

2m11. 2847.4

Université de Montréal

Phylogénie moléculaire de *Monopetalanthus* Harms  
(*Fabaceae:Caesalpinioideae*) et des genres affiliés

Par

G.Y.Fannie Gervais

Département de sciences biologiques,  
Institut de recherche en biologie végétale  
Faculté des arts et des sciences

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

Juin, 2000

© Fannie Gervais, 2000



QK 3 U54 2000 v.004

QK  
3  
U54  
2000  
v.004

Université de Montréal

Physiologie moléculaire de l'absorption des nutriments  
(Processus cellulaires) et des gènes affines

Dr  
G.Y. Fanni Gervais

Département de sciences biologiques,  
Institut de recherche en biologie végétale  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de

M.Sc.

en sciences biologiques

Juin, 2000

G. Y. Fanni Gervais, 2000



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:  
Phylogénie moléculaire de *Monopetalanthus* Harms  
(*Fabaceae:Caesalpinioideae*) et des genres affiliés

Présenté par:  
G.Y.Fannie Gervais

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Denis Barabé	Président du jury
Anne Bruneau	Directeur de recherche
Luc Brouillet	Membre du jury

Mémoire accepté le : ..... 18 août 2000 .....

## Sommaire

Le but de ce travail fut d'obtenir une phylogénie moléculaire du genre *Monopetalanthus* Harms (*Fabaceae: Caesalpinioideae: Macrolobieae*) afin de vérifier les liens phylogénétiques existant entre les espèces de ce genre et les autres espèces des *Macrolobieae*. Des études morphologiques de *Monopetalanthus* ont indiqué que ce genre n'est pas un taxon naturel. Dans la présente étude, deux régions de l'ADN, l'une chloroplastique et l'autre nucléaire, de *Monopetalanthus* et d'autres espèces de *Macrolobieae*, que nous croyons apparentées à *Monopetalanthus*, furent séquencées. Les données moléculaires ainsi obtenues furent analysées à l'aide de méthodes cladistiques. La phylogénie obtenue fut comparée à la taxonomie actuelle et aux taxonomies précédentes. Selon les analyses moléculaires, *Monopetalanthus* n'est pas un taxon naturel. Il se divise en différents groupes d'espèces qui se répartissent au sein de plusieurs autres genres. De façon générale, la phylogénie moléculaire supporte la nouvelle taxonomie proposée par Wieringa en 1999. Ces résultats amène la mise en synonymie du nom *Monopetalanthus*. En effet, les espèces de ce genre serait mieux placées dans les genres *Aphanocalyx* (Oliver) Wieringa, *Bikinia* Wieringa et *Tetraberlinia* (Harms) Hauman.

## Résumé

La sous-famille des *Caesalpinioideae* des Légumineuses compte environ 2000 espèces et est considérée comme basale par rapport aux deux autres sous-familles, les *Papilionoideae* et les *Mimosoideae*. Dans la sous-famille des *Caesalpinioideae*, la majeure partie des espèces se trouve en région tropicale. Quelques espèces herbacées existent dans cette sous-famille, mais la plupart des représentants sont de grands arbres ou des lianes. Leur lieu d'origine et leur port furent et sont toujours des obstacles importants à la collecte de matériel. La découverte constante de nouvelles espèces et l'élaboration de taxonomies basées seulement sur des flores régionales ont entraîné un grand nombre de révisions taxonomiques.

Une étude phylogénétique basée sur des caractères morphologiques nécessite un grand nombre de représentants de chaque espèce, afin de pouvoir bien définir les états de caractères et d'évaluer la variation morphologique des espèces. Malheureusement, avec les *Caesalpinioideae*, le matériel d'herbier est restreint pour chaque espèce. Il existe de grands avantages à utiliser des caractères moléculaires pour une étude phylogénétique. En effet, le génome complet d'une espèce peut être extrait à partir d'une partie de feuille. Un fragment de feuille provenant d'un échantillon bien identifié peut fournir un grand nombre de caractères. Corroborée par des caractères morphologiques, la phylogénie obtenue à partir de caractères moléculaires peut aider à obtenir une meilleure classification des espèces.

