

UNIVERSITE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

présentée

pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

par

Laurent Penet

Sujet :

**Evolution de la morphologie du pollen chez les
Angiospermes : sélection naturelle et/ou contraintes
développementales?**

Soutenue le 16 décembre 2005, devant un jury composé de :

Michel DRON, Professeur
Carol FURNESS, Chargé de Recherches
Pierre-Henri GOUYON, Professeur
Michel LAURIN, Chargé de Recherches
Irène TILL-BOTTRAUD, Directeur de Recherches

Président
Rapporteur
Directeur de thèse
Examineur
Rapporteur

Evolution de la morphologie du pollen chez les Angiospermes : sélection naturelle et/ou contraintes développementales ?

Résumé de la thèse :

La sélection naturelle est considérée comme une des forces responsables de l'évolution adaptative des organismes en général, et de leur morphologie en particulier. Depuis une trentaine d'années, un débat a lieu sur la question de savoir si chaque caractéristique doit être considérée comme le résultat d'une adaptation orchestrée par la sélection naturelle. Les caractéristiques biologiques des organismes peuvent en effet n'être que le résultat de contraintes de leur développement, soit du fait de leur histoire (contraintes phylogénétiques), soit du fait de contraintes structurelles (contraintes formelles).

Afin d'étudier l'influence respective de la sélection naturelle, optimisant les phénotypes, et des contraintes développementales, limitant les phénotypes offrant prise à la sélection, nous avons choisi comme organisme modèle le grain de pollen, et nous avons centré notre étude sur le type apertural, qui est le nombre, la forme et la disposition des ouvertures (zones amincies de la paroi du grain de pollen impliquées dans la résistance à la dessiccation et dans la germination du tube pollinique). L'étude de la microsporogénèse montre que le type apertural des grains de pollen est déterminé précocément au cours de ce processus, et que des facteurs clés y exercent une influence fondamentale (type de cytokinèse, mode de formation des parois callosiques, forme des tétrades contenant les microsporocytes, et localisation des ouvertures au sein de la tétrade).

Cette thèse comporte deux parties :

- l'étude fine de la variation du développement au cours de la microsporogénèse en liaison avec le type apertural, chez les Asparagales (ordre caractérisé par la présence de plusieurs types aperturaux) ;
- l'influence de la sélection naturelle, étudiée par une analyse de paternité chez le frêne commun (*Fraxinus excelsior*), qui produit deux types aperturaux en proportions variables. L'influence de la proportion des différents types aperturaux sur le succès reproducteur a été testée.

Les résultats montrent que la microsporogénèse est variable et diversifiée chez les Asparagales. En dépit de la variation rencontrée, qui serait susceptible de permettre la formation de types aperturaux variés, le type apertural monosulqué est produit de façon majoritaire chez cet ordre. On observe de nombreuses modifications du développement qui ont pour conséquence de canaliser la microsporogénèse vers la production de cette morphologie de pollen. Ceci indique un avantage sélectif important pour ce type apertural. Une des étapes de la microsporogénèse possède une des caractéristiques d'une contrainte évolutive liée au développement : la formation des parois. Cependant, cette contrainte évolutive d'origine développementale ne semble pas affecter l'évolution du type apertural, puisqu'il existe de nombreuses voies alternatives pour produire du pollen monosulqué. Des études directes de l'avantage du type apertural monosulqué, ainsi que des conditions écologiques nécessaires aux transitions vers d'autres types aperturaux, sont nécessaires pour confirmer ces observations indirectes de l'influence de la sélection naturelle. L'analyse de paternité chez le frêne ne nous a pas permis de mettre en évidence d'influence significative du type apertural sur le succès reproducteur, pour des raisons méthodologiques (discutées dans le manuscrit).

Les résultats suggèrent un rôle relativement mineur des contraintes développementales dans l'évolution du type apertural, dans le système et à l'échelle étudiée (ordre des Asparagales). La discussion porte sur les inférences phylogénétiques permettant de conclure à l'existence de contraintes évolutives, ainsi que de l'ambiguïté intrinsèque aux définitions de ce qu'est une contrainte et de ses conséquences sur l'évolution des caractères.

Evolution of pollen morphology in Angiosperms: Natural selection and/or developmental constraints?

ABSTRACT :

Natural selection is considered as one of the main evolutionary forces responsible for adaptive evolution in organisms in general, and for their morphology in particular. Since three decades, a debate rages about whether each trait of an organism should be considered as the result of an adaptation due to natural selection. Traits of organisms can actually be the result of developmental constraints, either because of their natural history (phylogenetic constraints) or because of structural constraints (formal constraints).

In order to investigate the relative importance of natural selection, that optimizes phenotypes, and developmental constraints, that limit phenotypes available to selection, we chose pollen grains as model organisms and we centred our study on aperture type, which is defined as the number, the shape and position of apertures (thinned area on pollen grain wall that serve for desiccation resistance and pollen tube germination). Previous studies on microsporogenesis showed that aperture type is determined early during this process and that key steps do have a dramatic influence on this character (cytokinesis type, intersporal wall formation, tetrad shape, and position of apertures within tetrads). This document has two parts:

- A fine scale study of developmental variation during microsporogenesis and its link with aperture type in Asparagales (an order characterized by several different aperture types) ;
- The influence of natural selection, investigated with a paternity analysis in the common ash (*Fraxinus excelsior*), a tree that produces two main aperture types in variable proportions. The influence of pollen morphs ratio on male reproductive success was tested.

Results show that microsporogenesis is variable and diverse in Asparagales. Despite such variation that would lead to diverse aperture types monosulcate pollen is mainly produced in this order. We observe numerous modifications of development which canalize microsporogenesis into producing such pollen morphology. This implies an important selective advantage of this aperture type.

One step of microsporogenesis possesses a characteristic of evolutionary constraint linked to development: the formation of the intersporal wall. However, this developmental constraint does not affect aperture type evolution, since several alternative pathways leading to monosulcate pollen exist. Direct studies of advantages of monosulcate pollen, and of ecological conditions responsible for transition to other morphologies are needed to confirm these indirect observations of natural selection. Paternity analysis did not provide evidence for a significant influence of aperture type ratio on male reproductive success for methodological reasons (discussed in the manuscript).

Our results suggest a relatively minor role of developmental constraints in evolution of aperture type at the scale of the study (the order of Asparagales). The discussion is centred on phylogenetic inferences that permit conclusions about the existence of developmental constraints, and also on intrinsic ambiguities about how developmental constraints are defined and their consequences on evolution of traits of organisms.

Je remercie Pierre-Henri GOUYON, pour être à l'origine de ce sujet, conjointement avec Adrienne RESSAYRE pour en avoir posé les fondements indispensables, bien qu'il puisse paraître aujourd'hui bien différent de ce qu'il aurait pu être (l'essence ne précède pas inexorablement l'existence et les mêmes s'altèrent souvent au moment de leur répliation). Je remercie également Sophie NADOT et Béatrice ALBERT, mes co-encadrantes, notamment pour les relectures du manuscrit, et pour Sophie en particulier, ainsi qu'Adrienne, pour leurs connaissances pratiques et théoriques de la microsporogénèse. Mais ce travail repose aussi sur l'aide et les conseils avisés des autres membres de l'équipe « pollen » : Arlette FORCHIONI, que je remercie pour sa proximité, son enthousiasme et sa grande curiosité, ainsi que sa riche expérience en microscopie qui m'a épargné bien des tracas ; Christian RAQUIN, non seulement pour sa connaissance inestimable des recettes de cuisines biologiques de paillasse (et gastronomiques aussi au passage), son expérience immense des soucis de manip' et de leur résolution-minute, pour sa culture et son goût des bons mots d'esprit. Sans oublier Julie SANNIER, la dernière arrivée, en saluant sa bravoure pour s'attaquer à la microsporogénèse des palmiers, et en la remerciant pour les discussions sur nos observations respectives.

Je remercie par ailleurs l'ensemble du personnel du département « Evolution et Systématique », celui du reste du laboratoire, ainsi que l'ensemble des stagiaires, thésards & post-doctorants (Alexandra, Benjamin, Céline, Christian, Emmanuelle, Jérôme, Juan, Lucile, Manuela, Marie-Elise, Michael, Mickaël, Naoko, Pierre, Roxana, Sandrine, Sarah, Solenn, mais aussi Anne, Guerrick, Guillaume, Hendrick, Philippe, Pierrick, Romain, Virginie, Xavier & Yann), sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est, pour tout ce qui relève de la science (les discussions notamment, avec une mention spéciale pour Jean-Michel GUILLEON, dont les remarques sont souvent fort à propos), mais également pour ce qui se juxtapose à la pratique de la science (et la liste est bien trop longue). Il convient d'y ajouter Betty GASCARD et Monique DEBEST, pour tout ce qui a relevé de l'administration, Paola BERTOLINO, Odylle CUDELOU & Odile JONOT, pour les aides diverses à la paillasse, Odile ROBIN et Sonia YAKOVLEV, pour celles à la microscopie, et Lionel SAUNOIS pour le soin porté à mes bulbes à la serre. Je remercie aussi, pour leurs relectures et leurs conseils, pour leur soutien lors de la dernière (et néanmoins tortueuse) ligne droite : Nathalie FRASCARJA-LACOSTE, Bernard LEJEUNE, Jacqui SHYKOFF & Christine VASSILIADIS. Mes remerciements vont également à Etienne KLEIN, Tatiana GIRAUD et Aurélie GARNIER avec qui j'ai partagé le bureau au cours de ces trois années.

Je souhaite aussi remercier les collègues d'Afrique du Sud, Léanne DREYER, ainsi que ses collègues du bâtiment de botanique et d'écologie de l'université de Stellenbosch, Adam HARROWER et Graham DUNCAN du jardin botanique de Kirstenbosch, ainsi que John MANNING, du COMPTON HERBARIUM. Je remercie également les compagnons de terrain : Awot, François, Ghirmaï, M'ba, Myke, Viik.

Enfin, je remercie les membres du jury, Michel DRON, pour sa proximité avec les étudiants dans sa gestion de l'école doctorale, Irène TILL-BOTTRAUD, pour l'aide concernant l'article 2 ; Michel LAURIN, pour ses conseils divers concernant les analyses comparatives, Caroll FURNESS, pour l'intérêt qu'elle porte aux Asparagales et à l'évolution de la microsporogénèse dans ce groupe, & à nouveau Pierre-Henri, pour ses bons conseils.

Au passage, je salue avec toute la cordialité possible les amis qui m'ont accompagné le temps de cette aventure scientifique, pour leur soutien et leur présence, à savoir David, Jean-Noël, Antoine, Manu, Céline, Karl (Ia orana oe !), David, Katerina, Jean-Michel, Mathias & Honoré (Mam' zoi !), ainsi que le groupe Miss Mama et sa « musique des bois ».

Je voudrais également ici même rendre un dernier hommage à ceux qui m'ont définitivement quitté au cours de ces deux dernières années : Pierre & Françoise, mes grands-parents paternels, pour l'attention prodiguée dans mon enfance, pour chacun de ces moments généreux gravés dans ma mémoire ; Pascal, que la route a emporté trop tôt – bien trop tôt, en espérant qu'il existe quelque part un paradis « sans classes », toi qui en rêvais tant – ; Cédric, parti sans crier gare et nous laissant désemparés ; Maurice YAMEOGO, mon papa « adoptif » burkinabé, dont la lucidité clairvoyante illustrait combien rien n'est jamais complètement perdu – je me joins à mes frères et sœurs d'adoption sur leur chemin de deuil – ; Régis, que je n'aurais pas la chance de mieux connaître.

En achevant cette liste, ô combien non-exhaustive, des personnes liées directement ou indirectement à ce travail, je souhaite dédier le manuscrit à ma famille, mes parents, mes sœurs Sophie & Clotilde, et bien sûr à Carine et à notre petite Cléo.

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
<i>Evolution et développement, approche historique</i>	1
<i>Le concept de contrainte en biologie évolutive</i>	2
La critique du programme adaptationniste	2
Le concept d'exaptation	5
Les contraintes évolutives et la sélection naturelle : où en est-on 25 ans après l'affaire des spandrels de San Marco ?	8
<i>Objectifs de la thèse</i>	13
<i>Le grain de pollen : morphologie et développement</i>	14
Apertures, rôles biologiques, et définitions des types aperturaux	15
Diversité morphologique du pollen chez les Angiospermes	15
L'établissement du type apertural : aperçu développemental	17
Partie 1 : Evolution de la microsporogénèse chez les Asparagales.....	29
<i>1-1 L'ordre des Asparagales</i>	30
1-1-1 Historique de la classification et phylogénie des Asparagales	30
1-1-2 Les apports de la phylogénie moléculaire dans la classification des Asparagales	33
1-1-3 Les nouveaux enjeux de la systématique des Asparagales	34
1-1-4 Diversité du type apertural des Asparagales sur le plan systématique	37
1-1-5 Organisation de la diversité du type apertural chez les Asparagales	37
<i>1-2 Diversité de la microsporogénèse chez les Asparagales</i>	39
1-2-1 Matériel et méthodes	39
1-2-2 Résultats	39
a) ASPARAGALES SUPERIEURES	40
b) ASPARAGALES INFÉRIEURES	42
1-2-3 Discussion	46
a) Validité du modèle	46
b) Variabilité du développement au cours de la microsporogénèse	49
c) Exploration du champ des possibles et contraintes développementales	51
<i>1-3 Analyse comparative du développement du type apertural des Asparagales</i>	53
1-3-1 Méthodes d'analyse comparative	55
1-3-2 Résultats de l'analyse comparative	57
a) Quels sont les états ancestraux aux nœuds principaux de la phylogénie ?	57
Reconstruction des états ancestraux pour le type de cytokinèse	59
Reconstruction des états ancestraux pour la progression des plaques cellulaires	61
Reconstruction des états ancestraux pour le type majoritaire de tétrades	63
Etats de caractères consensuels aux différents nœuds étudiés et types aperturaux ancestraux	65
b) Y a-t-il un signal phylogénétique pour les différentes étapes du développement ?	67
c) Y a-t-il des corrélations entre les états de caractère aux différentes étapes de la microsporogénèse ?	69
<i>1-4 Discussion</i>	72
1-4-1 Evolution des caractéristiques de la microsporogénèse	72
a) Type de cytokinèse	72
b) Formation des parois	73
c) Forme des tétrades	75
d) Localisation des apertures au sein des tétrades	76
1-4-2 Contraintes développementales et sélection sur l'évolution du type apertural	78

Partie 2 : Sélection sur la morphologie du pollen.....	81
2-1 <i>Introduction</i>	81
2-1-1 Ce que nous apprennent les expériences de compétition pollinique	81
a) Y a-t-il compétition pollinique pour la fécondation ?.....	81
b) Quels sont les facteurs qui jouent dans la compétition pollinique ?.....	83
2-1-2 La sélection sur le type apertural.....	87
a) Quelle est la fréquence de l'hétéromorphisme pollinique chez les plantes à fleur ?	87
b) Quels sont les facteurs influençant l'hétéromorphisme ?	87
c) Comment explique-t-on le maintien de l'hétéromorphisme chez les plantes à fleurs ?... 89	
L'hétéromorphisme pollinique chez le genre <i>Viola</i>	89
2-2 <i>Succès reproducteur en verger et morphologie du pollen chez <i>Fraxinus excelsior</i></i>	91
2-2-1 Introduction	91
2-2-2-Matériel et méthodes	94
2-2-3 Résultats.....	102
2-3 <i>Discussion</i>	105
Synthèse et perspectives.....	109
1- <i>Les contraintes dans l'évolution</i>	109
2- <i>Le rôle de la sélection naturelle</i>	115
Bibliographie.....	121
ANNEXES.....	131
<i>ANNEXE 1</i>	131
<i>ANNEXE 2</i>	133

Introduction générale

Evolution et développement, approche historique

Bien que la science du développement (embryologie) ait précédé celle de l'évolution, à laquelle elle a d'ailleurs cédé son nom¹, ces deux aspects de la biologie devaient être appelés à s'enrichir mutuellement. Darwin, préoccupé de trouver une explication convenable à la variation dans les espèces, s'attacha à présenter l'étude du développement comme un des aspects primordiaux qui permettra de comprendre celle-ci. En témoignent ces deux citations tirées de l'origine des espèces (Darwin 1859, chapitre 13) :

« L'embryologie acquiert un grand intérêt, si nous considérons l'embryon comme un portrait plus ou moins effacé de l'ancêtre commun, à l'état de larve ou à l'état adulte, de tous les membres d'une même grande classe. »

et : « En partant de ce même principe de la descendance avec modifications, la plupart des grands faits de la Morphologie deviennent intelligibles, soit que nous considérions le même plan présenté par les organes homologues des différentes espèces d'une même classe, quelles que soient, d'ailleurs, leurs fonctions ; soit que nous les considérions dans les organes homologues d'un même individu, animal ou végétal. Partant du principe de variation mineures successives, (...) nous pouvons comprendre les grands principes directeurs de l'Embryologie, c'est à dire la ressemblance des parties homologues d'un embryon qui, lorsqu'elle seront développées, différeront grandement les unes des autres dans leur nature et leur fonction, ainsi que la ressemblance de classes de parties et d'organes homologues dans des espèces différentes, bien que servant chez les adultes des objectifs aussi différents que possible. »

L'étude du développement sera donc considérée comme un des moyens de comprendre l'évolution des structures biologiques. L'embryologie connaîtra effectivement son heure de gloire avec les diagrammes d'Haeckel et l'idée que « l'ontogénèse récapitule la phylogénèse ». Cependant, l'irruption de la génétique mendélienne changera la donne et orientera les débats à propos des forces de l'évolution sur la question de l'hérédité et du rôle évolutif des mutations, reléguant l'étude de l'embryologie et du développement au second plan.

Le développement des techniques de biologie moléculaire à partir des années 1970 et la généralisation de leur utilisation, permettant l'identification des gènes régulateurs du

¹ Evolution est un mot qui a d'abord servi à définir les changements d'ordre développementaux de l'individu au cours de sa vie (signification en usage au cours du XVIIIème siècle). Darwin se référait à « l'évolution » en tant que « descendance avec modification » ou transmutationisme (par opposition au fixisme). Ce n'est que sous l'impulsion de Herbert Spencer et Thomas Huxley à la fin du XIXème siècle que le sens du terme évolution a évolué pour désigner le changement des espèces au cours du temps.

développement et de l'organisation des organismes va replacer l'embryologie en position centrale, en la renouvelant et en l'instaurant comme discipline nouvelle, baptisée "évo-dévo".

Ce champ scientifique émergent permet de soulever des questions nouvelles, notamment celles d'un possible biais dans la production des phénotypes, lié au développement lui-même.

Le concept de contrainte en biologie évolutive

Les rôles de l'adaptation et de la sélection naturelle ne sont plus aujourd'hui considérés comme aussi prépondérants qu'ils l'étaient immédiatement après le ralliement à la théorie synthétique de l'évolution. Il est aujourd'hui reconnu que la sélection naturelle ne peut pas conduire à l'optimisation idéale dans toutes les situations et qu'il existe des contraintes dans l'évolution. Les contraintes développementales font notamment partie des objections à une adaptation parfaite orchestrée par la sélection et sont encore l'objet d'un débat en biologie évolutive. Nous allons détailler dans cette introduction la genèse du concept de contrainte.

La critique du programme adaptationniste...

L'idée que des contraintes interviennent dans l'évolution peut être attribuée à Gould et Lewontin (1979), avec leur critique du « programme adaptationniste ». Selon eux, la tendance à ne considérer que des hypothèses adaptatives pour expliquer les phénomènes du vivant conduisait la communauté des évolutionnistes à ignorer d'autres phénomènes, comme la dérive génétique, les relations d'allométrie entre les parties des organismes, l'intégration d'un '*Bauplan*' contraint par l'héritage phylétique de l'espèce et sa trajectoire ontogénique. Autant de facteurs délaissés au profit d'une vision idéaliste de la sélection naturelle supposée aboutir librement à des adaptations parfaites. Leur message s'appuyait essentiellement sur l'utilisation métaphorique des spandrels (= pendentifs) de la cathédrale de San Marco à Venise (figure 1) : si ces derniers sont au nombre de quatre, ce n'est pas spécifiquement pour accueillir les ornements qu'ils abritent mais parce que construire un dôme sur des arches arrondies impose l'utilisation de pendentifs. Les pendentifs résultent donc d'une contrainte architecturale et leur intérêt ornemental n'est que secondaire. Cette métaphore devait illustrer le risque de n'envisager que des scénarios adaptatifs pour expliquer la diversité du vivant.



Figure 1 : Détail d'un des pendentifs (spandrel) de la cathédrale de San Marco (tiré de Gould et Lewontin 1979).

Gould et Lewontin opposaient donc au panglossianisme² du programme adaptatif, le spandrelisme des contraintes biologiques. Leur critique du programme adaptationniste peut se résumer à un certain nombre d'objections :

- l'opposition marquée au réductionnisme. L'adoption d'une démarche holiste (en étudiant les organismes et leurs interactions avec leur environnement comme un tout indivisible) relève pour eux de la nécessité : les individus ne sauraient se réduire à un de leurs traits indépendamment des autres. Ils doivent être pris comme un tout indivisible. Cette position fait l'objet d'un débat récurrent en biologie et ne sera pas abordée ici.

- l'adaptationnisme se résume à raconter des « histoires » sans fondement solide et se suffit à lui-même. Si un scénario adaptatif est rejeté, un autre prend le relais, et comme « l'étendue des histoires adaptatives est aussi grande que nos esprits sont fertiles », il n'y a aucune limite au renouvellement des scénarios. Gould et Lewontin (1979) accusaient leurs collègues non seulement d'avoir une imagination foisonnante, mais également de ne pas faire leur travail, quand ils écrivaient : « Souvent, les évolutionnistes utilisent la cohérence avec la

² En référence au Docteur Pangloss, un personnage de « Candide ». Dans ce livre, Voltaire satirise la théorie probablement trop optimiste du philosophe Leibnitz, qui laisse supposer que *tout est au mieux dans le meilleur des mondes possibles*. Le Dr Pangloss, « qui enseignait la *métaphysico-théologo-cosmolonigologie* », prétendait que « le nez semble de toute évidence fait pour porter des lunettes, aussi avons-nous des lunettes ». Le programme adaptationniste critiqué par Gould et Lewontin (1979) repose sur une vision panglossienne de l'adaptation.

sélection naturelle comme seul critère et considèrent leur travail fini quand ils concoctent une histoire plausible. La clé de la recherche historique réside dans l'élaboration d'un critère d'identification des explications correctes parmi une collection substantielle de chemins possibles, pour n'importe quel résultat moderne ». Ils posaient crûment le problème de la sélection naturelle optimisant les adaptations comme seule hypothèse de travail, et les risques encourus à oublier les autres aspects pouvant intervenir dans l'évolution des caractéristiques des organismes pour expliquer la diversité du vivant.

- selon eux, un ensemble d'alternatives ne sont pas considérées par l'adaptationnisme. On peut notamment lister ces cas selon les catégories ci-dessous (Gould et Lewontin 1979) :

- ni sélection ni adaptation (par simple dérive génétique, des mutations défavorables peuvent être fixées en dépit de la sélection naturelle, ou au contraire des mutations favorables peuvent être perdues par dérive)

- ni adaptation ni sélection sur le caractère considéré, mais la morphologie est la simple conséquence d'une sélection sur un autre caractère (cas d'allométrie ou encore de pléiotropie)

- découplage entre sélection et adaptation (tout ce qui est sélectionné n'est pas forcément adaptatif)

- adaptation et sélection, mais pas de base sélective pour expliquer le choix entre adaptations similaires : cette situation se produit si un même type d'adaptation peut s'obtenir en suivant des voies différentes (par convergence), comme c'est le cas, par exemple, pour la morphologie de la coquille chez les escargots du genre *Cerion*

- adaptation et sélection, mais l'adaptation en question est secondaire (postérieure) vis-à-vis de l'origine de la structure : Gould et Vrba (1982) reprendront cette distinction sous le terme d'exaptation (concept développé plus en détail ci-après)

L'argumentation de Gould et Lewontin (1979) s'articule autour d'arguments à la limite d'une caricature plutôt grossière de l'adaptationnisme. Ceci eut pour effet de provoquer de vives réactions en retour, et continue aujourd'hui encore à faire couler de l'encre (parfois jusque dans des détails du jargon architectural, par exemple : Houston 1997). L'impact du débat soulevé reste encore à évaluer, mais il est certain qu'il a contribué à revoir l'idée d'une prépondérance de la sélection et de l'adaptation dans l'évolution.

Le concept d'exaptation

C'est dans la lignée de cette intervention sur les spandrels de San Marco que Gould et Vrba (1982) proposèrent un nouveau terme qui, selon eux, manquait à la science de la morphologie : l'**exaptation**. Ces auteurs reprennent l'idée que la sélection qui s'exerce sur une structure et la maintient en vue d'une « utilité » actuelle n'est pas toujours celle qui explique son apparition originelle. Gould et Vrba (1982) se livrent dans leur article à un exercice de sémantique et de terminologie sur la base d'un point qui semble avoir échappé à tout le monde à cette époque, le rôle passé et le rôle présent de la sélection pour les caractéristiques des organismes, qui peuvent être tout à fait différents.

L'attachement de Stephen J. Gould aux aspects historiques et contingents de la vie est très marqué. Pour lui, cet aspect semble occulté dans le raisonnement des biologistes après la synthèse néo-darwinienne. Ceci provient du fait que la tradition (néo-)darwinienne repose beaucoup sur le fonctionnalisme (figure 2), attribuant aux caractéristiques biologiques une utilité immédiate, tandis que les visions alternatives suggèrent une origine différente (Gould 1989). Le **formalisme** n'interprète les propriétés des organismes que comme les conséquences physiques de leur structure matérielle immédiate, tandis que l'**historicisme** voit dans la forme et le degré de relation une connexion liée à la filiation. L'idée reprise par Stephen J. Gould de façon récurrente repose sur le fait que la tendance purement fonctionnaliste du darwinisme (caricaturée par le fameux « programme adaptationniste ») a montré d'évidentes limites et se montre inadéquate comme explication des patterns développementaux ou macro-évolutifs.

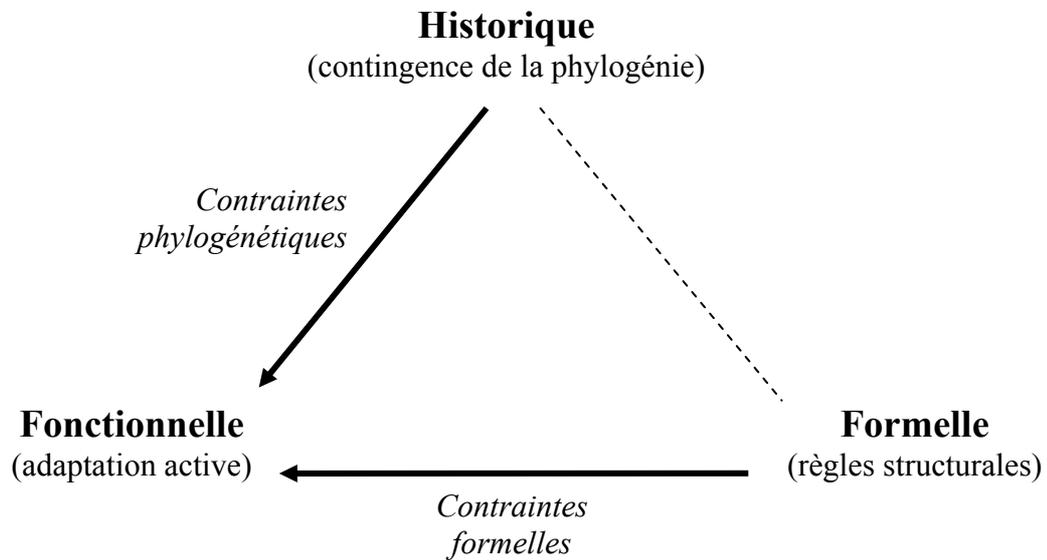


Figure 2 : Les trois grandes visions sur les sources des propriétés des organismes (d'après Gould, 1989). Selon Stephen J. Gould, la dérive moderne du darwinisme consiste à ne raisonner qu'en terme fonctionnel (utilité immédiate des adaptations), ce qui écarte d'autres explications possibles pour l'existence des structures biologiques, qui peuvent prendre leur origine directement dans leur nature (contraintes formelles, ou structurales, telles les spandrels), ou dans leur histoire (elles sont héritées d'un ancêtre commun).

L'exaptation n'est pas forcément une contrainte, mais est un exemple de l'importance de l'histoire évolutive de la vie des taxons. Le tableau 1, repris de Gould et Vrba (1982), résume la différence faite par ces auteurs entre le rôle passé et présent de la sélection. L'argumentation de cet article repose entièrement sur le fait que cette distinction entre les rôles passés et présents de la sélection sur une structure biologique est fondamentale pour comprendre la sélection et l'adaptation au travers de l'histoire naturelle. Historiquement, le problème est soulevé dès la publication de « L'origine des espèces » (Darwin 1859) de la part de réfractaires à la théorie de l'évolution au moyen de la sélection naturelle. Cette objection est notamment connue comme le dilemme des « étapes de la naissance des structures utiles » (« the incipient stages of useful structures »), critique initiée avec l'exemple des ailes par Mivart en 1871. La réponse darwinienne repose sur l'idée que l'avantage des ailes 'primitives' ne résidait probablement pas dans l'aptitude au vol mais dans une meilleure isolation thermique apportée par les plumes, puis dans un avantage des proto-ailes pour attraper des insectes (consulter Gould, 1980, pour une discussion de ces hypothèses). Le vol n'est donc qu'un usage dérivé des ailes, même si intuitivement l'utilisation actuelle des ailes repose sur l'adaptation au vol.

La distinction entre rôles passés et présents des structures biologiques peut paraître pertinente dans ce cadre historique, mais le concept d'exaptation est-il pour autant réellement pertinent ?

Processus sélectif	Caractère		Utilité
La sélection naturelle modifie le caractère pour un usage actuel – <i>adaptation</i>	« aptation »	adaptation	la sélection agit sur la fonction
Un caractère, auparavant sélectionné pour une fonction particulière (<i>adaptation</i>) est retenu pour un nouvel usage – <i>cooptation</i>		exaptation	la sélection agit sur l'effet
Un caractère, dont l'origine ne peut pas être attribué à l'action directe de la sélection naturelle (<i>non-adaptation</i>) est retenu pour l'usage actuel – <i>cooptation</i>			

Tableau 1 : sémantique introduite par Gould et Vrba (1982) pour distinguer les aspects historiques de l'adaptation.

Le tableau 1 dresse une dichotomie ambiguë entre la fonction et l'effet. Qu'est-ce qui distingue l'adaptation directe (première ligne du tableau) de la non-adaptation cooptée (troisième ligne) ? Ce que l'on sait de l'évolution tend à montrer que toute adaptation ne serait finalement qu'une exaptation. L'idée, chère à Jacob (1981), d'un « bricolage évolutif » consistant à faire « du neuf avec du vieux », semble être une règle générale apparente. C'est probablement la raison pour laquelle le terme est finalement assez peu utilisé dans la littérature, malgré une défense assidue (Gould 1997). L'avantage sémantique qui résout l'ambiguïté des termes précédents pour ce concept, comme la « pré-adaptation », discuté par Gould, 1982, ou Ganfornina et Sanchez (1999) s'acquiert au détriment du concept d'adaptation, qui reste toujours une idée valide aussi bien qu'intuitive. L'utilité réelle du concept d'exaptation est donc probablement réduite.

L'intervention de Gould et Lewontin (1979) a le mérite d'avoir soulevé un débat sur les contraintes, notamment développementales, et leur rôle dans l'évolution. En dehors de la réénumération de facteurs qui jouent un rôle parfois non négligeable dans l'histoire évolutive (inertie phylogénétique³, dérive, découplage entre adaptation et sélection, etc.), qu'en est-il vraiment du débat sur les contraintes aujourd'hui ?

³ Désigne le fait que les espèces retiennent des caractéristiques héritées des espèces ancestrales dont elles sont issues (voir introduction sur les analyses comparatives).

Les contraintes évolutives et la sélection naturelle : où en est-on 25 ans après l'affaire des spandrels de San Marco ?

Depuis cette critique féroce de l'adaptationnisme, un des effets immédiats et encore perceptible consiste en une profusion de références aux contraintes : les contraintes du développement, et leur rôle évolutif font maintenant régulièrement l'objet de publications. Si cela témoigne bien que la réalité des contraintes est aujourd'hui acceptée, il semble que la terminologie employée reste assez vague (Pigliucci et Kaplan 2000). Comme l'ont également souligné Antonovics et van Tienderen (1991), le terme de contrainte est appliqué à des niveaux et des phénomènes largement différents (physiques, physiologiques, écologiques, phylogénétiques, développementaux, etc.), encourageant la confusion conceptuelle autour de l'idée même de contrainte. La multiplication des références aux contraintes n'apporte pas la clarification souhaitée même si des efforts de catégorisation ont été entrepris (Maynard-Smith et al. 1985 ; Resnik 1995) ; en particulier, Gould (1989) s'est lui-même opposé à l'utilisation du mot « contrainte » pour désigner la restriction des phénotypes possibles liée à l'orientation dans une voie évolutive plutôt qu'une autre. Les contraintes restent pour lui à définir comme « les sources [des] changements, ou [les] restrictions au changement, qui *ne* se produisent *pas* par l'action de causes postulées au sein d'une théorie favorisée ». Il s'agit bien, pour lui, même s'il ne le formule pas explicitement, de recadrer le débat sur les contraintes dans les limites de la sélection naturelle et de l'adaptation. D'autre part, la référence à la « théorie favorisée » est effectivement le point clé pour résoudre les confusions sémantiques entre sélection et contrainte. Conclure à l'existence d'une contrainte suppose de définir l'hypothèse nulle d'évolution appropriée, celle-ci pouvant être aussi bien la neutralité/dérive que la sélection (stabilisante par exemple). L'hypothèse nulle de neutralité de l'évolution du caractère (discutée par Antonovics et van Tienderen 1991, ou Pigliucci et Kaplan 2000) peut cependant mener à ranger la sélection naturelle dans la catégorie des contraintes...

De plus, si l'erreur du 'Panglossianisme' existe, il convient également d'éviter celle du 'Spandrelisme', qui consiste à croire que tout est contrainte. Il semble que Gould (1989), au travers de l'étude du genre d'escargots terrestres *Cerion*, ait commis cet excès⁴ (Stone 1996 ; rapporté dans Pigliucci et Kaplan 2000).

⁴ Il semble en effet qu'un « mauvais sort » ait rattrapé les critiques du programme adaptationniste, et qu'à l'heure actuelle, le paradigme panglossien ait simplement été changé en paradigme spandreliste, l'évocation des contraintes se suffisant en elle-même, arrimée à l'élaboration de scénarios « imaginaires » à peine plus ancrés que les anciens mythes adaptationnistes. Cela devait-il être présagé par le fait que Gould, dans sa défense récurrente des exaptations, développe strictement les mêmes exemples dans ses articles en 1982 et en 1997 ?

Les contraintes développementales prennent souvent la forme de concepts variables selon les auteurs et les périodes. En voici quelques autres exemples :

Tableau périodique des morphologies (Vavilov 1922)
Potentiel de variation (Spurway 1949)
Morphologies discrètes liées (Alberch 1982)
Canaux des changements possibles (Gould 1989)
Degrés de liberté développementaux (Weber 1992)
Tendances à la variation (van Dassow et Munro 1999)
Trajectoires développementales (Arthur 2001)

Le rôle des contraintes évolutives a donc été largement débattu, malgré l'absence de définition précise et en reflétant divers phénomènes biologiques selon la sensibilité des auteurs (voir ci-dessus). Nous donnons ci-dessous une des rares à être explicitement postulée (Maynard-Smith et al. 1985) :

« Les contraintes développementales peuvent se définir comme un biais dans la production de phénotypes variants, ou une limitation de la variabilité phénotypique, causée par la structure, le caractère, la composition ou la dynamique du système développemental ».

Ces auteurs définissent aussi deux classes de contraintes aisément identifiables :

- les **contraintes universelles**, qui touchent l'ensemble du vivant,
- les **contraintes locales**, qui sont caractéristiques d'un taxon ou d'un groupe de taxons.

Stephen J. Gould (1989) reconnaît l'importance de ces catégories, bien qu'il les nomme respectivement 'contraintes formelles' et 'contraintes historiques' (phylogénétiques), mais les considère comme intimement liées (figure 2). Alors que Stephen J. Gould s'attache surtout à dresser un plaidoyer pour le concept de contraintes (historiques et développementales), l'approche de Maynard-Smith et al. (1985) tend à clarifier les origines possibles des contraintes évolutives, ainsi que des pistes méthodologiques pour en estimer l'importance. Selon ces auteurs, les contraintes locales sont les plus susceptibles de nous renseigner sur l'évolution : comprendre pourquoi les contraintes existent et comment elles sont contournées dans certains taxons sans l'être chez d'autres peut nous informer sur la nature des contraintes et du processus évolutif.

D'autre part, ces distinctions (contrainte locale ou universelle, historique ou ahistorique), ne sont pas les seules à figurer dans le débat sur les contraintes. Une fois la distinction entre contraintes spécifiques (historiques et/ou locales) et externes (formelles et/ou universelles) définie, la discussion s'est centrée autour des contraintes les plus controversées, c'est-à-dire locales. Ces contraintes, qui ne résultent que des propriétés intrinsèques de la construction des organismes, ne prennent leur signification que sous une perspective

développementale : la complexité de l'élaboration du phénotype, et les contraintes qui pèsent sur sa réalisation, ne peuvent être comprises sans la connaissance du développement lui donnant naissance. La science du développement est donc un champ d'expression idéal pour les deux approches qui ne sont pas centrales au néo-darwinisme : l'approche formaliste et l'approche historique des structures des organismes (Gould 1989). L'approche formaliste semble aujourd'hui très minoritaire en biologie, et compte très peu d'adhérents. Goodwin (1982) apparaît comme l'un de ses derniers partisans, en soulignant le fait qu'aucune théorie biologique ne se propose de déterminer les « lois générales » qui déterminent la construction des organismes au travers du développement.

Le débat sur les contraintes développementales a pris encore une autre tournure avec l'irruption d'une distinction supplémentaire, celle d'un rôle *passif* ou *actif* du développement en tant que force évolutive (Resnik, 1995). Aujourd'hui encore, certains biologistes voient dans le développement plus qu'un simple filtre passif limitant les phénotypes accessibles à la sélection naturelle (Yampolski et Stolfus 2001), mais bel et bien un moteur du changement évolutif (Arthur 2001 ; Arthur 2002). Cette conception, qui n'hésite pas à se positionner aux frontières du paradigme darwinien (Arthur 2000), en déniait parfois presque tout rôle à la sélection naturelle, a été adoptée notamment par bon nombre de non-biologistes (bien souvent des philosophes, et très souvent dans le cadre d'une opposition véhémente au réductionnisme génétique, pour exemple, consulter Robert et al. 2001).

Nous reprenons dans le tableau 2 la classification des formes que peuvent prendre les contraintes d'après Maynard Smith et al. (1985), et nous dressons ensuite quelques exemples (non-exhaustifs) repris de la littérature au sujet des contraintes. Selon la méthode d'étude utilisée, les contraintes ne semblent pas difficiles à identifier localement dans différents groupes d'organismes, mais une partie d'entre elles sont cependant des contraintes liées à la compétition sur l'allocation de ressources (colonnes « mesure de la sélection » ou « mesure de l'héritabilité » du tableau 2). De ce fait, l'évolution peut être contrainte par ces conflits d'allocation s'ils sont inévitables, mais elle n'est pas contrainte en ce sens qu'elle peut opérer librement sur les gènes qui affectent ces allocations (Antonovics et van Tienderen 1991). En revanche, les études qui se placent sur une échelle plus grande (analyses comparatives ou distribution des formes dans le morphospace⁵) tendent apparemment plus facilement à conclure à l'existence de contraintes. Il existe donc peut être un problème d'échelle évolutive dans ce débat.

⁵ Un morphospace est un espace, le plus souvent mathématique, décrivant les morphologies par des paramètres mesurables sur les objets d'étude. Ils permettent de mettre en évidence les espaces occupés par les formes naturelles, ainsi que ceux laissés vacants (qu'ils soient impossibles à occuper, biologiquement parlant, ou plus simplement encore non-explorés par le vivant) Les études sur l'allométrie entre deux caractères sont un exemple de morphospace à deux dimensions. On peut également considérer le modèle de développement dont qui sera présenté dans la deuxième partie comme un morphospace.

Quand bien même Stephen J. Gould a prétendu le contraire, les contraintes restent des produits de la sélection naturelle : dans le cas d'un compromis pour l'allocation de ressources, même si un caractère ne résulte pas d'une optimisation directe, son phénotype est influencé indirectement par la sélection pour le caractère primant. Les contraintes peuvent donc l'être en tant que structures dérivées. Pour être informatives sur l'évolution, les contraintes ne doivent pas être simplement postulées mais replacées dans le contexte qui les a fait émerger en tant que contraintes : il est donc nécessaire de se demander de quels processus sélectifs elles sont la conséquence. On retiendra de l'intervention de Gould et Lewontin (1979) que chaque caractéristique d'un organisme n'est pas seulement le produit direct de la sélection, et de celle de Gould et Vrba (1982) que ces caractéristiques n'ont pas obligatoirement évolué sous l'influence de la sélection pour leurs avantages actuels.

Caractéristique de la contrainte	Type de contrainte	Méthodes d'étude des contraintes			
		distribution dans le morphospace	analyse comparative	mesure directe de la sélection	mesure de l'héritabilité
Phénotypes alternatifs inaccessibles quel que soit le mécanisme	universelle	<p>(+) Les patterns de phyllotaxie des feuilles ou des primordia suivent une suite de Fibonacci, probablement liée à une contrainte d'encombrement stérique impliquée dans la morphogénèse végétale, aucune autre possibilité n'est observée (Maynard-Smith et al. 1985)</p>			
Phénotypes alternatifs accessibles ou non pour un mécanisme de développement donné	locale	<p>(+) Contraintes développementales, escargots du genre <i>Cerion</i> (Gould, 1989)</p> <p>(-) Etude contredite par Stone (1996)</p> <p>(+) Evolution du nombre de segments chez les Centipèdes (Arthur and Farrow 1999)</p>	<p>(+) Inertie phylogénétique, <i>Tithonia</i> (Asteraceae) (Morales 2000)</p> <p>(+) Développement larvaire des oursins (Nielsen et al. 2003)</p>	<p>(+/-) Contrainte développementale (à la mue imaginale) d'un caractère soumis à sélections sexuelle et naturelle opposées, chez <i>Gerris odontogaster</i> (Arnqvist 1994)</p>	
Phénotypes alternatifs accessibles ou non pour des raisons sélectives	locale	<p>(-) Les crises d'extinctions sont suivies d'une augmentation de la disparité morphologique; la compétition écologique prime sur les contraintes ontogéniques (Ciampaglio 2002 ; Ciampaglio 2004)</p>	<p>(-) Lobes abdominaux mobiles (Sepsidae, Diptera), sélection sexuelle (Eberhard 2001)</p> <p>(+/-) La mobilité des lobes est une innovation contournant une contrainte ancestrale (Wagner et Müller 2002)</p>	<p>(+/-) Survie aux intempéries chez <i>Euschistus variolarius</i> (Hemiptera) ou <i>Passer domesticus</i> (Avies) (Lande et Arnold 1983 ; Crespi et Bookstein 1989)</p>	<p>(+/-) Compensations des allocations de ressources entre système végétatif et système reproducteur (amélioration des cultures céréalières)</p>
Contraintes dues à un phénomène de canalisation ===== (ou d'allométrie)	locale	<p>(+/-) Variations temporelles du développement du crâne du rat <i>S. fulviventer</i> (Zelditch et al. 1993)</p> <p>(+) Compétition entre parties du corps chez les insectes (Nijhout et Emlen 1998)</p>	<p>(+) Nombre de doigts et phalanges chez les tortues terrestres (Crumly et Sanchez-Villagra 2004)</p>	<p>(+/-) Allocations de la partition racine/tige, <i>Abutilon theophrasti</i> et <i>Chenopodium album</i>, partiellement optimisé et partiellement ontogénique (Gedroc et al. 1996)</p>	<p>(-) Forme et géométrie de la mandibule chez la souris (Klinkenberg et al. 2002)</p>
phénotypes alternatifs accessibles ou non en raison du système génétique	locale			<p>Superdominance (cas de l'anémie falciforme)</p>	

Tableau 2 : Les contraintes identifiées par Maynard-Smith et al. (1985) en colonnes, et leurs méthodes d'études (en lignes) avec un aperçu des études réalisées sur le sujet. Les études peuvent conclure favorablement (+) ou défavorablement (-) à l'existence de contraintes dans le cadre du débat lié au « programme adaptationniste », ou encore adopter une position relative ou neutre (+/-). Ce tableau illustre que la diversité des contraintes biologiques est également étudiée par le biais d'une grande diversité de méthodes.

Objectifs de la thèse

Ce travail se propose d'analyser les rôles respectifs de la sélection naturelle et des contraintes imposées par le développement sur l'évolution de la morphologie. Depuis l'épisode de la critique du programme adaptationnisme par Gould et Lewontin (1979), le débat a des répercussions passionnées dans la communauté évolutionniste. Si l'on admet généralement qu'il existe une inertie phylogénétique et que certaines options évolutives limitent la possibilité d'évoluer ultérieurement vers d'autres possibilités (symétries instaurées dans le monde animal par exemple), le concept de contraintes reste trop souvent invoqué en dernier ressort, et aucune quantification des limites à la sélection dans des exemples empiriques ne fonde ce concept. On suppose que les contraintes existent, mais elles ne sont pas mesurées.

Néanmoins, pour tester l'influence de ces deux composantes évolutives qui façonnent la diversité du vivant, un certain nombre de critères est nécessaires si l'on souhaite atteindre un niveau intéressant de généralisation des résultats sur les cas étudiés. L'étude des contraintes suppose tout d'abord d'avoir une échelle de comparaison entre différentes options du développement susceptibles d'opérer en tant que contraintes vis-à-vis des autres possibilités. C'est-à-dire qu'il doit exister une variation du développement identifiée et qui permette des comparaisons à différents niveaux biologiques (populations, espèces ou autre niveau systématique). Ces variations, ou différentes options, doivent aussi avoir des répercussions sur la morphologie, ou tout au moins permettre à la sélection naturelle de s'exercer. Or il est parfois difficile de parvenir à identifier des situations qui permettent ce genre d'approche à des niveaux phylogénétiques satisfaisants. L'exemple que nous allons traiter au cours de ce travail, la morphologie du pollen et son développement, présente un certain nombre d'avantages vis-à-vis des critères que nous venons d'évoquer :

- le pollen est un organisme simple, présentant des caractéristiques morphologiques variables et diverses (Erdtman 1952),
- il est commun à un très large groupe de plantes – les Angiospermes- ce qui favorise les comparaisons sur de grandes échelles de temps et d'espèces,
- certaines étapes de son développement sont variables et ont des répercussions sur sa morphologie (Ressayre et al. 2002).

De ce fait, le grain de pollen est un modèle idéal pour tester l'hypothèse selon laquelle certaines étapes du développement sont limitantes et se posent en contraintes de l'évolution de la morphologie. Un des aspects de ce travail a consisté en une approche d'abord descriptive de la microsporogénèse (production des quatre microspores méiotiques à partir d'une cellule mère) chez les Asparagales, avant d'en étudier la dynamique évolutive par une analyse comparative (partie 1). Un deuxième aspect s'attache plus particulièrement à étudier l'importance de la sélection naturelle chez une Eudicotylédone, le frêne commun, dans une population artificielle (verger) où deux morphologies de pollen coexistent (partie 2).

Par souci de clarté, dans les schémas qui vont suivre, les ouvertures seront toujours représentées en noir, au sein des tétrades ou sur le pollen.

Le grain de pollen : morphologie et développement

Les grains de pollen, organismes de dispersion des gamètes mâles chez les plantes à fleurs, sont composés de deux à trois cellules protégées par une paroi. Cette paroi présente de nombreuses variations, qu'elles se situent au niveau de la structure elle-même, de l'épaisseur, de la composition, de la texture ou encore de l'ornementation de l'exine (couche externe de la paroi) (figure 3).

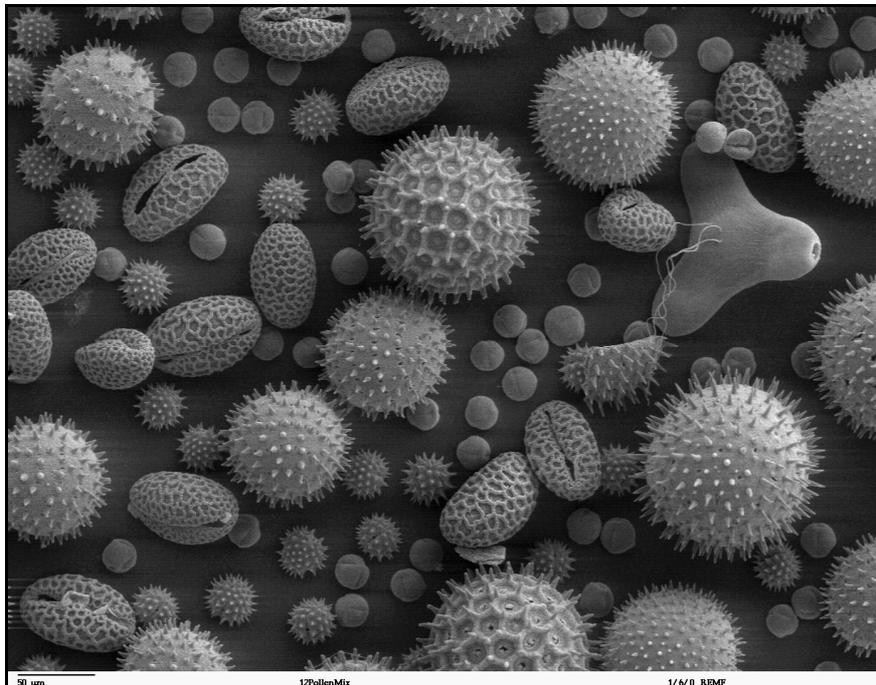


Figure 3 : Aperçu de la diversité morphologique du pollen : tournesol '*Helianthus annuus*', gloire du matin '*Ipomea purpurea*', *Sidalcea malviflora*, lys '*Lilium auratum*', onagre '*Oenothera fruticosa*' et ricin '*Ricinus communis*'. Auteurs : Louisa Howard, Charles Daghljan⁶.

⁶ Cette image appartient au domaine public et est libre de droits.
<http://remf.dartmouth.edu/images/botanicalPollenSEM/source/12.html>

La plupart des grains de pollen présentent des apertures⁷, éléments essentiels à leur survie, sur lesquels notre attention s'est portée.

Apertures, rôles biologiques, et définitions des types aperturaux

On donne à l'aperture la définition suivante (tirée du « Glossary of Pollen and Spore Terminology », seconde édition, Punt et al. 1994)⁸ :

- **Aperture** (adj. aperturé), (Erdtman 1947) : l'aperture est une région spécialisée du sporoderme (paroi de la spore ou du pollen) qui est plus fine que dans le reste de la microspore, et qui en général en diffère par son ornementation et/ou sa structure.

- **Type apertural** : caractère défini par la forme, le nombre et la disposition des apertures du grain de pollen.

L'encadré 1 décrit et nomme les différents types aperturaux concernés par notre étude.

Chez les grains de pollen, les apertures servent de site de germination, mais elles peuvent également servir de porte d'entrée pour l'eau ou d'autres substances et jouent ainsi un rôle important dans l'harmoméga-thie, qui est la résistance aux variations de volume au cours des événements de déshydratation/réhydratation (Wodehouse 1935). Les rôles biologiques des apertures sont multiples. Le plus évident et le plus souvent mis en avant dans la littérature palynologique est celui de zone de germination des tubes polliniques.

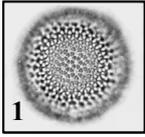
Diversité morphologique du pollen chez les Angiospermes

La morphologie du pollen est connue pour être variable, notamment en ce qui concerne le type apertural, et pour être répartie de façon structurée au sein des grands groupes d'Angiospermes émergeant des études phylogénétiques. Les trois grands groupes de plantes à fleurs (Angiospermes basales, Monocotylédones et Eudicotylédones) se partagent en deux ensembles du point de vue de la morphologie des grains de pollen : Monocotylédones et Angiospermes basales forment un ensemble paraphylétique (tableau 3, figure 4). dont les morphologies sont dérivées du type monosulqué, tandis que les Eudicotylédones ont des morphologies dérivées du type tricolpé (trois apertures perpendiculaires à l'équateur Erdtman, 1952) - il s'agit d'ailleurs d'une synapomorphie du groupe, appelé de ce fait « clade tricolpé » (tableau 3).

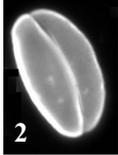
⁷ Ceux qui n'en possèdent pas sont dits inaperturés. De tels pollen existent sporadiquement chez les Monocotylédones et il s'agit en général d'un caractère dérivé (Furness and Rudall 2000).

⁸ Ce glossaire est disponible en ligne à l'adresse suivant : <http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/glos-int.htm>

Encadré 1 : Les principaux types aperturaux rencontrés au cours de cette étude : 1- *Croton parksii* (Euphorbiaceae, Eudicotylédones)⁷, 2- *Veltheimia bracteata* (Hyacinthaceae, Monocotylédones) 3- *Amaryllis belladonna* (Amaryllidaceae, Monocotylédones), 4- *Dietes grandiflora* (Iridaceae, Monocotylédones), 5- *Phormium tenax* (Hemerocallidaceae, Monocotylédones), 6-7- *Fraxinus excelsior* (Oleaceae, Eudicotylédones).



Pollen inaperturé (1) (Furness et Rudall 2000) : pollen qui ne présente aucune ouverture visible.



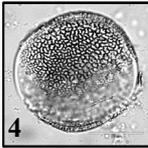
Pollen monosulqué (2) (Erdtman 1952) :

pollen ayant une unique ouverture, sous forme d'un sillon ou sulcus. Le pollen monoporé, caractéristique des Poales, est quand à lui défini par un pore unique ou ulcus (Iversen et Troels-Smith, 1950).



Pollen disulqué (3) (Harley 1998) :

pollen caractérisé par des sillons arrangés par paires, soit équatorialement (=°disulqué équatorial), soit arrangés en parallèle sur l'axe long du pollen et sur sa face distale (= disulqué distal).



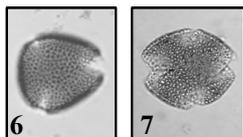
Pollen zonaperturé (4) (Walker et Doyle 1975) :

pollen caractérisé par une ouverture en forme d'anneau encerclant le grain de pollen.



Pollen trichomosulqué (5) (Erdtman 1952) :

pollen présentant une ouverture sous la forme d'un sillon partagé en trois branches et qui prend la forme d'un Y.



Pollen triaperturé (6) et tétra-aperturé (7) :

pollens présentant 3 ou 4 ouvertures. Lorsqu'elles sont perpendiculaires à l'équateur, les ouvertures prennent le nom de colpus. En général, les pollens colpés sont des morphologies caractéristiques des Eudicotylédones.

⁷ http://pollen.usda.gov/Light_Micrographs/Euphorbiaceae/Croton%20parksii.html

Les différences entre les trois groupes reposent sur la localisation distincte des ouvertures : en effet, les Angiospermes basales et les Monocotylédones ont de façon quasi générale une localisation polaire des ouvertures au sein des tétrades, tandis que les Eudicotylédones établissent leurs ouvertures de façon groupée dans les tétrades (Furness et Rudall 2004), ces différents groupes de plantes sont replacés dans la phylogénie actuelle⁹ des Angiospermes sur la figure 4. Cette différence offre aux Eudicotylédones la possibilité de faire varier le nombre des ouvertures des grains de pollen, et on observe parfois une tendance à l'augmentation du nombre d'ouverture dans ce clade.

⁹ Contrairement à l'ordre des Asparagales dont il sera question plus loin dans ce document, la phylogénie des Angiospermes est encore régulièrement débattue et les affinités entre clades sont encore incertaines ; il est probable qu'elle sera profondément remaniée dans les années à venir, aussi cette figure comporte-t-elle de nombreuses polytomies irrésolues. Il faut entendre par Angiospermes Basales le regroupement artificiel (mais autrefois valide) des Nymphéales, des Magnoliideae et autres groupes dont Monocotylédones et Eudicotylédones dérivent.

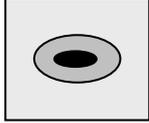
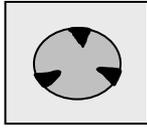
<p>Monocotylédones</p>	<p>Types aperturaux de base dérivés du type monosulqué</p> <p>Pollen majoritaire : Type monosulqué</p>   <p>Type tétrachotomosulqué (très rare)</p>  <p>Type trichotomosulqué</p>	<p>Hétéromorphisme exceptionnel</p> <p>-----</p> <p>30 % des familles sont polymorphes</p>
<p>Angiospermes basales et Magnoliideae</p>	 <p>Type inaperturé</p>   <p>Types zonaperturés</p>    <p>Types di- et tri-aperturés (disulqué/trisulqué)</p>	<p>Hétéromorphisme Moyen</p> <p>-----</p> <p>50 % des familles sont polymorphes</p>
<p>Eudicotylédones</p>	<p>Types aperturaux de base dérivés du type triaperturé</p>    <p>Types 2-, 3- et 4-aperturés</p>   <p>5- et 6-apertures</p>	<p>Hétéromorphisme Fréquent</p> <p>-----</p> <p>40 % des familles sont polymorphes</p>

Tableau 3 : Caractéristiques des types aperturaux et de leur répartition dans les trois grands groupes d'Angiospermes. Les grains de pollen encadrés sont ceux présentant le type apertural prépondérant de chacun de ces groupes.

L'établissement du type apertural : aperçu développemental

L'établissement du type apertural est influencé par différentes étapes qui interviennent au cours de la microsporogénèse (cytocinèse, progression des plaques cellulaires, forme des tétrades, définition des apertures au sein des tétrades). La variation qui existe à chacune de ces étapes peut être reliée à la production des différentes morphologies aperturales rencontrées chez le pollen. Si ces étapes sont connues depuis longtemps, la formalisation de leur lien avec le type apertural n'a été faite synthétiquement qu'assez tardivement. On peut cependant citer des travaux soulignant l'intérêt de prendre en compte ces caractéristiques du développement (Wodehouse 1935, pour les Eudicotylédones ; Dover 1972 ou encore Sheldon et Dickinson 1983, 1986, pour les Monocotylédones). Des études plus récentes ont également souligné l'influence de la cytocinèse sur le type d'ouverture du pollen, chez les Asparagales (Rudall et al. 1997). L'observation répétée de correspondances entre différentes étapes du développement et leur ouverture ont amené à la proposition d'un modèle développemental de la définition du type apertural (Ressayre et al. 2002). Notre travail d'investigation de la variabilité de la microsporogénèse s'appuie sur ce modèle, aussi allons-nous en présenter les différentes principales étapes.

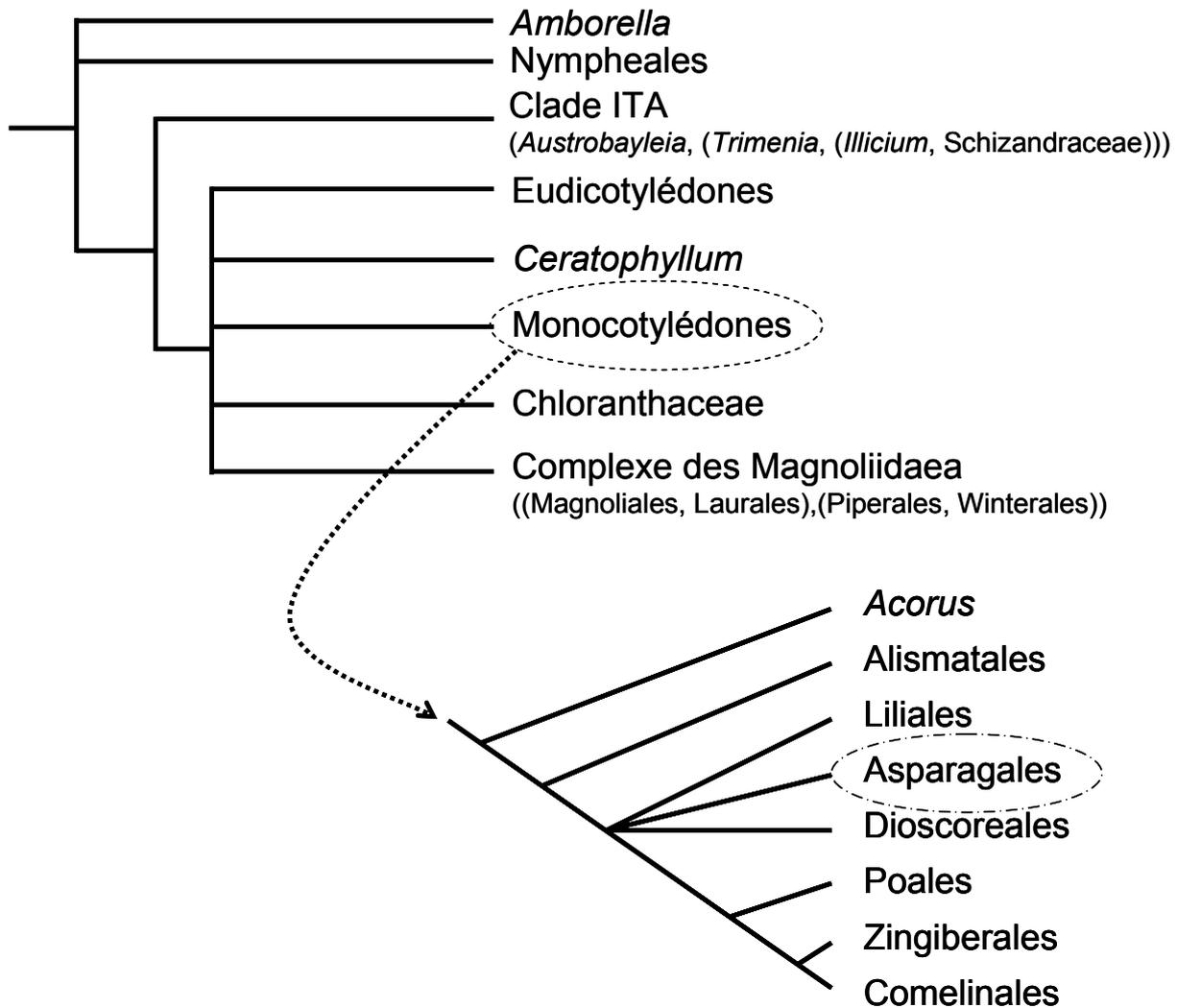


Figure 4 : Phylogénie des Angiospermes avec une emphase sur les Monocotylédones (et les Asparagales, dont il sera question plus loin dans ce document) dans son acception actuelle (source : Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>);. les relations phylogénétiques entre ces groupes sont tirés de Zanis et al. (2002), Hilu et al. (2003) et Qiu et al. (2000). Cette phylogénie verra probablement d'importantes modifications dans les années à venir en raison de ses nombreuses polytomies.

Le modèle s'organise autour de diverses étapes de la microsporangénèse :

a) Première modalité : le type de cytokinèse

On répertorie deux types distincts de partition du cytoplasme au cours de la méiose (figure 5) :

- La cytokinèse **successive**, qui intervient en deux temps : une première division de la cellule à la suite de la première division nucléaire, qui conduit à un stade identifiable appelé dyade et formé par deux cellules. Une deuxième division a lieu après la deuxième division nucléaire, aboutissant à la formation d'une tétrade. Il y a alors deux étapes de division cytoplasmique.

- La cytokinèse **simultanée**, au cours de laquelle la cellule mère du pollen est divisée directement à la suite des divisions nucléaires de la méiose en une tétrade de quatre microspores (en une seule étape de division cytoplasmique).

On peut noter que cette distinction est souple, et plusieurs cas de cytokinèse intermédiaire ont déjà été reportés, notamment avec l'apparition de plaques cellulaires transitoires disparaissant au cours du développement (Sampson 1969).

b) Deuxième modalité : la formation des parois et les dépôts de callose

Au cours de la division cellulaire (= cytokinèse), deux mécanismes entrent en jeu : la **formation des parois**, complétée par des **dépôts additionnels de callose**.

La progression des plaques cellulaires au cours de la cytokinèse se déroule de deux façons : soit par progression **centrifuge** et par l'intermédiaire d'un phragmoplaste, soit par constriction **centripète** à partir de la paroi de la cellule. Des dépôts de callose additionnels viennent fréquemment compléter les parois une fois la cytokinèse achevée. Ces dépôts additionnels peuvent intervenir soit directement au cours de la cytokinèse, soit ultérieurement, une fois que la division de la tétrade s'est achevée et ils peuvent se faire suivant une modalité différente de celle des parois. Il existe 4 possibilités de former les parois et de déposer de la callose supplémentaire dans les tétrades (figure 6) :

- cas 1 : de façon centripète au niveau de la cellule initiale (les derniers dépôts se font alors au centre de la tétrade),
- cas 2 : de façon centrifuge au niveau de la cellule initiale (les derniers dépôts de callose se font alors en périphérie de la tétrade),
- cas 3 : de façon centrifuge au niveau des plans de division (les derniers dépôts se font alors en périphérie et au centre de la tétrade, c'est-à-dire en périphérie des plans de division),
- cas 4 : de façon centripète au niveau des plans de division (les derniers dépôts se font alors au centre des plans de division).

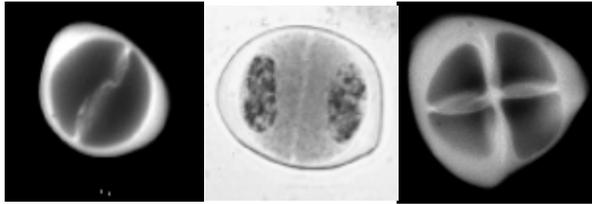
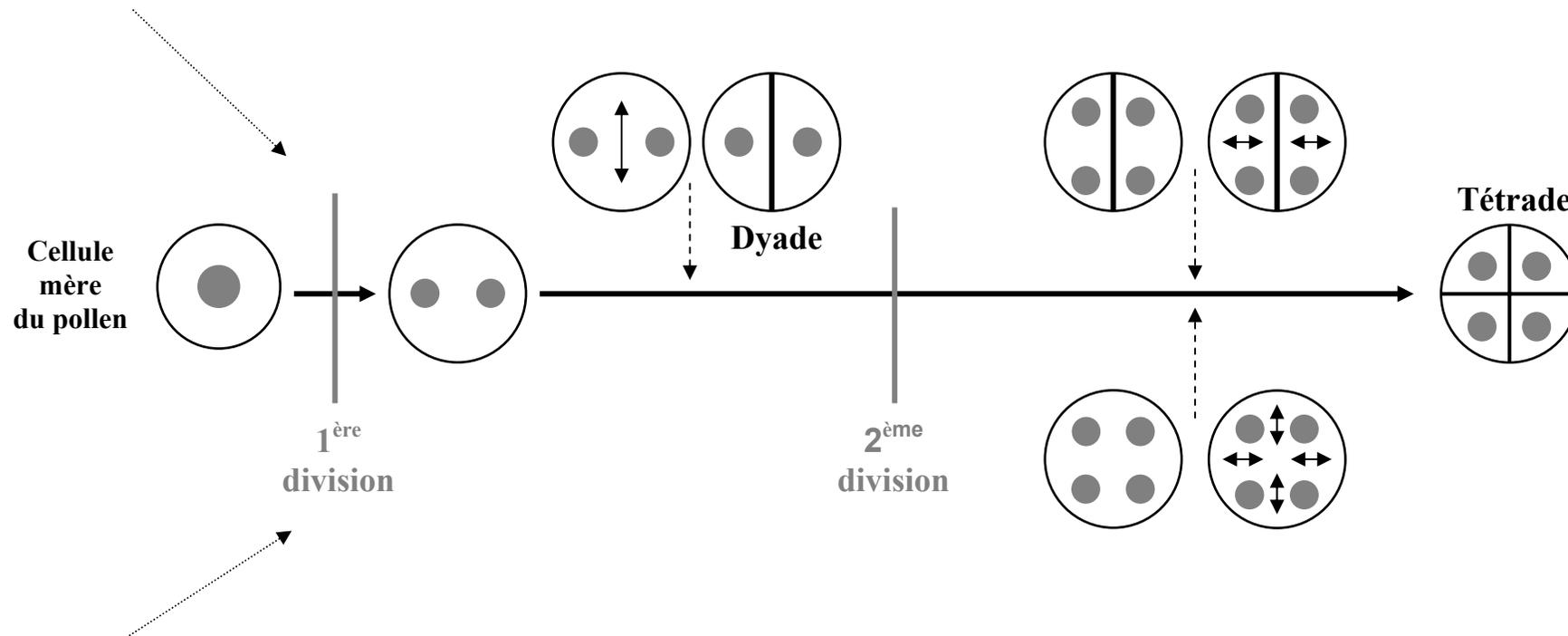
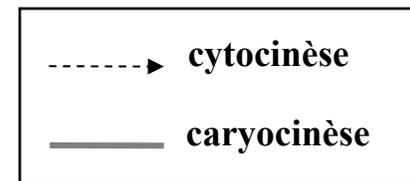
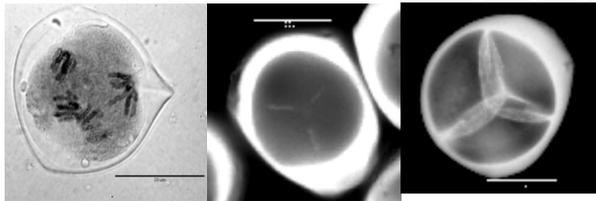


Figure 5 : Illustration des deux grands types de cytokinèse (successive et simultanée) au cours de la microsporogénèse.

