) includes exclusively genera that produce polyandrous flowers (Supplementary Table 1), with a number of stamens varying between 12 and 320. This subtribe represents a good candidate to examine the patterns of variation in stamen number among polyandrous species and to test whether particular trends can be detected.

The subtribe Ptychospermatinae (Arecaceae: Arecoideae: Areceae; Hooker, 1883) comprises 12 genera and around 60 species (Dransfield et al., 2008; PalmWeb, 2013). They are naturally widespread in East Malesia (Moluccas, New Guinea, Solomon Islands, Vanuatu) extending to

Fiji, Tonga, Samoa and Northern Australia. Two genera, *Adonidia* and *Ponapea*, are more distant from the main distribution area. The one species of *Adonidia* are found west of Wallace's Line, on the island of Palawan and its offshore islands (Philippines) and on the coast of Sabah (Borneo), and three species of *Ponapea* species are found in the Caroline Islands (Pohnpei and Palau). Ptychospermatinae palms are rarely used as primary resources by local populations, but the stems are sometimes used as timber (e.g. *Ptychococcus*), or as food (e.g. *Veitchia* heart). However many species of the subtribe make elegant ornamentals widely planted throughout the tropics and subtropics (e.g. *Adonidia merrillii*, *Balaka seemannii*, *Carpentaria acuminata*, *Normanbya normanbyi* or *Wodyetia bifurcata*; Dransfield et al. 2008). The IUCN Red List of Threatened Species (<http://www.iucnredlist.org/>) classifies two species as critically endangered in their natural habitat, *Balaka macrocarpa* and *Solfia samoensis* (formerly *Drymophloeus samoensis*). The habitat of *Balaka macrocarpa* has been severely reduced due to the conversion of land to agriculture and forestry plantations (Fuller 1998; Hodel 2010). *Solfia samoensis* is a rare palm of montane cloud forests, threatened mostly by natural disasters (Whistler & Johnson 1998). The recently discovered species *Ptychosperma halmaherensis*, although not yet included in the Red List, is also considered as critically endangered due to the small size of the population (Heatubun 2011). Two other species are endangered due to rapid and extensive deforestation for plantation agriculture, *Ptychosperma gracile* and *Drymophloeus hentyi* (formerly *Ptychosperma hentyi*; Essig 1978). *Wodyetia bifurcata* is protected within the Cape Melville National Park (Australia; Dowl 1998) and *Adonidia matorbongsii* in the North Biak Nature Reserve (Indonesia, Papua; Baker and Heatubun, 2012).

In the past decades, there has been an important effort in delimiting genera and species of the subtribe, resulting in numerous taxonomic revisions (Essig 1978; Irvine 1983; Zona & Essig 1999; Zona & Fuller 1999; Zona 1999b, 2005; Hodel 2010). The monophyly of the subtribe is

strongly supported by morphology (Zona 1999a). Synapomorphies include black scales at the apex of the leaf sheath, leaf segment tip erose, peduncular bract that pierces the tip of prophyll, lag time between peduncular bract fall and anthesis, bullet-shape staminate buds (more or less perpendicular to rachilla), numerous stamens and a pistillode usually bottle shaped. Within the subtribe, the limited variation in morphological characters makes synapomorphies difficult to identify, resulting in low morphological support for genera (Zona, 1999a). The latter study supported however the reinstatement of two monotypic genera, *Adonidia* (previously included in *Veitchia*) and *Solfia* (previously included in *Drymophloeus*). In the first molecular phylogenies of palms including several members of the subtribe, the monophyly of Ptychospermatinae was not retrieved (Asmussen and Chase, 2001; Hahn, 2002). In 2006, two studies based respectively on plastid and nuclear markers (Asmussen et al., 2006; Norup et al., 2006) increased the taxonomic sampling and identified Ptychospermatinae as potentially monophyletic (with moderate support). In the complete generic-level phylogenetic analysis of palms published by Baker et al. (2009), the subtribe was resolved as monophyletic with 100% bootstrap support. In a large survey of phylogenetic relationship among arecoid palms (Baker et al., 2011) based on sequences of the two low-copy nuclear genes PRK and RPB2 and including 16 species of Ptychospermatinae, the subtribe was resolved as monophyletic with good support (82% maximum parsimony bootstrap support and 88% maximum likelihood bootstrap support). Zona et al. (2011) recently produced the first molecular phylogeny focused on the subtribe, based also on PRK and RPB2 and including 37 species from 12 genera. The results confirmed the monophyly of Ptychospermatinae with strong support, and identified six major clades. They also found that the genera *Drymophloeus*, *Ponapea* and *Veitchia* were non-monophyletic. They proposed consequently to rearrange species among these genera. Although this study provided notable



improvement in our knowledge of the evolutionary history of the subtribe, there were several polytomies in the tree and some nodes were poorly supported.

Choosing DNA regions with the appropriate rate of variation to address issues on phylogenetic relationships among taxa is crucial and depends on the taxonomic level of the study. Rapidly evolving DNA sequences are required for studying closely related species. Until recently, the majority of species-level phylogenies in plants relied on a limited set of non-coding plastid DNA loci (Hughes et al. 2006) because they are potentially variable at low taxonomic levels and easy to amplify using universal (for plants) primers. It has been demonstrated that plastid DNA sequences evolve slowly in palms compared to other monocot groups (Wilson et al., 1990; Gaut et al., 1996; Asmussen and Chase 2001). However Cuenca and Asmussen-Lange (2007) challenged this statement and suggested that the evolution of plastid sequences in palms is complex and may vary among groups within the family. As a consequence we chose to use a combination of seven markers from both the nuclear and plastid genomes. Four markers were nuclear sequences: the AGAMOUS 1 (AG1) gene, the beta-carotene hydroxylase gene partial sequence (BRSC10), the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nrITS2) and intron 4 of the phosphoribulokinase (PRK) gene. Three plastid markers were added: the *matK* pseudogene, and the introns of *ndhA* and *rps15-ycf1*. Some of these DNA sequences have been widely used in phylogenetic analyses of palms, like PRK (e.g. Lewis & Doyle 2002; Zona et al. 2011) and *matK* (e.g. Asmussen et al. 2006). The other markers were chosen because there were considered to be potentially variable enough to be useful for infra-generic reconstruction in palms (see Ludena et al. (2011) for AG1, Bacon et al. (2007) for BRSC10, Jeanson et al. (2011) for nrITS2, and Scarcelli et al. (2011) for the introns of *ndhA* and *rps15-ycf1*). Phylogenetic reconstruction was carried out using each marker separately and in combination. It is now widely admitted that adding taxa and markers is beneficial (even if characters are missing for some taxa), in order to increase the accuracy

of phylogenetic inference (Zwickl and Hillis, 2002; Wiens and Morrill, 2011). The aims of our study were (1) to improve the resolution of the phylogenetic relationships among genera and species of Ptychospermatinae, (2) to use the resulting historical framework to reconstruct the evolution history of stamen number.

## Material and methods

### **Taxonomic sampling**

Taxa sampled, voucher and accession number information, and GenBank accessions are given in Appendix A. We obtained specimens from 46 of the 60 species recognized in Ptychospermatinae, representing all of the 12 genera of the subtribe (Dransfield et al. 2008). The ingroup included all species of *Adonidia*, *Brassiophoenix* and *Ptychococcus* (2 species in each genus). We sampled 17/30 species of *Ptychosperma*, 2/3 species of *Drymophloeus*, 6/9 species of *Balaka* (following Hodel 2010), 9/11 species of *Veitchia* and 1/4 species of *Ponapea*. The delimitation of genera follows the suggestions of Zona et al. (2011). The sampling includes an unpublished taxon that originates from Indonesia, in a locality named Gag Island (called ‘New taxon Gag Island’ in this study). Based on recent phylogenies (Baker et al., 2009; Baker et al., 2011), 13 outgroup species were chosen among various subtribes of the tribe Areceae, in order to root the trees. Plant material or DNA samples were obtained from DNA banks or living collections of botanical gardens around the world (see acknowledgements).

### **DNA extraction, amplification and sequencing**

Total genomic DNA was extracted from silica-gel dried leaf material using the NucleoSpin® Plant II (Machery-Nagel, Düren, Germany) extraction kit, following the manufacturer’s instructions. Primers used to amplify each DNA region are given in Supplementary Table 1.

PCR reactions (50 $\mu$ L) were performed using the following conditions: 1x PCR buffer (MP biomedical), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M each dNTP, 1 $\mu$ M each primer, 1U *Taq* polymerase (*Taq* CORE Kit 10; MP biomedical, Illkirch, France) and 1 or 2  $\mu$ L of DNA template. Reactions were run using MJ-Research (PTC-100) and Applied Biosystems (Veriti 96 Well) thermal cyclers programmed with the temperature profiles shown in Supplementary Table 2. PCR products were purified and sequenced by Beckman Coulter Genomics (Essex, UK) or at the Genoscope ([www.genoscope.cns.fr](http://www.genoscope.cns.fr)). Forward and reverse sequences were assembled and edited into contigs using CodonCode Aligner 4.0.3 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Whenever possible, we used DNA from the same specimen to amplify all selected markers, in order to obtain a homogeneous dataset.. We combined the sequences obtained from two different specimens for four species only. Some sequences were retrieved from GenBank (specified in Appendix A).

### **Alignment and phylogenetic analyses**

Sequences were aligned with ClustalW implemented in MEGA4 (Tamura et al. 2007) with manual adjustments. A highly variable dinucleotide microsatellite (TC/GA)<sub>n</sub> is present in intron 7 of AG1 (Ludena et al 2011), and a region of nine nucleotides within the *rps15-ycf1* sequence also displayed a high variability. These regions were too difficult to align with confidence and were therefore excluded from all analyses. Unambiguously aligned gaps were coded according to the modified complex indel coding (MCIC, Simmons et al. 2007) using the software SeqState (Müller 2005).

Phylogenetic analyses were conducted on each marker separately (single regions analyses), on plastid markers combined (plastid analysis), on nuclear markers combined (nuclear analysis), and finally on all markers combined (total evidence analysis; Kluge 1989).

### *Maximum parsimony analysis*

Maximum parsimony (MP) analyses were conducted using PAUP\* version 4.0b10 (Swofford 2002). All characters were unordered and had equal weight (Fitch 1971). Most parsimonious trees were found with a heuristic search with 1000 replicates using random stepwise addition of sequence. The tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping option was chosen and multiple trees (MULTREES) were saved at each replicate. The maximum number of trees that can be saved was fixed to 150,000 trees for all searches. The analyses were performed under the DELTRAN option. When the analyses yielded 150,000 before completion of the heuristic search (BRSC10, nrITS2, *ndhA* and combined data sets) a two-step heuristic search was applied: 1000 random replicates searches were conducted using TBR branch-swapping and only 10 trees per replicates were saved. A round of TBR swapping (to completion) was performed on this set of trees. When the maximum number of trees was reached before completion (BRSC10 and combined matrices) the parsimony ratchet method (Nixon 1999) was used. This method allows performing heuristic search with fewer trees in memory. Twenty independent replicates of 200 iterations (with 15% of characters reweighted each iteration) were generated using the software PAUPRat (Sikes & Lewis 2001). Strict and trees were calculated from all most parsimonious trees using PAUP. Support values for clades were calculated by conducting 1000 bootstraps replicates with one search per replicate under TBR branch swapping, starting trees built random addition sequence and 20 trees saved at each replicate.

### *Maximum likelihood and Bayesian inference analyses*

Model parameters for each data set and for coding vs non-coding regions within data sets were determined using jModelTest 2.1.1 (Darriba et al. 2012). More models were tested for the ML analysis (40) than for the BI analysis (24), to deal with the models implemented in the

softwares used for phylogenetic inference (PhyML and MrBayes). The Akaike information criterion was chosen to select the most appropriate model of DNA substitution. The models used are presented in Supplementary Table 3. Maximum likelihood (ML) analyses were performed using the PhyML 3.0 online server (Guidon et al. 2005). Indels were not included because PhyML 3.0 does not treat coded gaps. Tree searching was made with five random BIONJ starting trees and SPR tree improvement. Branch support was assessed by calculating 200 bootstrap pseudo-replicates.

Bayesian inference analyses (BI) were run using MrBayes 3.2 (Ronquist et al. 2011). Data sets were partitioned in order to implement the best model of evolution for each part (see Supplementary Table 3). Indels were treated as additional datatype (like a morphological present/absent character). Two independent Markov chain Monte Carlo (MCMC) runs, each comprising four linked chains (one cold and three heated; as default settings), were performed for 1 000 000 generations, sampling every 100 generations. The convergence of the two runs (the two tree samples becoming similar) was assessed by stopping the analysis when the average standard deviation was below 0.01 (stoprule=yes and stopval=0.01 in the mcmc command). For *ndhA*, *rps15-ycf1* and the plastid-DNA combined dataset, 1 000 000 generations were not enough to reach adequate average standard deviation (<0.01). The analysis had to be run again for respectively 1 510 000, 2 000 000 and 1 787 000 generations. The first 25% trees were discarded as burn-in.

### **Stamen number optimization**

All the species included in this study are polyandrous (more than six stamens). Data on stamen number at species level were mostly obtained from taxonomic treatments available in the literature. Information on stamen number was also obtained from direct observation on flowers from spirit collections (Aarhus University; Royal Botanic Gardens, Kew). Flowers

were dissected under a Zeiss Stemi SV6 stereomicroscope (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany) to count the stamens. Range values, references and accession numbers are indicated in Table 2. We were unable to find data on stamen number for two taxa, *Brassiophoenix drymophloeoides* and *Ptychosperma nicolai* (the last was classified as dubious by Essig (1978) due to incomplete specimen).

For character optimization, stamen number was coded as a discrete character. Three states were defined, namely (0) 6 or 12 stamens, (1) between 15 and 60 stamens, corresponding to moderately polyandrous species and (3) between 61 and 300 stamens, corresponding to highly polyandrous species. All Ptychospermatinae have flowers with 15 or more stamens, only outgroups had less stamens (6 or 12). We chose to combine 6 and 12 stamens in order to limit the number of character states. The Bayesian 50% majority rule consensus tree resulting from AG1 analysis (results not shown) and total evidence analysis were used to optimize the character with the MP method implemented in Mesquite 2.75 (Maddison and Maddison, 2011). Character states were treated as unordered, allowing any transition among states.

## Results

### *DNA amplification and alignments*

The average lengths of the DNA regions amplified were approximately 450 bp for AG1, 320 bp for BRSC10, 400 bp for nrITS2, 663 bp for PRK, 1700 bp for *matK*, 1090 bp for *ndhA* and 600 bp for *rps15-ycf1*. The number of characters in single gene and combined regions alignments, including nucleotides and coded gaps, is presented in Table 1. Amplification failed for a few samples resulting in datasets of different sizes (see Table 1). We were unable to obtain amplification for the full sequence of nrITS2 in some specimens because the sequence of the reverse primer appeared within the sequence. We chose to keep the specimens

with missing data in our analyses, in order to maximize the amount of information used for phylogenetic inference.

### *Phylogenetic analyses*

Maximum parsimony statistics (number of parsimony informative characters, number of most parsimonious trees, tree lengths and consistency (CI) and retention (RI) indices) for each individual marker and for the combined datasets are given in Table 1. There was little homoplasy in most datasets (CI >0.80) except for nrITS2 and the combined matrices (respectively CI=0.69, CI=0.76, CI=0.79 and CI=0.76). Trees were rooted with *Carpoxyton* as potential sister group to all other species, according to recent phylogenies of the family (Baker et al., 2009) and of the tribe Areceae (Baker et al., 2011). The trees resulting from the MP, ML and BI analyses conducted on single regions alignments showed nearly identical topologies. Bayesian trees however tend to be slightly more resolved than the trees obtained with the two other methods.

*Nuclear data:* All nuclear single regions analyses but one retrieved the monophyly of the subtribe with good supports (Figures S1-S4). The best support values are found for nrITS2 (Figure S1), with PBS (parsimony bootstrap support) = 98%, LBS (likelihood bootstrap support) = 86% and PP (posterior probabilities from Bayesian analysis) = 1.00 (clade credibility of 100%). The monophyly was less strongly supported with BRSC10 and PRK (Figures S2-S3): with BRSC10, PBS= 90%, LBS=61% and PP=1.00, and for PRK, PBS=67%, LBS=57% and PP=1.00. The subtribe was not monophyletic with the AG1 marker but most nodes were poorly supported (Figure S4). Since topological incongruences were not supported, we combined the data for further analyses.

The nuclear DNA-combined alignment included 1879 characters (1835 nucleotides positions and 44 coded indels) of which 238 (13%) were parsimony-informative. In the combined nuclear analysis (Figure 1), Ptychospermatinae appeared monophyletic with strong support (PBS=100%, LBS=96%, PP=0.99). Seven main clades emerged from this nuclear analysis, of which three were strongly supported (PBS and LBS >80% and PP>0.95). Only four genera, *Veitchia*, *Drymophloeus*, *Ptychococcus* and *Brassiophoenix*, were resolved as monophyletic with good support. *Balaka* and *Solfia* form a strongly supported clade.

*Plastid data:* The three single plastid regions alignments displayed very few variable sites (Table 1), and resulted in poorly resolved trees [Supplementary Figures S5-S7]. The monophyly of Ptychospermatinae was poorly to moderately supported. The best support values were found with *rps15-ycf1* (PBS=61%, LBS=58%, PP=0.82; Supplementary Figure S5). The plastid DNA-combined alignment included 3494 characters (3469 nucleotides positions and 25 coded indels) of which 47 (1.4%) were parsimony-informative. The 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian Inference analysis, with clade supports, is shown in Figure 2. The subtribe was resolved as monophyletic with low supports (PBS=66%, LBS=74%, PP=0.68). Only four of the seven clades emerging from the nuclear DNA-combined analysis were retrieved in this analysis. These markers provided little information, as shown by the lack of resolution in the resulting tree, but some of the terminal groupings observed in the nuclear tree were also found in this plastid analysis (e.g. *Solfia samoensis* sister group to *Balaka brachyclamys* or *Ptychosperma salomonense* sister group to *P. gracile*, *P. elegans* and *P. caryotoides*).

*Total evidence analyses based on the global nuclear-plastid alignment:* Since we detected no well supported conflicts (>80% bootstrap support) between the nuclear and plastid analyses,



we combined the nuclear and plastid data in a total evidence dataset (Kluge and Wolf, 1993; Nixon and Carpenter, 1996; Wiens, 1998).

The nuclear-plastid-combined alignment included 5373 characters (5304 nucleotides positions and 69 coded indels) of which 285 (5.3%) were parsimony-informative. The 50% majority-rule consensus tree resulting from the BI analysis, with support values from all three analyses, is shown in Figure 3. The monophyly of the subtribe was very strongly supported (PBS=100%, LBS=100%, PP=0.98). This analysis allowed us to identify seven major clades that were similar to those obtained in the nuclear DNA-combined analysis. Three clades are strongly supported by all three phylogenetic methods (Figure 3). The ‘*Veitchia* clade’ includes all the species of *Veitchia* (PBS=99%, LBS=100%, PP=1.00). *Balaka* and *Solfia* form the ‘*Balaka* clade’ (PBS=90%, LBS=100%, PP=1.00), and *Carpentaria* and *Wodyetia* form the ‘*Carpentaria* clade’ (PBS=100%, LBS=100%, PP=1.00). *Ptychococcus* and *Brassiophoenix* are sister groups with full support (PBS=100%, LBS=100%, PP=1.00). Together with the two species of *Drymophloeus* they form the ‘*Drymophloeus* clade’ with low support in the MP and ML analyses but strong support in the BI analysis (PP=1.00). (PBS=90%, LBS=92%, PP=1.00). *Normanbya normanbyi* is included with *Ponapea ledermanniana* in the moderately supported ‘*Normanbya* clade’ (PBS=72%, LBS=70%, PP=1.00). The ‘*Ptychosperma* clade’ includes all the species of the genus (except *P. halmaherense*) and is fully supported in the ML and BI analyses (LBS=100%, PP=1.00), although moderately in the ML analysis (PBS=60%). The BI analysis suggests that the ‘*Ptychosperma* clade’ is sister to the ‘*Normanbya* clade’ (PP=1.00). The ‘*Veitchia* clade’ and the ‘*Balaka* clade’ are sister groups with almost full support (PBS=99%, LBS=100%, PP=1.00). One difference between the nuclear-DNA analysis and the total evidence analysis is the relationships between the species of *Adonidia*, the newly discovered species *Ptychosperma halmaherense* and the new taxon from Gag Island. *maturbongsii*. In the first

one the two species of *Adonidia* and *P. halmaherense* formed a monophyletic group whereas in the second one *Adonidia maturbongsii* is sister to *P. halmaherense* and *Adonidia merrillii* is sister to the new taxon from Gag Island. However these relationships are supported only in the BI analysis (PP=1.00) and supports in the MP and ML analysis are low (<50%) or moderate.

#### *Stamen number optimization*

The optimization of stamen number evolution on the total evidence analysis Bayesian tree (50% majority-rule consensus tree) is shown on Figure 4. All the species included in the study are polyandrous (more than 6 stamens). However some are moderately polyandrous (between 15 and 60 stamens; in grey on Figure 4) and some are highly polyandrous (between 61 and 300 stamens; in black on Figure 4). The character optimisation suggests that the common ancestor of the subtribe was probably moderately polyandrous, and that transitions towards a higher number of stamens occurred several times independently during the evolutionary history of the subtribe. One transition occurred in the branch leading to *Ponapea ledermanniana*, one in *Wodyetia bifurcata* and one in the common ancestor of *Ptychococcus* and *Brassiophoenix*. Transitions between a moderate and a high number of stamens also occurred within the ‘*Veitchia* clade’. The ancestral state in this clade is ambiguous, because two scenarios are equally parsimonious (with three steps) to account for the observed distribution of character states. The first one implies two independent transitions towards a high number of stamens, one in *Drymophloeus* and one in the common ancestor of [*Veitchia arecina* + *V. metiti* + *V. winin* + *V. joannis* + *V. spiralis*] and one reversal in *Veitchia winin*. The second involves only one transition in the common ancestor of the whole clade and two reversals in *Veitchia winin* and in the ancestor of [*Veitchia filifera* + *Veitchia vitiensis*].

## Discussion

### **Nuclear vs. plastid markers**

Phylogenetic relationships within subtribe Ptychospermatinae have been explored recently using two nuclear markers, PRK and RPB2 (Zona et al. 2011), including a sampling of 37 species (among the 60 recognized in the subtribe) and 1640 molecular characters (plus 46 coded gaps). In spite of this effort, the phylogeny of Zona et al. (2011) remained partly unresolved, in particular concerning relationships within the genera *Ptychosperma* and *Veitchia*. In our study, all selected regions had expected high variation rates. The chosen non-coding plastid markers showed very little informative variation, with less than 2% parsimony informative sites overall (Table 1). Only one node was strongly supported (PBS and LBS >80% and PP >0.95) in the tree based on *matK* (Supplementary Fig 6). The plastid DNA of Ptychospermatinae is consistent with that of other palms in that it appears to evolve slowly (Asmussen and Chase 2001). The level of informative variation in the chosen nuclear regions varied between 6.3% (*AG1*) and 24.3% (*ITS2*) and was therefore much higher than the one observed in plastid alignments. It can be noted that the variation rate of *AG1* observed for Ptychospermatinae was similar to the one found previously in Bactridinae (Arecoideae; Ludena et al. 2011). The number of well-supported nodes in trees based on individual nuclear markers varied between two and seven, showing that nuclear markers bring useful information for phylogenetic reconstruction in the case of Ptychospermatinae. The use of ITS marker can be challenging due to possible amplification difficulty and paralogous copies (Baker et al. 2000; Hollingsworth 2011). In our experiment, most of the time the amplification of *ITS2* was successful, except when a sequence similar to the reverse primer appeared in the third part of the sequence, leading to an aborted amplicon and raising the question of universality of primers at a scale as large as seed plants (Chen et al. 2010). The presence of ITS paralogues is an important issue (Alvarez and Wendel, 2003) and can make

phylogenetic reconstruction difficult in palm (Baker et al. 2000; Lewis and Doyle 2001). However ITS sequences recently attracted new interest and proved to be useful in some groups of palms (Eiserhardt et al. 2011; Jeanson et al. 2011). In Ptychospermatinae, we detected on electropherograms only one sequence per specimen, although double nucleotide peaks occurred for few sites. No well-supported incongruence between phylogenetic reconstructions based on ITS2 vs. other markers was detected, so we included ITS2 data in our combined analysis. However, if the use of the ITS region is planned at large scale within the palm family further detailed investigations will be needed, as suggested by Feliner and Rossello (2007).

In spite of the little potential informativeness of plastid markers, we chose to include them in our analyses, because the plastid genome is inherited uniparentally and is not subject to recombination. It can be thus interesting to compare the evolutionary history of plastid vs. nuclear markers, in order to identify possible effect of recombination on the accuracy of species tree estimation (Posada and Crandall 2002). In our case however, there were no major incongruences among trees based on individual markers. The tree resulting from the total evidence analysis of our seven markers is the best resolved one, with 17 strongly supported nodes (Fig 3), stressing the utility of combining various sources of molecular characters for phylogenetic reconstruction.

### **Phylogenetic reconstruction**

In almost all individual and combined analyses (nuclear, plastid and total evidence), the subtribe Ptychospermatinae was resolved as monophyletic with good support. This confirms the conclusions of previous studies, based on morphological and molecular data (Zona 1999b; Asmussen et al. 2006; Norup et al. 2006; Baker et al., 2009; Baker et al. 2011; Zona et al. 2011). It should be noted that phylogenetic relationships among the outgroups (all belonging

to the tribe Areceae) were not fully resolved. We rooted the tree according to the supertree topology of Baker et al (2009). Compared to previous studies, our phylogenetic hypothesis based on the total evidence analysis provides improved resolution of the relationships among and within genera, allowing us to identify seven clades within the subtribe (Fig 3): the ‘Veitchia clade’, the ‘Balaka clade’, the ‘Adonidia clade’, the ‘Drymophloeus clade’, the ‘Carpentaria clade’, the ‘Normanbya clade’ and the ‘Ptychosperma clade’. The names were chosen as to match as closely as possible those used in Zona et al. (2011) in order to allow easy comparison. Each clade is discussed below in light of the morphological characteristics and geographical range of the species included.

#### *The Veitchia clade*

This well-supported clade comprises the nine *Veitchia* species of our sampling (out of eleven recognised in the genus). These species are characterized by an endocarp bearing a single flattened ridge on one side (Zona 1999b, Zona and Fuller, 1999). Within *Veitchia*, three well-supported clades emerge. One includes the four endemic species Vanuatu (*V. spiralis*, *V. winin*, *V. metiti*, *V. arecina*) and one species from Fiji and Tonga (*V. joannis*). The second includes two species to Fiji (*V. filifera* and *V. vitiensis*). Considering the distribution areas of these two clades, Fiji seems to be the ancestral area of the genus, as previously suggested in Zona et al. (2011), with subsequent overwater dispersal to Vanuatu. The distribution of *V. joannis*, sister group of *V. metiti*, could be explained by secondary dispersal to Fiji and Tonga. The third includes two species both formerly classified in the genus *Drymophloeus* (and before in the genus *Rhederophoenix*), *V. subdisticha* and *V. pachyclada*. Although the monophyly of *Veitchia* is strongly supported in the MP, ML and BI analyses, there are marked morphological differences between the species. For example, leaf segments are linear, the prophyll splitting is on the adaxial side and the pistillode is longer than the stamens in

most *Veitchia* species whereas leaf segments are cuneate, the prophyll splitting is on the abaxial side and the pistillode is shorter than the stamens in *V. subdisticha* and *V. pachyclada*. Our analyses confirm that *Drymophloeus* is not monophyletic, as recently showed by (Zona 2011). The species can be separated in two groups, the understory species of Indonesia and New Guinea, *D. litigosus* and *D. oliviformis*, related in our analysis to the *Ptychococcus/Brassiophoenix* clade, and the emergent species of the Solomon Islands *V. subdistichus* and *V. pachycladus*. This is consistent with the differences in morphological traits and ecological conditions between these two groups (Zona 1999b Blumea). For example persistent prophyll and peduncular bract are characteristic of *D. litigosus* and *D. oliviformis*. These species also have smaller pollen grains. The Solomon Islands are closer to the geographical range of *Veitchia* (Vanuatu and Fiji). Unfortunately we were not able to include *D. lepidotus* in our analysis; we cannot know its position within the subtribe. However the geographical range and the ecology of this species are in favour of its relationship with *D. subdistichus* and *D. pachycladus*.

#### *The Balaka clade*

This clade is resolved as sister to the *Veitchia* clade with full support. These two clades comprise species with the easternmost distribution within Ptychospermatinae.

Our analysis confirmed that *Solfia samoensis* is related to *Balaka*, as found by Zona et al. (2011), and suggests furthermore that the species is embedded with the latter genus. The Bayesian Inference analysis strongly supported a sister group relationship between the monotypic genus *Solfia* and *Balaka tahitensis*, which is congruent with the distribution of these two endemic taxa in the Samoa Islands. *Balaka* and *Solfia* are usually distinguished by the endocarp shape, angular with a rostrum for *Balaka* vs. terete and rounded for *Solfia* (Zona 1999a; Dransfield et al. 2008). However, in *Balaka tahitensis* ridges on the endocarp are only

slightly angled and rostrum is absent (Hodel 2010), making it more similar to the endocarp of *Solfia samoensis* and supporting the close relationship between both species. The other species of *Balaka*, all from the Fiji Islands (Viti Levu or Vanua Levu), form a well-supported clade. *Balaka diffusa* was formerly considered as a subspecies of *Balaka macrocarpa* (Moore 1979; Fuller 1997; Watling 2005) but Hodel (2010) reinstated the species on the basis of differences in geographical range (*Balaka diffusa* is from Viti Levu and *Balaka macrocarpa* is from Vanua Levu) and length of inflorescence (*Balaka macrocarpa* has smaller and more compact inflorescences).

#### *The Adonidia clade*

*Adonidia* was reinstated as a separate genus (from *Veitchia*) by Zona 1999a and this was confirmed by Zona et al. (2011). The total evidence analysis suggests that *Adonidia* is paraphyletic, due to the placement of *A. maturbongsii* as sister to *Ptychosperma halmaherense*, but the relationship is moderately supported. The newly discovered taxon from Gag Island (Indonesia) appears related to *A. merrillii* but also with little support. Interestingly, *Adonidia* (including *P. halmaherense*) is monophyletic in the nuclear DNA-combined analysis, but with low support. *Adonidia merrillii* is the only species of Ptychospermatinae occurring to the west of Wallace's Line, an important biogeographic interface (Baker and Couvreur, 2012). *Adonidia maturbongsii* and the new Gag Island taxon are geographically close to each other, occurring on islands at the western end of New Guinea. Both species of *Adonidia* were related in the study of Zona et al. (2011). They display strong similarities in their inflorescences and infructescences (white inflorescences branched up to four orders and red fruits; Baker and Heatubun 2012). Further analyses are obviously needed to address the issue of the monophyly of *Adonidia*.

### *The Drymophloeus clade*

The two remaining species of *Drymophloeus*, *D. oliviformis* and *D. litigosus*, are grouped together in the total evidence tree with strong support. They are distributed in New Guinea and the Moluccas (Zona 1999b). They share several morphological features like stilt roots, persistent prophyll and peduncular bract (Zona 1999b).

Previous molecular studies had suggested a relationship (although moderately supported) between *Ptychococcus* and *Brassiophoenix* (Asmussen et al, 2006; Norup et al., 2006; Baker et al. 2011; Zona et al., 2011). Our study confirms that these two genera are monophyletic and closely related with strong support. After taxonomic revision, the number of species in *Ptychococcus* was reduced to two and the geographical range restricted to New Guinea including the Bismarck Archipelagos (Zona 2005). *Brassiophoenix* includes two species also endemic to New Guinea (Zona and Essig 1999). Both genera share a strongly ridged endocarp (they differ by the colour, black or brown for *Ptychococcus*, straw-coloured for *Brassiophoenix*) and have the same distribution area.

Our analysis suggests with moderate support that *Drymophloeus* is related to *Ptychococcus* and *Brassiophoenix* (the relationship is however fully supported in the Bayesian analysis). All these species share a common geographical range (New Guinea and surrounding islands). They are understorey palms of moderate to small size. *Brassiophoenix* and *Drymophloeus* have similar leaf forms (Dransfield et al. 2008). It should be noted that plastid markers support an alternative hypothesis, with *Brassiophoenix* and *Ptychococcus* forming a clade with *Adonidia merrillii* and the new taxon from Gag. Further investigations are needed to assess the robustness of the *Drymophloeus* clade.



### *The Carpentaria clade*

Our analysis confirms with strong support the sister group relationship between the two monotypic genera *Carpentaria* and *Wodyetia* suggested by Zona et al. (2011). Both genera are endemic to Northern Australia (Northern Territory and north-east Queensland respectively; Dowe 2010). They have flat strongly forking fibrovascular bundles in the endocarp, and a ring of fibrovascular bundles in the mesocarp (Irvine 1983), and both have greenish inflorescence axes (Zona 1999a), contrary to the white colour found in all other members of the subtribe. In other morphological features, *Wodyetia* is more similar to *Normanbya*, another monotypic genera endemic to north-east Queensland, but in *Normanbya* the bundles of the fruit are purely fibrous (Irvine 1983), unlike the fruit of *Wodyetia* and *Carpenteria*.

### *The Ptychosperma clade*

The largest genus of Ptychospermatinae is resolved as monophyletic (except *P. halmaherense*) with strong support in the ML and Bayesian analysis (LBS=100% and PP=1.00) but low support in the MP analysis (PBS=60%). Historically the genus was divided in four subgenera: *Ponapea*, *Korora* (both included in the reinstated genus *Ponapea*; Dransfield 2008), *Ptychosperma* and *Actinophloeus*. This latter subgenus had been first considered as a subgenus of *Drymophloeus* in 1877 by Odoardo Beccari, later as a separate genus, named *Actinophloeus* and finally as a subgenus of *Ptychosperma* in 1935 by the same author (Essig 1978). The genus *Ptychosperma* is mostly distributed in Papua New Guinea, although there are several species distributed elsewhere, like *P. salomonense*, found in the Solomon Islands, *P. elegans* and *P. macarthurii* occurring in northern Australia, *P. gracile* from the Bismarck Archipelago, and *P. propinquum* distributed in the Moluccas (Essig 1978). Our results are in agreement with the two subgenera defined by Essig (1978). *Ptychosperma*

*salomonense*, *P. gracile*, *P. elegans* and *P. caryotoides*, the four members of the subgenus *Ptychosperma* form a well supported clade. The remaining species are grouped in another clade (but with low support) corresponding to the subgenus *Actinophloeus*. These two subgenera are morphologically differentiated by a number of subtle characters in fruit and seed (Essig 1978). For example, the subgenus *Ptychosperma* has seeds with ruminant endosperm, angular or broadly rounded seed lobes, and fruits with tanniniferous mesocarp whereas the subgenus *Actinophloeus* has homogeneous endosperm, squarish seed lobes and nontanniniferous mesocarp. The subgenus *Actinophloeus* was divided by Essig (1978) into two sections, *Actinophloeus* (stems always solitary) and *Caespitosa* (stems usually caespitose). Our results do not support this division, suggesting that the caespitose vs. solitary habit may be homoplastic.

*P. halmaherense* is distributed in the Halmahera Island, in North Moluccas. Heatubun 2011 included this new species from Halmahera in the genus *Ptychosperma* (subgenus *Ptychosperma*) based on floral characters, such as the pistillode equalling or exceeding stamens in length, small fruit, seed with ruminant endosperm, solitary stem and inflorescence with upper peduncular bract. However this species differs from all other species of the genus *Ptychosperma* by its seeds rounded in cross-section (vs. angular in the rest of *Ptychosperma*), lacking grooves or angles. Based on our molecular phylogeny and the fact that this new species is geographically distant from any other species of *Ptychosperma*, specimens must probably be re-examined and affiliation to *Ptychosperma* tested again.

#### *The Normanbya clade*

*Normanbya* is a monotypic genus endemic to North Australia. *Ponapea ledermanniana* belongs to the reinstated genus *Ponapea* (Dransfield et al. 2008, Zona et al. 2011), which includes four species formerly considered as belonging to *Ptychosperma* and *Drymophloeus*.

These species are originated from the Caroline Islands and the Bismarck Archipelago. In our tree, *Ponapea ledermanniana* is related to *Normanbya* with moderate support. This ‘*Normanbya* clade’ is sister group to the ‘*Ptychosperma* clade’ with good support in the Bayesian analysis. Our results favour the reinstatement of *Ponapea* as a genus separate from *Ptychosperma* as already found by Zona et al. (2011).

### **Future prospects for the phylogeny of Ptychospermatinae**

In spite of the improved resolution of phylogenetic relationships within Ptychospermatinae in our study, some relationships remain unresolved. It is notably the case within the genus *Ptychosperma*. The 50% majority-rule tree resulting from the total evidence Bayesian analysis (Figure 5) shows that within this genus, branches are very short, revealing a very low rate of variation. Species and generic limits in subtribe Ptychospermatinae are often problematic as evidenced by the frequent taxonomic changes that have occurred in the past (see Dransfield et al. 2008 for an overview). This raises the question of how species should be delimited within some genera, *Ptychosperma* in particular. The pattern observed within the genus could be due to different factors, like recent and rapid speciation events, or very slow evolution (generation time, evolutionary history, selection; Felsenstein 2004), strong hybridization that led to homogenous sequences or confusion between populations and species. Population genetics approaches could bring new insights into phylogenetic relationships, species limits and congruence between markers (Linder and Rieseberg 2004) within the different clades identified in Ptychospermatinae (in *Ptychosperma* in particular). Microsatellite loci could be isolated and characterized as was done for the cultivated palm *Bactris gasipaes* and its wild relatives (Martinez et al. 2004; Rodrigues et al. 2004; Couvreur et al. 2007) or for *Phoenix atlantica* (Henderson et al. 2006).

### **Stamen number optimization**

Within Ptychospermatinae, intra-specific variation in stamen number is very high (Table 2) and this variation occurs at both inter- and intra-individual levels. This makes stamen number optimization a challenge. We chose to use discrete optimization in order to avoid calculating a mean, needed in continuous optimization, and thus losing information on variation range. Moreover we chose categories that minimize overlapping. According to our coding, the ancestor of the subtribe was probably a moderately polyandrous species and several transitions toward a higher number of stamens occurred independently within the subtribe (Fig 4). Transitions from moderate polyandry towards high polyandry occurred at least four times. In two cases, within the ‘Veitchia clade’ and the ‘Drymophloeus clade’, high polyandry is a synapomorphy that supports the monophyly of groups.