La sous-famille des *Caesalpinioideae* est divisée en cinq tribus: les *Caesalpinieae*, les *Cassieae*, les *Cercideae*, les *Detarieae* et les *Macrolobieae*. Les *Caesalpinieae* et les *Cassieae* se regroupent dans les analyses moléculaires effectuées à partir de la séquence de l'intron du gène chloroplastique *trnL*. Ces deux tribus seraient à l'origine des deux autres sous-familles de Légumineuses. La tribu des *Cercideae* est la seule tribu des *Caesalpinioideae* qui soit monophylétique selon l'étude moléculaire. De nombreux caractères morphologiques supportent cette hypothèse. Les

deux dernières tribus, *Detarieae* et *Macrolobieae*, forment ensemble un groupe monophylétique reconnu depuis longtemps sur la base de leurs caractères morphologiques. Par contre, aucune de ces deux tribus, prise individuellement, ne forme un groupe naturel. Les différences entre la phylogénie moléculaire et les phylogénies morphologiques se situent principalement au niveau des relations entre les genres plutôt qu'au niveau des relations entre les tribus. De plus, à l'intérieur des *Macrolobieae*, l'un des problèmes semble être la polyphylie de plusieurs genres.

L'un des genres dont la taxonomie est problématique est *Monopetalanthus* Harms de la tribu des *Macrolobieae*. *Monopetalanthus* est un genre composé de 17 espèces de grands arbres endémiques à l'Afrique tropicale. La variation morphologique à l'intérieur de ce genre a amené à reconnaître deux groupes d'espèces. Ces deux groupes se distinguent par la morphologie des folioles. Un groupe possède des folioles dont la partie distale est totalement ou presque totalement réduite, tandis que l'autre possède des folioles entières, mais mucronées en position sub-apicale. Aucune valeur taxonomique ne fut donnée à ces groupes jusqu'à la récente révision taxonomique de Wieringa en 1999. Dans cette étude, les deux groupes de *Monopetalanthus* furent divisés en différents genres. Le groupe d'espèces aux folioles réduites fut intégré au genre *Aphanocalyx* Oliver (*Macrolobieae*) et le groupe d'espèces aux folioles mucronées en position sub-apicale fut nommé *Bikinia* Wieringa. Une espèce fut transférée dans le genre *Tetraberlinia* (Harms) Hauman (*Macrolobieae*).

Une étude cladistique du genre traditionnel *Monopetalanthus* fut donc réalisée dans le but d'obtenir une hypothèse phylogénétique à son égard. À partir de la phylogénie obtenue, nous avons vérifié les hypothèses de relations proposées par Wieringa. L'analyse fut exécutée à l'aide de caractères moléculaires provenant de la séquence de l'espaceur entre les gènes chloroplastiques *psbA* et *trnH* et de la séquence de l'espaceur interne transcrit des gènes ribosomiaux nucléaires (ITS).

Les analyses cladistiques indépendantes des deux séquences d'ADN et l'analyse combinée supportent en général la taxonomie proposée par Wieringa. En effet, les espèces autrefois placées dans le genre *Monopetalanthus* qui possèdent des folioles réduites forment un clade avec le genre *Aphanocalyx*. Toutefois, l'existence du sous-genre *Antherodonthus* Wieringa du genre *Aphanocalyx* n'est pas supportée. Les espèces de *Monopetalanthus* possédant une foliole entière, mais mucronée en position sub-apicale forment un clade dérivé du genre *Tetraberlinia*. Finalement, *Monopetalanthus longiracemosus* se retrouve dans le clade des *Tetraberlinia*, ce qui appuie son transfert dans ce genre.

En conclusion, l'utilisation de données moléculaire nous a permis d'obtenir une phylogénie supportée par un nombre élevé de caractères dans un groupe de légumineuses tropicales où l'échantillonnage de matériel par espèces est limité. La phylogénie moléculaire de *Monopetalanthus* démontre sa nature polyphylétique, confirmant ainsi le transfert des espèces qu'il contient à d'autres genres. Il en résulte la réduction en synonymie du nom *Monopetalanthus*.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>III</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>X</b>
<b>CONSIDÉRATION SUR LA DÉLIMITATION DES TRIBUS DE LA SOUS-FAMILLE DES CAESALPINIOIDEAE</b> .....	<b>1</b>
INTRODUCTION .....	1
Délimitation des tribus .....	2
Monophylie des tribus.....	4
<i>Caesalpinieae</i> .....	5
<i>Cassieae</i> .....	6
<i>Cercideae</i> .....	7
<i>Detarieae</i> et <i>Macrolobieae</i> .....	8
La tribu des <i>Macrolobieae</i> .....	9
Problèmes dans le groupe.....	10
Flores régionales.....	11
Grand genre sous révision.....	11
CONCLUSION .....	12
<b>MOLECULAR SYSTEMATICS OF <i>MONOPETALANTHUS</i> HARMS (FABACEAE:CAESALPINIOIDEAE: MACROLOBIEAE) AND RELATED GENERA</b> .....	<b>13</b>
RÉSUMÉ .....	13
ABSTRACT .....	14
INTRODUCTION .....	15
MATERIALS AND METHODS.....	18
Taxon sampling .....	18
Molecular methodology .....	22
Analyses.....	23
RESULTS .....	25
<i>PsbA-trnH</i> .....	25