Cytokinèse successive (ex : *Allium ursinum*, Alliaceae)



Cytokinèse simultanée (ex : *Kniphofia praecox*, Asphodelaceae)



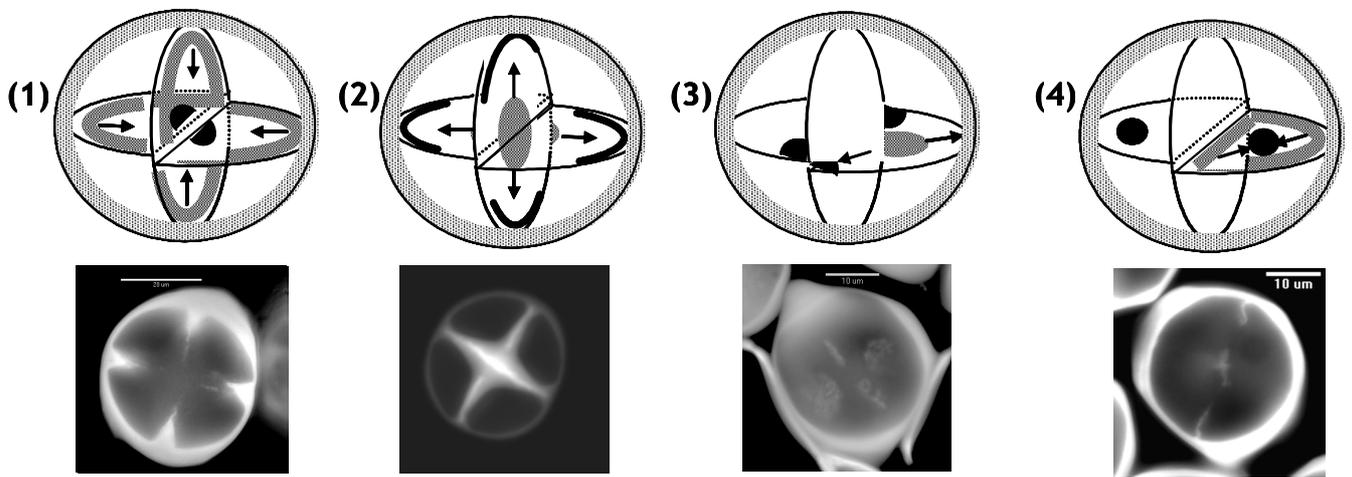


Figure 6 : Les différents modes de dépôts de callose au cours de la microsporogénèse. (1) *Dietes longiflora*, Asparagales, (2) *Pontederia cordata*, Commelinales, (3) *Trachyandra muricata*, Asparagales, et (4) *Chamaedorea radicalis*, Arecales.

c) Troisième modalité : la forme des tétrades

- *Nombre de plans et forme des tétrades* :

Le type de cytokinèse impose une contrainte sur le nombre de plans de division, mais une certaine diversité de la forme des tétrades est possible pour chaque type de cytokinèse. On reconnaît six catégories de forme de tétrades : tétrades **quadratiques**, **décussées**, **linéaires**, « **en T** », qui sont des tétrades en général associées à une cytokinèse de type successive ; les tétrades **tétraédriques** et **rhomboïdales** sont quant à elles caractéristiques d'une cytokinèse simultanée, mais il arrive parfois que des tétrades quadratiques ou linéaires soient aussi produites par ce type de cytokinèse (figure 7). La forme des tétrades a une importance dans la mise en place du type apertural, car ce dernier est sous l'influence des dépôts de callose sur les plans de division, dont le nombre varie avec la forme des tétrades.

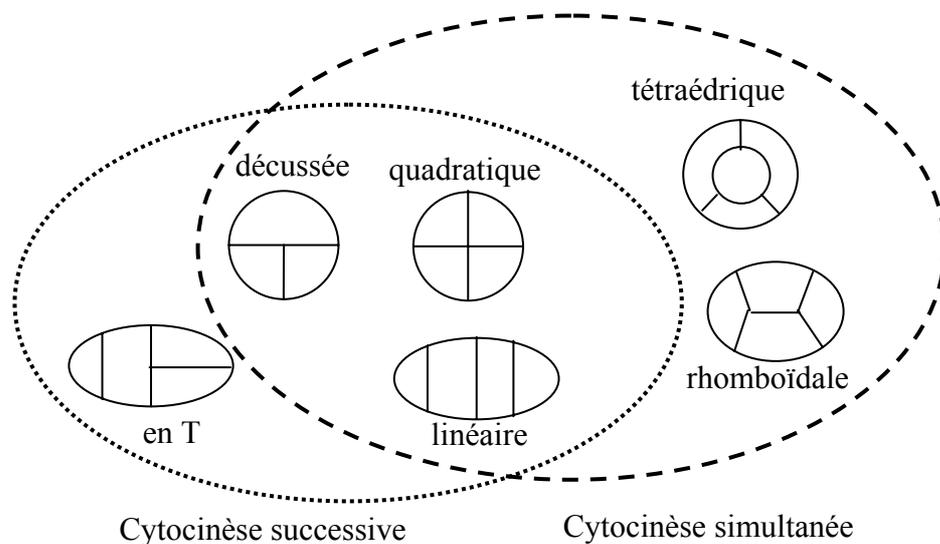


Figure 7 : Les différentes catégories de tétrades en fonction du type de cytokinèse.

En fonction du type de cytokinèse, le nombre de plans de division varie de 3 à 6 (figure 8). Le plus grand nombre de plans de division est obtenu via une tétrade tétraédrique, qui possède six plans. Les tétrades rhomboïdales en possèdent cinq. Les tétrades quadratiques (ou décussées, qui sont des tétrades produites par rotation d'un plan de deuxième division de cytokinèse par rapport à l'autre ; illustration figure 9 B, tétrade de droite) en possèdent trois ou quatre, suivant le type de cytokinèse dont elles sont issues : une cytokinèse successive passe par la formation d'un plan à la fin de la première division de méiose, ce qui fait qu'il ne reste que deux plans de division à former pour achever la tétrade, tandis que dans le cas d'une cytokinèse simultanée il est nécessaire de produire quatre plans de division pour former la tétrade.

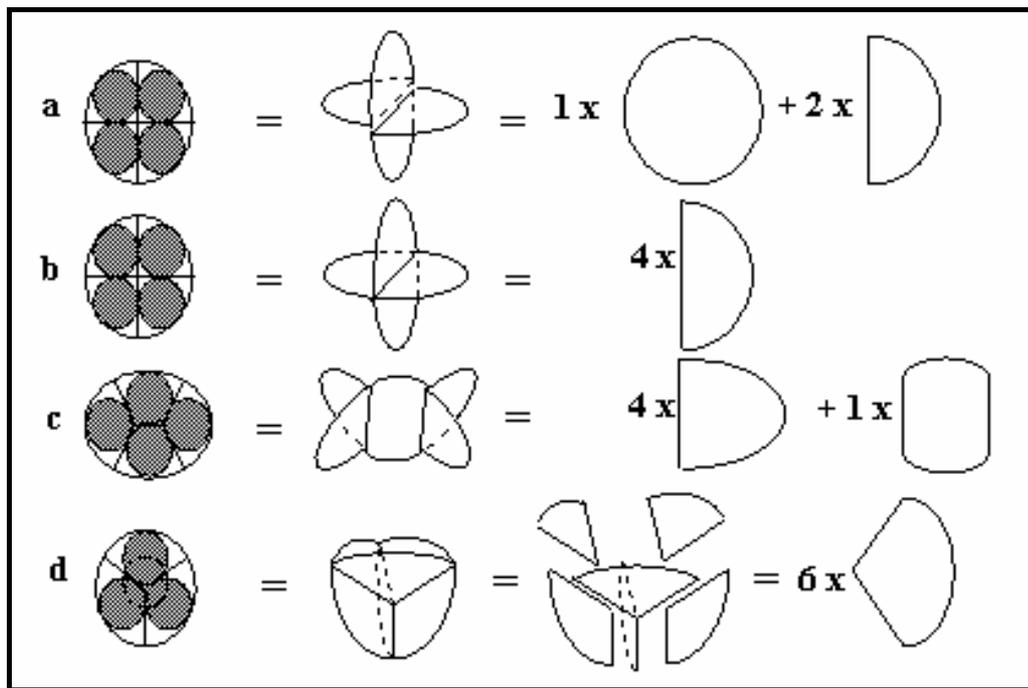


Figure 8 : Variation du nombre de plans de division au sein des tétrades. a- tétrade quadratique résultant d'une cytokinèse successive (3 plans de division), b- tétrade quadratique issue d'une cytokinèse simultanée (4 plans de division), c- tétrade rhomboïdale (5 plans de division), d- tétrade tétraédrique (6 plans de division). (D'après Ressayre et al. 2002).

Comme le nombre de plans de division, la forme des tétrades dépend du type de cytokinèse. En effet, lorsque la cytokinèse est successive, le premier plan de division aboutissant à la formation d'une dyade contraint la forme ultérieure de la tétrade, et certaines conformations ne peuvent pas être adoptées (forme tétraédrique par exemple). Lorsque la cytokinèse est simultanée, il n'existe pas de contrainte aussi forte sur la forme de la tétrade qui en résulte, bien que les tétrades formées soient dans ce cas très souvent tétraédriques.

Le nombre de plans de division d'une tétrade a, comme nous allons le voir maintenant, une répercussion sur l'établissement du type apertural.

- *Progression des plaques cellulaires, dépôts de callose et Zones de Convergence Aperturale (ZCA) :*

L'observation du type apertural au sein des tétrades montre que les apertures sont définies ou convergent vers des zones localisées de la tétrade qui sont identiques même entre espèces de types aperturaux différents (figure 9, situation illustrée pour le pollen monosulqué et le diporé au sein de tétrades quadratiques ou décussées ; Ressayre et al. 2002). Chez certaines espèces, ces zones localisées coïncident avec le lieu du dernier point de dépôt de la callose dans les tétrades, c'est-à-dire le dernier point de contact entre les microspores. Ces zones ont été appelées Zones de Convergence Aperturale (ZCA, Ressayre et al. 2002) et cette propriété est utilisée dans le modèle développemental pour définir le type d'aperture. On peut prédire l'emplacement des ZCA dans les différents types de tétrade en fonction de la cytokinèse et du mode de dépôt de la callose (figure 10). La combinaison de la forme des tétrades (nombre de plans de division) et du mode de dépôt de la callose aboutit à une variation de l'emplacement de ces zones, en périphérie, au centre ou encore sur les plans de division de la cellule mère du pollen qui a donné naissance à la tétrade. La localisation de ces zones va nous permettre de prédire le type apertural en fonction du mode de définition des apertures (polaires ou groupées), qui est le dernier critère développemental du modèle proposé par Ressayre et al. (2002).

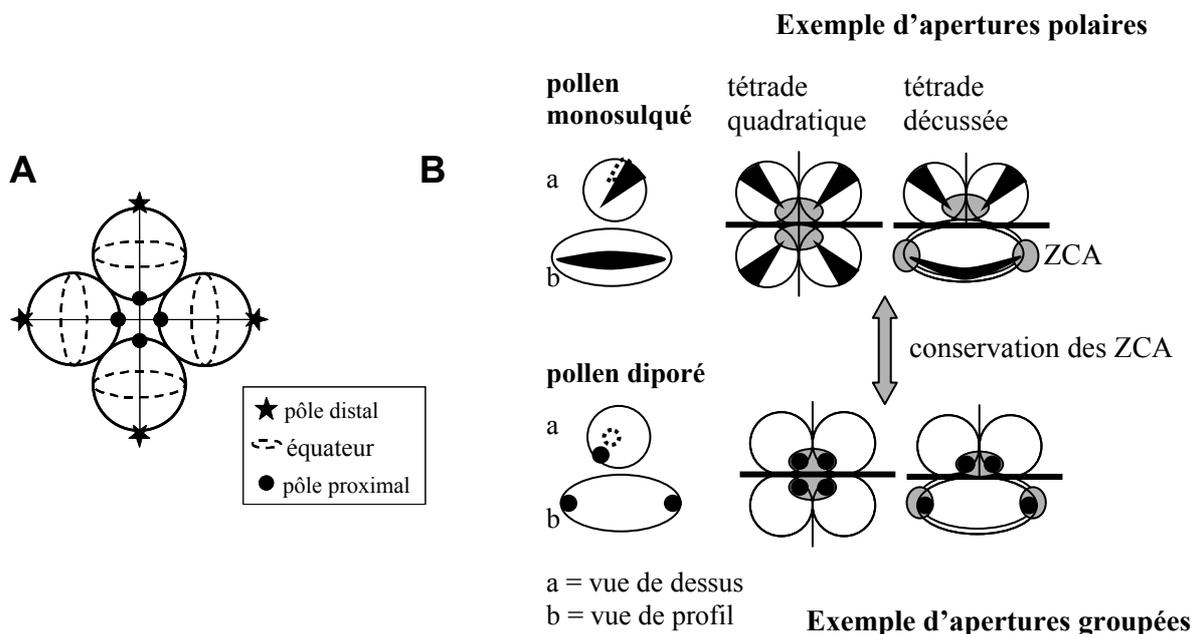


Figure 9 : Polarité et relation entre apertures au sein des tétrades.

A. Polarité dans les tétrades. **B.** Correspondance entre ZCA et position des apertures pour certains types aperturaux. Les ZCA, indiquées en gris, sont illustrées dans le cas du pollen monosulqué (apertures polaires) ou diporé (apertures groupées) au sein de tétrades quadratiques ou décussées. Le pollen correspondant est présenté (a) en vue latérale, puis (b) en vue polaire distale (selon la polarité dans la tétrade). (D'après Ressayre, 2002).

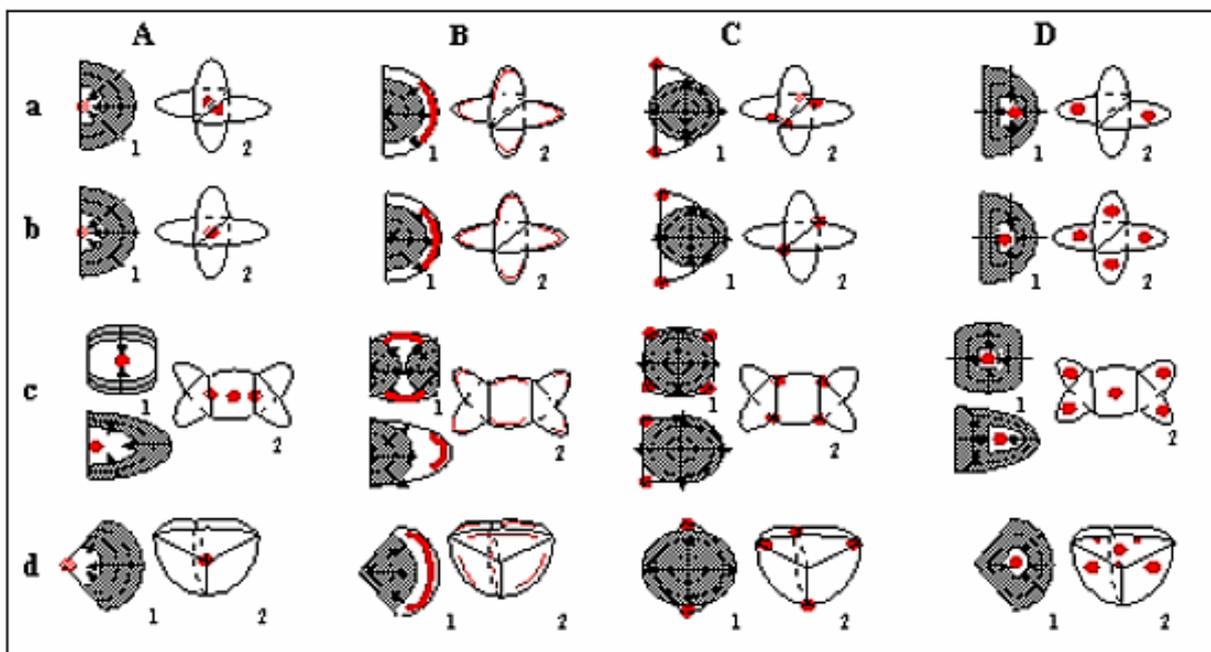


Figure 10 : Distribution des zones de convergence aperturales en fonction de la forme des tétrades, du type de plan de division, et du mode de dépôt de la callose.

A représente un dépôt de callose centripète au niveau de la cellule, **B** cas d'un dépôt centrifuge au niveau de la cellule, **C** cas d'un dépôt centrifuge au niveau du plan de division et **D** cas d'un dépôt centripète au niveau du plan de division. **a** représente le cas d'une tétrade quadratique produite par cytokinèse successive, **b** cas d'une tétrade quadratique issue de cytokinèse simultanée, **c** cas des tétrades rhomboïdales, et **d** cas des tétrades tétraédriques. **1** représente les dépôts individuellement sur les plans de division et **2** les ZCA sur les plans de division dans les différentes tétrades en fonction des différents modes de dépôts. (d'après Ressayre et al. 2002).

d) Quatrième modalité : polarité et localisation des apertures au sein des tétrades

Le type apertural est également dépendant de la polarité au sein des tétrades. Cette polarité est relativement simple : ainsi que l'illustre la figure 9, le grain de pollen est caractérisé par un pôle distal (orienté vers l'extérieur de la tétrade), un pôle proximal (orienté vers l'intérieur de la tétrade) et un équateur.

- Un premier groupe concerne les pollens à définition **polaire** : les apertures sont localisées sur le pôle distal dans les tétrades. Dans le cadre du modèle, l'orientation des apertures est déterminé par les Zones de Convergence Aperturale : quand les ZCA sont au nombre de deux, le sillon apertural est localisé sur le pôle et orienté vers celles-ci. Quand leur nombre est supérieur (3 ou 4), le sillon est placé sur le pôle et est divisé en trois ou quatre branches dont les extrémités se dirigent vers les zones de convergence aperturale (produisant dans ce cas un pollen trichotomosulqué ou tétrachotomosulqué). Quand il n'y a qu'une seule ZCA, et qu'elle est définie comme un point unique de la tétrade, les sillons des apertures sont représentés par un cercle passant soit par les pôles, soit encerclant le grain de pollen parallèlement à l'équateur.

- Un deuxième groupe rassemble les pollens à localisation **groupée** des apertures : dans cette situation, les apertures sont formées sur les ZCAs. On retrouve dans cette catégorie essentiellement les apertures à localisation équatoriales (figure **11**), quoique le modèle prédit aussi dans ce cas des exemples de définition des apertures sur le pôle proximal (configuration rarissime).

La combinaison de chacune de ces options au cours du développement permet de lier la microsporogénèse et le type apertural (figure **11**). Ce modèle nous a servi de base de travail pour l'étude de l'évolution de la microsporogénèse en relation avec le type apertural produit chez les Asparagales.

Une fois que le type apertural a été défini, suivant les options développementales présentées au cours de ce chapitre, l'élaboration des apertures débute (encadré **2**).

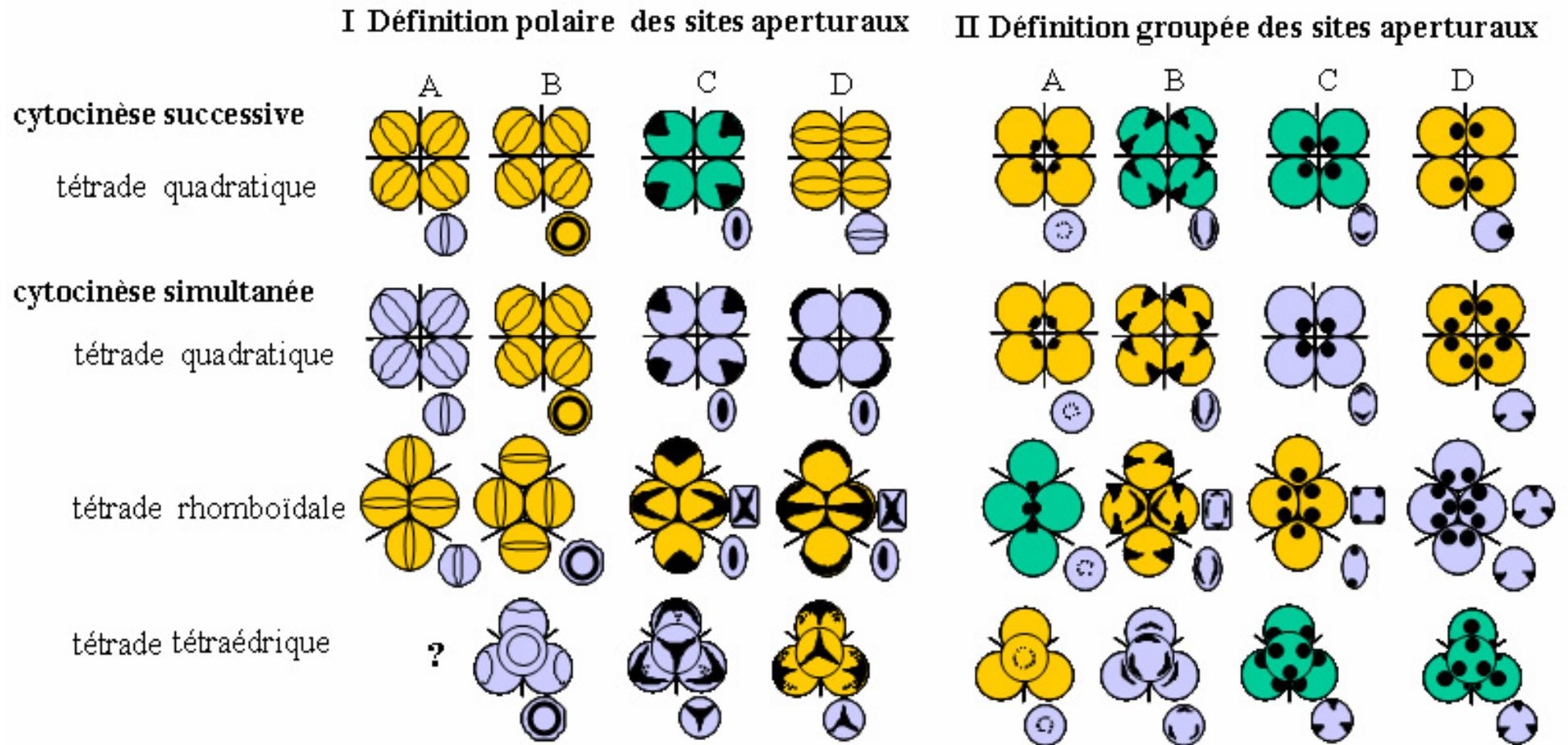


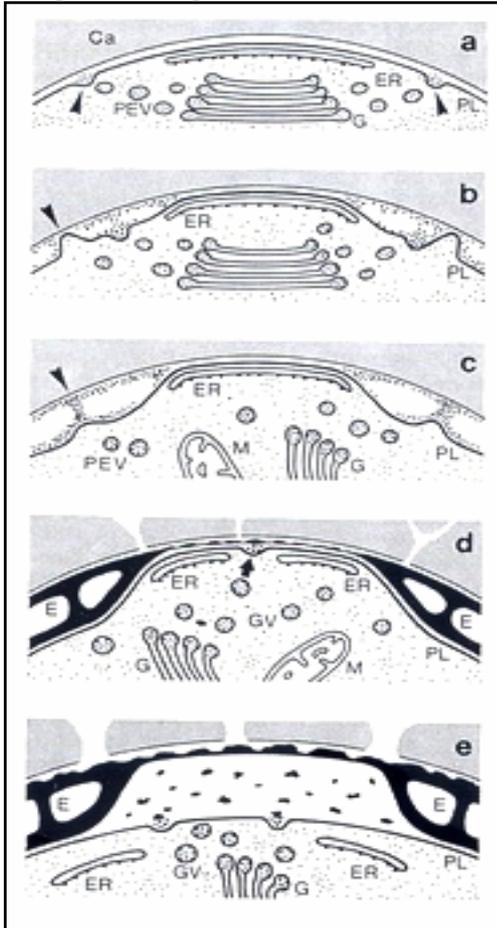
Figure 11 : Modèle de détermination du type apertural en fonction des étapes du développement (d'après Ressayre et al. 2002).

Etablissement du pattern des apertures en fonction de différentes étapes de la microsporogénèse (type de cytokinèse, forme de la tétrade, progression des plaques cellulaires et définition des apertures au sein de la tétrade). Colonnes **A** = progression centripète des parois de callose, au niveau de la cellule ; **B** = progression centrifuge et au niveau de la cellule ; **C** = progression centrifuge au niveau des plans de division ; **D** = progression centripète au niveau des plans de division. Les codes de couleur correspondent à l'état des connaissances lors de la publication du modèle et sont les suivants :

Vert : tétrades et apertures observées et résultats cohérents avec le modèle, **Bleu** : seule la disposition des apertures est décrite dans la littérature, **Orange** : aucune description de la définition des apertures.

Encadré 2 : Ontogénèse des apertures.

(d'après Heslop-Harrison 1963)



Dès la fin de la méiose, le réticulum endoplasmique (ER) forme un bouclier protecteur qui empêche l'exocytose (sécrétion cellulaire) de se produire au futur site de l'aperture. Les vésicules d'exocytose véhiculent l'ensemble des protéines et produits nécessaires à la formation de la primexine de la paroi du pollen sur le reste du plasmalemme (PL) (a, indiqué par des flèches). A ce stade de l'ontogénèse de l'aperture, la microspore est engoncée dans son revêtement de callose (Ca). A un stade ultérieur du développement (b), le plasmalemme adhère localement à la paroi de callose en certains endroits (indiqué par une flèche). L'accumulation progressive des composants de l'exine provoque l'éloignement du plasmalemme de la couche de callose (b, puis c). Les zones où le plasmalemme était en contact avec la paroi de callose voient la formation de baculae (pontages protéiques de l'exine ayant une structure cohésive en bâtonnet, d'où leur nom, c, indiqué par une flèche). La zone protégée par le reticulum (ER) apparaît désormais comme une surface plane. Lorsque l'ectexine de la paroi du grain de pollen devient mature (d), le reticulum se désagrège et l'exocytose est à nouveau permise dans la zone de la future ouverture (indiqué par une flèche) aux vésicules golgiennes (GV). La paroi de callose commence alors à se désagréger. Lorsque le reticulum a complètement disparu,

l'exocytose se poursuit et l'exine (E) est déposée au niveau de l'aperture, ainsi que les enzymes intervenant dans l'interaction avec le stigmate. Ce type d'ontogénèse a été décrit pour la première fois pour le genre *Silene* (Heslop-Harrison 1963), mais il semble être le type le plus répandu.

D'autres modes d'ontogénèse des apertures ont également été décrits, comme la formation d'un bouclier callosique (au lieu du réticulum endoplasmique) prévenant l'exocytose chez *Ipomopsis purpurea* (Barnes et Blackmore 1986) ; le même rôle est également joué par des corps interstitiels (Zwischenkörper) chez *Epilobium angustifolium* (Rowley 1975). Chez *Liriodendron tulipifera*, les apertures sont mises en place par une cassure provoquée par des crêtes d'exine au moment de la libération de la tétrade (Guzzo et al. 1994).

Les modes d'ontogénèse des apertures sont donc diversifiés. Cependant, le type apertural n'est pas modifié par la manière de faire les apertures. Tout se passe comme si l'ontogénèse du type apertural et l'ontogénèse des apertures étaient des mécanismes indépendants.

Partie 1 : Evolution de la microsporogénèse chez les Asparagales

Le modèle liant la microsporogénèse et la morphologie du pollen élaboré par Ressayre et al. (2002) présenté dans l'introduction concerne les types aperturux de base, c'est-à-dire présentant un faible nombre d'ouvertures (de 1 à 3 ouvertures). L'objectif du présent chapitre est double et concerne :

- **la validation du modèle** : connaissant les étapes du développement, la morphologie observée correspond-elle à la morphologie attendue ? Ou réciproquement : connaissant la morphologie du pollen d'une espèce, retrouve-t-on des séquences développementales avec les états de caractères prévus par le modèle ?
- la reconstruction de **l'évolution de la microsporogénèse** et de ses conséquences sur la morphologie du pollen, à travers l'histoire évolutive d'un groupe taxonomique ciblé. Il est ici nécessaire que la phylogénie du groupe en question soit connue.

De ce fait, le choix d'un groupe à étudier dépendait des critères suivants :

- la diversité morphologique du pollen doit y être suffisante,
- les morphologies doivent être décrites par le modèle (faible nombre d'ouvertures),
- le groupe d'étude doit correspondre à un clade monophylétique et les données sur son histoire évolutive doivent être connues et fiables.

Un groupe a retenu notre attention car il répondait à ces critères : l'ordre des Asparagales. Ce clade est non seulement diversifié au niveau de la morphologie des pollens qu'on peut y recenser mais il a également fait l'objet de plusieurs études sur l'une des étapes de la microsporogénèse, le type de cytocinèse, qui est une des étapes intervenant dans le modèle. L'ordre des Asparagales est l'un de ces groupes ayant émergé des travaux récents de clarification concernant la classification et la phylogénie des Monocotylédones (Chase et al. 1995). Il est composé de familles reconnues en tant qu'entités systématiques par leur singularité, comme de familles définies plus récemment et dont l'existence relève plus spécifiquement de l'apport de la phylogénie. Dans ce cas les fondements morphologiques de la classification botanique conventionnelle sont plus ténus, quand bien même les données de phylogénie moléculaire donnent des résultats convergents. Enfin, cet ordre est un groupe clé des Monocotylédones en raison de sa diversité spécifique (Pires et al. 2004, sous presse ; voir tableau 5).

1-1 L'ordre des Asparagales

1-1-1 Historique de la classification et phylogénie des Asparagales

La classification des Asparagales et du groupe morphologique lui ressemblant, les Liliales, a fait l'objet de nombreux travaux et d'un long débat entre systématiciens (consulter l'encadré 3 et le tableau 4, pages suivantes). Suivant les caractères étudiés, les regroupements taxonomiques ont beaucoup varié. En particulier, les Asparagales et les Liliales ont toujours été considérées comme un ensemble unique mais disparate. Finalement, les phylogénies moléculaires ont substantiellement éclairci les relations évolutives et ont été à l'origine de profonds remaniements dans le groupe des Monocotylédones lilioïdes. Les phylogénies moléculaires ont notamment permis de dissocier ces deux ordres, dont l'origine évolutive est finalement distincte. Nous nous placerons donc, dans cette étude, sous l'angle phylogénétique de l'ordre des Asparagales. Sa phylogénie fait aujourd'hui consensus (figure 12), elle a été confirmée par de nombreuses phylogénies utilisant des séquences moléculaires différentes.

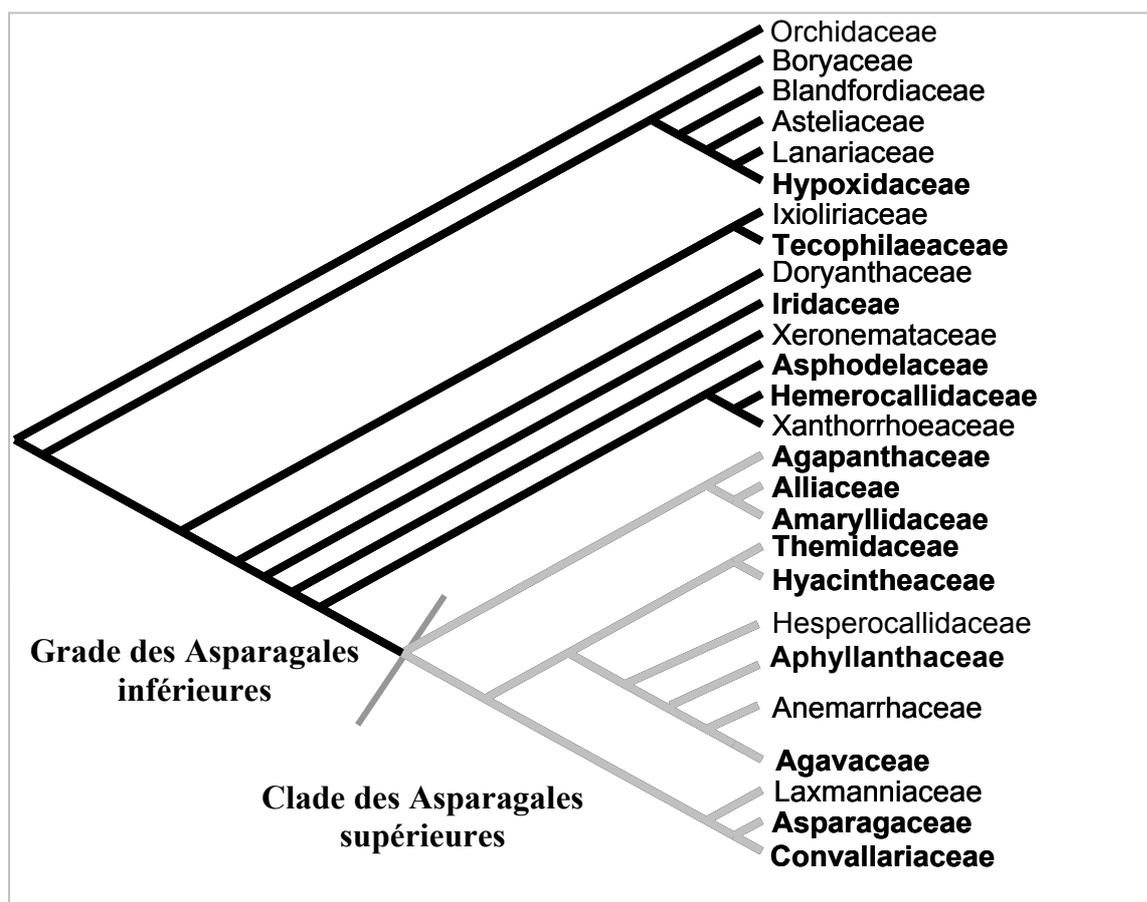


Figure 12 : Phylogénie des familles d'Asparagales (*sensu* Angiosperm Phylogeny Group 2003)

¹⁰. En gras, les familles pour lesquelles des données ont été obtenue au cours de cette étude.

¹⁰ Les dénominations respectives de Asparagales « inférieures » et Asparagales « supérieures » sont utilisées dans ce document pour conserver la convention actuelle d'usage chez les Asparagales. Elles ne reflètent aucune prise de position vis-à-vis des connotations anciennement attribuées à ces termes, et en particulier la signification comparative et désuète liée à la 'scala naturae' lamarckienne. Elles ne reflètent que la décision arbitraire de délimiter le clade des Asparagales supérieures par la synapomorphie de la cytotcinèse simultanée.

Encadré 3 : Historique de la classification des Asparagales

Les Asparagales telles qu'on les définit actuellement ont longtemps été classées en partie chez les Asparagales et chez les Liliales, les deux groupes ayant été considérés comme très proches par leur morphologie et leurs habitudes de vie similaires. Mais les différents auteurs qui se sont proposés d'établir des regroupements systématiques à l'échelle des Angiospermes ont abouti à des classifications souvent antagonistes, les points de discorde et l'appartenance familiale des espèces ayant parfois été très disputés (tableau 4). Dahlgren et al. (1985) sont les auteurs dont les travaux font office de référence pour la classification des Monocotylédones. Le tableau (ci-dessous) en décrit les caractéristiques distinctives. Dans leur système de classification, les Asparagales et les Liliales formaient le superordre des Lilianae et regroupaient respectivement 31 et 10 familles :

<i>Caractère</i>	<i>Asparagales</i>	<i>Liliales</i>
Raphides	Communs	Souvent absents
Racines	Souvent fusiformes, épaisses	Rarement fusiformes
Forme générale	Variable, en rosette, arbustes, etc. plutôt commun, nombreuses espèces bulbeuses	Pas de rosette, rarement buissonnants, sont le plus souvent des herbes avec des cormes épais
Succulence	Dans plusieurs familles	Aucune espèce
Inflorescence	Si délimitées à partir des régions végétatives, elles sont terminales ou axillaires, et alors souvent ramifiées	Si délimitées à partir des régions végétatives, elles sont habituellement terminales et rarement ramifiées
Tépales	En général ni panachés ni avec motifs de couleur en éclaboussure	Assez souvent panaché avec des motifs colorés en éclaboussure
Nectaires	Habituellement dans les cloisons des ovaires	La plupart du temps à la base des tépales ou des filets (à l'exception des Ixioideae chez les Iridaceae)
Anthères	Basifixes ou dorsifixe, hypopelté	Basifixes ou dorsifixe, épipelté ou en arc tubulaire sur les filets (pseudo-basifixées)
Déhiscence des anthères	Introrse (à l'exception des Ruscaceae)	Introrse, latrorse ou souvent extrorse
Style	En général un simple style	Style simple ou bien trois stylodes
Ovules par locule	De très nombreux à un ou deux	Très nombreux
Fruit	Baies ou le plus souvent des capsules à déhiscence loculicide	Capsules à déhiscence septicide ou loculicide (ou encore des follicules séparés)
Tégument immature	Sans amidon (à l'exception de quelques Asparagaceae ou Convallariaceae)	Probablement toujours accompagné d'amidon, disparaissant à maturité
Tégument	Jamais de tégument externe	Présence occasionnelle de tégument externe
Epiderme externe du tégument	Oblitéré dans la plupart des fruits sont des baies, présent et incrusté de phytomélanine dans les capsules	Toujours présent et bien développé, et toujours sans phytomélanine
Partie terminale du tégument de la graine	En général complètement contractée pour former une membrane brune, pourpre ou décolorée	La structure cellulaire est habituellement conservée

Critères permettant de distinguer entre Asparagales et Liliales *sensu* Dahlgren et al. (1985).

Ce travail de détermination de caractères morphologiques pertinents en ce qui concerne ces groupes de plantes, a montré la difficulté à apporter une réponse claire en utilisant une approche cladistique basée sur la morphologie. Les caractères morphologiques permettent donc difficilement une discrimination satisfaisante des familles chez les Asparagales (Rudall et Cutler 1995), soit parce qu'ils présentent une trop grande homoplasie, soit qu'ils ne sont pas généraux dans les différentes familles, soit aussi parce que leur combinaison n'est pas assez informative dès que l'on s'intéresse à l'histoire évolutive du groupe.

<i>Clade (APG 2003)</i>	<i>Famille (APG 1998)</i>	<i>Classification de Dahlgren et al. (1985)</i>	<i>Classification de Cronquist (1981) : Ordre des Liliales</i>	<i>classification de Takhtajan (1969)</i>
Orchidaceae	Orchidaceae	Liliales	Orchidaceae	Orchidales
Boryaceae	Boryaceae	-	-	-
Blandfordiaceae	Blandfordiaceae	Asparagales	Liliaceae	Asparagales
Asteliaceae	Asteliaceae	Asparagales	Liliaceae	Asparagales
Lanariaceae	Lanariaceae	-	-	-
Hypoxidaceae	Hypoxidaceae	Asparagales	Liliaceae	Hypoxidales
Ixioliriaceae	Ixioliriaceae	Asparagales	-	-
Tecophilaeaceae	Tecophilaeaceae	Asparagales	Liliaceae	Tecophilaeales
Doryanthaceae	Doryanthaceae	Asparagales	Agavaceae	Asparagales
Iridaceae	Iridaceae	Liliales (Geosiridaceae élevée au rang de famille)	Iridaceae	Iridales
Xeronemataceae	Xeronemataceae	-	-	-
Asphodelaceae	Asphodelaceae	Asparagales	Liliaceae	Asparagales
Hemerocallidaceae	Hemerocallidaceae	Asparagales (=Phormiaceae)	Liliaceae	Amaryllidales
Xanthorrhoeaceae	Xanthorrhoeaceae	Asparagales	Xanthorrhoeaceae	Xanthorrhoeales
Agapanthaceae	Agapanthaceae	Asparagales, Alliaceae	Liliaceae	Alliaceae
Amaryllidaceae	Amaryllidaceae	Asparagales	Liliaceae	Amaryllidales
Alliaceae	Alliaceae		Liliaceae	Amaryllidales
Themidaceae	Themidaceae	Asparagales, Alliaceae	-	-
Hyacinthaceae	Hyacinthaceae	Asparagales	Liliaceae	Amaryllidales
Hesperocallidaceae	Hesperocallidaceae	-	Liliaceae	Amaryllidales
Aphyllanthaceae	Aphyllanthaceae	Asparagales	Liliaceae	Asparagales
Anemarrhenaceae	Anemarrhenaceae	-	-	-
Agavaceae	Agavaceae	Asparagales	Agavaceae	Amaryllidales
	Anthericaceae	Asparagales	Liliaceae	Asparagales
	Behniaceae	-	-	-
	Herreriaceae	Asparagales	Liliaceae	Asparagales
	Laxmanniaceae	-	-	-
Asparagaceae	Asparagaceae	Asparagales	Liliaceae	Asparagales
	Convallariaceae	Asparagales	Liliaceae	Asparagales

Tableau 4 : Répartition des différentes familles d'Asparagales actuelles au sein des différentes classifications du groupe des « Liliales ». Thorne (1968) regroupait indistinctement toutes ces familles au sein des Liliaceae-Orchidales. Takhtajan (1969) et Cronquist (1981) sont indiqués pour illustrer l'absence de recouvrements existant entre classifications établies sur des critères différents. Les (-) indiquent des familles issues de la phylogénie moléculaire, composées d'espèces classées à l'état dispersé dans des familles selon les classifications précédentes, et dont il n'a pas été retracé l'appartenance. Dahlgren et al. (1985) regroupaient également avec les Asparagales les familles suivantes, qui en sont aujourd'hui exclues : Philesiaceae, Luzuriagaceae, Dracnaceae, Nolinaceae, Asteliaceae, Hanguanaceae, Dasypogonaceae, Calectasiaceae, Cynastraceae, Eriosphaceae, Funkiaceae.

1-1-2 Les apports de la phylogénie moléculaire dans la classification des Asparagales

Les premières phylogénies moléculaires des Lilianae (Asparagales et Liliales *sensu* Dahlgren 1985) sont celles de Duvall et al. (1993) et Chase et al. (1995). Les résultats obtenus ont confirmé les doutes réitérés concernant la classification de ces plantes : les groupes taxonomiques définis se sont souvent montrés sans fondement au regard des résultats de la phylogénie moléculaire, toute l'artificialité des affiliations étant reflétée par la polyphylie des ordres par rapport à la classification qui était la plus utilisée, celle de Dahlgren et al. (1985). Ces phylogénies moléculaires des Asparagales et Liliales ont donc conduit à une révision conséquente des regroupements des différentes familles et de leur composition en espèces (consulter le tableau 5 pour l'importance relative des familles en terme de richesse spécifique).

<i>Asparagales</i> (<i>sensu</i> APG 2003)	<i>nombre de genres</i>	<i>nombre d'espèces</i>
Orchidaceae	788	20 000 (30 000)
Boryaceae	2	12
Blandfordiaceae	1	4
Asteliaceae	4	36
Lanariaceae	1	1
Hypoxidaceae	9	220
Ixioliriaceae	1	3
Tecophilaeaceae	8	23
Doryanthaceae	1	2
Iridaceae	67	1800
Xeronemataceae	1	2
Asphodelaceae	15	785
Hemerocallidaceae	19	85
Xanthorrhoeaceae	1	30
Agapanthaceae	1	9
Amaryllidaceae	59	800
Alliaceae	13	795
Themidaceae	12	62
Hyacinthaceae	70	1 000
Hesperocallidaceae	1	?
Aphyllanthaceae	1	1
Anemarrhenaceae	1	?
Agavaceae	23	637
Asparagaceae	2	295
Convallariaceae	24	475

Tableau 5: Nombre de genres et d'espèces des différentes familles d'Asparagales (l'ordre de rangement est phylogénétique, consulter figure 12).

Les principaux changements concernant les Asparagales sont les suivants :

- Le classement des Orchidaceae et des Iridaceae dans les Asparagales, placées auparavant au sein des Liliales par Dahlgren et al. (1985).

- L'émergence ou la 'résurrection' de familles comportant un faible nombre de genres et/ou d'espèces et à la position taxonomique considérée auparavant comme incertaine (entrent dans ce cas surtout des familles des Asparagales 'inférieures' : Boryaceae, Blandfordiaceae, Lanariaceae, Asteliaceae, etc.).

- De nombreuses espèces rangées dans certaines familles sur la base de critères morphologiques sont reclassées dans d'autres familles ou d'autres ordres sur la base de ces résultats.

La nouvelle classification des Asparagales a été confortée par d'autres travaux de phylogénie moléculaire basés sur plusieurs gènes, notamment celle obtenue sur la base de quatre séquences moléculaires (Fay et al. 2000). Les études de phylogénies à l'échelle des Monocotylédones montrent que le groupe des Lilliales (*sensu* Dahlgren et al. 1985) n'était pas naturel car il s'avère paraphylétique (Duvall et al. 1993).

La réhabilitation du statut familial des petits groupes (tableau 5), ainsi que la reformulation de la classification se confirme (APG 2003 ; Pires et al. 2004, sous presse). Il reste à présent à éclaircir les phylogénies intra-familiales. La définition plus fine de ces relations intrafamiliales grâce aux phylogénies moléculaires s'étend pour l'instant aux familles les plus connues, comme les Asphodelaceae (Chase et al. 2000a), les Hyacinthaceae (Pfosser et Speta 1999 ; Pfosser et al. 2003), les Agavaceae (Bogler et Simpson 1996) et les Amaryllidaceae (Meerow et al. 1999 ; Ito et al. 1999) ou à d'autres familles plus circonscrites (géographiquement, mais aussi en terme de richesse spécifique), comme les Themidaceae (Fay et Chase 1996). Ces études concernent parfois le niveau générique, particulièrement lorsque les données moléculaires sont en conflit avec les données morphologiques, comme par exemple pour *Haworthia*, dans la sous-famille des Aloooideae (Treutlein et al. 2003). Il semble néanmoins qu'une augmentation de l'échantillonnage apportera plus de précisions tant à la définition des familles (et des genres) qu'à leurs positions relatives au sein de l'ordre des Asparagales.

1-1-3 Les nouveaux enjeux de la systématique des Asparagales

L'ensemble des études portant sur le groupe des Asparagales est avant tout marqué par le besoin de discuter et de définir les affinités morphologiques entre les différents groupes redéfinis par les phylogénies moléculaires. Il reste à établir des caractères diagnostiques permettant d'aboutir à une taxonomie pratique. Ce problème est une préoccupation pour les botanistes depuis la clarification des relations entre familles apportée par la phylogénie moléculaire. Les phylogénies moléculaires ont en effet bouleversé la classification et rendu parfois caduques les clés d'identification précédentes (la répartition des caractères

morphologiques dans le groupe est capricieuse et soulève parfois la question de l'homoplasie et de la convergence évolutive, tableau 6). Le phénomène de convergence est conforté par les études cladistiques récentes de Rudall (2002) ou Zomfeler (1999), basées sur des données anatomo-morphologiques. Cette recherche systématique de caractéristiques taxonomiques appropriées prend parfois la forme d'un survol synthétique du clade, comme cela a été conduit chez les Asparagales inférieures sur des critères morphologiques floraux (Kocyan et Endress 2001) ou encore d'études plutôt centrées au niveau de familles phylogénétiques : Asteliaceae et Hypoxidaceae (Rudall et al. 1998), Anthericaceae (Chase et al. 1996), Alliaceae (Rudall et al. 2002), Convallariaceae (Rudall et Campbell 1999). Les familles recirconsrites à partir des Anthericaceae comme les Lomandraceae et les Boryaceae (Chase et al. 1996), les Xeronemataceae (Chase et al. 2000b) ou celles résultant de la résurrection d'anciennes familles comme les Themidaceae (Fay et Chase 1996) ont reçu une certaine attention.

Cependant, des études détaillées manquent encore pour certaines familles (Blandfordiaceae, Doryanthaceae, Xanthorrhoeaceae, Laxmanniaceae, Anemarrhenaceae, Behniaceae), que ce soit à propos de leur morphologie ou de leur composition en espèces (le tableau 5 donne l'importance relative des différentes familles à l'heure actuelle). A ce jour, et toujours en raison d'une forte homoplasie des caractères morphologiques au sein de ce groupe, aucune série de caractères ne permet de dresser une taxonomie logique reflétant la phylogénie moléculaire. On retrouve ce phénomène aussi bien pour les caractères utilisés par Dahlgren (1985), concernant surtout la morphologie des graines, que pour des caractères racinaires (Kauff et al. 2000), dont l'homoplasie reflète probablement des adaptations convergentes aux milieux xériques. Dans le grade des Asparagales inférieures, certains taxons possédant des caractéristiques en commun avec des groupes phylogénétiquement éloignés (*Xanthorrhoea*, *Lanaria*) viennent perturber la topologie des arbres basés sur les analyses cladistiques (Rudall 2002). Les caractères moléculaires, tels l'absence ou la présence d'un gène (tableau 6), sont souvent des caractéristiques de l'ordre entier, à quelques exceptions près. Leur utilisation n'est donc pas d'une plus grande aide.

Parmi les nombreux caractères faisant l'objet d'investigations, on peut noter que certains concernent la microsporogénèse, en particulier le type de cytocinèse. Ce critère s'est révélé utile dans certains cas où la morphologie florale était insuffisante. Par exemple il a permis de distinguer les Anthericaceae, rangées à l'heure actuelle au sein des Agavaceae (APG 2003), qui ont une cytocinèse successive, des Asphodelaceae, qui ont une cytocinèse simultanée (Dahlgren et al. 1985 ; Stedje et Nordal 1994 ; Kativu 1996). La cytocinèse successive est considérée comme une synapomorphie du clade des Asparagales supérieures (Duvall et al. 1993 ; Chase et al. 1995; Rudall et al. 1997).

Systématique		Génétique moléculaire			Marqueurs biochimiques		Biochimie anatomique			Micromorphologie			Biologie florale				Anatomie		
Clade (APG 2003)	Famille (APG 1998)	gène mitochondrial sdh3 perdu	gène mitochondrial rpl2 perdu	perte du télomère de type <i>Arabidopsis</i>	acide chélidonique	anthraquinones	fucians dans les rameaux	fucians racinaire	canaux à muilage	cytokinèse	Stomates aractyiques	poils multicellulaires, branchés	ovaire	tapetum	nectaires	3 étamines	cotylédon non photosynthétique	feuilles spirales	exoderme racinaire à couches multiples
																			?
Orchidaceae	Orchidaceae	+	-	+	+	-	-	-	-	simultanée	-	-	infère	sécréteur	-	-	-	-	?
Boryaceae	Boryaceae	+	-	+	+	-	+	-	-	simultanée	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	+
Blandfordiaceae	Blandfordiaceae	+	-	+	+	-	+	-	-	simultanée	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	-
Asteliaceae	Asteliaceae	+	-	+	+	-	+	-	+	simultanée	+	+	infère/supère	sécréteur	+	-	+	-	+/-
Lanariaceae	Lanariaceae	+	-	+	+	-	+	-	-	simultanée	+	+	infère	sécréteur	+	-	-	-	?
Hypoxidaceae	Hypoxidaceae	+	-	+	+	-	+	-	+	successive	+	+	infère	<i>plasmodial</i>	-	-	+	-	-
Ixioliriaceae	Ixioliriaceae	+	-	+	+	-	+	-	-	simultanée	-	-	infère	sécréteur	+/-	-	-	+	-
Tecophilaeaceae	Tecophilaeaceae	+	-	+	+	-	+	-	-	simultanée	-	-	intermédiaire	sécréteur	+/-	-	-	+	-
Doryanthaceae	Doryanthaceae	+	-	+	+	-	+	-	-	simultanée	-	-	infère	sécréteur	+	-	-	-	+
Iridaceae	Iridaceae	+	-	+	+	-	+	-	-	succ/simul	-	-	infère/supère	sécréteur	+	+	-	-	+/-
Xeronemataceae	Xeronemataceae	+	+	+	+	+	+	-	-	simultanée	-	-	supère	sécréteur	+	-	+	-	-
Asphodelaceae	Asphodelaceae	+	+	+	+	+	+	-	-	simultanée	-	-	supère	sécréteur	+	-	+	-	+/-
Hemerocallidaceae	Hemerocallidaceae	+	+	+	+	+	+	-	-	succ?/simul	-	-	supère	sécréteur	+/-	-	+	-	+/-
Xanthorrhoeaceae	Xanthorrhoeaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	simultanée	+	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	-
Agapanthaceae	Agapanthaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	-
Alliaceae	Alliaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	+/-
Amaryllidaceae	Amaryllidaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	infère	sécréteur	+	-	-	-	-
Themidaceae	Themidaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	+	+	-
Hyacinthaceae	Hyacinthaceae	+	+	+/-	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	+	+	-
Hesperocallidaceae	-	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	?
Aphyllanthaceae	Aphyllanthaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	-
Anemarrhenaceae	Anemarrhenaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	?
Agavaceae	Agavaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	+
	Anthericaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	-
	Behniaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	?
	Herreriaceae	+	+	+	+	-	+	-	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	+/-
Asparagaceae	Laxmanniaceae	+	+	+	+	-	+	+	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	-
	Asparagaceae	+	+	+	+	-	+	+	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	+
	Convallariaceae	+	+	+	+	-	+	+	-	successive	-	-	supère	sécréteur	+	-	-	-	+/-

Tableau 6 : Variation et répartition de quelques caractères au sein des Asparagales.

1-1-4 Diversité du type apertural des Asparagales sur le plan systématique

En tant que caractère morphologique fiable et facilement identifiable (au moins pour un travail systématique de classification des espèces), la morphologie du pollen, et en particulier le type apertural, a été beaucoup étudiée chez les Angiospermes. La première tentative de recensement des morphologies du pollen, sans prétention systématique mais avec un réel effort d'exhaustivité (centré sur l'ensemble des Angiospermes), est le travail de Erdtman (1952). Ce travail présente une description complète de la diversité pollinique rencontrée chez les Angiospermes. Si certains caractères du pollen sont utiles d'un point de vue systématique, ce n'est pas toujours le cas. Ainsi, pour les Asparagales, comme le montre le tableau 7, le type apertural n'offre qu'une faible aptitude à prédire l'appartenance d'une espèce donnée à un quelconque groupe systématique. En effet, d'une part une morphologie (pollen monosulqué) est prépondérante et d'autre part la plupart des morphologies rencontrées dans cet ordre se retrouvent également dans d'autres ordres. Le type apertural ne représente un critère valable de classification que pour différencier certaines espèces dans un genre donné. L'utilité systématique du type apertural semble en effet circonscrite à des échelles taxonomiques relativement réduites : genre et sous-divisions du genre, comme c'est le cas pour le genre *Aristea* (Iridaceae), qui présente une diversité surprenante du type apertural (Goldblatt et al. 2004). Certains types de pollen peuvent cependant parfois être diagnostiques à de plus grandes échelles, comme la présence de pollen di-sulqué chez les Tigridioideae (une sous-famille des Iridaceae ; Rudall et Wheeler 1988). Un autre exemple est la présence caractéristique de pollen trichotomosulqué chez les Hemerocallidaceae, chez qui seules les espèces du genre *Hemerocallis* produisent uniquement du pollen monosulqué (Rudall et al. 1997 ; Xiong et al. 1998).

1-1-5 Organisation de la diversité du type apertural chez les Asparagales

En dépit de son manque d'intérêt sur le plan systématique, le type apertural varie cependant au sein des différentes familles :

- Le pollen monosulqué est la morphologie prépondérante dans toutes les familles.
- Du pollen trichotomosulqué est régulièrement observé en association avec du pollen monosulqué dans le cas des espèces à cytotcinèse simultanée, et est parfois la forme de pollen majoritaire, notamment pour les espèces du « clade trichotomosulqué » (Rudall et al. 1997).
- Les Iridaceae sont la famille la plus diversifiée au niveau du type apertural (tableau 7) : on y recense des pollens monosulqués, trichotomosulqués, disulqués, triaperturés, zonasulqués, ou encore inaperturés.
- Le clade des Asparagales supérieures est très homogène (pollen monosulqué) mais d'autres morphologies aperturales sont parfois rencontrées, comme le pollen disulqué, ou encore plus occasionnellement le pollen zonasulqué ou inaperturé.

Famille (APG 2003)	Type de cytokinèse	Type apertural du pollen
Orchidaceae	simultanée (Brown et Lemmon 1996)	Cypripedioideae : monosulqué , autres : <i>Vanilla</i> triaperturé (Erdtman 1952)
Boryaceae	?	monosulqué (Rudall et al. 1997)
Blandfordiaceae	?	monosulqué (Rudall et al. 1997)
Lanariaceae	simultanée (Rudall et al. 1997)	monosulqué (Rudall et al. 1997)
Asteliaceae	simultanée ? (Rudall et al. 1997)	monosulqué, trichotomosulqué (Rudall et al. 1997)
Hypoxidaceae	successive (Rudall et al. 1998 ; Dahlgren et al. 1985)	monosulqué, diaperturé (Rudall et al. 1998 ; Rudall et al. 1997)
Ixioliriaceae	simultanée (Rudall et Wheeler 1988 ; Dahlgren et al. 1985)	monosulqué (Dahlgren et al. 1985)
Tecophilaceae	simultanée (Rudall et al. 1997 ; Dahlgren et al. 1985)	monosulqué , parfois trichotomosulqué (Rudall et al. 1997 ; Erdtman 1952)
Doryanthaceae	simultanée (Rudall et al. 1997)	monosulqué, trichotomosulqué (Rudall et al. 1997)
Iridaceae	successive ou simultanée (Rudall et al. 1997)	Nivenioideae : monosulqué, diaperturé, zonasulqué triaperturé (Goldblatt et Le Thomas 1993 ; Le Thomas <i>et al.</i> 2001)
		Isophydoideae : monosulqué (Goldblatt et Le Thomas 1992)
		Ixiodeae : monosulqué, zonasulqué, triaperturé (Goldblatt et al. 1991)
		Iridoideae : monosulqué, zonasulqué (Pinar et Dönmez 2000) inaperturé, triaperturé, diaperturé (Goldblatt et Le Thomas 1992) ; Tigridieae : diaperturé (Rudall et Wheeler 1988)
Xeronemataceae	?	monosulqué, trichotomosulqué (Chase et al. 2000b)
Hemerocallidaceae	simultanée (Dahlgren et al. 1985)	monosulqué (Xiong et al. 1998) trichotomosulqué (Rudall et al. 1997)
Xanthorrhoeaceae	successive (Rudall et al. 1997)	monosulqué (Rudall et al. 1997)
Asphodelaceae	simultanée (Dahlgren et al. 1985)	Alooideae : monosulqué (Smith et VanWyk 1992 ; 1993)
		Asphodeloideae : monosulqué (Diaz Lifante 1996 ; Kosenko 1999 ; Huynh 1976) trichotomosulqué (Zomlefer 1999)
Alliaceae	successive (Rudall et al. 1997 ; Dahlgren et al. 1985)	monosulqué (Dahlgren et al. 1985 ; Huynh 1976)
Amaryllidaceae	successive (Rudall et al. 1997 ; Dahlgren et al. 1985)	monosulqué, diaperturé (Dahlgren et al. 1985 ; Erdtman 1952)
Agapanthaceae	successive (auparavant incluse dans les Alliaceae)	monosulqué (Rudall et al. 1997)
Themidaceae	successive (Rudall et al. 1997)	monosulqué (Rudall et al. 1997)
Aphyllantaceae	successive (Dahlgren et al. 1985)	spiraperturé (ouverture en spirale le long de la paroi du pollen) (Dahlgren et al. 1985)
Hyacinthaceae	successive (Dahlgren et al. 1985)	monosulqué (Dahlgren et al. 1985)
Agavaceae sensu lato	successive (Rudall et al. 1997 ; Dahlgren et al. 1985)	monosulqué, diaperturé, zonasulqué (Ambwani et Kumar 1993) monosulqué, diaperturé (Dahlgren et al. 1985) monosulqué (Rudall et al. 1997)
Asparagaceae sensu lato	successive (Rudall et al. 1997 ; Rudall et Campbell 1999 ; Dahlgren et al. 1985)	monosulqué , parfois inaperturé (Rudall et Campbell 1999 ; Dahlgren et al. 1985)

Tableau 7 : Types de cytokinèse et de morphologie pollinique des familles d'Asparagales. Les familles des Asparagales supérieures sont indiquées en gras dans le tableau.

1-2 Diversité de la microsporogénèse chez les Asparagales

Voici nos méthodes et résultats pour l'analyse de la microsporogénèse des Asparagales :

1-2-1 Matériel et méthodes

Différents colorants ont été utilisés afin de déterminer chacun des états de la microsporogénèse chez les plantes étudiées : le Carmin acétique a été utilisé pour déterminer le type de cytocinèse de l'espèce ; le Bleu d'Aniline a été utilisé pour déterminer le type de croissance des plaques cellulaires au cours de la microsporogénèse ainsi que les dépôts de callose supplémentaires et la forme des tétrades ; le Rouge Congo a été utilisé pour observer la position des ouvertures dans la tétrade (voir annexe 1 pour la liste des espèces qui ont fait l'objet d'observations, ainsi que leur numéro d'accession et leur lieu d'origine ; on trouvera à la page qui suit la composition des différents colorants. Le lecteur peut également lire les sections 'matériel et méthodes' des différents articles en annexe 2 pour de plus amples informations). Des étamines de différents individus et à différents stades de développement ont été disséquées et montées sur des lames avec chacun de ces différents colorants. Les observations ont été faites en microscopie soit à en transmission directe pour le Carmin acétique et le Rouge Congo, soit en microscopie à épifluorescence pour le Bleu d'Aniline. Les observations de progression centripète des parois ont également été confirmées par microscopie confocale à la même longueur d'onde que celle utilisée en microscopie à épifluorescence.

1-2-2 Résultats

Les résultats obtenus sont décrits et discutés dans les différents articles en annexe 2 :

- **Aperture pattern and microsporogenesis in Asparagales.** 2003.

Nadot, S., Penet, L., Dreyer, L. D., Forchioni, A., and A. Ressayre. Monocots 3, Ontario, California, April 2003 (symposium report).

- **Multiple developmental pathways leading to a single morph: monosulcate pollen (examples from the Asparagales).** 2005.

Penet, L., Nadot, S., Ressayre, A., Forchioni, A., Dreyer, L., and P.-H. Gouyon. Annals of Botany (95: 331-343).

- **Variation of pollen early development in monocots.**

Nadot, S., Forchioni, A., Penet, L., Sannier, J., and A. Ressayre. Soumis à Protoplasma.

Ces résultats sont également repris ici dans les pages suivantes.

a) ASPARAGALES SUPERIEURES

Les Asparagales supérieures ont une microsporogénèse très conservée et le clade entier montre très peu de variations (tableau **8-a**) :

1. Cytocinèse : elle est caractérisée par un stade dyade. Elle est donc de type successif pour l'ensemble des espèces observées (figures **13-3, 13-4, 13-9, 13-16, 13-22** et **13-28**).

2. Formation des parois callosiques entre les microspores : la cellularisation procède par plaques cellulaires à progression centrifuge, à la suite de la première division nucléaire de la méiose (figures **13-1, 13-2, 13-8**) et au niveau du plan de la deuxième division nucléaire (figures **13-3, 13-10, 13-17, 13-23, 13-30**).

3. Forme des tétrades : les tétrades sont en général quadratiques (figures **13-11, 13-24, 13-31**) ou décussées (figure **13-6**), mais chez certaines espèces d'autres formes de tétrades sont également rencontrées en proportions importantes (par exemple, chez *Albuca nelsonii* on peut observer des tétrades linéaires –figure **13-19**, en Z –figure **13-18**, ou encore en T).

4. Localisation des apertures au sein des tétrades : elle est polaire dans la grande majorité des cas (figures **13-6, 13-12, 13-25, 13-32**) ; une seule espèce de nos données montre probablement une position groupée des apertures dans la tétrade (*Amaryllis belladonna*, tableau **8-a**) en raison de son type apertural di-sulqué, mais les observations sont à confirmer.

5. Type apertural : la morphologie aperturale observée avec nos espèces est très majoritairement le type monosulqué (figures **13-13, 13-20, 13-33**), ou bien l'une de ses variations : le type monosulqué 'à sillon étendu' (figure **13-26**). Seules les espèces *Amaryllis belladonna* et *Aphyllanthes monspeliensis* montrent un type apertural différent : le type di-sulqué pour *Amaryllis* (pour une photographie du pollen, voir encadré **1**), et le type spiraperturé pour *Aphyllanthes*.

A l'exception des formes de tétrades et de variations occasionnelles du type apertural, le clade des Asparagales supérieures montre donc une constance de sa séquence développementale au cours de la microsporogénèse.

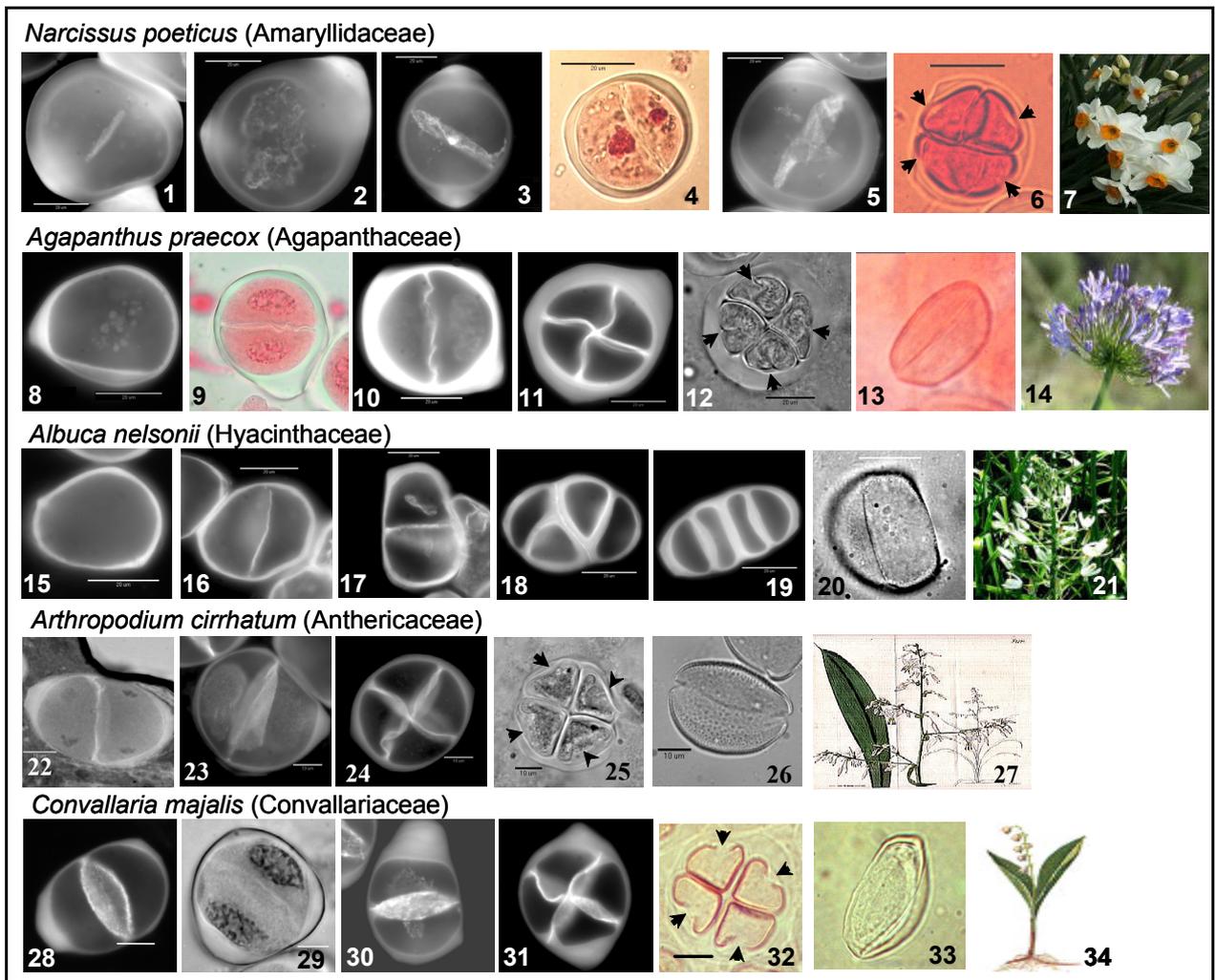


Figure 13 : La microsporogénèse chez quelques espèces d'Asparagales supérieures.

- *Narcissus poeticus* (Amaryllidaceae) : 1, 2, plaques cellulaires centrifuges ; 3 et 4, dyade ; 5 plaques cellulaires centrifuges ; 6, définition polaire des apertures (les flèches indiquent leurs emplacements) ; 7, fleurs.
- *Agapanthus praecox* (Agapanthaceae) : 8, plaques cellulaires centrifuges ; 9, dyade ; 10, plaques cellulaires centrifuges ; 11, tétrade quadratique ; 12, localisation polaire des apertures (les flèches indiquent leurs emplacements) ; 13, pollen monosulqué ; 14, inflorescence.
- *Albuca nelsonii* (Hyacinthaceae) : 15, cellule mère du pollen ; 16, dyade ; 17, plaques cellulaires centrifuges ; 18, tétrade en Z ; 19, tétrade linéaire ; 20, pollen monosulqué ; 21, inflorescence.
- *Arthropodium cirrhatum* (Agavaceae) : 22, dyade ; 23, plaques cellulaires centrifuges ; 24, tétrade quadratique ; 25, définition polaire des apertures (les flèches indiquent leurs emplacements) ; 26, pollen monosulqué (sillon étendu) ; 27, plante.
- *Convallaria majalis* (Convallariaceae) : 28 et 29, dyade ; 30, plaques cellulaires centrifuges ; 31, tétrade quadratique ; 32, localisation polaire des apertures (les flèches indiquent leurs emplacements) ; 33, pollen monosulqué ; 34, plante.

Colorants utilisés (voir annexe 1) : carmin acétique (4, 9, 22, 29), bleu d'aniline (1, 2, 3, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 28, 30, 31) et rouge congo (6, 12, 13, 20, 25, 26, 32, 33).

Les barres d'échelles représentent 20 μ m.

b) ASPARAGALES INFÉRIEURES

Le grade des Asparagales inférieures montre une plus grande diversité à chacune des étapes de la microsporogénèse intervenant dans la mise en place du type apertural (tableau 8-b) :

1. Cytocinèse : elle peut être successive (caractérisée par un stade dyade, figure 13-9), ou plus généralement simultanée (figure 14-1, 14-15, 14-16, 14-22, 14-29, 14-30). Certaines espèces sont caractérisées par un type de cytocinèse intermédiaire (voir article 2, en annexe 2), soit parce qu'une partie de la population de cellules mères du pollen passe par un stade de dyade tandis que le reste présente une cytocinèse simultanée (cas de *Tritonia securigera*), soit parce qu'une plaque cellulaire est initiée à la suite de la première division nucléaire de la méiose mais que la deuxième division de méiose se produit avant le stade dyade, comme observé chez *Hemerocallis fulva* et *Dianella tasmanica* (on observe alors 3 plaques cellulaires au cours de la cytocinèse, ce qui rapproche ce cas d'une cytocinèse de type successive).

2. Formation des parois callosiques entre les microspores : la division de la cellule mère du pollen peut se faire par l'intermédiaire de plaques cellulaires centrifuges (figures 14-8, 14-10, 14-30, 14-31) ou par le biais d'une constriction centripète (figures 14-2, 14-3, 14-16).