Androecium development was studied in details in *Ptychosperma gracile* (Uhl 1976). Like in most polyandrous palms species, the androecium is basically trimerous (Uhl et Moore 1980). When stamens initiation starts, the apex is divided in six primary primordia, three opposite each sepal and three opposite each petal. Stamens arise as secondary primordia in alternating antesepalous and antepetalous whorls. The number of secondary primordia is always one in antesepalous whorls but can vary between one and three (or more) in antepetalous whorls. Variation in stamen number between flowers of the same species occurs in two ways. The lower antepetalous whorls may have more stamens opposite one petal or more frequently, the number of primordia in uppermost whorls is slightly irregular. The ancestral state for the palm flower is six stamens, three in an antesepalous whorl and three in an antepetalous whorl. Thus in Ptychospermatinae, polyandry results from the increase of whorl number and the increase of primordia number within each antepetalous whorl. In palms polyandry mostly coincides with unisexual flowers (Nadot et al., 2011) and all Ptychospermatinae species have unisexual

flowers. Transition to unisexuality, with reduced female organs (pistillode), could have allowed space for increasing the number of stamen whorls and thus the number of stamens. The reason why the number of stamens progressively increased within the subtribe is unclear. Like many other flower features, for example symmetry (Citerne et al. 2010) or nectar (Barrera and Nobel 2004), stamen number may have evolved in a plant-pollinator interaction context. At the Angiosperm level, polyandry is often observed in beetle-pollinated species (Bernhardt, 2000). Pollination biology has been well studied in some members of the palm family (see Barfod et al. 2011 for a review), but in Ptychospermatinae pollination data are scarce. *Ptychosperma* is believed to be visited by various insects, flies, syrphids (Diptera) and bees (Hymenoptera; Essig 1973) and *Normanbya normanbyi* visited by thrips (Thysanoptera), flies and weevils (Coleoptera; Kitching et al. 2007). Polyandrous species in palms are thus not only visited by beetles but by many other insects. It has been suggested that more stamens is a way to produce more pollen in response to the feeding of the pollinators (Uhl and Moore 1977). A potential correlation between stamen number and pollen production has been demonstrated within the Arecoideae, and especially within Areceae (Alapetite et al. in prep). Whether the evolutionary pattern observed for stamen number results from adaptation to pollination mode or results from a simple relaxation of developmental constraints remains to be tested.

## Conclusion

We investigated the evolution of stamen number within the subtribe Ptychospermatinae using a new molecular phylogeny of the subtribe. The combined use of seven nuclear and plastid markers improved the resolution of phylogenetic relationships between genera and species compared to previous studies. Further phylogenetic or population genetics studies that incorporate additional more variable molecular markers (e.g. microsatellite loci) are needed to

clarify the circumscription of taxonomic subdivisions, notably species. Nevertheless, our work provides a useful framework for future studies on floral development, floral adaptation and pollination biology. We identified several transitions between moderate and high polyandry that could be investigated in details. One issue is whether the developmental pathway of stamen inception is the same in species with contrasted stamen numbers. Another issue is the adaptive significance of polyandry. Fitness of individuals with different number of stamens (naturally or experimentally altered) could be compared. Studies of visitors and pollinators should provide information on a possible correlation between stamen number and a specific kind of insects (taxonomic or functional group). Studying the evolutionary history of stamen number within palms could help us to investigate if the co-evolution with insect pollinators could have driven the modification of this character at a larger scale.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Lauren Gardiner, Felix Forest, Edith Kapinos and Laszlo Csiba (Royal Botanic Gardens, Kew); Carl E. Lewis and Hillary Burgess (Fairchild Tropical Botanic Garden); Anders Barfod (Aarhus university herbarium); Eric Joly and Denis Larpin (MNHN Paris); Larry Noblick (MBC); Nura Abdul Karim (Singapore Botanic Gardens); Dick Watling (Fiji) who provided the plant material. SN received a research grant from Aarhus University to conduct part of this research. EA received a financing from Centre de Recherche sur la Paléobiodiversité et les Paléoenvironnements (UMR 7207 CNRS - MNHN - UPMC) to sample material in Kew.

## Appendix A

Taxa sampled, voucher and accession number information and GenBank accessions

## Appendix B Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at

## References

- Alvarez, I. & Wendel, J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**, 417-434.
- Asmussen, C. B. & Chase, M. W. 2001. Coding and noncoding plastid DNA in palm systematics. *American Journal of Botany*, **88**, 1103–1117.
- Asmussen, C. B., Dransfield, J., Deickmann, V., Barfod, A. S., Pintaud, J.-C. & Baker, W. J. 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151**, 15–38.
- Bacon, C. D., Feltus, F. A., Paterson, A. H. & Bailey, C. D. 2007. Novel nuclear intron-spanning primers for Arecaceae evolutionary biology. *Molecular Ecology Notes*, **8**, 211-214.
- Baker, W. J. & Couvreur, T. L. P. 2012b. Global biogeography and diversification of palms sheds light on the evolution of tropical lineages. II. Diversification history and origin of regional assemblages. *Journal of Biogeography*, **40**, 286–298.
- Baker, W. J. & Heatubun, C. D. 2012. New palms from Biak and Supiori, Western New Guinea. *Palms*, **56**, 131-150.
- Baker, W. J., Hedderson, T. A. & Dransfield, J. 2000. Molecular phylogenetics of subfamily Calamoideae (Palmae) based on nrDNA ITS and cpDNA *rps16* intron sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**, 195–217.
- Baker, W. J., Norup, M. V., Clarkson, J. J., Couvreur, T. L. P., Dowe, J. L., Lewis, C. E., Pintaud, J.-C., Savolainen, V., Wilmot, T. & Chase, M. W. 2011. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). *Annals of Botany*, **108**, 1417-1432.
- Baker, W. J., Savolainen, V., Asmussen-Lange, C. B., Chase, M. W., Dransfield, J., Forest, F., Harley, M. M., Uhl, N. W. & Wilkinson, M. 2009. Complete generic-level phylogenetic analyses of palms (Arecaceae) with comparisons of supertree and supermatrix approaches. *Systematic Biology*, **58**, 240–256.
- Barfod, A. S., Hagen, M. & Borchsenius, F. 2011. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). *Annals of Botany*, **108**, 1503-1516.

- Barrera, E. & Nobel, P. S. 2004. Nectar: properties, floral aspects, and speculation on origin. *TRENDS in plant Sciences*, **9**, 65-69.
- Bernhardt, P. 2000. Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. *Plant Systematics and Evolution*, **222**, 293-320.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L. & Etal. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, **5**, e8613.
- Citerne, H., Jabbour, F., Nadot, S. & Damerval, C. 2010. The evolution of floral symmetry. *Advances in Botanical Research*, **54**, 85-137.
- Couvreur, T. L. P., Billote, N., Risterucci, A.-M., Lara, C. & etal. 2006. Close genetic proximity between cultivated and wild *Bactris gasipaes* Kunth revealed by microsatellite markers in Western Ecuador. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**, 1361-1373.
- Cuenca, A. & Asmussen-Lange, C. B. 2007. Phylogeny of the palm tribe Chamaedoreae (Arecaceae) based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany*, **32**, 250–263.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**, 772.
- Dowe, J. L. 2010. *Australian Palms: Biogeography, Ecology and Systematics*. CSIRO PUBLISHING.
- Dowl, J. L. 1998. *Wodyetia bifurcata*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Dransfield, J., Uhl, N. W., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M. & Lewis, C. E. 2008. *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. Royal Botanic Gardens, Kew: Kew Publishing.
- Endress, P. K. 2011. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. *American Journal of Botany*, **98**, 370-396.
- Essig, F. B. 1973. Pollination of some New Guinea palms. *Principes*, **17**, 75-83.
- Essig, F. B. 1978. A revision of the genus *Ptychosperma* Labill. (Arecaceae). *Allertonia*, **1**, 415-478.
- Feliner, G. N. & Rosselló, J. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 911-9.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.



- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific topology. *Systematic Zoology*, **20**, 406-416.
- Fuller, D. 1998. *Balaka macrocarpa*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org.
- Gaut, B. S., Morton, B. R., McCaig, B. C. & Clegg, M. T. 1996. Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcl*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**, 10274–10279.
- 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**, W557-W559.
- Hahn, W. J. 2002. A molecular phylogenetic study of the palmae (Arecaceae) based on *atpB*, *rbcl*, and 18S nrDNA sequences. *Systematic Biology*, **51**, 92-112.
- Heatubun, C. D. 2011. A new species of *Ptychosperma* from Halmahera, North Moluccas. *Palms*, **55**, 183-189.
- Hodel, D. R. 2010. A synopsis of the genus *Balaka*. *Palms*, **54**, 161-188.
- Hollingsworth, P. M. 2011. Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **108**, 19451-19452.
- Hughes, C. E., Eastwood, R. J. & Bailey, C. D. 2006. From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **361**, 211-225.
- Irvine, A. 1983. *Wodyetia*, a new arecoid genus from Australia. *Principes*, **27**, 158-167.
- Jeanson, M. L., Labat, J.-N. & Little, D. P. 2011. DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? *Annals of Botany*, **108**, 1445-1451.
- Jeanson, M. L., Labat, J.-N. & Little, D. P. 2011b. DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? *Annals of Botany*, **108**, 1445-1451.
- Kitching, R. L., Boulter, S. L., Howlett, B. G. & Goodall, K. 2007. Visitor assemblages at flowers in a tropical rain forest canopy *Austral Ecology*, **32**, 29-42.
- Kluge, A. G. & Wolf, J. 1993. Cladistics: what's in a word? . *Cladistics*, **9**, 183-199.
- Lewis, C. E. & Doyle, J. J. 2001. Phylogenetic utility of the nuclear gene malate synthase in the palm family (Arecaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **19**, 409-420.

- Lewis, C. E. & Doyle, J. J. 2002. A phylogenetic analysis of tribe Areceae (Arecaceae) using two low-copy nuclear genes. *Plant Systematics and Evolution*, **236**, 1-17.
- Linder, C. R. & Rieseberg, L. H. 2004. Reconstructing patterns of reticulate evolution of plants. *American Journal of Botany*, **91**, 1700-1708.
- Ludena, B., Chabrillange, N., Aberlenc-Bertossi, F., Adam, H., Tregear, J. W. & Pintaud, J.-C. 2011. Phylogenetic utility of the nuclear genes AGAMOUS 1 and PHYTOCHROME B in palms (Arecaceae): an example within Bactridinae. *Annals of Botany*, **108**, 1433-1444.
- Maddison, W. P. & Maddison, D. R. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>.
- Martinez, A. K., Gaitan-Solis, E., Duque, M. C., Bernal, R. & Tohme, J. 2002. Microsatellite loci in *Batris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and Characterization. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 408-410.
- Müller, K. 2005. SeqState - primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics*, **4**, 65-69.
- Nadot, S., Sannier, J., Barfod, A. S. & Baker, W. J. 2011. Evolution of the palm androecium as revealed by character mapping on a supertree. In: *Flowers on the tree of life* (Ed. by Wanntorp, L. & Roncedo-Craene, L. P.): Cambridge University Press.
- Nixon, K. C. 1999. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics*, **15**, 407-414.
- Nixon, K. C. & Carpenter, J. M. 1996. On simultaneous analysis. *Cladistics*, **12**, 221-241.
- Norup, M. V., Dransfield, J., Chase, M. W., Barfod, A. S., Fernando, E. S. & Baker, W. B. 2006. Homoplasious character combinations and generic delimitations: a case study from the Indo-Pacific arecoid palms (Arecaceae: Areceae). *American Journal of Botany*, **93**, 1065-1080.
- Palmweb. 2013. Palmweb: Palms of the World Online. Published on the internet <http://www.palmweb.org/>.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 2002. The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *Journal of Molecular Evolution*, **54**, 396-402.

- Rodrigues, D. P., Vinson, C., Ciampi, A. Y., Farias, I. P., Lemes, M. R. & etal. 2004. Novel microsatellite markers for *Bactris gasipaes* (Palmae). *Molecular Ecology Notes*, **4**, 575-576.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572-1574.
- Scarcelli, N., Barnaud, A., Eiserhardt, W., Treier, U. A., Seveno, M., d'Anfray, A., Vigouroux, Y. & Pintaud, J.-C. 2011. A set of 100 chloroplast DNA primer pairs to study population genetics and phylogeny in Monocotyledons. *PLoS ONE*, **6**, e19954.
- Sikes, D. S. & Lewis, P. O. 2001. PAUPRat: PAUP implementation of the parsimony ratchet. In: (Ed. by Beta software, v., distributed by the authors). Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, USA.
- Simmons, M. P., Müller, K. & Norton, A. P. 2007. The relative performance of indel-coding methods in simulations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 724-740.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), beta version 4.0. (Ed. by Sinauer). Sunderland, MA, 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.
- Uhl, N. & Moore, H. E. 1980. Androecial development in six polyandrous genera representing five major groups of palms. *Annals of Botany*, **45**, 57-75.
- Uhl, N. W. 1976. Developmental studies in *Ptychosperpa* (Palmae). II. The Staminate and Pistillate Flowers. *American Journal of Botany*, **63**, 97-109.
- Uhl, N. W. & Moore, H. E. 1977. Correlation of inflorescence, flower structure, and floral anatomy with pollination in some palms. *Biotropica*, **9**, 170-190.
- Whistler, A. & Johnson, D. 1998. *Drymophloeus samoensis*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Wiens, J. & Morrill, M. 2011. Missing data in phylogenetic analysis: reconciling results from simulations and empirical data. *Systematic biology*, **60**, 719-731.
- Wiens, J. J. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology*, **47**, 568-581.
- Zona, S. 1999a. New perspective on generic limits and relationships in the *Ptychospermatinae* (Palmae: Arecoideae). In: *Evolution, variation and*

- classification of palms* (Ed. by Henderson, A. & Borchsenius, F.), pp. 255-263.  
Bronx New York: The New York Botanical Garden Press.
- Zona, S. 1999b. Revision of *Drymophloeus* (Arecaceae: Arecoideae). *Blumea*, **44**, 1-24.
- Zona, S. 2005. A revision of *Ptychococcus* (Arecaceae). *Systematic Botany*, **30**, 520-529.
- Zona, S. & Essig, F. B. 1999. How many species of *Brassiophoenix*? *Palms*, **43**, 45-48.
- Zona, S., Francisco-Ortega, J., Jestrow, B., Baker, W. J. & Lewis, C. E. 2011. Molecular phylogenetics of the palm subtribe *Ptychospermatinae* (Arecaceae). *American Journal of Botany*, **98**, 1-11.
- Zona, S. & Fuller, D. 1999. A revision of *Veitchia* (Arecaceae-Arecoideae). *Harvard Papers in Botany*, **4**, 543-560.
- Zwickl, D. J. & Hillis, D. M. 2002. Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Systematic Biology*, **51**, 588-598.

## Tables and Figures

**Table 1:** Datasets characteristics and maximum parsimony analysis statistics

Data set	Number of			MP trees	Tree length	CI	RI
	Ingroup taxa	characters	PI characters (%)				
AG1 + [coded indels]	55	410 + [5]	23 + [3] (6,3%)	2	83	0,91	0,93
BRSC10 + [coded indels]	52	342 + [11]	36 + [7] (12,2%)	4004*	143	0,87	0,91
nrITS2 + [coded indels]	46	420 + [20]	103 + [10] (25,7%)	1939	337	0,69	0,78
PRK + [coded indels]	57	663 + [8]	58 + [4] (9,2%)	1113	217	0,87	0,92
<b>nuclear-DNA combined matrix</b>	60	1835 + [44]	238 + [24] (13%)	3615*	812	0,77	0,83
<i>matK</i> + [coded indels]	48	1706 + [3]	18 + [3] (1,2%)	448	71	0,94	0,96
<i>ndh A</i> + [coded indels]	56	1141+ [12]	9 + [6] (1,3%)	2328	91	0,89	0,91
<i>rps 15-ycf1</i> + [coded indels]	57	622 + [10]	7 + [4] (1,7%)	30	49	0,94	0,93
<b>plastid-DNA combined matrix</b>	59	3469 + [25]	34 + [13] (1,4%)	3694*	223	0,79	0,85
<b>total evidence matrix</b>	60	5304 + [69]	285 + [37] (5,3%)	3845*	1051	0,76	0,83

CI and RI are respectively the consistency index and the retention index

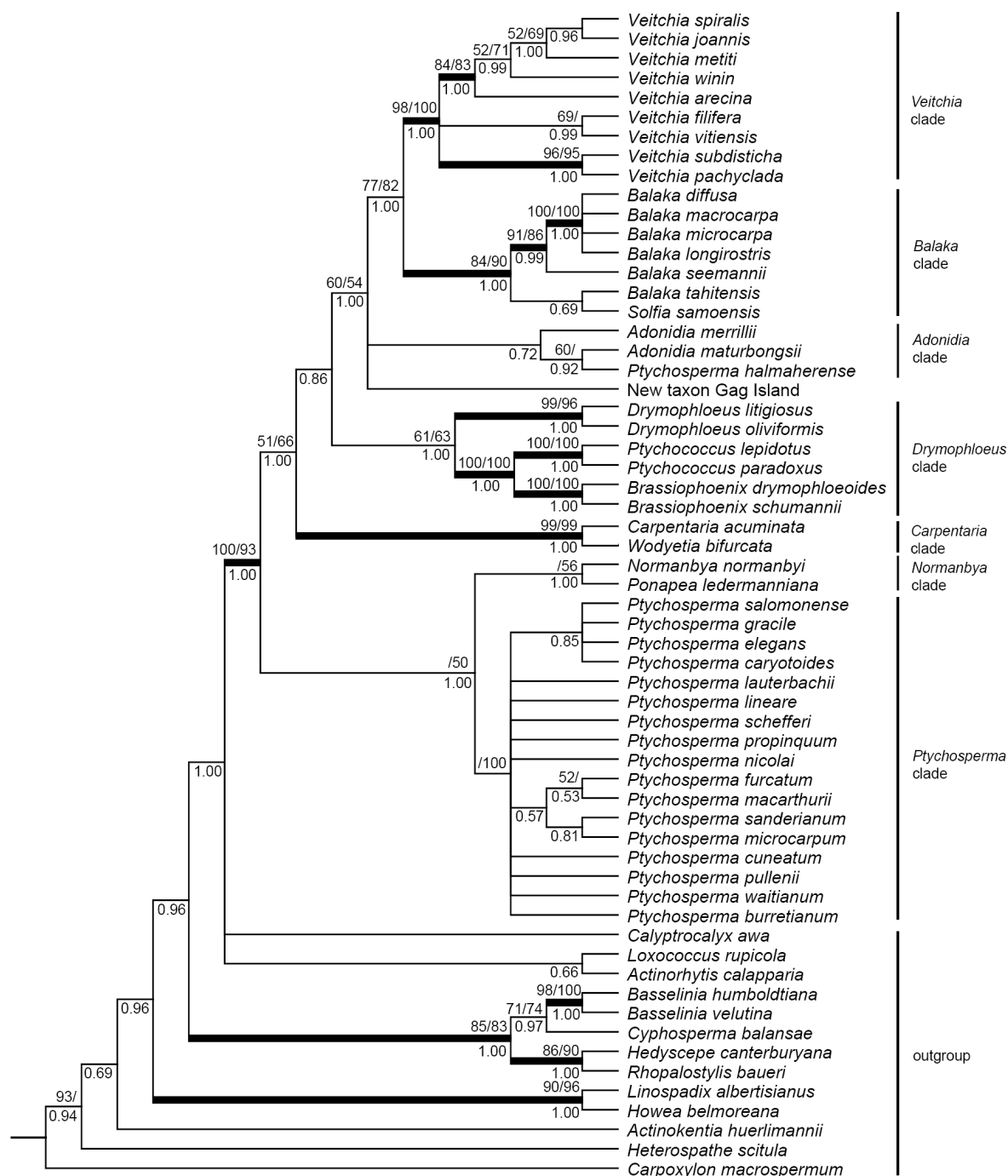
Numbers in square brackets represent the numbers of characters resulting from indel-coding

\* number of most parsimonious trees generated by parsimony ratchet analyses

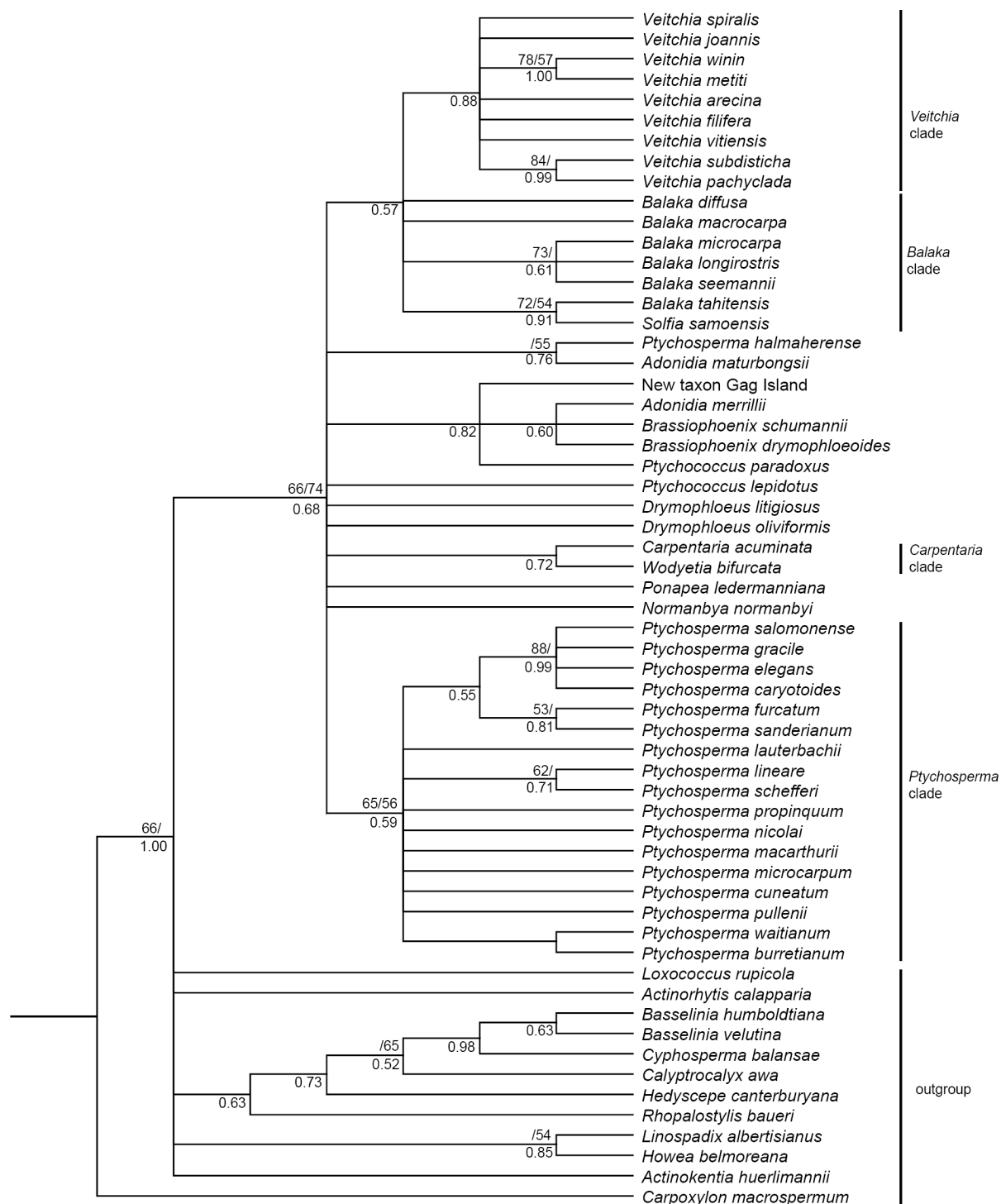
**Table 2:** Stamen number for the species included in the phylogenetic study; data are from literature and observation of herbarium specimens; (K) Kew herbarium and spirit collection, (AAU) Aarhus University herbarium and spirit collection; character state (0) 6-12 stamens, (1) 15-60 stamens = moderately polyandrous species, (2) 61-300 stamens = highly polyandrous species.

Species	Stamen number	References	Character state
<i>Adonidia maturbongsii</i>	26-43	Heatubun 906 (K)	1
<i>Adonidia merrillii</i>	43-55	54459 (K)	1
<i>Balaka diffusa</i>	50	Hodel 2010	1
<i>Balaka longirostris</i>	25-44	Dowe 1989	1
<i>Balaka macrocarpa</i>	40	Hodel 2010	1
<i>Balaka microcarpa</i>	20-32	Dowe 1989 / Hodel 2010	1
<i>Balaka seemanii</i>	15-29	Dowe 1989 / Hodel 2010	1
<i>Balaka tahitensis</i>	50	Hodel 2010	1
<i>Brassiophoenix schumannii</i>	130-200	Essig 1975	2
<i>Carpentaria acuminata</i>	30-40	Dowe 2010 / 46653 (K)	1
<i>Drymophloeus litigiosus</i>	24-32	Zona 1999	1
<i>Drymophloeus oliviformis</i>	30-66	Zona 1999	1
<i>Normanbya normanbyi</i>	24-40	Dowe 2010	1
<i>Ponapea ledermanniana</i>	110-120	Essig 1978 / 64789 (K)	2
<i>Ptychococcus lepidotus</i>	69-138	Zona 2005	2
<i>Ptychococcus paradoxus</i>	100-213	Zona 2005 / 383 (AAU)	2
<i>Ptychosperma burretianum</i>	30-35	Essig 1978	1
<i>Ptychosperma caryotoides</i>	14-29	Essig 1978	1
<i>Ptychosperma cuneatum</i>	24-30	Essig 1978	1
<i>Ptychosperma elegans</i>	12-30	Essig 1978 / Dowe 2010 / 48132 (K)	1
<i>Ptychosperma furcatum</i>	30	Essig 1978	1
<i>Ptychosperma gracile</i>	20-34	Essig 1978 / Gardiner 298 (K)	1
<i>Ptychosperma lauterbachii</i>	24-44	Essig 1978	1
<i>Ptychosperma lineare</i>	15-32	Essig 1978 / 63986 (K)	1
<i>Ptychosperma macarthurii</i>	23-40	Essig 1978 / Dowe 2010 / 41437 (AAU)	1
<i>Ptychosperma microcarpum</i>	18-30	Essig 1978	1
<i>Ptychosperma propinquum</i>	33-50	Essig 1978	1
<i>Ptychosperma pulleni</i>	20	Essig 1978	1
<i>Ptychosperma salomomense</i>	20-40	Essig 1978 / Gardiner 296 (K)	1
<i>Ptychosperma sanderianum</i>	15-25	Essig 1978	1
<i>Ptychosperma schefferi</i>	33-38	Essig 1978 / 75021 (K)	1
<i>Ptychosperma waitianum</i>	20-38	Essig 1978 / Gardiner 292 (K)	1
<i>Solfia samoensis</i>	35-41	Dransfield et al. 2008 / 75019 (K)	1
<i>Veitchia arecina</i>	80-131	Zona & Fuller 1999	2
<i>Veitchia filifera</i>	23-46	Zona & Fuller 1999	1
<i>Veitchia joannis</i>	74-123	Zona & Fuller 1999	2
<i>Veitchia metiti</i>	106-156	Zona & Fuller 1999	2
<i>Veitchia pachyclada</i>	174-320	Zona 1999	2
<i>Veitchia spiralis</i>	85-118	Zona & Fuller 1999 / Dowe 1989	2
<i>Veitchia subdisticha</i>	135-219	Zona 1999	2
<i>Veitchia vitiensis</i>	24-36	Zona & Fuller 1999	1
<i>Veitchia winin</i>	42-63	Zona & Fuller 1999	1
<i>Wodyetia bifurcata</i>	58-72	Dowe 2010	2
<i>Actinokentia huerlimanii</i>	19-23	Moore 1980	1
<i>Actinorhynchus calapparia</i>	24-33	Dransfield et al. 2008	1
<i>Basselinia humboldtiana</i>	6	Dransfield et al. 2008	0
<i>Basselinia velutina</i>	6	Dransfield et al. 2008	0
<i>Calyptrocalyx awa</i>	6-7	Dowe & Ferrero 2001	0
<i>Carpoxylon macrospermum</i>	6	Dransfield et al. 2008	0
<i>Cyphosperma balansae</i>	6	Moore et Uhl 1984	0
<i>Hedyscepe canterburyana</i>	9-12	Dransfield et al. 2008	0
<i>Heterospathes scitula</i>	6	Fernando 1990	0
<i>Howea belmoreana</i>	30-70	Dowe 2010	1
<i>Linospadix albertisianus</i>	6-12 (genus)	Dransfield et al. 2008	0
<i>Loxococcus rupicola</i>	12	Dransfield et al. 2008	0
<i>Rhopalostylis baueri</i>	6	Dransfield et al. 2008	0

**Fig. 1.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the nuclear DNA-combined alignment; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches. Thick lines represent well-supported clades (PBS and LBS >80% and PP >0.95).

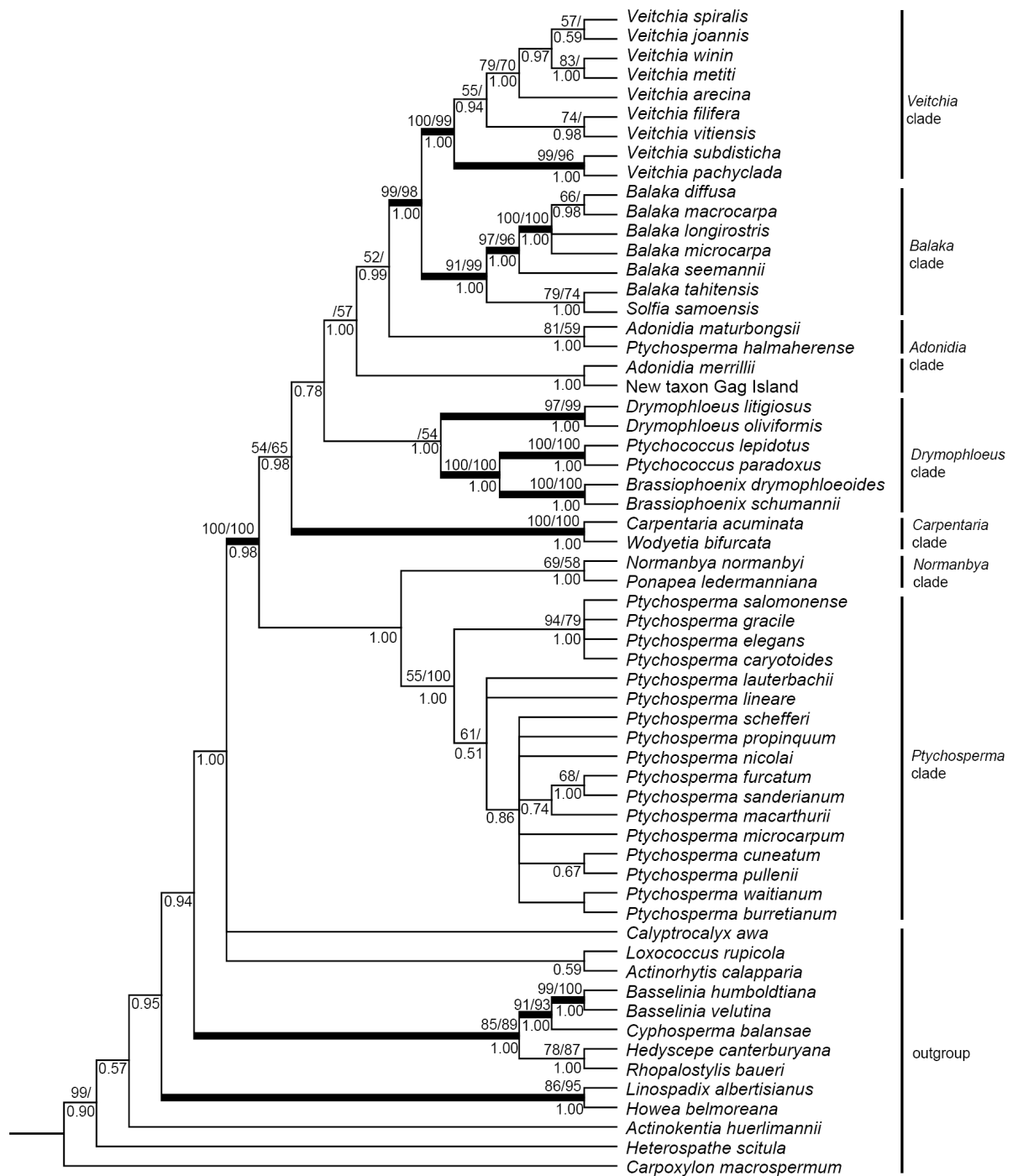


**Fig. 2.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of plastid DNA-combined alignment; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches.





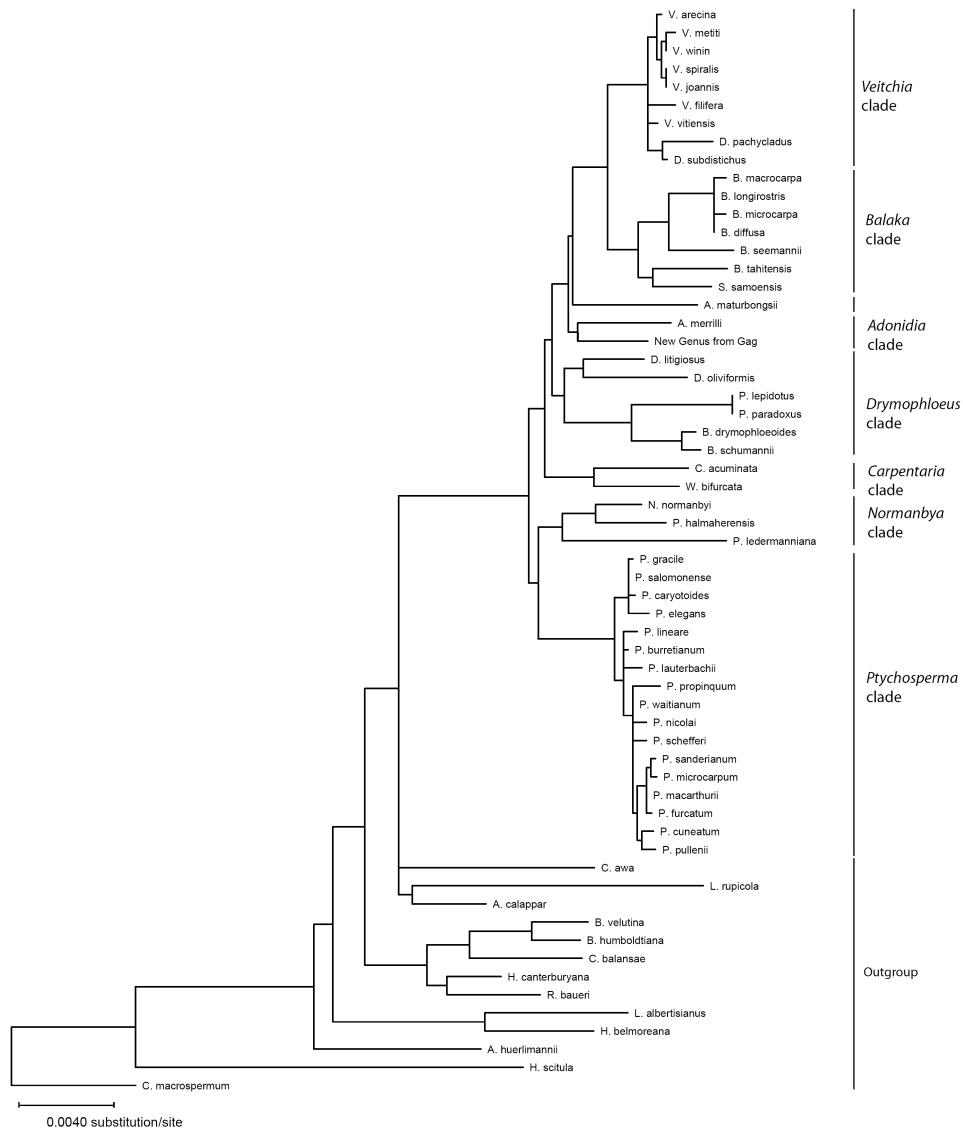
**Fig. 3.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the total evidence dataset; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches. Thick lines represent well-supported clades (PBS and LBS >80% and PP >0.95).



**Fig. 4.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the total evidence dataset showing the evolution of stamen number optimized using Maximum Parsimony. Boxes at the tip of branches are coloured according to the character state: White = 6 or 12 stamens, Grey = 15-60 stamens; moderately polyandrous species, Black = 61-300 stamens; highly polyandrous species. Branches colours correspond to the inferred ancestral state. Several colours on the same branch denote ambiguity in the ancestral state.



**Fig. 5.** Maximum-likelihood topology obtained from total evidence analysis showing branch lengths.



## Supplementary data

**Table S1:** Primers sequences used to amplify each DNA region

Marker	Primer name	Direction	Sequence 5'-3'	Reference
<b>AG1</b>	AG1-F1	Forward	CAGGAATTTGATGGGAGAGTC	Ludena et al. 2011
	AG1-R1	Reverse	GCTGATTGCTTTGCATGAG	
<b>BRSC10</b>	BRSC10_002_FOR	Forward	TTCGAGCTCAACGACGTCTT	Bacon et al. 2007
	BRSC10_002_REV	Reverse	CATCCCGAACAGCGTAATCC	
<b>nrITS2</b>	nrITS2-F	Forward	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	Jeanson et al. 2011
	nrITS2-R	Reverse	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
<b>PRK</b>	prk717f	Forward	GTGATATGGAAGAACGTGG	Lewis & Doyle 2002
	prk969r	Reverse	ATTCCAGGGTATGAGCAGC	
<b>matK</b>	MatK19-F	Forward	CGTTCTGACCATATTGCACTATG	Asmussen et al. 2006
	MatK-1862R	Reverse	CATTGCACACGACTTTACC	
<b>ndh A</b>	ndh A-F	Forward	TCYGCTTCTGGTAAATCAAA	Scarcelli et al. 2011
	ndh A-R	Reverse	AATATCTCTACGTGYGATTCCG	
<b>rps 15-ycf1</b>	rps 15-ycf1-F	Forward	CGTTGACGTTTTCCYAGRATT	Scarcelli et al. 2011
	rps 15-ycf1-R	Reverse	GCTTGATGAATCGBTATTGGTTT	

**Table S2:** temperature profiles used for PCR reactions; for some specimens annealing temperature has been modified; these temperatures are specified in brackets.