ITS of the nuclear ribosomal region .....	26
Congruence of data sets .....	30
Combined analysis .....	33
DISCUSSION .....	36
<i>Tetraberlinia</i> (Harms) Hauman .....	37
<i>Aphanocalyx</i> (Oliv.) Wieringa.....	39
<i>Bikinia</i> Wieringa .....	40
Problematic Taxa.....	40
CONCLUSION .....	41
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>43</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>44</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XIV</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1:</b> Caractères morphologiques distinctifs des tribus de Caesalpinioideae .....	<b>3</b>
<b>Tableau 2.1 :</b> List of specimens studied in a molecular phylogenetic analysis of <i>Monopetalanthus</i> and its close relatives .....	<b>19</b>
<b>Tableau 2,2 :</b> Amplification conditions .....	<b>22</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> : L'organisation des pétales dans les trois sous-familles de Légumineuses.....	<b>2</b>
<b>Figure 2.1</b> : Distribution of <i>Aphanocalyx</i> , <i>Bikinia</i> , <i>Icuria</i> , <i>Michelsonia</i> and <i>Tetraberlinia</i> .....	<b>16</b>
<b>Figure 2.2</b> : Secondary structure of the DNA forming a hairpin structure near the site of the chloroplast inversion located in the spacer between the <i>psbA</i> and <i>trnH</i> genes.....	<b>26</b>
<b>Figure 2.3</b> : One of the most parsimonius trees obtained from <i>psbA-trnH</i> sequence analysis (L=265, CI=0.689 and RI=0.729) .....	<b>27</b>
<b>Figure 2.4</b> : Strict consensus of the chloroplast <i>psbA-trnH</i> sequences analysed in species of the former genus <i>Monopetalanthus</i> and its close relatives.....	<b>28</b>
<b>Figure 2.5</b> : Strict consensus obtained from the cladistic analysis of the nuclear ITS sequences in species of the former genus <i>Monopetalanthus</i> and its close relatives.....	<b>31</b>
<b>Figure 2.6</b> : Strict consensus from the combined analysis of the <i>psbA-trnH</i> chloroplast spacer and nuclear ITS of the former genus <i>Monopetalanthus</i> and its close relatives.....	<b>34</b>
<b>Figure 2.7</b> : Cladogram of the morphological analysis of species of <i>Aphanocalyx</i> , <i>Bikinia</i> , <i>Icuria</i> and <i>Tetraberlinia</i> as presented by Wieringa (1999) .....	<b>37</b>
<b>Figure 2.8</b> : Comparative diagram of the results obtained from the morphological and the molecular analyses.....	<b>38</b>

## Considération sur la délimitation des tribus de la sous-famille des *Caesalpinioideae*

"The Caesalpinioideae known to us as living organisms are rich in morphologically isolated types which suggest terminal branches of a phylogenetic tree hidden from our eyes by the passage of ages."

Irwin et Barneby (1981)

### Introduction

Les vingt dernières années furent prospères dans les études phylogénétiques des grands groupes taxonomiques. La famille des Légumineuses ne fut pas laissée de côté. Déjà huit volumes d'une série consacrée entièrement aux Légumineuses sont parus sous les presses du Royal Botanic Garden, Kew, et un neuvième est présentement en cours d'édition (Polhill et Raven, 1981a, 1981b; Stirton, 1987; Herendeen et Dilcher, 1992; Sprent et Mckey, 1994; Ferguson et Tucker, 1994; Crisp et Doyle, 1995; Pickersgill et Lock, 1996; Herendeen et Bruneau, in press).

La famille des Légumineuses contient environ 18 000 espèces réparties en trois sous-familles. Les trois sous-familles reconnues à ce jour sont les *Papilionoideae*, les *Mimosoideae* et les *Caesalpinioideae*. Ces sous-familles se différencient principalement par la position des pétales les uns par rapport aux autres (figure 1). Depuis quelques années, les *Caesalpinioideae* sont considérées comme basales dans la famille et seraient à l'origine des deux autres sous-familles (Polhill *et al.*, 1981).