3. Forme des tétrades : La forme des tétrades dans ce grade varie de quadratique (figures 14-11, 14-17) à tétraédrique régulière (figures 14-24, 14-25, 14-26), tout en montrant de nombreuses formes intermédiaires : quadratique irrégulière (figure 14-4), rhomboïdale (article 2, annexe 2), tétraédrique asymétrique (figures 14-32, 14-5).

4. Localisation des ouvertures au sein des tétrades : nos observations ont montré une localisation polaire des ouvertures pour toutes nos espèces (figures 14-12, 14-18, 14-27, 14-33).

5. Type apertural : une grande majorité des espèces présente le type apertural monosulqué (tableau 8-b ; figures 14-13, 14-19, 14-34), hormis *Dietes grandiflora*, (pollen zonosulqué, figure 14-6) ou *Phormium tenax* (trichotomosulqué, figure 14-28).

La microsporogénèse est donc plus variable chez les Asparagales inférieures que chez les Asparagales supérieures. On retrouve la séquence de développement observée chez les Asparagales supérieures chez quelques espèces : pour *Hypoxis maheensis* (Hypoxidaceae), et pour *Moraea bipartita* et *M. aristata* (Iridaceae), tandis que le reste du grade se partage en deux grands groupes : les Tecophilaeaceae et les Iridaceae ont plutôt une cytocinèse simultanée et la cytocinèse a lieu par constriction centripète ; les Asphodelaceae et Hemerocallidaceae ont une cytocinèse simultanée et des plaques cellulaires centrifuges.

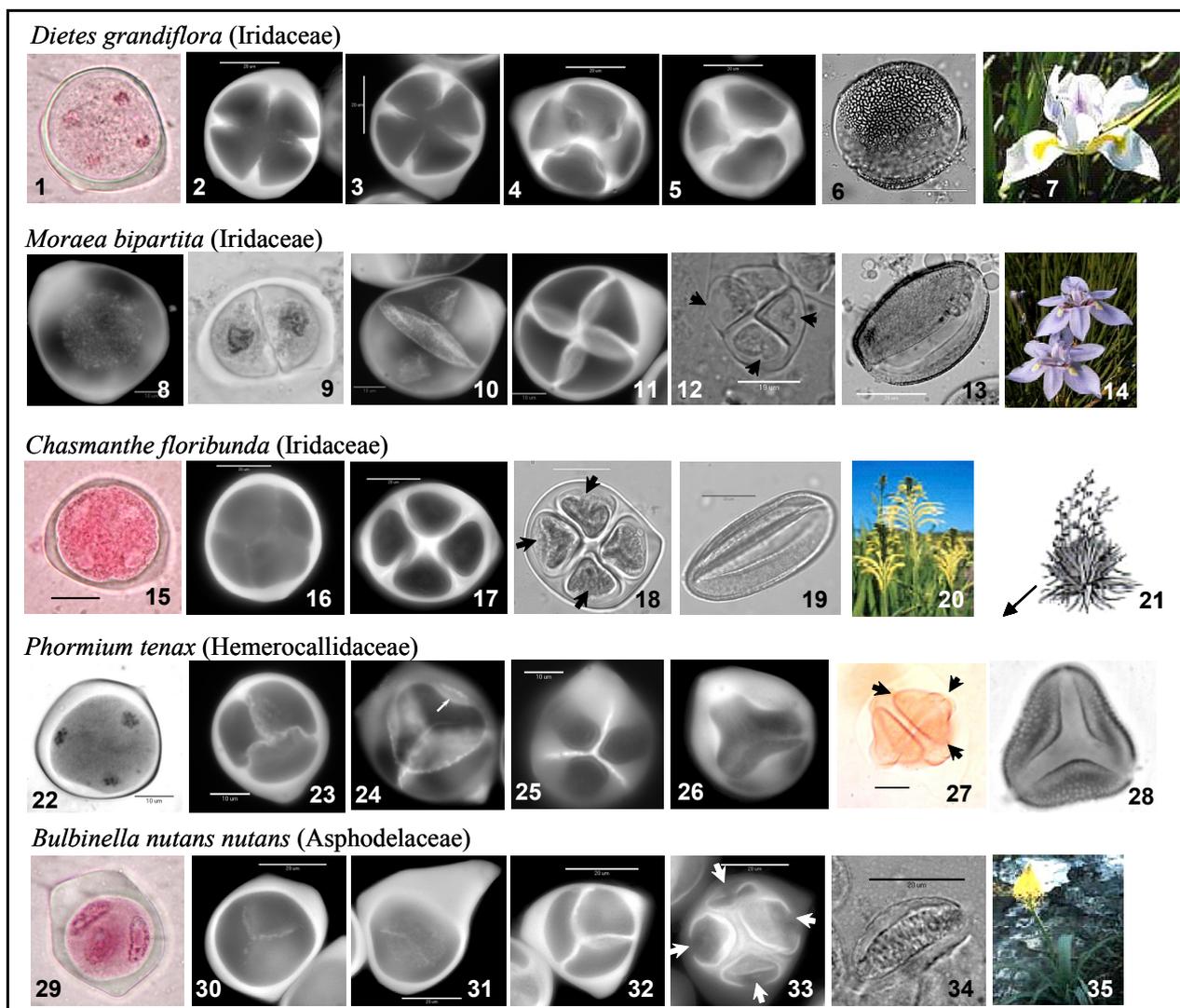


Figure 14 : Microsporogénèse chez les Asparagales inférieures, quelques exemples.

- *Dietes grandiflora* (Iridaceae) : 1, télophase 2 ; 2 et 3, cytokinèse simultanée et progression centripète des plaques cellulaires ; 4 et 5, tétrades tétraédriques irrégulières ; 6, pollen zonosulqué ; 7, fleur.
- *Moraea bipartita* (Iridaceae) : 8, progression centrifuge de la plaque cellulaire séparant les noyaux de première division de méiose ; 9, dyade ; 10, progression centrifuge des plaques cellulaires séparant les noyaux de deuxième division de méiose ; 11, tétrade quadratique ; 12, localisation polaire des ouvertures (les flèches indiquent leurs emplacements) ; 13, pollen monosulqué ; 14, fleurs.
- *Chasmanthe floribunda* (Iridaceae) : 15, télophase 2 ; 16, cytokinèse simultanée et progression centripète des plaques cellulaires (début de la cytokinèse) ; 17, tétrade quadratique ; 18, définition polaire des ouvertures (les flèches indiquent leurs emplacements) ; 19, pollen monosulqué ; 20, inflorescence.
- *Phormium tenax* (Hemerocallidaceae) : 21, plante ; 22 télophase 2 ; 23 et 24, tétrade tétraédrique régulière (symétrique) ; 25 et 26, dépôts supplémentaires de callose dans les tétrades ; 27, localisation polaire des ouvertures, les flèches indiquent les extrémités des sillons du pollen trichotomosulqué ; 28, pollen trichotomosulqué.
- *Bulbinella nutans nutans* (Asphodelaceae) : 29, télophase 2 ; 30 et 31, progression centrifuge des plaques cellulaires ; 32, tétrade tétraédrique asymétrique ; 33, définition polaire des ouvertures (les flèches indiquent leurs emplacements) observée au filtre FITC ; 34, pollen monosulqué ; 35, plante.

Colorants utilisés (voir annexe 1) : carmin acétique (1, 9, 15, 22, 29), bleu d'aniline (2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 16, 17, 23, 24, 25, 26, 30, 31, 32, 33) et rouge congo (6, 12, 13, 18, 19, 27, 28, 34).

Les barres d'échelles représentent 20 µm.

Famille (A. supérieures)	Espèce	Cytocinèse	Plaques cellulaires	Tétrades	Apertures	Type apertural	Remarques
Alliaceae	<i>Allium altaicum</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées (1)	polaire	1S	
	<i>Allium ursinum</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
Amaryllidaceae	<i>Narcissus poeticus</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Amaryllis belladonna</i>	*	*	quadratiques et associées	groupées ?	2S	
Agapanthaceae	<i>Agapanthus umbellatus</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
Themidaceae	<i>Triteleia ixioides ssp scabra</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
Aphyllanthaceae	<i>Aphyllanthes monspeliensis</i>	*	*	quadratiques et associées	-	Sp	« Taille »
Hyacinthaceae	<i>Albuca nelsonii</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Eucomis automnalis</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Hyacinthus non-scriptus</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Ornithogalum longibracteatum</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Veltheimia bracteata</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
Agavaceae	<i>Yucca agavoides</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Beschorneria yuccoides</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	-	Ia	
	<i>Hosta sp</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Arthropodium cirrhatum</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Chlorophytum paucifolium</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
Convallariaceae	<i>Polygonatum multiflorum</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Convallaria majalis</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	

Tableau 8-a : Description des caractéristiques de la microsporogénèse des espèces étudiées – Asparagales Supérieures.

(1) « Quadratiques et associées » signifie que le type majoritaire de tétrades dans les anthères est soit quadratique, soit d'une forme de tétrade qui lui est associée (décussée, en T, en Z, linéaire). * = donnée manquante. Apertures : - = sans définition au sein des tétrades. Type apertural : 1S = monosulqué, 2S = disulqué, Ia = Inaperturé, Sp = spiraperturé. Remarque : « Taille » = croissance spectaculaire du pollen au cours de la maturation, suivant la libération des microspores de la tétrade.

Asparagales inférieures	Espèce	Cytocinèse	Plaques cellulaires	Tétrades	Apertures	Type apertural	Remarques
Hypoxidaceae	<i>Hypoxidia maheensis</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
Tecophileaceae	<i>Cyanella alba</i>	simultanée	centripètes	tétraédriques et associées (1)	polaire	1S	
	<i>Cyanella orchidiformis</i>	simultanée	centripètes	tétraédriques et associées	polaire	1S	
Iridaceae	<i>Babiana angustifolia</i>	simultanée	centripètes	quadratiques et associées	polaire	1S	Anneau de callose
	<i>Babiana disticha</i>	simultanée	centripètes	quadratiques et associées	polaire	1S	Anneau de callose
	<i>Chasmanthe floribunda</i>	simultanée	centripètes	mixte (2)	polaire	1S	
	<i>Crocoshia massinorum</i>	simultanée	centripètes	mixte	polaire	1S	
	<i>Dietes grandiflora</i>	simultanée	centripètes	mixte	polaire	Zn	
	<i>Ferraria crispa</i>	simultanée	centripètes	mixte	polaire	1S	
	<i>Freesia sp</i>	simultanée	centripètes	mixte	polaire	1S	
	<i>Gladiolus italicus</i>	simultanée	centripètes	mixte	polaire	1S	
	<i>Iris pseudoacorus</i>	simultanée	centripètes	quadratiques et associées	polaire	1S	Anneau de callose
	<i>Ixia lutea lutea</i>	simultanée	centripètes	quadratiques et associées	polaire	1S	Anneau de callose
	<i>Libertia chilensis</i>	simultanée	centripètes	tétraédriques et associées	polaire	1S	
	<i>Libertia formosa</i>	simultanée	centripètes	tétraédriques et associées	polaire	1S	
	<i>Moraea bipartita</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Moraea aristata</i>	successive	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Sisyrinchium striatum</i>	simultanée	centripètes	tétraédriques et associées	polaire	1S-3ts	Hétéromorphisme
	<i>Tritonia securigera</i>	intermédiaire	centripètes	quadratiques et associées	polaire	1S	Anneau de callose
	<i>Aristea ecklonii</i>	simultanée	centripètes	tétraédriques et associées	polaire	1S	
<i>Watsonia aletroides</i>	simultanée	centripètes	quadratiques et associées	polaire	1S	Anneau de callose	
<i>Tigridia mexicana</i>	*	*	quadratiques et associées	groupées	2S		
Hemerocallidaceae	<i>Hemerocallis fulva</i>	intermédiaire	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Dianella tasmanica</i>	intermédiaire	centrifuges	mixte	polaire	1S-3ts	Hétéromorphisme
	<i>Phormium tenax</i>	simultanée	centrifuges	tétraédriques et associées	polaire	3ts	
Asphodelaceae	<i>Aloe globulifera</i>	simultanée	centrifuges	tétraédriques et associées	polaire	1S	
	<i>Asphodeline liburnica</i>	simultanée	centrifuges	tétraédriques et associées	polaire	1S	
	<i>Bulbine alooides</i>	simultanée	centrifuges	tétraédriques et associées	polaire	1S	
	<i>Bulbinella n. ssp nutans</i>	simultanée	centrifuges	tétraédriques et associées	polaire	1S	
	<i>Kniphofia praecox</i>	simultanée	centrifuges	tétraédriques et associées	polaire	1S	
	<i>Trachyandra muricata</i>	simultanée	centrifuges	quadratiques et associées	polaire	1S	
	<i>Trachyandra sp.</i>	simultanée	centrifuges	tétraédriques et associées	polaire	1S	

Tableau 8-b : Description des caractéristiques de la microsporogénèse des espèces étudiées – Asparagales inférieures.

(1) « Tétraédriques et associées » signifie que le type majoritaire de tétrades dans les anthères est soit tétraédrique, soit d'une forme de tétrade qui lui est associée (tétraédrique asymétrique, rhomboïdale). (2) « Mixte » signifie qu'aucune forme de tétrade majoritaire (quadratique ou tétraédrique) n'existe dans la population. * = donnée manquante. Type apertural : 1S = monosulqué, **Zn** = zonasulqué, **2S** = disulqué, **3ts** = trichotomosulqué. Remarque : hétéromorphisme = une forme de pollen minoritaire est présente en proportions > 1% ; Anneau de callose = mise en place d'un anneau de callose durant la méiose.

1-2-3 Discussion

a) Validité du modèle

Ce travail se base sur le modèle de développement de Ressayre et al. (2002). Les résultats obtenus chez les Asparagales permettent notamment d'en tester la validité. Le tableau 9, résume les séquences de développement observées et confronte le type apertural observé au type apertural prédit :

Cytocinèse	Formation des parois + dépôts callosiques	Forme des tétrades	Localisation des apertures	Type apertural observé	Type apertural prédit
Successive	Centrifuge/plan	Quadratique	Polaire	Monosulqué	Monosulqué
Simultanée	Centripète/cellule	Toutes formes	Polaire	Zonasulqué	Zonasulqué
Simultanée	Centrifuge/plan	Tétraédrique	Polaire	<u>Monosulqué</u> et/ou Trichotomosulqué	Trichotomosulqué
Simultanée	Centripète/plan	Tétraédrique	Polaire	<u>Monosulqué</u> et/ou Trichotomosulqué	Trichotomosulqué
Simultanée	Centrifuge/plan	Rhomboïdale	Polaire	Monosulqué	Monosulqué, Tétrachotomosulqué
?	?	quadratique	Groupées	Disulqué	Disulqué

Tableau 9 : Conformité du modèle par rapport aux types aperturaux observés. En grisé, les types aperturaux observés et non prédits par le modèle, ou attendus et non observés. En souligné, les morphologies majoritairement observées ; en grisé, celles qui ne sont pas observées bien que prédites par le modèle.

Les observations montrent que le modèle est effectivement prédictif dans la grande majorité des cas. Cependant, certaines situations semblent en conflit avec les prédictions du modèle.

Certaines variations n'affectent pas le type apertural prédit par le modèle, par exemple les variations de forme de tétrades. Cependant, avec une cytokinèse successive (tétrades linéaires, en T, en Z, figures 13-18 et 13-19 par exemple), la variation de forme des tétrades n'affecte pas le type apertural produit. Il n'en n'est pas de même pour les situations où la cytokinèse est simultanée. Dans ce cas, le type apertural produit n'est pas celui prédit par la géométrie de forme des tétrades dans le modèle. D'une part on n'observe pas de type apertural tétrachotomosulqué avec des tétrades rhomboïdales alors que le modèle prédit une situation d'hétéromorphisme (occurrence simultanée de plusieurs morphologies, voir partie 2 sur la sélection pour plus de détails sur ce phénomène), ici du pollen monosulqué et du pollen

tétrachotomosulqué. D'autre part certaines tétrades tétraédriques n'entraînent pas la formation de pollen trichotomosulqué mais aboutissent à la formation de pollen monosulqué.

Ces situations peuvent trouver une explication dans le fait que le modèle est « incomplet » : seules des figures géométriques régulières pour les tétrades font l'objet d'une description (tétrades quadratiques, rhomboïdales, ou tétraédriques). Le modèle ne fait en effet pas de prédiction pour les formes de tétrades intermédiaires entre ces configuration-types. Nos observations montrent que la forme des tétrades varie considérablement, et au-delà des formes régulières prises en compte dans le modèle. On observe notamment que la production de pollen monosulqué à la place de pollen trichotomosulqué intervient à chaque fois que la géométrie tétraédrique est imparfaitement réalisée, c'est-à-dire lorsque les tétrades tétraédriques sont asymétriques (figures 14-32 et 14-33 ; figure 15). Cette observation se répète dans de nombreux cas : lorsque les tétrades tétraédriques sont asymétriques, le pollen est monosulqué (par exemple chez les *Asphodelaceae*) ; lorsqu'elles sont tétraédriques et régulières, on obtient le type apertural trichotomosulqué prédit par le modèle (par exemple chez *Phormium tenax*). Enfin, lorsqu'on observe à la fois des tétrades tétraédriques régulières et asymétriques, on obtient pour le pollen une situation d'hétéromorphisme avec présence des types aperturaux monosulqués et trichotomosulqués au sein de la plante (comme par exemple chez *Sisyrinchium striatum* ou *Dianella tasmanica*). Cette situation s'explique probablement par un effet seuil pour le type apertural en liaison avec la forme de la tétrade, et à partir duquel le type apertural change d'une configuration à l'autre. Cette hypothèse permet également d'expliquer la situation d'absence de pollen tétrachotomosulqué : il est en effet fort probable qu'une configuration rhomboïdale régulière soit une figure difficile à réaliser, les quatre noyaux devant impérativement se retrouver sur un même plan. Dans ce cas, la probabilité de produire du pollen tétrachotomosulqué est très faible. Ceci correspond aux observations puisque ce type apertural n'a été recensé jusqu'à présent que comme forme pollinique minoritaire (consulter la bibliographie citée dans Ressayre et al. 2002).

Ces cas sont intéressants car ils illustrent des situations où le type apertural peut prendre des états différents avec des modifications mineures du développement (forme de la tétrade). Nous verrons plus loin que cet effet de seuil, basé sur la forme des tétrades et permettant de passer d'une morphologie à l'autre apporte de bons arguments en faveur d'un rôle non négligeable de la sélection naturelle sur la morphologie pollinique.

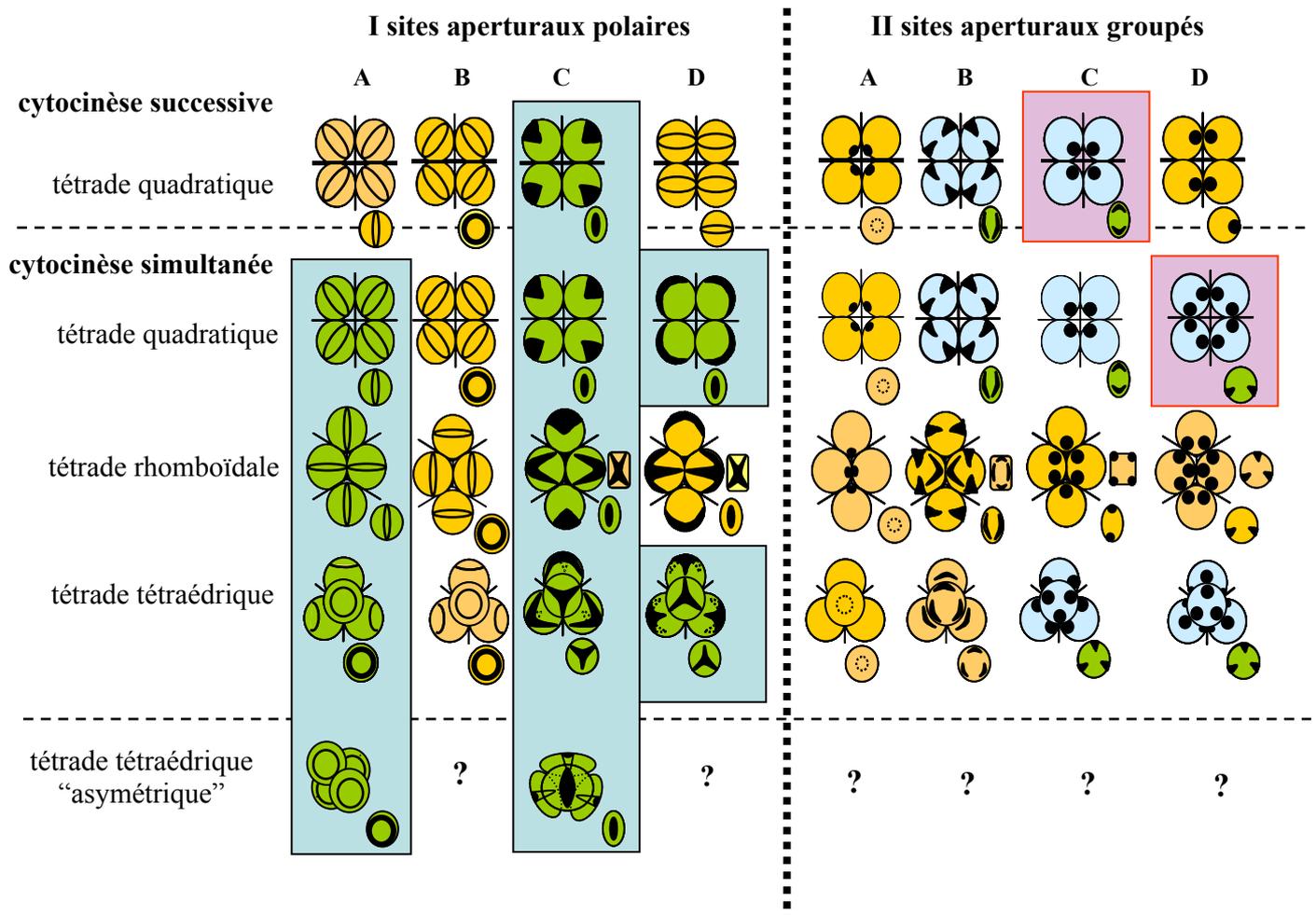


Figure 15 : Répartition des types de développement chez les Asparagales, en relation avec le modèle de Ressayre et collaborateurs (2002).

- Tétrades en vert : le développement où le pollen est observé dans notre échantillonnage (Asparagales).
- Tétrades en orange : le développement où le pollen n'est pas observé dans notre échantillonnage.
- Tétrades en bleu : séquence développementale possible pour les espèces d'Asparagales présentant un type apertural à deux ouvertures (*Amaryllis belladonna*, *Tigridia mexicanensis*) ou trois ouvertures (*Zygotritonia crocea*, *Aristea sp*).
- ' ? ' marque l'absence d'observation de tétrades tétraédriques asymétriques chez les espèces à sites aperturaux groupés. Pour la légende des colonnes A, B, C, et D, se reporter à la figure 9.
- Surface bleue : diversité du développement observée chez les Asparagales d'après nos résultats.
- Surface rose : II C, développement probable chez *Amaryllis belladonna* ; II D, celui réalisé par *Tigridia mexicanensis* (ces observations sont préliminaires et restent à confirmer).

Remarque :

Les dépôts de callose secondaires, après cytocinèse, peuvent influencer l'établissement du pattern apertural selon qu'ils sont centrifuges ou centripètes et au niveau du plan ou de la cellule. Ces dépôts peuvent parfois être mis en place dans un sens différent de celui qui a lieu lors de la formation des plaques cellulaires, et dans ce cas, prévalent généralement dans l'établissement du type apertural. Chez les Asparagales cependant, ces dépôts sont souvent absents ou n'ont pas pu être observés de façon détaillée pour des raisons d'échantillonnage, et cet aspect de l'établissement du pattern apertural n'a pas été étudié plus en détail.

b) Variabilité du développement au cours de la microsporogénèse

Les étapes de la microsporogénèse sont donc variables et diversifiées à l'échelle des Asparagales. Concernant le caractère le plus étudié dans la littérature, c'est-à-dire le type de cytokinèse, nos résultats confirment l'étude de Rudall et Furness (1997), qui a établi une transition vers une cytokinèse simultanée dans le grade des Asparagales inférieures (avec des réversions occasionnelles chez certaines espèces) suivie d'une réversion vers une cytokinèse successive dans le clade des Asparagales supérieures (articles 1 et 2, en annexe 2). Nos résultats montrent qu'il existe plusieurs situations de cytokinèse intermédiaires (article 2) : des espèces ont des cytokinèses qui tendent à se rapprocher d'une cytokinèse successive, sans pour autant que l'on observe de dyades. Le phénomène se produit aussi bien quand la formation des parois s'opère par constriction centripète, avec la présence d'un anneau de callose élaboré entre les deux divisions nucléaires de la méiose (une caractéristique propre à certaines Iridaceae chez les Asparagales), que lorsque la division cellulaire a lieu grâce à des plaques cellulaires centrifuges (formation de 3 plaques cellulaires, au lieu de 4, 5 ou 6 comme lorsque la cytokinèse est véritablement simultanée). L'occurrence indépendante et répétée d'espèces présentant ces cytokinèses intermédiaires (pseudo-successives) laisse penser qu'il existe un avantage à contraindre la forme des tétrades à la manière d'une cytokinèse successive. De même, la réversion vers une cytokinèse successive chez les Asparagales supérieures n'est probablement pas fortuite, mais pourrait certainement être liée à un avantage associé à la production des formes de tétrades qui en résultent. La nature de cet avantage est encore inconnue, mais on peut suspecter que cet avantage est la canalisation vers le type apertural monosulqué.

Nos résultats indiquent que la formation des parois callosiques, qui isolent les microspores à partir de la cellule mère du pollen, est une étape du développement variable dans cet ordre. On y observe des plaques cellulaires centrifuges mais aussi un mode de cytokinèse par constriction centripète, ce qui n'avait auparavant été décrit que pour les Eudicotylédones. La forme des tétrades apparaît aussi comme un facteur hautement variable, parfois comme un critère déterminant pour le type apertural obtenu (en cytokinèse simultanée, cas discutés dans le chapitre précédent), parfois comme un critère sans influence sur le type de pollen produit (en cytokinèse successive). Chez les Asparagales supérieures, il arrive que certaines espèces présentent une majorité de tétrades considérées comme plutôt rares (tétrades linéaires, en T, et autres formes associées –figures 13-18 et 13-19) dans des proportions importantes. C'est le cas par exemple d'*Albuca nelsonii* (Hyacinthaceae), chez qui les tétrades linéaires ou en T sont les formes majoritaires. Ces variations de forme des tétrades chez les Asparagales supérieures ne semblent pas modifier le type apertural, du pollen monosulqué étant produit chez l'ensemble de ces espèces.

Un dernier caractère est enfin essentiel dans l'établissement du type apertural : il s'agit de la localisation des ouvertures dans les tétrades. Nos observations ne nous permettent pas de détailler davantage l'évolution de ce caractère puisque nous n'avons observé la microsporogénèse que chez des espèces ayant une localisation polaire de leur ouverture. Il est reporté dans la littérature l'existence de pollen di-sulqué chez certaines espèces des Asparagales supérieures, comme *Agave americanum* (Agavaceae) (Ambwani et Kumar 1993) ou *Amaryllis belladonna* (Amaryllidaceae ; Erdman 1952). Une définition groupée des ouvertures dans les tétrades est également décrite dans la littérature dans le grade des Asparagales inférieures (*Vanilla*, Orchidaceae ; *Cucurliigo* sp, Hypoxidaceae ; sous-famille des Tigridioideae, Iridaceae, tableau 7). Nous n'avons pu cependant observer la microsporogénèse chez ces espèces. Cette variation du type apertural correspond à des transitions d'une définition polaire des ouvertures vers une définition groupée, mais nous ne savons pas si ces transitions se sont également accompagnées d'autres modifications de la microsporogénèse (type de cytocinèse par exemple).

Cette diversité de la microsporogénèse ne se répartit pas de façon aléatoire au niveau de la phylogénie, et certaines tendances se dessinent au niveau familial :

- Les Hemerocallidaceae, Asphodelaceae et Xanthorrhoeaceae sont caractérisées par une cytocinèse simultanée et des plaques cellulaires centrifuges. Cette séquence du développement aboutit à la production de pollen monosulqué et/ou trichotomosulqué en fonction de la forme des tétrades.
- Les Tecophilaeaceae et Iridaceae ont essentiellement une cytocinèse simultanée et une progression centripète des plaques cellulaires.
- Les Asparagales supérieures sont caractérisées par une cytocinèse successive, des plaques cellulaires centrifuges, des tétrades quadratiques ou décussées, ainsi qu'une définition polaire des ouvertures dans les tétrades ; toutes ces options aboutissant à la formation de pollen monosulqué. Cette séquence se retrouve de façon récurrente et occasionnelle dans différentes familles du grade des Asparagales inférieures : les Hypoxidaceae (*Hypoxis maheensis*), et les Iridaceae (*Moraea bipartita* et *M. aristata*).

Cette situation permet donc d'observer une certaine constance à l'échelle de la phylogénie : globalement, les espèces d'une famille (ou d'un ensemble de famille comme c'est le cas pour les Asparagales supérieures, à l'échelle d'un clade entier) présentent des séquences de la microsporogénèse très similaires entre elles (figure 16), à quelques variations près. *Ce pattern s'explique notamment par un faible nombre de transitions (en parcimonie), qui ségrège grades et clades en groupes de développement homogènes* (figure 17).

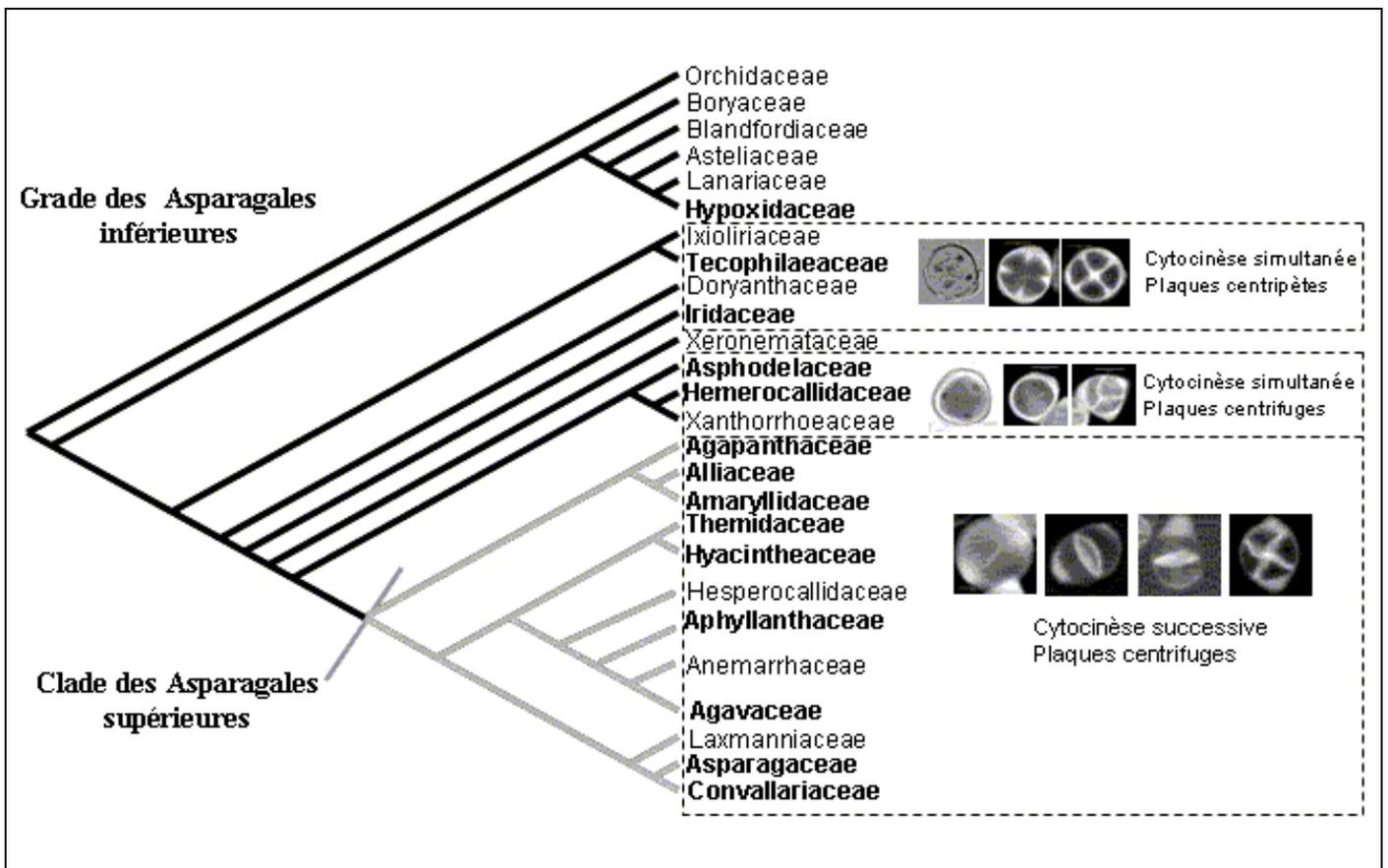


Figure 16 : Séquences développementales majoritaires des familles étudiées et leur distribution sur la phylogénie.

c) Exploration du champ des possibles et contraintes développementales

La microsporogénèse s'avère donc très diversifiée à l'échelle de cet ordre. En particulier, on y rencontre certaines variations inattendues, comme la formation centripète des parois callosique, auparavant décrite uniquement pour les Eudicotylédones. Une variabilité de la formation des parois se retrouve également dans d'autres groupes de Monocotylédones, comme les palmiers (J. Sannier, communication personnelle). La diversité concerne l'ensemble des caractères développementaux étudiés. *L'exploration du champ des possibles semble donc moins contraint qu'il n'y paraîtrait a priori*, comme le suggère le large recouvrement en types de développement que le modèle autorise (figure 15 : l'espace occupé par les séquences développementales observées représente un relativement grand échantillon des séquences possibles : 9/16, soit un peu plus de la moitié des types développementaux proposés par le modèle). Cependant, l'observation du pattern évoqué précédemment, qui permet d'observer une ségrégation en groupes de séquences de développement très similaires (figure 16), nous laisse supposer que *la microsporogénèse n'évolue pas aussi librement qu'elle n'y paraît*. Il semble que cette évolution présente une certaine inertie phylogénétique, et cela fera l'objet du chapitre suivant.

Cependant, si les étapes de la microsporogénèse sont variables, les types aperturaux produits chez *les espèces observées sont avant tout caractérisés par la prépondérance du pollen monosulqué* par rapport aux autres types. Ce résultat, sachant que la diversité de la microsporogénèse permet potentiellement de produire d'autres morphologies aperturales, suggère que la sélection joue un rôle sur ce caractère. Il semblerait donc qu'elle retienne préférentiellement les combinaisons développementales qui aboutissent à la formation de pollen monosulqué. La sélection agit notamment en retenant les modifications de la microsporogénèse orientant vers la production de tétrades asymétriques, ou par la mise en place de structures canalisant directement la forme des tétrades (vers une forme quadratique) et conséquemment le type apertural produit (pollen monosulqué) : l'anneau de callose chez les Iridaceae ou la cytokinèse intermédiaire des Hemerocallidaceae (article 2, annexe 2).

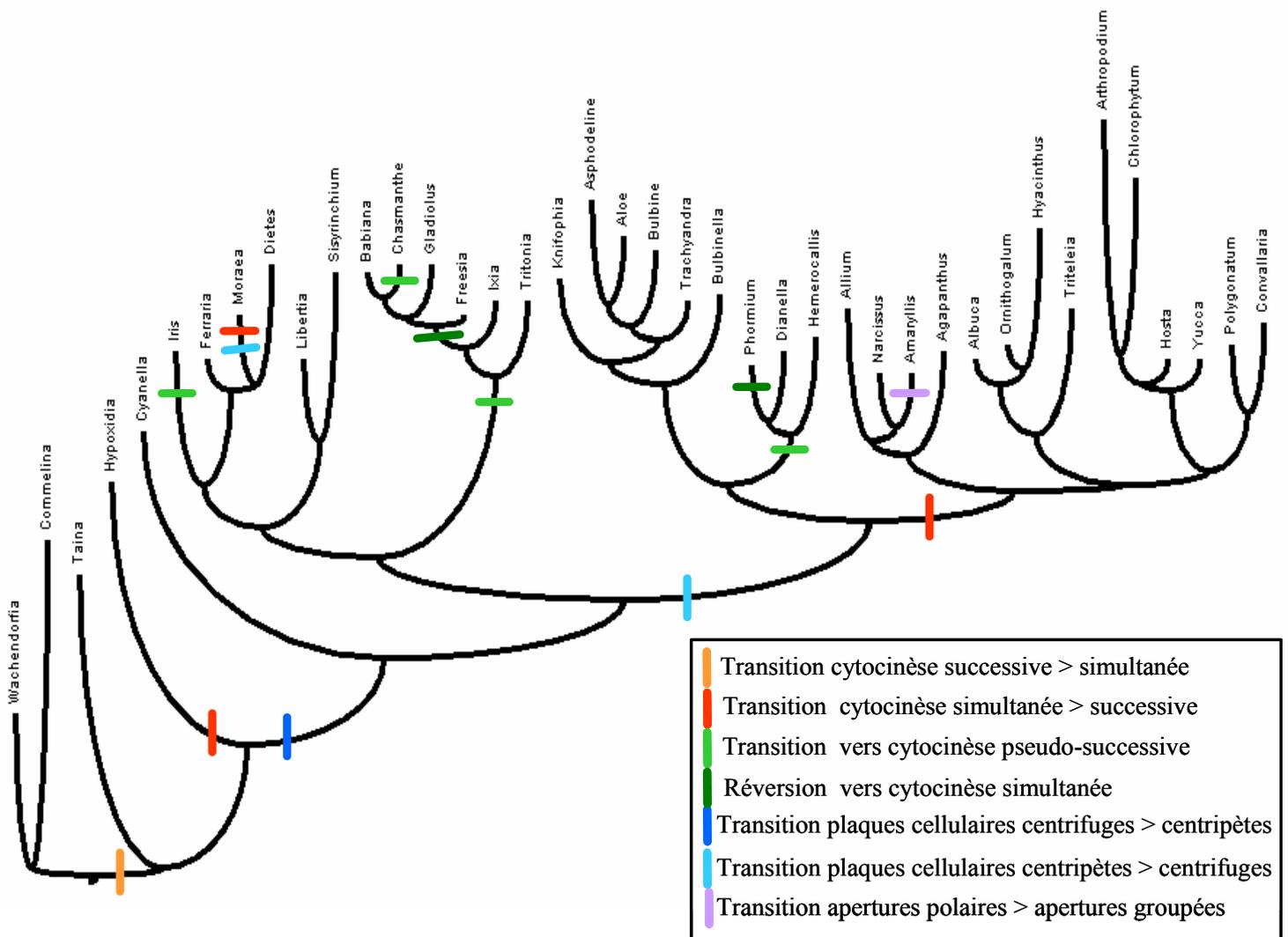


Figure 17 : Phylogénie des espèces étudiées et reconstruction par parcimonie des transitions de caractères de la microsporogénèse. Cette phylogénie est basée sur le gène chloroplastique *rbcL* et sa topologie a été contrainte selon celle l'APG (2003), qui fait consensus. La longueur des branches illustre la distance génétique séparant alors les taxons. L'arbre est enraciné grâce aux genres *Wachendorfia* et *Commelina* utilisés comme groupes externes.

1-3 Analyse comparative du développement du type apertural des Asparagales

D'un point de vue historique, les études concernant les comparaisons entre espèces se sont longtemps basées sur des analyses statistiques classiques sans tenir compte de l'histoire évolutive des espèces. Cette approche a été remise en cause il y a un peu moins d'une vingtaine d'années (Felsenstein 1985 ; Donoghue 1989) car la comparaison entre espèces viole une des conditions de base de ces statistiques : les procédures classiques requièrent en effet que les données de l'échantillon analysé soient indépendantes les unes des autres. Or les espèces actuelles dérivent d'espèces ancêtres sur le mode « généalogique » et sont plus ou moins proches les unes des autres. Leurs caractéristiques biologiques dépendent donc à la fois de celles qu'elles héritent de leurs ancêtres (inertie phylogénétique) et de celles qu'elles acquièrent par divergence au fil du temps. On s'attend donc à ce que les espèces « généalogiquement » proches soient plus similaires entre elles que ne le sont deux espèces généalogiquement plus distantes.

Ainsi, l'état d'un caractère n'est pas indépendant de l'histoire évolutive des espèces comparées (Felsenstein 1985). Il en résulte que l'échantillonnage effectif est surestimé si l'on procède à des analyses statistiques traditionnelles (deux espèces phylogénétiquement proches comptent pour une part égale à deux espèces phylogénétiquement distantes alors qu'elles divergent en réalité depuis beaucoup moins longtemps). Il faut trouver un moyen de prendre en compte l'information évolutive liée à la phylogénie des espèces étudiées. Les méthodes d'analyses comparatives intégrant la phylogénie peuvent permettre de répondre avec une plus grande fiabilité à de nombreuses questions d'ordre évolutif ou écologique et même de diversifier les questions relatives aux comparaisons interspécifiques : Le caractère étudié est-il phylogénétiquement contraint ? Quel en était l'état ancestral ? Deux traits (ou une caractéristique biologique et un facteur environnemental) sont-ils corrélés ?

Les méthodes d'analyse ont évolué et on peut aujourd'hui tester l'évolution des caractères entre les espèces par des méthodes qui incorporent les effets phylogénétiques (Pagel et Lutzoni 2002 ; Freckleton et al. 2002). Les deux méthodes les plus utilisées sont, par exemple, la méthode des **Contrastes Indépendants** pour les caractères quantitatifs (Felsenstein 1985), ou par **estimation par vraisemblance** des paramètres de modèles d'évolution (indépendante et corrélée) pour les caractères qualitatifs (détaillé plus loin dans les méthodes, Pagel 1994 ; 1997).

La microsporogénèse chez les Asparagales montre une grande diversité ; cependant, cette diversité est structurée en groupes d'espèces présentant un développement très proche. Nous avons examiné l'évolution des étapes du développement (type de cytokinèse, formation des parois, type de tétrade) par une analyse comparative, afin de :

- Rechercher les états ancestraux aux étapes de la microsporogénèse :

Cela permet d'affiner les inférences sur le sens des transitions évolutives, et également de déduire la séquence de développement ancestrale du groupe et le type apertural à chacun des nœud-ancêtres.

- Tester l'inertie phylogénétique, souvent considérée comme indicatrice de contraintes développementales :

Si les changements évolutifs se traduisent par un regroupement « en îlot » plus ou moins homogène d'un état de caractère sur la phylogénie, un signal peut être détecté (testé contre une distribution aléatoire) et indiquer un biais dans l'évolution de ce caractère (figure 18). Les contraintes développementales sont souvent associées au phénomène d'inertie phylogénétique, qui traduit le fait que les changements sur une phylogénie se produisent à un rythme suffisamment lent pour que les taxons terminaux soient plus similaires entre taxons apparentés qu'entre taxons à des nœuds plus éloignés. Cette interprétation de la nature du signal présent dans une phylogénie peut cependant être trompeuse, car l'inertie phylogénétique peut également traduire un effet de la sélection (sélection stabilisante sur le caractère par exemple).

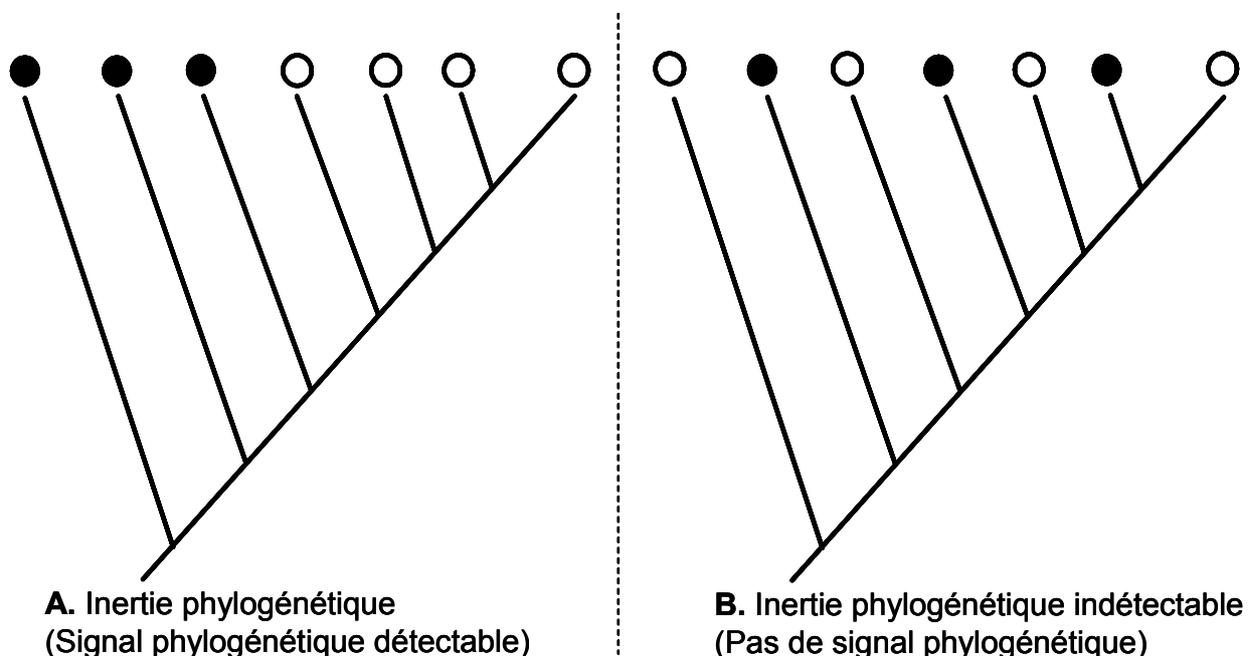


Figure 18 : Schématisation du phénomène d'inertie génétique sur une phylogénie. Les espèces de cette phylogénie théorique ont un caractère pouvant prendre deux états (blanc ou noir). Leur répartition sur la phylogénie illustre deux cas différents : un cas où le signal phylogénétique est fort (A), un cas où il est faible (B).

- tester une évolution corrélée entre états aux différentes étapes du développement :

Ce test va nous permettre de déceler une éventuelle interaction entre les composantes développementales. En effet, une des caractéristiques du développement est l'intégration de ses différentes composantes pour construire le phénotype : les structures mise en place sont souvent en interaction les unes avec les autres. Cela peut se traduire par des corrélations entre les différents états aux différentes étapes du développement. Un des principes de l'analyse comparative est notamment d'étudier la corrélation entre caractères, que cette corrélation ait pour origine l'adaptation liée à la sélection naturelle ou qu'elle soit une conséquence du développement. Nous avons donc testé l'existence d'une telle corrélation entre nos caractères de la microsporogénèse.

1-3-1 Méthodes d'analyse comparative

a) Reconstruction des états ancestraux : la reconstruction des états ancestraux a été réalisée à l'aide du logiciel d'analyses comparatives Mesquite (Maddison et Maddison 2004a). Les états ancestraux ont été inférés à partir des données sur la base de trois modèles différents :

- par parcimonie (Maddison et Maddison 2004a),
- par vraisemblance avec un modèle à taux de transitions symétriques ; les transitions et réversion sont estimées par maximum de vraisemblance par un seul paramètre et les évènements se produisent donc avec une probabilité identique (Maddison et Maddison 2004b),
- par vraisemblance avec un modèle à taux de transitions asymétriques (pour lequel les taux de transition et de réversion diffèrent : ils sont estimés chacun par vraisemblance et par un paramètre différent) (Maddison et Maddison 2004b).

b) Signal phylogénétique : le test été effectué à l'aide du logiciel Mesquite (Maddison et Maddison 2004a). Il est fondé sur la base de la comparaison du nombre de transitions observées pour les données avec la distribution du nombre de transitions obtenues lors de simulations par une répartition aléatoire des états terminaux sur la phylogénie (leur proportion restant la même) (Laurin 2004). Les transitions sont estimées par méthode de parcimonie, transitions et réversions étant comptabilisées de la même façon. Le signal phylogénétique a été testé pour les caractères du développement qui montraient une répartition suffisante sur la phylogénie, c'est-à-dire lorsque que le nombre d'occurrences de l'état d'un caractère sur la phylogénie permettait d'établir une distribution pour le nombre de transitions permettant de réaliser le test. Ceci était le cas pour le type de cytokinèse, la progression des plaques cellulaires et le type majoritaire de tétrades. Les autres caractères, présence d'un anneau de callose (caractère limité à certaines Iridaceae), localisation des apertures dans la tétrade et

type apertural, n'étaient pas suffisamment variables avec nos données pour pouvoir effectuer un test.

c) Corrélations de caractères : Il est possible, pour des caractères discrets, de réaliser le « Concentrated Change Test » (Maddison, 1990), qui consiste à tester l'hypothèse que les changements d'un caractère sont plus fréquemment associés à une transition pour un autre caractère. Néanmoins, ce test est sensible et nécessite que les états ancestraux soient définis sans ambiguïté, ce qui n'est pas le cas pour nos résultats (nous allons le voir). D'autrepart, les branches qui témoignent des transitions nécessaires ne sont pas assez nombreuses, en raison du signal phylogénétique détecté (nous allons le voir), ce qui aurait diminué la puissance du test. L'évolution corrélée entre deux caractères a donc été testée avec le logiciel Discrete (Pagel 1994), par le rapport des vraisemblances de deux modèles (figure 19) dont les paramètres (taux de transition) sont estimés par maximum de vraisemblance. Le modèle d'évolution indépendante repose sur l'estimation de quatre paramètres (taux de transition « forward », ou α , et réversion « backward », ou β , pour chacun des caractères), tandis que le modèle d'évolution corrélée en estime huit, chacun correspondant à l'estimation du taux de transition d'un état du phénotype vers deux états possibles.

Les modèles sont testés l'un contre l'autre, en comparant le rapport de leur Vraisemblance. Le modèle indépendant est pris comme modèle témoin. Le modèle dépendant explique significativement mieux les données si le rapport de Vraisemblance ($L_{\text{dépendant}}/L_{\text{indépendant}}$) dépasse le seuil de rejet (à 5%) d'une loi de Chi-deux à quatre degré de liberté, car les modèles diffèrent entre eux par 4 paramètres (Pagel 1997).

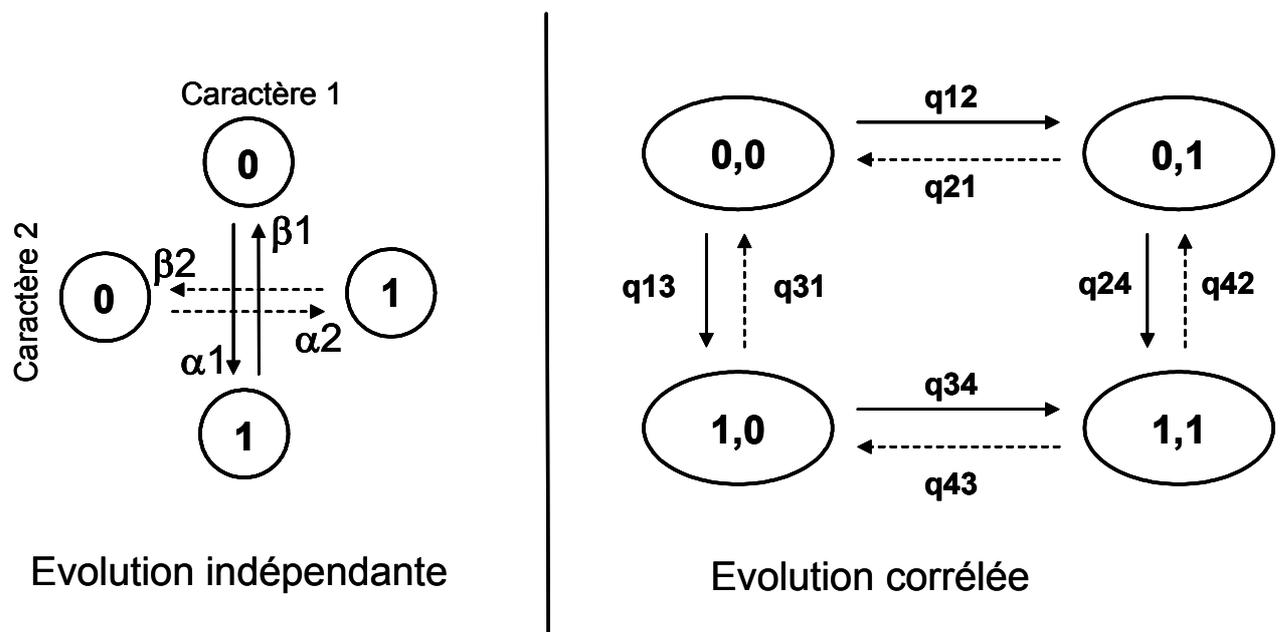


Figure 19 : Les deux modèles de base utilisés pour le test de l'évolution corrélée. Le premier suppose l'évolution indépendante des caractères, et peut donc être décrit sur la base de quatre paramètres (taux de transitions et réversions pour chaque caractère) ; le second suppose que chaque transition d'un état à un autre est dépendant de l'état du caractère associé, et nécessite donc huit paramètres (en faisant l'hypothèse que les deux caractères ne changent pas d'état simultanément, ou que cet évènement soit improbable).

1-3-2 Résultats de l'analyse comparative

a) Quels sont les états ancestraux aux nœuds principaux de la phylogénie ?

Nous avons porté notre attention sur les états ancestraux des grands groupes dont la séquence de développement est proche. Il s'agit des nœuds suivants (figure 20) :

- nœud 2 : dernier ancêtre commun aux Asparagales et au groupe extérieur (Commelinales),
- nœud 6 : dernier ancêtre commun dont sont dérivées les Orchidaceae,
- nœud 8 : dernier ancêtre commun dont sont dérivées les Hypoxidaceae,
- nœud 10 : dernier ancêtre commun dont sont dérivées les Tecophilaeaceae,
- nœud 12 : dernier ancêtre commun dont sont dérivées les Iridaceae,
- nœud 13 : dernier ancêtre commun des Iridaceae (nœud interne à cette famille),
- nœud 36 : dernier ancêtre commun dont sont dérivées Asphodelaceae et Hemerocallidaceae,
- nœud 37 : dernier ancêtre commun des Asphodelaceae et du clade trichotomosulqué (nœud interne au clade),
- nœud 54 : dernier ancêtre commun du clade des Asparagales supérieures.

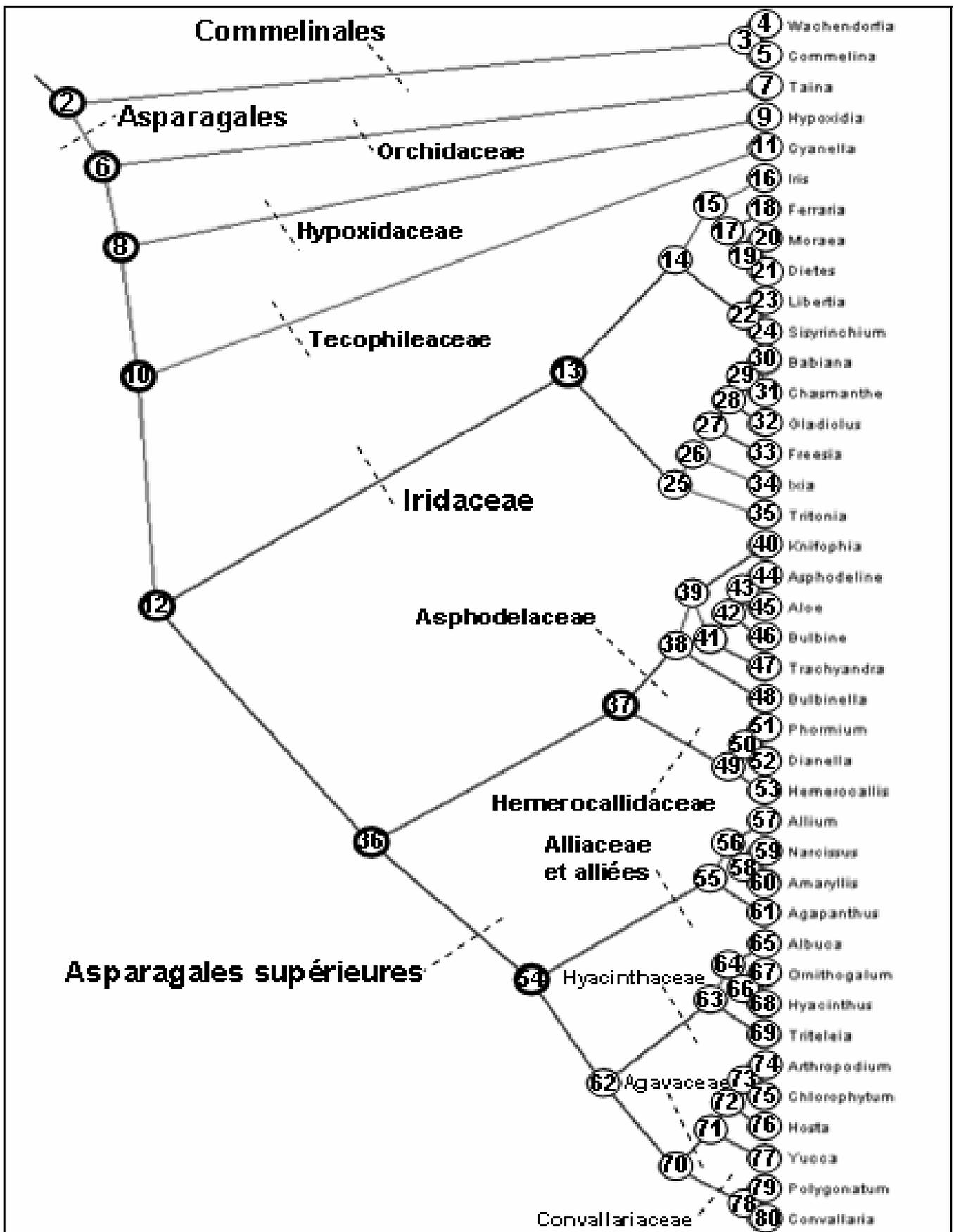


Figure 20 : Phylogénie des espèces étudiées et numéros des nœuds ancestraux et terminaux. Avec les cercles noirs renforcés sont indiqués les nœuds ancêtres principaux qui ont fait l'objet d'une reconstruction d'états de caractères (2, 6, 8, 10, 12, 13, 36, 37, 54).

Nous avons reconstruit l'état ancestral pour les caractères suivants : type de cytokinèse, formation des parois, et type de tétrade. Les autres caractères ne montrent pas suffisamment de variation pour en retracer les états aux nœuds qui nous intéressent.

Reconstruction des états ancestraux pour le type de cytokinèse

Le type de cytokinèse se distingue par sa constance chez les Asparagales supérieures (tableau 8-a) et une plus grande diversité dans le grade des Asparagales inférieures (tableau 8-b). Les espèces à cytokinèse pseudo-successive ont été considérées comme étant à cytokinèse « successive » dans cette analyse, car les modèles de vraisemblance ne peuvent pas calculer d'état ancestral si le caractère est indéterminé ou mixte.

La méthode de parcimonie donne des résultats indéterminés et ne permet pas de préciser les états de caractères ancestraux pour ce caractère pour les trois premiers nœuds (2, 6, 8 ; figure 21), tandis que les modèles de reconstruction des états ancestraux par vraisemblance (modèles symétrique et asymétrique) donnent un résultat conflictuel de cette reconstruction pour ces nœuds (figure 22 et tableau 10).

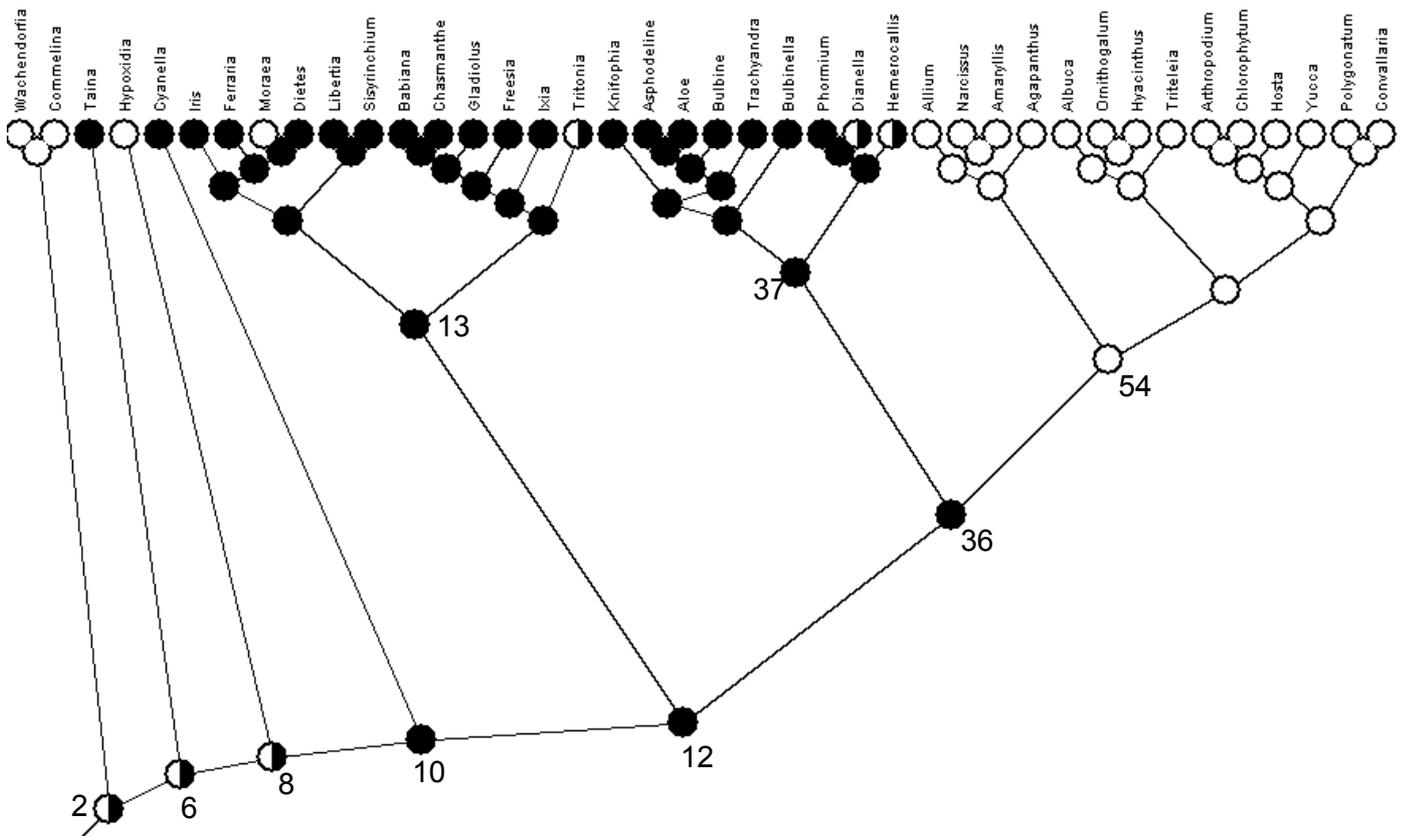


Figure 21 : Reconstruction du type de cytokinèse aux états ancestraux par méthode de parcimonie. En blanc, une cytokinèse successive ; en noir, une cytokinèse simultanée. Les états ancestraux aux nœuds à la base de l'arbre (2, 6, 8) ne sont pas résolus avec cette méthode.

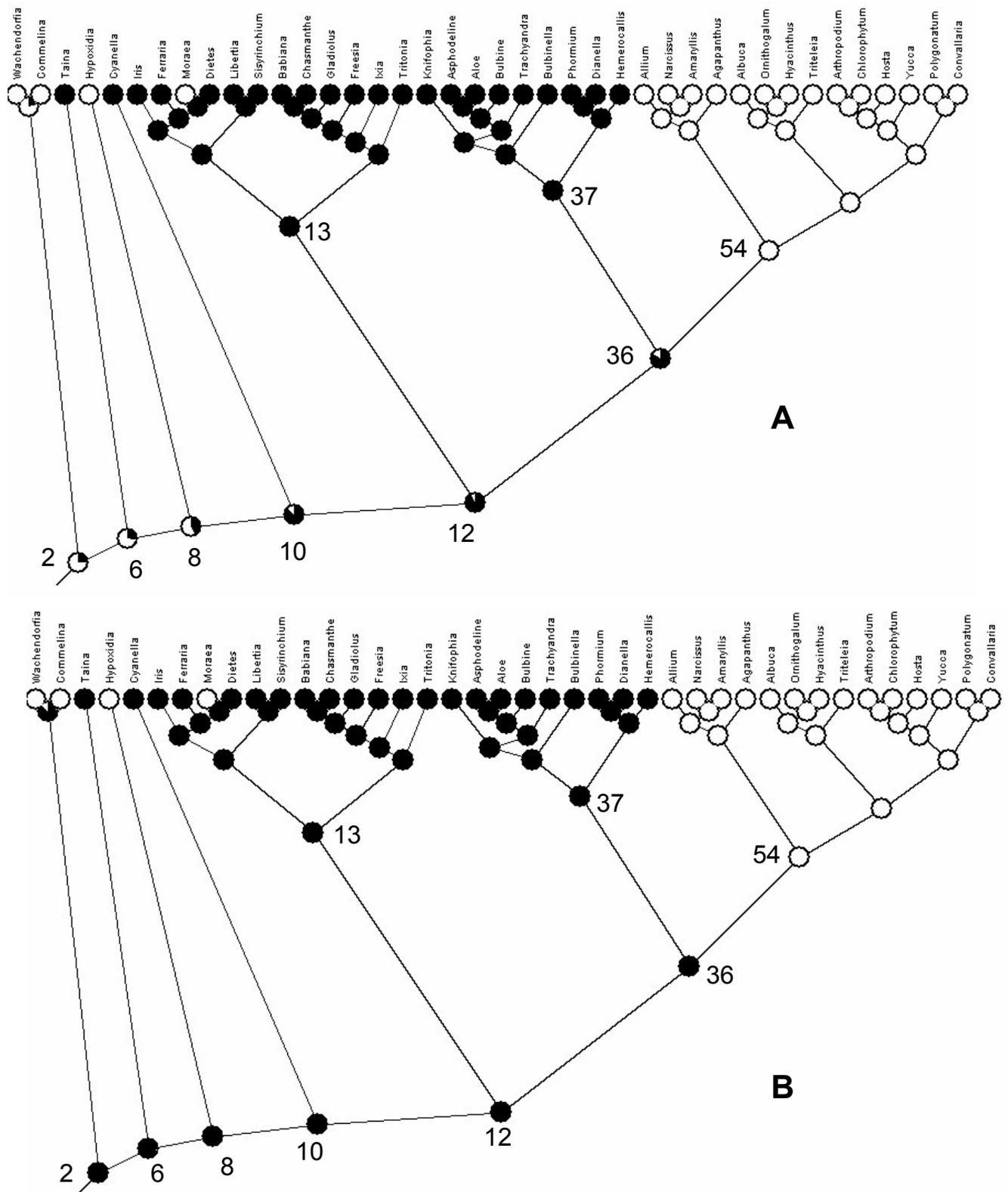


Figure 22 : Reconstruction des états ancestraux pour le type de cytokinèse par méthode de vraisemblance. En blanc, une cytokinèse successive. En noir, une cytokinèse simultanée. (A) modèle symétrique (taux de transitions = 0,0068). (B) modèle asymétrique (taux de transition = 4,9460 ; taux de réversion = 1,0101).

Ces taux de transition sont sans unité, ils correspondent à un taux relatif instantané de changement d'état de caractère (Pagel 1997). Les valeurs très élevées des taux du modèle asymétrique, qui supposent dans ce cas une évolution rapide du caractère et en particulier une transition fréquente vers une cytokinèse simultanée, laissent penser que ces valeurs sont ici mal estimées. Elles donnent une vision probablement fautive de l'évolution du caractère, avec une origine récente (dérivée) quasi immédiate pour les taxons à cytokinèse successive. Ceci est fort peu probable (voir discussion sur la reconstruction des voies de développement originelles).

Nœud	Etats ancestraux		
	parcimonie	vraisemblance symétrique	vraisemblance asymétrique
2	indéterminé	<u>plutôt successive</u>	<u>plutôt simultanée</u>
6	indéterminé	<u>plutôt successive</u>	<u>plutôt simultanée</u>
8	indéterminé	<u>plutôt successive</u>	<u>plutôt simultanée</u>
10	simultanée	plutôt simultanée	plutôt simultanée
12	simultanée	plutôt simultanée	plutôt simultanée
13	simultanée	simultanée	simultanée
36	simultanée	plutôt simultanée	simultanée
37	simultanée	simultanée	simultanée
54	successive	successive	successive

Tableau 10 : Bilan de la reconstruction de l'état ancestral pour le type de cytokinèse. Lorsqu'un état de caractère se dessine comme plus probable sans que l'état reconstruit soit significatif, l'état est assigné comme 'plutôt [simultanée/successive]'. En gris, les données indéterminées ou ne pouvant aboutir à un consensus. En noir, l'état ancestral choisi (discuté plus loin). En souligné, les conflits entre modèles.

Reconstruction des états ancestraux pour la progression des plaques cellulaires

La progression des plaques cellulaires est un caractère du développement moins variable que le type de cytokinèse. La reconstruction par parcimonie indique que la transition vers une constriction centripète du cytoplasme n'a eu lieu qu'une (ou deux) fois au cours de l'évolution de ce groupe (figure 23). Elle ne permet pas de déterminer l'état du caractère aux nœuds 10 et 12. L'estimation des états ancestraux par les méthodes de vraisemblance donne des résultats similaires (figure 24).