	Initialization step		No. cycles	Denaturation step		Annealing step		Elongation step		Final elongation	
<b>AG1</b>	94 °C	3 min	35x	94 °C	30 sec	58 °C	1 min	72 °C	45 sec	72 °C	3 min
<b>BRSC10</b>	94 °C	3 min	35x	94 °C	30 sec	55 (57) °C	30 sec	72 °C	1 min	72 °C	7 min
<b>nrITS2</b>	94 °C	3 min	35x	95 °C	30 sec	56 °C	30 sec	72 °C	30 sec	72 °C	7 min
<b>PRK</b>	94 °C	4 min	35x	94 °C	1 min	55 (57) °C	1 min	72 °C	2 min	72 °C	7 min
<b>matK</b>	94 °C	4 min	28x	94 °C	1 min	54 °C	1 min	72 °C	2 min	72 °C	5 min
<b>ndh A</b>	94 °C	3 min	35x	94 °C	30 sec	58 °C	30 sec	72 °C	1 min	72 °C	10 min
<b>rps 15-ycf1</b>	94 °C	3 min	35x	94 °C	30 sec	62 (58-64) °C	30 sec	72 °C	1 min	72 °C	10 min

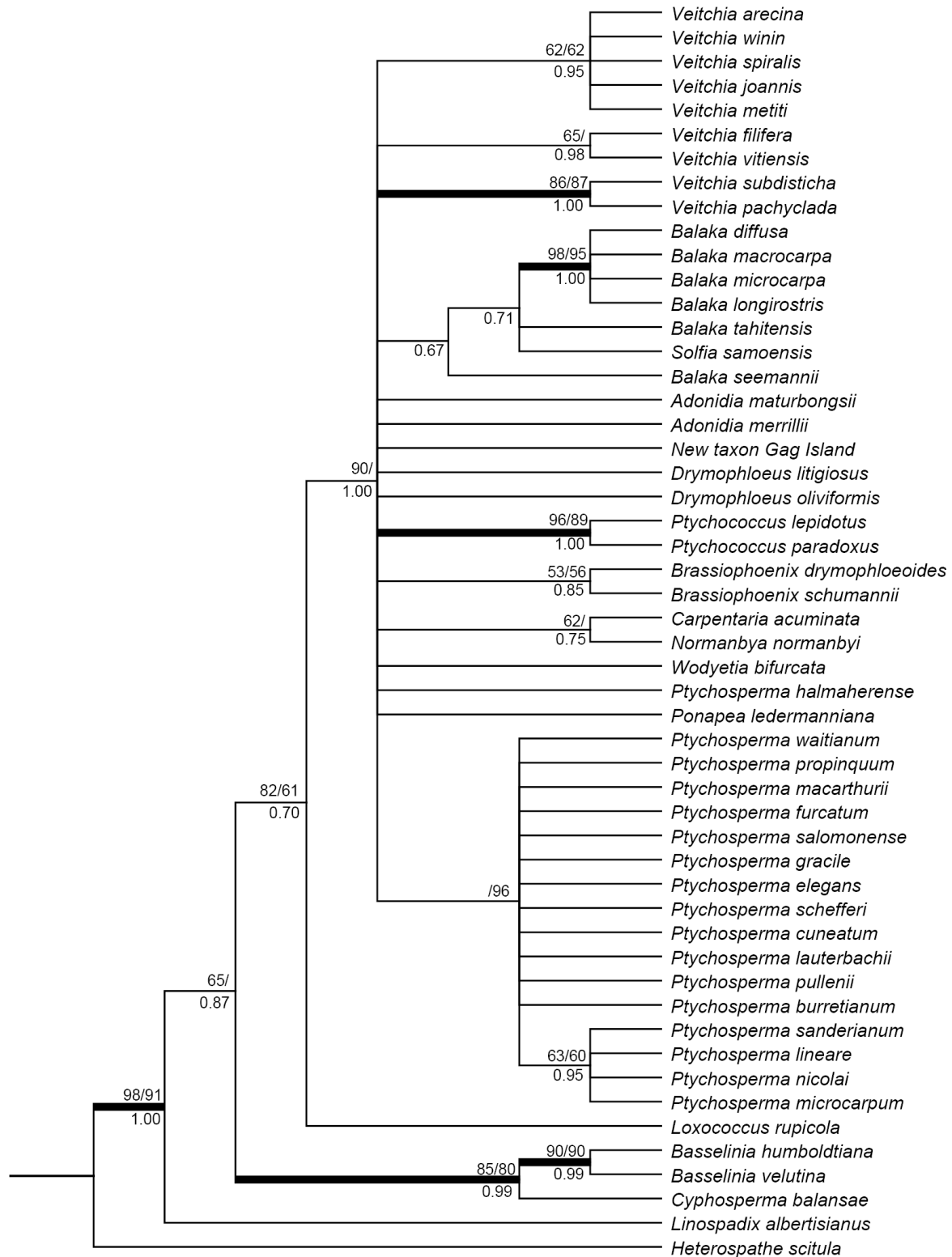
Table S3: Data and models used in analysis

Data set	Number of bases	Model	
		ML	BI
<b>AG1</b>	410	HKY	
AG1-exon	181		HKY+G
AG1-intron	229		HKY
<b>BRSC10</b>	342	HKY+I+G	HKY+I+G
<b>nrITS2</b>	420	GTR+G	
5,8S	52		GTR+I
ITS2	259		GTR+I+G
26S	109		K80+G
<b>PRK</b>	663	GTR+G	
PRK-exon	207		HKY+I
PRK-intron	452		GTR
<b>nuclear-DNA combined matrix</b>	1835	TrN+G	
<b>matK</b>	1706	GTR+G	
<i>trnK</i> -intron	161		HKY
<i>matK</i>	1545		GTR+I
<b>ndhA</b>	1141	HKY+G	HKY+G
<b>rps 15-ycf1</b>	622	GTR	
<i>rps 15</i>	167		HKY
spacer	377		GTR+I
<i>ycf1</i>	78		HKY
<b>plastid-DNA combined matrix</b>	3469	GTR+G	
<b>global combined matrix</b>	5304	GTR+I+G	

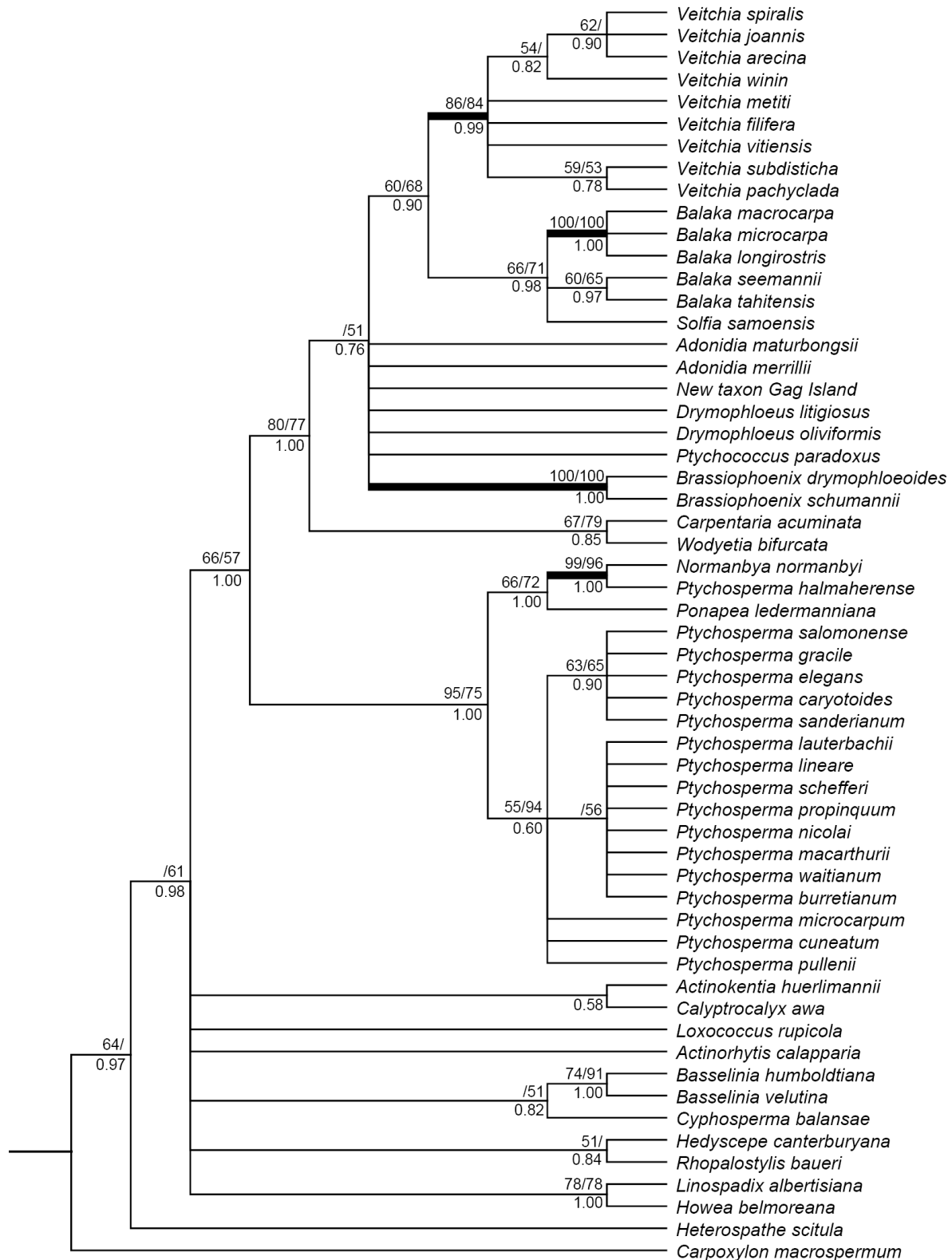
**Fig. S1.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the nrITS2 dataset; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches. Thick lines represent well-supported clades (PBS and LBS >80% and PP >0.95).



**Fig. S2.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the BRSC10 dataset; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches. Thick lines represent well-supported clades (PBS and LBS >80% and PP >0.95).

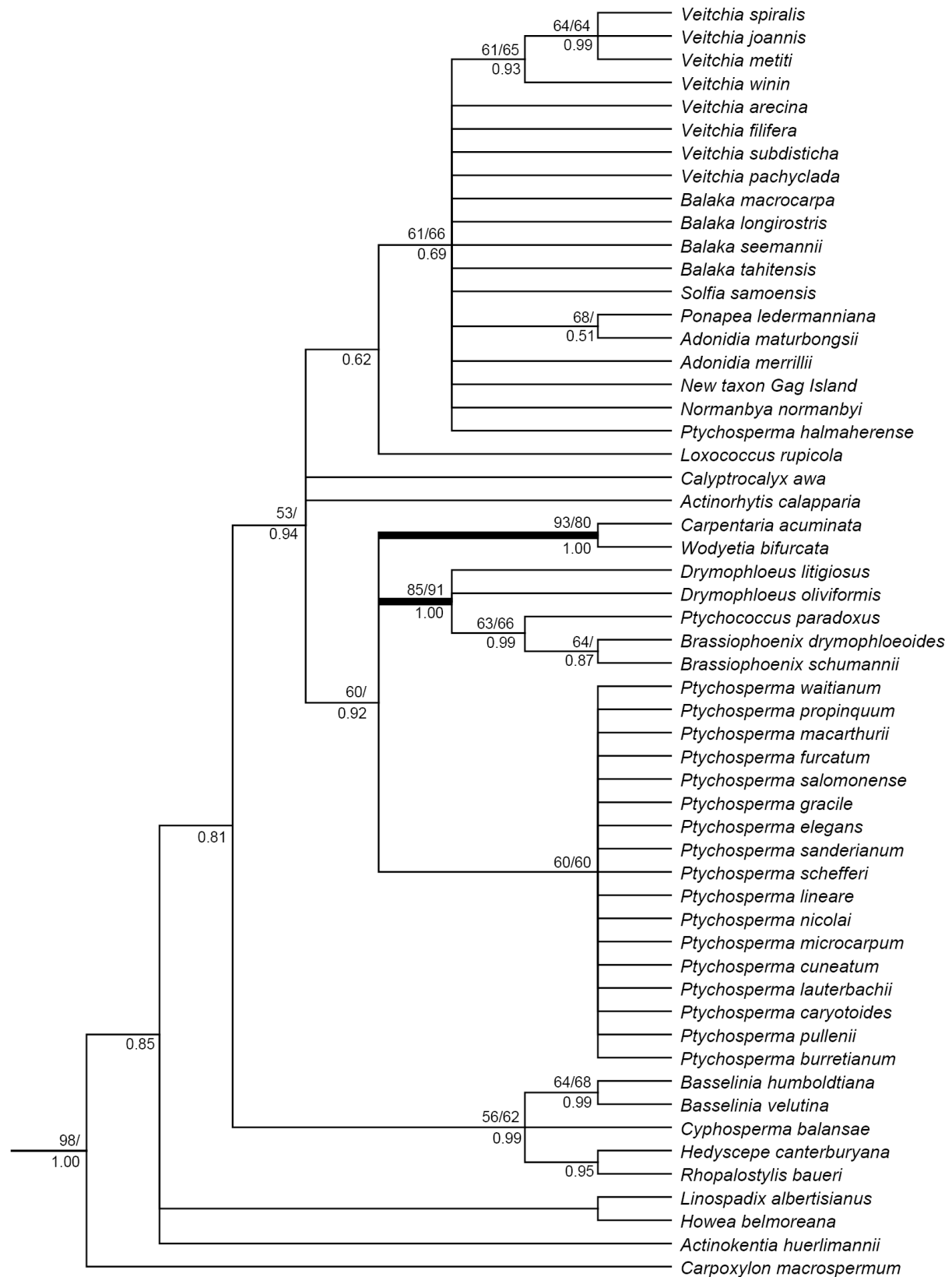


**Fig. S3.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the PRK dataset; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches. Thick lines represent well-supported clades (PBS and LBS >80% and PP >0.95).

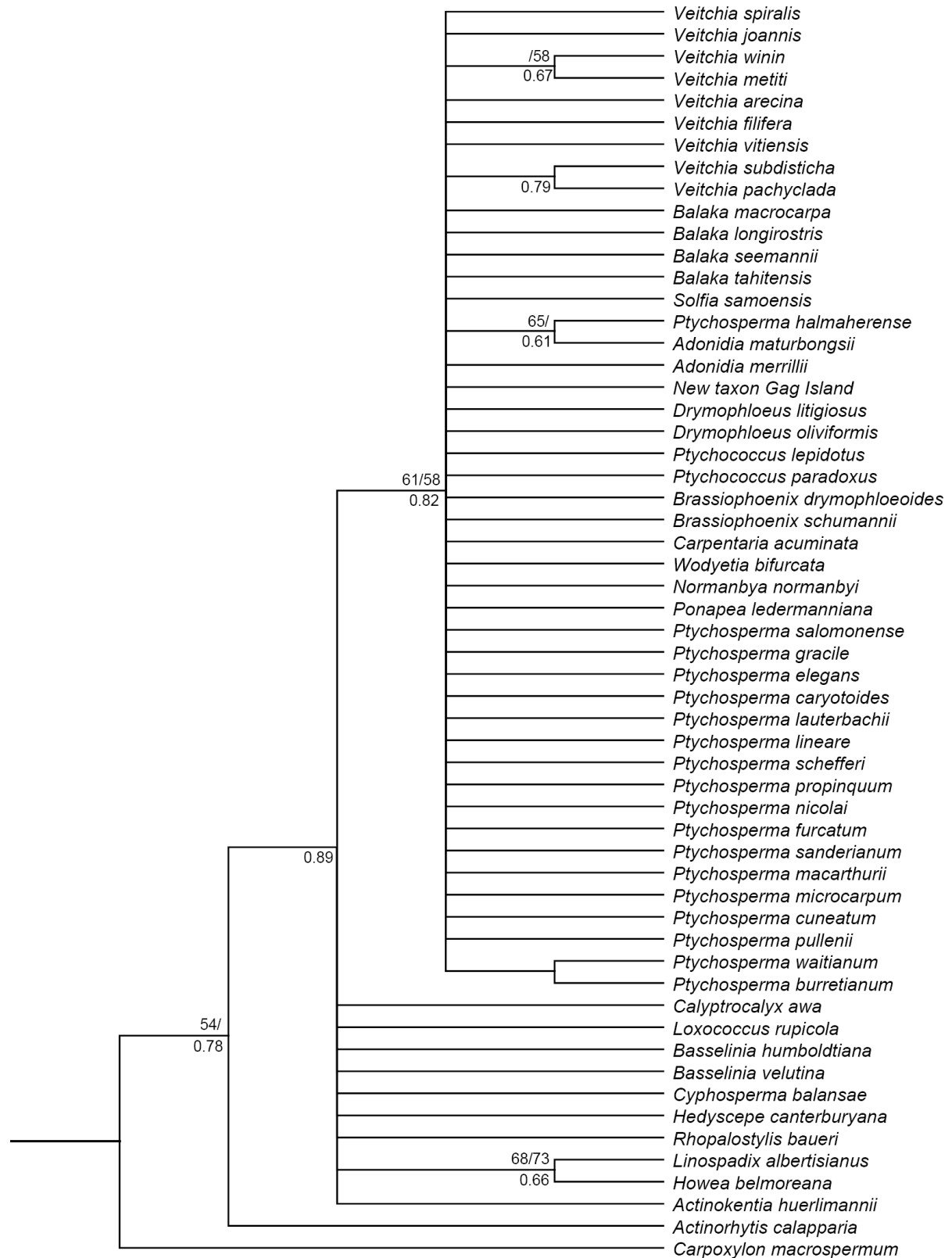




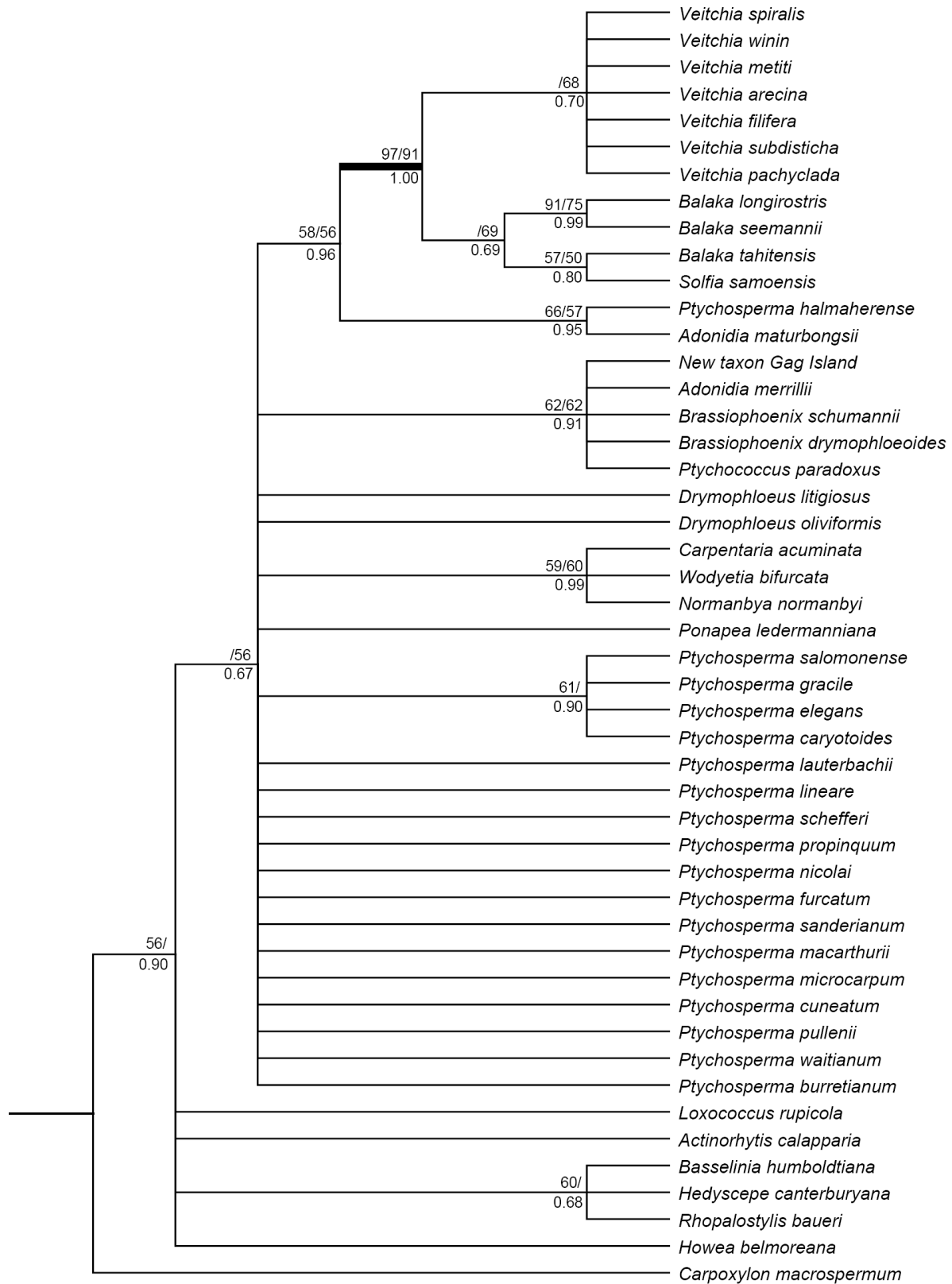
**Fig. S4.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the AG1 dataset; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches. Thick lines represent well-supported clades (PBS and LBS >80% and PP >0.95).



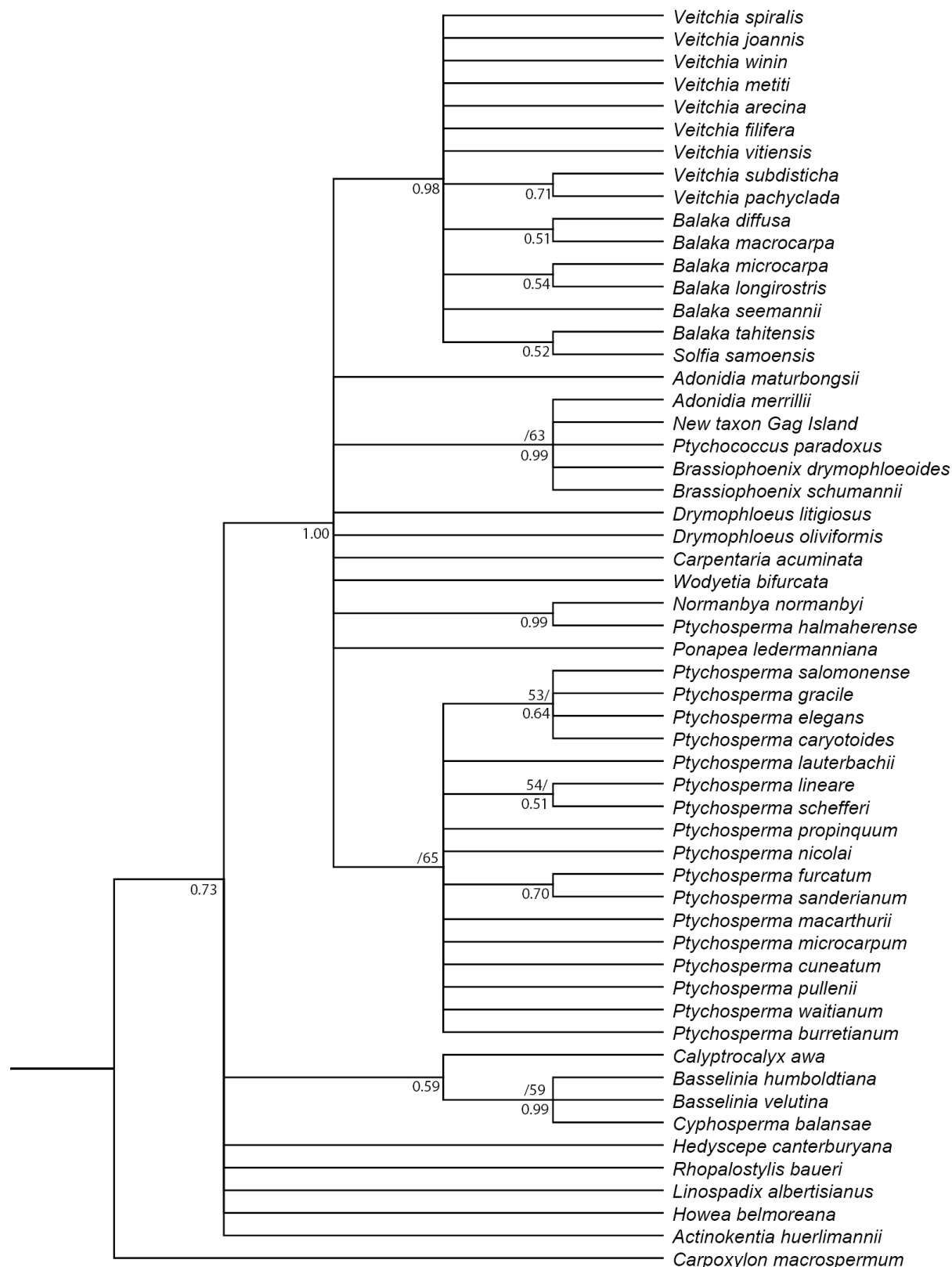
**Fig. S5.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the *rps15-ycf1* dataset; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches. Thick lines represent well-supported clades (PBS and LBS >80% and PP >0.95).



**Fig. S6.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the *matK* dataset; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches. Thick lines represent well-supported clades (PBS and LBS >80% and PP >0.95).



**Fig. S7.** 50% majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian analysis of the *ndhA* dataset; bootstrap supports are indicated above branches (parsimony bootstrap support / likelihood bootstrap support) and posterior probabilities below branches. Thick lines represent well-supported clades (PBS and LBS >80% and PP >0.95).





## **Conclusion générale**



## Synthèse des résultats

L'objectif de ma thèse était d'étudier deux caractères liés à la morphologie de l'appareil reproducteur et particulièrement variables au sein de la famille des palmiers. J'ai ainsi reconstruit l'évolution du système sexuel et celle du nombre d'étamines sur l'arbre phylogénétique de tous les genres de palmiers.

Mes études montrent que l'ancêtre commun à tous les palmiers était probablement monoïque et possédait des fleurs à six étamines. A partir de ces états ancestraux, de nombreuses transitions ont eu lieu pendant l'histoire évolutive de la famille. Des transitions vers l'hermaphrodisme et la dioécie, ainsi que vers des systèmes associant des fleurs hermaphrodites et unisexuées tels que l'andromonoécie ont été mis en évidence. De nombreuses modifications du nombre ancestral d'étamines ont eu lieu. Quelques réductions à une ou trois étamines, mais surtout des augmentations vers un nombre plus élevé. A l'échelle de la famille, l'évolution du nombre d'étamines ne se fait pas de manière progressive. Les transitions directes entre six et plusieurs dizaines (voire centaines) d'étamines sont fréquentes. Mon travail a contribué à amorcer une réflexion sur les mécanismes évolutifs qui sous-tendent l'évolution du nombre d'étamines, en montrant qu'il existe une corrélation entre leur nombre et la production de pollen dans deux sous-familles, les Coryphoideae et les Arecoideae. Néanmoins des expériences complémentaires sont nécessaires pour comprendre si les augmentations répétées du nombre d'étamines chez les palmiers sont le résultat de la sélection ou d'un relâchement de contraintes phylogénétiques.

L'observation de l'évolution du nombre d'étamines à l'échelle de la famille m'a conduite à m'intéresser plus précisément à une sous-tribu présentant une variation importante au niveau de ce caractère : les Ptychospermatinae. Cette étude montre que chez ce groupe contenant uniquement des espèces polyandres, la variation du nombre d'étamines est très importante tant au niveau inter-spécifique qu'intra-spécifique. Afin de reconstruire l'histoire évolutive du nombre d'étamines à l'échelle des espèces, j'ai construit une phylogénie moléculaire de la sous-tribu. J'ai ainsi participé au développement des connaissances sur les relations phylogénétiques au niveau inter-spécifique au sein de la famille des palmiers. La reconstruction du nombre d'étamines sur cette phylogénie révèle de nouveau des transitions multiples vers une augmentation du nombre d'étamines.



## Perspectives

### *L'évolution du système sexuel*

La grande diversité des systèmes sexuels chez les palmiers est connue depuis longtemps et les données sur l'organisation des sexes au niveau des fleurs et des inflorescences sont disponibles dans la littérature pour un grand nombre d'espèces. Notre étude s'est attachée à présenter une vue d'ensemble de cette diversité, ce qui n'avait encore jamais été fait. Nous avons ainsi pu montrer que les Arecaceae se distinguent de la plupart des angiospermes par leur nombre important d'espèces monoïques et dioïques et donc par conséquent, par leur faible nombre d'espèces hermaphrodites. Pour l'ensemble des angiospermes, le pourcentage d'espèces dioïques est estimé à 6% (Renner & Ricklefs 1995), celui d'espèces monoïques entre 3 et 19% (de Jong et al. 2008). L'estimation du nombre d'espèces hermaphrodites oscille donc entre 75 et 91%. Les palmiers, avec 52% d'espèces monoïques, 30% d'espèces dioïques et seulement 17% d'espèces hermaphrodites, présentent ainsi un biais fort en faveur de systèmes sexuels à fleurs unisexuées. La grande majorité des espèces hermaphrodites et monoïques présentent un décalage de maturité des organes ou des fleurs des deux sexes (protandrie notamment). Il semble donc exister, chez les palmiers, une tendance forte à la séparation des sexes, tant au niveau spatial que temporel.

Il serait intéressant d'étudier si cette séparation des sexes est le résultat d'une adaptation à l'évitement de l'autofécondation et/ou à une répartition plus complexe des ressources allouées aux deux sexes (de Jong et al. 2008). La présence de mécanismes d'auto-incompatibilité chez les espèces hermaphrodites et monoïques n'est pas connue, mais, par exemple, certains individus isolés semblent ne pas pouvoir donner de fruits. L'organisation des fleurs chez les espèces monoïques peut être très différente suivant les groupes mais elle conduit souvent à des sex-ratios variables et biaisés en faveur des fleurs mâles. Ainsi lorsque les fleurs sont organisées en triades, organisation la plus commune chez les espèces monoïques, le sex-ratio est de deux fleurs mâles pour une fleur femelle. En outre, les rachillae portent des fleurs mâles en paires ou solitaires dans leur partie distale, ce qui entraîne une variation du sex-ratio (également en faveur de la fonction mâle). Il serait intéressant d'étudier si la monoécie et la dioécie, ainsi que les différentes organisations des fleurs sont le résultat de la sélection de mécanismes permettant une régulation fine du sex-ratio à l'échelle de l'inflorescence, de l'individu et de la population.

Les mécanismes développementaux et génétiques qui sous-tendent la formation des fleurs unisexuées restent encore à explorer. Deux principaux modes ont été proposés (Mitchell & Diggle). Le premier consiste en l'avortement des organes d'un sexe à un stade plus ou moins avancé du développement. Si l'avortement est tardif, des organes stériles (staminodes et pistillode) seront présents. En revanche si l'avortement est précoce, les fleurs apparaîtront structurellement unisexuées. Sur une simple description morphologique, elles ne pourront alors pas être distinguées des fleurs unisexuées produites selon le deuxième mode. Celui-ci implique un remplacement des organes d'un sexe par les organes de l'autre sexe. Les fleurs sont alors structurellement unisexuées non plus uniquement d'un point de vue morphologique mais également développemental. Il serait intéressant de comparer le développement de plusieurs espèces monoïques et de plusieurs espèces dioïques pour identifier les différents modes de développement des fleurs unisexuées. Les staminodes et/ou pistillode étant fréquents chez les palmiers, cela suggère que le premier mode est le plus représenté dans la famille. Cependant, chez *Caryota mitis*, une étamine se développe à l'apex de la fleur, suggérant un remplacement des organes femelles par des organes mâles, ce qui correspond au deuxième mode (Uhl & Moore 1980). Ces études développementales pourraient s'accompagner d'études sur la détermination du sexe, tant au niveau de la fleur, de l'inflorescence que de l'individu. Il semble que cette détermination puisse être réalisée via un contrôle hormonal et/ou génétique. Des études d'expression des gènes liés à la mise en place des organes floraux pourraient être menées chez des taxons apparentés présentant des fleurs unisexuées et des fleurs hermaphrodites.

L'étude de l'évolution des processus de développement et du contrôle génétique des fleurs unisexuées pourrait permettre de progresser dans la compréhension du système sexuel ancestral des palmiers et des nombreuses transitions qui ont lieu dans la famille. Ainsi la doiécie et l'hermaphrodisme ont évolué à partir de la monoécie ; l'andromonoécie à partir de la dioécie, de la monoécie et de l'hermaphrodisme. Les palmiers constituent donc un groupe particulièrement intéressant pour étudier les processus évolutifs qui sous-tendent les transitions entre différents systèmes sexuels.

### *L'évolution du nombre d'étamines*

Notre étude sur l'évolution du nombre d'étamines s'inscrit dans une démarche globale de compréhension de la très grande diversité de ce trait floral chez les palmiers. Une précédente étude avait permis de mettre en évidence chez les *Arecaceae* l'évolution multiple de la polyandrie (plus de six étamines) à partir d'un état ancestral oligandre (six étamines ; Nadot et al. 2011). Nous avons confirmé et complété ces conclusions en détaillant différentes catégories de polyandrie. En effet le nombre d'étamines chez différentes espèces polyandres varie entre sept et mille. Plusieurs catégories de polyandrie ont été définies suivant le degré de variation dans le nombre d'étamines par rapport à l'état ancestral de six étamines : une polyandrie faible (allant de sept à une vingtaine d'étamines), une polyandrie modérée (allant d'une vingtaine à une centaine d'étamines) et une polyandrie forte (à partir d'une centaine d'étamines). Les transitions entre six étamines et des centaines d'étamines sont parfois directes comme chez les *Phytelephea*e ou plus progressives comme chez les *Ptychospermatinae*.

Le mode de développement des étamines nombreuses a été étudié pour certaines espèces (Uhl 1976 ; Uhl & Moore 1977 ; Uhl & Moore 1980 ; Uhl & Dransfield 1984 ; Barfod & Uhl 2001). En revanche, l'hypothèse que les modifications du nombre d'étamines seraient liées à une modification des contraintes de développement n'a pas encore été testée. L'étude de la corrélation entre la forme et le nombre des autres pièces florales (périclype et gynécée) et le nombre d'étamines serait intéressante. Uhl et Moore (1980) ont montré que le développement des étamines chez six espèces de palmier polyandres dépend de pressions exercées par la bractée de l'inflorescence et les pièces du périclype. La forme du périclype, et notamment la forme de la corolle au niveau du bouton floral, pourrait avoir un impact sur le nombre d'étamines. Certaines formes permettraient le développement de plus d'étamines. Pour tester cette hypothèse il serait nécessaire de générer des données sur la forme du bouton floral et non simplement des mesures de la taille du périclype. Les méthodes de morphométrie géométrique permettent d'étudier les variations de formes et leurs co-variations avec d'autres variables (Adams et al. 2004). Des programmes ont été développés pour prendre des points-repères (landmarks) sur des images scannées 2D puis pour les transformer en données numériques pouvant être traitées statistiquement. Des données sur la forme pourraient être générées à partir de dessins de boutons floraux présents dans la littérature puis traitées par des analyses statistiques multivariées.

Le contrôle génétique du nombre d'étamines est encore inconnu chez le palmier. L'identification d'orthologues de gènes impliqués dans la détermination des pièces florales et des frontières entre les organes chez les organismes modèles permettrait d'amorcer les études. Par exemple, il a été montré que SUPERMAN (Bowman et al. 1992) et FON1 (Huang and Ma 1997) jouent un rôle dans le contrôle du nombre d'organes chez *Arabidopsis*. L'expression de ces gènes candidats pourrait par la suite être étudiée, à différents stades de développement, chez des taxons apparentés présentant un contraste pour le nombre d'étamines. L'hybridation in-situ est une technique pour l'étude de l'expression déjà utilisée chez le palmier. L'approche par gènes candidats a notamment permis de mettre en évidence l'intervention de gènes MADS-box dans l'identité des organes floraux au cours du développement de la fleur de palmier (*Elaeis guineensis* ; Adam et al. 2007).

La différence de nombres d'étamines entre deux taxons apparentés est fréquente et parfois très grande. Les étamines étant les organes reproducteurs mâles de la fleur, il est envisageable que la variation observée soit le résultat d'une adaptation à des environnements différents et notamment à des modes de pollinisation différents. Une corrélation entre un nombre d'étamines élevé et une pollinisation par les coléoptères et les abeilles a été mise en évidence chez *Ptychosperma* (Uhl & Moore 1977), suggérant que l'augmentation du nombre d'étamines pourrait avoir été sélectionnée dans le cadre de la coévolution avec les pollinisateurs. Les coléoptères sont les pollinisateurs les plus importants des palmiers, ainsi que les abeilles dans une moindre mesure (Barfod et al. 2011). Ces pollinisateurs sont connus pour visiter des fleurs qui produisent une grande quantité de pollen. Notre étude sur la production de pollen montre que les fleurs possédant plus d'étamines ont tendance à produire plus de grains de pollen. Des expériences dans des populations naturelles, sur la valeur sélective conférée par différents phénotypes et les interactions avec les pollinisateurs permettraient d'estimer si des étamines nombreuses associées ou non à une production de pollen élevée se révèle être le résultat d'une sélection.

Les palmiers constituent un groupe intéressant pour l'étude du nombre d'étamines et notamment de la polyandrie. Celle-ci, que l'on retrouve de nombreuses fois chez les angiospermes, pourrait avoir joué un rôle fondamental de la diversification de ce groupe (Jabbour et al. 2008).

### *La relation entre système sexuel et nombre d'étamines*

La comparaison de l'évolution du système sexuel et du nombre d'étamines (Annexe 4) révèle que la majorité des espèces polyandres présentent également des fleurs unisexuées. Ces deux caractères ne sont néanmoins pas parfaitement corrélés puisque de nombreuses espèces présentent des fleurs unisexuées à six étamines ou moins (par exemple *Nypa*). L'absence de gynécée fonctionnel dans les fleurs mâles pourrait entraîner un relâchement de contraintes développementales, permettant une expansion de l'androcée. L'unisexualité constituerait ainsi une condition préalable à l'augmentation du nombre des étamines. Dans certains cas, les gènes impliqués dans la disparition des organes d'un sexe pourraient également être en relation avec la modification du nombre d'étamines. Par exemple, chez *Arabidopsis*, il a été montré que lorsque SUPERMAN est muté, les étamines se développent vers le centre de la fleur au détriment des carpelles (Bowman et al. 1992). L'étude de ce gène se révèle donc potentiellement intéressante pour l'étude de l'évolution du nombre d'étamines et le déterminisme du sexe des fleurs. Une exception notable intervient chez les Cryosophileae où certaines espèces présentent des fleurs hermaphrodites et polyandres. Le nombre d'étamines est supérieur à six mais reste cependant assez réduit. L'étude du développement des différents organes reproducteurs de ces espèces serait particulièrement intéressante.

Nous avons observé une tendance à la séparation des sexes mâles et femelles que ce soit sur le même individu ou sur des individus différents. Nous avons également observé une variation importante du nombre d'étamines qui est potentiellement corrélée à la production de pollen. Cela pourrait laisser penser que les palmiers présentent une capacité importante de modulation du sex-ratio et des investissements dans les fonctions mâles et femelles tant au niveau de la fleur que de l'inflorescence. Il serait intéressant d'étudier le sex-ratio dans des populations naturelles, pour estimer sa variation au sein d'une espèce ou entre des espèces différentes en fonction des conditions de ressources et des stratégies de reproduction et de pollinisation. Les perspectives d'expérimentation permettant d'étudier l'évolution de la morphologie de l'appareil reproducteur dans un contexte écologique sont nombreuses et prometteuses.