Le présent chapitre a pour but de faire un résumé des connaissances que nous possédons à ce jour sur la phylogénie d'une des sous-familles des Légumineuses, les *Caesalpinioideae*. Une attention particulière sera portée à deux des cinq tribus reconnues présentement, soit les *Detarieae* et les *Macrolobieae*. Cette occasion sera utilisée également pour poser une question plus globale: est-ce que nos connaissances actuelles sont suffisantes pour modifier la taxonomie des *Caesalpinioideae*.

**Figure 1 :** L'organisation des pétales dans les trois sous-familles de Légumineuses.

A) Schémas représentant l'organisation selon la sous-famille lorsque aucun pétale n'est manquant. (tiré de Tucker, 1989).  
B) Exemples où l'organisation est bien distincte. Les photos proviennent du CD-rom offert lors du XIV IBC, St-Louis

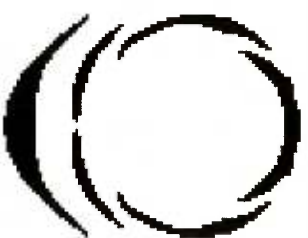
**Papilionoideae**



**Mimosoideae**



**Caesalpinioideae**



A)

B)



### Délimitation des tribus

Il existe, de façon générale chez les angiospermes, très peu de critères qui sont spécifiques à la définition d'une sous-famille ou d'une tribu. La grandeur de la famille et sa diversité morphologique semblent les seuls critères importants (Lawrence, 1951; Judd *et al.*, 1999). Avec plus de 154 genres et une grande diversité morphologique, la sous-famille des *Caesalpinioideae* se divise en cinq tribus: les *Caesalpinieae*, *Cassieae*, *Cercideae*, *Detarieae* et *Macrolobieae*. Les caractères qui distinguent les tribus varient entre elles (Tableau 2). Avec la grande plasticité de forme observée chez les *Caesalpinioideae*, il arrive souvent qu'un groupe se distingue par la fixation d'un caractère qui est variable chez les autres groupes. Par exemple, la sous-tribu des *Dialiinae* (*Cassieae*) est caractérisée par un fruit modifié en drupe ou samare. Par contre, cet état de caractère apparaît de façon sporadique chez les *Detarieae*.

**Tableau 1.1:** Caractères morphologiques distinctifs des tribus de *Caesalpinioideae*.

Tribu	Caractères morphologiques distinctifs
Caesalpinieae	aucun caractère unique au niveau de la tribu
Cassieae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absence d'hypanthium</li> <li>• anthère s'ouvrant par une fente longitudinale ou un pore apicale</li> <li>• sépales libres</li> </ul>
Cercideae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• feuilles simples, bilobées à nervation palmée</li> <li>• sépales soudés</li> <li>• hypanthium profondément lobé</li> <li>• trois marques ou cicatrices sur les graines</li> </ul>
Detarieae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stipules interpétiolaires,</li> <li>• cellules de transfert dans le phloème de la feuille</li> <li>• bractées relativement bien développées</li> </ul>
Macrolobieae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• les bractéoles enveloppent le bouton floral jusqu'à l'anthèse</li> </ul>

## Monophylie des tribus

Pour commencer cette section, j'aimerais définir les termes suivants: monophylétique, paraphylétique, polyphylétique ainsi que taxon naturel car ces concepts reviennent constamment dans le texte. Un groupe monophylétique est un groupe d'espèces qui provient d'une espèce ancestrale et qui inclut cette espèce et toutes les espèces provenant de cette espèce ancestrale (Hennig, 1979). Le qualificatif de monophylétique, applique seulement à des groupes dans un système hiérarchique, donc les catégories plus grande que l'espèce (Davis, 1997). Un groupe paraphylétique est un groupe d'espèces qui inclut l'espèce ancestrale mais ce groupe ne comprend pas tous les descendants de cette espèce. Les opinions varient pour savoir si les groupes paraphylétiques doivent être ou ne pas être reconnus de façon taxonomique (Sosef, 1997; van Welzen, 1997; Brummitt et Sosef, 1998). Un groupe polyphylétique est un groupe d'espèces dont l'ancêtre commun le plus proche ne fait pas partie du groupe (Rieseberg et Brouillet, 1994). Les groupes polyphylétiques sont indésirables en taxonomie car ils ne reflètent que des homoplasies. Pour ce qui est de l'expression de taxon naturel, elle désigne un groupe taxonomique qui est le produit naturel de l'évolution i.e. les groupes monophylétiques (Donoghue et Cantino, 1988).