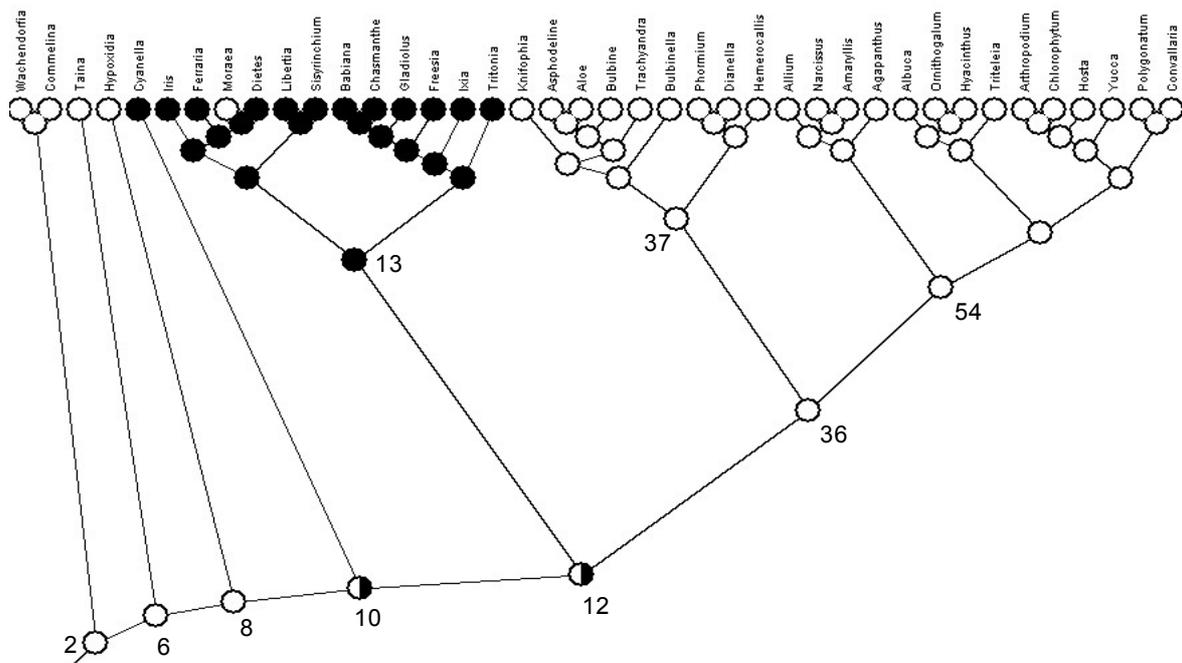


Figure 23 : Reconstruction de la formation des parois aux états ancestraux par la méthode de parcimonie. En blanc, une progression centrifuge des plaques cellulaires. En noir, une partition centripète du cytoplasme. Les états ancestraux aux nœuds 10 et 12 de l'arbre ne sont pas résolus avec cette méthode.

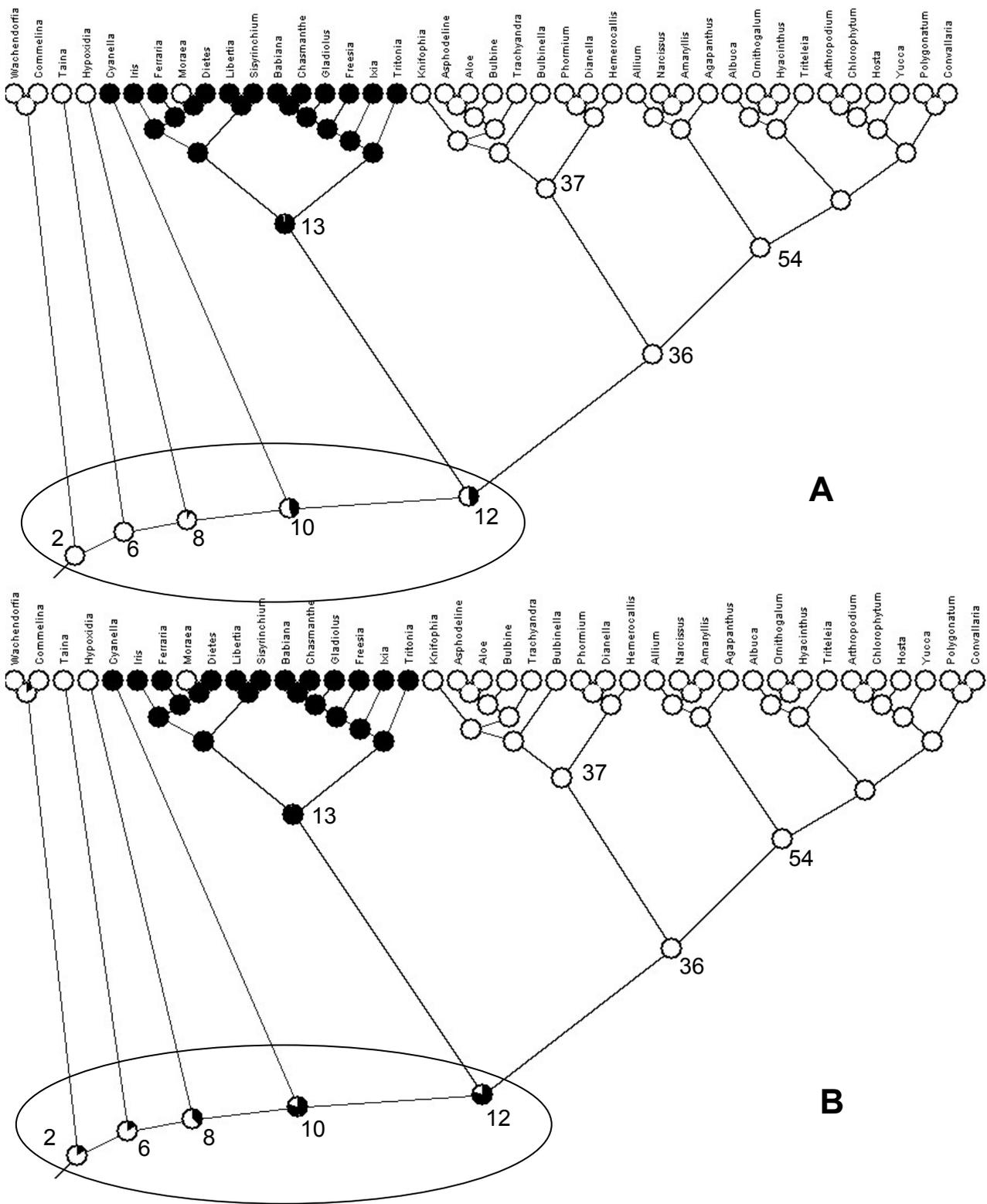


Figure 24 : Reconstruction des états ancestraux pour la progression des plaques cellulaires par méthode de vraisemblance. En blanc, une progression centrifuge des plaques cellulaires. En noir, une partition centripète du cytoplasme. **A.** modèle symétrique (taux de transition = 0,0045). **B.** modèle asymétrique (taux de transition = 0,0024 ; taux de réversion = 0,0115).

Nœud	Etats ancestraux		
	parcimonie	vraisemblance symétrique	vraisemblance asymétrique
2	centrifuge	centrifuge	plutôt centrifuge
6	centrifuge	centrifuge	plutôt centrifuge
8	centrifuge	centrifuge	plutôt centrifuge
10	indéterminé	indéterminé	plutôt centripète
12	indéterminé	indéterminé	plutôt centrifuge
13	centripète	centripète	centripète
36	centrifuge	centrifuge	centrifuge
37	centrifuge	centrifuge	centrifuge
54	centrifuge	centrifuge	centrifuge

Tableau 11 : Bilan de la reconstruction de l'état ancestral pour la progression des plaques cellulaires. Lorsqu'un caractère se dessine comme plus probable sans que l'état soit significatif, l'état est présenté comme 'plutôt [centrifuge/centripète]'. En gris, les données indéterminées ou ne pouvant aboutir à un consensus sur l'état ancestral. En noir, l'état ancestral consensuel finalement choisi.

Reconstruction des états ancestraux pour le type majoritaire de tétrades

La forme de tétrade est un caractère très variable de la microsporogénèse. Etant donnée la diversité de la forme des tétrades, ce caractère est difficile à coder : comment établir une échelle simple des relations qui existent entre les différentes catégories de géométries des tétrades ? Nous avons choisi de le coder de façon simplifiée, en retenant le type majoritaire de tétrades produites. Nous avons construit deux catégories :

- le type majoritaire « tétrades quadratiques et associées », qui comprend les tétrades quadratiques, décussées, linéaires, en T, en Z. Ces tétrades sont en général obtenues à la suite d'une cytokinèse de type successif, même si ce n'est pas toujours le cas.

- le type majoritaire « tétrades tétraédriques et associées », qui regroupe tétrades tétraédriques régulières et asymétriques, tétrades rhomboïdales, ainsi que le continuum entre ces trois formes. Ces tétrades ne peuvent être obtenues dans ce cas qu'avec une cytokinèse de type simultanée.

Ce choix d'homogénéisation (en tenant compte des proportions produites au sein d'une espèce et en limitant les résultats analysés à seulement deux catégories) reflète nécessairement moins bien la réalité de cette variabilité que les données réelles.

La méthode de parcimonie ne permet pas d'assigner d'état ancestral à l'exception du nœud 54 (dernier ancêtre commun des Asparagales supérieures, figure 25). Les modèles par Vraisemblance donnent des résultats à peine plus prononcés : les reconstructions indiquent une tendance, mais l'état reconstruit n'est pas significatif (sauf pour le nœud 54). Il en résulte une reconstruction difficile (tableau 12).

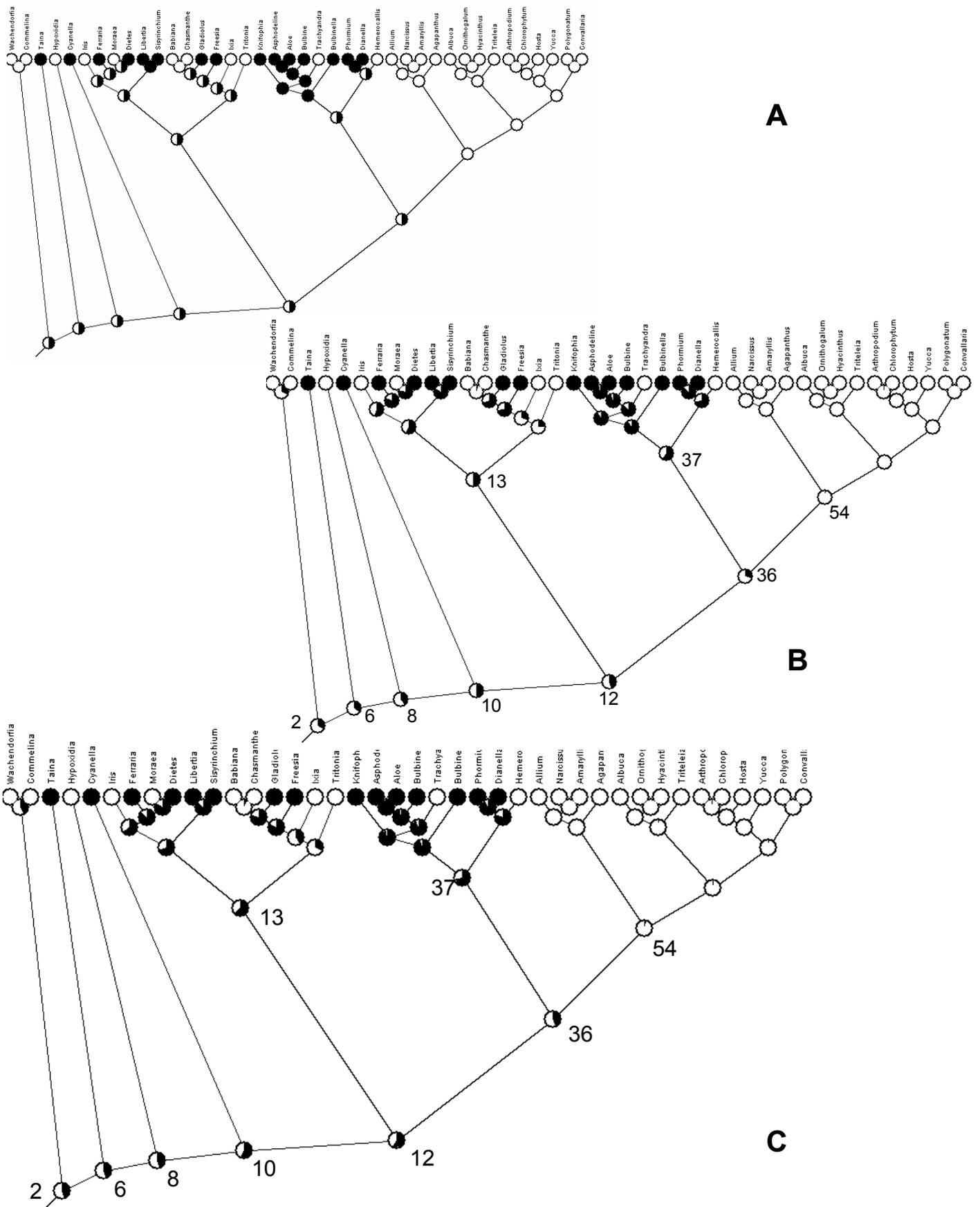


Figure 25 : Reconstruction des états ancestraux pour le type majoritaire de tétrade. En blanc, tétrades de type quadratiques et dérivées ; en noir, tétrades tétraédriques et dérivées. (A). Parcimonie (B). Vraisemblance, modèle symétrique (taux de transitions 0.0259), (C). Vraisemblance, modèle asymétrique (taux de transitions 0.0181, taux de réversions 0.0341).

Nœud	Etats ancestraux		
	parcimonie	vraisemblance symétrique	vraisemblance asymétrique
2	indéterminé	plutôt quadratiques et associées	indéterminé
6	indéterminé	plutôt quadratiques et associées	indéterminé
8	indéterminé	plutôt quadratiques et associées	indéterminé
10	indéterminé	indéterminé	indéterminé
12	indéterminé	indéterminé	plutôt tétraédriques et associées
13	indéterminé	indéterminé	plutôt tétraédriques et associées
36	indéterminé	<u>plutôt quadratiques et associées</u>	<u>plutôt tétraédriques et associées</u>
37	indéterminé	plutôt tétraédriques et associées	plutôt tétraédriques et associées
54	tétrades quadratiques et associées	tétrades quadratiques et associées	tétrades quadratiques et associées

Tableau 12 : Bilan de la reconstruction de l'état ancestral pour le type de forme de tétrade majoritaire. Lorsqu'un caractère se dessine comme plus probable sans que l'état soit significatif, l'état est présenté comme 'plutôt [quadratiques/tétraédriques]'. En gris, les données indéterminées ou ne pouvant aboutir à un consensus sur l'état ancestral. En souligné, des reconstructions conflictuelles entre modèles. En noir, l'état ancestral consensuel retenu.

Etats de caractères consensuels aux différents nœuds étudiés et types aperturaux ancestraux

La reconstruction des états de caractères aux nœuds à l'origine des grandes divisions des Asparagales (familles des Asparagales inférieures et clade des Asparagales supérieures) nous permet de reconstituer les séquences développementales ancestrales à chacun des nœuds (tableau 13). Nous établissons les états ancestraux en discutant des reconstructions établies par les différents modèles :

- en ce qui concerne le **type de cytocinèse** (figures 19 et 20, tableau 10), le modèle asymétrique de reconstruction par Vraisemblance est légèrement meilleur que le modèle symétrique pour expliquer les données, même si la différence de vraisemblance n'est pas significative ($\log L_{\text{sym}} = -14,179$; $\log L_{\text{asym}} = -13,724$). Cependant, l'image qu'il donne de l'évolution de ce caractère reflète une situation probablement erronée : il accorde plus de poids à la transition vers une cytocinèse successive, ce qui entraîne une distorsion de l'estimation des transitions vers les branches terminales de l'arbre (voir figure 22 et commentaire en légende). Or la cytocinèse successive est plus probablement une condition ancestrale (Rudall et al. 1997). Pour cette raison, nous n'avons pas tenu compte des estimations de ce modèle pour estimer les états ancestraux consensuels (tableau 13).

- pour le caractère « **formation des parois** », les reconstructions avec le modèle asymétrique sont moins 'catégoriques' pour les nœuds à la base de la phylogénie (tableau 11), et elles permettent de reconstruire un état ancestral (non significatif cependant, le rapport de

log-vraisemblance des deux états est < 2) aux nœuds indéterminés par les autres modèles (méthode de parcimonie, figure 23, et modèle par vraisemblance symétrique, figure 24). Ce modèle asymétrique explique mieux les données observées, même si la différence de vraisemblance avec le modèle symétrique n'est pas significative ($\log L_{\text{sym}} = -11,379$; $\log L_{\text{asym}} = -10,808$). Les états ancestraux ont été choisis sur une base consensuelle entre les trois modèles (tableau 13).

- en ce qui concerne la **forme de la tétrade**, la reconstruction des caractères ancestraux est celle qui montre le plus d'indécision (tableau 12). Cependant, on sait que ce caractère est sous l'influence du type de cytokinèse (puisque la cytokinèse a une influence sur le nombre de plans de divisions, qui lui-même est relié à la forme de la tétrade). Nous *préférons* donc ici inférer le type de tétrade ancestral à l'aide du type de cytokinèse estimé. Nous nous contenterons ici de noter que cette reconstruction du type de tétrade majoritaire, au niveau de l'état ancestral consensuel, n'entre pas en conflit avec les estimations pour le type de cytokinèse aux nœuds à l'origine dans la phylogénie (2, 6 et 37 ; figure 24). En revanche, la reconstruction pour le nœud 36 est en conflit pour les deux caractères : l'état ancestral est reconstruit comme plutôt quadratique (figure 24, B et C), alors que le type de cytokinèse ancestral à ce nœud est simultané. Ce résultat est la conséquence de la fixation d'un type de tétrade majoritaire quadratique et associées chez les Asparagales supérieures, on considère donc que le type majoritaire de tétrade à ce nœud est tétraédrique, en raison de son type de cytokinèse.

La localisation des apertures est considérée comme polaire, au regard de nos données : en effet, la presque totalité des espèces étudiées ont cet état de caractère, or la littérature décrit des espèces qui ont probablement une localisation groupée des apertures dans les tétrades. En ce qui concerne ce caractère, ces espèces sont isolées dans leurs genres ou leurs familles où les autres espèces forment majoritairement leurs apertures de façon polaire (voir discussion).

Le type apertural est inféré de la séquence développementale reconstruite à partir de l'estimation consensuelle des caractères ancestraux (tableau 13).

Nœud	Type de cytokinèse	Formation des parois	Type de tétrade	Localisation des apertures	type apertural ancestral inféré
2	successive	centrifuge	quadratique	polaire	monosulqué
6	successive	centrifuge	quadratique	polaire	monosulqué
8	indéterminé	centrifuge	indéterminé	polaire	monosulqué
10	simultanée	indéterminé	tétraédrique	polaire	<u>monosulqué/trichotomosulqué</u>
12	simultanée	centripète	tétraédrique	polaire	<u>monosulqué/trichotomosulqué</u>
13	simultanée	centripète	tétraédrique	polaire	<u>monosulqué/trichotomosulqué</u>
36	simultanée	centrifuge	tétraédrique	polaire	<u>monosulqué/trichotomosulqué</u>
37	simultanée	centrifuge	tétraédrique	polaire	<u>monosulqué/trichotomosulqué</u>
54	successive	centrifuge	quadratique	polaire	monosulqué

Tableau 13 : Etats ancestraux consensuels et type apertural ancestral inférés aux principaux nœuds de la phylogénie. En gris : les états indéterminés ou déterminés avec ambiguïté.

Les résultats montrent deux faits importants :

- D'une part, le type de développement ancestral des Asparagales devrait être le suivant : une cytokinèse de type successive, avec une partition cytoplasmique effectuée par des plaques cellulaires centrifuges, des tétrades quadratiques (ou dérivées de quadratiques), une localisation polaire des apertures, et du pollen de type monosulqué. Cette séquence développementale est identique à celle observée chez les Asparagales supérieures.
- D'autre part, le type apertural aux nœuds ancestraux est probablement essentiellement le type monosulqué. Il est possible cependant que du pollen trichotomosulqué ait été produit chez les espèces ancestrales (nœuds 10, 12 13, 36 et 37 ; tableau 13), soit en tant que type apertural majoritaire, soit plutôt en tant que type apertural co-existant avec le type monosulqué.

b) Y a-t-il un signal phylogénétique pour les différentes étapes du développement ?

Les résultats (figure 26) montrent qu'il existe un signal phylogénétique très fort pour deux caractères de la microsporogénèse avec nos données : le type de cytokinèse et la progression des plaques cellulaires. En revanche, pour le type majoritaire de tétrade, la distribution de nos données n'est pas significativement différente d'une répartition aléatoire ($p=0,056$), même si la valeur observée est proche du seuil de rejet.

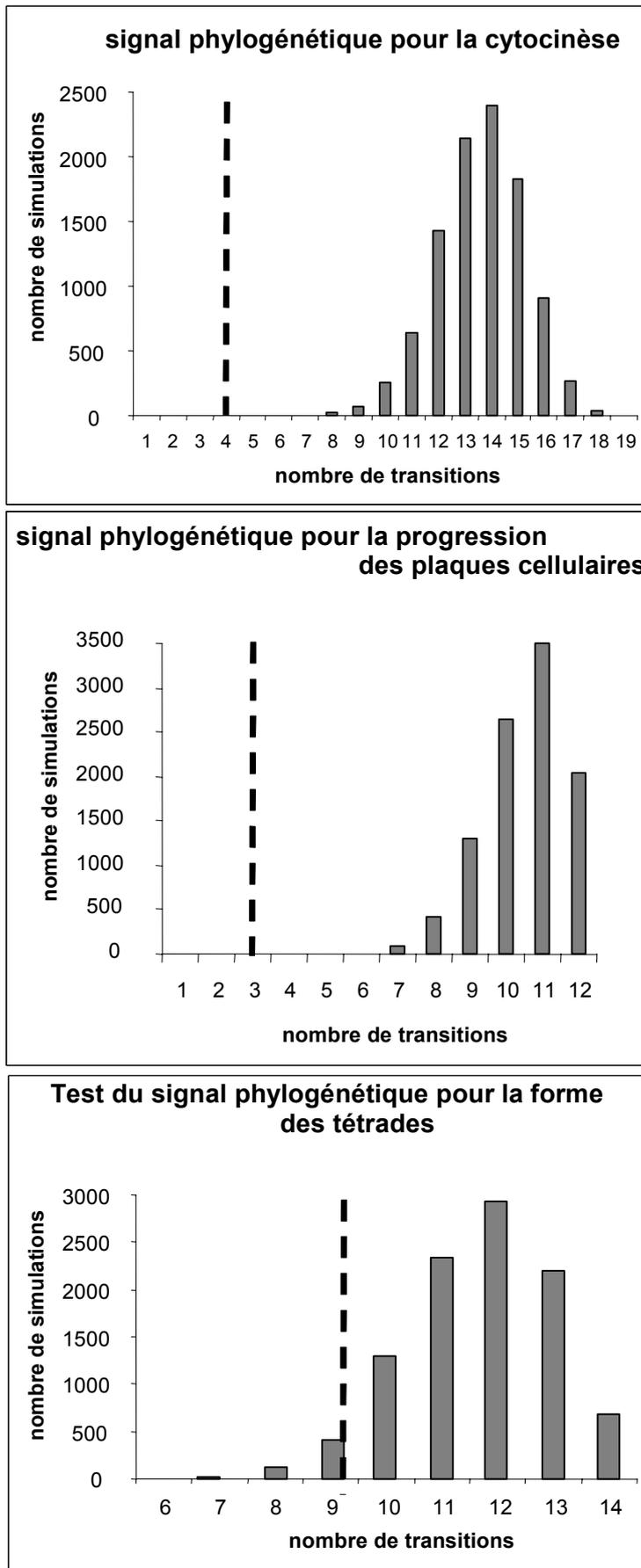


Figure 26 : Test du signal phylogénétique pour la cytokinèse, la progression des plaques cellulaires et le type majoritaire de tétrades. Dans chaque cas, 10 000 simulations de répartition aléatoire des caractères ont été effectuées. Le nombre de transitions nécessaires aux données observées sur l'arbre de référence correspond à la ligne pointillée, tandis que la distribution des simulations est indiquée par les histogrammes gris. Le test de la forme des tétrades est non significatif ($p=0.056$).

c) Y a-t-il des corrélations entre les états de caractère aux différentes étapes de la microsporogénèse ?

Comme il existe un signal phylogénétique fort des caractères testés, et qu'un faible nombre de transitions sur la phylogénie est impliqué, nous avons dû tester les modèles en fixant la racine de l'arbre à un état de caractère (fonction fossile du programme Discrete ; Pagel 1994). En effet, lorsque l'état ancestral de la racine est ambigu et qu'il y a des événements de transition rares, la valeur du rapport de vraisemblance peut être gonflée artificiellement et laisser conclure à une évolution corrélée quand il n'y en n'a pas (M. Pagel, communication personnelle). Les différents modèles testés montrent que les modèles d'évolution corrélée sont significativement plus probables que les modèles témoins d'évolution indépendante pour les caractères suivants :

- Le type de cytokinèse est corrélé avec le sens de progression des plaques cellulaires (tableaux **14-a, b et c**), le résultat est significatif pour les modèles d'évolution corrélée quelles que soient les options choisies (fossilisation ou non) pour les états ancestraux au nœud à l'origine de l'arbre (nœud 2), à l'exception du premier modèle d'évolution corrélée (tableau **14-a**). Cette situation est liée à l'estimation des paramètres de transitions qui convergent vers des valeurs sous-optimales en estimation simultanée, probablement à cause d'optimums locaux. Nous avons donc estimé individuellement les paramètres (procédure Surface-plot de Discrete, qui permet de calculer la vraisemblance des paramètres individuellement). Nous nous sommes ensuite servis de ce modèle optimisé pour les analyses avec les états ancestraux fossilisés à l'origine. Les résultats montrent qu'*une progression centripète est bien plus souvent associée à une cytokinèse simultanée, tandis qu'une progression centrifuge peut aussi bien se produire en cytokinèse successive que simultanée.*

- Le type de cytokinèse est également corrélé avec le type de tétrade (tableaux **14-d et e**, les modèles d'évolution corrélée expliquent significativement mieux la répartition de nos données. *Une cytokinèse successive est associée à des tétrades quadratiques (et associées), tandis qu'une cytokinèse simultanée est associée à la production de tétrades tétraédriques (et associées).* Ce résultat n'est pas surprenant, puisque le partage du cytoplasme entre les deux divisions nucléaires de la méiose impose une contrainte sur le nombre de plans et oriente indirectement la forme que les tétrades peuvent prendre ultérieurement. Il se traduit donc logiquement par une forte significativité du modèle d'évolution corrélée.

- La présence d'un anneau de callose est corrélée avec la progression des plaques cellulaires (tableaux **14-f et g**) : *l'anneau de callose n'est présent que lorsque la cytokinèse est centripète.* Les résultats sont moins significatifs que pour les modèles de corrélation entre caractères précédents, ceci est dû à la faible représentation de l'anneau de callose dans notre échantillon.

modèle	α_1 *	β_1 *	α_2 *	β_2 *	Q_{12} *	Q_{21} *	Q_{13} *	Q_{31} *	Q_{34} *	Q_{43} *	Q_{24} *	Q_{42} *	IR *	DR *	LR *	test
indépendant	<u>0,00685</u>	<u>0,00685</u>	<u>0,023</u>	<u>0,0115</u>									-31,0093			
dépendant					0,0016	2,229	0,00057	0,03014	0,73984	0,5574	4,09775	0,00544		-28,04376	7,803	ns p~0,1
Dépendant optimisé					<u>0,001</u>	<u>2,2296</u>	<u>0,00011</u>	<u>0,022</u>	0,00095	0,01095	<u>3,6879</u>	<u>0,0059</u>		-19,2151	23,558	***
Dépendant optimisé, variant					<u>0</u>	<u>2,229</u>	<u>0,00011</u>	<u>0,022</u>	0,00019	0,01415	<u>3,6879</u>	<u>0</u>		-20,4217	21,175	***

Tableau 14-a : Test de l'évolution corrélée. Cytocinèse (α_1, β_1) / progression plaques cellulaires (α_2, β_2) ; origine libre.

modèle	α_1	β_1	α_2	β_2	Q_{12}	Q_{21}	Q_{13}	Q_{31}	Q_{34}	Q_{43}	Q_{24}	Q_{42}	IR	DR	LR	test
indépendant	<u>0,00685</u>	<u>0,00685</u>	<u>0,023</u>	<u>0,0115</u>									-31,0640			
dépendant					0,0025	1,62549	0,54085	0,88887	0,00717	0,00344	4,48904	0,02392		-28,62217	6,7559	ns p~0,15
Dépendant optimisé					<u>0,001</u>	<u>2,2296</u>	<u>0,00011</u>	<u>0,022</u>	0,00098	0,00898	<u>3,6879</u>	<u>0,0059</u>		-21,15821	21,684	***

Tableau 14-b : Test de l'évolution corrélée. Cytocinèse (α_1, β_1) / progression plaques cellulaires (α_2, β_2) ; origine fossilisée avec plaques cellulaires centrifuges.

modèle	α_1	β_1	α_2	β_2	Q_{12}	Q_{21}	Q_{13}	Q_{31}	Q_{34}	Q_{43}	Q_{24}	Q_{42}	IR	DR	LR	test
indépendant	<u>0,00685</u>	<u>0,00685</u>	<u>0,023</u>	<u>0,0115</u>									-31,3526			
dépendant					0,0061	4,35538	0,29082	0,48299	0,00658	0,00185	0,14101	0,00715		-28,5093	5,1094	ns p~0,25
Dépendant optimisé					<u>0,001</u>	<u>2,2296</u>	<u>0,00011</u>	<u>0,022</u>	0,00098	0,00898	<u>3,6879</u>	<u>0,0059</u>		-23,8644	14,976	***

Tableau 14-c : Test de l'évolution corrélée. Cytocinèse (α_1, β_1) / progression plaques cellulaires (α_2, β_2) ; origine fossilisée (cytocinèse successive et plaques centrifuges).

* Les indices α correspondent au taux de transition et β de réversion pour le modèle indépendant (figure 17), l'indice représentant l'ordre des caractères. Q_{ij} sont les paramètres de transition pour le modèle d'évolution corrélée (figure 17). IR est la vraisemblance du modèle indépendant, et DR est celle du modèle d'évolution corrélée. LR est le double de la différence de vraisemblance des modèles indépendants et d'évolution corrélée (Pagel 1994), et se comporte comme une loi de Chi-2 à quatre degrés de liberté (dont le résultat est présenté dans la colonne « test »).

modèle	α_1	β_1	α_2	β_2	Q ₁₂	Q ₂₁	Q ₁₃	Q ₃₁	Q ₃₄	Q ₄₃	Q ₂₄	Q ₄₂	IR	DR	LR	test
indépendant	<u>0,0068</u> <u>5</u>	<u>0,0068</u> <u>5</u>	<u>0,0181</u>	<u>0,0345</u>									-39,0027			
dépendant					0,00295	2,6669	~0	0,0118	1,2417	0,5763	1,2240	0,0090		-26,2455	27,514	***

Tableau 14-d : Test de l'évolution corrélée. **Cytocinèse (α_1, β_1) /type majoritaire de tétrade (α_2, β_2)** ; origine libre.

modèle	α_1	β_1	α_2	β_2	Q ₁₂	Q ₂₁	Q ₁₃	Q ₃₁	Q ₃₄	Q ₄₃	Q ₂₄	Q ₄₂	IR	DR	LR	test
indépendant	<u>0,00685</u>	<u>0,00685</u>	<u>0,0181</u>	<u>0,0345</u>									-39,8737			
dépendant					0,00592	0,01201	0,0013	0,01968	0,70195	0,33395	10,199	0,00077		-29,5204	20,707	***

Tableau 14-e : Test de l'évolution corrélée. **Cytocinèse (α_1, β_1) /type majoritaire de tétrade (α_2, β_2)** ; origine fossilisée cytocinèse successive/tétrales quadratiques.

modèle	α_1	β_1	α_2	β_2	Q ₁₂	Q ₂₁	Q ₁₃	Q ₃₁	Q ₃₄	Q ₄₃	Q ₂₄	Q ₄₂	IR	DR	LR	test
indépendant	<u>0,00239</u>	<u>0,01155</u>	<u>0,4005</u>	<u>3,60518</u>									-23,1184			
dépendant					0,00057	1,97865	0,00267	0,01191	0,23997	0,48419	4,16267	0,04781		-18,0004	10,326	*
Dépendant variant					<u>0</u>	<u>0</u>	0,00013	0,02896	0,19422	0,37611	2,55762	0,00299		-17,8104	10,616	*

Tableau 14-f : Test de l'évolution corrélée. **Progression des plaques cellulaires (α_1, β_1) /anneau de callose (α_2, β_2)**, origine libre.

modèle	α_1	β_1	α_2	β_2	Q ₁₂	Q ₂₁	Q ₁₃	Q ₃₁	Q ₃₄	Q ₄₃	Q ₂₄	Q ₄₂	IR	DR	LR	test
indépendant	<u>0,00239</u>	<u>0,01155</u>	<u>0,4005</u>	<u>3,60518</u>									-24,0005			
dépendant					0,00267	1,76358	0,00065	0,00569	0,21498	0,45769	8,16984	0,08672		-18,6375	10,726	*
Dépendant variant					<u>0</u>	<u>0</u>	0,0029	0,01391	0,22191	0,44813	2,29558	0,00044		-18,5751	10,850	*

Tableau 14-g : Test de l'évolution corrélée. **Progression des plaques cellulaires (α_1, β_1) /anneau de callose (α_2, β_2)** ; origine fossilisée (progression centrifuge et sans anneau de callose).

1-4 Discussion

1-4-1 Evolution des caractéristiques de la microsporogénèse

a) Type de cytocinèse

Le type de cytocinèse est le caractère de la microsporogénèse qui a été le plus étudié dans l'ordre des Asparagales. C'est un caractère considéré comme labile dans ce groupe (Rudall et al. 1997) et également à l'échelle des Monocotylédones (Furness et Rudall 1999). C'est aussi un caractère qui, d'après le modèle de détermination du type apertural (Ressayre et al. 2002) a des conséquences sur la diversité du type apertural. Nos données confirment que le caractère est susceptible d'évoluer facilement. La cytocinèse successive, par exemple, caractérise soit le niveau taxonomique familial (Hypoxidaceae – nous n'avons qu'une espèce dans notre échantillon, mais une cytocinèse successive est également rapportée chez d'autres espèces de ce groupe ; Rudall et al. 1997), soit un groupe de familles (Asparagales supérieures), soit même des genres ou des espèces isolées dans des familles à cytocinèse simultanée (par exemple, *Moraea* chez les Iridaceae). Nos données ne montrent cependant pas de transitions fréquentes d'un état vers un autre si l'on considère seulement les cytocinèses successives 'vraies' et les cytocinèses simultanées (figure 16, une transition d'une cytocinèse successive vers simultanée et trois réversions). Si l'on considère également les cytocinèses intermédiaires, nous devons nuancer cette image de transition rare. En effet, les transitions vers une cytocinèse intermédiaire ou les retours à une cytocinèse simultanée sont alors plus fréquents (figure 16) : on dénombre sept transitions de cytocinèse simultanée vers « successive », et trois transitions de cytocinèse « successive » vers simultanée. L'existence de types de cytocinèse intermédiaires montre également que des transitions graduelles d'un état (simultané ou successif) vers l'autre peuvent être stabilisées. Elles sont probablement sélectionnées pour leur effet sur le pollen (parce qu'elles canalisent le phénotype).

Le signal phylogénétique de ce caractère est très fort (figure 25). Cette inertie phylogénétique pourrait traduire l'importance des contraintes du développement. Mais le signal est surtout dû à la signature particulière du caractère chez les Asparagales supérieures : une cytocinèse successive y est omniprésente. Etant donnée la labilité du caractère dans le grade des Asparagales inférieures, il est peu probable que le caractère devienne soudainement soumis à une contrainte qui l'empêche d'évoluer. Ceci laisse plutôt penser que la stase rencontrée avec la cytocinèse successive chez les Asparagales supérieures est le fait de la sélection naturelle, à moins de postuler l'existence d'une contrainte locale nouvelle sur ce caractère (voir discussion générale). Cet effet est indirect et probablement lié à la stabilité phénotypique (type apertural monosulqué) que confère une cytocinèse successive.

Le signal phylogénétique n'implique donc vraisemblablement pas de phénomène de contrainte pour ce caractère.

b) Formation des parois

Ce caractère a été beaucoup moins étudié que les autres caractères de la microsporogénèse. On sait depuis longtemps que les microsporocytes des Eudicotylédones se divisent de façon générale par une constriction centripète (on ne connaît pas encore d'exception à cette observation), et l'on a longtemps cru que les Monocotylédones se divisaient par formation de plaques cellulaires centrifuges (Waterkeyn 1962 ; Huynh 1968a, 1968b, 1976 ; Waterkeyn et Bienfait 1970 ; Van Campo 1976). La littérature présente cette situation comme un fait établi (Dover 1972 ; Harley et Baker 1998 ; Harley 2004 ; Blackmore et Crane 1998), et cela explique certainement pourquoi le caractère a été si peu étudié. Ce caractère est en réalité variable chez les Monocotylédones : nous avons décrit une formation centripète des parois chez les Tecophilaeaceae et les Iridaceae (voir article 2, annexe 2). Cette situation est probablement plus fréquente qu'il n'est actuellement reconnu. Mais elle est difficile à observer : elle se produit souvent sur une échelle de temps très réduite pour la cytokinèse simultanée. Pour les espèces de notre échantillonnage qui procèdent par constriction centripète, l'étape de division de la cellule mère en microspores a été une étape critique particulièrement difficile à observer. Chez *Dietes* ou *Chasmanthe* notamment, les cellules mères du pollen restent longtemps à l'état de syncytium à quatre noyaux méiotiques, et la division se produit ensuite si rapidement que l'on observe la plupart du temps cellules mères et tétrades sur la même lame de microscope. L'ordre des Asparagales présente donc également de la variation pour ce caractère, on y rencontre une formation centrifuge aussi bien que centripète des parois au moment de la partition de la cellule mère du pollen.

Cependant, le caractère « formation des parois » apparaît évoluer moins fréquemment que le type de cytokinèse, les transitions sont plus rares pour ce caractère (figure 15) : une transition d'une division avec plaques cellulaires centrifuges vers une constriction centripète, et deux réversions. Le signal phylogénétique est également très fort en ce qui concerne la formation des parois (figure 26). Contrairement à ce que l'on observe avec le type de cytokinèse, le caractère évolue lentement et le nombre de transitions sur la phylogénie est réduit. En conséquence, on peut attribuer ici l'inertie phylogénétique à des contraintes sur l'évolution du mode de formation des parois.

On pourrait imaginer simplement l'étape clé nécessaire à une transition pour ce caractère : il suffirait de réorienter la progression de la formation de la paroi d'un sens (centrifuge, par exemple) vers l'autre (centripète). On peut, par exemple, l'envisager par des modifications de l'orientation et de la progression des microtubules impliqués dans la formation des parois lors de la division. Les résultats (une seule transition) suggèrent que ce

changement est bien plus difficile à réaliser qu'il ne paraît. En fait, cela est lié à la nature des états que peut prendre ce caractère : une partition centrifuge du cytoplasme est réalisée à l'aide de plaques cellulaires dont l'origine est phragmoplastique. Le phragmoplaste progresse sur tous les fronts lors de la formation des plaques cellulaires, tandis que la constriction centripète se produit au fur et à mesure à partir de la membrane de la cellule mère (plasmalemma) et est uniquement orientée de la périphérie vers le centre de la cellule. Les mécanismes moléculaires de la cytokinèse commencent à dévoiler leurs secrets (Smith 2002 ; Nishihama et Machida 2001 ; Heese et al. 1998). Curieusement cependant, bien qu'il soit reconnu depuis longtemps que plusieurs mécanismes distincts coexistent chez les plantes (une scission méiotique centripète au cours de la microsporogénèse¹¹, une cellularisation simultanée du syncytium de l'albumen et une division somatique par plaque cellulaire ; Otegui et Staehelin 2000), seule la cytokinèse *somatique* (procédant par plaques cellulaires centrifuges) est réellement étudiée par les biologistes moléculaires, même si on commence à relever des composants en commun entre les différents types de cytokinèse (Mayer et Jürgens 2004). Il est intéressant de noter qu'une cytokinèse somatique par plaques cellulaires centrifuges, médiée par le phragmoplaste par dépôts de callose, est une synapomorphie des plantes terrestres. Elle prend son origine chez les algues vertes multicellulaires, sans que l'on sache encore avec précision si elle concerne l'ensemble de ce grade (et en ferait alors une synapomorphie de la « lignée verte »), et a probablement été sélectionnée pour la possibilité de réaliser des divisions latérales (Lopez-Bautista et al. 2003), ce qui permet de croître dans plusieurs directions et de n'être plus contraint à une croissance 'linéaire'.

De ce point de vue, la présence d'une division avec plaques cellulaires centrifuges au cours de la microsporogénèse peut être interprétée comme le recrutement du système de division somatique pour la division méiotique. Ce type d'évènement nécessite probablement des évènements plus difficiles à coordonner, ce qui peut être l'explication du faible nombre de transitions observées chez ce caractère. La connaissance de l'évolution du caractère dans ses détails moléculaires apporterait peut être des éléments de réponse ou des directions nouvelles à ce sujet.

¹¹ Cette distinction peut sembler simplifiée de façon outrancière, puisque nous venons de discuter de plaques cellulaires centrifuges en méiose, ainsi que de cytokinèse successive. En fait, la biologie moléculaire repose sur des plantes modèles, parmi lesquelles *Arabidopsis thaliana*, une Eudicotylédone qui se divise en constriction centripète au cours de la microsporogénèse. La démarche de la biologie moléculaire repose beaucoup sur la généralisation à partir des modèles qu'elle étudie, dans un cadre de pensée parfois trop essentialiste. La variabilité des mécanismes du vivant n'y est pas considérée, ce qui explique la simplification rencontrée dans la littérature pour ce caractère.

c) Forme des tétrades

Ainsi que nous l'avons vu pour l'exemple des grains de pollen trichotomosulqués, la forme des tétrades peut avoir des répercussions directes sur le type apertural (des tétrades tétraédriques régulières sont associées à la production de pollen trichotomosulqué, tandis que des tétrades tétraédriques asymétriques le sont à du pollen monosulqué). C'est également le caractère le plus variable et le plus diversifié de la microsporogénèse chez les Asparagales. Il est dépendant en partie de la division des cellules mères du pollen (une cytokinèse successive impose qu'il y ait trois plans de division, ce qui n'est pas le cas en cytokinèse simultanée), mais peut prendre une vaste gamme d'états possibles au sein de cette limite. La forme des tétrades est donc partiellement conditionnée par le type de cytokinèse, qui montre une inertie phylogénétique significative. Cependant, le signal phylogénétique pour la forme de la tétrade n'est pas significativement différent de celui qui serait obtenu en absence totale de contrainte ($p = 0,056$, figure 25). Ceci est lié au fait qu'en dépit de l'effet « d'entraînement » du clade des Asparagales supérieures figé pour une cytokinèse successive et qui présente donc des tétrades majoritairement quadratiques, d'autres facteurs influencent la forme des tétrades.

Parmi ces facteurs, on peut notamment citer les structures des cytokinèses de type intermédiaire : on peut remarquer une association étroite entre ces modifications de la cytokinèse simultanée et la présence majoritaire de tétrades de type quadratique (figure 27). En outre, il existe aussi probablement un moyen de contrôler la forme des tétrades en jouant directement sur la position relative des noyaux à la fin de la méiose. C'est ce qui se produit pour *Trachyandra muricata*, qui produit des tétrades majoritairement quadratiques et décussées alors que l'espèce présente une cytokinèse simultanée (figure 27). C'est également ce qui se produit chez les espèces à cytokinèse simultanée qui produisent des tétrades tétraédriques, lesquelles peuvent produire soit du pollen monosulqué si la forme des tétrades est asymétrique, soit trichotomosulqué si leur forme est celle d'un tétraèdre régulier, soit un mélange des deux types aperturaux (cette situation est rencontrée par exemple chez *Sisyrinchium striatum*, Iridaceae, et *Hemerocallis fulva*, Hemerocallidaceae). C'est encore le cas pour les espèces produisant des tétrades rhomboïdales occasionnelles, et produisant uniquement du pollen monosulqué quand le modèle prédit également la formation de pollen tétrachotomosulqué (*Moraea aristata*, *Gladiolus byzantinus* ou *Freesia alba* par exemple). L'évolution de la forme des tétrades montre que les deux mécanismes (modification directe de la cytokinèse ou modification de la position relative des noyaux) sont des réponses possibles pour optimiser le type apertural, en l'occurrence produire du pollen monosulqué. Ces situations se répètent plusieurs fois sur la phylogénie.

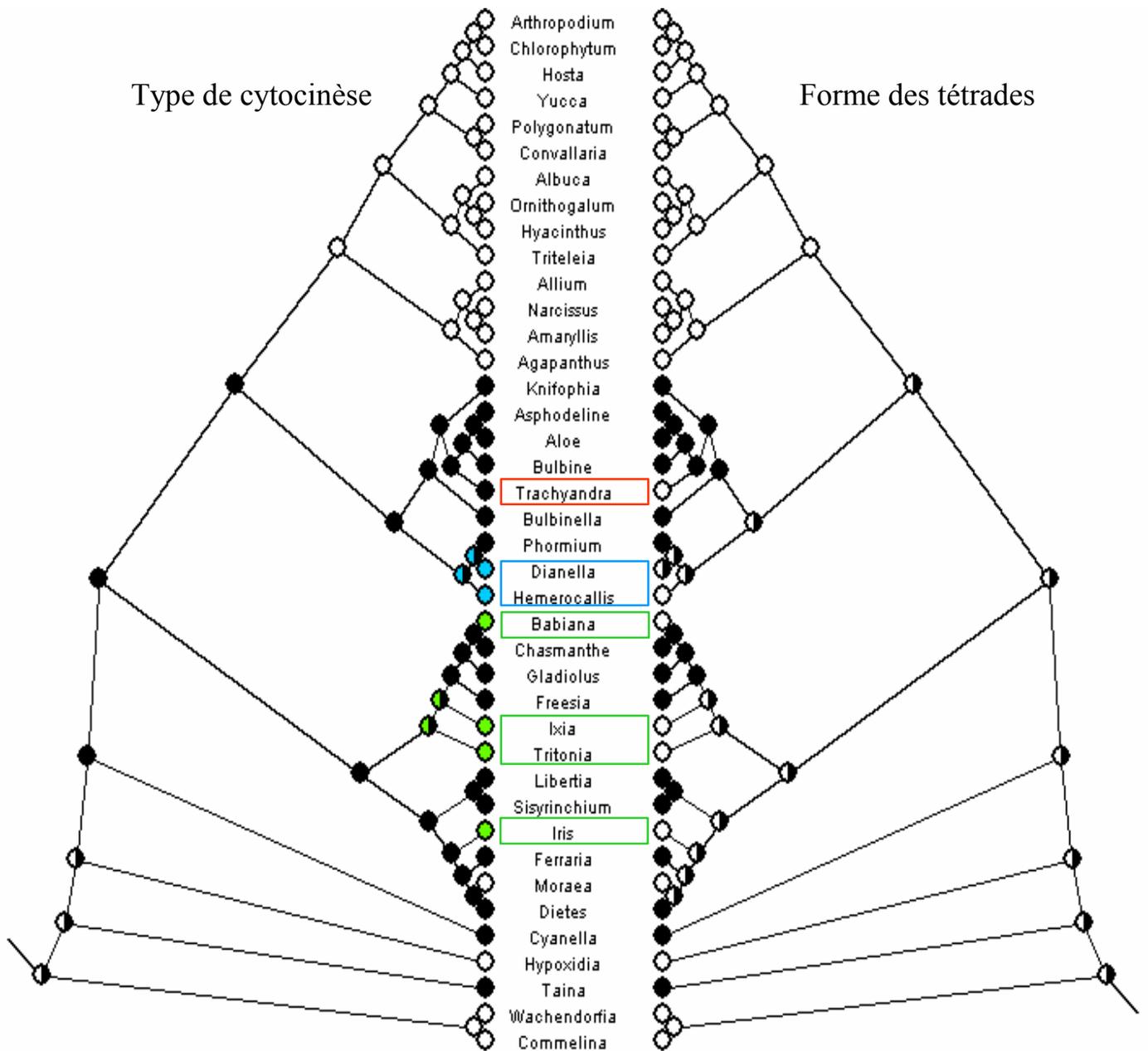


Figure 27 : Les variations de la cytokinèse simultanée qui modifient le type de tétrade obtenu. Arbre de gauche : type de cytokinèse (en blanc, cytokinèse successive ; en noir, cytokinèse simultanée). En vert, la présence d'un anneau de callose (chez des espèces à constriction centripète du cytoplasme). En bleu, les situations de cytokinèse pseudo-succesive (trois plaques cellulaires centrifuges mais pas de stade dyade). En rouge, pas de facteur autre que la disposition des noyaux en fin de méiose. Arbre de droite : forme majoritaire des tétrades (en blanc, tétrades quadratiques et associées ; en noir, tétrades tétraédriques et associées).

d) Localisation des apertures au sein des tétrades

Bien que notre échantillon n'en illustre aucune séquence développementale complète, des espèces présentant un type apertural suggérant une définition groupée des apertures dans les tétrades sont documentées dans la littérature, y compris chez les Asparagales (pollen di- ou tri-aperturé ; tableau 7). Les transitions d'une définition polaire vers une localisation groupée des apertures se seraient donc produites occasionnellement et de façon indépendante chez les Asparagales. Nous nous contenterons ici d'aborder certaines particularités de ces

changements, faute d'avoir pu en étudier plus précisément les détails. Ces transitions ont les particularités suivantes :

- Elles touchent, selon la littérature, majoritairement des espèces dont c'est un caractère dérivé « récent » par rapport aux espèces phylogénétiquement proches de la phylogénie (qui ont une localisation polaire des apertures). En effet, à l'exception de la sous-famille des Tigridioideae, chez les Iridaceae, dont toutes les espèces produisent du pollen di-sulqué (Rudall et Wheeler 1988), ce changement d'état de caractère touche à chaque occasion une espèce possédant cet état de caractère de façon isolée. Ces changements se produisent de manière récurrente, on peut donc faire l'hypothèse que les phénotypes qui leur sont associés sont parfois avantageux au niveau spécifique, mais que les espèces chez qui ils se produisent ne sont que rarement à l'origine d'un clade diversifié. Il y a donc peut être un phénomène de contre-sélection de ces espèces sur le long terme. Cette hypothèse de contre-sélection est cependant à pondérer par le fait que le passage à une définition groupée des apertures semble avoir été la clé du succès du pollen chez les Eudicotylédones (Furness et Rudall 2004), qui ont aussi retenu cet état de caractère (chez qui aucune réversion vers une localisation polaire n'est répertoriée).

- Dans la littérature, il est décrit des cas de types aperturaux composés présentant à la fois des apertures polaires et d'autres groupées sur le même grain de pollen. Ces types aperturaux ont été observés par Huynh (1976) chez la Liliale *Tulipa praecox*, dont le pollen a trois apertures (une établie en définition polaire, les deux autres de façon groupée), ou encore chez la Commelinale *Commelina anomala* (trois apertures selon le même mode que *T. praecox*). La coexistence de mécanismes impliqués dans la polarité et l'établissement du pattern des apertures ou des sutures sporales est également décrite pour les spores de certaines espèces de Ptéridophytes. La fougère *Osmunda*, par exemple, produit des spores avec une suture monolète –marque analogue à une aperture monosulquée, au pôle proximal, et une suture trilète –marque analogue à une aperture trichotomosulquée, au pôle distal de la tétrade (van Konijnenburg-van Cittert 2000). Les changements dans la définition des apertures font certainement intervenir des mécanismes différents, ce qui se traduirait par une coexistence possible des processus d'établissement du type apertural aboutissant à la formation de types aperturaux composés.

- Le caractère est apparemment marqué par l'absence de réversion vers une localisation polaire dans les tétrades une fois que la transition vers une localisation groupée s'est produite (aucune réversion de ce type n'a encore été décrite, y compris chez les Eudicotylédones qui ont pourtant acquis l'état groupé depuis longtemps). Ceci est peut-être lié à la nature des mécanismes impliqués dans la définition de la zone où seront placées les apertures. Si les différents mécanismes sont distincts (voir paragraphe précédent), la perte de l'un d'eux

équivalent à une perte de fonction. La réversion peut en conséquence être improbable, voire impossible, à réaliser et dans ce cas nous aurions une évolution irréversible.

Le déterminisme de la localisation des apertures est donc un caractère qui mériterait d'être étudié de façon plus détaillée. Il se trouve que nous n'avons à ce jour aucune idée des mécanismes mis en jeu au niveau moléculaire dans la réalisation de ce caractère.

1-4-2 Contraintes développementales et sélection sur l'évolution du type apertural

Nous avons surtout utilisé au cours de cette discussion la définition la plus commune pour tester les contraintes, à savoir l'inertie phylogénétique. Cette définition est finalement limitée, car elle peut induire en erreur. Nos résultats montrent que les analyses basées uniquement sur le test de l'inertie phylogénétique demandent une interprétation nuancée : lorsqu'un signal phylogénétique est détecté, son origine peut provenir effectivement de contraintes relatives à l'évolution du caractère. C'est ce que nous observons pour la formation des parois à l'issue de la méiose : ce caractère est caractérisé par un nombre limité de transitions. Cependant, même un signal phylogénétique très significatif peut trouver son explication dans l'action probable de la sélection naturelle. Nous l'observons avec nos données pour le type de cytocinèse : après une transition vers une cytocinèse simultanée, il y a eu de multiples tentatives d'évolution vers une cytocinèse de type successive (ou quasi-successive : cas des cytocinèses intermédiaires), avant qu'une réversion ne se produise et soit stabilisée chez les Asparagales supérieures. Dans ce cas, le signal phylogénétique du caractère ne peut être interprété comme la présence d'une contrainte, mais détecte la sélection d'options du développement pour leurs conséquences sur le phénotype : le nombre de transitions est important et tend à favoriser une production de tétrades quadratiques (en témoigne la figure 27). Si aucun signal phylogénétique n'est détecté, cela ne veut pas dire pour autant que les contraintes sont complètement absentes en ce qui concerne le caractère. La forme des tétrades l'illustre bien : elle est contrainte par la cytocinèse, sans pour autant être une contrainte évolutive.

Si le signal phylogénétique à lui seul est insuffisant pour établir l'existence d'une contrainte évolutive, la connaissance du nombre de transitions sur la phylogénie, relativement aux autres caractères, nous renseigne plus précisément : si le caractère évolue 'facilement' (nombre de transition élevé), la présence d'un signal n'est pas indicatrice de contrainte. En revanche, si les transitions sont rares, un signal phylogénétique indique bien une contrainte évolutive d'origine développementale. Deux de nos caractères (données observées et données de la littérature) sont soumis à des contraintes évolutives : la transition vers une formation centripète des parois, et la réversion d'une localisation groupée des apertures vers une localisation polaire (tableau 15).

Caractère	Transition	Effets observés (données) sur le type apertural	Occurrence chez les Asparagales (parcimonie/observations et littérature)	Nature de la contrainte
Type de cytokinèse	« successive » > simultanée	monosulqué > monosulqué/trichotomosulqué	3 (occasionnelle)	sélection naturelle ('contre'-sélection faible)
	simultanée > « successive »	monosulqué/(trichotomosulqué) > monosulqué	7 (fréquente)	sélection naturelle (favorable, canalisation du type apertural monosulqué)
Formation de la paroi	centrifuge > centripète	monosulqué/trichotomosulqué > monosulqué/trichotomosulqué, et zonasulqué	1 chez les Asparagales (rare), transition probablement occasionnelle	contrainte développementale
	centripète > centrifuge	monosulqué/trichotomosulqué, et zonasulqué > monosulqué/trichotomosulqué	2 (nos données), probablement occasionnel	sélection naturelle ?
Dépôts de callose	plan > cellule	monosulqué/trichotomosulqué > zonasulqué	1 (rare), récurrente chez les Iridaceae (Pinar et Dönmez, 2000)	sélection naturelle ? (avantage local ou conditionnel ?)
Forme des tétrades	régulière > asymétrique	trichotomosulqué > monosulqué	(nombre de transitions = ?), la situation est favorisée car cette situation est très fréquente.	sélection naturelle (favorable, production du type apertural monosulqué)
	asymétrique > régulière	monosulqué > trichotomosulqué	2 (plutôt rare), « clade trichotomosulqué » (Rudall et al. 1997)	sélection naturelle ? avantage local pour les milieux xériques ? (Pires et al. 2004)
Localisation des apertures	polaire > groupées	monosulqué/trichotomosulqué, zonasulqué > di- ou tri-aperturé	1 avec nos données, transition probablement occasionnelle (données de la littérature : Huynh, 1976)	sélection naturelle ?
	groupées > polaires	non observé	0 avec nos données, très rare, voire impossible ?	probablement une contrainte développementale

Tableau 15 : Transitions développementales et nature des contraintes évolutives sur le type apertural chez les Asparagales. Chacun des changements d'état pour les différentes étapes de la microsporogénèse liées au modèle sont détaillés (les deux premières colonnes) et mis en parallèle avec le taux de changement pour nos résultats et les données bibliographiques le cas échéant, ainsi qu'avec le mécanisme évolutif probablement limitant (sélection ou contrainte).

Partie 2 : Sélection sur la morphologie du pollen

2-1 Introduction

Les grains de pollen, que l'on peut considérer comme des quasi-gamètes, ont cette caractéristique des gamètes mâles d'être produits généralement en très grand nombre, comparativement à la population d'ovules qu'ils sont censés féconder. S'ils sont déposés en grand nombre sur les stigmates, ils seront en situation de compétition pour la fécondation. Cette compétition offre à la sélection naturelle l'opportunité d'agir sur les caractéristiques biologiques liées à la performance du pollen. Cependant, il arrive que la quantité de pollen soit limitante pour le succès reproducteur de la plante, phénomène communément appelé dans la littérature "limitation par le pollen". Que sait-on de cette situation? Y a-t-il plutôt compétition pollinique ou le pollen est-il un facteur limitant pour le succès reproducteur des plantes? Nous allons voir dans cette partie qu'il n'est pas aussi certain que la limitation par le pollen empêche toute compétition pollinique, avant de considérer quelques facteurs qui influencent cette compétition et en particulier aborder plus en détail l'importance que peuvent revêtir les caractéristiques morphologiques comme le type apertural pour le succès reproducteur du pollen.

2-1-1 Ce que nous apprennent les expériences de compétition pollinique

a) Y a-t-il compétition pollinique pour la fécondation ?

L'idée d'une compétition pollinique effective est relativement ancrée dans la littérature. En dépit de résultats parfois contradictoires, il semblerait que le pollen soit en général dans une situation de compétition, une fois déposé sur le stigmate. Si le débat n'a pas encore permis de trancher réellement sur l'importance de cette compétition pour la fécondation, l'idée qu'il soit possible de sélectionner des caractéristiques du sporophyte (notamment pour la vigueur, Hormaza et Herrero 1996) sur la phase gamétophytique est souvent évoquée dans la littérature. Cette idée, issue de la recherche agricole (Mulcahy 1974) et transposée à la biologie de la pollinisation et des plantes en général (Mulcahy 1979), a lancé un débat actif. Certaines études montrent que la sélection sur la phase gamétophytique est potentiellement possible (Touraev et al. 1995) ou effective (Stephenson et al. 2001), tandis que l'idée plus précise selon laquelle la vitesse de germination du pollen est corrélée à la valeur sélective des descendants ne donne pas toujours de résultats probants (Pasonen et al. 2001), même si l'effet a été montré dans certains cas (Mulcahy 1974 ; Johannsson et

Stephenson 1997 ; Winsor et al. 2000). A l'heure actuelle, en écologie de la pollinisation, la tendance est aussi à considérer le phénomène de limitation par le pollen comme non négligeable, voire très fréquent (Burd 1994) et parfois caractéristique d'une région (celle du Cap en Afrique du Sud, par exemple, Johnson et Bond 1997). Il peut sembler y avoir une contradiction entre l'idée d'une limitation par le pollen et celle de la compétition pollinique, cependant, ces deux phénomènes ne sont pas forcément contradictoires et peuvent jouer de paire dans l'évolution. S'il peut apparaître au niveau de la population de fleurs une limitation par le pollen, cette situation peut très bien coexister avec la compétition pollinique sur une partie des fleurs, celle où le dépôt de pollen excède le nombre d'ovules à féconder. D'une manière générale, il y a souvent compétition pollinique chez les espèces entomophiles, les insectes butineurs déposant du pollen en grande quantité à chaque visite. La limitation par le pollen est dans ce cas dépendante de la visite des fleurs par les pollinisateurs, surtout si les espèces ont une stratégie de pollinisation sans récompense (Johnson et Bond, 1997), tandis que la compétition pollinique intervient quasiment à chaque fois qu'une fleur est effectivement visitée et pollinisée (figure 28).

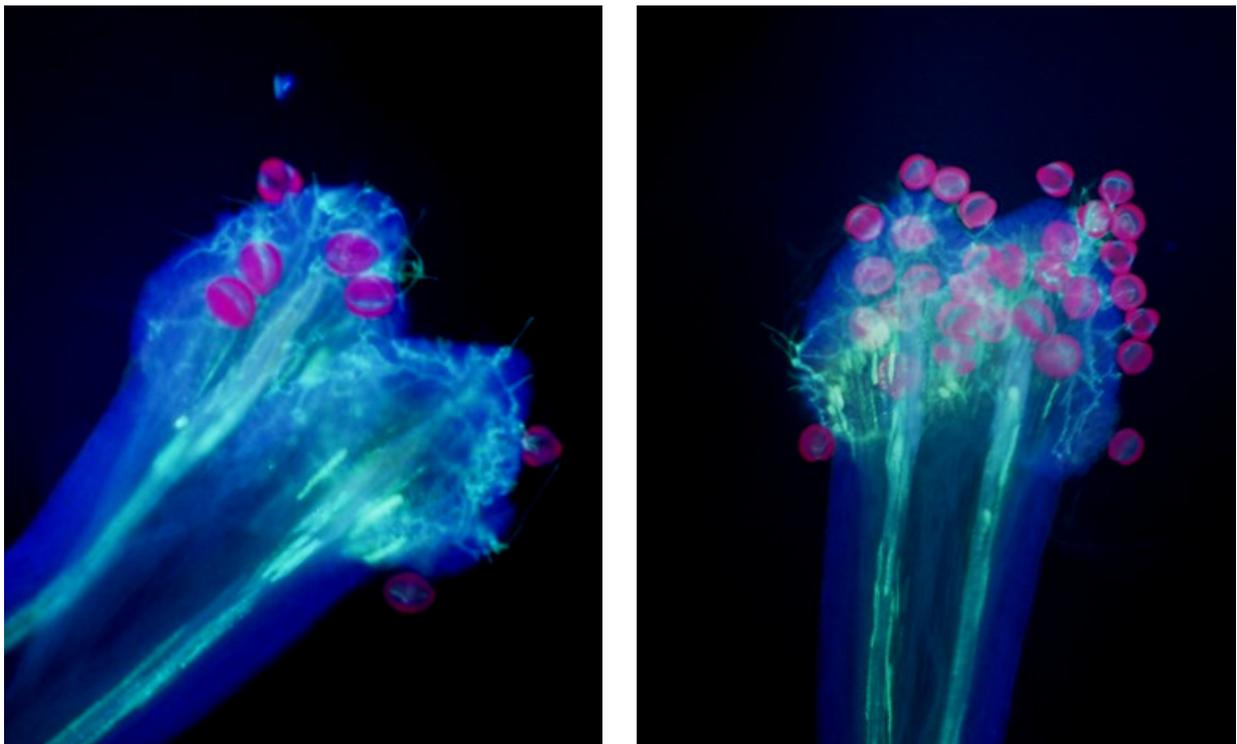


Figure 28 : Compétition pollinique chez *Gerbera aurantiaca* (Asteraceae). (Courtoisie de C. L. Collin et S. D. Johnson). En rose, les grains de pollen déposés sur le stigmat. En bleu clair, les tubes polliniques des grains de pollen ayant germé, qui se dirigent vers l'ovule via le style.

b) Quels sont les facteurs qui jouent dans la compétition pollinique ?

Selon la littérature, un certain nombre de facteurs interviennent au cours de la pollinisation et de la fécondation. La fécondation est un phénomène complexe, en raison de l'influence potentielle entre ses différents acteurs, grains de pollen, plante réceptrice, mais aussi en raison des conditions de l'environnement. Il en résulte une certaine difficulté à généraliser ce que l'on sait de l'ensemble des conditions qui influencent la fécondation chez les plantes, chaque situation ayant des caractéristiques propres et qui ne s'expriment pas forcément dans d'autres situations. On peut regrouper ces facteurs dans les catégories suivantes :

- Les effets liés au grain de pollen et à la plante productrice du pollen (« pollen donor »)

Le critère le plus étudié dans la littérature concerne la vitesse d'élongation du tube pollinique, pour laquelle il existe une forte variabilité dans les populations chez les plantes. Les pollens diffèrent par leur vitesse de germination, en fonction de la 'qualité' de la plante paternelle. Certaines études ont pu mettre en évidence que ce caractère est effectivement corrélé au succès reproducteur. Chez le pin, les pères dont les grains de pollen montrent une meilleure germination *in vitro* sont aussi ceux qui ont le plus grand succès reproducteur (Aronen et al. 2002). L'idée à l'origine de ces recherches est que si la vitesse de germination des grains de pollen permet d'apprécier la vigueur de ces « gamètes » (en termes de physiologie et métabolisme), alors cette composante devrait se retrouver chez les descendants (Mulcahy 1974 ; 1979). Cette idée est très débattue : si ces différences de germination sont faciles à observer, les effets de vigueur chez les descendants sont en revanche plus difficiles à mettre en évidence et ce point est encore très discuté. Chez *Cucurbita foetidissima* (Cucurbitaceae), une augmentation de vigueur chez les descendants a été effectivement démontrée (Winsor et al. 2000). Chez le bouleau, ces effets sont plutôt légers, même s'ils sont significatifs, et les effets maternels sont plus importants (Pasonen et al. 2001). Chez *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae), la compétition interspécifique est plus importante que la compétition intra spécifique. Le phénomène de compétition pollinique intervient donc ici en tant que facteur d'isolement reproducteur des espèces mais aucun effet sur la vigueur des descendants n'a été constaté (Caruso 1999). Le phénomène de compétition pollinique peut donc jouer un rôle important dans l'isolement reproducteur des espèces. Cette situation a également été décrite pour deux espèces d'*Hibiscus* (Malvaceae) (Klips 1999) mais aussi chez le bouleau (Williams et al. 1999), par observation directe de la compétition dans le style. Cette dernière étude insiste notamment sur le rôle actif de la compétition pollinique pour éviter les croisements interspécifiques, et cette compétition est plus importante que le phénomène d'avortement sélectif des embryons pour limiter les croisements interspécifiques dans ce genre (Williams et al. 1999).

Si la vitesse de croissance des tubes polliniques est un caractère qui influence le succès reproducteur, l'effet de la date d'arrivée du pollen sur le stigmate n'est pas à négliger non plus. En effet, dans une expérience destinée à mesurer l'effet de l'arrivée du pollen sur le stigmate chez *Hibiscus moscheutos* (deux dates de pollinisations manuelles ont été testées en combinaison avec deux populations de pollen différant dans la vitesse de croissance des tubes polliniques), Snow et collaborateurs (2000) ont montré que les pollens déposés secondairement ont moins de chance de féconder des ovules, mais également que les pollens « rapides » ne différaient pas des pollens « lents » dans leur capacité à féconder. Il semble donc que la capacité à germer rapidement ne soit pas une condition toujours suffisante pour s'assurer d'une paternité, mais qu'arriver en premier sur le stigmate ait une part importante dans le succès reproducteur mâle.

Dans une étude sur le radis, Marshall et Diggle (2001) rapportent que les différents donneurs de pollen diffèrent aussi significativement pour le succès reproducteur au niveau de la partie du fruit (haut/milieu/bas), suggérant la possibilité d'une 'spécialisation' locale possible au niveau de l'ovaire dans la compétition pour la fécondation.

D'autres facteurs influencent également la capacité de compétition des grains de pollen. Chez le frêne, par exemple, les plantes mâles ont un pollen plus compétitif que les plantes hermaphrodites dans les cas de compétition en croisements contrôlés (plus de 99% des fécondations sont attribuées aux pollens des plantes mâles ; Morand-Prieur et al. 2003). Chez *Dianthus* (Tejaswini 2002), deux traits du pollen montrent des avantages opposés : une plus grande taille du grain de pollen est positivement corrélée avec le taux de germination, tandis que la vitesse d'élongation du tube pollinique est négativement corrélée à la taille du grain de pollen. Ces deux pressions sélectives antagonistes pourraient expliquer l'existence de différentes classes de tailles de pollen dans ce genre comme stratégie mixte pour optimiser la reproduction.

- les effets liés à la plante réceptrice

Il existe une forte variabilité liée aux plantes réceptrices, quand elles reçoivent des populations polliniques similaires. Cela est parfois lié à la fécondité des plantes mères : la variation du nombre de grains de pollen déposés sur le stigmate peut affecter différemment les plantes. Mitchell (1997) a observé une telle variation de la réponse au dépôt de pollen chez la crucifère *Lesquerella fendleri*. Les variations de la production de fruits peuvent donc ne pas s'expliquer uniquement par des variations en dépôt de pollen. La variabilité de la réponse reflète des différences dans la capacité des plantes mères à produire des graines quand suffisamment de pollen est reçu. Cependant, cette variation n'est pas toujours liée à la fécondité, mais peut dépendre de l'état physiologique de la plante mère : il a ainsi été suggéré que le stress

subi par la plante mère influence la production des graines, en conditions optimales la fécondation est plus lente et plus sélective que lorsque la plante est en état de stress (Marshall et Diggle 2001).

La plante réceptrice a également un effet sur la compétition, notamment sur la progression des tubes polliniques dans le style. Cet effet sur les grains de pollen relève soit de facteurs physiques, comme la résistance des tissus transmetteurs, soit de facteurs physiologiques, comme la disponibilité en réserves nécessaires à la croissance. Ces deux derniers facteurs n'ont pas encore fait l'objet d'étude précise, et restent des hypothèses pour expliquer le déclin progressif du nombre de tubes polliniques le long du style, quand il n'y a pas d'interactions d'auto-incompatibilité (Hormaza et Herrero 1996).

Il peut également exister un phénomène de remplissage sélectif des fruits en relation avec la quantité de pollen déposée. Une étude chez *Alstroemeria aurea* a montré qu'il n'existait pas de différence significative du nombre de graines produites et de leur poids moyen en comparant des rameaux ayant reçu des dépôts de pollen manuels différents mais homogènes au niveau du rameau, tandis qu'une augmentation de près de 10 % du nombre de graines par fruit pouvait être observée lorsque le dépôt de pollen était variable sur les fleurs d'un rameau (spécifique et Searcy 1998). Ce résultat suggère une allocation sélective de ressources aux graines, basée sur l'hétérogénéité de la pollinisation, et indépendante du nombre de fruits produits.