# **Références**



- Adam, H., Jouannic, S., Morcillo, F., Verdeil, J. L., Duval, Y. & Tregear, J. W. 2007. Determination of flower structure in *Elaeis guineensis*: do palms use the same homeotic genes as other species? *Annals of Botany*, **100**, 1-12.
- Adams, D. C., Rohlf, F. J. & Slice, D. E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the "revolution". *Italian Journal of Zoology* **71**, 5-16.
- Alvarez, I. & Wendel, J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**, 417-434.
- Angiosperm Phylogeny Group. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plant: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**, 105-121.
- Armbruster, W. S., Debevec, E. M. & Willson, M. F. 2002. Evolution of syncarpy in angiosperms: theoretical and phylogenetic analyses of the effects of carpel fusion on offspring quantity and quality. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 657-672
- Asmussen, C. B., Baker, W. J. & Dransfield, J. 2000. Phylogeny of the palm family (Arecaceae) based on *rps16* intron and *trnL-trnF* plastid DNA sequences. In: *Monocots: systematics and evolution* (Ed. by Wilson, K. L. & Morrison, D. A.). Melbourne: CSIRO.
- Asmussen, C. B. & Chase, M. W. 2001. Coding and noncoding plastid DNA in palm systematics. *American Journal of Botany*, **88**, 1103–1117.
- Asmussen, C. B., Dransfield, J., Deickmann, V., Barfod, A. S., Pintaud, J.-C. & Baker, W. J. 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151**, 15–38.
- Bacon, C. D., Feltus, F. A., Paterson, A. H. & Bailey, C. D. 2007. Novel nuclear intron-spanning primers for Arecaceae evolutionary biology. *Molecular Ecology Notes*, **8**, 211-214.
- Bailey, C. D., Carr, T. G., Harris, S. A. & Hughes, C. E. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**, 435-455.
- Baker, W. J., Asmussen, C. B., Barrow, S. C., Dransfield, J. & Hedderson, T. A. 1999. A phylogenetic study of the palm family (Palmae) based on chloroplast DNA sequences from the *trnL-trnF* region. *Plant Systematics and Evolution*, **219**, 111-126.



- Baker, W. J. & Couvreur, T. L. P. 2012a. Global biogeography and diversification of palms sheds light on the evolution of tropical lineages. I. Historical biogeography. *Journal of Biogeography*, **40**, 274–285.
- Baker, W. J. & Couvreur, T. L. P. 2012b. Global biogeography and diversification of palms sheds light on the evolution of tropical lineages. II. Diversification history and origin of regional assemblages. *Journal of Biogeography*, **40**, 286–298.
- Baker, W. J. & Heatubun, C. D. 2012. New palms from Biak and Supiori, Western New Guinea. *Palms*, **56**, 131-150.
- Baker, W. J., Hedderson, T. A. & Dransfield, J. 2000. Molecular phylogenetics of subfamily Calamoideae (Palmae) based on nrDNA ITS and cpDNA *rps16* intron sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**, 195–217.
- Baker, W. J., Norup, M. V., Clarkson, J. J., Couvreur, T. L. P., Dowe, J. L., Lewis, C. E., Pintaud, J.-C., Savolainen, V., Wilmot, T. & Chase, M. W. 2011. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). *Annals of Botany*, **108**, 1417-1432.
- Baker, W. J., Savolainen, V., Asmussen-Lange, C. B., Chase, M. W., Dransfield, J., Forest, F., Harley, M. M., Uhl, N. W. & Wilkinson, M. 2009. Complete generic-level phylogenetic analyses of palms (Arecaceae) with comparisons of supertree and supermatrix approaches. *Systematic Biology*, **58**, 240–256.
- Baker, W. J., Zona, S., Heatubun, C. D., Lewis, C. E., Maturbongs, R. A. & Norup, M. V. 2006. *Dransfieldia* (Arecaceae)—A New Palm Genus from Western New Guinea. *Systematic Botany*, **31**, 61-69.
- Barfod, A. S. 1991. A monographic study of the subfamily Phytelephantoideae (Arecaceae). *Opera Botanica*, **105**, 1-73.
- Barfod, A. S., Hagen, M. & Borchsenius, F. 2011. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). *Annals of Botany*, **108**, 1503-1516.
- Barret, S. C. H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 274-284.
- Becker, A. & Theissen, G. 2003. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**, 464-489.

- Becker, A., Winter, K.-U., Meyer, B., Saedler, H. & Theissen, G. 2000. MADS-Box gene diversity in seed plants 300 million years ago. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 1425–1434.
- Bentham, G. & Hooker, J. D. 1862-1883 Genera Plantarum.  
<http://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/747>
- Berendse, F. & Scheffer, M. 2009. The angiosperm radiation revisited, an ecological explanation for Darwin's "abominable mystery". *Ecology Letters*, **12**, 865–872.
- Bjorholm, S., Svenning, J. C., Skov, F. & Balslev, H. 2005. Environmental and spatial controls of palm (Arecaceae) species richness across the Americas. *Global Ecology and Biogeography*, **14**, 423-429.
- Bock, W. J. & vonWahlert, G. 1965. Adaptation and the form-function complex. *Evolution*, **19**, 269-299
- Bowe, L. M., leCoat, G. & dePamphilis, C. W. 2000. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: Extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 4092–4097.
- Bowman, J. L. 1997. Evolutionary conservation of angiosperm flower development at the molecular and genetic levels. *Journal of Biosciences*, **22**, 515–527.
- Bowman, J. L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U. & Meyerowitz, E. M. 1992. SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development*, **114**, 599-615.
- BuffonLeclerc, C. 1756. Histoire naturelle, générale et particulière, avec la description du cabinet du roi. Tome Sixième: Les Animaux sauvages.  
<http://www.buffon.cnrs.fr/>.
- Busch, A. & Zachgo, S. 2009. Flower symmetry evolution: towards understanding the abominable mystery of angiosperm radiation. *BioEssays*, **31**, 1181-1190.
- Campbell, C. R. 2009. Using phenotypic manipulations to study multivariate selection of floral trait associations. *Annals of Botany*, **103**, 1557-1566.
- Castillejo, C., Romera-Branchat, M. & Pelaz, S. 2005. A new role of the *Arabidopsis* *SEPALLATA3* gene revealed by its constitutive expression. *The Plant Journal*, **43**, 586-596.
- CBOLPlantWorkingGroup. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **106**, 12794-12797.

- Chaw, S.-M., Parkinson, C. L., Cheng, Y., Vincent, T. M. & Palmer, J. D. 2000. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 4086–4091.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L. & Etal. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, **5**, e8613.
- Citerne, H., Jabbour, F., Nadot, S. & Damerval, C. 2010. The evolution of floral symmetry. *Advances in Botanical Research*, **54**, 85-137.
- Clarke, J. T., Warnock, R. C. M. & Donoghue, P. C. J. 2011. Establishing a time-scale for plant evolution. *New Phytologist*, **192**, 266–301.
- Coen, E. S. & Meyerowitz, E. M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, **353**, 31-37.
- Corsi, P. 2001. *Lamarck: genèse et enjeux du transformisme*. Paris: CNRS éditions
- Couvreur, T. L. P., Forest, F. & Baker, W. J. 2011. Origin and global diversification patterns of tropical rain forests: inferences from a complete genus-level phylogeny of palms. *BMC Biology*, **9**, doi:10.1186/1741-7007-9-44.
- Crepet, W. L. & Niklas, K. J. 2009. Darwin's second "abominable mystery": why are there so many angiosperm species? *American Journal of Botany*, **96**, 366-381.
- Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press
- Cubas, P., Vincent, C. & Coen, E. 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*, **401**, 157-161.
- Cuenca, A. & Asmussen-Lange, C. B. 2007. Phylogeny of the palm tribe Chamaedoreae (Arecaceae) based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany*, **32**, 250–263.
- Cuenca, A., Asmussen-Lange, C. B. & Borchsenius, F. 2008. A dated phylogeny of the palm tribe Chamaedoreae supports Eocene dispersal between Africa, North and South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46**, 760–775.
- Culley, T. M., Weller, S. G. & Sakai, A. K. 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **17**, 361-369.

- D'Arcy, W. 1996. Anthers and stamens and what they do. In: *The anther form, function and phylogeny* (Ed. by D'Arcy, W. & Keating, R.): Cambridge University Press.
- Damerval, C. & Nadot, S. 2007. Evolution of perianth and stamen characteristics with respect to floral symmetry in Ranunculales. *Annals of Botany*, **100**, 631-640.
- Darwin, C. 1859. *L'origine des espèces (traduction Edmond Barbier 2009)*. Paris: Flammarion.
- de Jong, T. J., Shmida, A. & Thuijsman, F. 2008. Sex allocation in plants and the evolution of monoecy. *Evolutionary Ecology Research*, **10**, 1087-1109.
- DeBodt, S., Maere, S. & VandePeer, Y. 2005. Genome duplication and the origin of angiosperms. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **20**, 591-597.
- Dowl, J. L. 1998. *Livistona alfredii*. IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Doyle, J. A. 2012. Molecular and fossil evidence on the origin of angiosperms. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **40**, 301–326.
- Dransfield, J., Uhl, N. W., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M. & Lewis, C. E. 2005. A new phylogenetic classification of the palm family. *Kew Bulletin*, **60**, 559-569.
- Dransfield, J., Uhl, N. W., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M. & Lewis, C. E. 2008. *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. Royal Botanic Gardens, Kew: Kew Publishing.
- Dyer, A. G., Boyd-Gerny, S., McLoughlin, S., Rosa, M. G. P., Simonov, V. & Wong, B. B. M. 2012. Parallel evolution of angiosperm colour signals: common evolutionary pressures linked to hymenopteran vision. *Proceedings of the Royal Society B*, **279**, 3606-3615.
- Eiserhardt, W. L., Bjorholm, S., Svenning, J.-C., Rangel, T. F. & Balslev, H. 2011. Testing the water–energy theory on american palms (Arecaceae) using geographically weighted regression. *PLoS ONE*, **6**, e27027.
- Endress, P. K. 1990. Patterns of floral construction in ontogeny and phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **39**, 153–175.
- Endress, P. K. 2006. Angiosperm floral evolution: Morphological developmental framework. *Advances in Botanical Research*, **44**, 1 – 61.
- Endress, P. K. 2011. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. *American Journal of Botany*, **98**, 370-396.

- Endress, P. K. & Lorence, D. H. 1983. Diversity and evolutionary trends in the floral structure of *Tambourissa* ( Monimiaceae ). *Plant Systematics and Evolution*, **143**, 53-81.
- Evans, R. 1998. *Cryosophila williamsii*. *IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. www.iucnredlist.org*.
- Feliner, G. N. & Rosselló, J. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 911-9.
- Fleming, T. H., Geiselman, C. & Kress, W. J. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany*, **104**, 1017-1043.
- Friedman, J. & Barrett, S. C. H. 2008. A phylogenetic analysis of the evolution of wind pollination in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 49-58.
- Friedman, J. & Barrett, S. C. H. 2009. Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. *Annals of Botany*, **103**, 1515–1527.
- Friedman, W. E. 2009. The meaning of Darwin's "abominable mystery". *American Journal of Botany*, **91**, 5-21.
- Friesen, M. L., Porter, S. S., Stark, S. C., vonWettberg, E. J., Sachs, J. L. & Martinez-Romero, E. 2011. Microbially mediated plant functional traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **42**, 23-46.
- Frohlich, M. W. & Chase, M. W. 2007. After a dozen years of progress the origin of angiosperms is still a great mystery. *Nature*, **450**, 1184-1189.
- Galletti, M., Donatti, C. I., Pires, A. S., Guimaraes, P. R. & Jordano, P. 2006. Seed survival and dispersal of an endemic Atlantic forest palm: the combined effects of defaunation and forest fragmentation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151**, 141-149.
- Gaut, B. S., Morton, B. R., McCaig, B. C. & Clegg, M. T. 1996. Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcl*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**, 10274–10279.
- Gaut, B. S., Muse, S. V., Clark, W. D. & Clegg, M. T. 1992. Relative rates of nucleotide substitution at the *rbcl* locus of monocotyledonous plants. *Journal of Molecular Evolution*, **35**, 292-303.

- GeoffroySaint-Hilaire, E. 1829. Cours de l'histoire naturelle des mammifères.  
<http://archive.org/details/coursdelhistoir00saingoog>
- Goodman, C. S. & Coughlin, B. C. 2000. The evolution of evo-devo biology.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 4424–4425.
- Graham, L. E., Cook, M. E. & Busse, J. S. 2000. The origin of plants: body plan changes contributing to a major evolutionary radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 4535–4540.
- Grant, V. 1950. The protection of the ovules in flowering plants. *Evolution*, **4**, 179-201
- Grant, V. 1995. Sexual selection in plants: pros and cons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **92**, 1247-1250.
- Hahn, W. J. 2002. A molecular phylogenetic study of the palmae (Arecaceae) based on *atpB*, *rbcl*, and 18S nrDNA sequences. *Systematic Biology*, **51**, 92-112.
- Harder, L. D. & Johnson, S. D. 2009. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist*, **183**, 530-545.
- Haynes, J. & McLaughlin, J. 2000. Edible palms and their uses. University of Florida : Institute of Food and Agriculture Sciences
- Henderson, A. 1986. A review of pollination studies in the Palmae. *The Botanical Review*, **52**, 221-259.
- Henderson, A. 1990. Arecaceae. Part I. Introduction and the Iriarteinae. *Flora Neotropica*, **53**, 1-100.
- Henderson, A. 2002. *Evolution and ecology of palms*. Bronx, New York: The New York Botanical Garden Press.
- Henderson, A. J. & Bacon, C. D. 2011. Lanonia (Arecaceae: Palmae), a new genus from Asia, with a revision of the species. *Systematic Botany*, **36**, 883-895.
- Herrera, C. 2002. Seed dispersal by vertebrates In: *Plant-Animal interactions an evolutionary approach* (Ed. by Herrera, C. & Pellmyr, O.): Blackwell publishing
- Hodges, S. A. & Arnold, M. L. 1995. Spurring plant diversification: are floral nectar spurs a key innovation? *Proceedings of the Royal Society B*, **262**, 343-348.
- Hollingsworth, P. M. 2011. Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **108**, 19451-19452.
- Honma, T. & Goto, K. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, **409**, 525-529.

- Huang, H. & Ma, H. 1997. FON1, an Arabidopsis gene that terminates floral meristem activity and controls flower organ number. *The Plant Cell*, **9**, 115-134.
- Hughes, C. E., Eastwood, R. J. & Bailey, C. D. 2006. From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **361**, 211-225.
- Husband, B. C. & Barrett, S. C. H. 1992. Effective population size and genetic drift in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution*, **46**, 1875-1890.
- IUCN. 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Jabbour, F., Damerval, C. & Nadot, S. 2008. Evolutionary trends in the flowers of Asteridae: is polyandry an alternative to zygomorphy? *Annals of Botany*, **102**, 153-165.
- Jeanson, M. L. 2011a. Systématique de la tribu des Caryoteae (Arecaceae). Paris: Museum National d'Histoire Naturelle.
- Jeanson, M. L., Labat, J.-N. & Little, D. P. 2011b. DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? *Annals of Botany*, **108**, 1445-1451.
- Joppa, L. N., Roberts, D. L. & Pimm, S. L. 2011. How many species of flowering plants are there? *Proceedings of the Royal Society B*, **278**, 554-559.
- Jordan, C. Y. & Harder, L. D. 2006. Manipulation of bee behavior by inflorescence architecture and its consequences for plant mating. *The American Naturalist*, **167**, 496-509.
- Kenrick, P. & Crane, P. R. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, **389**, 33-39.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **217**, 624-626.
- Kreft, H., Sommer, J. H. & Barthlott, W. 2006. The significance of geographic range size for spatial diversity patterns in Neotropical palms. *Ecography*, **29**, 21-30.
- Larousse. 2013. Dictionnaire. <http://www.larousse.fr/dictionnaires>.
- Levin, D. A. 1971. The origin of reproductive isolating mechanisms in flowering plants. *Taxon*, **20**, 91-113.
- Lewis, C. E. & Doyle, J. J. 2001. Phylogenetic utility of the nuclear gene malate synthase in the palm family (Arecaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **19**, 409-420.

- Lewis, C. E. & Doyle, J. J. 2002. A phylogenetic analysis of tribe Areceae (Arecaceae) using two low-copy nuclear genes. *Plant Systematics and Evolution*, **236**, 1-17.
- Lewis, E. B. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, **276**, 565-570
- Linder, H. P. 1998. Morphology and the evolution of wind pollination. In: *Reproductive Biology* (Ed. by Owens, S. J. & Rudall, P. J.), pp. 123-135. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Loo, A. H. B., Dransfield, J., Chase, M. W. & Baker, W. B. 2006. Low copy nuclear DNA, phylogeny and the evolution of the dichogamy in the betel nut palms and their relative (Arecinae, Arecaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**, 598-618.
- Lorence, D. H. 1985. A monograph of the Monimiaceae (Lauraceae) in the Malagasy region (Southwest Indian Ocean). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **72**, 1 – 165.
- Ludena, B., Chabrillange, N., Aberlenc-Bertossi, F., Adam, H., Tregear, J. W. & Pintaud, J.-C. 2011. Phylogenetic utility of the nuclear genes AGAMOUS 1 and PHYTOCHROME B in palms (Arecaceae): an example within Bactridinae. *Annals of Botany*, **108**, 1433-1444.
- Maddison, D. R., Schulz, K.-S. & Maddison, W. P. 2007. The Tree of Life Web Project. *Zootaxa*, **1668**, 19-40.
- Maynard-Smith, J., Burian, R., Kauffman, S., Alberch, P., Campbell, J., Goodwin, B., Lande, R., Raup, D. & Wolpert, L. 1985. Developmental constraints and evolution: a perspective from the mountain lake conference on development and evolution. *The Quarterly Review of Biology*, **60**, 265-287.
- Mathews, S. 2009. Phylogenetic relationships among seed plants: persistent questions and the limits of molecular data. *American Journal of Botany*, **96**, 228-236.
- Mitchell, C. H. & Diggle, P. K. 2005. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. *American Journal of Botany*, **92**, 1068-1076.
- Moore, H. E. 1973. The major groups of palms and their distribution. *Gentes Herbarum*, **11**, 27-140.



- Morjan, C. L. & Rieseberg, L. H. 2004. How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Molecular Ecology*, **13**, 1341-1356.
- Myers, N., Mittermeier, A. R., Mittermeier, C. G., daFonseca, G. A. B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858
- Nadot, S., Sannier, J., Barfod, A. S. & Baker, W. J. 2011. Evolution of the palm androecium as revealed by character mapping on a supertree. In: *Flowers on the tree of life* (Ed. by Wanntorp, L. & Roncedo-Craene, L. P.): Cambridge University Press.
- Norup, M. V., Dransfield, J., Chase, M. W., Barfod, A. S., Fernando, E. S. & Baker, W. B. 2006. Homoplasious character combinations and generic delimitations: a case study from the Indo-Pacific arecoid palms (Arecaceae: Areceae). *American Journal of Botany*, **93**, 1065-1080.
- Page, W. 1998. *Hyophorbe lagenicaulis*. IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Palmweb. 2013. Palmweb: Palms of the World Online. Published on the internet <http://www.palmweb.org/>.
- Paton, A. J., Brummitt, N., Govaerts, R., Harman, K., Hinchcliffe, S., Allkin, B. & Lughadha, E. N. 2008. Towards target 1 of the global strategy for plant conservation: a working list of all known plant species—progress and prospects. *Taxon*, **57**, 602–611.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E. & Yanofsky, M. F. 2000. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, **405**, 200-203.
- Pellmyr, O. 2002. Pollination by animals In: *Plant-Animal interactions an evolutionary approach* (Ed. by Herrera, C. & Pellmyr, O.): Blackwell publishing
- Prenner, G., Vergara-Silva, F. & Rudall, P. J. 2009. The key role of morphology in modelling inflorescence architecture. *Trends in Plant Sciences*, **14**, 302-309.
- Preston, J. C., Martinez, C. C. & Hileman, L. C. 2011. Gradual disintegration of the floral symmetry gene network is implicated in the evolution of a wind-pollination syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **108**, 2343-2348.
- Prusinkiewicz, P., Erasmus, Y., Lane, B., Harder, L. D. & Coen, E. 2007. Evolution and development of inflorescence architectures. *Science*, **316**.

- Purugganan, M. D., Rounsley, S. D., Schmidt, R. J. & Yanofsky, M. F. 1995. Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics*, **140**, 345-356.
- Rakotoarinivo, M. & Dransfield, J. 2012. *Tahina spectabilis*. IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Regal, P. J. 1977. Ecology and evolution of flowering plant dominance. *Science*, **196**, 622-629
- Reich, P. B., Walters, M. B. & Ellsworth, D. S. 1997. From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**, 13730–13734.
- Ren, M.-X. & Tang, Y.-Y. 2010. Anther fusion enhances pollen removal in *Campsis grandiflora*, a hermaphroditic flower with didynamous stamens. *International Journal of Plant Sciences*, **171**, 275-282.
- Renner, S. S. & Ricklefs, R. E. 1995. Dioecy and its correlations in the flowering plants. *American Journal of Botany*, **82**, 596-606.
- Rieseberg, L. H., Ellstrand, N. C. & Arnold, M. 1993. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences*, **12**, 213-241.
- Rieseberg, L. H. & Wendel, J. 1993. Introgression and its consequences in plants. In: *Hybrid zones and the evolutionary process* (Ed. by Harrison, R.). New-York, NY, USA: Oxford University Press.
- Roncal, J., Francisco-Ortega, J., Asmussen, C. B. & Lewis, C. E. 2005. Molecular phylogenetics of tribe Geonomeae (Arecaceae) using nuclear DNA sequences of Phosphoribulokinase and RNA Polymerase II. *Systematic Botany*, **30**, 275–283.
- Roncal, J., Zona, S. & Lewis, C. E. 2008. Molecular phylogenetic studies of caribbean palms (Arecaceae) and their relationships to biogeography and conservation. *Botanical Reviews*, **74**, 78-102.
- Ronce de Craene, L. P. & Smets, E. 1987. The distribution and the systematic relevance of the androecial characters oligomery and polymery in the Magnoliophytina. *Nordic Journal of Botany*, **7**, 239-253.
- Ronce de Craene, L. P. & Smets, E. F. 1998. Notes on the evolution of androecial organisation in the Magnoliophytina (angiosperms). *Botanica Acta*, **111**, 77-86.

- Ronce de Craene, L. P. & Smets, E. F. 2001. Staminodes: their morphological and evolutionary significance. *The Botanical Review*, **67**, 351-402.
- Ronse de Craene, L. P., Soltis, P. S. & Soltis, D. E. 2003. Evolution of floral structures in basal angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, **164**, 329-363.
- Sargent, R. D. 2004. Floral symmetry affects speciation rates in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society B*, **271**, 603-608.
- Sauquet, H., Ho, S. Y. W., Gandolfo, M. A., Jordans, G. J., Wilf, P. & et al. 2012. Testing the impact of calibration on molecular divergence times using a fossil-rich group: the case of *Nothofagus* (Fagales). *Systematic Biology*, **61**, 289–313.
- Sauquet, H. & Nadot, S. 2013. La botanique contemporaine. In: *La Science au Présent 2013*, pp. 192-203: Encyclopaedia Universalis.
- Savolainen, V., Anstett, M.-C., Lexer, C., Hutton, I., Clarkson, J. J., Norup, M. V., Powell, M. P., Springate, D., Salamin, N. & Baker, W. J. 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature*, **441**.
- Scarcelli, N., Barnaud, A., Eiserhardt, W., Treier, U. A., Seveno, M., d'Anfray, A., Vigouroux, Y. & Pintaud, J.-C. 2011. A set of 100 chloroplast DNA primer pairs to study population genetics and phylogeny in Monocotyledons. *PLoS ONE*, **6**, e19954.
- Schmid, R. 1983. Septal nectaries of *Asterogyne martiana* and other Palmae. *Principes*, **27**, 168-174.
- Schoen, D. J. & Dubuc, M. 1990. The evolution of inflorescence size and number: a gamete-packaging strategy in plants. *American Naturalist*, **135**, 841-857.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. & Sommer, H. 1990. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, **250**, 931-936.
- Scotland, R. W. & Wortley, A. H. 2003. How many species of seed plants are there? *Taxon*, **52**, 101–104.
- Selosse, M.-A., Richard, F., He, X. & Simard, S. W. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Science*, **21**, 621-628.
- Singer, S. D., Krogan, N. T. & Ashton, N. W. 2007. Clues about the ancestral roles of plant MADS-box genes from a functional analysis of moss homologues. *Plant Cell Reports*, **26**, 1155-1169.

- Skogsmyr, I. & Lankinen, A. 2002. Sexual selection: an evolutionary force in plants? *Biological Reviews*, **77**, 537-562.
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Angenent, G. C. & Kaufmann, K. 2012. Developmental and evolutionary diversity of plant MADSdomain factors: insights from recent studies. *Development*, **139**, 3081-3098.
- Soltis, P. S., Brockington, S. F., Yoo, M.-J., Piedrahita, A., Latvis, M., Moore, M. J., Chanderbali, A. S. & Soltis, D. E. 2009. Floral variation and floral genetics in basal angiosperms. *American Journal of Botany*, **91**, 110-128.
- Stevens, P. F. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Strauss, S. Y. & Whittall, J. B. 2006. Non-pollinator agents of selection on floral traits. In: *Ecology and evolution of flowers* (Ed. by Harder, L. D. & Barrett, S. C. H.), pp. 120-138. Oxford: Oxford University Press.
- Sunderland, T. C. H. 2012. A taxonomic revision of the rattans of Africa (Arecaceae: Calamoideae). *Phytotaxa* **51**, 1–76
- Theissen, G., Becker, A., DiRosa, A., Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., Winter, K.-U. & Saedler, H. 2000. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*, **42**, 115–149.
- Theissen, G. & Melzer, R. 2007. Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. *Annals of Botany*, **100**, 603–619.
- Thien, L. B., Azuma, H. & Kawano, S. 2000. New perspectives on the pollination biology of basal angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, **161**, S225-S235.
- Thomas, M. M., Garwood, N. C., Baker, W. B., Henderson, S. A., Russell, S. J., Hodel, D. R. & Bateman, R. M. 2005. Molecular phylogeny of the palms genus *Chamaedorea*, based on the low-copy nuclear genes PRK and RPB2. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**, 398-415.
- Thomas, R. & DeFranceschi, D. 2012. First evidence of fossil Cryosophileae (Arecaceae) outside Americas (early Oligocene and late Miocene of France): Anatomy, palaeobiogeography and evolutionary implications. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **171**, 27– 39.
- Thomson, J. D. & Wilson, P. 2008. Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence and directionality. *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 23-38.

- Tomlinson, P. B. 2006. The uniqueness of palms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151**, 5-14.
- Tomlinson, P. B., Horn, J. W. & Fisher, J. B. 2011. *The anatomy of palms (Arecaceae - Palmae)*. Oxford: Oxford University Press.
- Tomlinson, P. B. & Huggett, B. A. 2012. Cell longevity and sustained primary growth in palm stems. *American Journal of Botany*, **99**, 1891-1902.
- Trénel, P., Gustafsson, M. H. G., Baker, W. J., Asmussen-Lange, C. B., Dransfield, J. & Borchsenius, F. 2007. Mid-Tertiary dispersal, not Gondwanan vicariance explains distribution patterns in the wax palm subfamily (Ceroxyloideae: Arecaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **45**, 272-288.
- Uhl, N. & Moore, H. E. 1980. Androecial development in six polyandrous genera representing five major groups of palms. *Annals of Botany*, **45**, 57-75.
- Uhl, N. W. & Dransfield, J. 1984. Development of the inflorescence, androecium and gynoecium with reference to palms. In: *Contemporary problems in plant anatomy* (Ed. by White, R. A. & Dickinson, W. C.). New York: Academic Press.
- Uhl, N. W. & Dransfield, J. 1987. *Genera Palmarum, a classification of palms based on the work of Harold E. Moore Jr.* L.H. Bailey Hortorium and the International Palm Society, Lawrence, Kansas.
- Uhl, N. W., Dransfield, J., Davis, J. I., Luckow, M. A., Hansen, K. S. & Doyle, J. J. 1995. Phylogenetic relationships among palms: cladistic analysis of morphological and chloroplast DNA restriction site variation. In: *Monocotyledons: systematics and evolution* (Ed. by Rudall, P. J., Cribb, P. J., Cutler, D. F. & Humphries, C. J.), pp. 623-661: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Uhl, N. W. & Moore, H. E. 1977. Correlation of inflorescence, flower structure, and floral anatomy with pollination in some palms. *Biotropica*, **9**, 170-190.
- Vamosi, J. C. & Vamosi, S. M. 2010. Key innovations within a geographical context in flowering plants: towards resolving Darwin's abominable mystery. *Ecology Letters*, **13**, 1270–1279.
- Von Linné, C. 1753. *Species Plantarum*. <http://www.biodiversitylibrary.org/item/13829>
- Walker-Larsen, J. & Harder, L. D. 2000. The evolution of staminodes in angiosperms: patterns of stamen reduction, loss and functional re-invention. *American Journal of Botany*, **87**, 1367-1384.

- Walther, G. R., Gritti, E. S., Berger, S., Hickler, T., Tang, Z. & Sykes, M. T. 2007. Palms tracking climate change. *Global Ecology and Biogeography*, **16**, 801–809.
- Whittall, J. B. & Hodges, S. A. 2007. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, **447**, 706-709.
- Wikström, N., Savolainen, V. & Chase, M. W. 2001. Evolution of the angiosperms: Calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society B*, **268**, 2211-2220.
- Wilcock, C. & Neiland, R. 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Sciences*, **7**, 270-277.
- Wing, S. L. & Boucher, L. D. 1998. Ecological aspects of the cretaceous flowering plant radiation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **26**, 379-421.
- Zona, S. 1999. New perspective on generic limits and relationships in the Ptychospermatinae (Palmae: Arecoideae). In: *Evolution, variation and classification of palms* (Ed. by Henderson, A. & Borchsenius, F.), pp. 255-263. Bronx New York: The New York Botanical Garden Press.
- Zona, S., Francisco-Ortega, J., Jestrow, B., Baker, W. J. & Lewis, C. E. 2011. Molecular phylogenetics of the palm subtribe Ptychospermatinae (Arecaceae). *American Journal of Botany*, **98**, 1-11.
- Zona, S. & Henderson, A. 1989. A review of animal-mediated seed dispersal of palms. *Selbyana*, **11**, 6-21.

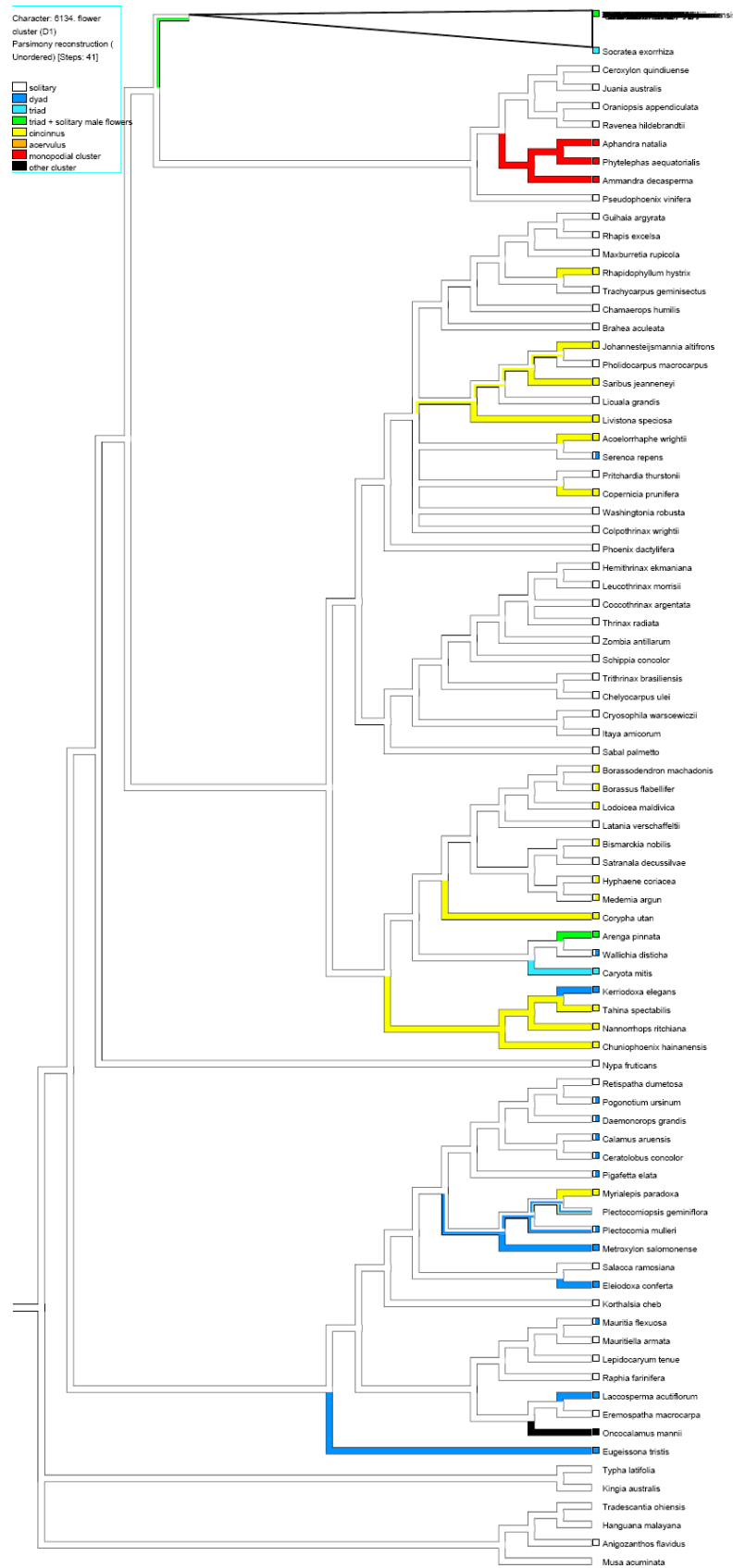


# **Annexes**



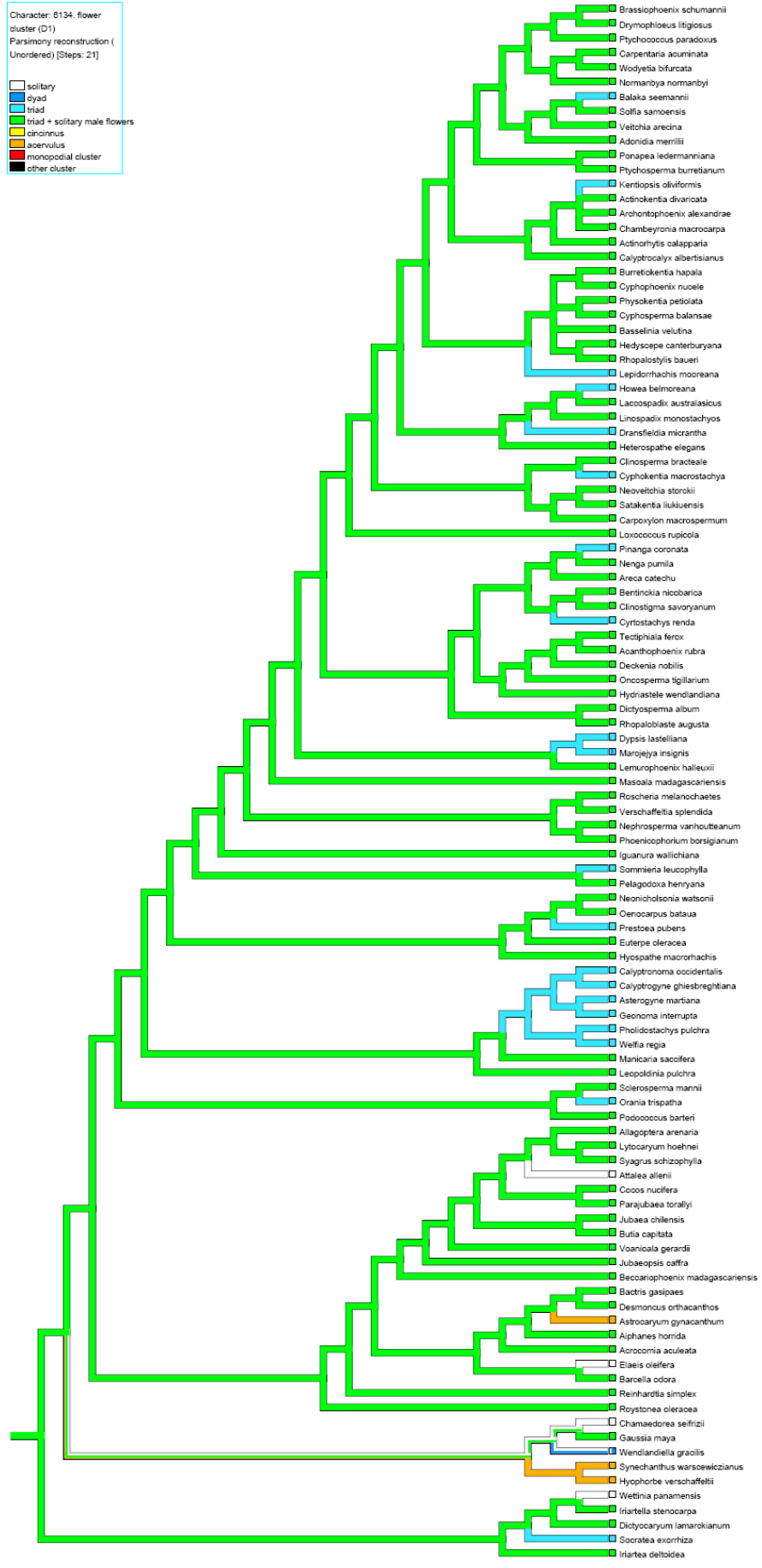


# Annexe 1 : Reconstruction de l'évolution de l'organisation des fleurs sur l'inflorescence



Character: 6134, flower cluster (D1)  
 Parsimony reconstruction (Unordered) [Steps: 21]

- solitary
- dyad
- triad
- triad + solitary male flowers
- cincinnus
- acervulus
- monopodial cluster
- other cluster



## **Annexe 2 : protocoles utilisés pour la dissection des fleurs de palmier, l'extraction et le comptage des grains de pollen.**

### **Protocole de dissection**

Les différentes étapes sont réalisées sous une loupe binoculaire et les observations sont notées dans un tableau (fichier joint).

1. Avant d'ouvrir le bouton floral, prendre une photo (appareil photo ajusté sur la loupe binoculaire) pour garder une trace de la forme générale, mesurer la longueur et la largeur (à l'aide du papier millimétré).
2. Ouvrir le bouton floral, en enlevant délicatement les pièces du périanthe pour ne pas endommager les étamines ; compter les sépales et les pétales, noter une éventuelle fusion des pièces.
3. Compter les étamines en les prélevant une à une, en faisant attention à ne pas percer les anthères pour que le pollen ne s'échappe pas.  
Vérifier que les anthères sont bien fermées (éventuellement qu'elles contiennent bien du pollen mature en écrasant une anthère entre lame et lamelle et en observant le contenu au microscope).
4. Mesurer la taille de l'anthère, préciser le type d'attache et de déhiscence, la présence d'un gynécée ou d'un pistillode, mesurer sa taille.
5. Prélever 6 anthères (soit l'ensemble des anthères pour les espèces à 6 étamines ou réaliser un transect de l'extérieur vers l'intérieur de l'androcée pour les espèces qui possèdent plus de 6 étamines). Le transect permet de prendre en compte une éventuelle différence de production de pollen entre les étamines externes et les internes.
6. Placer les 6 anthères dans un tube Eppendorf.

## Protocole d'extraction et de comptage du pollen

1. Placer le tube eppendorf contenant les anthères, ouvert, dans l'étuve. Laisser une nuit à 30°C pour permettre la déshydratation progressive des tissus de l'anthère.
2. Ajouter deux billes en métal dans le tube.
3. Le tube est placé dans un agitateur (Retsh MM300, Germany) pour le broyage mécanique des tissus de l'anthère. Afin de ne pas endommager les grains de pollen le broyage ne doit pas être trop fort, ni trop long : fréquence de 10 mouvements par seconde pendant 10 à 30 seconde. Le temps doit être ajusté en fonction de la taille et du caractère coriace des tissus de l'anthère. Le mieux est de commencer par dix secondes et de regarder l'aspect de l'échantillon. Si les anthères ne sont plus distinguables, arrêter ; sinon recommencer 10 secondes et ainsi de suite. (attention à bien équilibrer les tubes dans l'agitateur)
4. Ajouter 300µL de solution d'Alexander (composition ci-dessous). Cette solution colore l'exine du grain de pollen en vert et l'intérieur en rose.
5. Mélanger puis laisser reposer au minimum 1h afin que les grains de pollen se répartissent dans la solution.
6. Vortexer le tube pendant 1min minimum afin d'homogénéiser la solution de grains de pollen.
7. Prélever 5µL de la solution de grains de pollen ; les placer entre lame et lamelle (préférer une carré) ; compter l'ensemble des grains de pollen présents sous le microscope (grossissement x10 ou x20 suivant la taille des grains de pollen).
8. Recommencer l'étape 6 deux fois pour avoir trois comptages par fleur (3 x 5µL).

### Composition de la solution d'Alexander : pour 100 ml

- 1- 43 à 49 ml d'eau
- 2- 30 ml de glycérol
- 3- 5g d'hydrate de choral
- 4- 10 ml d'Ethanol 95° avec Parahydroxybenzoate de méthyle 150 mg
- 5- 2 ml de vert de malachite 0.5% (m/v) dans l'éthanol 50°
- 6- 1 ml d'orange G 0.5% (m/v) dans l'éthanol 50°
- 7- 2 à 5 ml de fuchsine acide 1% (m/v) dans l'éthanol 50°
- 8- 1 à 4 ml d'acide acétique

### Annexe 3 : fichier de données PROTEUS

Il contient l'ensemble des données rassemblées pour étudier l'évolution de la morphologie de l'appareil reproducteur ; les caractères et leurs différents états sont également présentés

D : caractère discret ; C : caractère continu ; 1 : caractère primaire ; 2 : caractère secondaire défini à partir d'un caractère primaire discret ou continu

Number	Class	Character
100	D1	Sex
100a	D2d	Sex (functional)
100b	D2d	Sex Arecaceae
103	C1	Flower length
6130	D2c	Hermaphroditic flower length
6000	C1	Pistillate flower length
6000a	D2c	Pistillate flower length
6001	C1	Staminate flower length
6001a	D2c	Staminate flower length
6002	D1	Floral dimorphism
6002b	D1	Floral dimorphism 1,5x
6002a	D2d	Floral dimorphism
6002c	D2d	Floral dimorphism 1,5x
6025	C1	Flower bud length
6026	C1	Pistillate bud length
6027	C1	Staminate bud length
301	C1	Number of fertile stamens
301b	D2c	Number of stamens (Arecaceae)
301c	D2c	Polyandry (Arecaceae)
6035	C1	Gynoecium length
6035a	D2c	Gynoecium length
6036	C1	Total number of ovules
6036a	D2c	number of ovules
6037	C1	Number of fertile ovules
6038	D1	Staminodes presence
6039	C1	Number of staminodes
6039b	D2c	Number of staminodes
6039c	D1	Staminode number vs stamen number
6040	C1	Staminode length
6040a	D2c	Staminode length
6095	D1	Staminodes
6131	D1	staminode modification
6041	C1	Stamen length
6041b	D2c	Stamen length
6043	C1	Anther length
6043a	D2c	anther length
6048	D1	Pistillode presence
6049	C1	Pistillode length
6049a	D2c	pitillode length
6132	C1	ratio pistillode length / gynoecium length
6132a	D2c	ratio pistillode length / gynoecium length
6094	C1	Sex ratio
6094a	D2c	Sex ratio
6094b	D1	sex ratio (monoecious)
6097	C1	Fruit length
6097b	D2c	Fruit length
6102	D1	order of sex

500	D1	Chronology of sex
6023	D1	Organization of flowers
6134	D1	flower cluster
6133	D1	sexual expression in space

Présentation des états des caractères primaires :

Character	Symbol	CharacterState
100. Sex (D1)	0	bisexual (structurally and functionally)
100. Sex (D1)	3	functionally unisexual dioecious, structurally bisexual
100. Sex (D1)	4	functionally unisexual dioecious, structurally androdioecious
100. Sex (D1)	5	functionally unisexual monoecious, structurally gynodioecious
100. Sex (D1)	A	functionally unisexual monoecious, structurally bisexual
100. Sex (D1)	B	functionally unisexual monoecious, structurally andromonoecious
100. Sex (D1)	C	unisexual dioecious (structurally or functionally)
100. Sex (D1)	D	unisexual monoecious (structurally or functionally)
500. Chronology of sex (D1)	1	protandrous
6002. Floral dimorphism (D1)	0	absent
6002. Floral dimorphism (D1)	1	male flowers larger
6002. Floral dimorphism (D1)	2	female flowers larger
6002. Floral dimorphism (D1)	3	bisexual flower
6002b. Floral dimorphism 1,5x (D1)	0	absent
6002b. Floral dimorphism 1,5x (D1)	1	male flowers larger
6002b. Floral dimorphism 1,5x (D1)	2	female flowers larger
6002b. Floral dimorphism 1,5x (D1)	3	bisexual flower
6023. Organization of flowers (D1)	0	triad
6023. Organization of flowers (D1)	1	pair
6023. Organization of flowers (D1)	2	solitary
6023. Organization of flowers (D1)	3	acervulus
6023. Organization of flowers (D1)	4	tetrad
6023. Organization of flowers (D1)	5	grouped
6038. Staminodes presence (D1)	0	yes
6038. Staminodes presence (D1)	1	no
6038. Staminodes presence (D1)	3	irrelevant
6039c. Staminode number vs stamen number (D1)	0	same number
6039c. Staminode number vs stamen number (D1)	1	more stamens
6039c. Staminode number vs stamen number (D1)	2	more staminodes
6039c. Staminode number vs stamen number (D1)	3	bisexual flower
6048. Pistillode presence (D1)	0	yes
6048. Pistillode presence (D1)	1	no
6048. Pistillode presence (D1)	2	sometimes
6048. Pistillode presence (D1)	3	irrelevant
6094b. sex ratio (monoecious) (D1)	0	irrelevant
6094b. sex ratio (monoecious) (D1)	1	triades
6094b. sex ratio (monoecious) (D1)	2	less than 4
6094b. sex ratio (monoecious) (D1)	3	less than 6
6094b. sex ratio (monoecious) (D1)	4	more than 6
6095. Staminodes (D1)	0	one side of gynoecium
6095. Staminodes (D1)	1	cup-ring
6095. Staminodes (D1)	2	as stamens
6095. Staminodes (D1)	3	tongue like
6102. order of sex (D1)	0	protandry
6102. order of sex (D1)	1	protogyny
6102. order of sex (D1)	2	irrelevant
6131. staminode modification (D1)	0	stamen like
6131. staminode modification (D1)	1	slightly modified

6131. staminode modification (D1)	2	highly modified
6131. staminode modification (D1)	3	lacking
6131. staminode modification (D1)	4	irrelevant
6133. sexual expression in space (D1)	0	within flower
6133. sexual expression in space (D1)	1	within rachillae
6133. sexual expression in space (D1)	2	within inflorescence
6133. sexual expression in space (D1)	3	within individual
6133. sexual expression in space (D1)	4	between individuals
6134. flower cluster (D1)	0	solitary
6134. flower cluster (D1)	1	dyad
6134. flower cluster (D1)	2	triad
6134. flower cluster (D1)	3	triad + solitary male flowers
6134. flower cluster (D1)	4	cincinnus
6134. flower cluster (D1)	5	acervulus
6134. flower cluster (D1)	6	monopodial cluster
6134. flower cluster (D1)	7	other cluster

### Présentation des états des caractères secondaires :

Character	Symbol	CharacterState	Start	End	Notes
100a. Sex (functional) (D2d)	0	bisexual			
100a. Sex (functional) (D2d)	1	unisexual			
100b. Sex Arecaceae (D2d)	0	bisexual			
100b. Sex Arecaceae (D2d)	1	unisexual monoecious			
100b. Sex Arecaceae (D2d)	2	unisexual dioecious			
301b. Number of stamens (Arecaceae) (D2c)	0		0	5	0 to 5
301b. Number of stamens (Arecaceae) (D2c)	1		6	6	6 to 6
301b. Number of stamens (Arecaceae) (D2c)	2		7	22	7 to 22
301b. Number of stamens (Arecaceae) (D2c)	3		23	114	23 to 114
301b. Number of stamens (Arecaceae) (D2c)	4		115	524	115 to 524
301b. Number of stamens (Arecaceae) (D2c)	5		525	1E+07	525 to 9999999
301c. Polyandry (Arecaceae) (D2c)	0	Oligandry	0	6	0 to 6
301c. Polyandry (Arecaceae) (D2c)	1	Polyandry	7	1E+07	7 to 9999999
6000a. Pistillate flower length (D2c)	0	tiny	0	0,89	0 to 1
6000a. Pistillate flower length (D2c)	1	small	0,9	3,99	1 to 4
6000a. Pistillate flower length (D2c)	2	medium	4	17,49	4 to 17
6000a. Pistillate flower length (D2c)	3	large	17,5	99999	18 to 99999
6001a. Staminate flower length (D2c)	0	tiny	0	0,57	0 to 1
6001a. Staminate flower length (D2c)	1	small	0,58	1,19	1 to 1
6001a. Staminate flower length (D2c)	2	medium	1,2	5,29	1 to 5
6001a. Staminate flower length (D2c)	3	large	5,3	9999	5 to 9999
6002a. Floral dimorphism (D2d)	0	absent			
6002a. Floral dimorphism (D2d)	1	present			
6002c. Floral dimorphism 1,5x (D2d)	0	absent			
6002c. Floral dimorphism 1,5x (D2d)	1	present			
6035a. Gynoecium length (D2c)	0		0	4,7	0 to 5
6035a. Gynoecium length (D2c)	1		4,8	26,9	5 to 27
6035a. Gynoecium length (D2c)	2		27	125,9	27 to 126
6035a. Gynoecium length (D2c)	3		126	1E+08	126 to 99999999
6036a. number of ovules (D2c)	0	1 ovule	0	1	0 to 1
6036a. number of ovules (D2c)	1	3 ovules	2	3	2 to 3
6036a. number of ovules (D2c)	2	more than 3 ovules	4	999	4 to 999



6039b. Number of staminodes (D2c)	0		0	5	0 to 5
6039b. Number of staminodes (D2c)	1		6	6	6 to 6
6039b. Number of staminodes (D2c)	2		7	22	7 to 22
6039b. Number of staminodes (D2c)	3		23	114	23 to 114
6040a. Staminode length (D2c)	0	absent	0	0,001	0 to 0
6040a. Staminode length (D2c)	1	minute	0,001	3,9	0 to 4
6040a. Staminode length (D2c)	2	small	4	10,4	4 to 10
6040a. Staminode length (D2c)	3	medium	10,5	35,9	11 to 36
6040a. Staminode length (D2c)	4	large	36	99999	36 to 99999
6041b. Stamen length (D2c)	0		0	4,85	0 to 5
6041b. Stamen length (D2c)	1		4,9	8,2	5 to 8
6041b. Stamen length (D2c)	2		8,25	23,45	8 to 23
6041b. Stamen length (D2c)	3		23,5	9999	24 to 9999
6043a. anther length (D2c)	0	tiny	0	2,7	0 to 3
6043a. anther length (D2c)	1	small	2,75	4,99	3 to 5
6043a. anther length (D2c)	2	medium	5	22,49	5 to 22
6043a. anther length (D2c)	3	large	22,5	99999	23 to 99999
6049a. pistillode length (D2c)	0	absent	0	0,0001	0 to 0
6049a. pistillode length (D2c)	1	minute	0,0001	1,7	0 to 2
6049a. pistillode length (D2c)	2	small	1,8	3,4	2 to 3
6049a. pistillode length (D2c)	3	medium	3,5	7,4	4 to 7
6049a. pistillode length (D2c)	4	large	7,5	9999	8 to 9999
6094a. Sex ratio (D2c)	0	hermaphroditic	0	1	0 to 1
6094a. Sex ratio (D2c)	1	triades	1,1	2	1 to 2
6094a. Sex ratio (D2c)	2	less than 4	2,1	3,9	2 to 4
6094a. Sex ratio (D2c)	3	less than 6	4	5,9	4 to 6
6094a. Sex ratio (D2c)	4	more than 6	6	9999	6 to 9999
6097b. Fruit length (D2c)	0		0	14,2	0 to 14
6097b. Fruit length (D2c)	1		14,3	31,9	14 to 32
6097b. Fruit length (D2c)	2		32	99,9	32 to 100
6097b. Fruit length (D2c)	3		100	455	100 to 455
6097b. Fruit length (D2c)	4		456	999999	456 to 999999
6130. Hermaphroditic flower length (D2c)	0	small	0	0,74	0 to 1
6130. Hermaphroditic flower length (D2c)	1	medium	0,75	3,74	1 to 4
6130. Hermaphroditic flower length (D2c)	2	large	3,75	12,62	4 to 13
6130. Hermaphroditic flower length (D2c)	3	gigantic	12,63	1E+07	13 to 9999999
6132a. ratio pistillode length / gynoecium length (D2c)	0	irrelevant	0	0	0 to 0
6132a. ratio pistillode length / gynoecium length (D2c)	1	highly reduced	0,0001	0,49	0 to 0
6132a. ratio pistillode length / gynoecium length (D2c)	2	slightly reduced	0,5	0,8	1 to 1
6132a. ratio pistillode length / gynoecium length (D2c)	3	same size	0,81	1,2	1 to 1
6132a. ratio pistillode length / gynoecium length (D2c)	4	bigger	1,21	99	1 to 99

Fichier de données :

Taxon	100	100a	100b	103	6130	6000	6000a	6001	6001a	6002	6002b	6002a	6002c
Acanthophoenix rubra	(A)	(1)	(1)			0,66	(0)	0,88	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Acoelorrhaphe wrightii	(0)	(0)	(0)	0,25	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Acrocomia aculeata	(A)	(1)	(1)										
Actinokentia divaricata	(A)	(1)	(1)			0,73	(0)	0,64	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
Actinorhynchus calapparia	(A)	(1)	(1)			1,00	(1)	0,50	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
Adonidia merrillii	(AD)	(1)	(1)			1,13	(1)	1,08	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Aiphanes horrida	(AD)	(1)	(1)			0,38	(0)	0,38	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Allagoptera arenaria	(A)	(1)	(1)	1,00	(1)	0,75	(0)	0,91	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Ammandra decasperma	(3)	(1)	(2)	12,63	(03)	18,80	(23)	1,53	(012)	(2)	(2)	(1)	(1)
Anigozanthos flavidus	(0)	(0)	(0)	0,38	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Aphandra natalia	(4)	(1)	(2)			27,00	(3)	2,50	(2)	(2)	(2)	(1)	(1)
Archontophoenix alexandrae	(A)	(1)	(1)			0,50	(0)	0,62	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Areca catechu	(5A)	(1)	(1)	0,75	(01)	1,25	(1)	0,46	(01)	(2)	(2)	(1)	(1)
Arenga pinnata	(B)	(1)	(1)			1,15	(1)	2,25	(2)	(0)	(1)	(0)	(1)
Asterogyne martiana	(A)	(1)	(1)			0,70	(0)	0,75	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Astrocaryum gynacanthum	(A)	(1)	(1)			1,57	(1)						
Attalea allenii	(A)	(1)	(1)			0,26	(0)	1,30	(12)	(1)	(1)	(1)	(1)
Bactris gasipaes	(B)	(1)	(1)			0,58	(0)	0,50	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
Balaka microcarpa	(A)	(1)	(1)			0,55	(0)	0,72	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Balaka seemannii	(A)	(1)	(1)										
Barcella odora	(A)	(1)	(1)			1,50	(1)	0,32	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
Basselinia velutina	(A)	(1)	(1)			0,50	(0)	0,50	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Beccariophoenix madagascariensis	(B)	(1)	(1)			1,30	(1)	1,50	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)
Bentinckia nicobarica	(A)	(1)	(1)			0,53	(0)	0,38	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Bismarckia nobilis	(3)	(1)	(2)			0,65	(0)	0,58	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Borassodendron machadonis	(3)	(1)	(2)			0,96	(1)	1,83	(2)	(0)	(1)	(0)	(1)
Borassus flabellifer	(3)	(1)	(2)	1,71	(01)	3,00	(1)	0,42	(01)	(2)	(2)	(1)	(1)
Brahea aculeata	(0)	(0)	(0)	0,36	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Brassiophoenix schumannii	(A)	(1)	(1)	0,80	(01)	0,60	(0)	0,80	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Burretiokentia hapala	(A)	(1)	(1)	0,56	(0)	0,60	(0)	0,53	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Butia capitata	(A)	(1)	(1)	0,65	(01)	0,35	(0)	0,65	(01)	(0)	(1)	(0)	(1)
Calamus aruensis	(3)	(1)	(2)	0,27	(0)	0,27	(0)	0,31	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Calyptrocalyx albertisianus	(A)	(1)	(1)			1,00	(1)						
Calyptroglyne ghiesbreghtiana	(A)	(1)	(1)			0,68	(0)	0,55	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Calyptronoma occidentalis	(A)	(1)	(1)	0,56	(0)	0,69	(0)	0,72	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
Carpentaria acuminata	(D)	(1)	(1)			0,55	(0)	1,00	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)
Carpoxydon macrospermum	(A)	(1)	(1)			0,32	(0)	0,27	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Caryota mitis	(B)	(1)	(1)			0,45	(0)	0,83	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)
Ceratolobus concolor	(3)	(1)	(2)	0,46	(0)	0,45	(0)	0,48	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Ceroxylon quindiuense	(3)	(1)	(2)			0,58	(0)	0,55	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
Chamaedorea seifrizii	(3C)	(1)	(2)	0,26	(0)	0,23	(0)	0,30	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Chamaerops humilis	(3)	(1)	(2)			0,46	(0)	0,50	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Chambeyronia macrocarpa	(B)	(1)	(1)			1,05	(1)	1,20	(12)	(0)	(0)	(0)	(0)
Chelyocarpus repens	(0)	(0)	(0)	0,40	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Chelyocarpus ulei	(0)	(0)	(0)	0,50	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Chuniophoenix hainanensis	(0)	(0)	(0)	0,75	(1)					(3)	(3)	(0)	(0)
Clinosperma bracteale	(A)	(1)	(1)			0,27	(0)	0,13	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
Clinostigma savoryanum	(A)	(1)	(1)	0,41	(0)	0,40	(0)	0,43	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Coccothrinax argentata	(0)	(0)	(0)	0,52	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Cocos nucifera	(A)	(1)	(1)	2,33	(012)	4,00	(12)	1,08	(012)	(2)	(2)	(1)	(1)
Colpotherinax wrightii	(0)	(0)	(0)	0,58	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Copernicia prunifera	(0)	(0)	(0)							(3)	(3)	(0)	(0)
Copernicia yarey	(0)	(0)	(0)	0,42	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Corypha utan	(0)	(0)	(0)	0,13	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Cryosophila warszewiczii	(0)	(0)	(0)	0,41	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Cyphokentia cerifera	(A)	(1)	(1)			0,41	(0)	0,32	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

Cyphokentia macrostachya	(A)	(1)	(1)			0,30	(0)	0,30	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Cyphophoenix nucele	(A)	(1)	(1)			0,55	(0)	0,45	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Cyphosperma balansae	(A)	(1)	(1)			0,43	(0)	0,35	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Cyrtostachys renda	(A)	(1)	(1)			0,50	(0)	0,30	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
Daemonorops grandis	(C)	(1)	(2)					0,53	(0)				
Deckenia nobilis	(A)	(1)	(1)			0,16	(0)	0,20	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Desmoncus orthacanthos	(A)	(1)	(1)										
Dictyocaryum lamarckianum	(A)	(1)	(1)	0,18	(0)	0,25	(0)	0,10	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
Dictyosperma album	(A)	(1)	(1)			0,52	(0)	0,62	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Dransfieldia micrantha	(A)	(1)	(1)			0,48	(0)	0,30	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
Drymophloeus litigiosus	(A)	(1)	(1)	0,46	(0)	0,40	(0)	0,52	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
Dypsis lastelliana	(A)	(1)	(1)			0,28	(0)	0,27	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Elaeis oleifera	(A)	(1)	(1)			1,63	(1)	0,53	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
Eleiodoxa conferta	(4)	(1)	(2)			0,61	(0)	0,64	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Eremospatha macrocarpa	(0)	(0)	(0)	1,06	(1)					(3)	(3)	(0)	(0)
Eugeissona tristis	(0A)	(01)	(01)	6,60	(2)			5,30	(3)	(3)	(3)	(0)	(0)
Euterpe oleracea	(5)	(1)	(1)	0,38	(0)	0,36	(0)	0,41	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Gaussia maya	(A)	(1)	(1)			0,27	(0)	0,20	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Geonoma interrupta	(A)	(1)	(1)			0,33	(0)	0,68	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Guihaia argyrata	(4)	(1)	(2)	0,15	(0)	0,15	(0)	0,20	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hanguana malayana	(C)	(1)	(2)			0,28	(0)	0,28	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hedyscepe canterburyana	(A)	(1)	(1)			0,69	(0)	0,99	(12)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hemithrinax ekmaniana	(0)	(0)	(0)	0,30	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Heterospatha elata	(D)	(1)	(1)										
Heterospatha elegans	(A)	(1)	(1)	0,25	(0)	0,22	(0)	0,28	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Howea belmoreana	(B)	(1)	(1)			1,00	(1)	1,20	(12)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hydriastele wendlandiana	(B)	(1)	(1)			0,30	(0)	0,90	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Hyophorbe verschaffeltii	(A)	(1)	(1)			0,25	(0)	0,26	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hyospatha macrorrhachis	(AD)	(1)	(1)			0,28	(0)	0,20	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hyphaene coriacea	(3)	(1)	(2)	0,20	(0)	0,33	(0)	0,80	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Iguanura wallichiana	(AD)	(1)	(1)			0,55	(0)	0,35	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
Iriarteia deltoidea	(AD)	(1)	(1)	0,55	(0)	0,45	(0)	0,60	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
Iriartella stenocarpa	(B)	(1)	(1)			0,16	(0)	0,33	(0)	(1)	(1)	(1)	(1)
Itaya amicum	(0)	(0)	(0)	0,58	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Johannesteijsmannia altifrons	(0)	(0)	(0)	0,50	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Juania australis	(3)	(1)	(2)			0,45	(0)	0,58	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Jubaea chilensis	(A)	(1)	(1)			0,80	(0)	1,60	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)
Jubaeopsis caffra	(A)	(1)	(1)			1,10	(1)	1,20	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)
Kentiopsis oliviformis	(A)	(1)	(1)	0,63	(0)	0,63	(0)	0,60	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
Kerriodoxa elegans	(4)	(1)	(2)			0,57	(0)	0,28	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
Kingia australis	(0)	(0)	(0)	0,31	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Korthalsia cheb	(0)	(0)	(0)							(3)	(3)	(0)	(0)
Korthalsia zippelii	(0)	(0)	(0)	0,40	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Laccospadix australasicus	(A)	(1)	(1)			0,48	(0)	0,68	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
Laccosperma acutiflorum	(0)	(0)	(0)							(3)	(3)	(0)	(0)
Latania verschaffeltii	(3)	(1)	(2)			1,50	(1)	1,02	(12)	(0)	(0)	(0)	(0)
Lemurophoenix halleuxii	(A)	(1)	(1)	1,40	(1)	0,35	(0)	0,80	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Leopoldinia pulchra	(A)	(1)	(1)			0,10	(0)	0,10	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Lepidocaryum tenue	(3)	(1)	(2)			0,80	(0)	0,90	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Lepidorrhachis mooreana	(A)	(1)	(1)			0,51	(0)	0,39	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
Leucothrinax morrisii	(0)	(0)	(0)	0,40	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Licuala grandis	(0)	(0)	(0)	0,50	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Linospadix monostachyos	(B)	(1)	(1)			0,55	(0)	0,95	(12)	(0)	(1)	(0)	(1)
Livistona speciosa	(0)	(0)	(0)	0,32	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Lodoicea maldivica	(3)	(1)	(2)			5,40	(2)	2,16	(2)	(2)	(2)	(1)	(1)
Loxococcus rupicola	(A)	(1)	(1)			0,38	(0)	0,76	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Lytocaryum hoehnei	(A)	(1)	(1)			0,75	(0)	0,65	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Manicaria saccifera	(B)	(1)	(1)			0,93	(1)	0,68	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Marojejya darianii	(A)	(1)	(1)	0,35	(0)	0,73	(0)	0,35	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)

<i>Marojejya insignis</i>	(A)	(1)	(1)			0,43	(0)	0,58	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Masoala madagascariensis</i>	(A)	(1)	(1)			0,58	(0)	0,33	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
<i>Mauritia flexuosa</i>	(3)	(1)	(2)			0,80	(0)						
<i>Mauritiella armata</i>	(3)	(1)	(2)			1,10	(1)	0,46	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
<i>Maxburretia rupicola</i>	(0)	(0)	(0)	0,33	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
<i>Medemia argun</i>	(C)	(1)	(2)					0,69	(1)				
<i>Metroxylon salomonense</i>	(0A)	(01)	(01)							(3)	(3)	(0)	(0)
<i>Musa acuminata</i>	(A)	(1)	(1)					3,75	(2)				
<i>Myrialepis paradoxa</i>	(3)	(1)	(2)			0,40	(0)	0,28	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Nannorrhops ritchiana</i>	(0)	(0)	(0)	0,55	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
<i>Nenga gajah</i>	(BD)	(1)	(1)			0,70	(0)	0,48	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Nenga pumila</i>	(BD)	(1)	(1)										
<i>Neonicholsonia watsonii</i>	(5)	(1)	(1)			0,60	(0)	0,72	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Neoveitchia storckii</i>	(A)	(1)	(1)			0,86	(0)	0,40	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
<i>Nephrosperma van-houtteanum</i>	(A)	(1)	(1)			0,50	(0)	0,60	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Normanbya normanbyi</i>	(A)	(1)	(1)			1,35	(1)	1,50	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Nypa fruticans</i>	(D)	(1)	(1)			1,18	(1)	0,50	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
<i>Oenocarpus bataua</i>	(5)	(1)	(1)			0,50	(0)	0,60	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Oncocalamus macrospathus</i>	(A)	(1)	(1)			0,43	(0)	0,51	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Oncocalamus manni</i>	(D)	(1)	(1)					0,55	(0)				
<i>Oncosperma tigillarum</i>	(A)	(1)	(1)			0,38	(0)	0,68	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)
<i>Orania trispatha</i>	(B)	(1)	(1)			0,25	(0)	0,90	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
<i>Oraniopsis appendiculata</i>	(3)	(1)	(2)			0,72	(0)	0,76	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Parajubaea torallyi</i>	(A)	(1)	(1)			1,03	(01)	1,10	(12)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Pelagodoxa henryana</i>	(A)	(1)	(1)			0,52	(0)	0,32	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
<i>Phoenicophorium borsigianum</i>	(B)	(1)	(1)			0,37	(0)	0,34	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Phoenix dactylifera</i>	(C)	(1)	(2)			0,45	(0)	0,85	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)
<i>Pholidocarpus macrocarpus</i>	(0)	(0)	(0)							(3)	(3)	(0)	(0)
<i>Pholidocarpus sumatranus</i>	(0)	(0)	(0)	0,60	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
<i>Pholidostachys pulchra</i>	(A)	(1)	(1)			0,66	(0)	0,72	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Physokentia petiolata</i>	(A)	(1)	(1)			0,48	(0)	0,50	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Phytelephas aequatorialis</i>	(4)	(1)	(2)			17,50	(23)	1,00	(1)	(2)	(2)	(1)	(1)
<i>Pigafetta elata</i>	(3)	(1)	(2)			0,42	(0)	0,31	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Pinanga coronata</i>	(D)	(1)	(1)			0,50	(0)	0,70	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Plectocomia mulleri</i>	(C)	(1)	(2)			2,46	(1)	0,49	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
<i>Plectocomiopsis geminiflora</i>	(3C)	(1)	(2)			0,73	(0)	0,63	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Podococcus barteri</i>	(5)	(1)	(1)			0,47	(0)	0,33	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Pogonotium ursinum</i>	(3)	(1)	(2)			0,60	(0)	0,37	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
<i>Ponapea ledermanniana</i>	(A)	(1)	(1)			0,58	(0)	1,00	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)
<i>Prestoea pubens</i>	(A)	(1)	(1)	0,26	(0)	0,20	(0)	0,26	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Pritchardia thurstonii</i>	(0)	(0)	(0)	0,82	(1)					(3)	(3)	(0)	(0)
<i>Pseudophoenix vinifera</i>	(0)	(0)	(0)	0,25	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
<i>Ptychococcus paradoxus</i>	(A)	(1)	(1)			0,76	(0)	1,40	(12)	(0)	(1)	(0)	(1)
<i>Ptychosperma burretianum</i>	(A)	(1)	(1)			0,35	(0)	0,65	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)
<i>Ptychosperma elegans</i>	(AD)	(1)	(1)			0,43	(0)	0,53	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Raphia farinifera</i>	(D)	(1)	(1)			0,80	(0)	1,13	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Ravenea hildebrandtii</i>	(3)	(1)	(2)			0,26	(0)	0,40	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)
<i>Reinhardtia simplex</i>	(B)	(1)	(1)			0,51	(0)	0,34	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
<i>Retispatha dumetosa</i>	(3)	(1)	(2)			1,40	(1)	0,26	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)
<i>Rhapidophyllum hystrix</i>	(3)	(1)	(2)			0,36	(0)	0,38	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Rhapis excelsa</i>	(3)	(1)	(2)	0,44	(0)	0,38	(0)	0,54	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Rhopaloblaste augusta</i>	(A)	(1)	(1)			0,41	(0)	0,64	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)
<i>Rhopalostylis baueri</i>	(A)	(1)	(1)			0,61	(0)	0,64	(01)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Roscheria melanochaetes</i>	(A)	(1)	(1)			0,19	(0)	0,14	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Roystonea oleracea</i>	(A)	(1)	(1)			0,30	(0)	0,39	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>Sabal palmetto</i>	(0)	(0)	(0)	0,60	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
<i>Salacca ramosiana</i>	(C)	(1)	(2)			0,90	(1)	0,58	(01)	(0)	(2)	(0)	(1)
<i>Saribus jeanneneyi</i>	(0)	(0)	(0)	0,47	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
<i>Satakentia liukiensis</i>	(A)	(1)	(1)			0,60	(0)	0,53	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

Satranala decussilvae	(C)	(1)	(2)			0,76	(0)						
Schippia concolor	(0B)	(01)	(01)	0,46	(0)	0,46	(0)	0,43	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Sclerosperma mannii	(D)	(1)	(1)					0,70	(1)				
Serenoa repens	(0)	(0)	(0)	0,56	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Socratea exorrhiza	(5D)	(1)	(1)			0,60	(0)	1,05	(12)	(0)	(1)	(0)	(1)
Solfia samoensis	(A)	(1)	(1)			0,45	(0)	0,75	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)
Sommieria leucophylla	(A)	(1)	(1)	0,28	(0)	0,28	(0)	0,20	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Syagrus schizophylla	(A)	(1)	(1)			0,83	(0)	0,54	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
Synechanthus warscewiczianus	(B)	(1)	(1)			0,16	(0)	0,10	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
Tahina spectabilis	(0)	(0)	(0)	0,92	(1)					(3)	(3)	(0)	(0)
Tectiphiala ferox	(A)	(1)	(1)			0,60	(0)	0,75	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Thrinax radiata	(0)	(0)	(0)							(3)	(3)	(0)	(0)
Trachycarpus geminisectus	(3)	(1)	(2)	0,28	(0)	0,25	(0)	0,30	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Tradescantia ohiensis	(0)	(0)	(0)	1,40	(1)					(3)	(3)	(0)	(0)
Trithrinax brasiliensis	(0)	(0)	(0)	0,58	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)
Typha latifolia	(D)	(1)	(1)										
Veitchia arecina	(A)	(1)	(1)			1,02	(01)	1,53	(2)	(0)	(1)	(0)	(1)
Verschaffeltia splendida	(A)	(1)	(1)			0,35	(0)	0,33	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Voanioala gerardii	(B)	(1)	(1)	1,10	(1)	1,20	(1)	1,10	(12)	(0)	(0)	(0)	(0)
Wallichia disticha	(D)	(1)	(1)	0,60	(01)	0,24	(0)	0,88	(01)	(1)	(1)	(1)	(1)
Washingtonia robusta	(0)	(0)	(0)	0,88	(1)					(3)	(3)	(0)	(0)
Welfia regia	(A)	(1)	(1)			1,90	(1)	2,20	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)
Wendlandiella gracilis	(3)	(1)	(2)			0,20	(0)	0,12	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)
Wettinia panamensis	(D)	(1)	(1)			0,90	(01)	0,75	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)
Wodyetia bifurcata	(A)	(1)	(1)			0,50	(0)	1,00	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Zombia antillarum	(0)	(0)	(0)	0,50	(0)					(3)	(3)	(0)	(0)

Taxon	6026	6027	301	301b	301c	6035	6035a	6036	6036a	6037	6038	6039b
Acanthophoenix rubra			13	(2)	(1)	5,0	(1)	1	(0)		(0)	(2)
Acoelorrhapha wrightii			6	(1)	(0)	1,4	(0)	3	(1)		(3)	
Acrocomia aculeata			6	(1)	(0)			3	(1)		(0)	(1)
Actinokentia divaricata	4,8	26	(23)	(1)		8,3	(1)	1	(0)	1	(0)	(0)
Actinorhynchus calapparia	4,5	29	(3)	(1)		8,3	(1)	1	(0)		(0)	(0)
Adonidia merrillii	9,6	48	(3)	(1)		10,0	(1)	1	(0)		(0)	(1)
Aiphanes horrida	3,7	6	(1)	(0)		2,8	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Allagoptera arenaria			15	(2)	(1)	3,5	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Ammandra decasperma			811	(45)	(1)	126,0	(3)	8	(2)		(0)	(3)
Anigozanthos flavidus			6	(1)	(0)						(3)	
Aphandra natalia			525	(45)	(1)	27,5	(12)	7	(2)		(0)	(3)
Archontophoenix alexandrae	6,0	15	(2)	(1)		4,5	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Areca catechu		9	(12)	(01)		10,0	(1)	1	(0)	1	(0)	
Arenga pinnata		80	(3)	(1)		5,5	(01)	3	(1)		(0)	(0)
Asterogyne martiana		6	(1)	(0)		9,5	(1)	3	(1)	1	(0)	(1)
Astrocaryum gynacanthum		6	(1)	(0)		1,0	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Attalea allenii		6	(1)	(0)		20,0	(1)	3	(1)		(0)	
Bactris gasipaes		6	(1)	(0)				3	(1)		(0)	(1)
Balaka microcarpa		30	(3)	(1)		4,8	(1)	1	(0)		(0)	(1)
Balaka seemannii		25	(23)	(1)				1	(0)		(0)	
Barcella odora		6	(1)	(0)		13,3	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Basselinia velutina	5,0	5,0	6	(1)	(0)			1	(0)	1	(0)	(0)
Beccariophoenix madagascariensis		20	(2)	(1)		10,6	(1)	3	(1)		(0)	
Bentinckia nicobarica		6	(1)	(0)		3,5	(0)	1	(0)		(0)	(01)
Bismarckia nobilis		6	(1)	(0)		4,2	(0)	3	(1)	1	(0)	(1)
Borassodendron machadonis		10	(2)	(1)		6,6	(1)	3	(1)		(0)	(2)
Borassus flabellifer		6	(1)	(0)		30,0	(2)	3	(1)		(0)	(1)
Brahea aculeata		6	(1)	(0)		1,3	(0)	3	(1)		(3)	
Brassiophoenix schumannii		165	(4)	(1)				1	(0)	1	(0)	(0)
Burretiokentia hapala		6	(1)	(0)				1	(0)	1	(0)	(0)
Butia capitata		6	(1)	(0)		9,3	(1)	3	(1)		(0)	