- les effets du milieu et du hasard

Dans un environnement variable, les fluctuations environnementales peuvent modifier considérablement les capacités des différents pollens à féconder les ovules. Une étude sur les capacités en compétition du pollen de *Viola tricolor* à différentes températures a montré une interaction « donneur x température » significative (Lankinen 2001). En conditions naturelles, la fluctuation de l'environnement est donc susceptible de maintenir une variation dans la capacité à la fécondation en dépit de la sélection.

Une autre composante du milieu qui semble avoir un impact important est la densité de la population de pollen en compétition. Chez *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae), lorsque la population de pollen est importante sur le stigmate, la germination et la croissance des tubes polliniques est globalement augmentée, et culmine pour des densités de pollen intermédiaires (Niesenbaum et Schueller 1997). Cet effet a été appelé « l'effet de population du pollen ». On constate par exemple une augmentation du nombre d'ovules fécondés, y compris lorsqu'une partie du pollen surnuméraire est mort (Hormaza et Herrero 1996). Cet effet population s'explique en partie par des facteurs chimiques, dont certains commencent à être identifiés (Chen et al. 2000).

La densité de pollen arrivant sur le stigmate peut aussi donner lieu à d'autres effets : la compétition pour la fécondation est bien sûr plus grande, mais l'avantage est donné aux grains de pollen les plus directement en contact avec le stigmate. La germination dépend de la réhydratation du pollen, qui est entre autre accélérée au contact du stigmate (Thomson 1989). Les grains les plus éloignés finissent également par germer, mais ils germent en retard par rapport aux grains en contact direct avec le stigmate. Selon l'auteur de cette étude, cet effet

aléatoire contribue à diminuer l'impact de la sélection. Cependant, il n'y a aucune raison de penser que la compétition pollinique n'a pas lieu pour les pollens à même le stigmate, ni même lorsque la variation de croissance du tube pollinique peut compenser le retard de germination. Il n'en reste pas moins cependant que des délais de cet ordre peuvent influencer le succès reproducteur des plantes en compétition.

Cette synthèse de la littérature montre que la sélection sur le pollen liée à la compétition pour la fécondation est potentiellement importante (figure 29). L'hypothèse d'une sélection sur les caractères de survie et de compétition des grains de pollen est donc fondée. Les apertures jouent un rôle crucial pour différents aspects de la vie du pollen, puisqu'elles servent de porte d'entrée pour l'eau au cours de la réhydratation, étape préliminaire à la germination, avant de permettre la germination des tubes polliniques. Il est donc fort probable que les apertures jouent un grand rôle dans la compétition pollinique, et qu'elles soient soumises à de fortes pressions de sélection. Que sait-on de cet aspect de la compétition ?

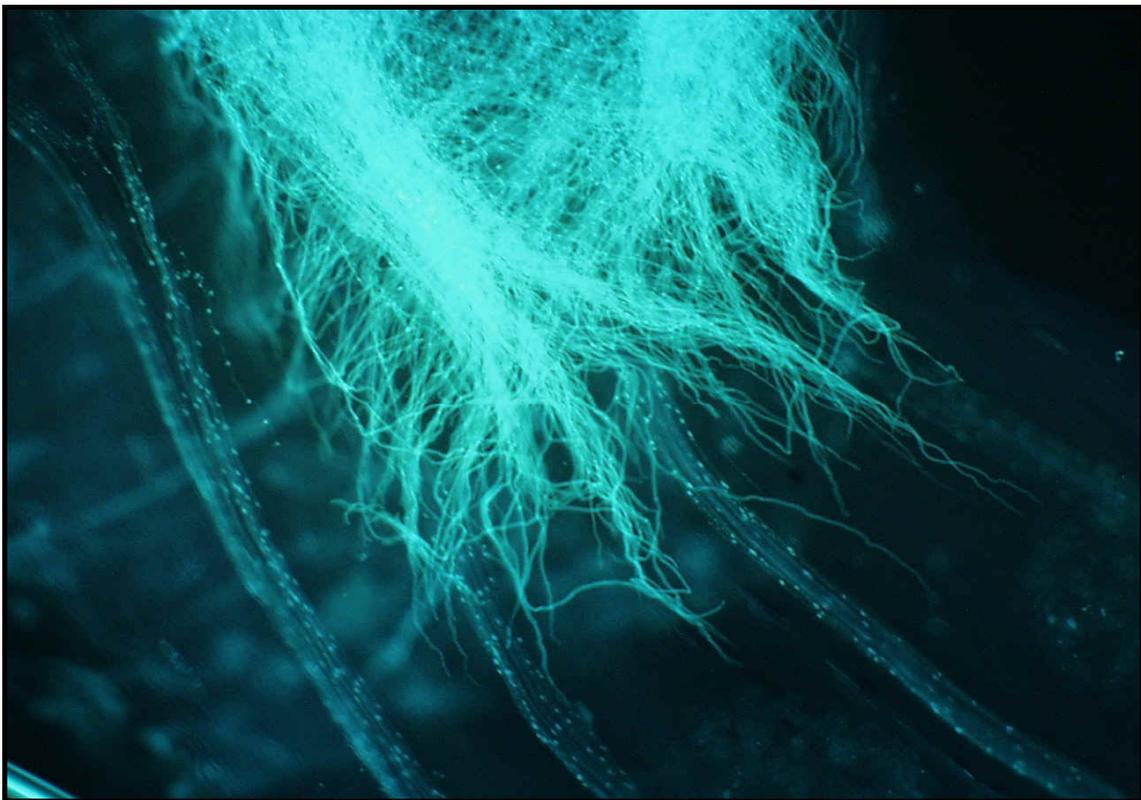


Figure 29 : Compétition pour la pollinisation dans le style entre tubes polliniques (en bleu clair) chez *Orchis mascula*. (Courtoisie de C. L. Collin et J. Jersakova).

2-1-2 La sélection sur le type apertural

Chez les angiospermes, certaines plantes ont la capacité de produire différentes formes de pollen dans leurs anthères. Cette situation diffère du polymorphisme *sensu stricto* (polymorphisme inter-individuel) dans la mesure où cette variation se trouve à l'échelle de l'individu et non entre plantes différentes. Ce phénomène est appelé **hétéromorphisme** (Venable 1985). Cette situation est particulièrement intéressante, puisqu'elle permet de tester l'influence de la sélection sur le type apertural tout en se démarquant des effets liés au génotype, qui sont toujours important dans les études sur le pollen.

a) Quelle est la fréquence de l'hétéromorphisme pollinique chez les plantes à fleur ?

Plutôt rare chez les Monocotylédones, l'hétéromorphisme est en revanche assez fréquent chez les eudicotylédones (différents types polliniques rencontrés chez le genre *Viola* sont illustrés figure 30). Des observations chez les eudicotylédones ont montré que plus d'un tiers de 170 espèces observées étaient hétéromorphes (Mignot et al. 1994).

Si l'on considère une définition 'large', à savoir le taux de familles d'Angiospermes présentant au moins une espèce hétéromorphe pour le pollen, la différence entre les groupes de plantes (angiospermes basales, monocotylédones et eudicotylédones) est moins marquée et indique que la situation d'hétéromorphisme est plus homogène entre ces groupes (se reporter au tableau 3).

b) Quels sont les facteurs influençant l'hétéromorphisme ?

L'hétéromorphisme peut dépendre de nombreux facteurs. Il dépend, par exemple, en partie du niveau de ploïdie chez certaines espèces. Le nombre d'ouvertures augmente avec le niveau de ploïdie, mais il est seulement corrélé en général à la ploïdie du sporophyte (Nadot et al. 2000 chez *Viola* pour exemple) ; cependant ce n'est pas toujours le cas pour toutes les espèces (Mignot et al. 1995, également pour quatre espèces de *Viola*) tandis que la ploïdie gamétophytique n'a pas non plus d'influence directe sur ce caractère : l'hétéromorphisme varie entre plantes dans les différentes populations de *Viola*, mais aucune corrélation entre le contenu moyen en ADN du noyau reproducteur du pollen et les différentes proportions en types aperturaux n'a été mise en évidence. En conséquence, les proportions des différents types aperturaux ne sont pas liées aux variations des contenus en ADN des noyaux reproducteurs (Dajoz et al. 1995). Il existe également une composante génétique sur la proportion des formes polliniques liée à la plante mère chez le tabac (Till-Bottraud et al. 1995) ou chez la violette (Dajoz et al. 1993), ainsi que le montre l'analyse de descendance de plantes différant par le taux des différents types polliniques. Cette composante génétique s'exprime différemment en fonction des cultivars chez le tabac (Till-Bottraud et al. 1995),

bien que l'hétéromorphisme soit cryptique (faible taux de pollen tétra-aperturé) chez les espèces sauvages parentes du tabac cultivé. L'hétéromorphisme varie également dans une moindre mesure entre les individus d'un cultivar, mais très peu entre individus d'un même génotype. Il varie encore en fonction de la fleur, de la taille de l'anthere et de la date, mais aucun effet de l'inflorescence (rameau latéral), ni de l'épaisseur ou de la largeur de l'anthere n'a été mis en évidence (Till-Bottraud et al. 1995). Les facteurs qui peuvent influencer l'hétéromorphisme sont donc complexes. Ces études montrent également que l'environnement influence l'hétéromorphisme.

Cet effet des composantes génétiques et environnementales sur la production de différents types aperturaux au sein des individus trouve son origine dans la nature du développement. Les facteurs de la microsporogénèse interviennent à part entière, ainsi qu'il a été noté par Woodehouse (1935) : il existe en moyenne une ouverture par plan de division, or le nombre de cloisons est déterminé par la position des noyaux et par les interactions des réseaux de microtubules. Les étapes du développement permettent de comprendre comment résulte l'hétéromorphisme. Les Eudicotylédones ont fixé un type de microsporogénèse précis : une cytokinèse simultanée, une progression centripète des parois de callose et une définition équatoriale des ouvertures. Les plans de division résultants de la cytokinèse interviennent dans la variation du nombre d'ouvertures, ainsi que le montrent les variations du type apertural liées à la présence de microspores surnuméraires (Ressayre et al. 2003). Chez les Eudicotylédones, un autre facteur pouvant influencer le nombre d'ouvertures, et donc la production de différents types aperturaux au sein d'un individu, est la variation de la disposition des noyaux à l'issue de la méiose. Chez le tabac, on trouve plusieurs catégories de tétrades tétraédriques : des tétrades homogènes avec quatre microspores toutes à 3 ou toutes à 4 ouvertures, ainsi que toutes les variantes de tétrades hétérogènes – trois microspores à 3 ouvertures et une à 4 ; deux microspores à 3 ouvertures et deux à 4 ; et finalement une microspore à 3 ouvertures et trois à 4 (Mignot et al. 1995). Cependant, toutes ces catégories ne sont pas obtenues dans les proportions attendues en cas d'indépendance des configurations, les catégories homogènes (uniquement du pollen tricolpé ou uniquement du tétracolpé dans les tétrades) sont en proportions plus élevées qu'attendues et leur distribution change selon la position dans l'anthere, ce qui suggère des contraintes à ce stade, probablement géométriques et d'ordre développemental. L'hétéromorphisme chez les Eudicotylédones est lié à leur développement et en particulier aux interactions entre noyaux issus de la méiose. Cette interaction peut être influencée par l'environnement (la température, par exemple). Cette hypothèse des interactions est soutenue par une modélisation des noyaux en tant qu'« attracteurs », qui permet d'expliquer la production des tétrades homogènes et hétérogènes (Ressayre et al. 1998). Les facteurs influençant l'hétéromorphisme sont nombreux, et il s'agit d'un caractère au déterminisme complexe.

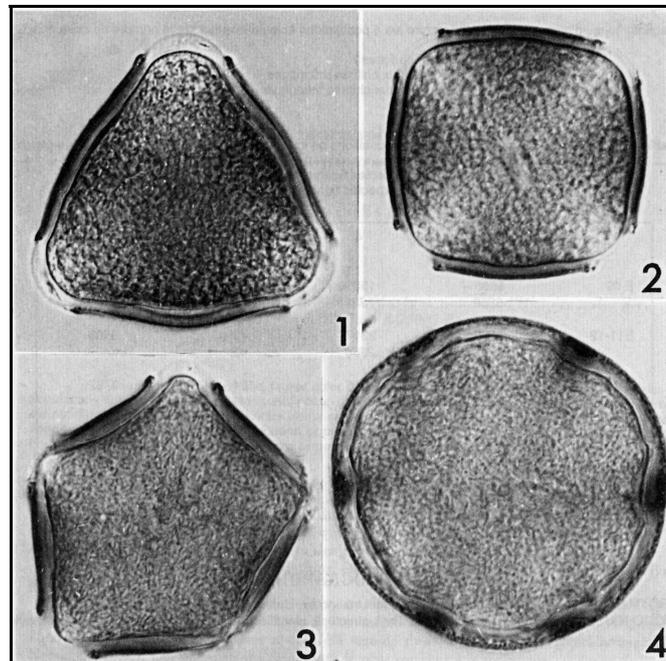


Figure 30 : Les différents types aperturaux des pollen du genre *Viola* (repris de Dajoz et al. 1991). 1- pollen tri-aperturé, 2- pollen à quatre apertures, 3- pollen à cinq apertures, et 4- pollen à six apertures.

c) Comment explique-t-on le maintien de l'hétéromorphisme chez les plantes à fleurs ?

En utilisant un modèle de théorie des jeux avec deux donneurs, Till-Bottraud et collaborateurs (1994) ont montré que l'hétéromorphisme est une stratégie évolutivement stable (ESS) sous certaines conditions (dépendant notamment de la longévité du pollen et des systèmes de pollinisation), tandis que le polymorphisme ne peut l'être. Le polymorphisme peut devenir une ESS dans les situations avec multiples donneurs, mais l'espace des paramètres permettant la stabilité de cette situation est toujours inférieur à ceux permettant l'évolution vers l'hétéromorphisme, ce qui expliquerait pourquoi l'hétéromorphisme est une situation plus fréquente que le polymorphisme pour le pollen chez les plantes (Till-Bottraud et al. 2001).

L'hétéromorphisme pollinique chez le genre *Viola*

Chez *Viola diversifolia*, une espèce hétéromorphe produisant essentiellement des pollens à 3 et 4 apertures, il a été montré des différences de survie et de germination pour chacune des deux morphologies polliniques : les pollens 4-aperturés ont un taux de germination plus élevé au départ, tandis que les pollens 3-aperturés ont une meilleure survie (Dajoz et al. 1991), ainsi qu'une croissance plus rapide du tube pollinique (Dajoz et al. 1993). Cette situation d'hétéromorphisme est instable si l'on ne considère ces stratégies alternatives qu'en terme de stratégie du gamétophyte, mais peut être une ESS si on les considère en terme de stratégies du sporophyte (Dajoz et Till-Bottraud 1992).

Cependant, l'hétéromorphisme peut ne pas être une stratégie sélectionnée mais représenter une phase de transition évolutive. Comme il existe des facteurs génétiques qui influencent la proportion des différents type de pollen, puisqu'il y a une composante génétique familiale significative à l'expression du caractère (Dajoz et al. 1993), il reste à savoir si la situation correspond à un état de transition de production de pollen 3-aperturé vers une production complète de pollen 4-aperturé (ou sa réciproque), ou à un état d'équilibre. Une analyse comparative de l'hétéromorphisme chez le genre *Viola* a montré que la production de différents morphes de pollen est corrélé au niveau de ploïdie (Nadot et al. 2000), ce qui rend la possibilité de contraintes d'origine génétique et développementale possible et on pourrait supposer que la situation d'hétéromorphisme correspond à une transition contrainte, dans le cas des violettes, par les conséquences d'un changement de ploïdie. Les modélisations tendent à suggérer cependant que les situations d'hétéromorphisme pourraient sous certaines conditions résulter d'un équilibre écologique (Till-Bottraud et al. 1994 ; Till-Bottraud et al. 2001). Un argument en faveur d'une situation d'équilibre écologique entre stratégies pour la pollinisation existe en effet : chez une autre espèce hétéromorphe, *Viola calcarata*, la proportion de pollen 4-aperturé (contre le pollen 5-aperturé) est corrélée positivement avec l'altitude, c'est-à-dire lorsque les pollinisateurs sont plus rares et que l'arrivée sur un stigmate est plus aléatoire. Ceci favorise une stratégie de longévité (pollen à 4 apertures) au détriment d'une stratégie de rapidité de germination (pollen à 5 apertures) (Till-Bottraud et al. 1999).

L'hétéromorphisme correspond donc peut-être bien à différentes stratégies coexistant afin de permettre une reproduction optimisée dans un contexte où les conditions de pollinisations sont imprévisibles. Néanmoins, l'abondance des situations d'hétéromorphisme chez les plantes à fleurs mérite davantage d'étude. En effet, cette situation correspond-elle à un état d'équilibre écologique dans chaque cas, s'agit-il aussi de transitions vers un nombre plus élevé d'apertures ou bien d'une contrainte liée au développement ou d'autres facteurs (par exemple, du degré de ploïdie sporophytique) ?

Nous avons étudié l'influence de la sélection chez une espèce hétéromorphe (le frêne commun) avec une étude se distinguant notamment sur deux points des précédentes : i) notre modèle, *Fraxinus excelsior*, est anémophile et disperse donc son pollen par le vent, et ii) nous avons choisi de tester la sélection en compétition *in natura*, plutôt que par des tests de germination *in vitro*, par le biais d'une analyse de paternité.

2-2 Succès reproducteur en verger et morphologie du pollen chez *Fraxinus excelsior*

Ces travaux sur le frêne ont été menés en collaboration par plusieurs équipes et sur plusieurs thématiques du laboratoire (évolution de la morphologie du pollen, évolution des systèmes de reproduction, évolution et diversité des populations). De nombreuses personnes ont collaboré pour recueillir ces données, de 1999 à 2004 : le suivi de la phénologie sur un verger à graines (C. Raquin, O. Cudelou, P. Bertolino, N. Frascaria-Lacoste, O. Jonot, B. Albert, S. Triki-Teurtroy), de la biologie moléculaire (essentiellement E. Coutté et moi-même en ce qui concerne les travaux présentés), du génotypage sur le verger (S. Brachet, B. Albert, O. Jonot, E. Coutté, M-E Morand-Prieur et moi-même), ou encore pour les analyses spécifiques (E. Klein). Ces données sont le résultat d'un travail collectif.

2-2-1 Introduction

Le frêne commun (*Fraxinus excelsior*) est un arbre de la famille des Oleaceae dont l'aire de répartition s'étend sur l'Europe et une partie de l'Asie mineure (Franc et Ruchaud 1996). C'est une espèce pionnière, qui s'établit parmi les premières dans les successions végétales ; elle présente une floraison protogyne et elle a une pollinisation anémophile (Wallander 2001). Le frêne commun possède la caractéristique d'avoir un système de reproduction complexe : il est polygame, c'est-à-dire qu'il se présente en populations formées d'un continuum entre individus femelles pures (ne portant que des fleurs femelles) et individus mâles purs (ne portant que des fleurs mâles), avec différentes catégories de plantes hermaphrodites (hermaphrodites à tendance mâle, hermaphrodites purs et hermaphrodites à tendance femelle) séparant ces deux sexes extrêmes (Wallander 2001, figure 31-4). Chez *F. excelsior*, les hermaphrodites produisent un pollen viable et fertile, mais ce pollen est cependant dix fois moins efficace en conditions contrôlées que le pollen issu d'individus mâles (Morand-Prieur et al. 2003).

Comme de nombreuses Eudicotylédones, cette espèce est hétéromorphe. Chaque individu présente plusieurs types aperturés : du pollen tricolpé (trois apertures perpendiculaires à l'équateur), ainsi que du pollen présentant un moindre (deux apertures) ou un plus grand nombre d'apertures (quatre, cinq voire même six : pollens tricolpé et tétracolpé illustrés sur les figures 31-2 et 31-3). Le pollen tricolpé, caractéristique des Eudicotylédones, est en général le type de pollen le plus fréquent (d'environ 35% à ~100% des grains de pollen produits, figure 32). Parmi les pollens différant du pollen tricolpé, le plus fréquent est le pollen à quatre apertures (de 0 à environ 65% des grains de pollen produits), les autres formes étant toujours très minoritaires. Il existe donc une forte variabilité de la proportion de pollen 3-aperturés et 4-aperturés entre individus chez cette espèce. Le taux d'hétéromorphisme, que nous considérerons dans cette partie comme la proportion de pollens tricolpés (étudiée en verger au sein de clones et d'une année sur l'autre), est stable chez cette espèce. Ce caractère montre une héritabilité (au sens large) de 70% (S. Triki-Teurtroy, résultats non publiés). Il montre donc une forte composante génétique.

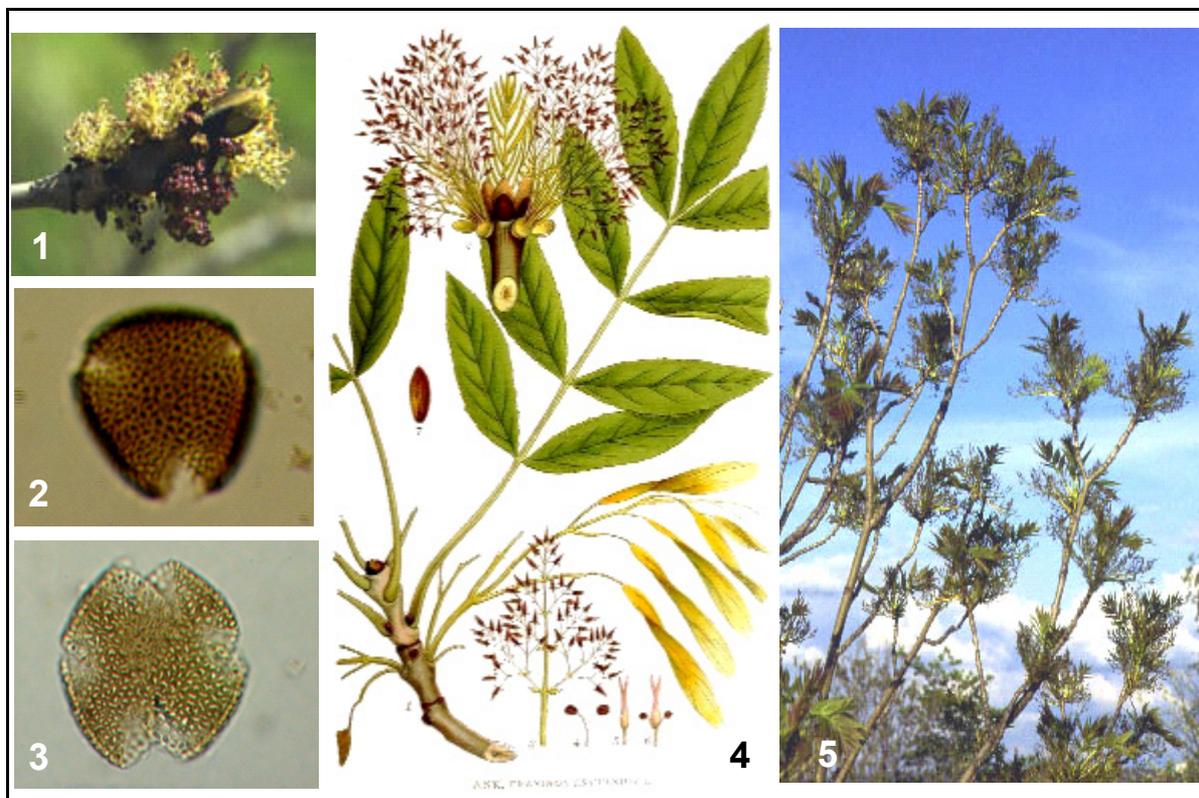


Figure 31 : Quelques illustrations du frêne commun. 1 : inflorescence femelle ; 2 : pollen tricolpé (forme majoritaire chez cette espèce) ; 3 : pollen à quatre ouvertures ; 4 : détails morphologiques de la feuille, du rameau, des fruits (samares), des inflorescences, hampes florales et types de fleurs (en bas : fleurs mâle, femelle et hermaphrodite)¹²; 5 : branches.

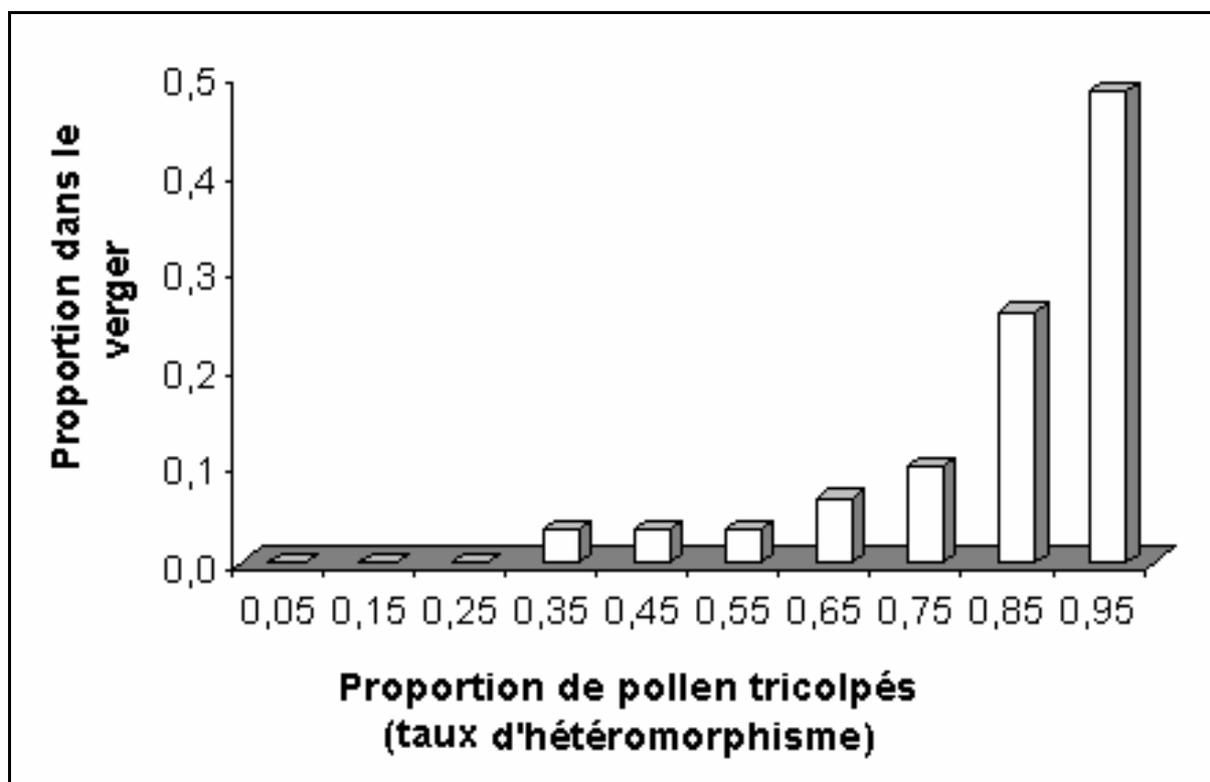


Figure 32 : Distribution du taux d'hétéromorphisme moyen par clone dans le verger.

¹² La planche botanique (4) illustre de nombreux sites web. Malgré nos efforts, son origine n'a pu être retrouvée.

Chez le frêne, le pistil des fleurs femelles contient quatre ovules, mais du fait d'un taux d'avortement important, une seule graine est produite en moyenne par fruit, parfois deux (C. Raquin, communication personnelle). En raison de ce nombre réduit d'ovules à féconder (généralement un), la compétition entre grains de pollen est probablement importante, quand bien même le nombre de grains de pollen déposé sur le stigmate pourrait être faible¹³ (une pollinisation anémophile est une situation différente d'une pollinisation entomophile, pour laquelle les grains de pollen sont déposés en amas sur le stigmate par les insectes et chez qui le phénomène de compétition pollinique s'en trouve exacerbé).

Il peut être légitime, dans ces conditions (caractère variable dans la population et montrant une composante génétique héritable), de se demander si la proportion de pollen tricolpé peut être corrélée à une différence de succès reproducteur. Notre étude tente donc de vérifier l'existence de cette différence de succès reproducteur en conditions naturelles.

Afin de tester la proportion de pollen tricolpés sur le succès reproducteur mâle chez le frêne commun, nous avons procédé à une analyse de paternité dans une population verger composée de clones. Notre étude doit permettre de tester s'il existe ou non une proportion optimale des différents types polliniques assurant un bon succès reproducteur. **La détermination *a posteriori* du nombre de descendants donne accès à la valeur sélective de chaque arbre et complète donc les études essentiellement *in vitro* de l'effet du type pollinique sur les composantes (viabilité et germination) de cette valeur sélective.**

L'analyse du succès reproducteur a été menée en tenant compte des facteurs susceptibles d'avoir une influence sur ce dernier : date de floraison, sexe des arbres, quantité de fleur, quantité de pollen, ou encore distance entre les arbres. La date de floraison, et en particulier la correspondance entre ces dates pour les arbres mères et les arbres pères peut augmenter les chances de l'arbre père de féconder avec succès les arbres mères. Le sexe des arbres pères est également un facteur non négligeable du succès reproducteur, puisque les arbres mâles produisent un pollen plus compétitif en croisements contrôlés (Morand-Prieur et al. 2003). La quantité de fleurs et de pollen produite par l'arbre peut éventuellement influencer le succès reproducteur, ainsi que la proportion de clones dans le verger (si un clone est très représenté, il a potentiellement plus de chances d'être assigné comme clone paternel dans l'analyse de paternité). Nous avons également choisi de réaliser l'analyse de paternité en choisissant comme mères des arbres femelles ou hermaphrodites afin de détecter d'éventuelles autofécondations.

¹³ Une pollinisation anémophile semble cependant avoir des conséquences sur la morphologie du pollen en général (taille et ornementations réduites), et sur le type apertural en particulier (réduction du nombre d'ouvertures ou évolution vers le type apertural zonasulqué), signes d'un impact réel de la sélection sur la morphologie du pollen lorsqu'une espèce évolue vers une pollinisation anémophile (Culley et al. 2002).

L'approche du test *in natura* des effets de la compétition sur le type apertural est donc rendue plus complexe du fait de tous ces facteurs susceptibles d'influencer le succès reproducteur paternel des arbres.

2-2-2-Matériel et méthodes

2-2-2a Le verger

Notre site d'étude est le verger des pépinières Lemonnier, constitué de clones de frênes commun destinés à la production de graines, et situé à environ une dizaine de kilomètres d'Alençon, dans l'Orne. Ce verger est relativement isolé (le frêne le plus proche est à cinq cent mètres dans le voisinage), et il est constitué de 414 arbres plantés en 50 lignes sur 10 colonnes (figure 33), sur une surface de 1 ha (les arbres sont espacés de 3 m sur chaque ligne, et 2,5 m sur chaque colonne ; figure 34-A). Le verger a été planté par greffage d'arbres élites sur des porte-greffes en 1992, et les arbres (taillés en 1996 et en 1998) avaient en 2001 une hauteur moyenne d'environ 7 m (figure 33).



Figure 33 : Verger à graines, frênes, Alençon. 2004.

Les 414 arbres se répartissent en 66 génotypes différents. La représentation de ces génotypes dans la population varie entre 1 et 25 individus : 41 génotypes sont représentés en moyenne par environ 9 individus (tableau 16) ; tandis que 25 des génotypes de la population sont représentés par un seul arbre (Coutté, Jonot et Brachet, résultats non publiés). Les génotypes greffés avaient fait l'objet d'une sélection sur des critères phénotypiques (rectitude et absence de défaut du tronc, port, hauteur, diamètre) pour produire des graines.

Verger	N	Nb individus moyen par clone	Ecart-type
Clones	41	9,49	5,81
Individus solitaires	25	1	-
Total	66	6,3	6,2

Tableau 16 : Caractéristiques de la composition en clones du verger.

Chacun des arbres a fait l'objet d'un génotypage, et d'un relevé régulier pour des indices phénologiques sur plusieurs années (1999 à 2004) par le laboratoire (équipe frêne/équipe pollen). Deux exemples de cartographie de ces indices sur le verger sont illustrés : l'hétéromorphisme (figure 34-B), et le sexe des arbres (figure 34-C). Les indices qui sont utilisés dans cette analyse en raison de leur influence potentielle sur le succès reproducteur, sont les suivants : la date de floraison, le sexe des arbres, la quantité de fleurs, la quantité moyenne de pollen produite par étamine (basée sur le comptage du pollen contenu dans deux couples d'étamines par arbre¹⁴), l'hétéromorphisme (défini ici de façon simplifiée comme la proportion de pollen tricolpé). Ces indices sont résumés pour chaque clone dans le tableau 17 (voir également la figure 31 pour l'hétéromorphisme moyen par clone dans le verger).

¹⁴ Cette estimation de la quantité de pollen surestime la quantité produite chez les arbres femelles. En effet, lorsque les fleurs des arbres femelles comportaient des étamines, ce qui arrive occasionnellement mais est rare chez les fleurs femelles, un comptage a tout de même été réalisé pour avoir une idée de la présence de pollen au sein de ces fleurs (les étamines en question sont souvent atrophiées).

Clone	Fréquence (verger)	Sexe	Date floraison	Abondance de fleurs	%3-aperturé	Quantité de pollen
2	0,033816425	1,0	1,5	2,6	0,76	152,7
3	0,060386473	1,1	1,9	2,5	0,71	247,4
5	0,026570048	3,7	2,7	1,3	0,86	152,7
6	0,016908213	3,8	3,2	0,6	0,64	56,5
7	0,024154589	5,3	2,3	0,9	0,47	32,7
8	0,024154589	1,8	2,0	1,4	0,86	154,1
10	0,026570048	1,5	1,6	2,3	0,86	225,9
11	0,041062802	7,0	1,3	0,5	0,80	78,3
14	0,009661836	1,5	3,0	0,6	0,87	264,5
15	0,004830918	.	.	0,0	.	.
16	0,041062802	5,5	2,5	0,6	0,32	63,8
18	0,009661836	1,0	1,0	0,5	0,76	264,5
19	0,024154589	5,8	2,0	0,9	0,64	15,2
21	0,024154589	1,0	1,1	3,5	0,85	156,9
26	0,041062802	1,1	2,8	1,5	0,79	175,3
27	0,041062802	1,1	2,2	1,3	0,86	248,7
31	0,026570048	1,4	2,1	2,2	0,78	260,5
32	0,024154589	4,2	2,8	0,4	0,72	108,4
33	0,038647343	4,9	2,8	0,9	0,76	71,9
34	0,031400966	4,0	1,9	2,2	0,57	131,4
35	0,024154589	2,0	1,4	2,1	0,68	113,8
36	0,024154589	1,3	1,4	2,0	0,75	118,2
37	0,038647343	3,3	3,1	0,9	0,77	167,9
38	0,024154589	1,0	1,9	2,6	0,80	282,3
39	0,019323671	1,1	1,4	2,6	0,83	120,1
40	0,002415459	1,0	2,0	2,5	0,75	62,5
41	0,036231884	5,5	2,3	1,0	0,54	82,9
42	0,019323671	1,5	1,5	0,8	0,83	142,5
43	0,036231884	1,2	1,7	1,4	0,76	111,1
44	0,014492754	6,0	3,0	0,8	0,82	17,8
45	0,043478261	4,6	1,8	2,6	0,77	109,5
46	0,031400966	3,9	2,5	1,5	0,41	67,8
100	0,002415459	1,0	2,0	3,0	0,51	186,0
101	0,002415459	.	.	0,0	.	.
102	0,002415459	.	.	0,0	.	.
103	0,002415459	1,0	1,0	3,5	0,92	144,5
104	0,002415459	2,0	1,0	2,0	0,28	115,3
105	0,004830918	6,0	4,0	0,5	0,57	38,0
106	0,002415459	4,0	2,0	0,5	0,62	296,3
107	0,004830918	1,0	2,0	0,3	0,70	199,0
108	0,004830918	.	.	0,0	.	.
109	0,004830918	.	.	0,0	.	.
110	0,002415459	1,0	3,0	2,0	0,68	246,0
113	0,009661836	1,0	3,5	1,1	0,60	237,8
114	0,002415459	.	.	0,0	.	.
115	0,002415459	.	.	0,0	.	.
116	0,002415459	1,0	1,0	3,0	0,76	168,5
117	0,002415459	1,0	3,0	1,5	0,78	235,0
118	0,002415459	1,0	3,0	1,5	0,63	99,5
120	0,004830918	1,5	2,5	2,0	0,82	351,5
122	0,002415459	.	.	0,0	.	.
124	0,002415459	4,0	4,0	0,0	0,81	130,5
125	0,002415459	3,0	4,0	1,0	0,84	205,1
126	0,002415459	.	.	0,0	.	.
127	0,004830918	1,0	3,0	1,0	0,88	161,0
128	0,002415459	.	.	0,0	.	.
130	0,002415459	5,0	1,0	3,0	0,81	40,5
132	0,002415459	.	.	0,0	.	.
133	0,002415459	1,0	1,0	3,0	0,88	311,0
134	0,009661836	2,7	3,7	1,5	0,78	153,8
135	0,004830918	1,0	4,0	1,0	0,75	226,5
136	0,004830918	3,5	3,0	2,0	0,74	85,8
137	0,002415459	.	.	0,0	.	.
138	0,004830918	3,0	1,0	0,5	0,74	129,0
139	0,002415459	.	.	0,0	.	.
140	0,002415459	.	.	0,0	.	.

Tableau 17 : Données phénologiques des clones du verger. Fréquence et indices phénologiques moyens des clones (le sexe est donné sur une échelle de 1=♂pur à 7=♀pure ; la quantité de pollen est la moyenne sur deux étamines).

b Méthodes

Dans le verger, 12 arbres ont été choisis comme mères (6 arbres femelles et 6 arbres hermaphrodites). Ces mères ont été choisies selon les critères suivants : l'environnement proche comportait des arbres variables à la fois au niveau du sexe et du taux d'hétéromorphisme (pour optimiser les résultats en cas de faible dispersion du pollen), et les mères étaient dispersées dans le verger, en bordure ou à l'intérieur de la population (afin de vérifier l'influence des contaminations éventuelles par du pollen extérieur). Les arbres pris comme mères sont consignés dans le tableau 18. Pour chaque mère, 31 graines ont été échantillonnées en 2000. Chacune de ces graines a été génotypée pour les trois marqueurs microsatellites (voir paragraphe suivant).

Arbre	Clone	Sexe
H22	41	plutôt femelle
F14	45	plutôt femelle
I33	44	plutôt femelle
E9	44	plutôt femelle
E19	41	plutôt femelle
H20	16	plutôt femelle
J4	34	plutôt hermaphrodite
K47	41	plutôt hermaphrodite
F2	34	plutôt hermaphrodite
K21	5	plutôt hermaphrodite
D18	46	plutôt hermaphrodite
C48	37	plutôt hermaphrodite

Tableau 18 : Arbres choisis comme mère pour l'analyse de paternité.

- Analyse de paternité (aspects moléculaires)

L'analyse de paternité a été réalisée en génotypant les descendants à l'aide de trois marqueurs microsatellites choisis parmi les dix marqueurs développés chez cette espèce au laboratoire (Brachet et al. 1999 ; Lefort et al. 1999). Les trois marqueurs sont Fem4, Fem19 et M230, dont la diversité allélique était suffisante dans le verger pour avoir de bonnes chances d'identifier le père chez les descendants (les locus Fem19, M230 et Fem4 présentent des richesses alléliques respectives de 56, 42 et 36 allèles pour le verger). Les protocoles moléculaires utilisés sont décrits dans les articles cités. Pour le génotypage, un des marqueurs (Fem19) montrait un trop grand recouvrement des allèles pour pouvoir attribuer le génotype avec certitude à la lecture des gels. Les génotypes ainsi lus à ce locus ne sont connus qu'à quelques paires de base près : la plupart du temps, la taille réelle est connue à +/- deux paires de base ; Les conséquences sont évoquées dans les résultats et font l'objet d'une discussion.

- Analyse de paternité

Il existe une grande diversité d'approches pour les analyses de paternité (encadré 4). Notre analyse de paternité a été réalisée à l'aide du logiciel Cervus (Marshall et al. 1998), qui se base sur une approche d'assignation de paternité au mâle le plus vraisemblable. Cervus se base sur le fait que la différence de LOD-score entre deux pères potentiels est d'autant plus élevée que le père le plus vraisemblable est le vrai père. Le logiciel réalise une distribution des LOD-scores sur la base d'analyses de paternités simulées à partir des données génétiques de la population. Dans chaque test, il génère des génotypes parentaux, des génotypes de descendants, et des génotypes de parents candidats non apparentés. Le LOD-score est calculé pour chacun des pères potentiels (les génotypes non apparentés et le génotype du vrai père). Il calcule également la distribution des différences de LOD-score entre les deux pères les plus vraisemblables (Δ) et la distribution des LOD-scores pour les pères correctement assignés et les mâles assignés comme pères alors qu'ils ne l'étaient pas. La comparaison de ces distributions permet de définir par simulation une valeur seuil minimale de Δ au-delà de laquelle le premier père comparé au deuxième père le plus vraisemblable est effectivement le vrai père avec une fiabilité de 95% (ou 80%).

Une analyse indépendante de nos données par E. Klein est en cours avec des méthodes synchronisées pour estimer et tester les paramètres agissant sur la fertilité mâle afin de tester différents modèles du succès reproducteur (influence du sexe, influence de l'hétéromorphisme, mais également de la précocité et de la dispersion du pollen via la distance entre les arbres). Cette analyse va intégrer l'estimation des erreurs potentielles de la lecture des génotypes. Mais son grand avantage est surtout qu'elle nous permettra d'intégrer une dimension supplémentaire à notre analyse, celle de l'influence de la distance des arbres par rapport à la mère, avec l'intégration de fonctions de dispersions du pollen dans les modèles (ces résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit).

- Influence de l'hétéromorphisme sur le succès reproducteur

Le succès reproducteur assigné au clone par Cervus (nombre de descendants) pour normaliser la distribution du paramètre mesuré suivant la formule qui suit : $\ln(\text{'succès reproducteur'} + 1)$. Les facteurs explicatifs utilisés sont les moyennes par clone des indices phénologiques mesurés sur le verger (date de floraison, sexe, quantité de fleurs, quantité moyenne de pollen par étamine, classes d'hétéromorphisme). Les classes d'hétéromorphisme ont été construites en regroupant les clones sur leur moyenne selon l'échelle suivante : 1 = de 30 à 40% de pollen tricolpé ; 2 = de 41 à 50% de pollen tricolpé ; 3 = de 51 à 60% de pollen tricolpé ; 4 = de 61 à 70% de pollen tricolpé ; 5 = de 71 à 80% de pollen tricolpé et 6 = de 81 à 100% de pollen tricolpé. Nous avons ensuite procédé en testant divers modèles à l'aide d'analyse de variance, en utilisant les facteurs seuls ou combinés, ainsi que d'éventuelles interactions (voir résultats).

Encadré 4 : Exposé des différentes méthodes de l'analyse de paternité.

Les méthodes d'analyse de paternité se répartissent en trois grands groupes : la méthode d'exclusion simple (Chakraborty et al. 1974), la méthode d'assignation de paternité par vraisemblance (Meagher 1986) et les méthodes de paternité fractionnelles (Devlin et al. 1988). Nous allons en voir les avantages et inconvénients respectifs.

Méthode d'exclusion simple :

Cette méthode consiste à rejeter la paternité sur la base de génotypes multilocus. La connaissance des génotypes de la mère et du descendant permet de déduire le génotype du ou des gamètes paternels possibles (si le descendant possède les deux allèles présents chez la mère, on ne peut décider de celui qu'il a hérité maternellement, et deux allèles peuvent donc provenir du père, ce qui contribue parfois à proposer plusieurs gamètes possibles). Dès qu'un père ne possède pas d'allèle compatible avec le génotype du descendant, il est exclu de l'assignation. Si cette procédure aboutit à l'exclusion de tous les pères à l'exception d'un seul, la paternité est assignée à ce dernier (Chakraborty et al. 1974). L'efficacité de cette méthode dépend du nombre de locus utilisés pour l'analyse, du nombre d'allèles à ces locus, également des fréquences de ces différents allèles dans la population et du nombre de parents potentiels. Même avec l'utilisation de marqueurs très polymorphes, il arrive que la méthode d'assignation par exclusion simple n'exclue pas tous les pères potentiels et une paternité multiple (plusieurs pères génétiquement compatibles) reste attribuée à une certaine proportion de la descendance (Chakraborty et al. 1988).

Méthode d'assignation de paternité au mâle le plus vraisemblable :

Cette méthode a été développée par Meagher (1986) en vue de résoudre le problème des paternités multiples assignées avec la méthode précédente. Elle se base sur le calcul des vraisemblances de paternité calculées pour chacun des mâles potentiels, la paternité étant assignée au mâle ayant la vraisemblance la plus forte. La vraisemblance de la paternité d'un père est décrite par un LOD score : logarithme du rapport entre la vraisemblance qu'un père potentiel soit effectivement le père (hypothèse H1) et la vraisemblance de paternité d'un mâle pris au hasard dans la population (H0), connaissant les génotypes de la mère, du descendant et du mâle testé (ce qui suppose également la connaissance de la structure génétique de la population). Cette méthode, si elle résout partiellement le problème des assignations multiples de la méthode précédente (elle ne résout toujours pas l'assignation de paternité si les scores de certains pères sont égaux), peut présenter l'inconvénient suivant : elle favorise l'assignation de paternité pour les mâles homozygotes au détriment des mâles hétérozygotes même compatibles. Ce phénomène peut être exacerbé en cas d'allèle rare dans la population. Cette méthode pose donc un problème d'erreur d'assignation (assigner un père potentiel qui n'est pas le vrai père). Choisir une statistique de test, et un test qui permet de contrôler ces erreurs a fait l'objet de plusieurs études ((Meagher 1986 ; Adams et Birkes 1991 ; Adams et al. 1992 ; Gerber et al. 2003 ; Marshall et al. 1998). Ce biais peut être réduit également par d'autres méthodes, en attribuant par exemple des attributions multiples pour la paternité. C'est l'objet de la méthode suivante.

Méthode d'attribution fractionnelle de la paternité :

Cette méthode, développée par Devlin et collaborateurs (1988), se base également sur le calcul des vraisemblances des différents pères potentiels, mais au lieu de tester la vraisemblance d'un père sur celle d'un parent potentiel pris au hasard dans la population, elle attribue une paternité fractionnelle à tous les mâles retenus par méthode d'exclusion simple (c'est-à-dire les pères génétiquement compatibles) en calculant la probabilité de transition mendélienne d'un père sur la somme des probabilités de transition des autres pères potentiels. Cette façon de procéder a donné naissance à des approches similaires, qui se basent elles aussi sur l'attribution fractionnelle de paternité et estiment à partir de là des paramètres de fertilité mâle par maximum de vraisemblance, en suivant une procédure itérative (algorithme EM) qui ajuste ces paramètres de façon à obtenir une distribution de génotype des descendants la plus proche possible de celle observée avec les données (Roeder et al. 1989) ; (Nielsen et al. 2001).

Méthodes d'analyse synchronisée des fertilités mâles :

Ces méthodes d'analyse de paternité correspondent à une démarche séquentielle : l'assignation des pères est une des étapes essentielles pour répondre à la question posée (qu'elle soit effectivement la reconnaissance de paternité ou des questions d'ordre écologique ou évolutif sur les facteurs qui influencent le succès reproducteur mâle). Il existe d'autres façons de procéder, par des démarches que l'on peut qualifier de synchronisées. Elles consistent à estimer directement les paramètres de dispersion ou les effets des facteurs influençant la fertilité mâle à partir d'une fonction de vraisemblance complète intégrant à la fois les événements de reproduction et de transmission mendélienne de gamètes pour toutes les graines échantillonnées sans passer par l'étape d'assignation de la paternité aux descendants. L'analyse est menée par maximisation directe de la fonction de vraisemblance (Burczyk et al. 2002). Dans certaines situations, les méthodes numériques classiques d'optimisation de fonction ne permettent pas de trouver le maximum de la vraisemblance. Dans ce cas, il est possible d'utiliser l'algorithme EM (Expectation-Maximisation) pour maximiser la vraisemblance (Nielsen et al. 2001).

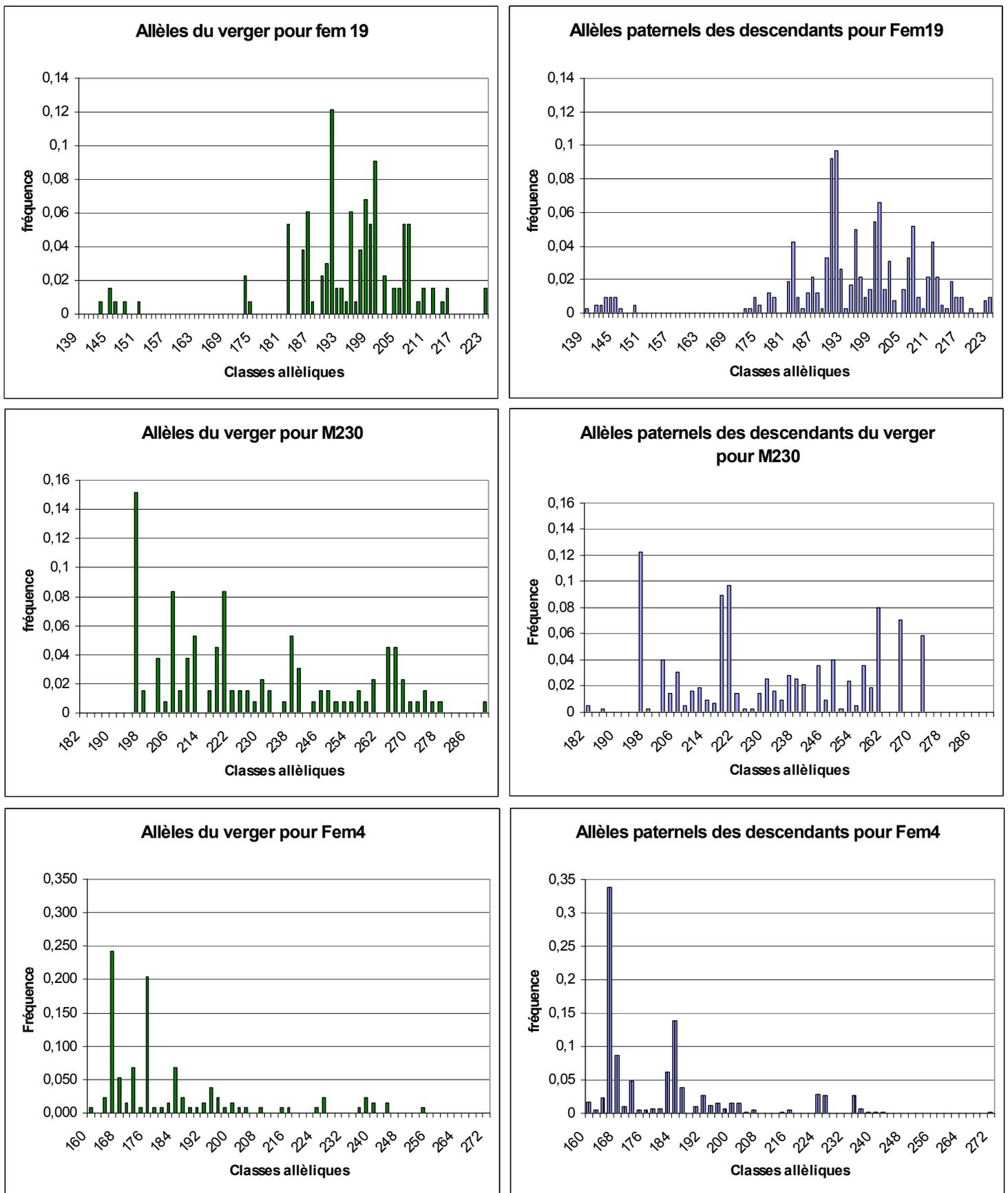


Figure 35 : Comparaison des diversités alléliques entre les individus du verger (à gauche) et les allèles paternels des descendants (à droite). Du haut vers le bas : Fem19, M230 et Fem4.

2-2-3 Résultats

a) Diversité allélique des descendants :

La composition en allèles paternels chez les descendants est diversifiée (figure 35), et de composition assez peu différente de la population paternelle parentale.

b) Analyse de paternité :

La richesse allélique des locus utilisés prédit une forte exclusion, avec la méthode d'exclusion simple (0.98), avec le cumul des trois marqueurs. Il y a donc de bonnes chances d'attribuer correctement le père si l'on utilise ces marqueurs pour une analyse de paternité (figure 36). Cependant, cette probabilité d'exclusion simple correspond à la probabilité attendue d'assigner la paternité si l'on ne considère que deux pères (comme il est en général de coutume pour les attributions de paternité litigieuses dans les populations humaines). Etant donné la population importante de pères potentiels du verger (par approximation, les 66 clones), la probabilité de trouver le vrai père (c'est-à-dire que $N-1 = 65$ clones soient effectivement exclus) est beaucoup plus faible dans notre situation : $(0,98)^{65} = 0,27$ (cela devrait se produire dans 27% des cas si la population est naturelle).

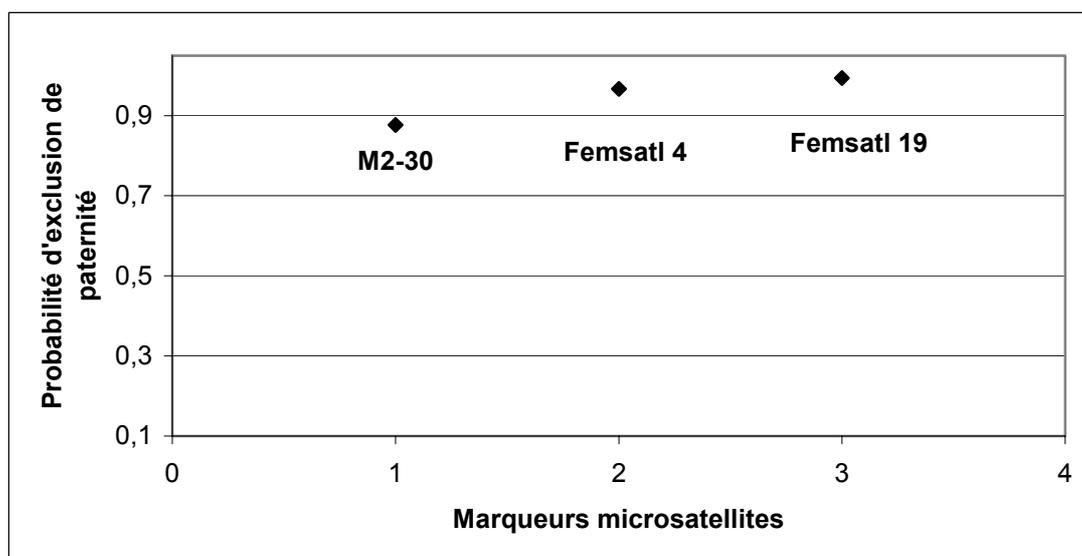


Figure 36. Evolution de la probabilité d'exclusion de paternité simple avec les marqueurs utilisés. La figure représente la probabilité d'exclusion simple réalisée par le cumul successif des marqueurs M230, Fem4 et Fem19. L'ajout des marqueurs polymorphes augmente cette probabilité, qui reste dépendante du nombre de pères potentiels à tester.

Avec Cervus, les résultats de l'assignation de paternité sont cependant nettement en deçà des assignations théoriques simulées par le logiciel. **Au lieu de résoudre la paternité de près de 90% des descendants (331 graines), Cervus n'assigne de père que pour 12% d'entre eux (44 graines)** (tableau 21, figure 37). Ceci est en partie lié au mode de lecture du marqueur Fem19 (voir discussion).

Niveau du test d'assignation de paternité	Pouvoir de confiance (%)	Résultats des tests observations (simulations)	Réussite des assignations résultats (simulations) En %
Strict	95.00	44 (331)	12% (90%)
Relâché	80.00	44 (331)	12% (90%)
Non résolu	-	324 (37)	88% (10%)

Tableau 21 : Résultats de l'analyse de paternité par Cervus. Entre parenthèse, les assignations théoriques que devrait faire Cervus, sachant les données génétiques de la population étudiée.

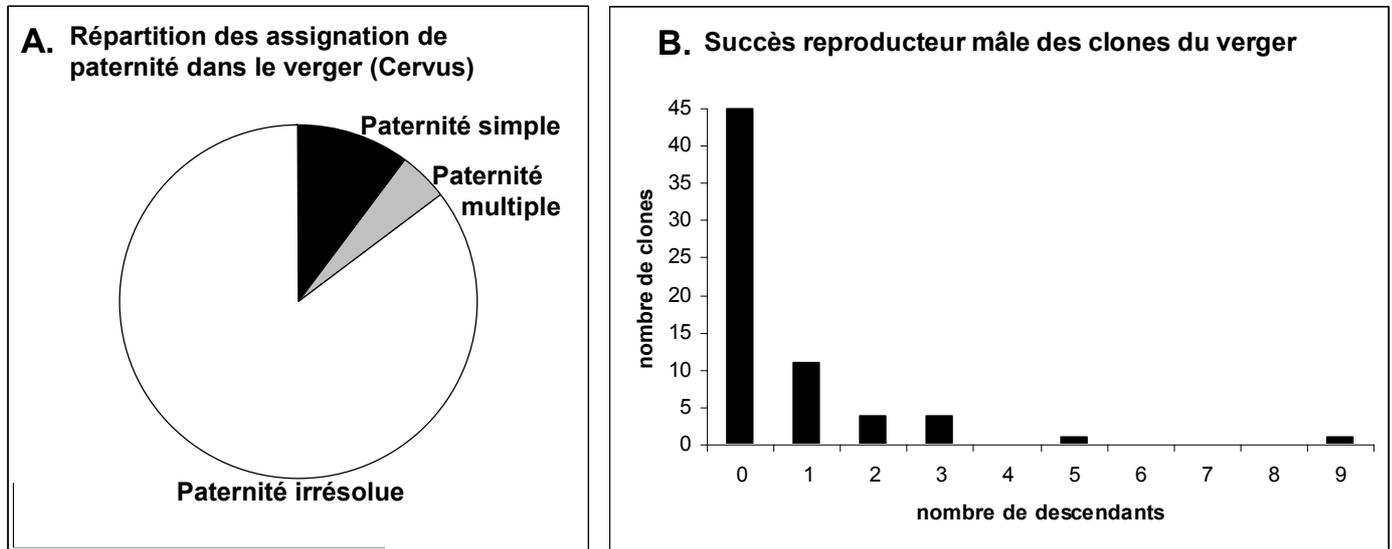


Figure 37 : Répartition des assignations de paternité avec Cervus, par catégories de descendants (paternité simple, paternité multiple et paternité irrésolue) (A) ; et distribution du succès reproducteur mâle des paternités assignées (B).

Suite à ce résultat inattendu (**très faible assignation de paternité lors de l'utilisation de Cervus**), nous avons regardé ce que produisait l'analyse de paternité en exclusion simple (sur les trois mères H22, F14 et I33). Les assignations de paternité par exclusion simple sont quasiment identiques à celles données par l'analyse avec Cervus.

Cette procédure nous a également permis de constater que, sur le verger, la majorité des gamètes possibles (408 génotypes multilocus distincts) produits par les clones sont des gamètes 'diagnostiques' : 375 (91,9 %) ne sont produits que par un seul clone. Pour les gamètes produits par plusieurs clones, 27 (6,6%) ne sont produits que par deux clones différents. Ceci confirme que nous devrions avoir une assignation de paternité efficace à partir des génotypes des descendants si leur père est bien dans le verger.

D'autre part, les allèles de la population de descendants sont pour la plupart des allèles du verger : seuls quelques allèles extérieurs à la population d'étude ont pu être mis en évidence chez 15 descendants, soit environ 4% des graines de l'étude (tableau 22).

Locus	Fem4	M230
Allèles extérieurs au verger (pb)	162, 242, 206	182, 186, 214, 234

Tableau 22 : Allèles extérieurs au verger retrouvés chez les descendants. Les allèles extérieurs n'ont pas été pris en compte en raison de la méthode de génotypage.

c) Influence du taux d'hétéromorphisme avec le succès reproducteur

Malgré le faible nombre de descendants auxquels un père a pu être attribué (44 graines sur les 366 seulement), nous avons souhaité poursuivre les analyses, qui doivent donc être considérées comme préliminaires et sujettes à caution. Cervus n'a pas détecté d'allèles nuls en proportions significatives. Des analyses supplémentaires sont donc en cours afin de vérifier les taux d'assignation par méthode de maximum de vraisemblance de la fertilité mâle (E Klein), notamment en testant des taux d'erreur de lecture sur les génotypes sur la base du « Stepwise Mutation Model » caractérisant les marqueurs microsatellites, c'est-à-dire des variations de +/- deux paires de base à partir de l'allèle lu (Cervus permet de tenir compte d'un certain taux d'erreur, cependant, sa correction se base sur l' « Infinite Allele Model », et pour les erreurs de lecture, les allèles sont remplacés par un allèle pris au hasard dans la population).

Nous avons testé l'influence des différents indices phénologiques en paramètres uniques puis en combinaison pour les ANOVAs. Pour les facteurs sexe, date de floraison, abondance de fleurs, quantité de pollen par étamine, hétéromorphisme, aucun n'explique significativement le succès reproducteur mâle ($p > 0,3$). Seul le facteur 'fréquence du clone' est significatif ($F_{(1,50)} = 12,8$; $p = 0,0008$) : plus un clone est fréquent dans le verger, plus il a de chance de participer à la reproduction en tant que père. L'hétéromorphisme n'influence donc pas le succès reproducteur mâle, avec ces données. On peut néanmoins remarquer une tendance liée au taux d'hétéromorphisme en ce qui concerne le succès reproducteur : la classe d'hétéromorphisme 5 (71 à 80% de pollen tricolpé) semble avoir en moyenne plus de descendance que les autres, même si ce résultat n'est pas significatif (figure 38).

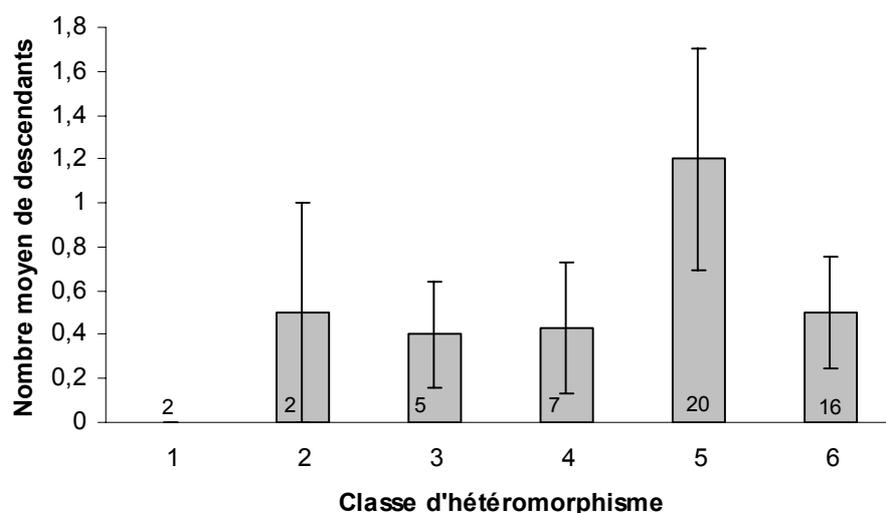


Figure 38 : Nombre de descendants moyen par clone en fonction de la classe d'hétéromorphisme. Les différences observées ne sont pas significatives ($F_{(5,46)} = 0,5$, $p = 0,7$), tendance se dessine. Sur les histogrammes est indiqué le nombre de clones dans chaque classe d'hétéromorphisme.

2-3 Discussion

La paternité dans le verger est diverse, comme en témoigne la diversité allélique rencontrée chez les descendants. De nombreux arbres participent à la reproduction. Nous avons à résoudre le problème de la très faible assignation de paternité. Celle-ci ne semble pas être due à la présence d'allèles nuls (les analyses avec Cervus montrent qu'ils ne sont pas en fréquences suffisantes pour pouvoir expliquer ce résultat). Nous pouvons avancer deux raisons principales à ce résultat surprenant :

- Il y a une contamination très forte par du pollen extérieur. Les premiers frênes en dehors du verger sont situés à environ cinq cent mètres dans le voisinage. La plupart des études d'analyse de paternité chez les arbres montrent un taux important de pollinisation extérieure à la population d'étude, mais ces taux varient beaucoup : 37% chez l'arbre dioïque *Cecropia obtusifolia* (Kaufman et al. 1998), 57% chez *Quercus macrocarpa* (Dow et Ashley, 1998), 39% chez *Eucalyptus grandis* (Chaix et al. 2003). Ils n'ont cependant pas une ampleur comme celle que nous avons rencontrée, mais les arbres anémophiles ont des distances de dispersion de leur pollen très importantes (Dow et Ashley, 1998). Même la présence d'arbres dans le voisinage proche ne pourrait expliquer une telle situation : il faudrait pour cela que ces arbres fécondent presque systématiquement les arbres mères (qui sont répartis dans l'ensemble du verger) en dépit d'une concurrence des arbres du verger à proximité immédiate des mères. De plus, le nombre d'allèles extérieurs au verger est plutôt réduit (7 allèles pour M230 et Fem4) et ne concernent que 15 descendants (données non montrées). Même s'il reste possible qu'une contamination importante par du pollen extérieur ait lieu, cela suppose que les allèles des gamètes fournis par ces arbres extérieurs possèdent presque tous des allèles qui existent dans notre population d'étude.

- Nous avons un fort taux d'erreur dans la lecture de nos génotypes (l'allèle maternel est correctement estimé du fait de sa répétition chez les descendants, mais ce n'est pas le cas pour l'allèle paternel). Une part de ces résultats doit donc s'expliquer par des erreurs de génotypage, notamment pour le locus Fem19, dont la diversité allélique est telle que la lecture du génotype ne peut se faire directement (la taille est estimée par la distance de migration et à l'aide d'allèles témoins). Il y a en effet dans le verger une telle diversité allélique qu'il existe un recouvrement presque continu de la taille des allèles. L'influence d'erreurs sur la lecture du génotype fait notamment l'objet d'une estimation plus précise par E. Klein (se reporter à la section méthodes d'analyse de paternité).

De plus, les faibles effectifs testés ne permettent de faire aucune conclusion définitive, et il se peut que des données plus complètes donnent des résultats différents. Il est notamment possible que l'amélioration de l'assignation de la paternité permette d'affiner les estimations du nombre moyen de descendants par clone pour les différentes classes d'hétéromorphisme (figure 37), ainsi que la variance. Un effet de l'hétéromorphisme reste donc possible, surtout si la tendance constatée, qui attribue pour le moment un nombre de descendants moyen plus élevé pour les clones ayant un taux de pollen tricolpé entre 71 et 80%, se trouve confirmée et statistiquement significative.

On peut cependant envisager les différentes situations possibles concernant l'influence du type apertural sur le succès reproducteur :

1) La production des différents types polliniques n'a pas ou peu d'influence sur le succès reproducteur.

Si un avantage sélectif est faible ou nul, la sélection peut difficilement aboutir à l'adaptation du caractère. Une héritabilité forte signifie que la part de variation du caractère liée aux effets des gènes est importante. Des différences génétiques hérissables sont nécessaires à l'évolution, mais l'importance d'une variation d'origine génétique peut également signifier que le caractère n'est pas sous sélection. L'importance de la composante d'origine génétique pour les différentes proportions de pollen tricolpé dans le verger est peut être le signe d'une sélection inefficace ou faiblement efficace sur le caractère¹⁵.

Même si le taux d'hétéromorphisme est soumis à sélection, et qu'il existe un avantage en fertilité mâle lié à l'optimisation de ces caractères, cet avantage ne pèse peut être pas si fort, sachant que le succès reproducteur réel est également composé du succès reproducteur femelle. Dans ces conditions, l'effet de la sélection peut s'en trouver réduit.

2) Le taux d'hétéromorphisme influence le succès reproducteur.

Une autre hypothèse pouvant expliquer la persistance d'une composante génétique forte reste la possibilité que les types polliniques produits chez le frêne ont des avantages sélectifs qui diffèrent en fonction des conditions. Si l'environnement qui influence le résultat de la compétition est variable, les types polliniques peuvent co-exister en tant que stratégies alternatives, chacune privilégiée par des conditions différentes. Les différences génétiques qui les expliquent peuvent alors être maintenues et l'héritabilité du caractère restera forte.

¹⁵ Il faut néanmoins nuancer cet argument pour deux raisons : d'une part la population est artificielle, donc l'héritabilité n'a pu être modifiée sous l'influence directe de la sélection naturelle. D'autre part, il s'agit d'une héritabilité estimée par répétition de clones, donc d'une héritabilité au « sens large », c'est-à-dire comprenant les effets épistatiques liés aux interactions entre gènes. L'inférence de l'absence de sélection est en conséquence un argument moins fort qu'il n'est *a priori*, compte tenu de ces considérations.

Une faible sélection peut éventuellement être liée à la nature de la pollinisation chez cet arbre : le frêne est une espèce anémophile. Or l'influence du nombre d'ouvertures sur la compétition pollinique n'a à ce jour été étudiée que chez des espèces entomophiles, pour qui la compétition sur le type apertural est importante comme le montre le modèle développé par Till-Bottraud et collaborateur (2001), et qui semble confirmé du point de vue écologique (Till-Bottraud et al. 1999). Peut être que le mode de pollinisation anémophile ne prédispose pas les grains de pollen à se trouver dans une situation où les effets du type apertural sur la compétition sont perceptibles, comme c'est le cas pour les espèces entomophiles. En effet, les différences de taux de germination et de croissance pollinique sont de l'ordre de quelques heures chez *Viola*. Or chez cette espèce entomophile, les grains de pollen sont déposés en amas et sont donc en compétition pour la fécondation. Cela ne se produit peut être pas chez le frêne, où les grains de pollen transportés par le vent arrivent probablement de façon plus dispersée sur le stigmate à cause de la pollinisation anémophile. D'autres études sur des modèles permettant de diversifier les données pour les différents modes de pollinisation sont encore nécessaires pour tester cette hypothèse concernant l'influence du type apertural sur la compétition entre grains de pollen et le succès reproducteur.