Calamus aruensis		6	(1)	(0)	2,4	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Calyptrocalyx albertisianus		41	(23)	(1)			1	(0)		(0)	(2)
Calyptrogryne ghiesbreghtiana		6	(1)	(0)	5,8	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Calyptronoma occidentalis		6	(1)	(0)	6,7	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Carpentaria acuminata	7,8	36	(3)	(1)	7,0	(1)	1	(0)		(0)	(0)
Carpoxydon macrospermum		6	(1)	(0)	2,0	(0)	1	(0)	1	(0)	(0)
Caryota mitis		18	(23)	(1)	2,0	(0)	2	(01)		(0)	(0)
Ceratolobus concolor		6	(1)	(0)	3,5	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Ceroxylon quinduense		13	(2)	(1)	2,5	(0)	3	(1)	1	(0)	(2)
Chamaedorea seifrizii	3,2	6	(1)	(0)	2,0	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Chamaerops humilis		6	(1)	(0)	2,5	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Chambeyronia macrocarpa	11,0	46	(3)	(1)	11,6	(1)	1	(0)		(0)	(0)
Chelyocarpus repens		6	(012)	(01)	1,5	(0)	4	(012)		(3)	
Chelyocarpus ulei		8	(2)	(1)	1,6	(0)				(3)	
Chuniophoenix hainanensis		6	(1)	(0)	4,3	(0)	3	(1)		(3)	
Clinosperma bracteale		6	(1)	(0)	2,3	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Clinostigma savoryanum		6	(1)	(0)	3,0	(0)	1	(0)	1	(0)	
Coccothrinax argentata		9	(2)	(1)	4,2	(0)	1	(0)		(3)	
Cocos nucifera	9,0	6	(1)	(0)	27,0	(2)	3	(1)		(0)	
Colpotherinax wrightii		6	(1)	(0)	4,2	(01)				(3)	
Copernicia prunifera		6	(1)	(0)			3	(1)	1	(3)	
Copernicia yarey		6	(1)	(0)	1,8	(0)	3	(1)	1	(3)	
Corypha utan		6	(1)	(0)	2,9	(0)	3	(1)		(3)	
Cryosophila warszewiczii		6	(1)	(0)	3,2	(0)	3	(1)	1	(3)	
Cyphokentia cerifera		6	(1)	(0)	3,5	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Cyphokentia macrostachya		12	(2)	(1)			1	(0)		(0)	(01)
Cyphophoenix nucela		6	(1)	(0)			1	(0)		(0)	(0)
Cyphosperma balansae		6	(1)	(0)	4,4	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Cyrtostachys renda		14	(2)	(1)	4,3	(0)	1	(0)	1	(0)	
Daemonorops grandis		6	(1)	(0)							
Deckenia nobilis		8	(12)	(01)	2,0	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Desmoncus orthacanthos		8	(12)	(01)			3	(1)		(0)	(1)
Dictyocaryum lamarckianum		6	(1)	(0)			3	(1)	1	(0)	(1)
Dictyosperma album	6,5	6	(1)	(0)	4,3	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Dransfieldia micrantha		17	(2)	(1)	3,0	(0)	1	(0)	1	(0)	(0)
Drymophloeus litigiosus		28	(3)	(1)	2,9	(0)	1	(0)	1	(0)	(0)
Dypsis lastelliana		6	(1)	(0)	2,5	(0)	1	(0)		(0)	(01)
Elaeis oleifera		6	(1)	(0)	15,3	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Eleiodoxa conferta		6	(1)	(0)	5,0	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Eremospatha macrocarpa		6	(1)	(0)	5,1	(1)	3	(1)		(3)	
Eugeissona tristis		33	(3)	(1)	31,3	(2)	3	(1)		(3)	
Euterpe oleracea		6	(1)	(0)	3,5	(0)	1	(0)	1	(1)	
Gaussia maya		6	(1)	(0)	1,4	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Geonoma interrupta		6	(1)	(0)	3,3	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Guihaia argyrata		6	(1)	(0)	0,6	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Hanguana malayana		6	(1)	(0)			2	(01)		(0)	
Hedyscepe canterburyana		11	(2)	(1)	6,2	(1)	1	(0)		(0)	(0)
Hemithrinax ekmaniana		6	(1)	(0)	2,4	(0)	1	(0)		(3)	
Heterospatha elata							1	(0)		(0)	(0)
Heterospatha elegans		6	(1)	(0)	1,5	(0)	1	(0)	1	(0)	(0)
Howea belmoreana	9,3	48	(3)	(1)			1	(0)		(0)	(01)
Hydriastele wendlandiana		15	(123)	(01)			1	(0)		(0)	(01)
Hyophorbe verschaffeltii		6	(1)	(0)	1,4	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Hyospatha macrorhachis	2,5	6	(1)	(0)	2,8	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Hyphaene coriacea	3,7	6	(1)	(0)	3,4	(0)	3	(1)	1	(0)	(1)
Iguanura wallichiana	5,5	6	(1)	(0)	4,6	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Iriarteia deltoidea	6,5	15	(2)	(1)	4,3	(0)	3	(1)	1	(0)	(2)
Iriartella stenocarpa		6	(1)	(0)			3	(1)	1	(0)	(1)
Itaya amicum		21	(23)	(1)	4,5	(0)	1	(0)		(3)	

Johannesteijsmannia altifrons		6	(1)	(0)	1,7	(0)	3	(1)		(3)	
Juania australis		6	(1)	(0)	2,6	(0)	3	(1)	1	(0)	(1)
Jubaea chilensis		18	(2)	(1)	6,5	(1)	3	(1)		(0)	
Jubaeopsis caffra		12	(2)	(1)	9,6	(1)	3	(1)		(0)	
Kentiopsis oliviformis	6,0	36	(3)	(1)	4,8	(1)	1	(0)	1	(0)	(0)
Kerriodoxa elegans		6	(1)	(0)	3,3	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Kingia australis		6	(1)	(0)			3	(1)		(3)	
Korthalsia cheb							3	(1)		(3)	
Korthalsia zippelii					3,3	(0)	3	(1)		(3)	
Laccospadix australasicus		11	(2)	(1)	4,1	(0)	1	(0)		(0)	(01)
Laccosperma acutiflorum		6	(1)	(0)	6,3	(1)	3	(1)		(3)	
Latania verschaaffeltii		25	(3)	(1)	9,0	(1)	3	(1)		(0)	
Lemurophoenix hallexii		56	(3)	(1)	2,5	(0)	1	(0)		(0)	(2)
Leopoldinia pulchra		6	(1)	(0)	0,6	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Lepidocaryum tenue		6	(1)	(0)	3,6	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Lepidorrhachis mooreana		6	(1)	(0)	3,5	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Leucothrinax morrisii		6	(1)	(0)	2,4	(0)	1	(0)		(3)	
Licuala grandis		6	(1)	(0)	2,8	(0)	3	(1)		(3)	
Linospadix monostachyos		10	(2)	(1)	4,0	(0)	1	(0)		(0)	(01)
Livistona speciosa		6	(1)	(0)			3	(1)		(3)	
Lodoicea maldivica		20	(2)	(1)	38,0	(2)	3	(1)		(0)	(2)
Loxococcus rupicola		12	(2)	(1)	2,4	(0)	1	(0)		(0)	(2)
Lytocaryum hoehnei		6	(1)	(0)	6,8	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Manicaria saccifera		33	(3)	(1)	6,6	(1)	3	(1)		(0)	(2)
Marojejya darianii		6	(1)	(0)			1	(0)	1	(0)	(1)
Marojejya insignis		6	(1)	(0)	4,3	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Masoala madagascariensis		6	(1)	(0)	14,5	(1)	1	(0)		(0)	(1)
Mauritia flexuosa		6	(1)	(0)	4,0	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Mauritiella armata		6	(1)	(0)	8,6	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Maxburretia rupicola		6	(1)	(0)	2,1	(0)	3	(1)		(3)	
Medemia argun		6	(1)	(0)							
Metroxylon salomonense		6	(1)	(0)			3	(1)		(3)	
Musa acuminata		5	(0)	(0)						(0)	
Myrialepis paradoxa		6	(1)	(0)	2,4	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Nannorrhops ritchiana		6	(1)	(0)	2,8	(0)	3	(1)		(3)	
Nenga gajah		6	(1)	(0)			1	(0)	1	(0)	(1)
Nenga pumila	8,0	6	(1)	(0)	9,0	(1)	1	(0)		(0)	
Neonicholsonia watsonii		6	(1)	(0)	6,1	(1)	1	(0)		(1)	
Neoveitchia storckii		6	(1)	(0)	7,6	(1)	1	(0)		(0)	(0)
Nephrosperma van-houtteanum		45	(3)	(1)	4,3	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Normanbya normanbyi		32	(3)	(1)	10,0	(1)	1	(0)		(0)	(0)
Nypa fruticans		3	(0)	(0)	7,1	(1)	3	(1)		(1)	
Oenocarpus bataua		11	(2)	(1)			1	(0)		(1)	
Oncocalamus macrospathus		6	(1)	(0)	3,5	(0)	3	(1)		(0)	(2)
Oncocalamus mannii	5,5	6	(1)	(0)			3	(1)			
Oncosperma tigillarum		6	(1)	(0)	3,2	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Orania trispatha		29	(3)	(1)	5,0	(1)	3	(1)		(0)	(2)
Oraniopsis appendiculata		6	(1)	(0)	2,8	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Parajubaea torallyi		14	(2)	(1)	9,0	(1)	3	(1)		(0)	(0)
Pelagodoxa henryana		6	(1)	(0)	5,0	(1)	2	(01)		(0)	(01)
Phoenicophorium borsigianum	4,2	17	(2)	(1)	2,8	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Phoenix dactylifera		6	(1)	(0)			3	(1)		(0)	(1)
Pholidocarpus macrocarpus		6	(1)	(0)			3	(1)	1	(3)	
Pholidocarpus sumatranus		6	(1)	(0)	5,0	(1)	3	(1)		(3)	
Pholidostachys pulchra		6	(1)	(0)	6,1	(1)	3	(1)		(0)	(12)
Physokentia petiolata		6	(1)	(0)	4,0	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Phytelephas aequatorialis		600	(45)	(1)	12,5	(1)	6	(2)		(0)	(23)
Pigafetta elata		6	(1)	(0)	3,7	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Pinanga coronata	7,7	20	(23)	(1)	3,8	(0)	1	(0)		(1)	

Plectocomia mulleri		6	(1)	(0)	18,6	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Plectocomiopsis geminiflora	6,0	6	(1)	(0)	5,6	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Podococcus barteri		6	(1)	(0)	3,0	(0)	2	(01)		(1)	
Pogonotium ursinum		6	(1)	(0)	5,5	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Ponapea ledermanniana	9,2	115	(34)	(1)	4,0	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Prestoea pubens		6	(1)	(0)			1	(0)	1	(0)	(1)
Pritchardia thurstonii		6	(1)	(0)	4,0	(0)	3	(1)		(3)	
Pseudophoenix vinifera		6	(1)	(0)	5,3	(01)	3	(1)		(3)	
Ptychococcus paradoxus		157	(34)	(1)	4,4	(01)	1	(0)		(0)	(0)
Ptychosperma burretianum		33	(3)	(1)			3	(1)	1	(0)	(01)
Ptychosperma elegans	4,3	23	(23)	(1)			1	(0)		(0)	(1)
Raphia farinifera		6	(1)	(0)	5,5	(1)	3	(1)	1	(1)	
Ravenea hildebrandtii		6	(1)	(0)	3,0	(0)	3	(1)	3	(0)	(1)
Reinhardtia simplex		20	(2)	(1)	4,6	(0)	3	(1)		(0)	(2)
Retispatha dumetosa		6	(1)	(0)	10,2	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Rhapidophyllum hystrix		6	(1)	(0)	3,2	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Rhapis excelsa	6,2	6	(1)	(0)	1,2	(0)	3	(1)		(0)	(1)
Rhopaloblaste augusta		6	(1)	(0)	3,0	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Rhopalostylis baueri	7,5	6	(1)	(0)	6,7	(1)	1	(0)		(0)	(01)
Roscheria melanochaetes	1,3	6	(1)	(0)	1,8	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Roystonea oleracea		7	(12)	(01)	2,4	(0)	3	(1)	1	(0)	(1)
Sabal palmetto		6	(1)	(0)	4,3	(0)	3	(1)		(3)	
Salacca ramosiana		6	(1)	(0)	7,0	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Saribus jeannenei		6	(1)	(0)	1,8	(0)	3	(1)		(3)	
Satakentia liukuensis		6	(1)	(0)	6,0	(1)	1	(0)		(0)	(0)
Satranala decussilvae					5,0	(1)					
Schippia concolor		6	(1)	(0)	2,3	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Sclerosperma mannii		60	(3)	(1)			1	(0)	1		
Serenoa repens		6	(1)	(0)	5,0	(1)	3	(1)		(3)	
Socratea exorrhiza	12,5	38	(3)	(1)	7,0	(1)	3	(1)		(1)	
Solfia samoensis	6,8	36	(3)	(1)	2,3	(0)	1	(0)		(0)	(0)
Sommieria leucophylla	2,0	6	(1)	(0)			1	(0)	1	(0)	
Syagrus schizophylla		6	(1)	(0)	5,8	(1)	3	(1)		(0)	(1)
Synechanthus warszewiczianus		6	(0)	(0)	2,2	(0)	3	(1)	3	(0)	(1)
Tahina spectabilis		6	(1)	(0)	3,0	(0)	3	(1)		(3)	
Tectiphiala ferox		7	(12)	(01)	6,4	(1)	1	(0)		(0)	(12)
Thrinax radiata		7	(12)	(01)			1	(0)		(3)	
Trachycarpus geminisectus		6	(1)	(0)			3	(1)		(0)	(1)
Tradescantia ohiensis		6	(1)	(0)			6	(2)		(3)	
Trithrinax brasiliensis		6	(1)	(0)	1,6	(0)	3	(1)		(3)	
Typha latifolia		2	(0)	(0)	7,9	(1)	1	(0)		(1)	
Veitchia arecina		106	(34)	(1)	6,7	(01)	1	(0)		(0)	(0)
Verschaffeltia splendida		6	(1)	(0)	2,5	(0)	1	(0)		(0)	(1)
Voanioala gerardii		13	(2)	(1)	4,0	(0)	3	(1)		(0)	(2)
Wallichia disticha		12	(2)	(1)	2,4	(0)	3	(1)		(1)	
Washingtonia robusta		6	(1)	(0)	7,5	(1)	3	(1)		(3)	
Welfia regia		35	(3)	(1)	16,0	(1)	3	(1)		(0)	(2)
Wendlandiella gracilis		6	(1)	(0)	2,0	(0)	3	(1)		(0)	(0)
Wettinia panamensis		10	(2)	(1)	9,0	(1)					
Wodyetia bifurcata		66	(3)	(1)	2,7	(0)	1	(0)	1	(0)	(1)
Zombia antillarum		11	(2)	(1)	5,0	(1)	1	(0)		(3)	

Taxon	6040	6040a	6095	6131	6041	6041b	6043	6043a	6048	6049	6049a
Acanthophoenix rubra	0,6	(1)	(1)	(2)	5,30	(1)	3,50	(1)	(0)	0,6	(1)
Acoelorrhaphe wrightii	0,0	(0)		(4)	1,00	(0)	0,40	(0)	(3)	0,0	(0)
Acrocomia aculeata			(12)	(0)					(0)		
Actinokentia divaricata	1,0	(1)	(0)	(2)	3,00	(0)	1,50	(0)	(0)	3,3	(2)
Actinorhytis calapparia	1,3	(1)	(0)	(2)	2,20	(0)	1,90	(0)	(0)	2,5	(2)
Adonidia merrillii	4,0	(2)	(3)	(1)	6,50	(1)	3,50	(1)	(0)	3,7	(23)



Aiphanes horrida	3,0	(12)	(1)	(1)	3,70	(01)	1,85	(01)	(01)	0,8	(1)
Allagoptera arenaria	1,5	(1)	(1)	(2)	2,50	(0)	2,80	(1)	(0)	1,2	(1)
Ammandra decasperma	1,6	(1)	(2)	(0)	13,30	(0123)	1,10	(0)	(02)	2,0	(2)
Anigozanthos flavidus	0,0	(0)		(4)			3,00	(01)	(3)	0,0	(0)
Aphandra natalia	10,5	(23)	(2)	(0)	6,00	(1)	3,25	(1)	(1)	0,0	(0)
Archontophoenix alexandrae	0,6	(1)	(0)	(2)	4,30	(0)	3,78	(1)	(0)	4,0	(3)
Areca catechu			(1)	(2)	2,50	(0)	1,50	(0)	(0)	3,0	(2)
Arenga pinnata	7,5	(2)	(2)	(0)	15,50	(2)	11,50	(2)	(1)	0,0	(0)
Asterogyne martiana	4,5	(12)	(23)	(1)	9,80	(2)	0,90	(0)	(0)	3,5	(23)
Astrocaryum gynacanthum	1,0	(1)	(1)	(2)	2,65	(0)	1,75	(0)	(0)		
Attalea allenii	7,0	(2)	(1)	(1)			6,00	(2)			
Bactris gasipaes			(3)	(2)					(1)	0,0	(0)
Balaka microcarpa	0,5	(1)	(3)	(2)	3,60	(0)	3,30	(1)	(0)	5,3	(3)
Balaka seemannii											
Barcella odora	2,0	(1)	(1)	(2)	1,80	(0)	1,40	(0)	(0)	0,6	(1)
Basselinia velutina			(0)	(1)			2,50	(0)	(0)	2,5	(2)
Beccariophoenix madagascariensis	1,0	(1)	(1)	(2)	10,75	(2)	9,00	(2)	(1)	0,0	(0)
Bentinckia nicobarica	0,6	(1)	(3)	(2)	2,10	(0)	1,00	(0)	(0)	2,3	(2)
Bismarckia nobilis	1,6	(1)	(12)	(0)	2,50	(0)	2,00	(0)	(0)	1,0	(1)
Borassodendron machadonis	1,3	(1)	(1)	(2)	18,00	(2)	5,83	(2)	(0)	0,3	(1)
Borassus flabellifer	6,0	(2)	(3)	(2)	2,50	(0)	0,50	(0)	(0)		
Brahea aculeata	0,0	(0)		(4)	2,60	(0)	0,50	(0)	(3)	0,0	(0)
Brassiophoenix schumannii			(1)	(2)					(0)		
Burretiokentia hapala			(0)	(2)			2,50	(0)	(0)		
Butia capitata	1,0	(1)	(1)	(2)	5,00	(1)	4,20	(1)	(0)	1,6	(1)
Calamus aruensis	1,2	(1)	(2)	(0)	1,90	(0)	1,40	(0)	(0)	0,2	(1)
Calyptrocalyx albertisianus	1,0	(1)	(3)	(2)	9,50	(12)	2,50	(01)	(0)	1,0	(1)
Calyptrogyne ghiesbreghtiana	6,6	(2)	(12)	(1)	5,50	(1)	2,00	(0)	(0)	0,6	(1)
Calyptronoma occidentalis	8,0	(2)	(12)	(1)	9,00	(2)	2,20	(0)	(0)	0,3	(1)
Carpentaria acuminata	1,0	(1)	(3)	(2)	6,50	(1)	3,50	(1)	(0)	7,5	(34)
Carpoxyton macrospermum	0,5	(1)	(1)	(2)	3,50	(0)	2,00	(0)	(0)	2,0	(2)
Caryota mitis	1,5	(1)	(3)	(2)	4,25	(01)	3,25	(01)	(1)	0,0	(0)
Ceratolobus concolor	1,5	(1)	(2)	(0)			2,50	(0)	(0)		
Ceroxylon quindiuense	4,2	(2)	(2)	(0)	4,95	(01)	2,20	(0)	(0)	0,6	(1)
Chamaedorea seifrizii			(3)	(2)	2,00	(0)	1,33	(0)	(0)	3,0	(2)
Chamaerops humilis	3,2	(1)	(2)	(0)	3,30	(0)	2,20	(0)	(0)	0,3	(1)
Chambeyronia macrocarpa	1,0	(1)	(0)	(2)	3,00	(0)	4,00	(1)	(1)	0,0	(0)
Chelyocarpus repens	0,0	(0)		(4)					(3)	0,0	(0)
Chelyocarpus ulei	0,0	(0)		(4)	3,30	(0)	2,10	(0)	(3)	0,0	(0)
Chuniophoenix hainanensis	0,0	(0)		(4)	4,20	(0)	1,30	(0)	(3)	0,0	(0)
Clinosperma bracteale	0,3	(1)	(0)	(2)	0,70	(0)	0,50	(0)	(0)	0,6	(1)
Clinostigma savoryanum			(3)	(1)	2,90	(0)	1,60	(0)	(0)	1,2	(1)
Coccothrinax argentata	0,0	(0)		(4)	2,60	(0)	2,40	(0)	(3)	0,0	(0)
Cocos nucifera	4,6	(2)	(1)	(2)	12,00	(2)	5,03	(12)	(0)	3,1	(123)
Colpotherinax wrightii	0,0	(0)		(4)	6,90	(12)	3,05	(01)	(3)	0,0	(0)
Copernicia prunifera	0,0	(0)		(4)					(3)	0,0	(0)
Copernicia yarey	0,0	(0)		(4)	2,00	(0)	0,60	(0)	(3)	0,0	(0)
Corypha utan	0,0	(0)		(4)	2,90	(0)	1,00	(0)	(3)	0,0	(0)
Cryosophila warszewiczii	0,0	(0)		(4)	5,10	(01)	1,80	(0)	(3)	0,0	(0)
Cyphokentia cerifera	0,5	(1)	(0)	(2)	2,25	(0)	2,00	(0)	(0)	2,1	(2)
Cyphokentia macrostachya									(0)		
Cyphophoenix nucele	1,0	(1)	(0)	(2)					(0)		
Cyphosperma balansae	1,0	(1)	(0)	(2)	1,90	(0)	1,60	(0)	(0)	2,0	(2)
Cyrtostachys renda	0,8	(1)	(1)	(2)	1,55	(0)	1,20	(0)	(0)	0,9	(1)
Daemonorops grandis					3,20	(0)	2,08	(0)	(1)	0,0	(0)
Deckenia nobilis	0,2	(1)	(1)	(2)	1,10	(0)	0,80	(0)	(0)	2,0	(2)
Desmoncus orthacanthos			(3)	(2)					(0)		
Dictyocaryum lamarckianum	0,5	(1)	(3)	(2)	7,00	(1)	5,50	(2)	(0)		
Dictyosperma album	0,6	(1)	(0)	(2)	4,60	(0)	3,93	(12)	(0)	3,8	(23)

<i>Dransfieldia micrantha</i>	0,4	(1)			3,45	(0)	1,15	(0)	(0)	0,5	(1)
<i>Drymophloeus litigiosus</i>	1,0	(1)	(1)	(2)	3,55	(0)	1,80	(0)	(0)	2,7	(123)
<i>Dypsis lastelliana</i>	0,6	(1)	(0)	(2)	2,00	(0)	1,45	(0)	(0)	2,2	(2)
<i>Elaeis oleifera</i>	1,6	(1)	(1)	(2)	4,20	(0)	2,00	(0)	(0)	2,0	(2)
<i>Eleiodoxa conferta</i>	2,3	(1)	(2)	(0)	3,25	(0)	2,55	(01)	(1)	0,0	(0)
<i>Eremospatha macrocarpa</i>	0,0	(0)		(4)	3,30	(0)	1,10	(0)	(3)	0,0	(0)
<i>Eugeissona tristis</i>	0,0	(0)		(4)	28,00	(3)	23,00	(3)	(0)	2,6	(2)
<i>Euterpe oleracea</i>	0,0	(0)		(3)	5,00	(01)	2,25	(0)	(0)	2,5	(2)
<i>Gaussia maya</i>			(3)	(2)			1,00	(0)	(0)	1,0	(1)
<i>Geonoma interrupta</i>	2,8	(1)	(1)	(1)	6,30	(1)	2,00	(0)	(0)	0,8	(1)
<i>Guihaia argyrata</i>	0,2	(1)	(2)	(0)	0,40	(0)	0,40	(0)	(1)	0,0	(0)
<i>Hanguana malayana</i>											
<i>Hedyscepe canterburyana</i>	1,1	(1)	(0)	(2)	7,00	(1)	5,00	(2)	(0)	5,7	(3)
<i>Hemithrinax ekmaniana</i>	0,0	(0)		(4)	2,50	(0)	2,00	(0)	(3)	0,0	(0)
<i>Heterospathe elata</i>			(3)	(2)					(0)		
<i>Heterospathe elegans</i>			(3)	(2)	2,85	(0)	1,50	(0)	(0)	1,3	(12)
<i>Howea belmoreana</i>					7,00	(1)	5,38	(012)	(1)	0,0	(0)
<i>Hydriastele wendlandiana</i>			(3)	(2)	7,00	(1)	3,50	(1)	(1)	0,0	(0)
<i>Hyophorbe verschaffeltii</i>	0,6	(1)	(1)	(1)	1,60	(0)	1,30	(0)	(0)	1,0	(1)
<i>Hyospathe macrorrhachis</i>			(3)	(2)			0,35	(0)	(0)	0,9	(1)
<i>Hyphaene coriacea</i>	1,8	(1)	(12)	(1)	2,70	(0)	1,45	(0)	(1)	0,0	(0)
<i>Iguanura wallichiana</i>	1,2	(1)	(3)	(1)	2,20	(0)	1,88	(0)	(01)	2,0	(2)
<i>Iriarteia deltoidea</i>	1,8	(1)	(3)	(2)	5,00	(01)	5,00	(12)	(12)	0,0	(0)
<i>Iriartella stenocarpa</i>			(3)	(2)					(1)	0,0	(0)
<i>Itaya amicornum</i>	0,0	(0)		(4)	4,30	(0)	2,40	(0)	(3)	0,0	(0)
<i>Johannesteijsmannia altifrons</i>	0,0	(0)		(4)	1,16	(0)	0,23	(0)	(3)	0,0	(0)
<i>Juania australis</i>	1,0	(1)	(3)	(1)	4,60	(0)	4,30	(1)	(0)	1,2	(1)
<i>Jubaea chilensis</i>	0,8	(1)	(1)	(2)	5,20	(1)	3,80	(1)	(0)	1,6	(1)
<i>Jubaeopsis caffra</i>	1,5	(1)	(1)	(2)	9,60	(2)	8,00	(2)	(0)	2,2	(2)
<i>Kentiopsis oliviformis</i>			(0)	(2)	4,90	(01)	2,90	(1)	(0)		
<i>Kerriodoxa elegans</i>	1,3	(1)	(2)	(0)	1,30	(0)	1,00	(0)	(1)	0,0	(0)
<i>Kingia australis</i>	0,0	(0)		(4)	30,50	(3)			(3)	0,0	(0)
<i>Korthalsia cheb</i>	0,0	(0)		(4)					(3)	0,0	(0)
<i>Korthalsia zippelii</i>	0,0	(0)		(4)	2,80	(0)	1,60	(0)	(3)	0,0	(0)
<i>Laccospadix australasicus</i>	0,5	(1)	(3)	(2)	6,50	(1)	3,00	(01)	(0)		
<i>Laccosperma acutiflorum</i>	0,0	(0)		(4)					(3)	0,0	(0)
<i>Latania verschaffeltii</i>			(1)	(1)	6,65	(1)	2,75	(01)	(0)	3,3	(23)
<i>Lemurophoenix halleuxii</i>	0,4	(1)	(3)	(2)	5,00	(01)	2,00	(0)	(0)	1,5	(1)
<i>Leopoldinia pulchra</i>	0,1	(1)	(3)	(2)	0,62	(0)	0,42	(0)	(0)	0,3	(1)
<i>Lepidocaryum tenue</i>	5,1	(2)	(2)	(0)	5,65	(1)	2,20	(0)	(0)		
<i>Lepidorrhachis mooreana</i>	1,0	(1)	(0)	(2)	2,30	(0)	1,50	(0)	(0)	1,9	(2)
<i>Leucothrinax morrisii</i>	0,0	(0)		(4)	4,00	(0)	2,50	(0)	(3)	0,0	(0)
<i>Licuala grandis</i>	0,0	(0)		(4)	3,16	(0)	0,66	(0)	(3)	0,0	(0)
<i>Linospadix monostachyos</i>	0,3	(1)	(3)	(2)	3,00	(0)	2,00	(0)	(1)	0,0	(0)
<i>Livistona speciosa</i>	0,0	(0)		(4)					(3)	0,0	(0)
<i>Lodoicea maldivica</i>	14,0	(3)	(1)	(2)	7,30	(1)	6,20	(2)	(0)	3,3	(2)
<i>Loxococcus rupicola</i>	0,3	(1)	(1)	(2)	4,30	(0)	3,80	(1)	(0)	1,1	(1)
<i>Lytocaryum hoehnei</i>	1,0	(1)	(1)	(2)	4,00	(0)	2,90	(1)	(0)	1,0	(1)
<i>Manicaria saccifera</i>	2,8	(1)	(3)	(1)	3,50	(0)	3,40	(1)	(1)	0,0	(0)
<i>Marojejya darianii</i>			(3)	(2)	4,75	(01)	2,50	(0)	(0)	0,8	(1)
<i>Marojejya insignis</i>	0,5	(1)	(3)	(2)	3,10	(0)	2,50	(0)	(0)	1,0	(1)
<i>Masoala madagascariensis</i>	0,3	(1)	(3)	(2)			2,90	(01)	(0)	2,9	(23)
<i>Mauritia flexuosa</i>	4,6	(2)	(2)	(0)					(0)		
<i>Mauritiella armata</i>	7,5	(2)	(2)	(0)	4,00	(0)	2,40	(0)	(0)	0,3	(1)
<i>Maxburretia rupicola</i>	0,0	(0)		(4)	1,30	(0)	0,70	(0)	(3)	0,0	(0)
<i>Medemia argun</i>					3,70	(0)	1,50	(0)	(0)	0,8	(1)
<i>Metroxylon salomonense</i>	0,0	(0)		(4)					(0)		
<i>Musa acuminata</i>									(0)		
<i>Myrialepis paradoxa</i>	3,1	(1)	(2)	(0)	3,00	(0)	1,60	(0)	(0)		

Nannorrhops ritchiana	0,0	(0)		(4)	2,50	(0)	1,55	(0)	(3)	0,0	(0)
Nenga gajah	0,5	(1)			23,50	(3)	22,50	(3)			
Nenga pumila			(3)	(2)			1,50	(0)	(1)	0,0	(0)
Neonicholsonia watsonii	0,0	(0)		(3)	6,00	(1)	3,30	(1)	(0)	2,0	(2)
Neoveitchia storckii	1,0	(1)	(3)	(2)	2,00	(0)	1,50	(0)	(0)	2,0	(2)
Nephrosperma van-houtteanum	0,6	(1)	(3)	(2)	2,20	(0)	1,20	(0)	(0)	1,5	(1)
Normanbya normanbyi	1,0	(1)	(3)	(2)	9,50	(12)	9,00	(2)	(0)	20,0	(4)
Nypa fruticans	0,0	(0)		(3)	5,20	(1)	2,20	(0)	(1)	0,0	(0)
Oenocarpus bataua	0,0	(0)		(3)	5,50	(1)			(0)		
Oncocalamus macrospathus	3,0	(1)	(2)	(0)	2,46	(0)	0,55	(0)	(0)	2,7	(2)
Oncocalamus mannii							0,95	(0)	(0)	1,8	(12)
Oncosperma tigillarum	0,5	(1)	(1)	(2)	4,00	(0)	3,30	(1)	(0)	2,2	(2)
Orania trispatha	2,0	(1)	(3)	(2)			6,00	(2)	(1)	0,0	(0)
Oraniopsis appendiculata	4,5	(2)	(2)	(0)	8,25	(12)	5,00	(2)	(0)	1,0	(1)
Parajubaea torallyi	2,0	(1)	(1)	(1)	6,00	(1)	4,00	(1)	(0)	2,0	(2)
Pelagodoxa henryana	1,0	(1)	(3)	(1)	1,90	(0)	1,20	(0)	(0)	0,4	(1)
Phoenicophorium borsigianum	0,5	(1)	(1)	(2)	1,90	(0)	1,75	(0)	(1)	0,0	(0)
Phoenix dactylifera					5,00	(1)					
Pholidocarpus macrocarpus	0,0	(0)		(4)					(3)	0,0	(0)
Pholidocarpus sumatranus	0,0	(0)		(4)	3,80	(0)	0,50	(0)	(3)	0,0	(0)
Pholidostachys pulchra	6,0	(2)	(1)	(1)	7,20	(1)	2,00	(0)	(0)	0,6	(1)
Physokentia petiolata	1,3	(1)	(0)	(2)	4,50	(01)			(0)	3,0	(2)
Phytelephas aequatorialis	36,0	(4)	(2)	(0)	10,00	(2)	4,00	(12)	(1)	0,0	(0)
Pigafetta elata	1,3	(1)	(1)	(1)	2,20	(0)	2,00	(0)	(0)	0,3	(1)
Pinanga coronata	0,0	(0)		(3)	3,00	(0)	2,98	(01)	(1)	0,0	(0)
Plectocomia mulleri			(2)	(0)	2,60	(0)	1,25	(0)			
Plectocomiopsis geminiflora	1,0	(1)	(2)	(0)	5,60	(1)	1,15	(0)	(0)	1,0	(1)
Podococcus barteri	0,0	(0)		(3)	1,70	(0)	0,80	(0)	(0)	0,8	(1)
Pogonotium ursinum	1,5	(1)	(2)	(0)	2,20	(0)	1,90	(0)	(0)	0,6	(1)
Ponapea ledermanniana			(3)		5,50	(1)	3,08	(01)	(0)	1,8	(12)
Prestoea pubens			(3)	(2)	2,00	(0)	1,00	(0)	(0)		
Pritchardia thurstonii	0,0	(0)		(4)	5,00	(1)	2,30	(0)	(3)	0,0	(0)
Pseudophoenix vinifera	0,0	(0)		(4)	10,25	(2)	5,60	(2)	(0)		
Ptychococcus paradoxus	1,2	(1)	(1)	(2)	8,90	(012)	4,25	(012)	(0)	11,3	(34)
Ptychosperma burretianum									(0)		
Ptychosperma elegans			(13)	(2)	6,00	(1)	1,63	(0)	(0)	5,4	(234)
Raphia farinifera	0,0	(0)		(3)	5,80	(1)	3,40	(1)	(1)	0,0	(0)
Ravenea hildebrandtii			(2)	(0)			2,13	(0)	(0)	1,5	(1)
Reinhardtia simplex	1,3	(1)	(3)	(1)	2,00	(0)	1,40	(0)	(1)	0,0	(0)
Retispatha dumetosa	4,6	(2)	(2)	(0)	2,00	(0)	0,80	(0)	(0)	0,8	(1)
Rhapidophyllum hystrix	2,5	(1)	(2)	(0)	3,10	(0)	2,00	(0)	(0)	1,3	(1)
Rhapis excelsa	1,3	(1)	(2)	(0)	2,50	(0)	0,60	(0)	(12)	0,0	(0)
Rhopaloblaste augusta	0,9	(1)	(1)	(2)	3,35	(0)	3,10	(1)	(0)	4,4	(3)
Rhopalostylis baueri	0,6	(1)	(1)	(2)	4,30	(0)	3,65	(1)	(0)	4,9	(3)
Roscheria melanochaetes	0,8	(1)	(1)	(1)	0,80	(0)	0,35	(0)	(0)	0,5	(1)
Roystonea oleracea	2,2	(1)	(1)	(1)	6,60	(012)	4,10	(1)	(0)		
Sabal palmetto	0,0	(0)		(4)	4,20	(0)	1,50	(0)	(3)	0,0	(0)
Salacca ramosiana			(2)	(0)							
Saribus jeanneneyi	0,0	(0)		(4)	2,00	(0)	0,30	(0)	(3)	0,0	(0)
Satakentia liukuensis	1,0	(1)	(0)	(2)	4,00	(0)	3,00	(1)	(0)	4,0	(3)
Satranala decussilvae											
Schippia concolor	1,5	(1)	(2)	(0)	2,40	(0)	1,40	(0)	(1)	0,0	(0)
Sclerosperma mannii									(1)	0,0	(0)
Serenoa repens	0,0	(0)		(4)	3,00	(0)	1,00	(0)	(3)	0,0	(0)
Socratea exorrhiza	0,0	(0)		(3)	7,20	(1)	6,00	(2)	(0)	1,3	(12)
Solfia samoensis	0,7	(1)	(0)	(2)	5,00	(1)	3,15	(01)	(12)	0,0	(0)
Sommieria leucophylla	0,6	(1)	(3)	(2)	2,63	(0)	0,99	(0)	(0)	0,6	(1)
Syagrus schizophylla	1,8	(1)	(1)	(1)	3,60	(0)	2,90	(1)	(0)	1,4	(1)
Synechanthus warscewiczianus	0,3	(1)	(1)	(2)	1,00	(0)	0,30	(0)	(1)	0,0	(0)

Tahina spectabilis	0,0	(0)		(4)	5,00	(1)	3,00	(1)	(3)	0,0	(0)
Tectiphiala ferox	1,4	(1)	(3)	(2)	7,50	(1)	3,10	(1)	(0)	2,7	(2)
Thrinax radiata	0,0	(0)		(4)			2,85	(01)	(3)	0,0	(0)
Trachycarpus geminisectus			(2)	(0)					(0)		
Tradescantia ohiensis	0,0	(0)		(4)					(3)	0,0	(0)
Trithrinax brasiliensis	0,0	(0)		(4)	4,30	(0)	2,00	(0)	(3)	0,0	(0)
Typha latifolia	0,0	(0)		(3)					(1)	0,0	(0)
Veitchia arecina			(3)	(2)	10,75	(12)	5,00	(12)	(0)	13,8	(4)
Verschaffeltia splendida	0,8	(1)	(3)	(1)	1,25	(0)	0,80	(0)	(0)	1,3	(1)
Voanioala gerardii	1,2	(1)	(1)	(2)	10,50	(2)	9,00	(2)	(1)	0,0	(0)
Wallichia disticha	0,0	(0)		(3)	3,40	(0)	2,40	(01)	(1)	0,0	(0)
Washingtonia robusta	0,0	(0)		(4)	6,00	(1)	4,00	(1)	(3)	0,0	(0)
Welfia regia	18,3	(3)	(3)	(1)	15,00	(2)	10,00	(2)	(0)		
Wendlandiella gracilis	0,2	(1)	(3)	(2)	1,00	(0)	0,50	(0)	(0)	0,7	(1)
Wettinia panamensis					7,00	(1)	5,50	(2)			
Wodyetia bifurcata			(3)	(2)	7,00	(1)	5,75	(2)	(0)	8,0	(4)
Zombia antillarum	0,0	(0)		(4)	5,50	(1)	4,50	(12)	(3)	0,0	(0)