Nos observations soulèvent les questions suivantes :

- Une meilleure résolution de l'assignation de la paternité changerait-elle le résultat des analyses ?

- Les différents types polliniques chez le frêne ont-ils des caractéristiques propres susceptibles d'avoir des conséquences en terme de compétition pollinique ? Les types aperturaux produits répondent-ils à des stratégies différentes pour assurer la fécondation comme c'est le cas dans le genre *Viola* ? Des études de viabilité et de germination *in vitro* pourraient y répondre. Il n'est en effet pas certain que la situation que l'on trouve chez le genre *Viola* soit générale. D'autre part, si les types aperturaux produits chez le frêne ont bien des caractéristiques de germination, de croissance du tube pollinique et de survie différentes mais que ces dernières n'ont pas d'incidence sur le succès reproducteur, il peut être intéressant de se demander pourquoi (voir les deux prochaines séries de questions).

- Si ces types aperturaux chez le frêne ont des caractéristiques de germination et de viabilité différentes, pourrait-on envisager que ces différences interviennent dans la compétition ? Des études de croisements contrôlés permettraient de le tester tout en s'affranchissant des contraintes de fertilité liées au sexe des arbres (mâles plus compétitifs que les hermaphrodites pour la fécondation en compétition, etc.).

- Existe-t-il des différences concernant le mode de pollinisation (anémophile vs entomophile) qui placent ou non les différents types aperturaux dans des conditions de compétition pour fertiliser les ovules ? D'autres analyses sur des plantes hétéromorphes présentant ces modes de pollinisation sont nécessaires pour pouvoir avoir une vision plus générale sur cette question.

Synthèse et perspectives

1- Les contraintes dans l'évolution

Un phénomène d'inertie phylogénétique indique un biais dans l'évolution des caractères qui se traduit par la présence d'un signal dans la phylogénie. Ces situations sont encore souvent interprétées comme signe de contraintes développementales. Nous avons discuté du risque qu'il y a à interpréter cette inertie phylogénétique comme le signe d'une contrainte : l'inertie phylogénétique peut aussi bien traduire l'existence d'une contrainte phylogénétique, que celle de la sélection lorsqu'elle est stabilisante ou encore une divergence récente et telle que les lignées ne sont pas suffisamment différenciées. Un signal phylogénétique fort peut donc accompagner un caractère dont les transitions d'un état à l'autre sont nombreuses sur une phylogénie, et dans ce cas l'évolution du caractère n'est pas contrainte. Conclure à l'existence d'une contrainte se trouve en revanche justifié si le nombre de transitions du caractère est faible¹⁶ : l'inertie phylogénétique traduit alors bien une contrainte évolutive. **La conclusion de l'existence de contraintes est alors dépendante de l'échelle à laquelle les observations sont faites** : l'examen de la microsporogénèse à l'échelle des Asparagales supérieures peut laisser penser que le développement est fortement contraint car peu variable. Cette conclusion est plus nuancée dès lors que l'évolution de la microsporogénèse est regardée au niveau de l'ordre entier : la microsporogénèse y est plus diversifiée. La fixation d'un type de développement spécifique chez les Asparagales supérieures est peut-être le résultat d'une contrainte propre à ce clade (contrainte locale), mais il faudrait, pour en avoir la certitude, en démontrer les causes explicites, car le type de cytokinèse n'est pas contraint chez les Asparagales. L'hypothèse d'un recrutement des mécanismes d'une cytokinèse de type 'somatique' et la perte consécutive des mécanismes de cytokinèse 'méiotique' pourrait expliquer ce pattern observé chez les Asparagales supérieures. Cependant il faudrait alors pouvoir montrer qu'il existe, en conditions habituelles chez les plantes, deux types différenciés d'information sur la manière de partager les cellules, **et** que le type 'méiotique' a été perdu chez ce clade. Ainsi, si le niveau phylogénétique auquel les observations sont faites compte pour une part déterminante pour montrer l'existence de contraintes développementales, il est toujours nécessaire de retourner aux détails du développement lui-même...

¹⁶ Cette limite est ici volontairement laissée floue. Un consensus se dégagera peut être un jour sur une limite à adopter. Certaines transitions évolutives, la méiose par exemple, semblent bien ne s'être produites qu'une seule fois dans l'histoire du vivant, mais la plupart des transitions sont localement plus rares ou plus fréquentes. Nous nous contenterons dans cette discussion de considérer la fréquence relative des transitions qui concernent la microsporogénèse. Le lecteur aura probablement déjà remarqué le fait qu'elles sont-elles mêmes visiblement plus rares que celles qui concernent la morphologie des plantes et familles de plantes dont il est question.

L'analyse phylogénétique de l'évolution d'un caractère ne reflète donc qu'imparfaitement ce que sont les contraintes développementales puisqu'elle ne permet d'identifier que celles qui ont une conséquence évolutive décelable et directe. Or, certaines voies du développement imposent des contraintes sur les possibilités phénotypiques ultérieures. Dans notre système, le type de cytocinèse en est l'exemple parfait : lorsque la cytocinèse est successive, le nombre de plans de division est contraint à trois, et cela limite la forme que peuvent prendre les tétrades par la suite. Dans cette situation, le développement limite effectivement les phénotypes possibles, sans pour autant que la contrainte touche l'évolution du caractère lui-même : avec notre exemple, le type de cytocinèse présente de nombreuses transitions sur la phylogénie et n'est donc pas évolutivement contraint. Parmi les deux catégories à prendre en compte (contraintes évolutives et contraintes développementales), les contraintes développementales se répartissent elles-mêmes en deux catégories : les contraintes **formelles** et les contraintes **phylogénétiques** (tableau 23), qui sont celles disputées dans le débat sur les contraintes biologiques sans pour autant que leur nature soit distinguée.

	Le développement <i>ne limite pas</i> les phénotypes possibles	Le développement <i>limite</i> les phénotypes possibles
L'évolution du caractère présente <i>de nombreuses transitions</i> sur la phylogénie	Evolution non contrainte	Contrainte formelle (contournable par sélection naturelle)
L'évolution du caractère présente <i>peu de transitions</i> sur la phylogénie	Autre contrainte (contre-sélection du caractère)	Contrainte phylogénétique (locale et historique)

Tableau 23 : Différences entre catégories de contraintes en fonction des modalités du développement et celles de l'évolution du caractère.

Les contraintes formelles sont propres à l'impact du développement lui-même sur le phénotype (structure, caractère et composition), les contraintes phylogénétiques sont caractérisées par l'impact évolutif du développement (sa dynamique). Ces deux catégories correspondent aux deux visions alternatives à l'adaptacionisme pour expliquer les structures biologiques ainsi que Stephen J. Gould l'avait proposé (figure 2). Cette distinction fondamentale entre les deux catégories légitimes de contraintes continuera de peser dans le débat car chacune des catégories relève d'une définition intuitive et naturelle des contraintes et est marquée par les préférences épistémologiques individuelles des biologistes. Cependant, en termes évolutifs, seules les contraintes interférant avec l'évolution des caractères revêtent un intérêt particulier.

Les contraintes formelles tendent à être des contraintes proximales : la connaissance des mécanismes de développement permet de comprendre les causes immédiates qui limitent

l'évolution du phénotype. Mais si un caractère est susceptible de changer facilement, quelle que soit la nature de la contrainte formelle, l'impact évolutif d'une telle contrainte est potentiellement réduit. Ce qui fait d'une simple contrainte formelle une contrainte phylogénétique réside dans sa difficulté à être modifiée. Cette difficulté dépend bien sûr de la complexité du caractère, des mécanismes moléculaires, cellulaires ou tissulaires qu'il implique. Ces considérations ramènent la question des contraintes à celle du temps nécessaire aux lignées à les dépasser, et ceci dépend donc encore de l'échelle de l'observation.

Nous allons reprendre à présent la définition des contraintes développementales proposée par Maynard-Smith et al. (1985), en discutant les aspects successifs en relation avec le développement du type apertural et le modèle qui nous sert de référence :

« Les contraintes développementales peuvent se définir comme un biais dans la production de phénotypes variants, ou une limitation de la variabilité phénotypique, causée par la structure, le caractère, la composition ou la dynamique du système développemental ».

Tout d'abord, le critère clé de définition, *« un biais dans la production de phénotypes variants, ou une limitation de la variabilité phénotypique »*, est propre à l'ensemble des contraintes au sens large. Cet aspect inclut la sélection naturelle, qui par sa nature peut limiter l'évolution phénotypique (par exemple dans une situation de sélection stabilisante). Elle peut notamment expliquer dans certains cas le phénomène d'inertie phylogénétique car les espèces sœurs partagent toujours, au moins initialement, un habitat et un environnement communs en raison de leur origine commune. L'idée de contrainte développementale suppose cependant que la cause de la contrainte soit liée au développement lui-même, ainsi que la définition proposée le rappelle, et elle suggère que la contrainte puisse exercer une limitation à la variabilité phénotypique en raison de :

- *« sa structure, son caractère et sa composition » :*

Le type apertural, dans la construction du modèle, prend un ensemble de formes limitées par la disposition des Zones de Convergences verger D'autres formes aperturales sont probablement envisageables mais il faudrait modifier les règles géométriques qui définissent le type apertural. Ces changements nécessiteraient une réorganisation complète des processus qui déterminent le type apertural. Il s'agit d'une contrainte forte, qui régit le phénomène même d'évolution, qui procède toujours sur la base de la variation préexistante dans des systèmes déjà fonctionnels.

Notre cadre de référence (résumé dans le tableau 24) est un système contraint qui donne les types aperturaux possibles pour un état donné à une étape précise de la microsporogénèse. Suivant le caractère considéré, tous les types aperturaux ne sont pas possibles à obtenir. La composition du système développemental, et notamment les interactions entre ses différentes composantes, est une dimension importante du débat.

Étapes de la microsporogénèse	monosulqué	zonasulqué	trichotomo sulqué	di- aperturé	tri- aperturé
cytocinèse successive	X	X	-	X	-
cytocinèse simultanée	X	X	X	X	X
formation des parois et dépôts de callose centripètes/ cellule	X	X	-	-	-
formation des parois et dépôts de callose centrifuges/ cellule	-	X	-	X	X
formation des parois et dépôts de callose centripètes/ plan de division	X	-	X	X	X
formation des parois et dépôts de callose centrifuges/ plan de division	X	X	X	X	X
localisation polaire des apertures	X	X	X	-	-
localisation groupée des apertures	X	-	-	X	X

Tableau 24 : Types aperturaux possibles selon le modèle en fonction des états à une étape de la microsporogénèse (tous les autres caractères étant également susceptibles de varier).

Dans le cadre du modèle, le type apertural est dépendant de la combinaison des étapes de la microsporogénèse, même s'il existe malgré tout dans notre système une certaine flexibilité. Par exemple, avec une définition polaire des sites aperturaux et une cytocinèse simultanée, des variations dans le mode de formation des parois peuvent mener à des types aperturaux identiques :

- 1) La formation centrifuge ou bien centripète des parois, au niveau de la cellule, aboutit à la formation de pollen zonaperturé ;
- 2) Le changement d'un mode de dépôt de callose centrifuge vers centripète au niveau du plan de division (ou réciproquement), ne modifie pas le type apertural résultant (à condition que la forme des tétrades reste la même : consulter le modèle, figure 11).

Dans ces deux situations, seule l'orientation des apertures au sein des tétrades est modifiée par un changement dans le mode de formation des parois. Le type apertural obtenu ne change pas. Ici, donc, cette flexibilité autorise éventuellement une réduction des contraintes, à moins que l'orientation dans les tétrades ne soit défavorablement sélectionnée (par exemple, si l'orientation des apertures fragilise la résistance osmotique des microspores au moment où la callose se désagrège). Il convient donc de souligner que les contraintes formelles peuvent montrer plus ou moins de flexibilité. Il n'est pas nécessaire non plus que cette flexibilité soit symétrique : dans le cas d'une définition polaire des apertures, mais cette fois avec une cytocinèse de type successif, un seul mode de formation des parois permet d'aboutir à la production de pollen monosulqué. Toutes les autres situations aboutissent à du pollen zonasulqué (figure 11).

Nous avons montré que certains caractères étaient corrélés entre eux, par exemple qu'une formation centripète des parois était rarement accompagnée d'une cytokinèse de type successif. Ces corrélations peuvent avoir des répercussions phylogénétiques localisées, et influencer le phénomène d'inertie phylogénétique. Cette influence ne permet pas de faire de prédictions : elle tend à diminuer le signal phylogénétique lors d'une transition puisqu'elle augmente, pour le second caractère corrélé, la probabilité qu'il effectue lui aussi une transition. Elle tend à augmenter le signal phylogénétique par la suite car elle subordonne le changement du caractère corrélé à une réversion du premier caractère. Une contrainte formelle peut donc parfois avoir des répercussions sur le signal phylogénétique, à condition, cependant, qu'elle soit due à une corrélation entre deux étapes du développement. Mais l'influence de ces corrélations sur la phylogénie n'aura de conséquence évolutive qu'à la condition supplémentaire que le caractère qui provoque cet effet d'entraînement montre peu de transitions. C'est effectivement ce qui se produit avec la corrélation négative entre la formation centripète des parois et la cytokinèse successive. Ceci peut expliquer pourquoi la branche menant au genre *Moraea* montre deux réversions : l'une vers une progression centrifuge des plaques cellulaires, et l'autre vers une cytokinèse successive (figure 39). Nous manquons de situations similaires pour vérifier notre raisonnement, et il serait intéressant de voir si la situation se reproduit pour d'autres réversions d'une formation centripète des parois vers une formation centrifuge. Cela nous permet néanmoins d'insister sur l'importance de pouvoir retracer l'histoire évolutive d'un caractère, ce qui fait d'ailleurs l'objet de la deuxième partie de la définition de Maynard-Smith et al. (1985).

Cette première partie de la définition, que nous venons de commenter, concerne donc plus la nature même du système de développement, c'est-à-dire les contraintes développementales formelles. Elle peut suggérer des contraintes potentielles (comme celles que nous venons de soulever à propos du modèle), mais le point probablement le plus important de cette définition reste le suivant :

- « *la dynamique du système développemental lui-même* »

Quand bien même les étapes d'un système de développement peuvent contraindre les phénotypes possibles, la contrainte n'en n'est pas évolutive pour autant. En effet, si les transitions vers d'autres états se produisent fréquemment, ces contraintes locales peuvent facilement être surpassées. Ce point est un critère essentiel pour pouvoir déceler les contraintes (développementales) qui ont un véritable impact évolutif. Un nombre de transition réduit ou inexistant, comme c'est le cas par exemple pour la transition vers une formation centripète des parois ou encore pour la réversion d'une localisation groupée vers une localisation polaire des ouvertures (tableau 15), est bien la marque d'une contrainte d'origine développementale au sens le plus fort. Une connaissance fine de l'évolution du

développement et des transitions qui s'opèrent sur une phylogénie permet de déduire la présence de contraintes avec plus de certitude que la simple existence d'un signal phylogénétique. Deux des caractères étudiés pour la microsporogénèse sont des contraintes développementales (tableau 15). Dans notre système développemental, leurs conséquences évolutives sont cependant diminuées par le fait que le type apertural le plus abondant (pollen monosulqué), et qui est potentiellement le plus favorablement sélectionné (cela demande confirmation par des études plus directes cependant), peut être produit par d'autres voies développementales.

L'approche phylogénétique permet bien de faire la différence entre ce qui relève d'une contrainte formelle, intrinsèque au développement, mais qui n'interfère pas avec le processus évolutif, et ce qui relève d'une contrainte développementale qui a des répercussions sur l'évolution elle-même (contrainte phylogénétique). Cette étude sur les étapes de la microsporogénèse montre que s'il existe bien des contraintes formelles au développement, seules deux étapes apparaissent comme étant phylogénétiquement contraintes :

- 1) la formation centripète des plaques cellulaires,
- 2) la réversion d'une localisation polaire vers une localisation groupée des apertures dans les tétrades.

Cette dernière est d'ailleurs une contrainte possible à l'échelle des angiospermes elles-mêmes, puisque cette réversion n'a à ce jour encore jamais été décrite chez aucun groupe de plantes à fleurs.

Des questions se dégagent de ces résultats et observations :

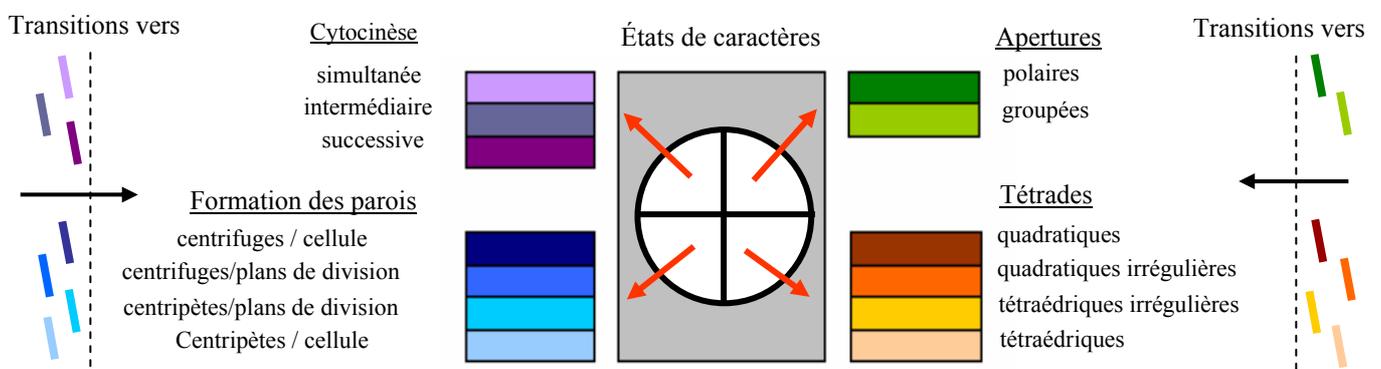
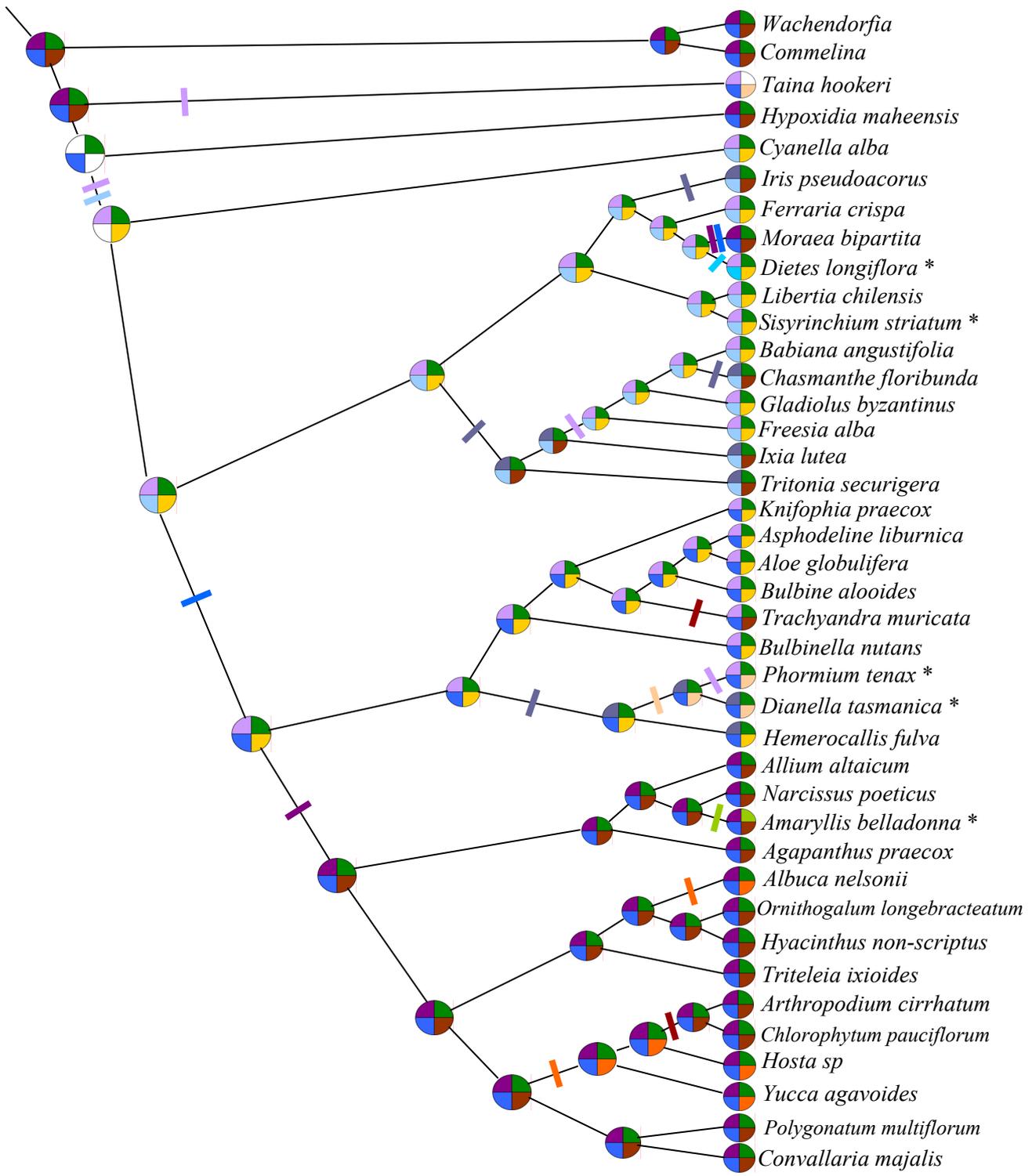
- Dans quelle mesure ces contraintes sont-elles propres à l'ordre des Asparagales ? Doit-on s'attendre à retrouver ces mêmes contraintes chez d'autres groupes ou bien existe-t-il des contraintes spécifiques aux différents clades ?
- Plus généralement, les transitions d'un état de caractère à un autre, pour chacune des étapes de la microsporogénèse, sont-elles plus ou moins fréquentes chez d'autres groupes ? Y retrouve-t-on aussi des espèces présentant des cytocinèses de type intermédiaire lorsqu'il y a eu une transition vers une cytocinèse simultanée ?
- Que pourra-t-on dire de ces transitions dans la microsporogénèse à l'échelle des Monocotylédones ? Observera-t-on des changements dans la fréquence des transitions dans certains clades ou bien resteront-elles uniformes ?

Ces questions ouvrent de bien vastes perspectives. Notre équipe s'occupe déjà d'étudier l'évolution de la microsporogénèse chez les Areaceae (palmiers ; thèse de J. Sannier). Il serait cependant également intéressant d'étudier son évolution chez les Liliales. En effet, le groupe « frère » des Asparagales, longtemps confondu avec lui en raison des convergences morphologiques que ces deux ordres partagent du fait de leur adaptation à des milieux semblables, offre l'opportunité de vérifier si des convergences se retrouvent également au niveau de la microsporogénèse.

Notre analyse comparative du déroulement de la microsporogénèse accorde finalement peu de place aux contraintes évolutives chez les Asparagales et à l'échelle de cet ordre, en dépit de la part importante qu'elles ont pris dans le débat sur les forces évolutives depuis une vingtaine d'années. D'autres systèmes modèles donneraient peut être une vision plus nuancée des contraintes et de leur impact sur l'évolution, notamment chez les animaux.

2- Le rôle de la sélection naturelle

La diversité de la microsporogénèse à l'échelle de l'ordre des Asparagales est importante (la figure 39 résume cette variation ainsi que les transitions du développement et la microsporogénèse des nœuds ancestraux). De plus, elle donne des arguments indirects en faveur de la sélection naturelle : la variation du développement est *a priori* suffisante pour permettre l'existence de nombreux types aperturaux différents, mais le pollen de type monosulqué est produit de manière prépondérante. Ce type apertural peut être produit à la place de types aperturaux concurrents par des modifications relativement mineures de la séquence de développement.



* Présence d'un type apertural différent du type monosulqué

Figure 39 : Evolution de la microsporogénèse chez les Asparagales. les transitions de formes des tétrades qui suivent les transitions du type de cytotinèse n'ont pas été indiquées.

Le pollen de type monosulqué peut être produit par :

- une modification de la position relative des noyaux en fin de méiose, qui a pour conséquence de privilégier la production de formes de tétrades de type tétraédriques asymétriques aboutissant à la formation de pollen monosulqué, au lieu de tétrades tétraédriques de forme régulière qui produisent du pollen trichotomosulqué ;
- une modification hétérochronique du déroulement de la méiose relativement à la cytokinèse lorsque la formation des parois est centrifuge, qui a pour conséquence une cytokinèse de type intermédiaire caractérisée par l'initiation d'une plaque cellulaire à la fin de la première division de méiose. La deuxième division nucléaire se produit avant que cette plaque cellulaire n'ait eu le temps d'achever sa formation complète, donc aucune dyade n'est produite. Cette cytokinèse n'est donc pas véritablement successive mais en possède tout de même la caractéristique principale (trois cloisons seulement sont formées), et elle est suffisante pour orienter encore plus fortement la morphologie des futurs grains de pollen vers la production de pollen monosulqué que l'arrangement simple de la position relative des noyaux ;
- le marquage du futur plan de division de la cellule entre deux divisions de méiose par un anneau de callose, lorsque la formation des parois est centripète. Quand la cytokinèse intervient à la suite des divisions nucléaires, la production de tétrades quadratiques (ou décussées) est favorisée par la présence de l'anneau de résolu, avec en conséquence la production de pollen monosulqué (figure 40).

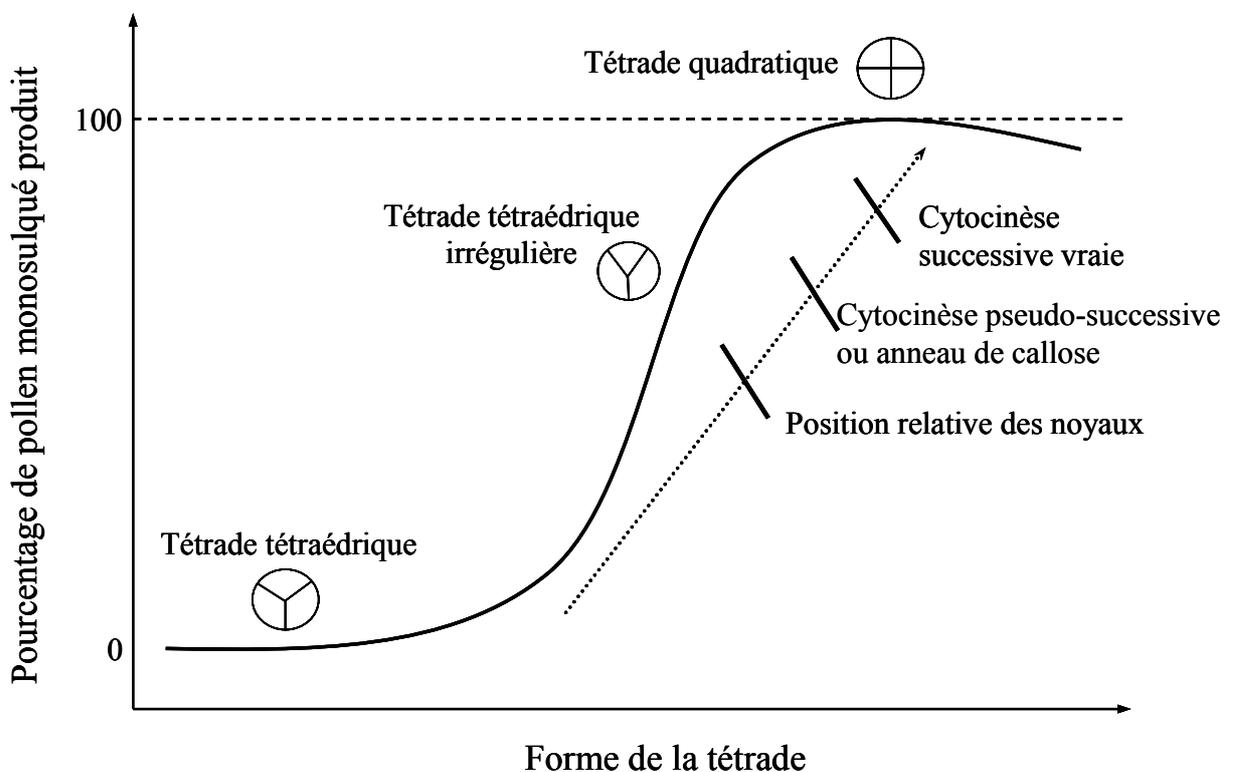


Figure 40 : Influence des modifications de la cytokinèse sur la production relative du pollen monosulqué et du pollen trichotomosulqué.

Cependant, ces arguments en faveur d'un rôle important de la sélection naturelle n'ont qu'une valeur indirecte. En effet, si l'avantage moyen du pollen monosulqué est suffisamment important pour que ce type apertural soit sélectionné plus souvent qu'il n'est attendu, cela ne nous donne aucune information sur les raisons de l'existence (même marginales) des autres morphologies polliniques chez certaines espèces. Ces morphologies ont probablement été plus compétitives dans des conditions spécifiques de pollinisation, mais quels sont les facteurs sélectifs qui sont à l'origine de ces transitions ?

Il est donc nécessaire de se focaliser plus localement sur les conditions et les facteurs qui favorisent un type apertural plutôt qu'un autre. L'intérêt de cumuler les approches comparatives de l'évolution du phénotype avec des études au niveau des espèces elles-mêmes réside dans cette possibilité de mettre en évidence les facteurs naturels impliqués dans les transitions évolutives observées plus globalement au niveau phylogénétique. Les deux approches sont donc véritablement complémentaires.

Notre étude sur l'évolution du type apertural chez le frêne n'a pas permis de mettre en évidence l'influence du type apertural sur le succès reproducteur, même si nous avons constaté une tendance non significative (ces résultats demandent confirmation en raison du problème lié à la faible résolution de l'assignation de pères aux graines). Les situations d'hétéromorphisme sont idéales pour estimer l'avantage sélectif des différents types aperturaux, puisqu'elles nous permettent d'étudier les caractéristiques relatives des grains de pollen produits tout en s'affranchissant des effets génotypiques, parfois très marqués chez le pollen. Cependant, il n'est pas certain que l'on puisse trouver l'ensemble des situations d'hétéromorphismes envisageables (par exemple, un hétéromorphisme monosulqué/disulqué ou un hétéromorphisme monosulqué/zonasulqué) : d'une part l'hétéromorphisme n'est pas si fréquent chez certains groupes de plantes (monocotylédones, par exemple) et d'autre part les types aperturaux concernés par ces situations d'hétéromorphisme ne sont vraisemblablement qu'un sous-ensemble des situations théoriquement possibles.

L'analyse du rôle de la sélection est donc un travail de longue haleine. En effet, cela suppose de tester l'influence de l'ensemble des conditions qui pourraient avoir une conséquence sur l'expression des qualités liées au type apertural des grains de pollen. Ces situations peuvent être nombreuses et elles montrent vraisemblablement des variations spécifiques. Il faut donc garder à l'esprit que les conditions d'évolution du type apertural sont peut être elles mêmes conditionnées par leurs interactions respectives. L'évaluation des influences sélectives sur la morphologie en est donc plus difficile, mais la diversification des modèles permettrait d'en dégager des formalisations plus générales.

L'exemple de l'hétéromorphisme pollen monosulqué/pollen trichotomosulqué est apparemment le cas le plus fréquemment rencontré, en tout cas chez les Asparagales. Cette situation offre l'opportunité de poursuivre l'étude des forces sélectives influençant l'évolution de la morphologie du pollen. Elle présente également la possibilité d'étudier des types aperturaux de natures différentes (un sillon simple contre un sillon complexe) des cas abordés pour le moment dans la littérature (trois ouvertures contre quatre) :

- Il faudrait d'abord confirmer la corrélation observée entre les formes des tétrades et le type apertural par des études quantitatives. Ce type d'étude peut être menée à l'échelle spécifique aussi bien qu'à un niveau phylogénétique plus grand. Le plus grand clade trichotomosulqué apparaît comme un bon cadre phylogénétique pour approfondir ces études sur le type apertural : il est composé d'espèces qui produisent soit du pollen monosulqué, soit du pollen trichotomosulqué, soit les deux types polliniques en proportions variables. On peut également compléter l'analyse par la recherche d'une éventuelle corrélation entre la production de pollen trichotomosulqué et l'habitat de la plante. Il semble en effet que ce type pollinique soit produit chez les espèces inféodées aux milieux xériques (Pires et al. sous presse).

- Ensuite, comment varie cet hétéromorphisme : est-il stable au cours du temps ? La production de deux types polliniques (monosulqué et trichotomosulqué) repose-t-elle sur une base génétique ?

Nos observations chez *Sisyrinchium striatum* tendent à montrer que ce n'est pas le cas, au moins chez cette espèce : d'une année sur l'autre, la proportion de pollen trichotomosulqué a varié de 0 à quelques pour cents (pour les mêmes individus). Cette fluctuation est-elle corrélée avec un avantage sélectif ou bien n'est-elle qu'une pure conséquence du système développemental et sans implication pour le succès reproducteur ?

Ainsi, bien que la sélection naturelle semble être un des facteurs déterminant de l'évolution du type apertural comme le suggère l'analyse comparative de la microsporogénèse chez les Asparagales, la mise en évidence d'une action plus directe à des niveaux spécifiques est difficile à mettre en œuvre en raison de la complexité des facteurs en interaction. Les études doivent donc s'envisager à des échelles différentes afin de détecter d'éventuelles corrélations entre le type apertural et des facteurs écologiques (climatiques, par exemple) ou biologiques (mode de pollinisation, système de reproduction, etc.), et d'en obtenir confirmation par des études plus fines au niveau des espèces.

Bibliographie

- Adams, W. T., and D. S. Birkes. 1991. Estimating mating patterns in forest tree populations. Pages 152-172 in M. E. M. S. Fineschi, F. Cannata, and H. H. Hattermer, eds. *Biochemical markers in the population genetics of forest trees*. SPB Academic Publishing, Hague, Netherlands.
- Adams, W. T., A. R. Griffin, and G. F. Moran. 1992. Using paternity analysis to measure effective pollen dispersal in plant populations. *The American Naturalist* 140: 762-780.
- Aizen, M. A., and K. B. Searcy . 1998. Selective fruit filling in relation to pollen load size in *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae). *Sexual Plant Reproduction* 11: 1166-170.
- Alberch, P. 1982. Developmental constraints in evolutionary processes. Pages 313-332 in J. T. Bonner, ed. *Evolution and development*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ambwani, K., and M. Kumar. 1993. Pollen morphology and aperture evolution in *Agave* Linn. *Geophytology* 23: 171-176.
- 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.
- Antonovics, J., and P. H. van Tiendren. 1991. Ontoecogenophyloconstraints? The chaos of constraints terminology. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 166-168.
- Arnqvist, G. 1994. The cost of male secondary sexual traits developmental constraints during ontogeny in a sexually dimorphic water strider. *The American Naturalist* 144: 119-132.
- Aronen, T., T. Nikkanen, A. Harju, H. Tiimonen, and H. Häggman. 2002. Pollen competition and seed-siring success in *Picea abies*. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 638-642.
- Arthur, W. 2000. The concept of developmental reprogramming and the quest for an inclusive theory of evolutionary mechanisms. *Evolution & Development* 2: 49-57.
- Arthur, W. 2001. Developmental drive: an important determinant of the direction of phenotypic evolution. *Evolution & Development* 3: 271-278.
- Arthur, W. 2002. The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology. *Nature* 415: 757-764.
- Arthur, W., and M. Farrow. 1999. The pattern of variation in centipede segment number as an example of developmental constraint in evolution. *Journal of Theoretical Biology* 200: 183-191.
- Barnes, S. H., and S. Blackmore. 1986. Some functional features in pollen development. Pages 71-80 in S. Blackmore and I. K. Ferguson, eds. *Pollen and Spores: form and function*. Academy press, London New-York.
- Blackmore, S., and P. R. Crane. 1998. The evolution of apertures in the spores and pollen grains of embryophytes. Pages 159-182 in S. J. Owens and P. J. Rudall, eds. *Reproductive Biology*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Bogler, D. J., and B. B. Simpson. 1996. Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *American Journal of Botany* 83: 1225-1235.
- Brachet, S., M. F. Jubier, M. Richard, B. Jung-Muller, and N. Frascaria-Lacoste. 1999. Rapid identification of microsatellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior*. *Molecular Ecology* 8: 160-163.
- Brown, R. B., and B. E. Lemmon. 1996. Nuclear cytoplasmic domains, microtubules and organelles in microsporocytes of the slipper orchid *Cypripedium californum* A. Gray dividing by simultaneous cytokinesis. *Sexual Plant Reproduction* 9: 145-152.
- Burczyk, J., W. T. Adams, G. F. Moran, and A. R. Griffin. 2002. Complex patterns of mating revealed in a Eucalyptus regnans seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. *Molecular Ecology* 11: 2379-2391.
- Burd, M. 1994. Bateman's principle and plant reproduction : the role of pollen limitation in fruit and seed set. *Botanical Review* 60: 83-139.
- Caruso, C. M. 1999. Pollination of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae): effects of intra- vs interspecific competition. *American Journal of Botany* 86: 663-668.

- Chakraborty, R., T. R. Meagher, and P. E. Smouse. 1974. Exclusion of paternity: the current state of the art. *American Journal of Human Genetics* 26: 477-488.
- Chakraborty, R., T. R. Meagher, and P. E. Smouse. 1988. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics* 118: 527-536.
- Chase, M. W., A. Y. De Bruijn, A. V. Cox, G. Reeves, P. Rudall, M. A. Johnson, and L. E. Eguiarte. 2000a. Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): an analysis of plastid *rbcl* and *trnL-F* DNA sequences. *Annals of Botany* 86: 935-951.
- Chase, M. W., M. R. Duvall, H. G. Hills, J. G. Conran, A. V. Cox, L. E. Eguiarte, J. Hartwell, M. F. Fay, L. R. Caddick, K. M. Cameron, and S. Hoot. 1995. Molecular phylogenetics of Liliaceae. Pages 109-137 in P. J. Rudall, P. J. Cribb, D. F. Cutler, and C. J. Humphries, eds. *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Chase, M. W., P. J. Rudall, and J. G. Conran. 1996. New circumscriptions and a new family of asparagoid lilies: genera formerly included in the Anthericaceae. *Kew Bulletin* 51: 667-680.
- Chase, M. W., P. J. Rudall, M. F. Fay, and K. L. Stobart. 2000b. Xeronemataceae, a new family of asparagoid lilies from New Caledonia and New Zealand. *Kew Bulletin* 55: 865-870.
- Chen, Y. F., Y. Matsubayashi, and Y. Sakagami. 2000. Peptide growth factor phytosulphine-a contributes to the pollen population effect. *Planta* 211: 752-755.
- Ciampaglio, C. N. 2002. Determining the role that ecological and developmental constraints play in controlling disparity: examples from the crinoid and blastozoan fossil record. *Evolution & Development* 4: 170-188.
- Ciampaglio, C. n. 2004. Measuring changes in articulate brachiopod morphology before and after the Permian mass extinction event: do developmental constraints limit morphological innovation? *Evolution & Development* 6: 260-274.
- Crespi, B. J., and F. L. Bookstein. 1989. A path-analytic model for the measurement of selection on morphology. *Evolution* 43: 18-28.
- Crumly, C. R., and M. R. Sanchez-Villagra. 2004. Patterns of variation in the phalangeal formulae of land tortoises (Testudinidae): Developmental constraint, size, and phylogenetic history. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 302B: 134-146.
- Culley, T. M., S. G. Weller, and A. K. Sakai. 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 361-369.
- Dahlgren, R. M. T., H. T. Clifford, and P. F. Yeo. 1985. *The families of the Monocotyledons*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Dajoz, I., A. Mignot, C. Hoss, and A. Till-Bottraud. 1995. Pollen aperture heteromorphism is not due to unreduced gametophytes. *American Journal of Botany* 82: 104-111.
- Dajoz, I., and I. Till-Bottraud. 1992. Pollen aperture polymorphism and associated variability in the flower structure of *Viola diversifolia*. *Evolutionary Trends in Plants* 6: 41-44.
- Dajoz, I., I. Till-Bottraud, and P. H. Gouyon. 1991. Evolution of pollen morphology. *Science* 253: 66-68.
- Dajoz, I., I. Till-Bottraud, and P. H. Gouyon. 1993. Pollen aperture polymorphism and gametophyte performance in *Viola diversifolia*. *Evolution* 47: 1080-1093.
- Darwin, C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*, London.
- Devlin, B., K. Roeder, and N. C. Ellstrand. 1988. Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 369-380.
- Diaz Lifante, Z. 1996. Pollen morphology of *Asphodelus* L. (Asphodelaceae): taxonomic and phylogenetic inferences at the infrageneric level. *Grana* 35: 24-32.
- Donoghue, M. 1989. Phylogenies and the analysis of evolutionary sequences, with examples from seed plants. *Evolution* 43: 1137-1156.

- Dover, G. A. 1972. The organisation and polarity of pollen mother cells of *Triticum aestivum*. *Journal of Cell Science* 11: 699-711.
- Duvall, M. R., M. T. Clegg, M. W. Chase, W. D. Clark, W. J. Kress, H. G. Hills, L. E. Eguiarte, J. F. Smith, B. S. Gaut, E. A. Zimmer, and G. H. Learn. 1993. Phylogenetics hypotheses for the monocotyledons constructed from *rbcL* sequence data. *Annals Of The Missouri Botanical Garden* 80: 607-619.
- Eberhard, W. G. 2001. Multiple origins of a major novelty: moveable abdominal lobes in male sepsid flies (Diptera: Sepsidae), and the question of developmental constraints. *Evolution & Development* 3: 206-222.
- Erdtman, G. 1947. Suggestions for the classification of fossil and recent pollen grains and spores. *Svensk Bot. Tidskr.* 41: 104-114.
- Erdtman, G. 1952. *Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms.* Almquist and Wiksell, Stockholm.
- Fay, M., and M. W. Chase. 1996. Resurrection of Themidaceae for the Brodiaeae alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon* 45: 441-451.
- Fay, M. F., P. J. Rudall, S. Sullivan, K. L. Stobart, A. Y. de Bruijn, G. Reeves, F. Qamaruz-Zaman, W.-P. Hong, J. Joseph, W. J. Hahn, J. G. Conran, and M. W. Chase. 2000. Phylogenetic studies of Asparagales based on four plastid DNA regions. Pages 360-371 in K. L. Wilson and D. A. Morrison, eds. *Monocots: Systematics and Evolution.* CSIRO, Melbourne.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* 125: 1-15.
- Franc, A., and F. Ruchaud. 1996. Le Frêne commun. Pages 15-68 in CEMAGREF, ed. *Autécologie des feuillus précieux : Frêne commun, Merisier, Erable sycomore, Erable plane,* Gap, France.
- Freckleton, R., P. H. Harvey, and M. Pagel. 2002. Phylogenetic analysis and ecological data: a review of the evidence. *The American Naturalist* 160: 712-726.
- Furness, C. A., and P. J. Rudall. 1999. Microsporogenesis in Monocotyledons. *Annals of Botany* 84: 475-499.
- Furness, C. A., and P. J. Rudall. 2000. Aperture absence in pollen of Monocotyledons in. S. Blackmore, M. Harley, ed. *Pollen and spores: morphology and biology.* Royal Botanical Gardens, Kew.
- Furness, C. A., and P. J. Rudall. 2004. Pollen aperture evolution - a crucial factor for eudicots success? *Trends in Plant Science* 9: 154-158.
- Ganfornina, M. D., and D. Sanchez. 1999. Generation of evolutionary novelty by functional shift. *BioEssays* 21: 432-439.
- Gedroc, J. J., K. D. M. McConnaughay, and J. S. Coleman. 1996. Plasticity in root/shoot partitioning: optimal, ontogenetic, or both? *Functional Ecology* 10: 44-50.
- Gerber, S., P. Chabrier, and A. Kremer. 2003. FaMoz: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers. *Molecular Ecology* 9: 1037-1048.
- Goldblatt, P., and A. Le Thomas. 1992. Pollen Apertures, exine sculpturing and phylogeny in Iridaceae subfamily Iridoideae. *Review of Paleobotany and Palynology* 72: 301-315.
- Goldblatt, P., and A. Le Thomas. 1993. Pollen morphology of Madagascan *Aristea* and *Geosiris* (Iridaceae-Nivenoideae) in relation to systematics and phylogeny. *Adansonia* 14: 223-233.
- Goldblatt, P., A. Le Thomas, and M. Suarez-Cervera. 2004. Phylogeny of the Afro-Madagascan *Aristea* (Iridaceae) revisited in the light of new data on pollen morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society* 144: 41-68.
- Goldblatt, P., J. C. Manning, and A. Bari. 1991. Sulcus and operculum structure in the pollen grains of Iridaceae subfamily Ixiioideae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 78: 950-961.
- Goodwin, B. C. 1982. Development and evolution. *Journal of Theoretical Biology* 97: 43-55.

- Gould, S. J. 1980. 'Is a new and general theory of evolution emerging?'. *Paleobiology* 61: 126-127.
- Gould, S. J. 1989. A developmental constraint in *Cerion*, with comments on the definition and interpretation of constraint in evolution. *Evolution* 43: 516-539.
- Gould, S. J. 1997. The exaptive excellence of spandrels as a term and prototype. *Proceedures of the National Academy of Sciences* 94: 10750-10755.
- Gould, S. J., and R. C. Lewontin. 1979. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 205: 581-598.
- Gould, S. J., and E. S. Vrba. 1982. Exaptation -a missing term in the science of form. *Paleobiology* 8: 4-15.
- Guzzo, F., B. Balban, F. Bracco, and P. Mariani. 1994. Pollen development in *Liriodendron tulipifera*: some unusual features. *Canadian Journal of Botany* 72: 352-358.
- Harley, M., and W. J. Baker. 1998. Aperture morphology in Arecaceae: application within phyletic analyses, and a summary of the fossil record of palm-like pollen. *Grana* 40: 45-77.
- Harley, M. M. 2004. Triaperturate pollen in monocotyledons: configurations and conjectures. *Plant Systematics and Evolution* .
- Heese, M., U. Mayer, and G. Juergens. 1998. Cytokinesis in flowering plants: Cellular process and developmental integration. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 486-491.
- Heslop-Harrison, J. 1963. An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene pendula*. *Grana Palynologica* 4: 7-24.
- Hilu, K. W., T. Borsch, K. Müller, D. E. Soltis, P. S. Soltis, V. Savolainen, M. W. Chase, M. P. Powell, L. A. Alice, R. Evans, H. Sauquet, C. Neinhuis, T. A. B. Slotta, J. G. Rohwer, C. S. Campbell, and L. W. Chatrou. 2003. Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. *American Journal of Botany* 90(12):1758-1776.
- Hormaza, J. I., and M. Herrero. 1996. Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. *Sexual Plant Reproduction* 9: 153-160.
- Houston, A. I. 1997. Are the spandrels of San Marco really panglossian pendentives? *Trends in Ecology and Evolution* 12: 125.
- Huynh, K. L. 1968. Etude de l'arrangement du pollen dans la tétrade chez les Angiospermes sur la base de données cytologiques. *Bulletin de la Société Botanique Suisse* 78: 151-191.
- Huynh, K. L. 1976. Arrangement of some monosulcate, disulcate, trisulcate, dicolpate and tricolpate pollen types in the tetrads, and some aspects of evolution in the angiosperms in I. K. Ferguson and M. Muller, eds. *The evolutionary significance of the exine*. Academic Press, London.
- Ito, M., A. Kawamoto, Y. Kita, T. Yukawa, and S. Kurita. 1999. Phylogenetic relationships of Amaryllidaceae based on MatK sequence data. *Journal of Plant Research* 112: 207-216.
- Jacob, F. 1981. *Le jeu des possibles. Essai sur la diversité du vivant*. Fayard, Paris.
- Johannsson, M. H., and A. G. Stephenson. 1997. Effects of pollination intensity on the vigor of the sporophytic and gametophytic generation of *Cucurbita texana*. *Sexual Plant Reproduction* 10: 236-240.
- Johnson, S. D., and W. J. Bond. 1997. Evidence for widespread pollen limitation of fruiting success in Cape wildflowers. *Oecologia* 109: 530 - 534.
- Kativu, S. 1996. A study on microsporogenesis and ovule morphology in Tropical African Anthericaceae and Asphodelaceae. Pages 477-480 in L. J. G. van der Maesen, ed. *The biodiversity of African Plants*. Kluwer Academic Publisher.
- Kauff, F., P. Rudall, and J. Conran. 2000. Systematic root anatomy of Asparagales and other Monocotyledons. *Plant Systematics and Evolution* 223: 139-154.
- Kaufman, S. R., P. E. Smouse, and E. R. Alvarez-Buylla. 1998. Pollen-mediated gene flow and differential male reproductive success in a tropical pioneer tree, *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Moraceae): a paternity analysis. *Heredity* 81: 164-173.

- Klinkenberg, C. P., L. J. Leamy, E. J. Routman, and J. M. Cheverud. 2002. Analysis of quantitative trait locus effects on the size and shape of mandibular molars in mice. *Genetics* 160: 1573-1586.
- Klips, R. A. 1999. Pollen competition as a reproductive isolating mechanism between two sympatric *Hibiscus* species (Malvaceae). *American Journal of Botany* 86: 269-272.
- Kocyan, A., and P. K. Endress. 2001. Floral structure and development and systematic aspects of some 'lower' Asparagales. *Plant Systematics and Evolution* 229: 187-216.
- Kosenko, V. N. 1999. Contributions to the pollen morphology and taxonomy of the Liliaceae. *Grana* 38: 20-30.
- Lande, R., and S. J. Arnold. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37: 1210-1226.
- Lankinen, A. 2001. In vitro pollen competitive ability in *Viola tricolor*: temperature and pollen donor effects. *Oecologia* 128: 492-498.
- Laurin, M. 2004. The evolution of body size, Cope's rule and the origin of Amniotes. *Systematic Biology* 53: 594-622.
- Lefort, F., S. Brachet, N. Frascaria-Lacoste, K. J. Edwards, and G. C. Douglas. 1999. Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (Oleaceae). *Molecular Ecology* 8: 1075-1092.
- Lopez-Bautista, J. M., D. A. Waters, and R. L. Chapman. 2003. Phragmoplastin, green algae and the evolution of cytokinesis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1715-1718.
- Maddison, W. P. 1990. A method for testing the correlated evolution of two binary characters: are gains or losses concentrated on certain branches of a phylogenetic tree? *Evolution* 44: 539-557.
- Maddison, W. P., and D. R. Maddison. 2004a. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis.
- Maddison, W. P., and D. R. Maddison. 2004b. StochChar: A package of Mesquite modules for stochastic models of character evolution.
- Marshall, D. L., and P. K. Diggle. 2001. Mechanisms of differential pollen donor performance in wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 88: 242-257.
- Marshall, T., J. Slate, L. E. B. Kruuk, and J. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- Mayer, U., and G. Jürgens. 2004. Cytokinesis: lines of division taking shape. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 599-604.
- Maynard-Smith, J., R. Burian, S. Kauffman, P. Alberch, J. Campbell, B. Goodwin, R. Lande, D. Raup, and L. Wolpert. 1985. Developmental constraints and evolution. *The Quarterly Review of Biology* 60: 265-287.
- Meagher, T. R. 1986. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of the most likely male parents. *The American Naturalist* 128: 199-215.
- Meerow, A. W., M. F. Fay, C. L. Guy, L. Quin-Bao, F. Q. Zaman, and M. W. Chase. 1999. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid sequence data. *American Journal of Botany* 86: 1325-1345.
- Mignot, A., I. Dajoz, and I. Till-Bottraud. 1995. Heteromorphism of pollen aperture number and heterogeneity in post-meiotic tetrads in two *Viola* species and *Nicotiana tabacum*. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences* 318: 453-457.
- Mignot, A., C. Hoss, I. Dajoz, C. Leuret, J. P. Henry, J. M. Dreuillaux, E. Heberleborgs, and I. Till-Bottraud. 1994. Pollen aperture polymorphism in Angiosperms: importance, possible causes and consequences. *Acta Botanica Gallica* 141: 109-122.
- Mitchell, R. 1997. Effects of pollination intensity on *Lesquerella fendleri* seed set: variation among plants. *Oecologia* 109: 382-388.
- Morales, E. 2000. Estimating phylogenetic inertia in *Thitonia* (Asteraceae): a comparative approach. *Evolution* 54: 475-484.

- Morand-Prieur, M.-E., C. Raquin, J. Shykoff, and N. Frascaria-Lacoste. 2003. Males outcompete hermaphrodites for seed siring success in controlled crosses in the polygamous *Fraxinus excelsior* (Oleaceae). *American Journal of Botany* 90: 949-953.
- Mulcahy, D. L. 1974. Correlation between speed of pollen tube growth and seedling weight in *Zea mays* L. *Nature* 249: 491—493.
- Mulcahy, D. L. 1979. The rise of the angiosperms: a genealogical factor. *Science* 206: 20-23.
- Nadot, S., H. E. Ballard, J. B. Creach, and I. Dajoz. 2000. The evolution of pollen heteromorphism in *Viola*: a phylogenetic approach. *Plant Systematics and Evolution* 223: 155-171.
- Nielsen, M. G., E. Popodi, S. Minsuk, and R. Raff. 2003. Evolutionary convergence in Otx expression in the pentamerous adult rudiment in direct-developing sea urchins. *Development, Genes and Evolution* 213: 73-82.
- Nielsen, R., D. K. Mattila, P. K. Clapham, and P. J. Palsbølld. 2001. Statistical Approaches to Paternity Analysis in Natural Populations and Applications to the North Atlantic Humpback Whale. *Genetics* 157: 1673-1682.
- Niesenbaum, R. A., and S. K. Schueller. 1997. Effects of pollen competitive environment on pollen performance in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). *Sexual Plant Reproduction* 10: 101-106.
- Nijhout, H. F., and D. J. Emlen. 1998. Competition among body parts in the development and evolution of insect morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3685-3689.
- Nishihama, R., and Y. Machida. 2001. Expansion of the phragmoplast during plant cytokinesis: a MAPK pathway may MAP it out. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 507-512.
- Otegui, M., and L. A. Staehelin. 2000. Cytokinesis in flowering plants: more than one way to divide a cell. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 493-502.
- Pagel, M. 1994. Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings of the Royal Society London (B)* 255: 37-45.
- Pagel, M. 1994, 1997, 1999. Discrete, a computer program for the comparative analysis of binary characters on phylogenetic trees.
- Pagel, M. 1997. Inferring evolutionary processes from phylogenies. *Zoologica Scripta* 26: 331-348.
- Pagel, M., and F. Lutzoni. 2002. Accounting for phylogenetic uncertainty in comparative studies of evolution and adaptation. Pages 148-161 in M. Lässig and A. Valleriani, eds. *Biological Evolution and Statistical Physics*. Springer-Verlag, Berlin.
- Pasonen, H. L., P. Pulkkinen, and M. Kämpylä. 2001. Do pollen donors with fastest-growing pollen tubes sire the best offspring in an anemophilous tree, *Betula pendula* (Betulaceae)? *American Journal of Botany* 88: 854-860.
- Pfossner, M., and F. Speta. 1999. Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences. *Annals of Missouri Botanical Garden* 86: 852-875.
- Pfossner, M., W. Wetschnig, S. Ungar, and G. Prenner. 2003. Phylogenetic relationships among genera of Massonieae (Hyacinthaceae) inferred from plastid DNA and seed morphology. *Journal of Plant Research* 116: 115-132.
- Pigliucci, M., and J. Kaplan. 2000. The fall and rise of Dr Pangloss: adaptationism and the *Spandrels* paper 20 year later. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 66-70.
- Pinar, n. M., and E. O. Dönmez. 2000. Pollen morphology of Turkish *Iris* L. (Iridaceae) with reference to evolutionary trends at the infrageneric level. *Israel Journal of Plant Sciences* 48: 129-141.
- Punt, W., S. Blackmore, S. Nilsson, and A. Le Thomas. 1994. *Glossary of pollen and spores terminology*. LPP Foundation, Utrecht.
- Qiu, Y. L., J. H. Lee, F. Bernasconi-Quadroni, D. E. Soltis, P. S. Soltis, M. Zanis, E. A. Zimmer, Z. D. Chen, V. Savolainen, and M. W. Chase. 2000. Phylogeny of basal angiosperms: Analyses of five genes from three genomes. *International Journal of Plant Sciences* 161:S3-S27.

- Resnik, D. 1995. Developmental constraints and patterns: some pertinent distinctions. *Journal of Theoretical Biology* 173: 231-240.
- Ressayre, A., B. Godelle, A. Mignot, and P. H. Gouyon. 1998. A morphogenetic model accounting for pollen aperture pattern distribution in flowering plants. *Journal of Theoretical Biology* 193: 321-334.
- Ressayre, A., B. Godelle, C. Raquin, and P.-H. Gouyon. 2002. Aperture pattern ontogeny in angiosperms. *Journal of Experimental Zoology* 294: 122-135.
- Ressayre, A., A. Mignot, S. Siljak-Yakovlev, and C. Raquin. 2003. Post meiotic cytokinesis and pollen aperture number determination in eudicots: effect of the cleavage wall number. *Protoplasma* 221: 257-268.
- Robert, J. S., B. K. Hall, and W. M. Olson. 2001. Bridging the gap between developmental systems theory and evolutionary developmental biology. *BioEssays* 23: 954-962.
- Roeder, K., B. Devlin, and B. G. Lindsay. 1989. Application of maximum likelihood methods to population genetic data for the estimation of individual fertilities. *Biometrics* 45: 363-379.
- Rowley, J. R. 1975. Germinal aperture formation in pollen. *Taxon* 24: 17-25.
- Rudall, P., and D. F. Cutler. 1995. Asparagales: a reappraisal. Pages 157-168 in P. J. C. P. J. Rudall, D. F. Cutler and C. J. Humphries, ed. *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Rudall, P., and A. Wheeler. 1988. Pollen morphology in Tigridaeae (Iridaceae). *Kew Bulletin* 43: 693-701.
- Rudall, P. J. 2002. Unique floral structures and iterative evolutionary themes in Asparagales: Insights from a morphological cladistic analysis. *Botanical Review* 68: 488-509.
- Rudall, P. J., R. M. Bateman, M. F. Fay, and A. Eastman. 2002. Floral anatomy and systematics of Alliaceae with particular reference to *Gilliesia*, a presumed insect mimic with strongly zygomorphic flowers. *American Journal of Botany* 89: 1867-1883.
- Rudall, P. J., and G. Campbell. 1999. Flower and pollen structure of Ruscaceae in relation to Aspidistreae and other Convallariaceae. *Flora* 194: 201-214.
- Rudall, P. J., M. W. Chase, D. F. Cutler, J. Rusby, and A. Y. De Bruijn. 1998. Anatomical and molecular systematics of Asteliaceae and Hypoxidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 127: 1-42.
- Rudall, P. J., C. A. Furness, M. W. Chase, and M. F. Fay. 1997. Microsporogenesis and pollen sulcus type in Asparagales (Lilianaes). *Canadian Journal of Botany* 75: 408-430.
- Sampson, F. B. 1969. Cytokinesis in pollen mother cells of Angiosperms, with emphasis on *Laurelia novae-zelandiae* (Monimiaceae). *Cytologia* 34: 627-634.
- Sheldon, J. M., and H. G. Dickinson. 1983. Determination of patterning in the pollen wall of *Lilium henryi*. *Journal of Cell Science* 63: 191-208.
- Sheldon, J. M., and H. G. Dickinson. 1986. Pollen wall formation in *Lilium*: the effect of chaotropic agents, and the organisation of the microtubular cytoskeleton during pattern development. *Planta* 168: 11-23.
- Smith, L. G. 2002. Plant cytokinesis : motoring to the dispatch finish. *Current Biology* 12: R206-R209.
- Snow, A. A., T. P. Spira, and H. Liu. 2000. Effects of sequential pollination on the success of "fast" and "slow" pollen donors in *Hibiscus maoscheutos* (Malvaceae). *American Journal of Botany* 87: 1656-1659.
- Spurway, H. 1949. Genetics and cytology of *Drosophila subobscura* IV. *Journal of Genetics* 49: 126-140.
- Stedge, B., and I. Nordal. 1994. A contribution to the discussion to the family delimitation of Anthericaceae versus Asphodelaceae. Pages 513-524. *XIIIth Plenary meeting AETFAT*. J. H. Seyani and A. C. Chikuni, Malawi.
- Stephenson, A. G., C. N. Hayes, and J. A. W. Johannsson. 2001. The performance of microgametophytes is affected by inbreeding depression and hybrid vigor in the sporophytic generation. *Sexual Plant Reproduction* 14: 77-83.

- Stone, J. R. 1996. Computer simulated shell size and shape variation in the caribbean land snail genus *Cerion*: a test of geometrical constraints. *Evolution* 50: 341-347.
- Tejaswini. 2002. Variability of pollen grain features: a plant strategy to maximize reproductive fitness in two species of *Dianthus*? *Sexual Plant Reproduction* 14: 347-353.
- Thomson, J. D. 1989. Germination schedules of pollen grains: implications for pollen selection. *Evolution* 43: 220-223.
- Till-Bottraud, I., P. H. Gouyon, D. L. Venable, and B. Godelle. 2001. The number of competitors providing pollen on a stigma strongly influences intraspecific variation in number of pollen apertures. *Evolutionary Ecology Research* 3: 231-253.
- Till-Bottraud, I., A. Mignot, R. De Paepe, and I. Dajoz. 1995. Pollen heteromorphism in *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 82: 1040-1048.
- Till-Bottraud, I., D. L. Venable, I. Dajoz, and P. H. Gouyon. 1994. Selection on pollen morphology: A game theory model. *The American Naturalist* 144: 395-411.
- Till-Bottraud, I., Vincent M, Dajoz I, and A. Mignot. 1999. Pollen aperture heteromorphism. Variation in pollen-type proportions along altitudinal transects in *Viola calcarata*. *Comptes Rendus De L'Académie Des Sciences Série III - Sciences De La Vie-Life Sciences* 322: 579-589.
- Touraev, A., C. S. Fink, E. Stöger, and E. Heberle-Bors. 1995. Pollen selection: a transgenic reconstruction approach. *Proceedures of the National Academy of Sciences of USA* 92: 12165-12169.
- Treutlein, J., G. F. S. Smith, B. E. van Wyk, and W. Wink. 2003. Phylogenetic relationships in Asphodelaceae (Alooideae) inferred from chloroplast DNA sequences (rbcL, matK) and from genomic finger-printing (ISSR). *Taxon* 52: 193.
- van Campo, M. 1971. Palynologie et évolution - Précisions nouvelles sur les structures comparées des pollens de Gymnospermes et d'Angiospermes. *Comptes Rendus Académie Sciences Paris, sér. D.* 272: 2071-2074.
- van Dassow, G., and E. Munro. 1999. Modularity in animal development and evolution: elements of a conceptual framework for evo-devo. *Journal of Experimental Zoology* 285: 307-325.
- van Konijnenburg-van Cittert, J. H. A. 2000. Osmundaceous spores throughout time in M. M. Harley, ed. *Pollen and Spores: Morphology and Biology*. Royal Botanical Garden, Kew.
- Vavilov, N. I. 1922. The law of homologous series in variation. *Journal of Genetics* 12: 67-87.
- Venable, D. L. 1985. The evolutionary ecology of seed heteromorphism. *The American Naturalist* 126: 577-595.
- Wagner, G. P., and G. B. Müller. 2002. Evolutionary innovations overcome ancestral constraints: a reexamination of character evolution in male sepsid flies (Diptera: Sepsidae). *Evolution & Development* 4: 1-6.
- Walker, J. W., and J. A. Doyle. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: palynology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 664-723.
- Wallander, E. 2001. Evolution of wind pollination in *Fraxinus* (Oleaceae) -an ecophylogenetic approach. Göteborg University, Sweden.
- Waterkeyn, L. 1962. Les parois microsporocytaires de nature callosique chez *Helleborus* et *Tradescantia*. *La cellule* 62: 225-255.
- Waterkeyn, L., and A. Bienfait. 1970. On a possible function of the callosic special wall in *Ipomea purpurea* (L.) Roth. *Grana* 10: 13-20.
- Weber, K. E. 1992. How small are the smallest selectable domains of form? *Genetics* 130: 345-353.
- Williams, J. H., W. E. Friedman, and M. L. Arnold. 1999. Developmental selection within the angiosperm style: using gamete DNA to visualize interspecific pollen competition. *Proceedures of the National Academy of Sciences of USA* 96: 9201-9206.
- Winsor, J. A., S. Peretz, and A. G. Stephenson. 2000. Pollen competition in a natural population of *Cucurbita foetidissima* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany* 87: 527-532.

- Wodehouse, R. P. 1935. *Pollen Grains, their Structure, Identification and Significance in Science and Medicine*. McGraw-Hill, New York.
- Xiong, Z. T., S. Chen, D. Hong, and Y. Luo. 1998. Pollen morphology and its evolutionary significance in *Hemerocallis* (Liliaceae). *Nordic Journal of Botany* 18: 183-189.
- Yampolski, L. Y., and A. Stolfus. 2001. Bias in the introduction of variation as an orientating factor in evolution. *Evolution & Development* 3: 73-83.
- Zanis, M. J., D. E. Soltis, P. S. Soltis, S. Mathews, and M. J. Donoghue. 2002. The root of the angiosperms revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 99:6848-6853.
- Zelditch, M. L., F. L. Bookstein, and B. L. Lundrigan. 1993. The ontogenic complexity of developmental constraints. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 621-641.
- Zomlefer, W. B. 1999. Advances in angiosperm systematics: examples from the Liliales and Asparagales. *Journal of Torrey Botanical Society* 125: 58-62.

Annexes

ANNEXES

ANNEXE 1 : matériel et méthode, partie 2 (p. 28).

Espèces et familles étudiées, provenance, accession et date de récolte

CBNB = Conservatoire Botanique National de Brest ; JBVP = Jardin Botanique de la Ville de Paris ; MNHN = Museum National d'Histoire Naturelle ; Orsay = Parc Botanique de Launay ; UJF = Université Joseph Fourier, Grenoble ; BulbArgence = entreprise horticole française ; Kew = Royal Botanic Gardens, Kew ; Kirstenbosch = Kirstenbosch National Botanical Garden (Afrique du Sud) ; Cap = région du Cap (Afrique du Sud)

Famille (APG 2003)	Espèce	# accession	Provenance	Date
Hypoxidaceae	<i>Hypoxidia maheensis</i>	810110	CBNB	mai-02
Tecophilaeaceae	<i>Cyanella alba</i>	510/67	Kirstenbosch	août-02
	<i>Cyanella orchidiformis</i>	9809wf2	BulbArgence	mai-03
Iridaceae	<i>Babiana angustifolia</i>		Kirstenbosch	août-02
	<i>Babiana disticha</i>	655/74	Kirstenbosch	août-02
	<i>Chasmanthe floribunda</i>	856/83	Cap	août-02
	<i>Crocosmia massinorum</i>		BulbArgence	avr-03
	<i>Dietes grandiflora</i>	431/35	Kirstenbosch	août-02
	<i>Ferraria crispa</i>	9810AC12	BulbArgence	mai-03
	<i>Freesia sp</i>		Stellenbosch	août-02
	<i>Gladiolus italicus</i>	9708cw29	BulbArgence	mai-03
	<i>Iris pseudoacorus</i>	Récolté dans la nature	Orsay	avr-03
	<i>Ixia lutea lutea</i>	177/78	Kirstenbosch	août-02
	<i>Libertia chilensis</i>	980085	CBNB	mai-02
	<i>Libertia formosa</i>	AUT-2001-JAR-032	JBVP	avr-02
	<i>Moraea bipartita</i>	1002/71	Kirstenbosch	août-02
	<i>Moraea arisata</i>	1252/82	Kirstenbosch	août-02
	<i>Sisyrinchium striatum</i>		Orsay	avr-03
	<i>Tritonia securigera</i>	9810AC66	BulbArgence	mai-03
	Hemerocallidaceae	<i>Aristea ecklonii</i>		BulbArgence
<i>Watsonia aletroides</i>			BulbArgence	mai 03
<i>Hemerocallis fulva</i>			UJF	juin-02
Asphodelaceae	<i>Phormium tenax</i>		JBVP	juin-02
	<i>Dianella tasmanica</i>		Kew	mai-02
	<i>Aloe globulifera</i>		MNHN	sept-01
	<i>Asphodeline liburnica</i>	AUT-1999-JAR-043	JBVP	juin-02
	<i>Trachyandra muricata</i>	wild	Cap	juil-02
	<i>Bulbine alooides</i>	431/35	Kirstenbosch	août-02
	<i>Bulbinella nutans nutans</i>	1309/84	Kirstenbosch	août-02
Alliaceae	<i>Kniphofia praecox</i>	172/76	Kirstenbosch	août-02
	<i>Trachyandra muricata</i>	Récolté dans la nature	Cap	juil-02
	<i>Allium altaicum</i>	al 233	Orsay	avr-02
Amaryllidaceae	<i>Allium ursinum</i>	Récolté dans la nature	Orsay	avr-02
	<i>Narcissus poeticus</i>	PFP-2000-NAT-014	CBNB	sept-02
Agapanthaceae	<i>Agapanthus praecox</i>	?	Stellenbosch	janv-02
Themidaceae	<i>Triteleia ixioïdes ssp scabra</i>	9510HD1	BulbArgence	mai-03
Aphyllanthaceae	<i>Aphyllanthes monspeliensis</i>	?	Kew	mai-02
Hyacinthaceae	<i>Albuca nelsonii</i>	9809kb	BulbArgence	mai-03
	<i>Eucomis autumnalis</i>	671/83	Kirstenbosch	janv-02
	<i>Hyacinthus non-scriptus</i>	Récolté dans la nature	Orsay	déc-02
	<i>Ornithogalum longibracteatum</i>	528/93	Kirstenbosch	juil-02
	<i>Veltheimia bracteata</i>		Kirstenbosch	juil-02
Agavaceae	<i>Yucca agavoides</i>		Orsay	août 03
	<i>Beschorneria yuccoides</i>	22 764	MNHN	avr-02
	<i>Hosta sp</i>		Orsay	mai-02
	<i>Arthropodium cirrhatum</i>	?	Kew	mai-02
	<i>Chlorophytum pauciflorum</i>	Récolté dans la nature	West Coast	août-02
Convallariaceae	<i>Polygonatum multiflorum</i>	Récolté dans la nature	Orsay	avr-02
	<i>Convallaria maialis</i>	EDB-2000-VIV-0135	Orsay	avr-02

Recette des colorants utilisés (protocole détaillé : voir les articles, en annexe 2)

Carmin Acétique :

67,5 ml d'acide acétique
0,75 g de Carmin
0,025 g d'acétate ferrique
ajuster à 150 ml H₂O distillée

Le Carmin Acétique colore les acides nucléiques en rose et permet ainsi d'observer la méiose et d'identifier le type de cytokinèse.