Taxon	6132a	6094	6094b	6097	6097b	6102	500	6023	6134	6133
Acanthophoenix rubra	(1)	2,0	(1)	10,3	(0)	(0)		(012)	(3)	(1)
Acoelorrhaphe wrightii	(0)	1,0	(0)	10,0	(0)	(2)		(5)	(4)	(0)
Acrocomia aculeata				43,0	(2)	(0)		(012)	(3)	(1)
Actinokentia divaricata	(1)	3,0	(2)	25,0	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Actinorhynchus calapparia	(1)	3,4	(2)	5,9	(0)	(0)		(012)	(3)	(1)
Adonidia merrillii	(1)	4,0	(3)	34,0	(2)			(012)	(3)	(1)
Aiphanes horrida	(1)	3,0	(2)	18,6	(1)	(0)	(1)	(01)	(3)	(1)
Allagoptera arenaria	(1)	4,0	(3)	19,5	(01)	(0)	(1)	(01)	(3)	(1)
Ammandra decasperma	(1)		(0)	70,0	(2)	(2)		(5)	(6)	(4)
Anigozanthos flavidus	(0)	1,0	(0)			(2)		(2)	(0)	(0)
Aphandra natalia	(0)		(0)	9,5	(0)	(2)		(5)	(6)	(4)
Archontophoenix alexandrae	(3)			13,2	(01)	(0)		(012)	(3)	(1)
Areca catechu	(1)			52,5	(2)	(01)		(012)	(3)	(1)
Arenga pinnata	(0)			37,5	(12)	(1)		(01)	(3)	(1)
Asterogyne martiana	(1)	2,0	(1)	10,0	(0)	(0)	(1)	(0)	(2)	(1)
Astrocaryum gynacanthum				35,0	(12)	(0)		(3)	(5)	(1)
Attalea allenii								(2)	(0)	(3)
Bactris gasipaes	(0)			38,5	(012)	(1)		(012)	(3)	(1)
Balaka microcarpa	(3)	2,0	(1)	18,3	(1)			(02)	(3)	(1)
Balaka seemannii								(0)	(2)	(1)
Barcella odora	(1)			43,0	(2)	(0)		(012)	(3)	(1)
Basselinia velutina		3,0	(2)	11,0	(0)			(012)	(3)	(1)
Beccariophoenix madagascariensis	(0)			35,0	(2)			(0124)	(3)	(1)
Bentinckia nicobarica	(2)	2,0	(1)	16,0	(1)			(012)	(3)	(1)
Bismarckia nobilis	(1)		(0)	44,0	(2)	(2)		(25)	(04)	(4)
Borassodendron machadonis	(1)		(0)			(2)		(25)	(04)	(4)
Borassus flabellifer			(0)	120,0	(3)	(2)		(25)	(04)	(4)
Brahea aculeata	(0)	1,0	(0)	29,3	(1)	(2)		(2)	(0)	(0)
Brassiophoenix schumannii								(01)	(3)	(1)
Burretiokentia hapala		3,4	(2)			(0)		(012)	(3)	(1)
Butia capitata	(1)			33,3	(2)	(0)		(012)	(3)	(1)
Calamus aruensis	(1)		(0)	11,0	(0)	(2)		(12)	(01)	(4)
Calyptrocalyx albertisianus				28,5	(12)	(0)		(012)	(3)	(1)
Calyptroglyne ghiesbreghtiana	(1)			15,3	(1)			(0)	(2)	(1)
Calyptronoma occidentalis	(1)			15,0	(1)	(0)		(0)	(2)	(1)
Carpentaria acuminata	(3)			20,0	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Carpoxydon macrospermum	(3)	8,0	(4)	46,0	(2)			(012)	(3)	(1)
Caryota mitis	(0)	2,0	(1)	11,5	(01)	(0)		(0)	(2)	(1)
Ceratolobus concolor			(0)	20,0	(1)	(2)		(12)	(01)	(4)
Ceroxylon quindiuense	(1)		(0)	18,0	(1)	(2)		(2)	(0)	(4)

<i>Chamaedorea seifrizii</i>	(4)		(0)	8,0	(0)		(2)	(0)	(4)
<i>Chamaerops humilis</i>	(1)		(0)	18,0	(1)	(2)	(2)	(0)	(4)
<i>Chambeyronia macrocarpa</i>	(0)			50,0	(2)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Chelyocarpus repens</i>	(0)	1,0	(0)	25,0	(1)	(2)	(2)	(0)	(0)
<i>Chelyocarpus ulei</i>	(0)	1,0	(0)	26,6	(1)	(2)	(2)	(0)	(0)
<i>Chuniophoenix hainanensis</i>	(0)	1,0	(0)	23,3	(1)	(2)	(5)	(4)	(0)
<i>Clinosperma bracteale</i>	(1)	6,0	(4)	15,0	(01)		(012)	(3)	(1)
<i>Clinostigma savoryanum</i>	(1)			12,0	(0)		(01)	(3)	(1)
<i>Coccothrinax argentata</i>	(0)	1,0	(0)	9,6	(0)	(2)	(2)	(0)	(0)
<i>Cocos nucifera</i>	(1)			22,5	(012)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Colpotherinax wrightii</i>	(0)	1,0	(0)	20,0	(1)	(2)	(2)	(0)	(0)
<i>Copernicia prunifera</i>	(0)	1,0	(0)			(2)	(5)	(4)	(0)
<i>Copernicia yarey</i>	(0)	1,0	(0)	18,0	(1)	(2)	(5)	(4)	(0)
<i>Corypha utan</i>	(0)	1,0	(0)	22,5	(1)	(2)	(5)	(4)	(0)
<i>Cryosophila warszewiczii</i>	(0)	1,0	(0)	23,0	(1)	(2)	(2)	(0)	(0)
<i>Cyphokentia cerifera</i>	(2)			14,3	(1)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Cyphokentia macrostachya</i>		2,0	(1)	12,5	(01)	(0)	(0)	(2)	(1)
<i>Cyphophoenix nucele</i>		4,8	(3)	20,0	(1)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Cyphosperma balansae</i>	(1)	8,0	(4)	12,0	(0)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Cyrtostachys renda</i>	(1)	2,0	(1)	10,0	(0)	(0)	(0)	(2)	(1)
<i>Daemonorops grandis</i>	(0)		(0)			(2)	(2)	(01)	(4)
<i>Deckenia nobilis</i>	(3)			10,6	(0)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Desmoncus orthacanthos</i>						(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Dictyocaryum lamarckianum</i>				26,5	(1)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Dictyosperma album</i>	(3)	3,1	(2)	16,0	(1)	(0)	(01)	(3)	(1)
<i>Dransfieldia micrantha</i>	(1)			15,0	(1)	(0)	(0)	(2)	(1)
<i>Drymophloeus litigiousus</i>	(3)			18,5	(01)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Dypsis lastelliana</i>	(3)	2,0	(1)	21,0	(1)	(0)	(0)	(2)	(1)
<i>Elaeis oleifera</i>	(1)			23,3	(1)		(2)	(0)	(2)
<i>Eleiodoxa conferta</i>	(0)		(0)	50,0	(2)	(2)	(1)	(1)	(4)
<i>Eremospatha macrocarpa</i>	(0)	1,0	(0)	39,0	(2)	(2)	(2)	(0)	(0)
<i>Eugeissona tristis</i>	(1)	2,0	(1)				(1)	(1)	(01)
<i>Euterpe oleracea</i>	(2)			16,6	(1)		(012)	(3)	(1)
<i>Gaussia maya</i>	(2)			12,5	(01)		(012)	(3)	(1)
<i>Geonoma interrupta</i>	(1)	2,0	(1)	6,0	(0)	(0)	(0)	(2)	(1)
<i>Guihaia argyrata</i>	(0)		(0)	6,0	(0)	(2)	(2)	(0)	(4)
<i>Hanguana malayana</i>			(0)						
<i>Hedyscepe canterburyana</i>	(3)	2,0	(1)	40,0	(2)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Hemithrinax ekmaniana</i>	(0)	1,0	(0)			(2)	(2)	(0)	(0)
<i>Heterospathe elata</i>							(012)	(3)	(1)
<i>Heterospathe elegans</i>	(3)	2,6	(2)	12,5	(01)		(012)	(3)	(1)
<i>Howea belmoreana</i>	(0)	2,0	(1)	3,5	(0)	(0)	(0)	(2)	(1)
<i>Hydriastele wendlandiana</i>	(0)			9,0	(0)	(1)	(012)	(3)	(1)
<i>Hyophorbe verschaffeltii</i>	(2)			18,3	(1)	(0)	(5)	(5)	(1)
<i>Hyospathe macrorhachis</i>	(1)			11,0	(0)	(0)	(01)	(3)	(1)
<i>Hyphaene coriacea</i>	(0)		(0)	55,0	(2)	(2)	(25)	(04)	(4)
<i>Iguanura wallichiana</i>	(1)			11,1	(0)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Iriartea deltoidea</i>	(0)			24,6	(1)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Iriartella stenocarpa</i>	(0)					(01)	(012)	(3)	(1)
<i>Itaya amicornum</i>	(0)	1,0	(0)	20,0	(1)	(2)	(2)	(0)	(0)
<i>Johannesteijsmannia altifrons</i>	(0)	1,0	(0)	19,3	(1)	(2)	(5)	(4)	(0)
<i>Juania australis</i>	(1)		(0)	16,0	(1)	(2)	(2)	(0)	(4)
<i>Jubaea chilensis</i>	(1)	4,4	(3)	38,0	(2)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Jubaeopsis caffra</i>	(1)			39,0	(2)	(0)	(012)	(3)	(1)
<i>Kentiopsis oliviformis</i>		2,0	(1)	18,5	(01)	(0)	(0)	(2)	(1)
<i>Kerriodoxa elegans</i>	(0)		(0)	36,0	(2)	(2)	(1)	(1)	(4)
<i>Kingia australis</i>	(0)	1,0	(0)			(2)			
<i>Korthalsia cheb</i>	(0)	1,0	(0)	15,0	(1)	(2)	(2)	(0)	(0)
<i>Korthalsia zippelii</i>	(0)	1,0	(0)			(2)	(2)	(0)	(0)

Laccospadix australasicus				13,5	(01)	(0)		(012)	(3)	(1)
Laccosperma acutiflorum	(0)	1,0	(0)			(2)		(1)	(1)	(0)
Latania verschaffeltii	(1)		(0)	40,0	(2)	(2)		(2)	(0)	(4)
Lemurophoenix halleuxii	(2)	3,0	(2)	50,0	(2)	(0)		(01)	(3)	(1)
Leopoldinia pulchra	(2)			24,0	(1)			(012)	(3)	(1)
Lepidocaryum tenue			(0)	30,6	(1)	(2)		(12)	(0)	(4)
Lepidorrhachis mooreana	(2)	2,0	(1)	13,5	(01)			(0)	(2)	(1)
Leucothrinax morrisii	(0)	1,0	(0)	7,2	(0)	(2)		(2)	(0)	(0)
Licuala grandis	(0)	1,0	(0)	12,5	(01)	(2)		(2)	(0)	(0)
Linospadix monostachyos	(0)			12,0	(01)	(0)		(012)	(3)	(1)
Livistona speciosa	(0)	1,0	(0)	30,0	(12)	(2)		(5)	(4)	(0)
Lodoicea maldivica	(1)		(0)	456,0	(4)	(2)		(25)	(04)	(4)
Loxococcus rupicola	(1)	3,2	(2)	25,3	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Lytocaryum hoehnei	(1)			27,3	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Manicaria saccifera	(0)			70,0	(2)	(0)		(012)	(3)	(1)
Marojejya darianii				22,5	(1)			(012)	(012)	(3)
Marojejya insignis	(1)			23,1	(1)			(12)	(012)	(3)
Masoala madagascariensis	(1)			24,5	(1)			(012)	(3)	(1)
Mauritia flexuosa			(0)	53,0	(2)	(2)		(12)	(01)	(4)
Mauritiella armata	(1)		(0)	32,0	(2)	(2)		(2)	(0)	(4)
Maxburretia rupicola	(0)	1,0	(0)	5,8	(0)	(2)		(2)	(0)	(0)
Medemia argun			(0)	42,0	(2)	(2)		(25)	(04)	(4)
Metroxylon salomonense				65,0	(2)			(1)	(1)	(01)
Musa acuminata										
Myrialepis paradoxa			(0)	26,0	(1)	(2)		(5)	(4)	(4)
Nannorrhops ritchiana	(0)	1,0	(0)	13,3	(0)	(2)		(5)	(4)	(0)
Nenga gajah								(0123)	(3)	(1)
Nenga pumila	(0)	3,0	(2)	28,0	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Neonicholsonia watsonii	(1)			11,3	(0)	(0)		(012)	(3)	(1)
Neoveitchia storckii	(1)	11,0	(4)	50,0	(2)	(0)		(01)	(3)	(1)
Nephrosperma van-houtteanum	(1)			6,0	(0)	(0)		(012)	(3)	(1)
Normanbya normanbyi	(4)			42,5	(2)	(0)		(012)	(3)	(1)
Nypa fruticans	(0)			106,0	(3)	(1)		(2)	(0)	(2)
Oenocarpus bataua		4,0	(3)	32,5	(12)	(0)		(012)	(3)	(1)
Oncocalamus macrospathus	(2)			16,8	(1)			(5)	(7)	(1)
Oncocalamus mannii								(5)	(7)	(1)
Oncosperma tigillarum	(2)			12,6	(0)	(0)		(012)	(3)	(1)
Orania trispatha	(0)	2,0	(1)	52,5	(2)	(0)		(0)	(2)	(1)
Oraniopsis appendiculata	(1)		(0)	34,0	(2)	(2)		(2)	(0)	(4)
Parajubaea torallyi	(1)			66,6	(2)	(0)		(012)	(3)	(1)
Pelagodoxa henryana	(1)	6,8	(4)	62,6	(2)	(0)		(012)	(3)	(1)
Phoenicophorium borsigianum	(0)			12,0	(0)	(0)		(012)	(3)	(1)
Phoenix dactylifera			(0)	55,0	(2)	(2)		(2)	(0)	(4)
Pholidocarpus macrocarpus	(0)	1,0	(0)	100,0	(3)	(2)		(2)	(0)	(0)
Pholidocarpus sumatranus	(0)	1,0	(0)			(2)		(2)	(0)	(0)
Pholidostachys pulchra	(1)	2,0	(1)	24,2	(1)	(0)		(0)	(2)	(1)
Physokentia petiolata	(2)	4,0	(3)	2,0	(0)	(0)		(012)	(3)	(1)
Phytelephas aequatorialis	(0)		(0)	125,0	(3)	(2)		(5)	(6)	(4)
Pigafetta elata	(1)		(0)			(2)		(12)	(01)	(4)
Pinanga coronata	(0)	2,0	(1)	13,0	(01)	(1)		(0)	(2)	(1)
Plectocomia mulleri			(0)	25,0	(1)	(2)		(12)	(01)	(4)
Plectocomiopsis geminiflora	(1)		(0)	25,0	(1)	(2)		(5)		
Podococcus barteri	(1)			30,0	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Pogonotium ursinum	(1)		(0)	17,0	(1)	(2)		(12)	(01)	(4)
Ponapea ledermanniana	(1)	3,0	(2)	39,3	(2)			(012)	(3)	(1)
Prestoea pubens				10,0	(0)			(0)	(2)	(1)
Pritchardia thurstonii	(0)	1,0	(0)	10,6	(0)	(2)		(2)	(0)	(0)
Pseudophoenix vinifera				20,0	(1)	(2)		(2)	(0)	(0)
Ptychococcus paradoxus	(4)			49,5	(2)			(012)	(3)	(1)

Ptychosperma burretianum						(0)		(012)	(3)	(1)
Ptychosperma elegans				12,0	(01)			(012)	(3)	(1)
Raphia farinifera	(0)			55,0	(2)			(2)	(0)	(1)
Ravenea hildebrandtii	(2)		(0)	9,5	(0)	(2)		(2)	(0)	(4)
Reinhardtia simplex	(0)					(0)		(012)	(3)	(1)
Retispatha dumetosa	(1)		(0)	26,0	(12)	(2)		(2)	(0)	(4)
Rhaphidophyllum hystrix	(1)		(0)	22,0	(1)	(2)		(5)	(4)	(4)
Rhapis excelsa	(0)		(0)	9,0	(0)	(2)		(2)	(0)	(4)
Rhopaloblaste augusta	(4)							(012)	(3)	(1)
Rhopalostylis baueri	(2)	2,4	(2)	17,3	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Roscheria melanochaetes	(1)			6,8	(0)			(012)	(3)	(1)
Roystonea oleracea						(0)		(012)	(3)	(1)
Sabal palmetto	(0)	1,0	(0)	11,0	(0)	(2)		(2)	(0)	(0)
Salacca ramosiana			(0)	60,0	(2)	(2)		(2)	(0)	(4)
Saribus jeanneneyi	(0)	1,0	(0)	40,0	(2)	(2)		(5)	(4)	(0)
Satakentia liukuensis	(2)	6,8	(4)	14,3	(1)			(012)	(3)	(1)
Satranala decussilvae			(0)	43,0	(12)	(2)		(2)	(0)	(4)
Schippia concolor	(0)			26,6	(1)			(2)	(0)	(01)
Sclerosperma mannii	(0)			27,5	(1)			(02)	(3)	(1)
Serenoa repens	(0)	1,0	(0)	18,0	(1)	(2)		(12)	(01)	(0)
Socratea exorrhiza	(1)	2,0	(1)	26,0	(1)	(1)		(0)	(2)	(1)
Solfia samoensis	(0)			18,8	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Sommieria leucophylla				10,0	(0)	(0)		(0)	(2)	(1)
Syagrus schizophylla	(1)			29,3	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Synechanthus warszewiczianus	(0)	9,0	(4)	25,3	(1)			(3)	(5)	(1)
Tahina spectabilis	(0)	1,0	(0)	26,0	(1)	(2)		(5)	(4)	(0)
Tectiphiala ferox	(1)			11,8	(0)	(0)		(012)	(3)	(1)
Thrinax radiata	(0)	1,0	(0)	7,6	(0)	(2)		(2)	(0)	(0)
Trachycarpus geminsectus			(0)			(2)		(2)	(0)	(4)
Tradescantia ohiensis	(0)	1,0	(0)			(2)				
Trithrinax brasiliensis	(0)	1,0	(0)	20,0	(1)	(2)		(2)	(0)	(0)
Typha latifolia	(0)					(0)				
Veitchia arecina	(4)			40,0	(2)	(0)		(012)	(3)	(1)
Verschaffeltia splendida	(2)			24,6	(1)	(0)		(012)	(3)	(1)
Voanioala gerardii	(0)			7,5	(0)	(0)		(012)	(3)	(1)
Wallichia disticha	(0)			16,5	(01)			(12)	(01)	(34)
Washingtonia robusta	(0)	1,0	(0)	12,0	(0)	(2)		(2)	(0)	(0)
Welfia regia		2,0	(1)	34,0	(2)	(0)		(0)	(2)	(1)
Wendlandiella gracilis	(1)		(0)	8,3	(0)	(2)		(123)	(01)	(4)
Wettinia panamensis				30,0	(12)			(2)	(0)	(3)
Wodyetia bifurcata	(4)			55,0	(2)			(012)	(3)	(1)
Zombia antillarum	(0)	1,0	(0)	35,0	(2)	(2)		(2)	(0)	(0)

## **Annexe 4 : article présentant la phylogénie moléculaire des Archontophoenicinae**

### **A phylogeny of subtribe Archontophoenicinae (Arecaceae) based on 14 DNA regions**

Authors

Boris Domenech<sup>1</sup>, Conny B. Asmussen-Lange<sup>2</sup>, William J. Baker<sup>3</sup>, Elodie Alapetite<sup>1</sup>, Jean Christophe Pintaud<sup>4</sup> and Sophie Nadot<sup>1</sup>

Author affiliations

<sup>1</sup>Univ Paris-Sud, Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, UMR8079, Orsay, F-91405, France

<sup>2</sup>Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Rolighedsvej 21, DK-1958 Frederiksberg C, Denmark

<sup>3</sup>Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AB, UK

<sup>4</sup>Jean-Christophe Pintaud, UMR 1097, Institut de recherche pour le Développement, BP 64501, 911 avenue Agropolis, F-34394 Montpellier, France



## Introduction

The subtribe Archontophoenicinae belongs to the tribe Areceae, which is one of the 11 tribes now recognized within Arecoideae (Dransfield et al., 2008), by far the largest of all five palm subfamilies. Archontophoenicinae includes 15 species distributed among five genera: *Actinorhytis* H.Wendl. & Drude, *Archontophoenix* H.Wendl. & Drude, *Actinokentia* Dammer, *Chambeyronia* Vieill., *Kentiopsis* Brongn. (Dransfield et al., 2005). All members of the subtribe are distributed in the Pacific Ocean, with *Archontophoenix* (six species) in Eastern of Australia, the monotypic *Actinorhytis* in New Guinea and the Solomon Island, and the remaining genera (eight species) in New Caledonia (Dransfield et al., 2008; Pintaud and Baker, 2008; Dowe, 2010; Baker et al., 2011; Baker and Couvreur, 2012). The vegetative morphology of Archontophoenicinae is relatively homogeneous and makes some species difficult to distinguish (Pintaud, 1999; Dransfield et al., 2008): they are unarmed palms with a crownshaft, a prophyll completely sheathing (similar to a peduncular bract) and acute leaflet tips.

The circumscription of Archontophoenicinae was revised recently in the new classification of palms published by Dransfield et al. (2005), resulting in the inclusion of *Actinorhytis* in the subtribe, the removal of *Hedyscepe* and *Rhopalostylis* (moved to subtribe Rhopalostylidinae) and the inclusion of *Mackeea* within *Kentiopsis*, as suggested by Pintaud (1999). Pintaud (1999) conducted a cladistic analysis on the seven genera then included in Archontophoenicinae in the prevailing palm classification at that time (Uhl and Dransfield, 1987); *Archontophoenix*, *Actinokentia*, *Chambeyronia*, *Kentiopsis*, *Hedyscepe* H.Wendl. & Drude, *Rhopalostylis* H.Wendl. & Drude and *Mackeea* H.E. Moore, based on 47 morpho-anatomical characters. Pintaud (1999) found that *Archontophoenix* was the sister group to all other genera in the subtribe, that *Chambeyronia* was paraphyletic whereas *Actinokentia* and *Kentiopsis* (including *Mackeea*) were both monophyletic. Recent studies have used molecular

markers to reconstruct large scale phylogenies of the palm family (Lewis and Doyle, 2002; Baker et al., 2009, 2011) including representatives of Archontophoenicinae. However, while generic sampling may have been complete in later studies, only a few species of the subtribe are represented in these phylogenies, leaving phylogenetic relationships within this subtribe still inadequately resolved.

The aim of the present study was to produce a comprehensive molecular phylogeny of Archontophoenicinae at the species level, with a sampling representing all of the 15 species included in the subtribe, and a dataset comprising a high number of chloroplast and nuclear markers. These markers include the DNA barcoding markers *matK* and *rbcL* which have been shown to result in good species discrimination in the palm tribe Caryoteae when used in combination with the nuclear marker ITS2 (Jeanson et al. 2011). We compared the phylogenetic hypotheses resulting from the chloroplast vs. the nuclear dataset, and combined both datasets in order to retrieve as much phylogenetic information as possible.

## **Material and Methods**

### *Taxonomic sampling*

Leaf samples of specimens from all species representing the taxonomic diversity of Archontophoenicinae were obtained from various herbaria and living collection: Royal Botanic Garden, Kew, Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Fairchild Tropical Botanic Garden, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris. (Table 1). Sequences were also retrieved from GenBank for some species, when they were available for the selected markers. Specimens from the following species were used as outgroups to root the phylogenetic trees: *Carpentaria acuminata* (H.Wendl. & Drude) Becc, *Cyphosperma balansae* (Brongn.) H.Wendl. ex Salomon, *Linospadix monostachyos* (Mart.) H.Wendl. and *Rhopalostylis baueri* (Hook.f.) H.Wendl. & Drude. These were selected from

the western Pacific clade of tribe Areceae, to which Archontophoenicinae belongs (Baker et al. 2011).

#### *DNA extraction, amplification and sequencing*

Total genomic DNA was extracted from fresh or silica gel dried plant material using the NucleoSpin<sup>®</sup> Plant II extraction kit (Macherey-Nagel), the 2× CTAB method of Doyle & Doyle (1987) or the DNeasy<sup>™</sup> Plant Mini Kit (Qiagen). Five nuclear DNA regions and nine plastid DNA regions were selected for amplification and sequencing. The nuclear DNA regions were *AGI* (a region of the oil palm gene *Eg-AGI*, homologous to *AGAMOUS* which is involved in organ identity during floral development (Ludena et al., 2011)), *BRSC* (a nuclear DNA region of unknown function), *ITS2* (nrDNA), *PRK* (coding region for the phosphoribulokinase, sequences retrieved from GenBank) and *RPB2* (RNA polymerase II, sequences retrieved from GenBank). These five nuclear regions were useful to reconstruct the phylogeny of the Bactridinae palm subtribe (Ludeña et al., 2011), to discriminate some close related palm species in the barcoding context (Jeanson et al., 2011), to identify large scale relationship within the palm family (Bacon et al., 2008) and to infer the phylogeny of the palm genus *Chamaedorea* (Thomas et al., 2006). The plastid DNA regions included were the coding regions *rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rps16* and *rpoC*, and the noncoding regions *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnL-F*, and *trnQ*

PCR amplification was conducted in a final reaction volume of 40 µL, including 1 µL of DNA, 1 µM of each primer, 200 µM dNTP, 1 x *Taq* polymerase buffer and 1 U *Taq* polymerase (MP Biomedicals).

PCR amplification of *AGI* was performed with the following primers: *AGI-Forward* CAGGAATTTGATGGGAGAGTC and *AGI-Reverse* GCTGATTGCTTTGCATGAG, and the following conditions: initial denaturation at 94°C for 3 mn, followed by 35 cycles of 30 sec at 94°C, 1 mn at 58°C, 45 sec at 72°C and ended by a final extension at 72°C for 3 mn

(see Ludena et al., (2011) for more details). PCR amplification of BRSC was performed with the following primers: BRSC-Forward TTCGAGCTCAACGACGTCTT and BRSC-Reverse CATCCCGAACAGCGTAATCC, and the following conditions: initial denaturation at 94°C for 3 mn, followed by 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 mn at 72°C and ended by a final extension at 72°C for 7 mn (see also Bacon et al., (2008) for more details). PCR amplification of ITS2 was performed with the following primers: ITS2-Forward ATGCGATACTTGGTGTGAAT and ITS2-Reverse GACGCTTCTCCAGACTACAAT, and the following conditions: initial denaturation at 94°C for 3 mn, followed by 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 56°C, 30 sec at 72°C and ended by a final extension at 72°C for 7 mn (see Jeanson et al., (2011) for more details). PCR products were purified and sequenced at the Genoscope ([www.genoscope.cnrs.fr](http://www.genoscope.cnrs.fr)). Sequence resulting from forward and reverse primers for each sample were corrected and assembled into contigs using CodonCode Aligner ([www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)).

#### *Sequence alignments and phylogenetic analyses*

Sequences were aligned with MAFFT (Kato and Toh, 2008), and the alignments were further refined manually when necessary using BioEdit (Hall, 1999). A microsatellite region in *AGI* was deleted, as suggested in Ludeña et al. (2001). The correct identity of the nuclear sequences was verified by submitting the sequences to a BLAST search in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). All DNA regions were assembled and aligned individually, and then concatenated into a combined matrix of nuclear DNA regions, a matrix of combined plastid DNA regions, and a combined matrix of all nuclear and plastid DNA regions using SequenceMatrix (Vaidya et al., 2011) (see table 1). Phylogenetic analyses were conducted using maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI). For MP analyses, heuristic searches with 1000 replicates of random addition sequence and tree bisection and reconnection branch swapping were performed using PAUP\*

version 4.0b10 (Swofford, 2003). Bootstrap analyses were performed using heuristic searches with 1000 replicates with branch swapping and 10 random addition sequences per replicate. No bootstrap could be performed on the nuclear dataset due to technical limits in computation. ML analyses were performed using PhyML (Guindon et al., 2010) with the GTR model of evolution (using default values for the associated parameters), starting with a BioNJ tree and using the NNI and SPR methods to find the trees with the best likelihood. Node support was estimated by performing 1000 non parametric bootstrap replicates on the datasets. The other parameters were left unchanged. Bayesian inference analyses were conducted with MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), with the following models of evolution: GTR+I for *psbK-psbI*, RPB2 and ITS2; HKY+I for *rbcL*, PRK and BRSC; HKY for *atpF-atpH*, *rpoC*, *trnQ* and AG1; GTR for *matK*, *ndhF* and *rps16*; and last, F81+I for *trnL-F*. The models were selected using MrModelTest (Nylander, 2004) using the Akaike Information Criterion. 10,000,000 generations were calculated in MrBayes, discarding the first 25% as burnin.

All trees were calculated with the inclusion of four outgroups belonging to other subtribes of the tribe Areceae. *Linospadix monostachyos* was selected as the outgroup to compute trees.

## **Results**

### *PCR and sequencing*

For ITS2, single band PCR products were obtained, avoiding a cloning step. In some specimens the BRSC DNA region could be sequenced only with the forward primer. For these specimens the single strand sequences were edited carefully before inclusion in the alignments.

All nine plastid DNA regions were obtained for all species, except for *Chambeyronia lepidota* and *Kentiopsis piersoniorum*, for which *trnQ* sequences were missing. All three nuclear DNA

regions AG1, BRSC, ITS2 were obtained for the following species: *Archontophoenix myolensis*, *A. tuckeri*, *A. maxima*, *A. alexandrae*, *Chambeyronia lepidota*, *Kentiopsis piersoniorum* and *K. magnifica* (table 1). Two of the three regions were obtained for nine species: *Archontophoenix cunninghamiana*, *A. purpurea*, *Chambeyronia macrocarpa*, *Actinorhytis calapparia*, *Kentiopsis pyriformis*, *K. oliviformis*, *Actinokentia huerlimannii*, *Cyphosperma balansae* (outgroup) and *Linospadix monostachyos* (outgroup) (table 1). For three species, only one nuclear region could be amplified and sequenced per species: *Actinokentia divaricata* (ITS2), *Carpentaria acuminata* (outgroup) (ITS2) and *Rhopalostylis baueri* (outgroup) (AG1), see Table 1.

Sequences from two nuclear regions were retrieved from GenBank for the following species: PRK for *Actinokentia divaricata*, *A. huerlimannii*, *Actinorhytis calapparia*, *Archontophoenix purpurea*, *Chambeyronia macrocarpa*, *Kentiopsis oliviformis*, *K. magnifica*, *Carpentaria acuminata* (outgroup) and *Rhopalostylis baueri* (outgroup) (table 1); and RPB2 for *Actinokentia divaricata*, *A. huerlimannii*, *Actinorhytis calapparia*, *Archontophoenix purpurea*, *Chambeyronia macrocarpa*, *Kentiopsis oliviformis*, *K. magnifica*, *Carpentaria acuminata* (outgroup) and *Rhopalostylis baueri* (outgroup) (table 1).

### *Phylogenetic analyses*

Most regions were aligned easily and alignments required very few manual adjustments. Table 2 shows the tree statistics for the MP analyses based on the different combinations of data. The ML trees based on the different datasets are shown on figure 1 (plastid tree), figure 2 (nuclear tree) and figure 3 (total evidence analysis). The BI and MP trees are shown on Figures S1-S2 (plastid trees), S3-S4 (nuclear trees) and S5-S6 (total evidence trees).

A well supported clade (PP>95% for all Bayesian analyses, bootstrap value>85% for all ML analysis) including all species from the genera *Archontophoenix*, *Actinokentia*, *Chambeyronia* and *Kentiopsis* emerges from the analyses (figures 1 to 3 and S1, S2, S3, S5, S6). This clade

will be termed here the “core Archontophoenicinae” and is present in all analyses except for those conducted in MP on the nuclear dataset (figure S4). This clade was recovered in previous analyses (Baker et al. 2009, 2011, Norup et al., 2006) in which it was moderately to highly supported. The placement of *Actinorhytis* as the sister group of the core Archontophoenicinae has been previously resolved in both separate and combined analyses of the nuclear genes PRK and RPB2 (Baker et al. 2011) and the supertree study of Baker et al. (2009), which also draws on these two DNA regions. It is also consistent with earlier findings (Lewis and Doyle, 2002 Norup et al. 2006). In this study, however, *Actinorhytis* is consistently placed in an unresolved position at the base of the tree, whatever the dataset or method used, as emerged from the earliest analyses of the group based on morphological data (Pintaud 1999). Our results neither refute nor support the placement of *Actinorhytis* as a member of the Archontophoenicinae. However, the fact that so large a dataset based on so many DNA regions fails to recover this relationship is noteworthy and supports concerns expressed by the authors of the current classification regarding this genus (Dransfield et al. 2008). But in some analyses (combined matrix in ML, nuclear dataset in ML and BI), *Actinorhytis* is closer to outgroups than to the “core Archontophoenicinae”. Although the morphology of *Actinorhytis* is consistent with the current morphological circumscription of the subtribe and its distribution in New Guinea and the Solomon Islands is adjacent to that of the core Archontophoenicinae in Australia and New Caledonia, *Actinorhytis* stands apart on a number of features. It is an extremely tall palm with a very slender crownshaft, the leaves are strongly recurved and the fruit is very large, not only in comparison to the core Archontophoenicinae, but also relative to almost all other Areceae. The position of *Actinorhytis*, along with several other ambiguously placed genera of Areceae, will only be solved with dense taxon and data sampling across the tribe.

### Archontophoenix

This genus was recognized as monophyletic in previous studies (Pintaud, 1999; Dowe, 2010). The six species of *Archontophoenix* form a well supported clade in all analyses based on the plastid and the combined datasets, except those based on the nuclear dataset (ML bootstrap support >85%, MP bootstrap>50% and BI PP=1 with the plastid and combined datasets), confirming that the genus is indeed a natural group, as suggested by its shared morphological features (highly branched inflorescences and small fruits with ruminant endosperm (Dransfield et al., 2008)). In the nuclear trees there is a splitting of *Archontophoenix* in three distinct groups: [[*Archontophoenix alexandrae* + *A. myolensis*] + *A. cunninghamiana*] separated from [*A. maxima* + *A. tuckeri*] and *A. purpurea* alone. The sister group relationship between [*Archontophoenix alexandrae* + *A. myolensis*] on the one hand, and [*A. maxima* + *A. tuckeri*] on the other hand is well supported in all our analyses except in the plastid trees. In spite of the large amount of characters sampled in this study, the relationships between *Archontophoenix* and the other genera of the subtribe remain however unclear.

### Actinokentia

The monophyly of this genus (two species) is strongly supported in the plastid trees (MP bootstrap support > 95%, ML bootstrap support > 95% and BI PP = 1; figures 1, S1 and S2) and in the total evidence trees (MP bootstrap support = 94%, ML bootstrap support > 95% and BI PP = 1; figures 3, S5 and S6). It is supported by lower values in the nuclear trees obtained with ML and BI (ML bootstrap value = 86% and BI PP = 0.77; figures 2 and S3), and the MP analysis of the nuclear dataset failed to recover this clade (figure S4). The two species, both endemic from New Caledonia, are markedly smaller palms than the rest of the subtribe, making them easily distinguishable. They show strong divaricate branches, small inflorescences bearing staminate asymmetrical flowers with prominent columnar pistillode and a slender stem. (Dowe, 1989; Dransfield et al., 2008)



The monophyly of *Actinokentia* was evidenced by Pintaud (1999) using morphological characters, and the genus was considered to be closely related to *Chambeyronia* because of shared morphological features. This relationship is not supported in our analyses, as already suggested by Baker et al. (2011).

#### *Kentiopsis* and *Chambeyronia*

None of our analyses recovered monophyly for *Chambeyronia* and *Kentiopsis*. It should be noted that the three species *K. magnifica*, *K. oliviformis* and *C. macrocarpa* are consistently grouped together in all the analyses (except in the BI and MP analyses of the plastid dataset; figures S1 and S2), suggesting that *Kentiopsis* and *Chambeyronia* are not monophyletic. Both genera are endemic from New Caledonia. Within Archontophoenicinae, the two species of *Chambeyronia* are characterized by the absence of a pistillode in the male flowers, which is a derived trait in this subtribe (Nadot et al., 2011). The pistillode has been lost several times within the Areceae, making it a homoplasious character state, perhaps not entirely reliable as a synapomorphy for a genus. The four species of *Kentiopsis* occur also in New Caledonia and share broom-like inflorescences, as well as asymmetrical staminate flowers, an unusual feature in palms. The unresolved placement of *C. lepidota*, *K. piersoniorum* and *K. pyriformis* is problematic and does not allow us to make further conclusion as to the delimitation of *Kentiopsis* or *Chambeyronia*. Both *Chambeyronia macrocarpa* and *Actinokentia divaricata* have been formerly placed in the genus *Kentiopsis* (Brongniart, 1873), stressing the very close relationship among these genera.

#### *Actinorhytis*

The single species of this monotypic genus (*Actinorhytis calapparia*) is located in New Guinea and the Solomon Islands (Dransfield et al., 2008; Pintaud and Baker, 2008). Baker et al., (2011) suggested that this genus was sister to all other Archontophoenicinae. The BI and ML nuclear trees (figures S3 and S4) as well as the ML total evidence tree (figure 3) support

this sister-group relationship. In all other analyses, the position of the specie is unresolved among outgroups.

## **Discussion**

Molecular phylogenies have led to dramatic changes in the classification of palms, highlighting the usefulness of molecular characters for palm systematic. Archontophoenicinae was highlighted in some studies (Lewis and Doyle, 2002; Norup et al., 2006; Baker et al., 2011) to be part of the South West Pacific and Australia clade (especially the Western Pacific clade). Previous studies based on morphological characters (Uhl and Dransfield, 1987; Pintaud, 1999) resulted in the inclusion of *Hedyscepe* and *Rhopalostylis* in the subtribe Archontophoenicinae, but this inclusion is not supported in phylogenetic analyses based on molecular data (Baker et al., 2011), and our results confirm this latter view. Our multigene analysis of the subtribe also confirm the position of *Actinorhytis* as sister group to the other genera (*Kentiopsis*, *Actinokentia*, *Archontophoenix* and *Chambeyronia*), as suggested by Baker et al., (2009, 2011) in large scale studies of the subfamily Arecoideae based on a smaller taxonomic sampling of Archontophoenicinae. Our results furthermore challenge the monophyly of *Chambeyronia* and *Kentiopsis*.

Palms are known to evolve particularly slowly at the molecular level (Wilson et al., 1990; Gaut et al., 1996), and adding up molecular characters was a way to optimize our chances to resolve phylogenetic relationships among closely related species. The close examination of the relative support brought by the nuclear and plastid data reveals that nuclear regions tend to support external nodes in the phylogeny, whereas plastid regions bring resolution to the deepest nodes of the tree. In the case of *Archontophoenix* for example, the phylogenetic analyses of plastid regions result in a large clade with little resolution among species, whereas

nuclear regions suggest affinities between species ([*A. alexandrae* + *A. myolensis*] and [*A. maxima* + *A. tuckeri*]), although failing to recover the monophyly of the genus.

Overall, plastid data contain less information than nuclear data (Table 3), as suggested by the comparison of the statistics associated with the MP analyses of nuclear, plastid and combined datasets. These statistics show that the best results are obtained with the combined analysis of nuclear and plastid data (figures 1 and 2, and S1-S4 to compare the resolution of trees). Interestingly, plesiomorphic characters bring resolution to the deepest nodes of the phylogeny.

The combined analysis of 14 DNA regions resulted in improving the resolution of phylogenetic relationships within Archontophoenicinae and suggested that the circumscription of some genera should perhaps be revised. The lack of support remaining in parts of the phylogeny may be due to the variable evolutionary rate of these 14 DNA regions, leading to conflicts between the plastid and nuclear datasets, as already stressed by Cuenca and Asmussen, (2007). Although we used both non-coding and coding plastid and nuclear DNA regions, there was a high level of homoplasy, especially within the plastid regions (almost 38% in MP when excluding non-uninformative character). The nuclear dataset displayed a little less homoplasy (~31% in MP), and the combined dataset had an intermediate level of homoplasy (~35% in MP) (table 2).