Exemple : coloration d'un microsporocyte au carmin acétique. Le stade observé est une anaphase II. La paroi est présente au moment de la seconde division de méiose, la cytokinèse est donc successive.

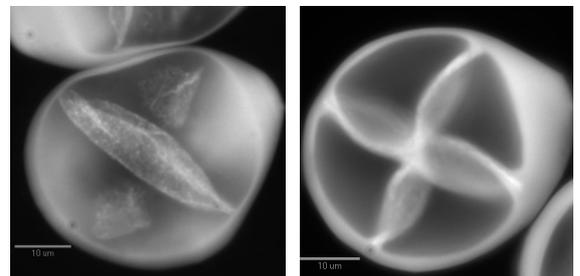


Bleu d'Aniline :

74,96 g de glycérol (20% final)
6,36 g de K₃PO₄
0,3 g de Bleu d'Aniline
ajuster à 300 ml avec H₂O distillée

Le colorant Bleu d'Aniline colore spécifiquement la callose, et nous sert donc à observer les cellules mères, la formation des parois et la forme des tétrades.

Exemple : coloration de microsporocytes au bleu d'aniline. La photo de gauche montre une tétrade en formation. On observe une première paroi (séparant les noyaux issus de la méiose I) déjà achevée et deux autres parois en formation (séparant les noyaux issus de la méiose II). La photo de droite montre une tétrade de forme quadratique.



Rouge Congo :

2 ml H₂O (UP)
2 g d'hydrazine mallique
10 ml d'une solution de (thiéthanolamine 85%, monoéthanolamine 7,5%, diéthanolamine 7,5%)
puis rajouter un peu de poudre de Rouge Congo

Le colorant Rouge Congo nous sert à observer les ouvertures au sein des tétrades ainsi que le pollen mature.

Exemple : coloration de tétrades au rouge congo. La photo de gauche montre une tétrade décussée. La photo de droite montre une tétrade tétraédrique irrégulière. Dans les deux situations, le pollen est monosulqué, les ouvertures sont en position polaire dans la tétrade.



aperture



ANNEXE 2 :

Articles en voie de publication ou faisant l'objet d'une évaluation :

- **Aperture pattern and microsporogenesis in Asparagales.** 2003.

Nadot, S., Penet, L., Dreyer, L. D., Forchioni, A., and A. Ressayre. Monocots 3, Ontario, California, April 2003 (symposium report).

- **Multiple developmental pathways leading to a single morph: monosulcate pollen (examples from the Asparagales).** 2005.

Penet, L., Nadot, S., Ressayre, A., Forchioni, A., Dreyer, L., and P.-H. Gouyon. Annals of Botany (95: 331-343).

- **Variation of pollen early development in monocots.**

Nadot, S., Forchioni, A., Penet, L., Sannier, J., and A. Ressayre. Soumis à Protoplasma.

Les analyses comparatives de la microsporogénèse chez les Asparagales vont également faire l'objet d'une publication (en préparation).

Aperture pattern and microsporogenesis in Asparagales.

Nadot, S., Penet, L., Dreyer, L. D., Forchioni, A., and A. Ressayre.

Monocots 3, Ontario, California, April 2003 (symposium report).

Aperture pattern and microsporogenesis in Asparagales

SOPHIE NADOT¹, LAURENT PENET¹, LEANNE D. DREYER², ARLETTE FORCHIONI¹, AND ADRIENNE
RESSAYRE¹

¹*Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, CNRS UMR 8079, Université Paris-Sud, 91405
Orsay cedex, France*

²*Botany Department, University of Stellenbosch, Private Bag XI, Matieland 7602, South Africa*

Running title head: Microsporogenesis in Asparagales

ABSTRACT

The aperture pattern of pollen grain is a character defined as the number, shape and position of apertures. Although this character is highly variable in angiosperms, two states are particularly widespread. Pollen grains with one polar aperture occur frequently in basal angiosperms and monocots while tricolpate pollen is a synapomorphy of the eudicots. Many morphological characters are the result of a compromise between selective forces (acting on morphology) and developmental constraints (limiting the range of possible morphologies). To investigate what are the respective roles of development and selection in the determination of aperture pattern in angiosperms, we have chosen to study the characteristics of cell division during male meiosis, since it has been shown that aperture pattern is determined during microsporogenesis. The present study focuses on Asparagales. For a selection of species belonging to the major families of Asparagales, we described the type of cytokinesis, the way callose is deposited, the shape of the tetrad, as well as the shape and position of apertures within the tetrad. We show that although pollen morphology is quite uniform in Asparagales (most species produce monosulcate pollen), the characteristics of cell division during male meiosis vary among families. A highly conserved developmental sequence is observed in higher Asparagales whereas lower Asparagales, and particularly Iridaceae, display different ways of achieving cell division.

Keywords: pollen, aperture pattern, microsporogenesis, Asparagales.

INTRODUCTION

Pollen morphology is extremely diversified in angiosperms. Many studies have focused on the structure of pollen grains and particularly on the ornamentation of the pollen wall. However, a high diversity is also found in the apertures, and particularly in the aperture pattern (Erdtman 1952; Huynh 1976; Thanikaimoni 1986; Harley and Zavada 2000). Variation in aperture pattern is expressed in the shape and number of apertures, as well as the position of apertures within the tetrad, visible when microsporogenesis is completed. The pollen grains in monocots are characterized by a relatively conserved aperture pattern since very many species produce monosulcate pollen. However, the monosulcate type is not a strict rule in monocots (Harley and Zavada 2000) and variation occurs in several families such as Alismataceae (Furness and Rudall 1999), Araceae (Grayum 1992), Liliaceae and Tofieldiaceae (Huynh 1976; Rudall et al. 2000), Arecaceae (Harley and Baker 2001), Dioscoreaceae (Caddick et al. 1998) or Hemerocallidaceae (Huynh 1971). The latter family belongs to the order Asparagales, which has been subject to detailed phylogenetic analyses (Chase et al. 1995; Rudall et al. 1997; Fay et al. 2000). Rudall et al. (1997) surveyed the evolution of cytokinesis and pollen aperture type in Asparagales and concluded that simultaneous cytokinesis is apomorphic for the order, with a reversal to the successive type in higher Asparagales. Like in the rest of monocots, most Asparagalean species produce monosulcate pollen grains. Other aperture types have been recorded in families such as Hemerocallidaceae, characterized by the predominance of trichotomosulcate pollen (Roth et al. 1987), or Iridaceae, where various types, such as zonosulcate, disulcate, trichotomosulcate or inaperturate, are encountered (Goldblatt and Le Thomas 1992, 1993). It is noteworthy that variation is mostly found in families belonging to the lower Asparagalean grade, whereas taxa from the higher Asparagales clade consistently produce monosulcate pollen. Moreover, monosulcate pollen grains can be produced by either successive or simultaneous cell division whereas trichotomosulcate pollen occur only when cytokinesis is of the simultaneous type (Rudall et al. 1997).

The type of cytokinesis is one of the different parameters that have been shown to play a role in the determination of aperture pattern (Ressayre 2001; Ressayre et al. 2002). Other parameters involved are the characteristics of intersporal wall formation during male cytokinesis (centrifugal or centripetal callose deposition), the shape of the tetrad (tetragonal, tetrahedral or rhomboidal) and the position of apertures within the tetrad (polar or grouped at the last point of contact between the microspores).

Little information is available concerning intersporal wall formation in Asparagales. The process has been described in detail for a handful of species, such as *Convallaria majalis* L. (Waterkeyn 1962), *Hemerocallis fulva* L., and *Sansevieria trifasciata* Prain. (Longly and Waterkeyn 1979). Cytokinesis is described as being successive for all three species, and cell division involves the formation of three centrifugal cell plates (one formed after the first meiotic division, two formed after the second meiotic division) meeting with callose ingrowths at the junction with the callose wall surrounding the tetrad. Cell plates are covered by additional callose deposition. So far, only centrifugally extending cell plates have been described in monocots (Longly and Waterkeyn 1979; Ressayre 2001).

This paper presents the first large scale investigation of intersporal wall formation in a group of plants, the Asparagales, conducted using simple methods of staining and observation. Our main objective was to explore the developmental pathway of microsporogenesis from a cellular point of view, in a range of species representing the taxonomic diversity of the Asparagales, with a focus on higher Asparagales, in order to understand the conservativeness of aperture pattern.

MATERIALS AND METHODS

For this study, fourteen species were selected, representing most major families of the higher Asparagales, as well as a few families of the lower Asparagales. Fresh floral buds of different sizes, and therefore at different stages of microsporogenesis, were collected from plants grown in botanical gardens or found on the campus of the University Paris-Sud (Table 1). Floral

buds were immediately dissected to extract the anthers. One anther per bud was squashed and mounted in aceto-carmin in order to identify the stage of the bud (Fig. 1–2). When meiosis was in progress, the remaining anthers were squashed in aniline blue (modified from Arens 1949), which reveals callose wall formation by epifluorescence (Fig. 3–4). When the tetrad stage was observed, half of the remaining anthers were squashed in congo red (Stainier et al. 1967), in order to visualize the position of apertures within the tetrad (Fig. 5–6), and the remaining half was mounted in aniline blue, to visualize callose walls just before the release of pollen grains. Intersporal wall formation of the first and second meiotic divisions is represented in Fig. 7–18 and 19–30, respectively. Mature pollen was also mounted in congo red. Aceto-carmin and congo red preparations were observed in transmission light with a Zeiss Axiophot microscope. The epifluorescence Zeiss Axiophot microscope was used with filter set 01 (excitation 345, emission 425 nm long pass) for aniline blue staining.

RESULTS

Higher Asparagales

This clade was represented in this study by nine species from seven families: Agapanthaceae (Fig. 17–18, 28), Agavaceae (Fig. 11–14), Alliaceae (Fig. 3), Amaryllidaceae (Fig. 7–10, 27), Anthericaceae (Fig. 19–22, 29), Convallariaceae (Fig. 15–16, 30), and Hyacinthaceae (Fig. 25–26). All species examined produced monosulcate pollen and presented the same characteristics concerning the progress of microsporogenesis. Cytokinesis was of the successive type, as shown by the occurrence of dyads (Fig. 10, 14, 18). Cell walls separating the four microspores after both first and second meiotic divisions were formed by callosic cell plates expanding centrifugally (Fig. 7–9, 11–12, 15–16, 17–18, 19–21, 23–26). The tetrads were mostly tetragonal, with all four microspores in the same optical plane (Fig. 22, 24, 28) or decussate, with one pair of microspores forming a right angle with the other pair (Fig. 29). T-shaped tetrads were

seldom recorded. The sulcus, generally visible on the wall of the microspores in post-meiotic tetrads, was in a polar position and parallel to the cleavage planes (Fig. 27–30).

Lower Asparagales

Six species belonging to three different families (Fig. 1–2, 4–6, 31–42) and presenting either successive or simultaneous types of cytokinesis were examined for microsporogenesis. All species produced monosulcate pollen grains, arranged in tetrads of irregular shape. In three of the species examined, namely *Hypoxidia maheensis* (Hypoxidiaceae), *Moraea aristata*, and *M. bipartita* (Iridaceae), the pattern observed for microsporogenesis was strictly similar to the pattern described for higher Asparagales: successive cytokinesis (Fig. 1), centrifugal cell plates (Fig. 31–32, 34–35), tetragonal or decussate tetrads (Fig. 33, 36) and polar apertures parallel to cleavage planes (Fig. 5, 33). The three other species examined, *Aloe globulifera*, *Bulbine alooides* (Asphodelaceae), and *Libertia formosa* (Iridaceae) had a cytokinesis of the simultaneous type, as shown by the observation of four nuclei in the same cytoplasm right after both meiotic divisions (Fig. 40). In the two Asphodelaceae species, intersporal cell walls were formed by centrifugal cell plates (Fig. 37, 41), similar to Higher Asparagales. The only difference was that all cell plates were growing simultaneously, forming six walls separating the four microspores assembled in a tetrahedral tetrad (Fig. 38, 42). In *Bulbine alooides*, additional callose deposits occur at the intersection of cell plates (Fig. 42). Cell wall formation seems to occur differently in *Libertia formosa*: callose ingrowths starting from the wall surrounding the future tetrad are observed (Fig. 4), and progress centripetally towards the center. In spite of the differences concerning cytokinesis and cell wall formation, all three species displayed a distal sulcus (Fig. 6, 39) as in higher Asparagales.

DISCUSSION

The microsporogenesis pathway leading to monosulcate pollen, a feature of monocots and basal angiosperms, was known to involve either successive or simultaneous cytokinesis. The results obtained in this study show that in higher Asparagales, a clade characterized by successive cytokinesis (Rudall et al. 1997), the whole process of microsporogenesis is highly conserved. All species examined displayed identical features concerning the formation of the callosic cell walls and the distribution of sulci within the tetrad. Intersporal walls are formed by centrifugally expanding cell plates, with slight ingrowths of callose at the junction between the cell plates and the callose wall surrounding the tetrad (indicated by an arrow on Fig. 22). What had been described for two species (Longly and Waterkeyn 1979) can therefore be considered as a general feature of the higher Asparagales.

The clade consisting of Asphodelaceae, Hemerocallidaceae, and Xanthorrhoeaceae is sister to higher Asparagales (Fay et al. 2000). Asphodelaceae, which produce monosulcate pollen through simultaneous cytokinesis (Rudall et al. 1997), achieve the cell wall formation by means of centrifugal cell plates like higher Asparagales. This is also the case for Hemerocallidaceae (data not shown) in which, interestingly, *Hemerocallis* displays a type of cytokinesis intermediate between successive and simultaneous (Cave 1955). *Xanthorrhoea* is reported as being successive (Rudall et al. 1997). Our results show that in lower Asparagales, the microsporogenesis pathway associated with a successive type of cytokinesis is achieved by way of centrifugally growing cell plates, exactly like in higher Asparagales. A simultaneous cytokinesis is, however, the most common condition in lower Asparagales. In this case, cell wall formation can be achieved by centrifugal cell plates, a situation encountered in Asphodelaceae and related families, or by callose growing centripetally (data not shown), like in Iridaceae or Tecophilaeaceae. In spite of this variation observed in microsporogenesis, the pollen produced is monosulcate in most Asparagales. This raises the question of the role played by cytokinesis and cell wall formation during microsporogenesis in the determination of aperture pattern (Ressayre et al. 2002). A more thorough

investigation of microsporogenesis in lower Asparagales is currently being conducted and will allow us to further explore this point.

ACKNOWLEDGMENTS

We are extremely grateful to Carol Furness for her help with the plant material at the Royal Botanic Garden, Kew. We thank the Musée National d'Histoire Naturelle (Paris, France), Royal Botanic Gardens (Kew, UK), Stellenbosch Botanical Garden (South Africa), and Kirstenbosch National Botanical Garden (Cape Town, South Africa) for allowing us to use their living collections. This work was supported by a grant from the Singer-Polignac foundation to A.R. and a grant from the MENRT (20 2001-1081).

LITERATURE CITED

- ARENS, K. 1949. Prova de calose por meio da microscopia a luz fluorescente e aplicações do método. *Lilloa* **18**: 71–75.
- CADDICK, L. R., C. A. FURNESS, K. L. STOBART, AND P. J. RUDALL. 1998. Microsporogenesis and pollen morphology in Dioscoreales and allied taxa. *Grana* **37**: 321–336.
- CAVE, M. S. 1955. Sporogenesis and the female gametophyte of *Phormium tenax*. *Phytomorphology* **5**: 247–253.
- CHASE, M. W., M. R. DUVAL, H. G. HILLS, J. G. CONRAN, A. V. COX, L. E. EGUIARTE, J. HARTWELL, M. F. FAY, L. R. CADDICK, K. M. CAMERON, AND S. HOOT. 1995. Molecular phylogenetics of Liliales, pp. 109–137. In P. J. Rudall, P. J. Cribb, D. F. Cutler and C. J. Humphries [eds.], *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- ERDTMAN, G. 1952. *Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperms*. Almqvist & Wiksell, Stockholm. 553 p.
- FAY, M. F., P. J. RUDALL, S. SULLIVAN, K. L. STOBART, A. Y. DE BRUIJN, G. REEVES, F. QAMARUZ-ZAMAN, W.-P. HONG, J. JOSEPH, W. J. HAHN, J. G. CONRAN, AND M. W. CHASE. 2000. Phylogenetic studies of Asparagales based on four plastid DNA regions, pp. 360–371. In K. L. Wilson and D. A. Morrison [eds.], *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia.
- FURNESS, C. A., AND P. J. RUDALL. 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. *Ann. Bot.* **84**: 475–499.
- GOLDBLATT, P., AND A. LE THOMAS. 1992. Pollen apertures, exine sculpturing and phylogeny in Iridaceae subfamily Iridoideae. *Rev. Paleobot. Palyno.* **72**: 301–315.
- _____, AND A. LE THOMAS. 1993. Pollen morphology of Madagascan *Aristea* and *Geosiris* (Iridaceae-Nivenoideae) in relation to systematics and phylogeny. *Adansonia* **14**: 223–233.
- GRAYUM, M. H. 1992. Comparative external pollen ultrastructure of the Araceae and putatively related taxa. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **43**: 1–167.

- HARLEY, M. M., AND M. S. ZAVADA. 2000. Pollen of the monocotyledons: selecting characters for cladistic analysis, pp. 191–210. *In* K. L. Wilson and D. A. Morrison [eds.], *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia.
- _____, AND W. J. BAKER. 2001. Pollen aperture morphology in Arecaceae: application within phylogenetic analyses, and a summary of the fossil record of palm-like pollen. *Grana* **40**: 45–77.
- HUYNH, K.-L. 1971. Etude de l'arrangement du pollen dans la tétrade chez les Angiospermes sur la base de données cytologiques. III. Le pollen trilète du genre *Dianella* Lam. (Liliaceae). *Beitr. Biol. Pflanzen* **47**: 277–286.
- _____. 1976. Arrangement of some monosulcate, disulcate, trisulcate, and tricolpate pollen types in the tetrads, and some aspects of evolution in the angiosperms, pp. 101–124. *In* I. K. Ferguson and J. Muller [eds.], *The evolutionary significance of the exine*. Linnean Society Symposium Series, Academic Press, London, England.
- LONGLY, B, AND L. WATERKEYN. 1979. Etude de la cytokinèse. III. Les cloisonnements simultanés et successifs des microsporocytes. *La cellule* **73**: 65–80.
- RESSAYRE, A. 2001. Equatorial aperture pattern in monocots: same definition rules as in eudicots? The example of two species of Pontederiaceae. *Int. J. Pl. Sci.* **162**: 1219–1224.
- _____, B. GODELLE, C. RAQUIN, AND P.-H. GOUYON. 2002. Aperture pattern ontogeny in angiosperms. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* **294**: 122–135.
- ROTH, J. L., J. W. WALKER, AND A. G. WALKER. 1987. The distribution and systematics of trichotomosulcate pollen within the Lilialean complex. *Amer. J. Bot.* **74**: 751.
- RUDALL, P. J., C. A. FURNESS, M. W. CHASE, AND M. F. FAY. 1997. Microsporogenesis and pollen sulcus type in Asparagales (Liliana). *Canad. J. Bot.* **75**: 408–430.
- _____, K. L. STOBART, W.-P. HONG, J. G. CONRAN, C. A. FURNESS, G. C. KITE, AND M. W. CHASE. 2000. Consider the lilies—systematics of Liliales, pp. 347–359. *In* K. L. Wilson and D. A. Morrison [eds.], *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia.

- STAINIER, F., D. HUARD, AND F. BRONKERS. 1967. Technique de coloration spécifique de l'exine des microspores jeunes encore groupées en tétrade. *Pollen et Spores* **9**: 367–370.
- THANIKAIMONI, G. 1986. Pollen apertures: form and function, pp. 119–136. In S. Blackmore and I. K. Ferguson [eds.], *Pollen and spores: form and function*. Linnean Society Symposium Series, Academic Press, London, England.
- WATERKEYN, L. 1962. Les parois microsporocytaires de nature callosique chez *Helleborus* et *Tradescantia*. *La cellule* **62**: 225–255.

Table 1. List of species surveyed in this study. Kirstenbosch = Kirstenbosch National Botanical Garden (Cape Town, South Africa); Paris = Musée National d'Histoire Naturelle (Paris, France); Orsay = campus of University Paris-Sud (Orsay, France); Stellenbosch = Stellenbosch Botanical Garden (South Africa); Brest = Conservatoire Botanique National de Brest (France); Kew = Royal Botanic Gardens Kew (UK).

Family	Species	Voucher	Origin
<i>Higher Asparagales</i>			
Agapanthaceae		134/53	Kirstenbosch
	<i>A. umbellatus</i> L'Herit.	No voucher	Paris
Agavaceae	<i>Beschorneria yuccoides</i> C. Koch	22 764	Paris
Alliaceae	<i>Allium ursinum</i> L.	No voucher	Orsay
Amaryllidaceae	<i>Narcissus poeticus</i> L.	No voucher	Orsay
Anthericaceae	<i>Arthropodium cirrhatum</i> R.Br.	1985-706	Kew
Convallariaceae	<i>Convallaria majalis</i> L.	No voucher	Orsay
Hyacinthaceae	<i>Eucomis autumnalis</i> (Mill.) Chittenden	671/83	Kirstenbosch
	<i>Veltheimia bracteata</i> Harv.ex Baker	No voucher	Stellenbosch
Asphodelaceae	<i>Aloe globulifera</i> Graessn.	7280	Paris
	<i>Bulbine alooides</i> Willd.	431/35	Kirstenbosch
Hypoxidaceae	<i>Hypoxidia maheensis</i> F.Friedmann	810 110	Brest
Iridaceae	<i>Moraea bipartita</i> L.Bolus	1102/71	Kirstenbosch
	<i>M. aristata</i> (Houtt.) Asch. & Graebn.	1252/82	Kirstenbosch
	<i>Libertia formosa</i> R.Grah.	1980-773	Kew

Figure Legends

Fig. 1–6. Examples of differential staining during microsporogenesis. Fig. 1–2. Aceto-carmine staining.—1. *Moraea bipartita*.—2. *Libertia formosa*.—3–4. Aniline blue staining.—3. *Allium ursinum*.—4. *L. formosa*.—5–6. Congo red staining; stars indicate the position of sulci.—5. *Hypoxidia maheensis*.—6. *L. formosa*.

Fig. 7–18. Intersporal wall formation after the first meiotic division in higher Asparagales.—7–10. *Narcissus poeticus*.—7–9. Microsporocytes stained with aniline blue.—10. Dyad stained with aceto-carmine.—11–14. *Beschorneria yuccoides*.—11–13. Microsporocytes stained with aniline blue.—14. Dyad stained with aceto-carmine.—15–17. Dyads stained with aniline blue.—15–16. *Polygonatum multiflorum*.—17–18. *Agapanthus caulescens*.

Fig. 19–30. Intersporal wall formation after the second meiotic division in higher Asparagales.—19–26. Tetrads stained with aniline blue.—19–22. *Arthropodium cirrhatum*.—22. Ingrowth of callose indicated by the arrow.—23–24. *Eucomis autumnalis*.—25–26. *Veltheimia bracteata*.—27–30. Tetrads stained with congo red; stars indicate the position of sulci.—27. *Narcissus poeticus*.—28. *Agapanthus umbellatus*.—29. *Arthropodium cirrhatum*.—30. *Convallaria majalis*.

Fig. 31–42. Intersporal wall formation in lower Asparagales (staining: aniline blue unless stated otherwise).—31–32. *Moraea bipartita*.—33. Tetrad of *M. aristata* stained with congo red; the stars indicate the position of the sulci.—34–36. *Hypoxidia maheensis*.—37–39. *Aloe globulifera*.—39. Tetrad stained with congo red; stars indicate the position of sulci.—40–42. *Bulbine alooides*.—40. Microsporocyte stained with aceto-carmine.—42. Additional callose deposit indicated by the arrow.

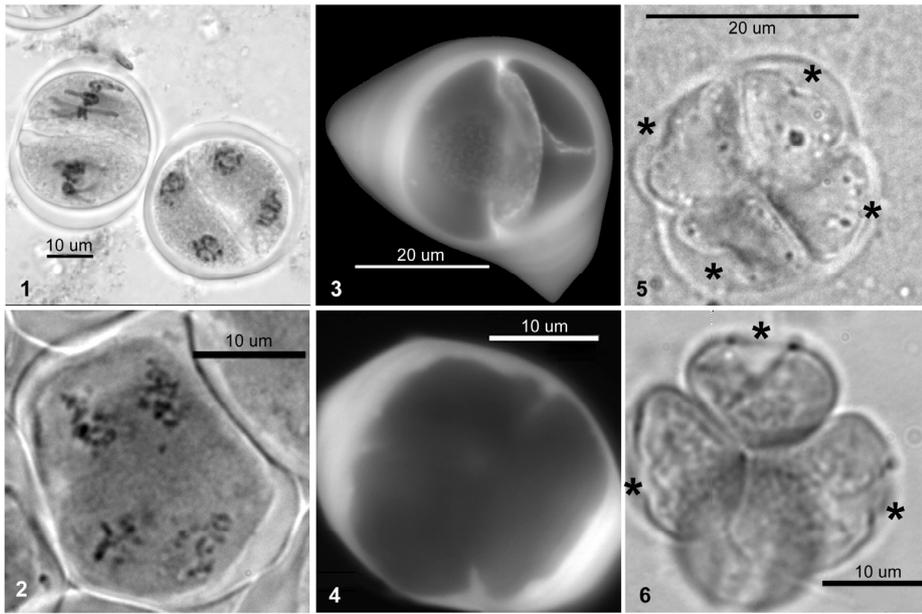


Plate 1

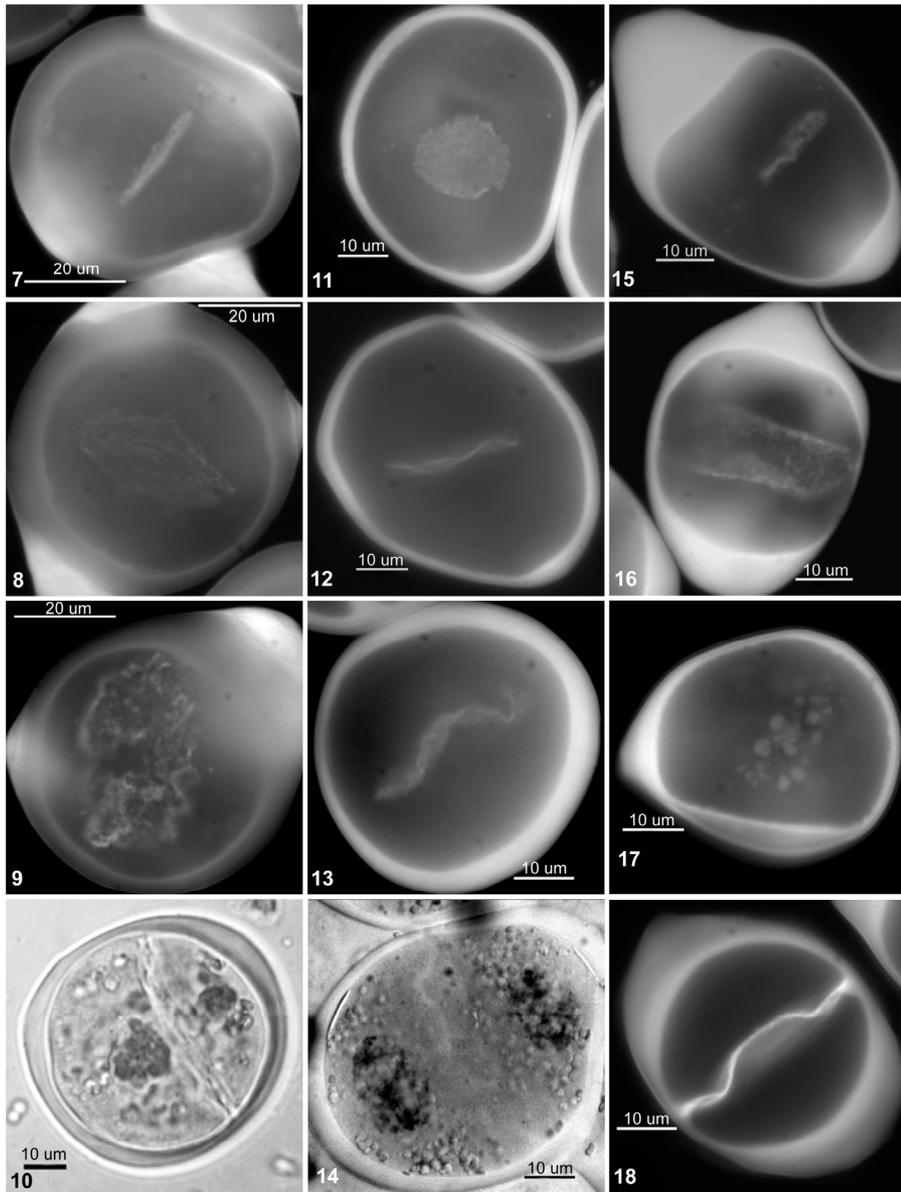


Plate 2

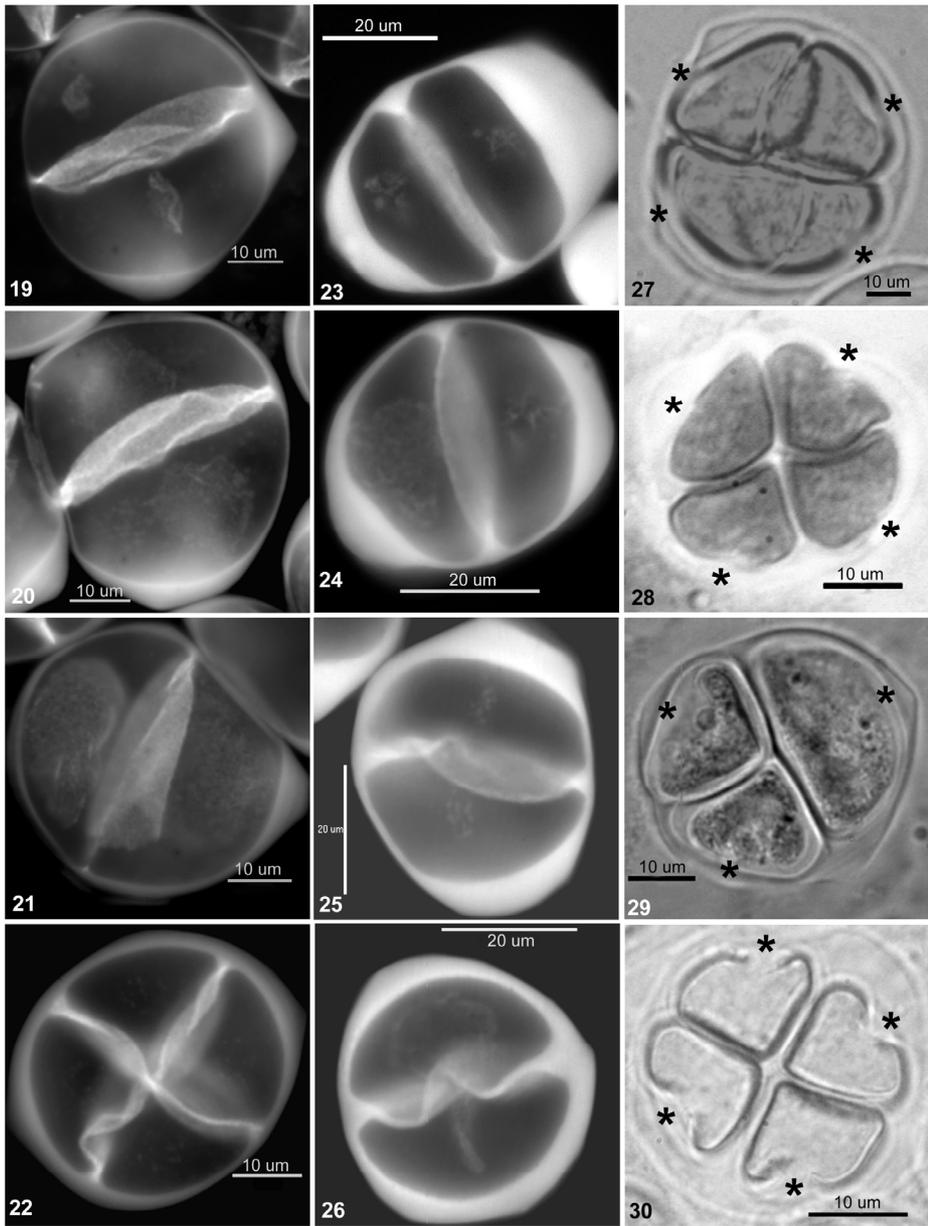


Plate 3

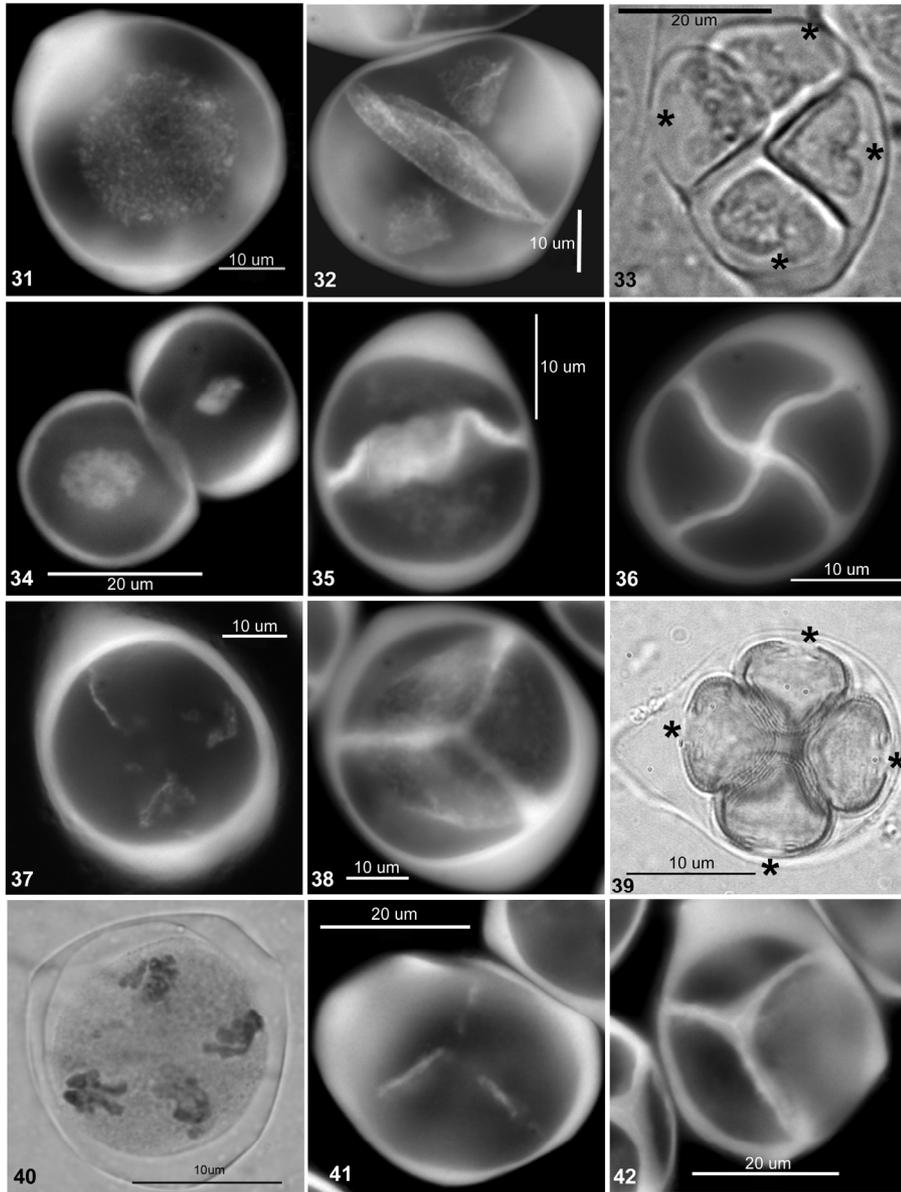


Plate 4.

**Multiple developmental pathways leading to a single morph:
monosulcate pollen (examples from the Asparagales).**

Penet, L., Nadot, S., Ressayre, A., Forchioni, A., Dreyer, L., and P.-H. Gouyon.

Annals of Botany 2005 95: 331-343.

Multiple Developmental Pathways Leading to a Single Morph: Monosulcate Pollen (Examples From the Asparagales)

L. PENET^{1,*}, S. NADOT¹, A. RESSAYRE², A. FORCHIONI¹, L. DREYER³ and P. H. GOUYON¹

¹Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, Bâtiment 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay cédex, France,

²UMR de Génétique Végétale, INRA/Univ. Paris XI/CNRS/INA PG, Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France and ³Botany Department, University of Stellenbosch, Private Bag XI, Matieland 7602, South Africa

Received: 23 June 2004 Returned for revision: 12 August 2004 Accepted: 26 September 2004 Published electronically: 26 November 2004

• **Background and Aims** Early developmental events in microsporogenesis are known to play a role in pollen morphology: variation in cytokinesis type, cell wall formation, tetrad shape and aperture polarity are responsible for pollen aperture patterning. Despite the existence of other morphologies, monosulcate pollen is one of the most common aperture types in monocots, and is also considered as the ancestral condition in this group. It is known to occur from either a successive or a simultaneous cytokinesis. In the present study, the developmental sequence of microsporogenesis is investigated in several species of Asparagales that produce such monosulcate pollen, representing most families of this important monocot clade.

• **Methods** The developmental pathway of microsporogenesis was investigated using light transmission and epifluorescence microscopy for all species studied. Confocal microscopy was used to confirm centripetal cell plate formation.

• **Key Results** Microsporogenesis is diverse in Asparagales, and most variation is generally found between families. It is confirmed that the whole higher Asparagales clade has a very conserved microsporogenesis, with a successive cytokinesis and centrifugal cell plate formation. Centripetal cell wall formation is described in Tecophilaeaceae and Iridaceae, a feature that had so far only been reported for eudicots.

• **Conclusions** Monosulcate pollen can be obtained from several developmental pathways, leading thus to homoplasy in the monosulcate character state. Monosulcate pollen should not therefore be considered as the ancestral state unless it is produced through the ancestral developmental pathway. The question about the ancestral developmental pathway leading to monosulcy remains open.

© 2004 Annals of Botany Company

Key words: Aperture pattern, Asparagales, cell wall formation, development, microsporogenesis, monosulcate pollen.

INTRODUCTION

The pollen grain is the male gametophytic phase of flowering plants. Its morphology is highly diversified, from the texture and structure of its wall to its ornamentation and general shape. Apertures, the areas where the external layer (exine) is thinner than over the rest of the grain, represent one of the most variable features of pollen grains (Erdtman, 1947). Apertures play a crucial role during pollen germination, since they are the areas through which the pollen tube emerges. Other aperture functions have been described in the literature. These include harmomegathy, which accommodates pollen volume variation during pollen dehydration prior to anther dehiscence and rehydration on the floral stigma (Wodehouse, 1935; Heslop-Harrison, 1976). Pollen water content status at dispersal is a phenomenon known to influence survival, longevity and germination ability, and to vary among angiosperms (Franchi *et al.*, 2002).

Apertures vary in shape, number and location. Shapes are usually furrows or pores, but other morphologies are also found, such as a zonalsulcus (Walker and Doyle, 1975), a ring-like aperture extended around the pollen grain, or a trichotomosulcus (Erdtman, 1952) with three branches that are joined to form a Y-like structure. The number of apertures usually ranges from one to several. When there is only one polar furrow, the pollen is called monosulcate

(Erdtman, 1952). When three apertures are present, the pollen is named trisulcate (or tricolpate, a characteristic of the eudicots clade), trisulcate or triporate (Punt *et al.*, 1994). Occasionally, pollen grains with more apertures are found. Sometimes no aperture is present, as in inaperturate pollen (Iversen and Troels-Smith, 1950), a condition that is not infrequent in the monocots (Furness and Rudall, 2000b).

The variation in aperture pattern is not randomly distributed in angiosperms, but reflects the phylogeny of this group to some extent. Thus, eudicots are known as the tricolpate clade, because this pollen morphology is synapomorphic for this group (Chaloner, 1970; Crane *et al.*, 1995); monocots generally have monosulcate or monoporate pollen grains, although there are numerous exceptions (Furness and Rudall, 1999, 2000a); basal angiosperms also frequently have monosulcate pollen (Kuprianova, 1966; Walker, 1974; Zavada, 1983; Sampson, 2000; also see Furness and Rudall, 2004 for a review of aperture type distribution in angiosperms). Monosulcate pollen is considered to be plesiomorphic in monocots and basal angiosperms (Furness and Rudall, 1999; Sampson, 2000). This is in agreement with the fact that the oldest known unambiguous fossilized angiosperm pollen is monosulcate (Doyle, 1969; Walker and Doyle, 1975).

Although observation of mature pollen is very well documented, the ontogeny of aperture pattern is still poorly understood at present. Aperture pattern is determined during

* For correspondence. E-mail Laurent.Penet@ese.u-psud.fr

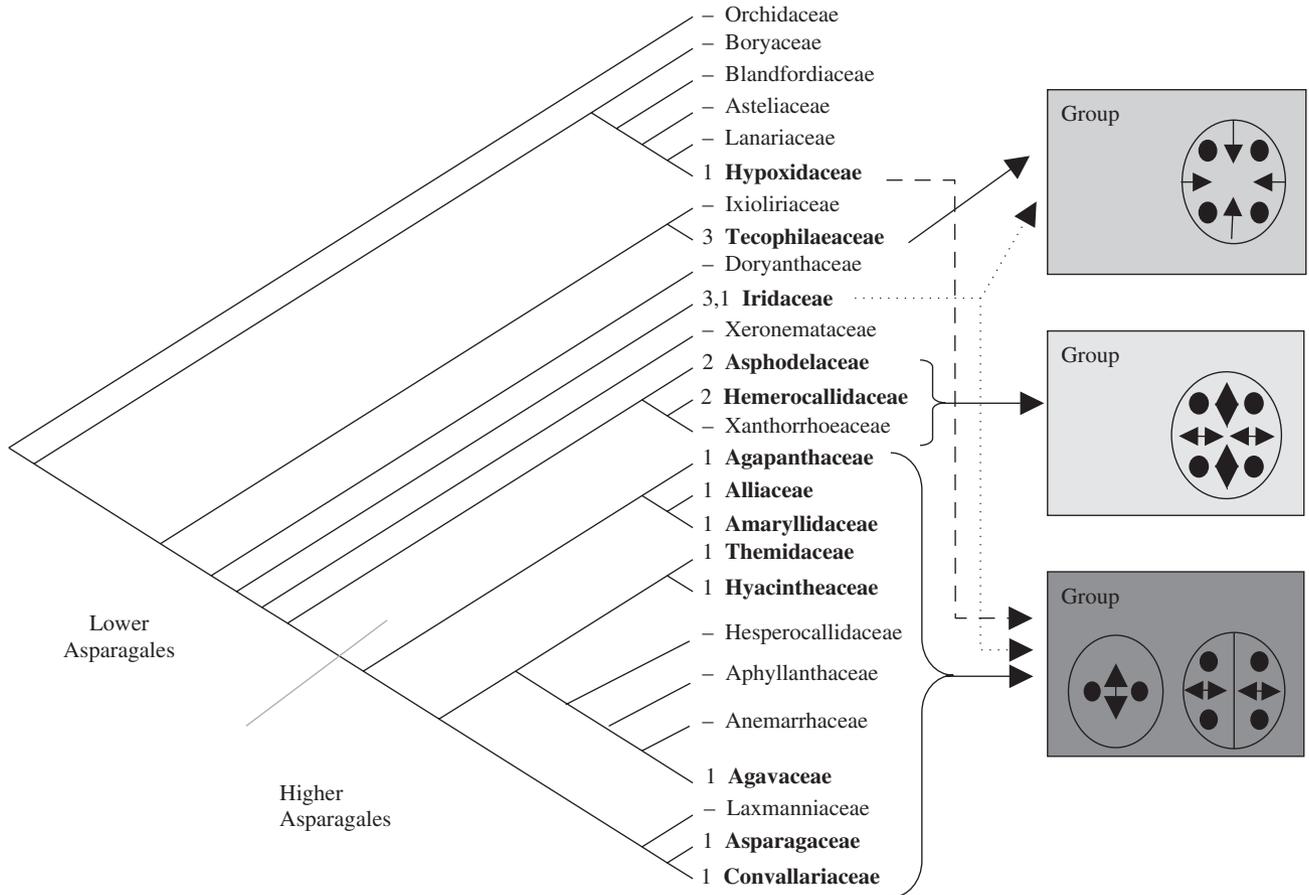


FIG. 2. A phylogenetic reconstruction of the affinities between families in the Asparagales (APG, 2003). Families of which representative species were included in the present study are indicated in bold. They were assigned to the different groups according the way cytoplasm is partitioned: group 1, successive division/centrifugal cell plates; group 2, simultaneous division/centripetal infurrowings; and group 3, simultaneous division/centrifugal cell plates. The groups encountered in a family (1, 2 or 3) are indicated at the tips of the phylogeny. A minus (–) indicates that the family was not investigated in this study.

The successive/simultaneous cytokinesis dichotomy has been useful to distinguish Anthericaceae (now placed within Agavaceae, APG II, 2003), displaying successive cytokinesis, and Asphodelaceae, which have simultaneous cytokinesis (Dahlgren *et al.*, 1985; Stedje and Nordal, 1994; Kativu, 1996). Monosulcate pollen is found as the usual condition in most families in the lower asparagoids, from Hypoxidaceae (Rudall *et al.*, 1997) to the better documented Asphodelaceae (Diaz Lifante, 1996; Xiong *et al.*, 1998; Kosenko and Sventorzetskaya, 1999), but also in Iridaceae (Goldblatt *et al.*, 1991; Goldblatt and Le Thomas, 1992, 1993; Pinar and Dönmez, 2000). The higher Asparagales also mainly have monosulcate pollen (Rudall *et al.*, 1997).

We made a deliberate choice to focus in this paper on species producing monosulcate pollen, in which we investigated variation during microsporogenesis in order to address the following key questions: what are the possible ontogenic trajectories leading to monosulcate pollen (in other words, how do Asparagales acquire the monosulcate pollen type)? Does microsporogenesis display more variation than just cytokinesis? What are the consequences of the developmental diversity on the presumed monosulcate ancestry of monocot pollen?

MATERIAL AND METHODS

Microsporogenesis was investigated using material collected from plants grown in botanical gardens, plants collected on the campus of the University Paris-Sud (Orsay, France) or plants collected on the campus of the University Joseph Fourier (Grenoble, France) (Table 1).

Microsporocytes were extracted from one anther and immediately squashed in aceto-carmin to determine the stage of microsporogenesis. Depending on the stage observed, different subsequent staining techniques were used. Aceto-carmin (67.5 mL acetic acid, 0.75 g carmin, 0.025 g ferrous acetate, made up to 150 mL with distilled water) was used to investigate cytokinesis. A syncytium stage with four meiotic nuclei resulted in the species being assigned to the simultaneous type. If the second meiotic nuclear division occurred after the first cytokinesis event had taken place, and if a dyad stage was identified, the species was assigned to the successive type. Anilin blue (modified from Arens, 1949, with the addition of glycerol to 15 % of the final volume) was used to visualize callose wall formation and to determine the shape of the tetrad. In some cases, it was even possible to discern apertures within

TABLE 1. A summary of the families, species, voucher specimens and origin of the material studied

Family	Species	Voucher	Origin
Lower Asparagales			
Hypoxidaceae	<i>Hypoxidia maheensis</i> Friedmann	810110	CBNB, Brest (France)
Tecophileaceae	<i>Cyanella alba</i> Herb.	510/67	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Cyanella orchidiformis</i> Jacq.	9809wf2	BulbArgence (France)
Iridaceae	<i>Babiana angustifolia</i> Sweet	Cultivated (no voucher)	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Babiana disticha</i> Ker Gawl.	655/74	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Chasmanthe floribunda</i> (Salisb.)N.E.Br.	856/83	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Ferraria crispa</i> Burm.	9810AC12	BulbArgence (France)
	<i>Freesia alba</i> (Baker)Gumbl.	Cultivated (no voucher)	Stellenbosch (RSA)
	<i>Iris pseudoacorus</i> L.	Wild	UPS (France)
	<i>Ixia lutea lutea</i> Baker	177/78	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Libertia chilensis</i> Klotzsch	980085	CBNB, Brest (France)
	<i>Libertia formosa</i> Graham	AUT-2001-JAR-032	Serres d'Auteuil (France)
	<i>Moraea bipartita</i> L.	1002/71	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Moraea aristata</i> (Houtt.)Asch. & Graebn.	1252/82	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Tritonia securigera</i> Ker Gawl.	9810AC66	BulbArgence (France)
	<i>Watsonia aletroides</i> Ker Gawl.	(No voucher)	BulbArgence (France)
Hemerocallidaceae	<i>Hemerocallis fulva</i> L.	Cultivated (no voucher)	Grenoble University (Fr.)
Asphodelaceae	<i>Aloe globulifera</i> Graessn.	Chèvreloop	Chèvreloop (France)
	<i>Asphodeline liburnica</i> Reichb.	AUT-1999-JAR-043	Serres d'Auteuil (France)
	<i>Trachyandra muricata</i> Kunth	Wild (no voucher)	Langebaan (RSA)
	<i>Trachyandra</i> sp.	Wild (no voucher)	Langebaan (RSA)
	<i>Bulbine alooides</i> Willd.	431/35	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Bulbinella nutans nutans</i> Th.Dur.et Schinz	1309/84	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Kniphofia praecox</i> Baker	172/76	Kirstenbosch (RSA)
Higher Asparagales			
Alliaceae	<i>Allium altaicum</i> Pall.	Al 233	ESE (France)
	<i>Allium ursinum</i> L.	Wild (no voucher)	UPS (France)
Amaryllidaceae	<i>Narcissus poeticus</i> L.	PPF-2000-NAT-014	Serres d'Auteuil (France)
	<i>Agapanthus umbellatus</i> L'Hér.	Cultivated (no voucher)	Stellenbosch (RSA)
Themidaceae	<i>Triteleia ixioides ssp scabra</i> Greene	9510HD1	BulbArgence (France)
Hyacinthaceae	<i>Albuca nelsonii</i> N.E.Br.	9809 kb	BulbArgence (France)
	<i>Eucomis autumnalis</i> (Mill.) Chittenden	671/83	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Hyacinthus non-scriptus</i> L.	Wild (no voucher)	UPS (France)
	<i>Ornithogalum longibracteatum</i> Jacq.	528/93	Kirstenbosch (RSA)
	<i>Veltheimia bracteata</i> Harv. Ex Baker	Cultivated (no voucher)	Kirstenbosch (RSA)
Agavaceae	<i>Yucca agavoides</i> Horl. Ex Carr.	Cultivated (no voucher)	UPS (France)
	<i>Arthropodium cirrhatum</i> G.Benn.	Kew	RBG Kew (England)
	<i>Chlorophytum pauciflorum</i> Dammer	Wild (no voucher)	West Coast (RSA)
	<i>Hosta</i> sp.	Cultivated (no voucher)	UPS (France)
Convallariaceae	<i>Polygonatum multiflorum</i> Kunth	Wild (no voucher)	UPS (France)
	<i>Convallaria majalis</i> L.	EDB-2000-VIV-0135	UPS (France)

the tetrads. Congo red (Stainier *et al.*, 1967) was used to stain pollen grains or microspores just before their release from the tetrad, in order to determine the aperture type, shape and position. Aceto-carmin and congo red preparations were observed under transmission light with a Zeiss Axiophot microscope. Anilin blue preparations were observed using epifluorescence microscopy (epifluorescence Zeiss Axiophot microscope used with filter set 01; excitation 345, emission 425 nm long pass) or confocal microscopy.

Whenever possible, the developmental sequence during microsporogenesis, as presented in the results, was established on the basis of data obtained from a single individual, although several individuals were usually investigated. For species in which each plant produces only a few flowers per year, such as in some Iridaceae, it was not possible to infer the complete developmental sequence from only one individual.

RESULTS

The observations reveal that monosulcate pollen (see, for example, the monosulcate pollen of *Veltheimia bracteata* Harv., Fig. 3L) can be obtained through seven different developmental pathways. We divided these different pathways in three main groups, according to their similarity in microsporogenesis. We have chosen to illustrate the developmental pathway typical of each group by presenting the developmental sequence of one or a few species. Group 1, named 'higher Asparagales' is illustrated by *Allium altaicum*. Group 2, 'Asphodelaceae' (and sister groups), is illustrated by *Bulbinella nutans*, *Trachyandra muricata* and *Hemerocallis fulva*. Group 3, 'centripetal group' is illustrated by *Cyanella orchidiformis*, *Iris pseudoacorus* and *Tritonia securigera*. Table 2 lists the data obtained for the species of Asparagales investigated in this study, according to their developmental pathways.

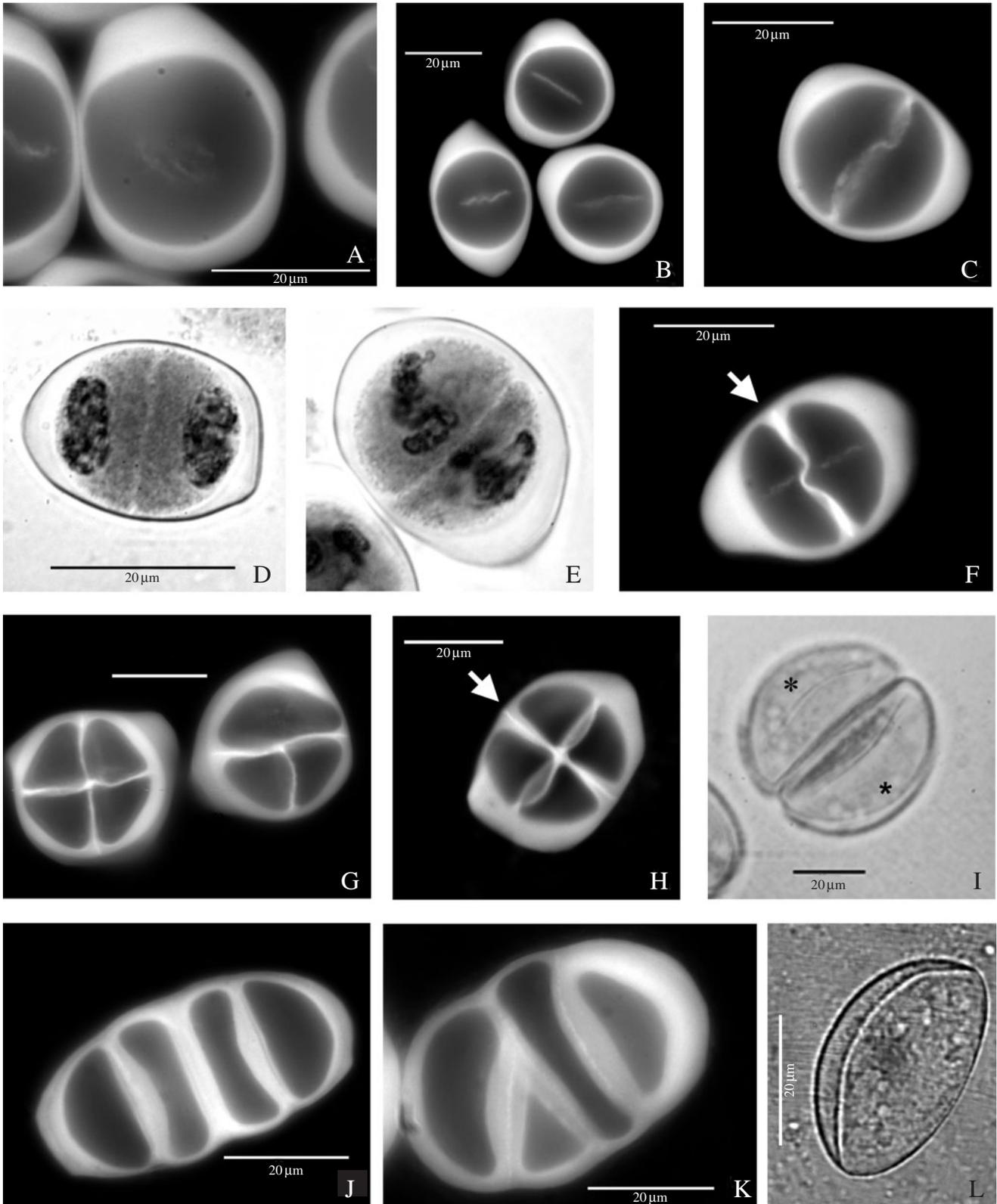


FIG. 3. Group 1, 'Higher Asparagales'. Figs 3A to 3L: Microsporogenesis in *Allium altaicum*. (A, B) Centrifugal cell plate of the first cytoplasmic division. (C, D) Dyad stage. (E) Metaphase of second meiotic division. (F) Centrifugal cell plates of the second cytoplasmic division. (G) Tetragonal and decussate tetrads. (H) Later tetragonal tetrad with extra callose deposits (indicated by an arrow). (I) Mature tetrad with (polar) apertures visible (indicated by asterisk). (J, K) Alternative tetrad shapes in *Albuca nelsonii*. (J) Linear tetrad and (K) irregular T-shaped tetrad. (L) Monosulcate pollen (*Veltheimia bracteata*). (A–C, F–H, J, K) Anilin blue staining; (D, E) aceto-carmine staining; (I, L) congo red staining. Scale bars = 20 μm.

TABLE 2. Summary of the different types of pollen development recorded in this study. Each developmental type is represented by one species (left column), while other species with similar developmental pathways are listed in the last column to the right

Species	Cytokinesis	Cell wall formation	Tetrad shape	Particular features	Species with similar development type
<i>Allium altaicum</i>	Successive	Centrifugal	Tetragonal/decussate	Occasionally with additional tetrad morphologies: linear, T-shaped or other successive-derived tetrads	<i>A. ursinum</i> <i>Agapanthus umbellatus</i> <i>Albuca nelsonii</i> <i>Arthropodium cirrhatum</i> <i>Chlorophytum pauciflorum</i> <i>Eucomis autumnalis</i> <i>Hyacinthus non-scriptus</i> <i>Hypoxidia maheensis</i> <i>Hosta</i> sp. <i>Moraea aristata</i> <i>Moraea bipartita</i> <i>Narcissus poeticus</i> <i>Ornithogalum longibracteatum</i> <i>Polygonatum multiflorum</i> <i>Convallaria majalis</i> <i>Triteleia ixioides</i> ssp <i>scabra</i> <i>Veltheimia bracteata</i> <i>Yucca agavoides</i> <i>Aloe globulifera</i> <i>Asphodeline liburnica</i> <i>Bulbine alooids</i> <i>Kniphofia praecox</i> <i>Trachyandra</i> sp.
<i>Bulbinella nutans</i>	Simultaneous	Centrifugal	Tetrahedral (irregular)	—	—
<i>Trachyandra muricata</i>	Simultaneous	Centrifugal	Mostly tetragonal or decussate, rarely tetrahedral	—	—
<i>Hemerocallis fulva</i>	Intermediate between successive and simultaneous	Centrifugal	Tetragonal, decussate or Tetrahedral (irregular)	Curved cell plates	—
<i>Cyanella orchidiformis</i>	Simultaneous	Centripetal	Mostly tetrahedral (irregular)	—	<i>Cyanella alba</i> <i>Ferraria crispa</i> <i>Freesia alba</i> <i>Libertia chilensis</i> <i>Libertia formosa</i> <i>Babiana angustifolia</i>
<i>Iris pseudacorus</i>	Simultaneous	Centripetal	Tetragonal, decussate or tetrahedral (irregular)	Callose ring	<i>Babiana disticha</i> <i>Chasmanthe floribunda</i> <i>Ixia lutea lutea</i> <i>Watsonia aleitroides</i>
<i>Tritonia securigera</i>	Intermediate between successive and simultaneous	Centripetal	Tetragonal, decussate or tetrahedral (irregular)	Callose ring	—

Group 1: Allium altaicum, a microsporogenesis pathway typical of higher Asparagales

In *Allium altaicum*, cytokinesis is of the successive type (Fig. 3A–F), as is shown by the characteristic dyad stage (Fig. 3C–E). Cell plates grow centrifugally during both the first cytoplasmic partition event (Fig. 3A, 3B) and the second partition (Fig. 3F). Secondary callose deposits are observed in this species (Fig. 3F, 3H), and are abundant on the first cell plate. We use the term ‘extra callose deposits’ for the deposits that are formed after cytokinesis is completed. Although their biochemical nature may differ from the cell plates (Longly and Waterkeyn, 1979a, b), this has not been investigated. Tetrads are tetragonal or decussate in equal proportions (Fig. 3G). Apertures are located at the distal pole of microspores within the tetrads (Fig. 3I, indicated by an asterisk).

All investigated species from the higher Asparagales clade display the same developmental sequence: successive cytokinesis with centrifugal cell plate formation and polar apertures. Some species from the Lower Asparagales, such as *Hypoxidia maheensis* (Hypoxidaceae), *Babiana angustifolia* and *B. disticha* (Iridaceae), present the same developmental pathway. In several species, linear or T-shaped (or derived) tetrads (Fig. 3J and 3K, respectively, in *Albuca nelsonii*) are observed in addition to the tetragonal and decussate tetrads. It was not possible to see apertures within these tetrads so we do not know if they result in monosulcate pollen, but only monosulcate pollen grains are observed at maturity. Variable amounts of extra callose are laid onto cell plates in mature tetrads in higher Asparagales, either on the first cleavage wall (Fig. 3F, 3H), or on all the cleavage walls (Fig. 3J, 3K).

Group 2: Bulbinella nutans, a microsporogenesis typical of Asphodelaceae

This species displays a simultaneous cytokinesis (Fig. 4E). Cytoplasmic partitioning is achieved by the formation of centrifugal cell plates (Fig. 4A–D). The resulting tetrads are irregular tetrahedral (Fig. 4F). Secondary callose deposits are recorded (Fig. 4G, H). Apertures are located distally within tetrads (Fig. 4H).

Most species studied from the Asphodelaceae have the same type of microsporogenesis: simultaneous cytokinesis, centrifugally growing cell plates, irregular tetrahedral tetrads, and polar apertures. This type was also observed in *Hemerocallis*, the only genus of Hemerocallidaceae that produces monosulcate pollen. Minor variation in the microsporogenesis developmental sequence were detected in the following species.

Trachyandra muricata (Asphodelaceae). This species has the same developmental sequence as the other Asphodelaceae, but the tetrads formed are mostly tetragonal instead of irregular tetrahedral. Meiotic nuclei are squarely arranged at the end of meiosis (Fig. 4I), and our observations reveal that only four cleavage planes are formed during cytokinesis (Fig. 4J–L) instead of six as in the other species investigated (Fig. 4C).

Hemerocallis fulva (Hemerocallidaceae): *a special case of cytokinesis*. This species displays centrifugal cell plates

that grow simultaneously, although one cell plate starts growing before the others and is generally larger than the others (Fig. 4M–O). This makes cytokinesis appear like a quasi-successive partitioning, but a true dyad stage is never observed. Cytokinesis in *Hemerocallis fulva* is therefore intermediate between successive and simultaneous partitioning. Tetrads are either tetragonal (Fig. 4Q) or irregular tetrahedral. Cell plates curve and fold back in some cells (Fig. 4P), so that the resulting tetrad can assume different shapes (Fig. 4R), and appear to be slightly irregular tetrahedral. Aperture location is clearly visible in the late tetrad stage with aniline blue staining (Fig. 4R, indicated by an asterisk) as it is marked as a footprint in the callose wall (Fig. 4Q, indicated by an asterisk). Apertures are also polar. Extra callose deposits are present but less conspicuous than in Asphodelaceae. The microsporogenesis in this species differs from the situation found in all other Hemerocallidaceae, which have regular tetrahedral tetrads and produce trichotomosulcate pollen (Rudall *et al.*, 1997).

Group 3: ‘Centripetal group’, Cyanella orchidiformis (Tecophilaeaceae)

Cyanella orchidiformis displays a simultaneous cytokinesis that proceeds centripetally (Fig. 5A–C), apertures are located at the distal pole (Fig. 5G, H). This species exhibits a large variety of tetrad shapes, ranging from quasi-tetragonal (Fig. 5D) to irregular tetrahedral (Fig. 5E) or rhomboidal (Fig. 5F), and the pollen grains are always monosulcate (Fig. 5G, H, apertures indicated by an asterisk). Extra callose is deposited on the cell plates (Fig. 5D–F). A similar developmental pathway was observed in several species of the Iridaceae (*Freesia alba*, *Libertia chilensis*, *Libertia formosa* and *Ferraria crispa*). Minor variation from this pathway was recorded in several species of this family.

The callose ring in Iris pseudoacorus (Iridaceae). *Iris pseudoacorus* is peculiar in possessing a callose ring extending around the pollen mother cell, which is visible during meiosis (Fig. 5I, J, but see also Fig. 5M in *Tritonia*). This callose ring is a continuous callose deposit running around the pollen mother cell, which forms during meiosis between the two nuclear divisions. Such a structure is already known to occur, for example in *Magnolia* (Huynh, 1976). Although this callose ring could be misleading and make cytokinesis appear to be successive (Fig. 5I), the cytoplasmic partitioning does not take place before meiosis is completed (Fig. 5J). Cytokinesis is therefore simultaneous, and cytoplasmic partitioning is achieved through centripetally growing infurrows (Fig. 5K). Most tetrads are tetragonal or decussate, occasionally irregular tetrahedral. Apertures are polar (Fig. 5L, indicated by an asterisk).

A similar developmental sequence was observed in several species of Iridaceae, including *Ixia lutea* Baker var. *lutea*, *Babiana angustifolia*, *Babiana disticha*, *Chasmanthe floribunda* and *Watsonia aletroides*. The striking feature of this development type is the presence of this callose ring in all of these species.

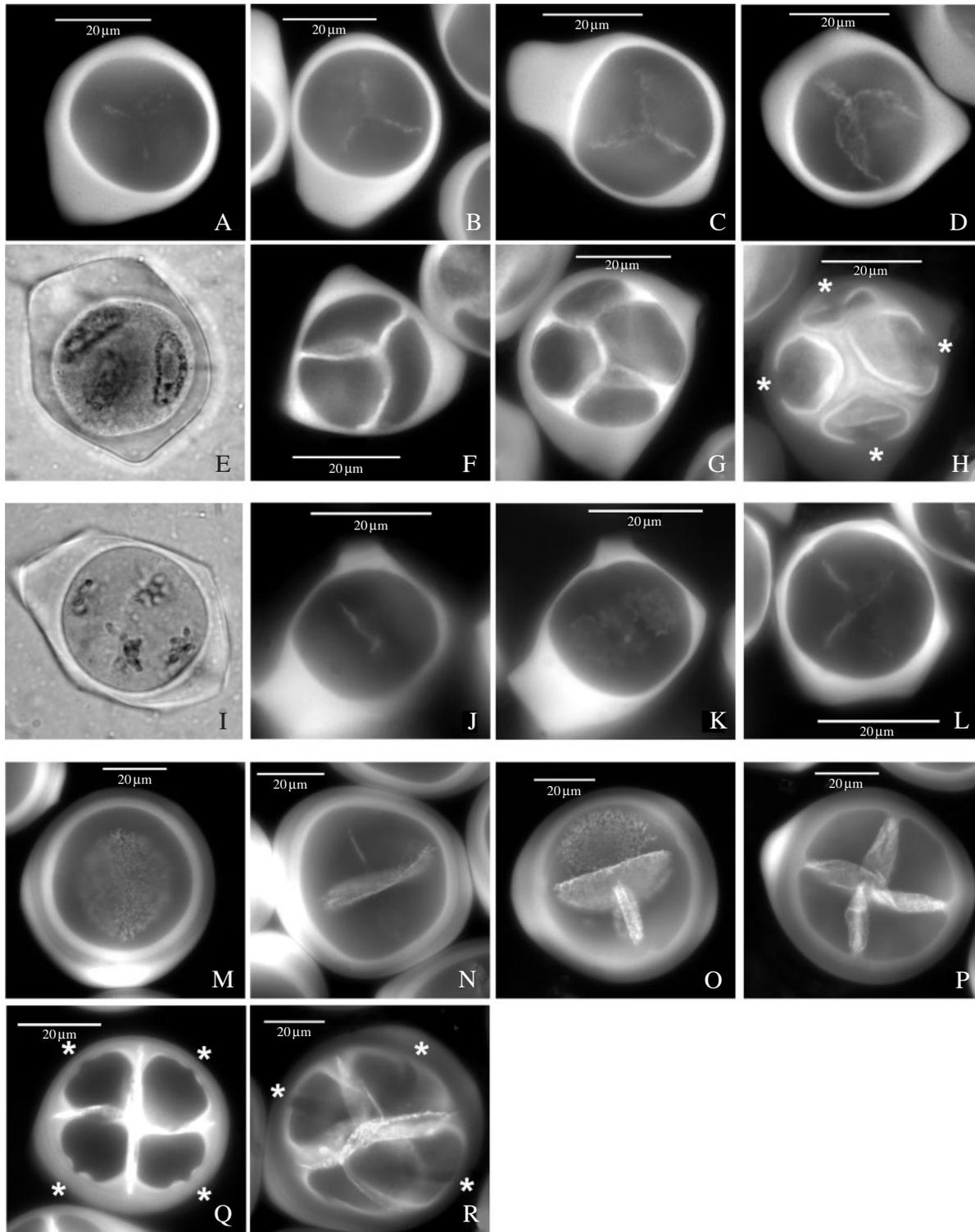


FIG. 4. Group 2, 'Asphodelaceae' (and sister groups). (A–H) Microsporogenesis in *Bulbinella nutans*. (A–D) Cell plates expanding centrifugally and simultaneously. (E) Syncytium stage with four meiotic nuclei. (F) Irregular tetrahedral tetrad, with two large and one small walls. (G, H) The same tetrad illuminated with only a DAPI filter and with a IRTC filter respectively; note extra callose deposits and polar aperture location (indicated by asterisk). (I–L) Microsporogenesis in *Trachyandra muricata*. (I) Telophase of second meiotic division, with nuclei on the same plane. (J, K) Simultaneous centrifugally expanding cell plates (different height within one tetrad). (L) Another example of simultaneous centrifugally expanding cell plates. (M–R) Microsporogenesis in *Hemerocallis fulva*. (M) First centrifugal cell plate. (N, O) Centrifugal growth of secondary cell plates, showing that the first cell plate still does not close the pollen mother cell (no dyad formed) at this stage. (P) Tetragonal tetrad, with slightly curved cell plates. (Q) Mature tetragonal tetrad, with extra callose deposits and polar apertures visible (indicated by asterisk). (R) Mature irregular tetrahedral tetrad with polar apertures visible (indicated by asterisk). (A–D, F–H, J–R) Anilin blue staining; (E, I) aceto-carmin staining. Scale bars = 20 μm .