## **Conclusion**

Obtaining well resolved phylogenies at the species level in the palm family is a challenge. The plastid genome, which is a valuable source of informative markers in plants at various taxonomic levels, has a particularly low rate of evolution in palms even in the non-coding regions, a phenomenon identified in the early 90's, when the very first molecular phylogenies

of angiosperms, and then palms, were produced (Chase et al., 1995; Nadot et al., 1995, Baker et al., 1999; Asmussen & Chase, 2001; Asmussen et al., 2006). According to Cuenca and Asmussen (2007), using plastid DNA brings sometimes as much information as nuclear DNA, and sometimes even much more.. In contrast, the present study confirms that the amount of phylogenetic information that can be extracted from chloroplast data in palms is extremely low. However, when used in combination with nuclear markers, which are more variable and bear more informative, they can prove useful, as shown by the results obtained here, which fully support the use of multigene approaches in palm molecular systematics.

Our results raise two questions. One question is the delimitation of genera within the core Archontophoenicinae. The large polytomy in this clade indicates that the genera (in particular *Kentiopsis* and *Chambeyronia*) are difficult to delimit not only at the morphological level but also at the molecular level, which may be an indication of a rapid radiation having occurred at the base of core Archontophoenicinae. Second, our results raise the question of whether *Actinorhytis* should remain in Archontophoenicinae. Clarifying this point will require the addition of still more molecular data in combination with additional outgroups from other subtribes.

## References

- ASMUSSEN, C.B., AND M.W. CHASE. 2001. Coding and noncoding plastid DNA in Palm systematics. *American journal of botany* 88: 1103–1117.
- ASMUSSEN, C.B., J. DRANSFIELD, V. DEICKMANN, A.S. BARFOD, J.C. PINTAUD, AND W.J. BAKER. 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 15–38. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8339.2006.00521.x>.
- BACON, C.D., A. FELTUS, A.H. PATERSON, AND C.D. BAILEY. 2008. Novel nuclear intron-spanning primers for Arecaceae evolutionary biology. *Molecular ecology resources* 8: 211–214. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21585759> [Accessed February 19, 2013].
- BAKER, W.J., C.B. ASMUSSEN, S.C. BARROW, J. DRANSFIELD, AND T.A. HEDDERSON. 1999. A phylogenetic study of the palm family (Palmae) based on chloroplast DNA sequences from the trnL-trnF region. *Plant Systematics and Evolution* 219: 111–126. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF01090303>.
- BAKER, W.J., AND T.L.P. COUVREUR. 2012. Biogeography and distribution patterns of Southeast Asian palms. In *Biotic Evolution and Environmental Change in Southeast Asia*,
- BAKER, W.J., M. V NORUP, J.J. CLARKSON, T.L.P. COUVREUR, J.L. DOWE, C.E. LEWIS, J.C. PINTAUD, ET AL. 2011. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). *Annals of botany* 108: 1417–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21325340> [Accessed October 26, 2012].
- BAKER, W.J., V. SAVOLAINEN, C.B. ASMUSSEN, M.W. CHASE, J. DRANSFIELD, F. FOREST, M.M. HARLEY, ET AL. 2009. Complete Generic-Level Phylogenetic Analyses of Palms (Arecaceae) with Comparisons of Supertree and Supermatrix Approaches. *Systematic Biology*.
- BRONGNIART. 1873. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences.
- CUENCA, A., AND C.B. ASMUSSEN. 2007. Phylogeny of the Palm Tribe Chamaedoreae (Arecaceae) Based on Plastid DNA Sequences. *Systematic Botany* 32: 250–263.
- DOWE, J.L. 2010. Australian palms.
- DOWE, J.L. 1989. Palms of the South-West Pacific.
- DRANSFIELD, J., N.W. UHL, C.B. ASMUSSEN, W.J. BAKER, M.M. HARLEY, AND C.E. LEWIS. 2005. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. *Kew Bulletin* 60: 559–569.
- DRANSFIELD, J., N.W. UHL, C.B. ASMUSSEN, W.J. BAKER, M.M. HARLEY, AND C.E. LEWIS. 2008. Genera Palmarum.

- GAUT, B., B.R. MORTON, B.C. MCCAIG, AND M.T. CLEGG. 1996. Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10274–10279. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38374&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- GUINDON, S., J.-F. DUFAYARD, V. LEFORT, M. ANISIMOVA, W. HORDIJK, AND O. GASCUEL. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* 59: 307–321. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525638> [Accessed October 26, 2012].
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95,98,NT. *In* Nucleic Acids Symposium Series, 95–98.
- JEANSON, M.L., J.-N. LABAT, AND D.P. LITTLE. 2011. DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? *Annals of botany* 108: 1445–1451. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757475> [Accessed November 7, 2012].
- KATOH, K., AND H. TOH. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in bioinformatics* 9: 286–298. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372315> [Accessed November 1, 2012].
- LEWIS, C.E., AND J.J. DOYLE. 2002. A phylogenetic analysis of tribe Areceae (Arecaceae) using two low-copy nuclear genes. *Plant Systematics and Evolution* 236: 1–17.
- LUDENA, B., N. CHABRILLANGE, F. ABERLENC-BERTOSSI, H. ADAM, J.W. TREGEAR, AND J.C. PINTAUD. 2011. Phylogenetic utility of the nuclear genes *AGAMOUS 1* and *PHYTOCHROME B* in palms (Arecaceae): an example within Bactridinae. *Annals of botany* 108: 1433–1444.
- NADOT, S., J. SANNIER, A.S. BARFOD, AND W.J. BAKER. 2011. Evolution of the palm androecium as revealed by character mapping on a supertree. *In* *Flowers of the Tree of Life*, 156–180.
- NORUP, M. V, J. DRANSFIELD, M.W. CHASE, A.S. BARFOD, E.S. FERNANDO, AND W.J. BAKER. 2006. Homoplasious character combinations and generic delimitation: a case study from the Indo-Pacific arecoid palms (Arecaceae: Areceae). *American journal of botany* 93: 1065–1080. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642171>.
- NYLANDER, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. *Evolutionary Biology Centre, Uppsala University*.
- PINTAUD, J.C. 1999. A cladistic analysis of the Archontophoenicinae (Palmae, Areceae) based on morphological and anatomical characters. *In* *Memoirs of the New York Botanical Garden*,
- PINTAUD, J.C., AND W.J. BAKER. 2008. A revision of the palm genera (Arecaceae) of New Caledonia. *Kew Bulletin* 63: 61–73.

- RONQUIST, F., AND J.P. HUELSENBECK. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics Applications Note* 19: 1572–1574. Available at: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/bioinformatics/btg180> [Accessed November 1, 2012].
- SWOFFORD, D.L. 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts*.
- THOMAS, M.M., N.C. GARWOOD, W.J. BAKER, S. A HENDERSON, S.J. RUSSELL, D.R. HODEL, AND R.M. BATEMAN. 2006. Molecular phylogeny of the palm genus *Chamaedorea*, based on the low-copy nuclear genes PRK and RPB2. *Molecular phylogenetics and evolution* 38: 398–415. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16249101> [Accessed November 23, 2012].
- UHL, N.W., AND J. DRANSFIELD. 1987. *Genera Palmarum* (1st edition).
- VAIDYA, G., D.J. LOHMAN, AND R. MEIER. 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27: 171–180.
- WILSON, M.A., B. GAUT, AND M.T. CLEGG. 1990. Chloroplast DNA Evolves Slowly in the Palm Family (Arecaceae). *Molecular biology and evolution* 7: 303–314.

## Acknowledgements

This project was supported by the "Bibliothèque du Vivant" funded by CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, INRA and CNS (Centre National de Séquençage). We thank the various botanical gardens which provided us with plant material.

Table 1. Species name, accession and voucher information for each of the specimens studied.

atpF- atpH	matK	ndhF	psbK- psbI	rbcL	rpoC	rps16	trnL-F	trnQ	AG1	BRSC	ITS2	PRK	RPB2
CBA59	CBA59	CBA59	CBA59	CBA59	CBA59	CBA59	CBA59	CBA59	-	015BD	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ831221.1	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FR729727.1
CBA280	CBA280	CBA280	CBA280	CBA280	CBA280	CBA280	CBA280	CBA280	15729	019BD	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ831222.1	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ830023.1
CBA505	CBA505	CBA505	CBA505	CBA505	CBA505	CBA505	CBA505	CBA505	CBA505	-	CBA505	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ830024.1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ831223.1	-
CBA263	CBA263	CBA263	CBA263	CBA263	CBA263	CBA263	CBA293	CBA263	014BD	014BD	014BD	-	-
CBA261	CBA261	CBA261	CBA261	CBA261	CBA261	CBA261	CBA261	CBA261	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	009BD	-	009BD	-	-
CBA723	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	CBA724	CBA724	CBA724	CBA724	CBA724	CBA724	CBA724	CBA724	CBA724	CBA724	CBA724	-	-
CBA708	CBA708	CBA708	CBA708	CBA708	CBA708	CBA708	CBA708	CBA708	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	001BD	001BD	001BD	-	-
CBA650	-	-	CBA650	-	-	-	-	-	CBA650	-	-	-	-
-	CBA264	CBA264	-	CBA264	CBA264	CBA264	CBA264	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	003BD	003BD	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ831227.1	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ830028.1
CBA709	CBA709	CBA709	CBA709	CBA709	CBA709	CBA709	CBA709	CBA709	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	002BD	002BD	002BD	-	-
CBA60	CBA60	CBA60	CBA60	CBA60	CBA60	CBA60	CBA60	-	CBA60	CBA60	CBA60	-	-
CBA61	CBA61	CBA61	-	-	-	-	CBA61	CBA61	-	-	-	-	-
-	-	-	CBA711	CBA711	CBA711	CBA711	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	013BD	013BD	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ831260.1	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ830056.1
CBA72	CBA72	CBA72	CBA72	CBA72	CBA72	CBA72	CBA72	CBA72	-	-	-	-	AY543100.1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	010BD	010BD	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AF453353.1	-
-	CBA71	CBA71	-	CBA71	-	-	CBA71	-	017BD	-	-	-	-
CBA706	-	-	CBA706	-	CBA706	CBA706	-	CBA706	-	CBA706	CBA706	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ831299.1	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ830103.1
CBA45	CBA45	CBA45	CBA45	CBA45	CBA45	CBA45	CBA45	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	004BD	004BD	004BD	-	-
CBA25	CBA25	CBA25	CBA25	CBA25	CBA25	CBA25	CBA25	CBA25	CBA25	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CBA86	-	-	-
CBA390	CBA390	CBA390	CBA390	CBA390	CBA390	CBA390	CBA390	CBA390	-	-	CBA390	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ831259.1	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ830196.1
CBA291	CBA291	CBA291	CBA291	CBA291	CBA291	CBA291	CBA291	CBA291	022BD	022BD	-	-	-
CBA371	CBA371	CBA371	CBA371	CBA371	CBA371	CBA371	CBA371	CBA371	-	CBA371	CBA371	-	-
CBA64	CBA64	CBA64	CBA64	CBA64	CBA64	CBA64	CBA64	CBA64	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	38381	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ831333.1	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AJ830145.1



Table 2. Tree statistics for the maximum parsimony analyses.

	Plastid dataset (9 DNA regions)	Nuclear dataset (5 DNA regions)	Combined dataset (nuclear and plastid sequences: 14 DNA regions)
Number of characters	8546	1043	11004
Number of unchanged (constant) characters	8425	830	10592
Number of uninformative variable characters	95	123	278
Number of informative characters	26	90	134
Informative characters (%)	0.30%	8.63%	1.22%
Number of equally parsimonious trees	141	557	49
Best tree length	141	284	522
CI*	0.8794	0.8522	0.8448
HI*	0.1206	0.1478	0.1552
CI excluding uninformative characters*	0.6222	0.6875	0.6478
HI excluding uninformative characters*	0.3778	0.3125	0.3522
RI*	0.7463	0.7500	0.7178

\* index values for one randomly chosen tree

Table 3. Proportion of apomorphic and plesiomorphic characters in the MP analyses

Clade	Apomorphic characters (strict homology)		Plesiomorphic characters (homoplasy)		Total
	Plastid dataset	Nuclear dataset	Plastid dataset	Nuclear dataset	
Core Archontophoenicinae	3	10	0	6	19
<i>Actinokentia</i>	0	1	0	1	2
<i>Archontophoenix</i>	2	9	1	53	65
[ <i>Kentiopsis oliviformis</i> + [ <i>K. magnifica</i> + <i>Chambeyronia macrocarpa</i> ]]	1	2	0	4	7
[ <i>Kentiopsis magnifica</i> + <i>Chambeyronia macrocarpa</i> ]	1	0	1	0	2
[ <i>Archontophoenix alexandrae</i> + <i>A. myolensis</i> ]	0	7	3	3	13
[ <i>Archontophoenix maxima</i> + <i>A. tuckeri</i> ]	0	5	3	46	54

## Figure legends

Figure 1. Tree resulting from the Maximum Likelihood analysis of the combined plastid dataset (*rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rps16*, *rpoC*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnL-F*, and *trnQ*). Bootstrap supports are indicated above branches (first value: ML analysis, second value: MP analysis).

Figure 2. Tree resulting from the Maximum Likelihood analysis of the combined nuclear dataset (AG1, BRSC, ITS2, PRK and RPB2). ML bootstrap supports are indicated above branches.

Figure 3. Total evidence tree resulting from the Maximum Likelihood analysis of the combined plastid and nuclear datasets (*rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rps16*, *rpoC*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnL-F*, *trnQ*, AG1, BRSC, ITS2, PRK and RPB2). ML bootstrap supports are indicated above branches.

### **Supplementary material**

Figure S1. Tree resulting from the Bayesian Inference analysis of the combined plastid dataset (*rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rps16*, *rpoC*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnL-F*, and *trnQ*). BI supports are indicated above branches.

Figure S2. Tree resulting from the Maximum Parsimony analysis of the combined plastid dataset (*rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rps16*, *rpoC*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnL-F*, and *trnQ*). Bootstrap supports are indicated above branches.

Figure S3. Tree resulting from the Bayesian Inference analysis of the combined nuclear dataset (AG1, BRSC, ITS2, PRK and RPB2). BI supports are indicated above branches.

Figure S4. Tree resulting from the Maximum Parsimony analysis of the combined plastid dataset (*rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rps16*, *rpoC*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnL-F*, and *trnQ*).

Figure S5. Total evidence tree resulting from the Bayesian Inference analysis of the combined plastid and nuclear datasets (*rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rps16*, *rpoC*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnL-F*, *trnQ*, AG1, BRSC, ITS2, PRK and RPB2). BI supports are indicated above branches.

Figure S6. Tree resulting from the Maximum Parsimony analysis of the combined plastid dataset (*rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rps16*, *rpoC*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnL-F*, *trnQ*, AG1, BRSC, ITS2, PRK and RPB2). Bootstrap supports are indicated above branches.

Figure 1

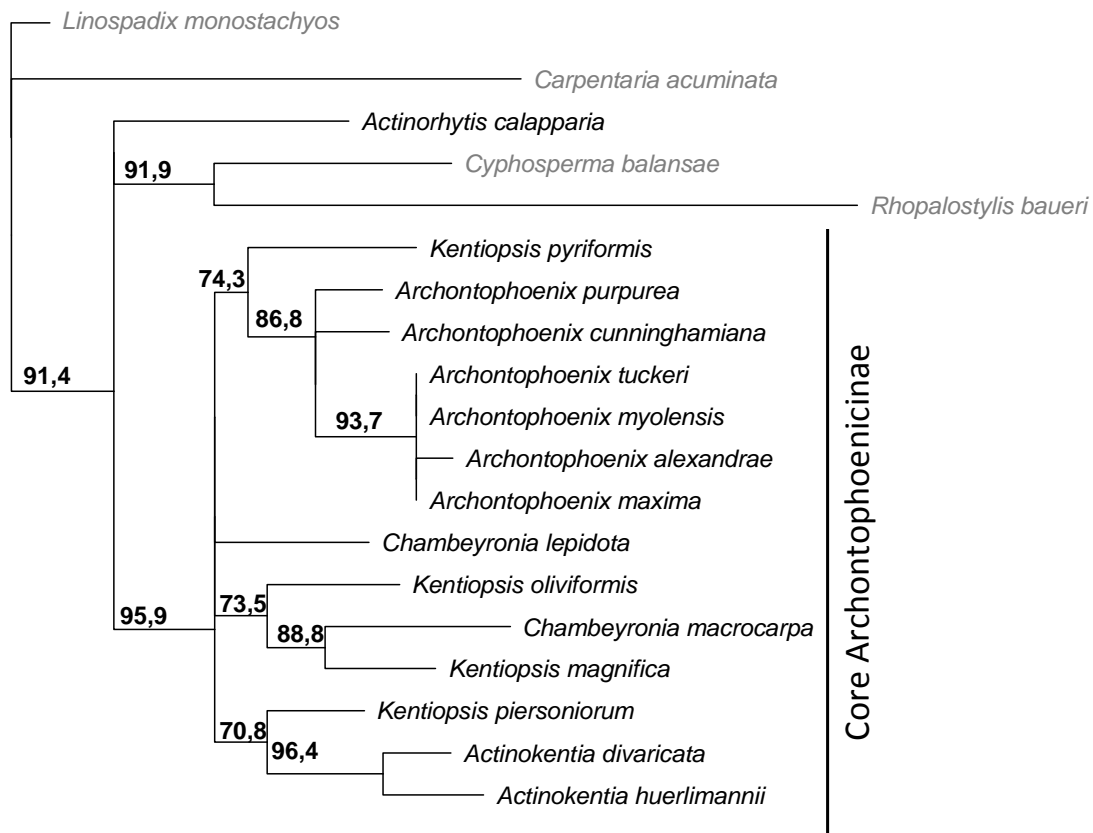


Figure 2

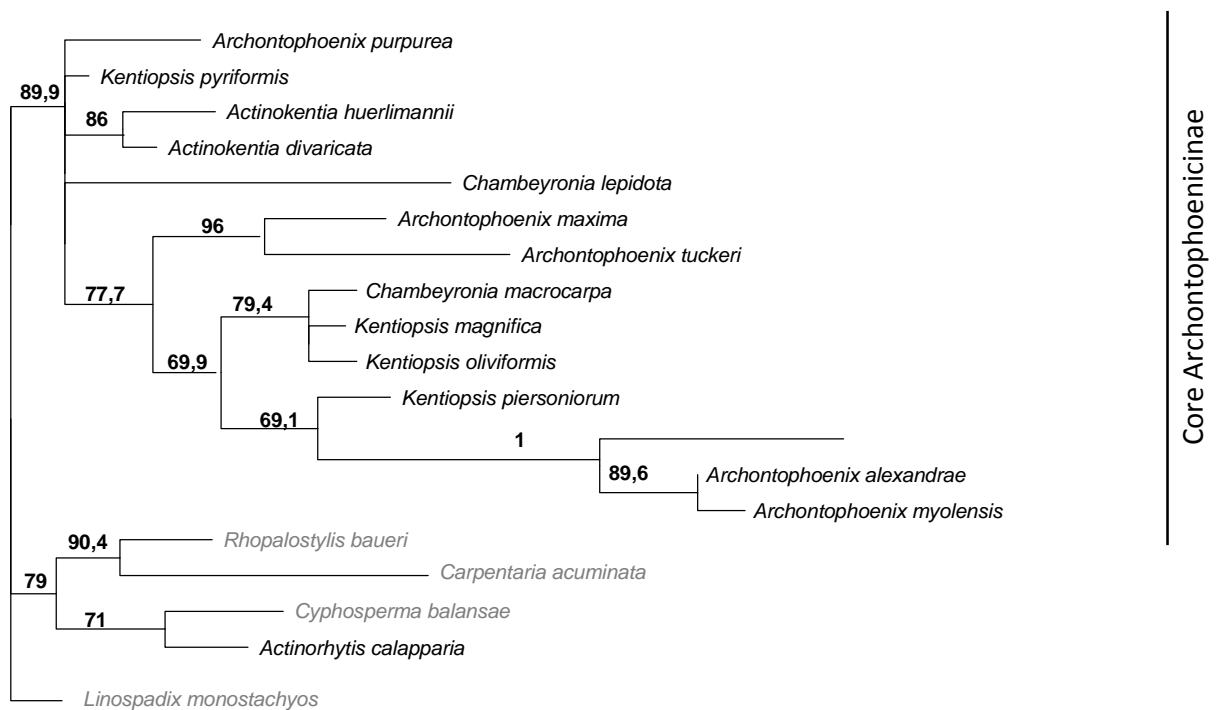


Figure 3

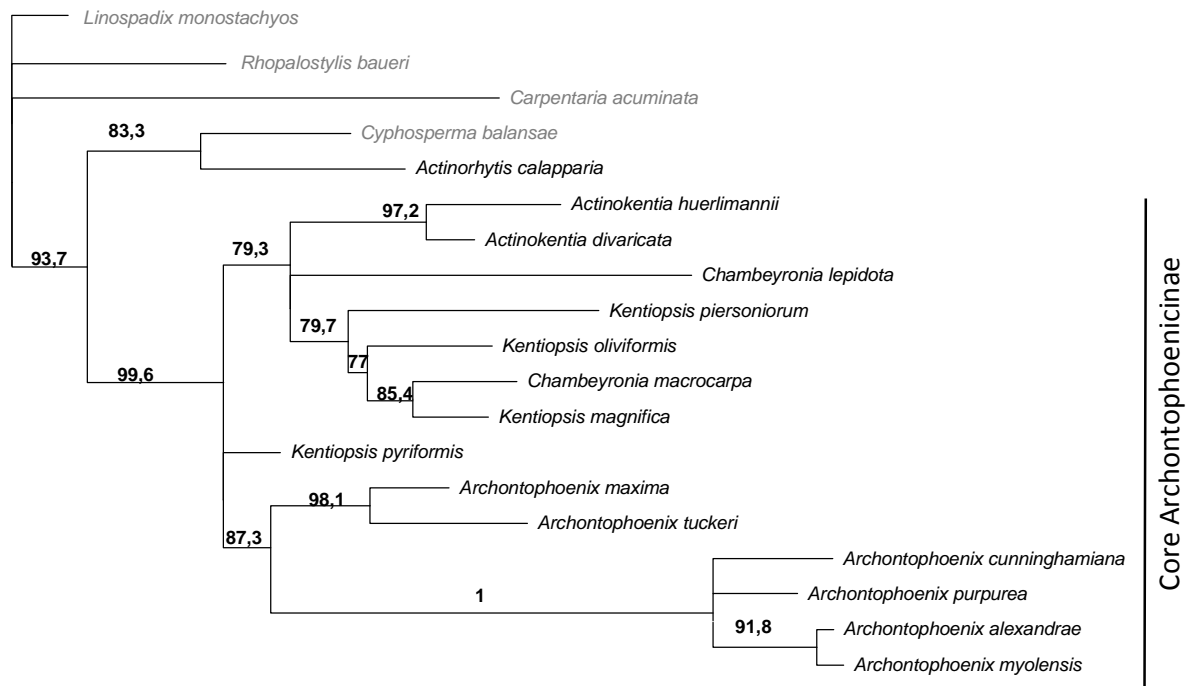


Figure 3. Total evidence tree (ML BS ML)

Figure S1

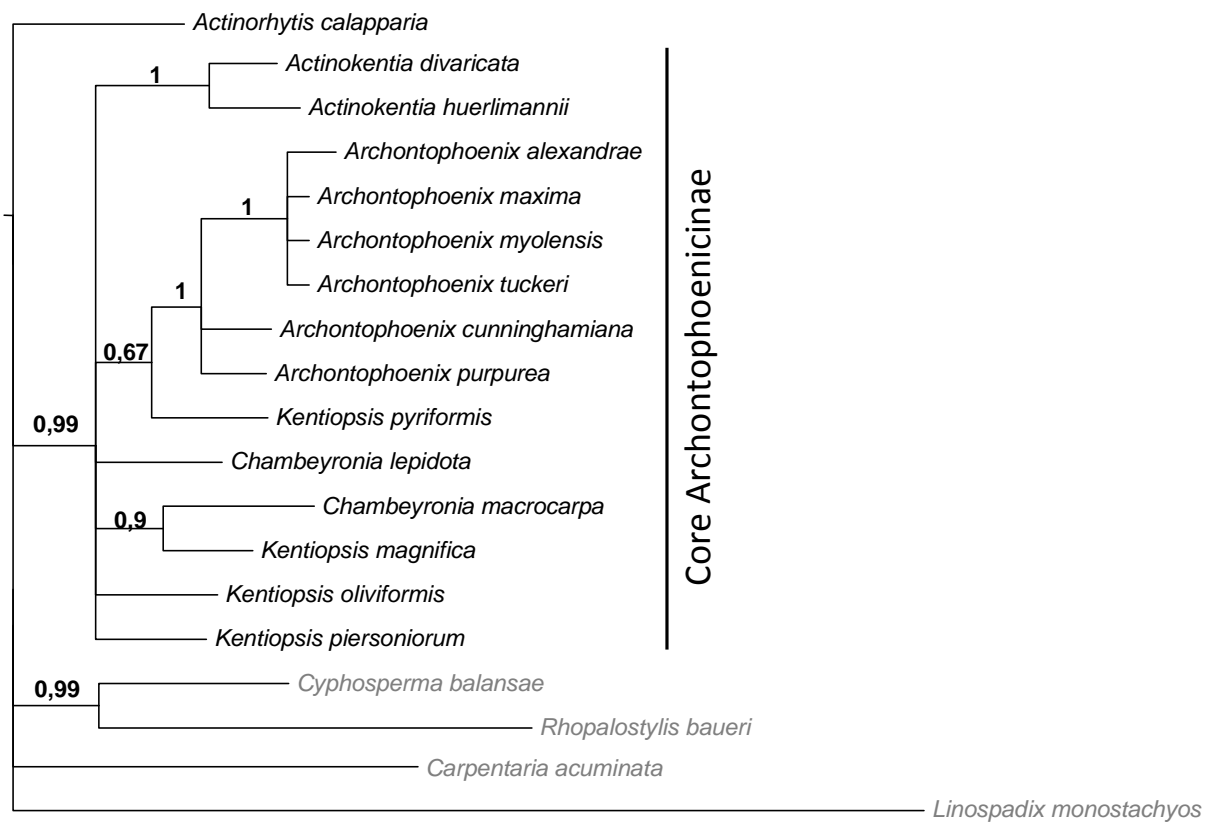


Figure S2

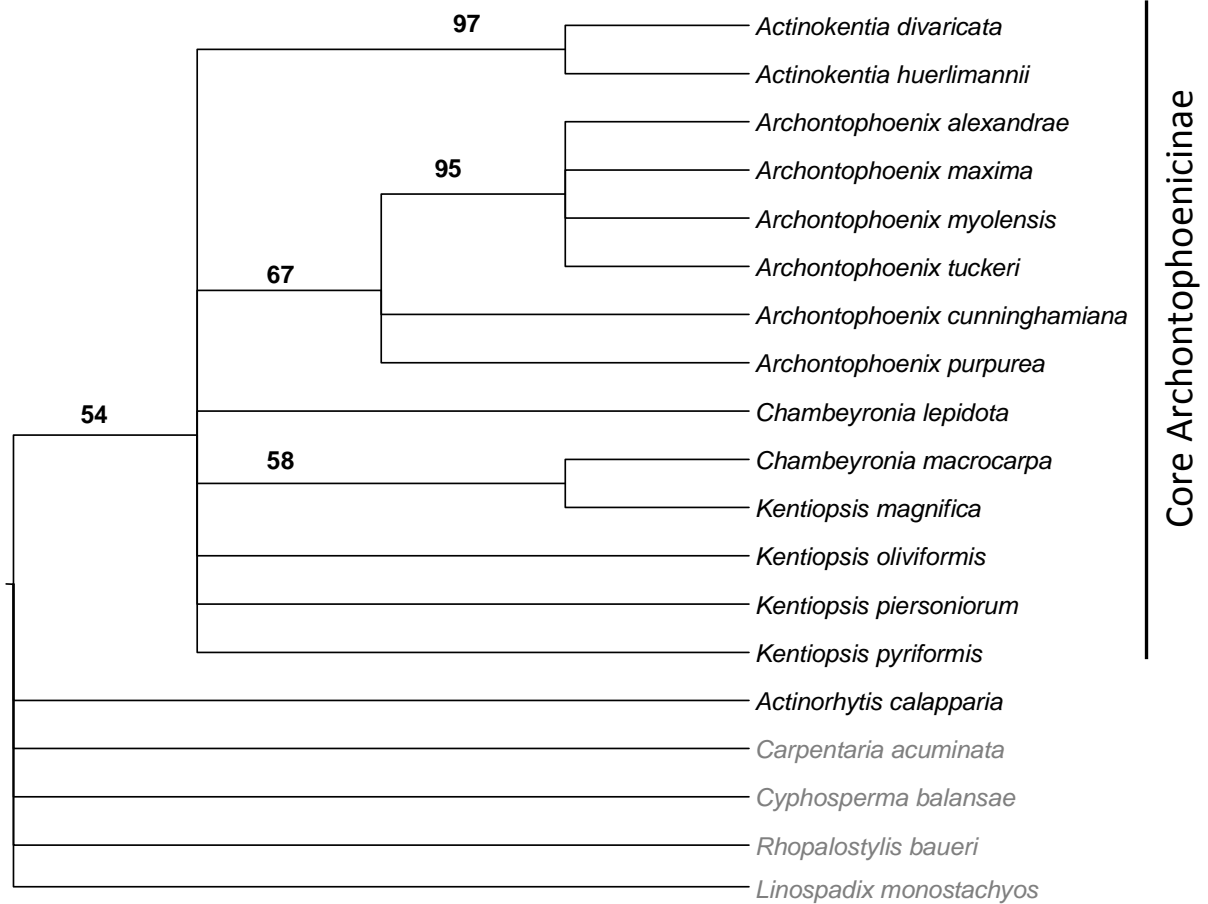


Figure S3

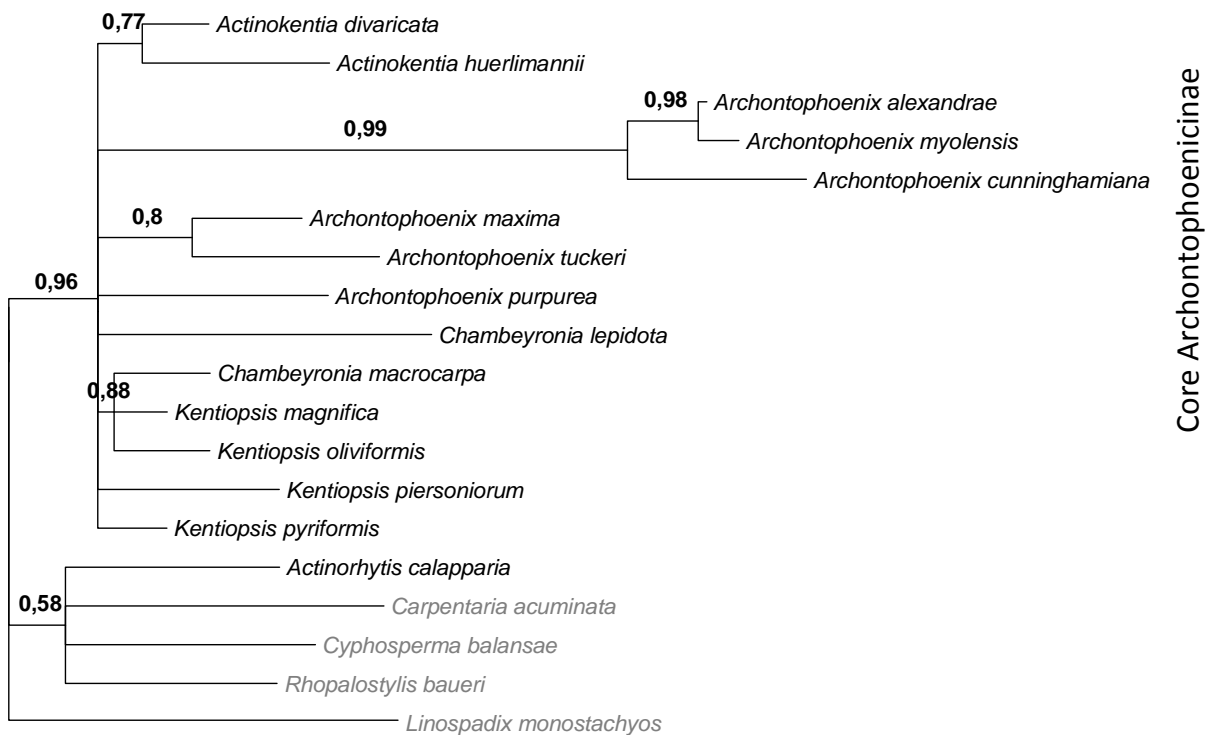


Figure S4

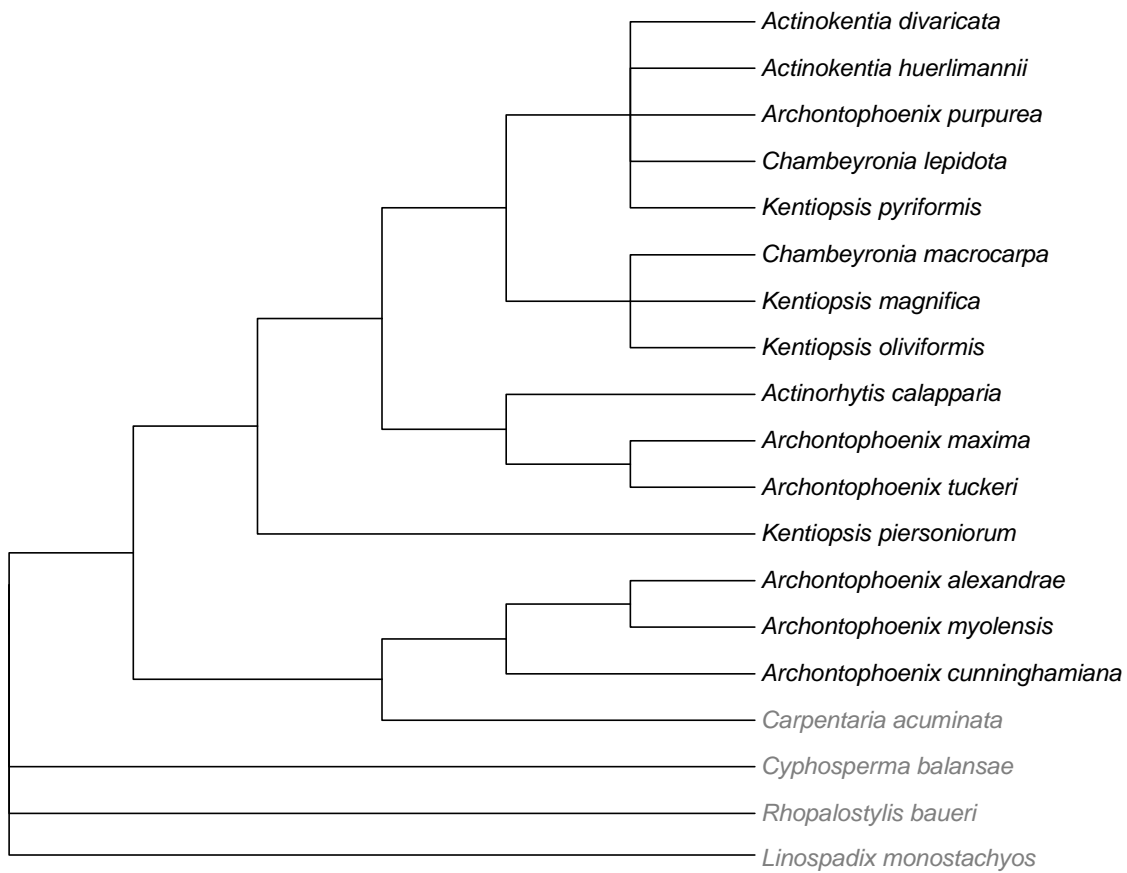
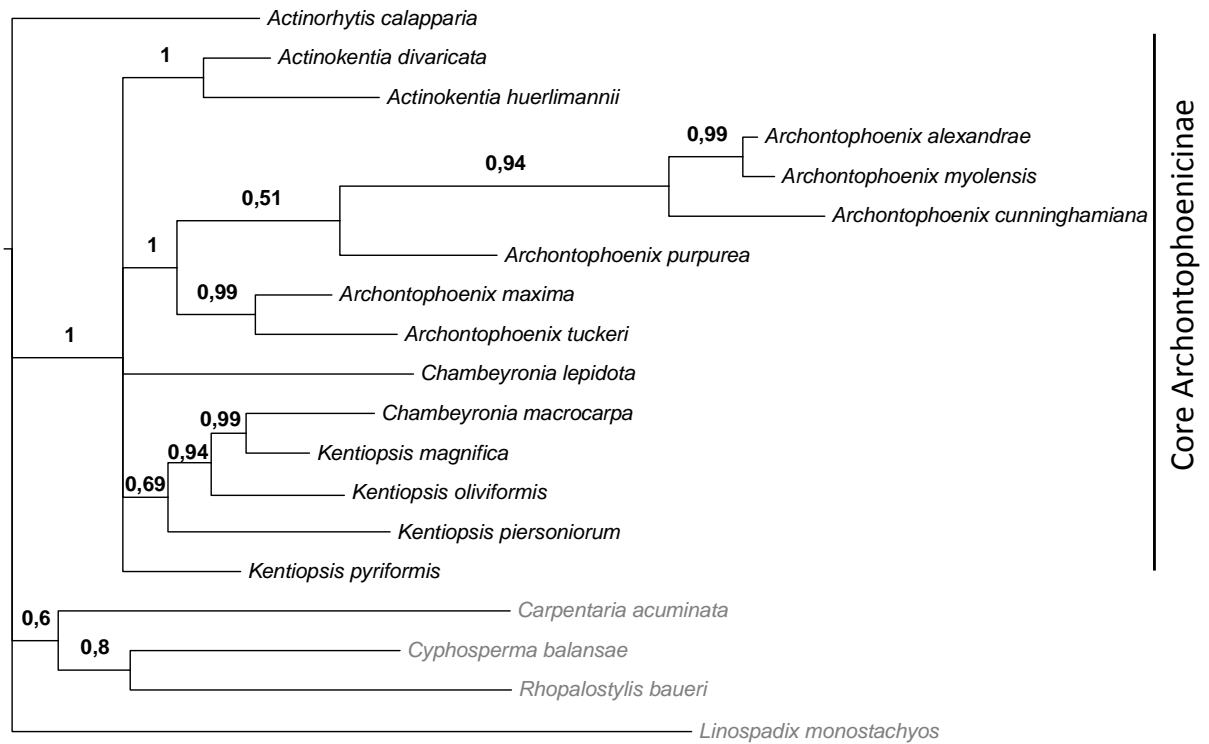


Figure S5



BI

Figure S6