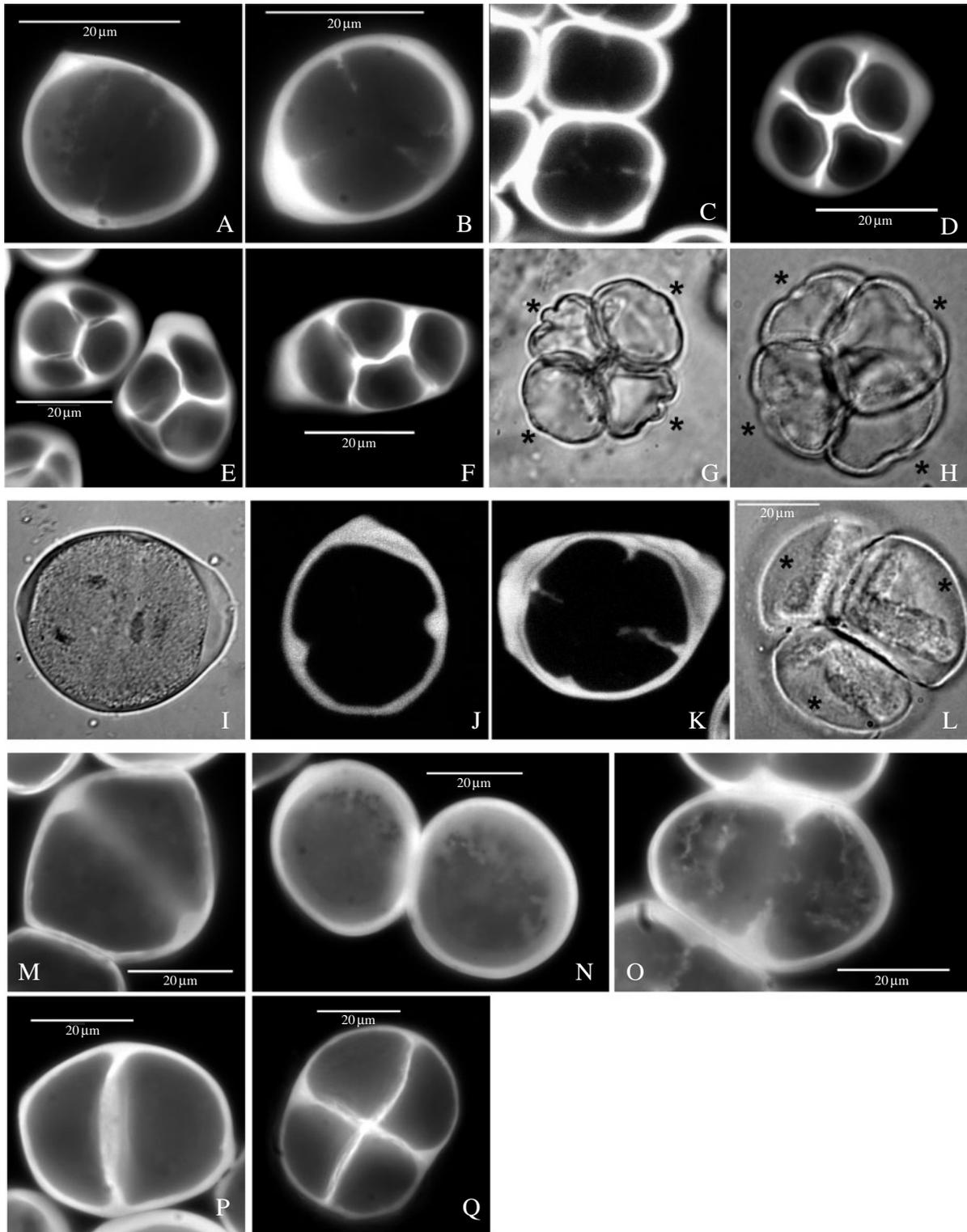


FIG. 5. Group 3, 'Centripetal group'. (A–H) Microsporogenesis in *Cyanelia orchidiformis*. (A, B) Beginning of cytoplasmic division with centripetal infurrowings. (C) Confocal microscopy; centripetal partition observed at the median section of the cell. (D–F) Tetrad shapes: quasi-tetragonal (D), tetrahedral (E) and rhomboidal (F). (G, H) Polar apertures, in rhomboidal (G) or irregular tetrahedral tetrads (H). (I–L) Microsporogenesis in *Iris pseudoacorus*. (I) Telophase of second meiotic division, with a callose ring. (J) Confocal microscopy; callose ring observed at the median section of the cell. (K) Confocal microscopy; centripetal cell partitioning, observed at the median section of the cell. (L) Polar apertures in an irregular tetrahedral tetrad (indicated by asterisk). (M–Q) Microsporogenesis in *Tritonia securigera*. (M) Callose ring stage. (N) Centripetal infurrowing growth from the callose ring. (O) Simultaneous centripetal infurrowing. (P) A cell in a true dyad stage. (Q) Tetragonal tetrad. (A–F, J, K, M–Q) Anilin blue staining; (I) aceto-carmin staining; (G, H, L) congo red staining. Scale bars = 20 μ m.

Simultaneous and successive cytokinesis both occurring in Tritonia securigera (Iridaceae). A developmental sequence similar to *Iris pseudoacorus* was observed in *Tritonia securigera*: formation of a callose ring during meiosis (Fig. 5M), cytokinesis by centripetal division (Fig. 5N, O) with mostly tetragonal tetrads (Fig. 5Q) and polar apertures. However, the cytoplasmic partitioning starts very soon after the callose ring is elaborated (Fig. 5N), leading to a dyad stage in some cells (Fig. 5P), while other cells are partitioned simultaneously (Fig. 5O). Cytokinesis is therefore intermediate between successive and simultaneous, depending on the mother cell.

DISCUSSION

Our study shows that microsporogenesis in the Asparagales is actually more diverse than has been previously thought. Variation in Asparagales does not only concern the type of cytokinesis, but also the way in which the cytoplasm is partitioned. While certain of these developmental pathways develop into different aperture types (data not shown), we focused on microsporogenesis pathways leading to the production of monosulcate pollen. Seven different developmental pathways were identified, all of which eventually result in the formation of this aperture type. Some pathways are very similar (in *Iris* and *Tritonia*, microsporogenesis is related to the group 3 ‘centripetal group’, and in *Trachyandra* and *Hemerocallis*, it is related to the group 2 ‘Asphodelaceae group’). The combination of cytokinesis (successive or simultaneous) and cytoplasmic partitioning (centripetally or centrifugally) determines four different pathways. These four combinations also vary with regard to the tetrad shape. The tetrad shape is linked to the type of cytokinesis: successive cytokinesis usually leads to tetragonal or decussate tetrads, while simultaneous cytokinesis usually leads to tetrahedral tetrads. The three most frequent combinations are (group 1) successive division/centrifugal cell plates, (group 2) simultaneous division/centripetal infurrowings and (group 3) simultaneous division/centrifugal cell plates, respectively found in 18, 13 and eight of the 40 species investigated. These three combinations correspond to the most widespread view about microsporogenesis in angiosperms (Fig. 1), as presented in the Introduction, but development actually varies far beyond these limits, with additional developmental features (such as intermediate types of cytokinesis or the presence of a callose ring during meiosis). Moreover, the Iridaceae and Tecophilaeaceae are characterized by the combination of simultaneous cytokinesis and centripetal cell plates, a combination of features which, to our knowledge, has never been described in monocots before. This combination is, however, known to characterize eudicot microsporogenesis.

Variation in microsporogenesis will be discussed with respect to each different step: cytokinesis type, cell wall formation, and tetrad shape, before summarizing our results about the observed patterns in microsporogenesis in Asparagales.

Cytokinesis type

The evolution of cytokinesis in Asparagales has been studied by Rudall *et al.* (1997). Our results, which are

based on the study of different species, confirm that the higher Asparagales clade, represented here by eight families (Alliaceae, Amaryllidaceae, Agapanthaceae, Themidaceae, Hyacinthaceae, Agavaceae, Asparagaceae and Convallariaceae, see also Fig. 2) is characterized by successive cytokinesis. Both types of cytokinesis occur in lower Asparagoids, although the simultaneous condition is more frequent. As successive cytokinesis in lower Asparagoids is found in several species from different families, for example in Asteliaceae (Rudall *et al.*, 1997), in Iridaceae and in Hypoxidaceae (Rudall *et al.*, 1997; our results), it has been argued that switches in cytokinesis are frequent in this group, and that this character is labile. Simultaneous cytokinesis has evolved independently several times in monocots, and may increase the efficiency of pollen production (Furness and Rudall, 2000a). The lack of simultaneous cytokinesis in the large ‘higher’ Asparagales clade may then indicate that the ability to switch back from successive to simultaneous has been lost or that this developmental switch is deleterious in this group.

Theoretically, transitions in cytokinesis should not imply dramatic mutations as no functional change is needed, but simply a delay in cytoplasmic partition during meiosis. Thus such a transition can potentially arise rapidly. Two cases from our data (namely *Hemerocallis* and *Tritonia*) nevertheless suggest that transitions from simultaneous to successive cytokinesis can happen progressively. The developmental pathway observed in *Hemerocallis fulva* could represent a transition between simultaneous and successive cytokinesis. Generally, during cytokinesis, cleavage planes are located equidistantly between the nuclei; the cell walls are formed at the intersection between microtubules radiating from each meiotic nucleus. In simultaneous cytokinesis, the number of cleavage planes ranges from four to six (Ressayre *et al.*, 2002a). Four cleavage planes are formed in a tetragonal (or decussate) tetrad as observed in *Trachyandra muricata* (Fig. 4I–L), five cleavage planes are formed in a rhomboidal tetrad (Fig. 5F), and six in a tetrahedral tetrad (Fig. 4C for the cleavage planes, 4F and G for the tetrahedral tetrads). Normal successive cytokinesis involves three cleavage planes: the first one is between the nuclei resulting from the first meiotic division, leading to the dyad stage, and the other two are between the nuclei resulting from second meiotic division. The resulting tetrad is generally tetragonal (other possible tetrad shapes are illustrated in Fig. 1). Only three cell plates are observed in *Hemerocallis fulva* (Fig. 4O) as in the case of a successive cytokinesis, despite the fact that it is a simultaneous species. The formation of one of the cell plates is initiated before the others, but a true dyad stage is never observed. On the other hand, *Tritonia securigera* displays a transition from simultaneous toward successive cytokinesis with centripetal cytoplasmic partitioning. As illustrated, some pollen mother cells go through a true dyad stage (Fig. 5P), which is characteristic of successive cytokinesis, while others are partitioned simultaneously (Fig. 5O). The timing of cell partitioning in this species is variable, and therefore seems to be transitional if we consider the population of cells. Evolution from simultaneous towards successive cytokinesis could then possibly involve transitory

stages in which cytoplasmic partitioning is initiated before the second meiotic division, until a true dyad stage is retained. This may also be a way to canalize tetrad shape with simultaneous cytokinesis and therefore stabilize pollen into monosulcate morphology, as tetragonal tetrads always lead to monoapertury when apertures are polar.

Cell wall formation

The occurrence of centripetal cell partitioning in monocots is recorded here for the first time. This type of partitioning was observed in two families from the lower asparagoids, namely Tecophilaeaceae (Fig. 5B, C) and Iridaceae (Fig. 5K, N, O). In both families it constitutes the main way in which pollen mother cells divide. Centripetal cytoplasmic partitioning is known to occur in basal angiosperms, for example among the magnoliids (Brown and Lemmon, 1992), and is known to be general in eudicots (Furness and Rudall, 2004). To date, only centrifugal cell plates had been recorded in monocots.

Another striking result associated with centripetal infurrowings during cell partitioning is the presence of a callose ring in several Iridaceae species that display simultaneous cytokinesis. Although the exact role of this callose ring in meiosis is still unclear, we noted that the shape of the tetrads seemed to be constrained to tetragonal when this ring is present. In most cases, the partitioning process starts on the callose ring, making the resulting tetrad look like a tetrad obtained through successive cytokinesis, i.e. tetragonal or decussate.

The mode of cytoplasmic partitioning also allows us to distinguish between lower asparagoids and higher Asparagales. In this study, only centrifugal cell plates were recorded in higher Asparagales, while in lower asparagoids both centrifugal and centripetal cell wall formation were observed. In this latter group, centrifugal cell plates are usually observed when cytokinesis is successive, such as in *Hypoxidia maheensis* (Hypoxidaceae) or *Moraea aristata* and *M. bipartita* (Iridaceae). Thus successive cytokinesis appears to be strongly correlated with centrifugal cell plates. Dyads are occasionally observed in *Tritonia securigera* (Iridaceae, Fig. 5P), which has cell walls that grow centripetally, but most cells in this species are partitioned simultaneously after the completion of nuclear divisions. Successive cytokinesis could then constrain species to adopt centrifugal cytoplasmic partitioning, since the pattern displayed by *Tritonia* seems to be rare, at least within Asparagales. In contrast, simultaneous cytokinesis is associated with either centripetal or centrifugal cell wall formation within this order. Centrifugal cell plate formation coupled with simultaneous cytokinesis is reported here for the Asphodelaceae and Hemerocallidaceae. This is particularly interesting since these families, together with Xanthorrhoeaceae, form a clade (Xanthorrhoeaceae *sensu lato*; APG II, 2003) which is sister to the higher Asparagales (Fig. 2). In the higher Asparagales, cell plate growth is also always centrifugal but it only occurs through successive cytokinesis. Asphodelaceae, Hemerocallidaceae and Xanthorrhoeaceae could thus represent an intermediate

step in the fixation of the developmental pathway characteristic of higher Asparagales.

Tetrad shape

A variety of tetrad shapes were observed in this study. The tetrad shape is sometimes used to infer the cytokinesis type of a species. In most cases, the shape of a tetrad is indeed correlated with the type of cytokinesis. For example, tetrahedral tetrads can never be obtained through successive cytokinesis, since the occurrence of a dyad stage constrains the shape of the resulting tetrads. In this study, species with successive cytokinesis mostly produced tetragonal or decussate tetrads, although linear or T-shaped tetrads were also recorded (Fig. 3J, K). The transitory syncytium stage in simultaneous cytokinesis theoretically allows nuclei to adopt any spatial arrangement, but a tetrahedral configuration is the most common and characteristic. However, the four meiotic nuclei can adopt any other configuration, thereby giving rise to different tetrad shapes. Linear tetrads resulting from simultaneous cytokinesis were observed in a moss (Shimamura *et al.*, 1998), and we observed tetragonal tetrads resulting from simultaneous cytokinesis in *Trachyandra muricata*. Linear and tetragonal tetrads are generally obtained from a successive cytokinesis. Thus tetrad shape should not always be considered as a reliable criterion for inferring the type of cytokinesis, and one should avoid drawing conclusions solely on the basis of tetrad shape. The observation of callose walls in tetrads stained with anilin blue nevertheless allows the distinction between successive and simultaneous cytokinesis in some cases. In the successive type, extra callose is usually deposited onto the cell plate that is formed first, but not on the other two, a feature which has already been described by Huynh (1967). When cytokinesis is simultaneous, such as in *Trachyandra*, all four cell plates (or none) were covered equally with such extra callose deposits. We believe that the only way to determine the type of cytokinesis followed is through direct observation of cell wall growth, and the possible presence of a dyad stage. The observation of tetragonal or decussate tetrads alone is not a sufficient criterion.

Variation in tetrad shape may result from locular space constraints. The study of tetrad packaging in the anther could help to understand why some tetrad types are more frequent in some species, since such constraints in space could modify tetrad shape. Other criteria may nevertheless account for tetrad shape, such as the initial shape of microsporocytes (varying from spherical to ellipsoidal), which can modify the relative position of the nuclei and consequently the shape of the future tetrad.

In this study, species with simultaneous cytokinesis always had irregular tetrahedral tetrads. Interestingly, since pollen aperture pattern seems to be conditioned by tetrad shape, regular tetrahedral tetrads are associated with the presence of trichotomosulcate pollen (Rudall *et al.*, 1997; S. Nadot, unpublished data), while irregular tetrahedral tetrads are always associated with monosulcate pollen. This change of pollen morphology is ascribed to a modification in the relative positions of the nuclei at the end of meiosis. It may be the consequence of

selection for a better-adapted pollen morphology. Other such correlations between the production of monosulcate and trichotomosulcate pollen through simultaneous cytokinesis have been reported (Rudall *et al.*, 1997; Harley, 2004) and more data are needed to address this question.

Interestingly, Iridaceae species with a callose ring may represent another example of the fixation of a developmental event canalizing pollen morphology. In these species, the majority of tetrads are tetragonal or almost tetragonal. This particular shape could result from a constraint due to the callose ring and might have been selected as being more efficient for constraining tetrads into tetragonal shapes and therefore for producing monosulcate pollen. Monosulcate pollen can also result from irregular tetrahedral tetrads, but in this case it is often associated with the production of trichotomosulcate pollen resulting from regular tetrahedral tetrads. If there is a cost for producing two different pollen (for example, if one morph is locally less efficient in fertilization), we should expect developmental options that reduce the occurrence of a morphology to be selected. This may be the case for species with a callose ring. The case of *Hemerocallis fulva* and its semi-simultaneous cytokinesis may be another example of such a mechanism that constrains tetrad shape and therefore apertural type. The co-occurrence of monosulcate and trichotomosulcate pollen should then be considered as a direct consequence of the developmental pathway.

Pattern in microsporogenesis

Microsporogenesis in the Asparagales is relatively conservative at the family level, except in the Iridaceae. The higher Asparagales clade is characterized by a highly conserved developmental pathway: successive cytokinesis with centrifugal cell plate growth. In this group, the only variation in this study concerns the shape of tetrads, which are mostly tetragonal or decussate, but also linear or T-shaped in some species. The latter shapes of tetrads can be rare (*Hyacinthus non-scriptus*, *Hosta sp.*, *Polygonatum multiflorum* and *Convallaria majalis*) or relatively frequent (*Albuca nelsonii*). Asphodelaceae are characterized by simultaneous cytokinesis associated with centrifugal cell plate development, resulting in monosulcate pollen grains. We did not investigate enough species of Hypoxidaceae and Tecophilaeaceae to generalize our observations in these groups. However, since microsporogenesis appears conservative within most families, we expect other species from these families to present a pattern similar to the species described here. Iridaceae was the only family in which monosulcate pollen was obtained via different developmental pathways. Most of the pathways present in this family are also present in other Asparagales families. However, the presence of a callose ring formed during meiosis is unique to the Iridaceae and therefore could represent a diagnostic character of this family within the Asparagales.

Incidentally, the described similar developmental groups correlate more or less with phylogeny, indicating that dramatic differences in microsporogenesis are generally

discerned only at macroevolutionary levels, while developmental differences between related species (generally within the family level) are less marked.

Microsporogenesis leading to monosulcate pollen is thus highly diverse, with some developmental pathways limited to families, while others are encountered throughout the Asparagales. This journey through development raises questions about pollen morphology: monosulcate pollen is considered ancestral among the monocots. If several developmental pathways correlate with this morphology, the character is homoplastic, and only the morphology associated with the ancestral developmental pathway can be considered as ancestral. If developmental events that determine monosulcate apertures are so diverse, which developmental type really constitutes the ancestral condition? This needs further in-depth investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are greatly indebted to the botanical gardens that provided us with the plant material (Kirstenbosch National Botanical Garden; Royal Botanic Gardens, Kew; Jardin Botanique de Paris; Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris; Conservatoire Botanique de Brest; Parc Botanique de Launay). Thanks are due to the following people for their help with collecting material: Graham Duncan and Adam Harrower (Kirstenbosch), John Manning (Compton Herbarium) and Lauw de Jager (<http://www.bulbargence.com>). We are also very grateful to Irene Till-Bottraud and two anonymous reviewers for their helpful comments on the manuscript. This work was supported by a grant from the MENRT-IFB (20 2001-1081), the MAE (France–South Africa cooperation program) (041 18 19 00).

LITERATURE CITED

- APG (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.
- Arens K. 1949. Prova de Calose por meio da microscopia a luz fluorescente e aplicações do método. *Lilloa* **18**: 71–75.
- Blackmore S, Crane PR. 1998. The evolution of apertures in the spores and pollen grains of embryophytes. In: Owens, SJ, Rudall PJ, eds. *Reproductive biology*. Kew, London: Royal Botanic Gardens, 159–182.
- Brown RC, Lemmon BE. 1992. Control of division plane in normal and griseofulvin treated microsporocytes of *Magnolia*. *Journal of Cell Science* **103**: 1031–1038.
- Chaloner WG. 1970. The evolution of miospore polarity. *Geoscience and Man* **1**: 47–56.
- Chase MW, Duvall MR, Hills HG, Conran JG, Cox AV, Eguiarte LE, Hartwell J, Fay MF, Caddick LR, Cameron KM, Hoot S. 1995. Molecular phylogenetics of Liliaceae. In: Rudall PJ, Cribb PJ, Cutler DF, Humphries CJ, eds. *Monocotyledons: systematics and evolution*. Kew, London: Royal Botanic Gardens, 109–137.
- Crane PR, Friis EM, Pedersen KR. 1995. The origin and early diversification of Angiosperms. *Nature* **374**: 27–33.
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985. *The families of the Monocotyledons*. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.
- Diaz Lifante Z. 1996. Pollen morphology of *Asphodelus* L. (Asphodelaceae): taxonomic and phylogenetic inferences at the infrageneric level. *Grana* **35**: 24–32.
- Dover GA. 1972. The organisation and polarity of pollen mother cells of *Triticum aestivum*. *Journal of Cell Science* **11**: 699–711.

- Doyle JA. 1969. Cretaceous Angiosperm pollen of the Atlantic coastal plain and its evolutionary significance. *Journal of the Arnold Arboretum* 50: 1–35.
- Erdtman G. 1947. Suggestions for the classification of fossil and recent pollen grains and spores. *Svensk Botanisk Tidskrift* 41: 104–114.
- Erdtman G. 1952. *Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms*. Stockholm: Almqvist and Wiksell.
- Fay MF, Rudall PJ, Sullivan S, Stobart KL, de Bruijn AY, Reeves G, Qamaruz-Zaman F, Hong W-P, Joseph J, Hahn WJ, Conran JG, Chase MW. 2000. Phylogenetic studies of Asparagales based on four plastid DNA regions. In: Wilson KL, Morrison DA, eds. *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, 360–371.
- Franchi GG, Nepi M, Dafni A, Pacini E. 2002. Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance. *Plant Systematics and Evolution* 234: 211–227.
- Furness CA, Rudall PJ. 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. *Annals of Botany* 84: 475–499.
- Furness CA, Rudall PJ. 2000a. The systematic significance of simultaneous cytokinesis during microsporogenesis in monocotyledons. In: Wilson KL, Morrison DA, eds. *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, 189–193.
- Furness CA, Rudall PJ. 2000b. Aperture absence in pollen of Monocotyledons. In: Harley MM, Morton CM, Blackmore S, eds. *Pollen and spores: morphology and biology*. Kew, London: Royal Botanical Gardens.
- Furness CA, Rudall PJ. 2004. Pollen aperture evolution—a crucial factor for eudicots success? *Trends in Plant Science* 9: 154–158.
- Furness CA, Rudall PJ, Sampson FB. 2002. Evolution of microsporogenesis in Angiosperms. *International Journal of Plant Science* 163: 235–260.
- Goldblatt P, Le Thomas A. 1992. Pollen Apertures, exine sculpturing and phylogeny in Iridaceae subfamily Iridoideae. *Review of Paleobotany and Palynology* 72: 301–315.
- Goldblatt P, Le Thomas A. 1993. Pollen morphology of Madagascar *Aristea* and *Geosiris* (Iridaceae–Nivenoideae) in relation to systematics and phylogeny. *Adansonia* 14: 223–233.
- Goldblatt P, Manning JC, Bari A. 1991. Sulcus and operculum structure in the pollen grains of Iridaceae subfamily Ixioidae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 78: 950–961.
- Harley MM. 2004. Triaperturate pollen in monocotyledons: configurations and conjectures. *Plant Systematics and Evolution* 247: 75–122.
- Harley M, Baker WJ. 1998. Aperture morphology in Arecaceae: application within phyletic analyses, and a summary of the fossil record of palm-like pollen. *Grana* 40: 45–77.
- Heslop-Harrison J. 1976. The adaptive significance of the exine. In: Ferguson IK, Muller J, eds. *The evolutionary significance of the exine*. Kew, London: Linnean Society of London, 27–37.
- Huynh KL. 1976. Arrangement of some monosulcate, disulcate, trisulcate, dicolpate and tricolpate pollen types in the tetrads, and some aspects of evolution in the angiosperms. In: Ferguson IK, Muller M, eds. *The evolutionary significance of the exine*. London: Academic Press.
- Iversen J, Troels-Smith J. 1950. Pollenmorphologische Definitionen und Typen. *Danmarks Geologiske Undersøgelse* 4-3: 1–54.
- Kativu S. 1996. A study on microsporogenesis and ovule morphology in Tropical African Anthericaceae and Asphodelaceae. In: van der Maesen LG, ed. *The biodiversity of African Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. 477–480.
- Kosenko V, Sventorzhetskaya OY. 1999. Pollen morphology in the family Asphodelaceae (Asphodeleae, Kniphofieae). *Grana* 38: 218–227.
- Kuprianova LA. 1966. Apertures of pollen grains and their evolution in Angiosperms. *Review of Paleobotany and Palynology* 3: 73–80.
- Longly B, Waterkeyn L. 1979a. Etude de la cytocinèse. II. Structure et isolement des plaques cellulaires microsporocytaires. *La cellule* 72: 227–242.
- Longly B, Waterkeyn L. 1979b. Etude de la cytocinèse. III. Les cloisonnements simultanés et successifs des microsporocytes. *La cellule* 73: 65–80.
- Pinar nM, Dönmez EO. 2000. Pollen morphology of Turkish *Iris* L. (Iridaceae) with reference to evolutionary trends at the infrageneric level. *Israel Journal of Plant Sciences* 48: 129–141.
- Punt W, Blackmore S, Nilsson S, Le Thomas A. 1994. *Glossary of pollen and spores terminology*. Utrecht: LPP Foundation.
- Ressayre A, Godelle B, Raquin C, Gouyon P-H. 2002a. Aperture pattern ontogeny in angiosperms. *Journal of Experimental Zoology* 294: 122–135.
- Ressayre A, Mignot A, Siljak-Yakovlev S, Raquin C. 2003. Postmeiotic cytokinesis and pollen aperture number determination in eudicots: effect of the cleavage wall number. *Protoplasma* 221: 257–268.
- Ressayre A, Raquin C, Mignot A, Godelle B, Gouyon P-H. 2002b. Correlated variation in microtubule distribution, callose deposition during male post-meiotic cytokinesis, and pollen aperture number across *Nicotiana* species (Solanaceae). *American Journal of Botany* 89: 393–400.
- Rudall PJ, Furness CA, Chase MW, Fay MF. 1997. Microsporogenesis and pollen sulcus type in Asparagales (Liliana). *Canadian Journal of Botany* 75: 408–430.
- Sampson FB. 2000. Pollen diversity in some modern magnoliids. *International Journal of Plant Science* 161: S193–S210.
- Sheldon JM, Dickinson HG. 1986. Pollen wall formation in *Lilium*: the effect of chaotropic agents, and the organisation of the microtubular cytoskeleton during pattern development. *Planta* 168: 11–23.
- Shimamura M, Deguchi H, Mineyuki Y. 1998. Meiotic cytotkinetic apparatus in the formation of the linear spore tetrads of *Conocephalum japonicum* (Bryophyta). *Planta* 206: 604–610.
- Stainier F, Huard D, Bronckers F. 1967. Technique de coloration spécifique de l'exine des microspores jeunes encore groupées en tétrade. *Pollen et Spores* 9: 367–370.
- Stedje B, Nordal I. 1994. A contribution to the discussion to the family delimitation of Anthericaceae versus Asphodelaceae. In: Seyani JH, Chikuni AC, eds. XIIIth Plenary meeting AETFAT, Malawi, 1: 513–524.
- Walker JW. 1974. Aperture evolution in the pollen of primitive Angiosperms. *American Journal of Botany* 61: 1112–1136.
- Walker JW, Doyle JA. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: palynology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 664–723.
- Wodehouse RP. 1935. *Pollen grains, their structure, identification and significance in science and medicine*. New York: McGraw-Hill.
- Xiong ZT, Chen S, Hong D, Luo Y. 1998. Pollen morphology and its evolutionary significance in *Hemerocallis* (Liliaceae). *Nordic Journal of Botany* 18: 183–189.
- Zavada MS. 1983. Comparative morphology of Monocot pollen and evolutionary trends of apertures and wall structures. *The Botanical Review* 49: 331–379.

Variation of pollen early development in monocots.

Nadot, S., Forchioni, A., Penet, L., Sannier, J., and A. Ressayre.

Soumis à Protoplasma.

Variation of pollen early development in monocots

Running head:

S. Nadot et al., pollen early development in monocots

Authors:

Sophie Nadot*, Arlette Forchioni, Laurent Penet, Julie Sannier and Adrienne Ressayre[§]

Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS UMR 8079, Université Paris-Sud, 91405

Orsay Cedex, France

[§]Station de Génétique Végétale du Moulon, CNRS UMR 8120, 91190 Gif sur Yvette, France

*Corresponding author:

sophie.nadot@ese.u-psud.fr

Tel: +33169155665

Fax: +33169154697

Summary

Although the pollen grains produced in the monocots are predominantly monosulcate (or monoporate), other aperture types are also found within this taxonomic group, such as the trichotomosulcate, inaperturate, zonaperturate, di- or triaperturate types for example. The aperture pattern is determined early during pollen development and it is known that some features of microsporogenesis can constrain the aperture type. For example, trichotomosulcate pollen is always associated with simultaneous cytokinesis, a condition considered as derived in the monocots. Our observations of the microsporogenesis pathway in a range of monocot species show that this pathway is surprisingly variable. Our results, however preliminary, reveal that variation in microsporogenesis concerns not only cytokinesis but also callose deposition among the microspores and shape of the tetrads. The role played by these features in aperture pattern determination is discussed.

132 words

Keywords :

microsporogenesis, pollen, cytokinesis, aperture pattern, callose deposition, monocots

Introduction

The early steps of pollen development consist in the formation of microspores, a process called microsporogenesis that involves the meiotic division of diploid microsporocytes into four haploid microspores, enclosed within the callosic wall of the microsporocyte. Each microspore will then undergo mitotic divisions and mature to give a pollen grain, the male gametophyte of spermatophytes. The pollen grains of angiosperms are surrounded by a complex wall made of sporopollenin: the exine. In most species, pollen grains present apertures, *i.e.* areas where the exine layer is thin or lacking (Erdtman 1952). The apertures are often fully visible in late tetrad stage, indicating that the aperture pattern (aperture structure, number and distribution) is determined during the early stages of pollen development. There is now increasing evidence that aperture pattern ontogeny is linked to meiosis (Blackmore and Crane 1998, Ressayre et al. 2002, Harley 2004). Detailed observations of microsporogenesis in species with different aperture patterns, either from the monocots or from the eudicots (Ressayre 2001, Ressayre et al. 2003, Ressayre et al. in press), show that the apertures are defined according to the regions where cytokinesis is completed, as already suggested by Wodehouse (1935). Since cytokinesis involves the formation of callosic walls among the microspores (Longly and Waterkeyn 1979), callose deposition during microsporogenesis is likely to play a key role in aperture pattern determination.

There is a variety of aperture types in monocots. The monosulcate type (a single distal polar aperture, sometimes reduced to a pore) occurs in most families of the monocots but some families, such as the Araceae (Grayum 1992), Iridaceae (Goldblatt et al. 1998) or Arecaceae (Harley and Baker 2001), display variation in the aperture pattern. Variation concerns different aspects of the aperture pattern: shape (sulci or pores), number (one to several) or position (polar or equatorial). Variation occurs generally among genera, sometimes among species of the same genus (Goldblatt and Le Thomas 1993), but there are many records of intra-individual variation (Harley and Baker 2001, Harley 2004), a phenomenon called heteromorphism (Till-Bottraud et al. 1995). Some species produce inaperturate pollen in which the exine layer is either continuous or entirely lacking (Furness and Rudall 1999a, 2000). Data concerning the cellular process of microsporogenesis in

monocots are focused essentially on the type of cytokinesis and indicate that some aperture types, such as the trichotomosulcate or tri-aperturate types, occur only when cytokinesis is simultaneous (Furness and Rudall 1999b, Harley 2004). The widespread monosulcate pollen is commonly associated with successive cytokinesis but also occurs with simultaneous cytokinesis, in which case it is sometimes found together with trichotomosulcate pollen (Rudall et al. 1997, Harley 1999a).

We have undertaken a comprehensive study of microsporogenesis in monocots, with a special focus on cell wall formation during cytokinesis, in order to identify the main features of microsporogenesis in this taxonomic group. In the long run, this study will help us to improve our understanding of aperture pattern determination in monocots and identify the key steps involved in the evolution of this character. In this paper we present observations from selected species belonging to different clades of the monocots. Although the number of species examined was limited, our results reveal that variation concerns different features of microsporogenesis, such as the type of cytokinesis, intersporal callosic wall formation and shape of the tetrads. We discuss the role played by these features in aperture pattern determination.

This work was presented as an oral communication at the 11th International Palynological Congress, Granada, Spain, 4-9 July 2004

Material and methods

Microsporogenesis was examined in plant material belonging to fourteen species, representing some of the taxonomic diversity of monocots. Fresh floral buds potentially at different stages of microsporogenesis were collected from plants grown in botanical gardens or found in the wild (Table 1). Floral buds were immediately dissected to extract the anthers. One anther per bud was squashed to extract the sporogenous cells and mounted in aceto-carmin to identify the meiotic stage of the bud. When meiosis was in progress, the remaining anthers were squashed in aniline blue (modified from Arens (1949) by the addition of 15% glycerol) which allowed us to observe callosic wall formation by epifluorescence. When the mature tetrad stage was observed, half of the remaining anthers were squashed in congo red (Stainier et al. 1967) to visualize the position of apertures within the tetrad. The remaining half was mounted in aniline blue to observe intersporal walls just before the release of pollen grains. In some species it was possible to visualize the apertures with aniline blue staining under epifluorescence. Mature pollen was mounted in congo red. In the case of the species *Dioscorea communis*, the floral buds were squashed directly in the different stains without being dissected, because of their small size. Aceto-carmin and congo red preparations were observed in transmission light with a Zeiss Axiophot microscope. The epifluorescence Zeiss Axiophot microscope was used with filter set 01 (excitation 345, emission 425 nm long pass) for aniline blue staining.

Results

Alisma, Anthurium, Beschorneria, Commelina, Strelitzia, Tradescantia and Wachendorfia

Eight of the fourteen species examined here presented a developmental sequence of microsporogenesis involving successive cytokinesis (fig. 1a) and intersporal wall formation achieved by centrifugal cell plates (fig. 1b-c). In *Anthurium hookeri*, the second meiosis divisions were not exactly synchronous: fig. 1a shows a dyad in which one cell is at the anaphase II stage while the other cell is at the metaphase II stage. Tetragonal and decussate tetrads (fig. 1d-f) were observed in all eight species. A few T-shaped tetrads were recorded in *Beschorneria yuccoides* (fig. 1g). A large variety of shapes were recorded in both species of *Strelitzia* such as T-shaped, linear or Z-shaped (fig.1h) in addition to tetragonal and decussate shapes. *Commelina erecta*, *Tradescantia x andersoniana* and *Wachendorfia paniculata* produced monosulcate pollen grains (fig. 1i-j), *Alisma canaliculatum* and *Anthurium hookeri* produced polyporate pollen (fig. 1k), whereas the pollen of *Strelitzia juncea* and *S. reginae* was inaperturate (fig. 1l).

Dianella

In *Dianella tasmanica*, cytokinesis was achieved in two different ways. One way involved the formation of three cell plates (fig. 2a) and resulted in tetragonal or decussate tetrads (fig. 2b-c). The other way involved the simultaneous formation of six cell plates (fig. 2d) and resulted in the formation of tetrahedral tetrads (fig. 2e-f). The pollen grains produced by this species were trichotomosulcate (fig. 2g), occasionally monosulcate (fig. 2h) or asymmetric trichotomosulcate (fig. 2i).

Gaussia

Cytokinesis in *Gaussia maya* was achieved by the simultaneous formation of four to six centrifugal cell plates (fig. 3a-b), which are covered by extra callose after completion of cytokinesis. The tetrads were tetragonal (fig. 3c), rhomboidal (not shown), symmetric tetrahedral (fig. 3d) or

asymmetric tetrahedral (fig. 3e). The pollen grains were predominantly monosulcate (fig. 3e), mixed with trichotomosulcate pollen grains (fig. 3f).

Chamaedorea, Dioscorea and Sisyrinchium

In all three species, cytokinesis was simultaneous and achieved by cell plates growing centripetally from the edges of each of the cleavage plane (fig. 4a-c). The resulting tetrads ranged from tetragonal to symmetric or asymmetric tetrahedral (fig d-f), with occasional rhomboidal tetrads in *Chamaedorea microspadix* (fig. 4g). Pollen grains in *Chamaedorea* and *Sisyrinchium* were monosulcate, occasionally trichotomosulcate (fig. 4h-i). The pollen of *Dioscorea communis* was disulcate (fig. j), i.e. with two apertures in equatorial position.

Dietes

In this species, intersporal wall formation was achieved by the simultaneous formation of four to six callosic walls starting from the edges of the tetrad and progressing centripetally toward the centre of the tetrad (fig. 4k-l). The tetrads were tetragonal, rhomboidal or tetrahedral (not shown) and the pollen grains were zonosulcate, with a ring-like sulcus running through both poles (fig. 4m).

Discussion

Microsporogenesis with successive cytokinesis

A widespread developmental sequence observed in monocots involves successive cytokinesis and intersporal wall formation achieved by centrifugal cell plates. Such features are found in species belonging to different orders of monocots as shown by the data presented here (table 2) or by previous works (Longly and Waterkeyn 1979, Penet et al. in press). The pollen associated with these features of microsporogenesis is generally boat-shaped and monosulcate, with the sulcus oriented along the longest axis of the pollen grain. In the tetrad, the sulcus of each microspore is oriented in such a way that both ends of the sulcus are located precisely where callose wall

formation is completed (shown by the stars on fig. 1i), as predicted by a model of aperture pattern ontogeny (Ressayre et al. 2002). There are exceptions to this association, since species displaying successive cytokinesis and centrifugal cell wall formation were found to produce other pollen types, such as polyporate or inaperturate (table 2). A low but variable number of pores were recorded in *Anthurium hookeri*, as already noted (Buchner and Weber 2000). In nearly all species with successive cytokinesis the tetrads were predominantly tetragonal or decussate, occasionally T-shaped, and additional callose was laid on the cell plates in most cases (indicated by arrow on fig. 1f) except in *Wachendorfia paniculata* in which the cell plates were left bare in mature tetrads. In both species of *Strelitzia*, a large variety of tetrad shapes was observed. Many tetrads were of irregular shapes, called here “Z-shaped” suggesting that there are no constraints on the shape of the tetrad in these species which produce pollen grains with no apertures. Further investigation of species producing inaperturate pollen will be needed to test whether there is indeed a correlation between the production of inaperturate pollen grains and the release of constraint on tetrad shape. As for *Anthurium hookeri* (of which the type of cytokinesis is described here for the first time) and *Alisma canaliculatum*, which produce polyporate pollen, our observations support the hypothesis of Wodehouse (1935) who suggested that for high aperture numbers the aperture pattern is disconnected from meiosis.

Microsporogenesis with intermediate cytokinesis

Cytokinesis in *Dianella tasmanica* involved the formation of centrifugal cell plates. This situation is found in all species of Hemerocallidaceae and Asphodelaceae for which intersporal wall formation has been described (Ressayre et al. in press, Penet et al. in press). These two closely related families are sister group to the higher Asparagales clade (Chase et al. 2000) characterised by successive cytokinesis involving centrifugal cell plates. The literature is conflicting about the type of cytokinesis in *Dianella tasmanica*, described as simultaneous (Schnarf and Wunderlich 1939) or successive (Huynh 1971). Our observations reveal that cytokinesis in this species can be achieved by the formation of either 3 or 6 cell plates. When six cleavage planes were involved, all

cell plates were formed simultaneously. When three cleavage planes were involved (like in successive cytokinesis), the cell plates formed were unequal, with one larger than the two others. Our interpretation is that the large cell plate separates the nuclei resulting from meiosis I and the two smaller cell plates separate the nuclei resulting from meiosis II. Unlike in successive cytokinesis, a true dyad stage was never observed, the cell plates formed after meiosis II being initiated before the first cell plate was completed. Cytokinesis in *Dianella tasmanica* should then be considered as intermediate between simultaneous and successive, which could explain the conflicts found in the literature.

Microsporogenesis with simultaneous cytokinesis

Different ways of separating the four microspores were found in species with simultaneous cytokinesis (table 2). Intersporal wall formation was a two-step process, with first callosic cell plates developing either centrifugally or centripetally, and then additional callose laid onto the cell plates once the four nuclei were completely separated. One exception was found however, in the case of *Dietes grandiflora*. In this species there was no stage with bare cell plates; the cell plates were covered with extra callose while they were developing. This situation, which is a rule in the eudicots (Brown and Lemmon 1991), had never been described in the monocots so far. The diversity displayed by monocots concerning intersporal wall formation when cytokinesis is simultaneous contrasts greatly with the conserved pattern observed in the eudicots. It also contrasts with the situation observed in the case of successive cytokinesis, in which intersporal wall formation always involved cell plates forming centrifugally.

Tetrad shape and aperture pattern

In the literature, simultaneous cytokinesis is generally considered to be associated with the formation of tetrahedral tetrads, especially in the eudicots (Blackmore and Crane 1998, Harley 1999b). However, almost all “simultaneous” species examined here displayed a large variety in the shape of post-meiotic tetrads. The tetrad shape ranged from tetragonal to tetrahedral (symmetric or

asymmetric), including rhomboidal. Theoretically, the shape of a tetrad is defined by the number of cleavage planes which divide the internal space of a spherical or elliptical volume: three or four planes result in tetragonal or decussate tetrads (depending on the relative orientation of the cleavage planes), five planes result in rhomboidal tetrads, six equal planes result in symmetric tetrahedral tetrads, six unequal planes result in asymmetric tetrahedral tetrads. The variation in tetrad shape in our sampling of species should therefore result from the occurrence of variation in the number and size of the cleavage planes that divide the four haploid nuclei after meiosis. Such a variation was recorded in several species of our sampling, for example in *Gaussia attenuata* or *Dietes grandiflora*.

Interestingly, the variation in tetrad shape was associated with variation in pollen aperture pattern in four species examined here, namely *Chamaedorea microspadix* and *Gaussia attenuata* (Arecaceae), *Dianella tasmanica* (Hemerocallidaceae) and *Sisyrinchium striatum* (Iridaceae). These species produced a mixture of monosulcate and trichotomosulcate pollen grains, a situation that is not uncommon in the palm family (Harley 1999a) or in the “lower” asparagoids with simultaneous cytokinesis (Rudall et al. 1997). *Dianella tasmanica* was known to produce trichotomosulcate pollen (Huynh 1971, Roth et al. 1987) arranged in tetrahedral tetrads at the post-meiotic stage, a general feature of Hemerocallidaceae with the exception of *Hemerocallis* (Roth et al. 1987). The specimen of *Dianella* studied here produced a small proportion of monosulcate pollen mixed with symmetric trichotomosulcate pollen grains and occasional asymmetric trichotomosulcate pollen grains. The position of the apertures within the tetrad shows that monosulcate pollen results from tetragonal or decussate tetrads, as would be expected if cytokinesis were successive, whereas trichotomosulcate pollen is associated to tetrahedral tetrads. The record of both symmetric and asymmetric tetrahedral tetrads (not shown) in *Dianella tasmanica* could account for the record of symmetric and asymmetric trichotomosulcate pollen grains. In *Gaussia maya* and *Chamaedorea microspadix*, all mature tetrads observed consisted of monosulcate pollen grains assembled in tetragonal, rhomboidal, decussate or asymmetric tetrahedral tetrads. If tetrad shape has an impact on aperture shape, as suggested by our

observations, then we would expect to find the trichotomosulcate pollen grains of *Gaussia* and *Chamaedorea* associated in symmetric tetrahedral tetrads. Unfortunately, we have not been able to observe this pollen type in tetrads, probably due to the rare occurrence of trichotomosulcate pollen in these two species. In *Sisyrinchium striatum*, the observation of a continuum of pollen shapes ranging from symmetric monosulcate to symmetric trichotomosulcate (fig. 4i), together with tetrad shapes ranging from tetragonal to tetrahedral, including rhomboidal, also support the hypothesis of a link between aperture pattern and tetrad shape. In this species, like in *Dianella tasmanica*, trichotomosulcate pollen grains were assembled in tetrahedral tetrads whereas monosulcate pollen grains was found in tetragonal or decussate tetrads.

Convergences in microsporogenesis

As already mentioned, cytokinesis involved centrifugal cell plates in *Dianella tasmanica* and *Gaussia maya*, whereas in *Chamaedorea microspadix* and *Sisyrinchium striatum* cell plate formation was centripetal, a feature generally associated with the eudicots (Brown and Lemmon 1988, 1991). It is noteworthy that four species belonging to different orders converged in producing both monosulcate and trichotomosulcate pollen grains in spite of differences in the formation of intersporal walls. On the opposite, cell plate formation was achieved similarly in three species that belonged to different clades of the monocots and produced pollen grains differing in aperture pattern: *Chamaedorea microspadix*, *Sisyrinchium striatum* (monosulcate and trichotomosulcate pollen) and *Dioscorea communis* (disulcate pollen). In these three species, as well as in *Gaussia maya* and *Dianella tasmanica*, the observation of mature tetrads showed that extra callose was deposited onto the cell plates after their completion. This aspect was not studied here, but it would be interesting to conduct further observations in order to identify precisely the exact points where callose is last deposited among the microspores, since this parameter has been shown to be involved in aperture pattern determination (Ressayre et al. 2002, in press). For example, in *Pontederia cordata*, which has a successive cytokinesis, all cell plates are covered by callose deposited centrifugally from the centre of the tetrad toward the junctions between the

intersporal walls and the outer wall of the tetrad, precisely where the apertures are located in the mature tetrad (Ressayre 2001). Another example is *Phormium tenax*, a species producing trichomosulcate pollen through simultaneous cytokinesis: in the tetrad, the three branches of the trichomosulcus are directed toward the last points where callose is deposited among the microspores (Ressayre et al. in press). This phenomenon was actually observed in the case of the species of *Sisyrinchium* studied here: ingrowths of callose developed toward the junction of the cell plates and the outer wall of the tetrad once cytokinesis was achieved (shown by arrow on fig. 4f). If such a phenomenon is a rule in aperture pattern determination in angiosperms, then we expect to find no differences in the way callose is laid onto the cell plates among *Dianella tasmanica*, *Gaussia maya*, *Chamaedorea microspadix* and *Sisyrinchium striatum* (all produce similar pollen morphologies in spite of differences in cell plate formation). On the opposite, differences are expected between *Chamaedorea* or *Sisyrinchium* and *Dioscorea* (similar cell plate formation but different pollen morphologies).

Conclusion

Despite the small size of the sampling of species examined in this study, our results point out the existence of convergences in the different features of microsporogenesis in monocots. This was already known concerning cytokinesis: there are numerous transitions from successive to simultaneous cytokinesis in the different clades of the monocots. We show here that this phenomenon also concerns the formation of cell plates during simultaneous cytokinesis: centripetal cell plates occur in Arecaceae, Iridaceae and Dioscoreaceae (three unrelated families), and centrifugal cell plates are found in Arecaceae as well as in “higher” Asparagales and the related Hemerocallidaceae. Detailed observations are now needed to know whether convergences occur concerning extra callose deposition within the monocots. Further investigations of microsporogenesis will then improve our understanding of the evolution of aperture pattern ontogeny in monocots.

Acknowledgements

We are grateful to the various botanic gardens which provided us with most of the plant material studied here (MNHN, JBVP, CBNB and Parc Botanique de Launay, France; Royal Botanic Gardens Kew, UK; Kirstenbosch National Botanical Garden, SA). This work was financially supported by the Institut Français de la Biodiversité (grant number 041 18 19 00).

References

- 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
- Arens K (1949) Prova de Calose por meio da microscopia a luz fluorescente e aplicações do metodo. *Lilloa* 18: 71-75
- Blackmore S, Crane PR (1998) The evolution of apertures in the spores and pollen grains of embryophytes. In: Owens SJ, Rudall PJ (eds) *Reproductive Biology*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp 159-182
- Brown RC, Lemmon BE (1988) Microtubules associated with simultaneous cytokinesis of coenocytic microspocytes. *American Journal of Botany* 75: 1848-1856
- Brown RC, Lemmon BE (1991) The cytokinetic apparatus in meiosis: control of division plane in the absence of a preprophase band of microtubules. In: W. LC (eds) *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. Academic Press, London, pp 259-273
- Buchner R, Weber M (2000) PalDat - a palynological database: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. <http://paldat.botanik.univie.ac.at/>
- Caddick LR, Furness CA, Stobart KL, Rudall PJ (1998) Microsporogenesis and pollen morphology in Dioscoreales and allied taxa. *Grana* 37: 321-336
- Cave MS (1955) Sporogenesis and the female gametophyte of *Phormium tenax*. *Phytomorphology* 5: 247-253

Chase MW, Soltis DE, Soltis PS, Rudall PJ, Fay MF, Hahn WH, Sullivan S, Joseph J, Molvray M, Kores PJ, Givnish TJ, Sytsma KJ, Pires JC (2000) Higher level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. In: Wilson KL, Morrison DA (eds) *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, pp

Clarke GCS, Jones MR (1981) Dioscoreaceae. Review of paleobotany and palynology 33: 45-50

Furness CA, Rudall PJ (1999a) Inaperturate pollen in monocotyledons. *International Journal of Plant Science* 160: 395-414

Furness CA, Rudall PJ (1999b) Microsporogenesis in Monocotyledons. *Annals of Botany* 84: 475-499

Furness CA, Rudall PJ (2000) The systematic significance of simultaneous cytokinesis during microsporogenesis in monocotyledons. In: Wilson KL, Morrison DA (eds) *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, pp 189-193

Furness CA, Rudall PJ (2000) Aperture absence in pollen of monocotyledons. In: Harley MM, Morton CM, Blackmore S (eds) *Pollen and spores: morphology and biology*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp 249-257

Furness CA, Rudall PJ, Sampson FB (2002) Evolution of microsporogenesis in Angiosperms. *International Journal of Plant Science* 163: 235-260

Goldblatt P, Le Thomas A (1993) Pollen morphology of Madagascan *Aristea* and *Geosiris* (*Iridaceae-Nivenoideae*) in relation to systematics and phylogeny. *Adansonia* 14: 223-233

Goldblatt P, Manning JC, Rudall PJ (1998) Iridaceae. In: Kubitzki K (eds) *The families and genera vascular plants volume 3*. Springer Verlag, Heidelberg, pp 295-335

Grayum MH (1992) Comparative external pollen ultrastructure of the Araceae and putatively related taxa. *Monogr Syst Not Missouri Bot Gard* 43: 1-167

Harley MM (1999a) Palm pollen: overview and examples of taxonomic value at species level. In: Henderson A, Borschenius F (eds) *Evolution, variation and classification of Palms*. Memoirs of the New York botanical garden, pp 95-120

Harley MM (1999b) Tetrad variation: its influence on pollen form and systematics in the Palmae.

In: Kurmann MH, Hemsley AR (eds) The evolution of plant architecture. Royal Botanic Gardens, Kew, pp 289-304

Harley MM, Baker WJ (2001) Pollen aperture morphology in Arecaceae: application within phylogenetic analyses, and a summary of the fossil record of palm-like pollen. *Grana* 40: 45-77

Harley MM (2004) Triaperturate pollen in the monocotyledons: configurations and conjectures. *Plant Systematics and Evolution* online:

Huynh K-L (1971) Etude de l'arrangement du pollen dans la tétrade chez les Angiospermes sur la base de données cytologiques. III. Le pollen trilète du genre *Dianella* Lam. (Liliaceae). 277-286

Huynh K-L (1976) Arrangement of some monosulcate, disulcate, trisulcate, and tricolpate pollen types in the tetrads, and some aspects of evolution in the angiosperms. In: Ferguso IK, Muller J (eds) The evolutionary significance of the exine. Academic Press, London, pp 101-124

Longly B, Waterkeyn L (1977) Etude de la cytocinèse. I. Les stades callosiques de la plaque cellulaire somatique. *La cellule* 72: 195-227

Longly B, Waterkeyn L (1979) Etude de la cytocinèse. II. Structure et isolement des plaques cellulaires microsporocytaires. *La cellule* 72: 227-242

Longly B, Waterkeyn L (1979) Etude de la cytocinèse. III. Les cloisonnements simultanés et successifs des microsporocytes. *La cellule* 73: 65-80

Penet L, Nadot S, Ressayre A, Forchioni A, Dreyer LD, Gouyon PH (In press) Multiple developmental pathways leading to a single morph: monosulcate pollen (Examples from the Asparagales). *Annals of Botany*

Ressayre A (2001) Equatorial aperture pattern in monocots: same definition rules as in eudicots? The example of two species of Pontederiaceae. *International Journal of Plant Science* 162: 1219-1224

Ressayre A, Godelle B, Raquin C, Gouyon P-H (2002) Aperture pattern ontogeny in angiosperms. *Journal of Experimental Zoology* 294: 122-135

Ressayre A, Mignot A, Siljak-Yakovlev S, Raquin C (2003) Postmeiotic cytokinesis and pollen aperture number determination in eudicots: effect of the cleavage wall number. *Protoplasma* 221:

Ressayre A, Dreyer LD, Triki-Teurtroy S, Forchioni A, Nadot S (In press) Post-meiotic cytokinesis and pollen aperture pattern ontogeny: comparison of development in four species differing in aperture pattern. *American Journal of Botany*

Roth JL, Walker JW, Walker AG (1987) The distribution and systematics of trichotomosulcate pollen within the Lilialean complex. *American Journal of Botany* 74: 751

Rudall PJ, Furness CA, Chase MW, Fay MF (1997) Microsporogenesis and pollen sulcus type in Asparagales (Lilianaes). *Canadian Journal of Botany* 75: 408-430

Schnarf K, Wunderlich R (1939) Zur vergleichenden Embryologie der Liliaceae: Asphodeloideae. *Flora* 133: 297-327

Stainier F, Huard D, Bronkers F (1967) Technique de coloration spécifique de l'exine des microspores jeunes encore groupées en tétrade. *Pollen et Spores* 9: 367-370

Till-Bottraud I, Mignot A, De Paepe R, Dajoz I (1995) Pollen heteromorphism in *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 82: 1040-1048

Waterkeyn L (1962) Les parois microsporocytaires de nature callosique chez *Helleborus* et *Tradescantia*. *La cellule* 62: 225-255

Wodehouse RP (1935) *Pollen grains*. McGraw Hill Book Company, New York London

Figure legends

Figure 1. Successive cytokinesis. a-b: *Anthurium hookeri*. a- Dyad stage with second meiosis division in progress (AC). b- Formation of the cell plate after meiosis I (AB). c- Formation of the cell plates after meiosis II (AB) in *Strelitzia reginae*. d- Tetragonal tetrad in *Wachendorfia paniculata* with bare callosic cell plates (AB). e- Tetragonal tetrad in *Anthurium hookeri* with cell plates covered by additional callose (AB). f- Decussate tetrad in *Commelina erecta*, callose deposits are particularly important on the cell plate formed after meiosis I, shown by the arrow (AB). g- T-shaped tetrad in *Beschorneria yuccoides* (CR). h- Z-shaped tetrad in *Strelitzia reginae* (CR). i- Monosulcate pollen grains in *Wachendorfia paniculata* (CR). j- Decussate tetrad in *Commelina erecta* with apertures indicated by arrows and last points of callose deposition indicated by stars (AB). k- Porate pollen grains in *Anthurium hookeri* (AB). l- Inaperturate pollen in *Strelitzia reginae* (CR).

AC = aceto-carmin; AB = aniline blue; CR = congo red

Figure 2. Microsporogenesis in *Dianella tasmanica*. a- Three unequal cell plates developing centrifugally (AB). b- Tetrads with a shape intermediate between tetragonal and decussate (AB). c- Mature tetrad with apertures visible on the microspores, indicated by arrow (CR). d- Six cell plates developing centrifugally, joining in the centre of the tetrad (AB). e- Tetrahedral tetrad with three intersporal walls visible (AB). f- Tetrahedral tetrad (CR). g- Symmetric trichotomosulcate pollen (CR). h- Monosulcate pollen (AB). i- Asymmetric trichotomosulcate pollen (AB).

AB = aniline blue; CR = congo red

Figure 3. Microsporogenesis in *Gaussia maya*. a- Microsporocyte with four cell plates developing centrifugally (AB). b- Microsporocyte with six cell plates developing centrifugally and joining in the centre of the microsporocyte (AB). c- Tetragonal tetrad with extra callose laid on the cell plates (AB). d- Tetrahedral tetrad with the six cell plates visible (AB). e- Asymmetric tetrahedral tetrad of four monosulcate microspores (AB, FITC filter). f- Trichotomosulcate pollen grain (AB, FITC filter)

AB = aniline blue; CR = congo red

Figure 4. Simultaneous cytokinesis with centripetal intersporal wall formation. a-c: developing cell plates. a- *Chamaedorea microspadix*. b- *Sisyrinchium striatum*. c- *Dioscorea communis*. d-e: *Chamaedorea microspadix*. d- Tetragonal tetrad of four monosulcate microspores, with apertures indicated by arrow (AB, FITC filter). e- Symmetric tetrahedral tetrad, apertures not visible (CR). f- Asymmetric tetrahedral tetrad in *Sisyrinchium striatum* with callose ingrowths indicated by arrow (AB) g-h: *Chamaedorea microspadix*. g- Rhomboidal tetrad of four monosulcate microspores in (AB, FITC filter). h- Monosulcate and trichotomosulcate pollen grains (CR). i- Monosulcate and trichotomosulcate pollen grains in *Sisyrinchium striatum* (CR). j- Mature tetrad in *Dioscorea communis* with equatorial apertures indicated by arrows. k-m: *Dietes grandiflora*. k- Four cell

walls developing centripetally toward the centre of the tetrad (AB). l- Six cell walls developing centripetally toward the centre of the tetrad (AB). m- Two tetrads with zonalsulci visible on microspores (CR).

AB = aniline blue; CR = congo red

Table 1

List of species examined in this study. Kirstenbosch = Kirstenbosch National Botanical Garden (Cape Town, SA); MNHN = Musée National d'Histoire Naturelle (Paris, France); JBVP = Jardin Botanique de la Ville de Paris (Paris, France); Orsay = Parc Botanique de Launay (Orsay, France); Stellenbosch = Stellenbosch Botanical Garden (SA); Kew = Royal Botanic Gardens Kew (UK). Orders and families are according to APG II 2003.

Order and family	Species	Voucher	Origin
<i>Alismatales</i>			
Alismataceae		1983-101	Kew
Araceae	<i>Anthurium hookeri</i> Kunth	4025	MNHN
<i>Dioscoreales</i>			
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea communis</i> (L.) Caddick & Wilkin	No voucher	Orsay
<i>Asparagales</i>			
Agavaceae	<i>Beschorneria yuccoides</i>		MNHN
Hemerocallidaceae	<i>Dianella tasmanica</i> Hook.f.	1996-610	Kew
Iridaceae	<i>Dietes grandiflora</i> N.E.Br		Kirstenbosch
	<i>Sisyrinchium striatum</i> Sm.	No voucher	Orsay
<i>Commelinales</i>			
Commelinaceae	<i>Tradescantia</i> × <i>andersoniana</i> W.Ludw. & Rohw.	No voucher	Orsay
	<i>Commelina erecta</i> L.	No voucher	Orsay
Haemodoraceae	<i>Wachendorfia paniculata</i> L.	No voucher	Cape Region
<i>Zingiberales</i>			
Strelitziaceae	<i>Srelitzia juncea</i> Link	No voucher	Cape Region
	<i>S. reginae</i> Aiton	No voucher	Cape Region
Arecaceae			
	<i>Chamaedorea microspadix</i> Burret	913448	JBVP
	<i>Gaussia attenuata</i> (O.F.Cook) Becc.	569-6656902	Kew

Table 2

Summary of the main features of microsporogenesis in the species examined in this paper. Orders and families are according to APG II 2003.

Cytokinesis and intersporal wall formation	Aperture type	Apertures within tetrad
Successive and centrifugal		
<i>Alismatales</i>		
<i>Alisma canaliculatum</i>	polyporate	No data
<i>Anthurium hookeri</i>	diporate or triporate	No data
<i>Asparagales</i>		
<i>Beschorneria yuccoides</i>	monosulcate?	
<i>Commelinales</i>		
<i>Tradescantia x andersoniana</i>	monosulcate	Polar
<i>Commelina erecta</i>	monosulcate	Polar
<i>Wachendorfia paniculata</i>	monosulcate	
<i>Zingiberales</i>		
<i>Strelitzia reginae</i>	inaperturate	
Simultaneous and centrifugal		
<i>Asparagales</i>		
<i>Dianella tasmanica</i>	monosulcate and trichotomosulcate	Polar
<i>Arecales</i>		
<i>Gaussia attenuata</i>	monosulcate and trichotomosulcate	Polar
Simultaneous and centripetal		
<i>Dioscoreales</i>		
<i>Dioscorea communis</i>	disulcate	equatorial
<i>Asparagales</i>		
<i>Dietes grandiflora</i>	zonasulcate	Polar
<i>Sisyrinchium striatum</i>	monosulcate and trichotomosulcate	Polar
<i>Arecales</i>		
<i>Chamaedorea microspoadix</i>	monosulcate and trichotomosulcate	Polar

Figure 1

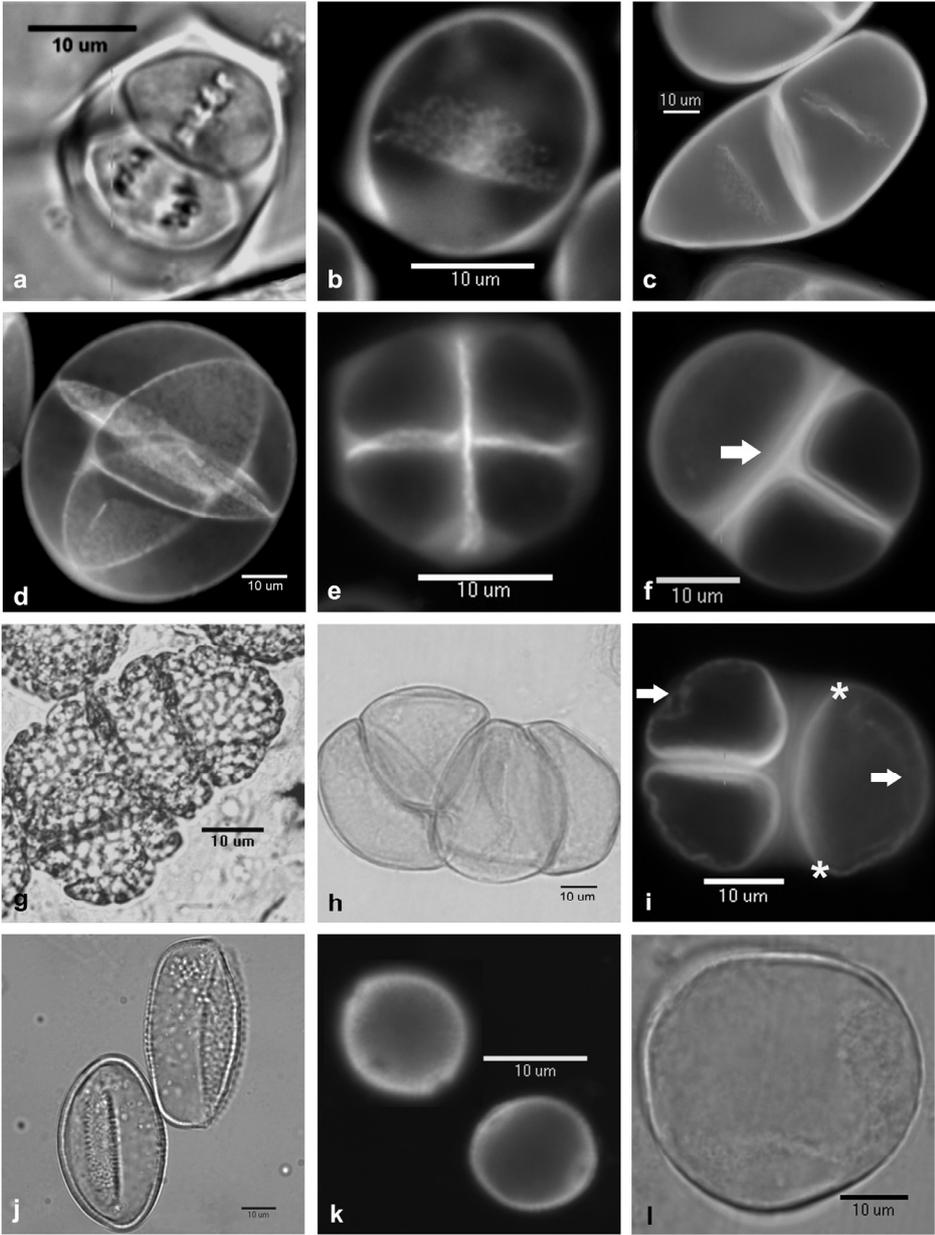


Figure 2

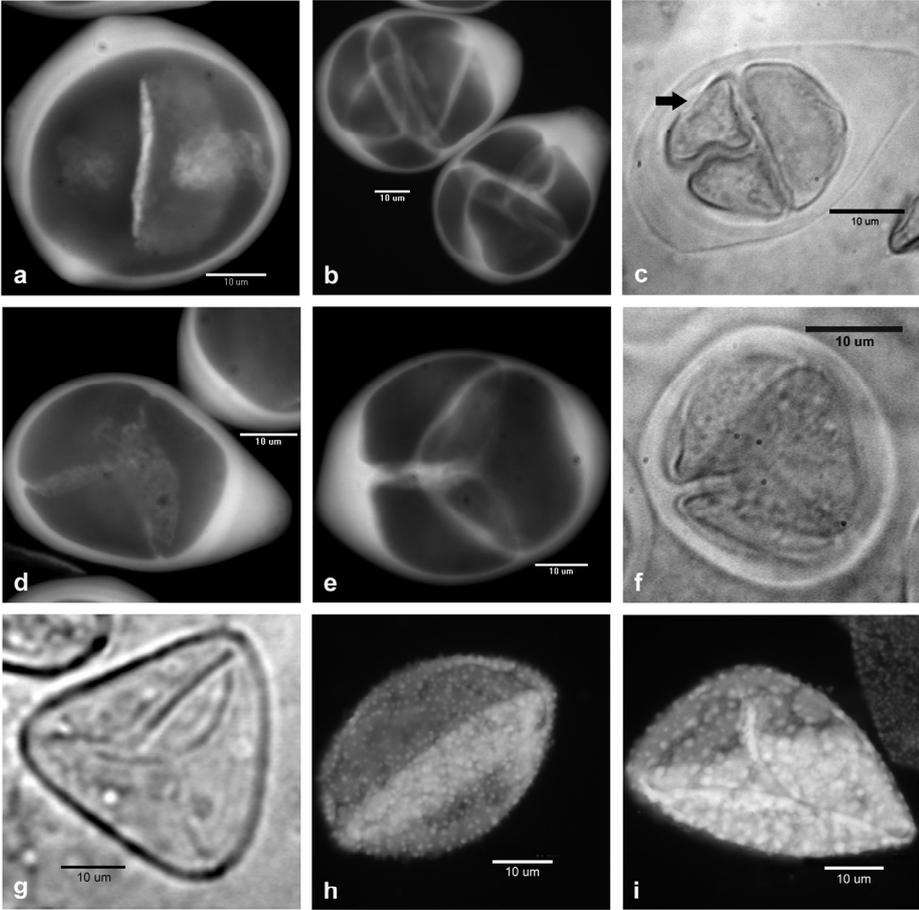


Figure 3

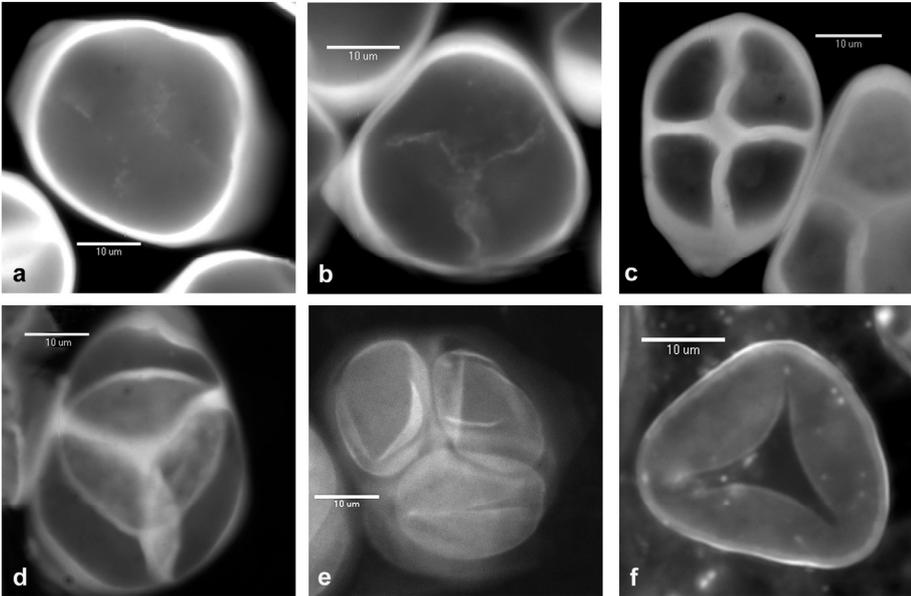


Figure 4