Les changements dans la classification reflètent l'avancement de nos connaissances phylogénétiques (Dominguez et Wheeler, 1997). Chez les Légumineuses, la plupart des révisions taxonomiques ont porté sur la redéfinition de genres ou la relation entre petits groupes de genres (par exemple, Pellegrin, 1942; Troupin, 1950; Ding hou, 1994) au fur et à mesure que de nouvelles espèces étaient découvertes. Des études de plus grande ampleur ont tout de même été publiées (Polhill, 1981). Pettigrew et Watson (1977), puis Watson (1981), ont accumulé un grand nombre de données morphologiques sur les *Caesalpinioideae*. Ils utilisèrent ces données dans une analyse taxonomique dont le but principal était de produire une clef d'identification.

Des études cladistiques utilisant des données provenant de nombreuses sources ont amélioré nos connaissances sur les relations entre les tribus (Tucker et Douglas, 1994; Chappill, 1995; Kaas et Wink, 1996; Doyle *et al.*, 1997; Bruneau *et al.*, 2000). Dans la plupart de ces études, un nombre assez limité de taxons fut utilisé. Ces résultats, basés sur des données ontogénétiques, morphologiques, cytologiques et moléculaires, ont permis d'avoir un bon aperçu des relations phylogénétiques existantes à l'intérieur des *Caesalpinioideae*. même si les résultats de ces études peuvent diverger (Doyle, 1994).

### *Caesalpinieae*

La tribu des *Caesalpinieae*, telle que reconnue par Pohill et Vidal (1981), comprend 340 espèces réparties en 47 genres. Selon Tucker et Douglas (1994), il n'existe pas de caractère autopomorphique définissant la tribu. Il s'agirait d'un amalgame de petites tribus reconnues dans le passé, soit les *Dimorphandreae* Bentham, *Sclerolobieae* Bentham, *Caesalpinieae* End et *Poeppigieae* Britton et Rose. Pohill et Vidal (1981) reconnaissent toutefois huit groupes de genres délimités par des caractères pratiques et non à partir de considérations phylogénétiques. Certains de ces groupes correspondent grossièrement aux tribus reconnues dans les études antérieures (Hutchinson, 1964; Steenis, 1975; Robertson et Lee, 1976; 1930).

Selon l'hypothèse de l'évolution des *Caesalpinioideae* de Polhill *et al.* (1981), les *Caesalpinieae* ne seraient pas une tribu naturelle. Selon ces auteurs, cette tribu serait à l'origine des *Mimosoideae*, des *Papilionoideae* et des *Detarieae/Macrolobieae*. Les analyses ontogénétiques de Tucker et Douglas (1994) appuient cette interprétation. L'analyse moléculaire effectuée sur l'intron du gène chloroplastique *trnL* (Bruneau *et al.*, 2000), qui comprend un échantillonnage taxonomique plus étendu que les analyses précédentes, présente bien la nature polyphylétique de cette tribu, mais ne supporte pas l'hypothèse selon laquelle elle serait à l'origine des tribus *Detarieae/Macrolobieae* ni de la sous-famille des *Papilionoideae*. Selon une analyse phylogénétique produite en se basant sur l'intron *trnL*,



aucun des regroupements génériques de Polhill et Vidal (1981) n'a été retrouvé. Le seul groupement se rapprochant d'un clade naturel est le groupe des *Caesalpinia*. Dans deux différentes analyses, le groupe *Caesalpinia* n'est pas supporté à cause de la présence de *Pterogyne* (Bruneau *et al.*, 2000) et de *Poeppegia* (Chappill, 1994), deux genres monospécifique d'Amérique, uniques représentants de leur groupe taxonomique respectif. Malheureusement, ces deux taxons n'ont pas été utilisés dans l'étude phylogénétique effectuée sur le groupe des *Caesalpinia* par Lewis et Shrire (1995).

La tribu des *Caesalpinieae* est polyphylétique. Non seulement est-elle à la base de la sous-famille des *Mimosoideae* (Polhill *et al.*, 1981; Luckow, 1999; Bruneau *et al.* 2000), mais en plus, certains membres de la tribu des *Cassieae* sont enchevêtrés dans les *Caesalpinieae* (Chappill, 1995; Bruneau *et al.*, 2000). Des études phylogénétiques supplémentaires sont nécessaire avant de pouvoir proposé une nouvelle taxonomie pour cette tribu.

### *Cassieae*

La tribu des *Cassieae* comprend environ 600 espèces réparties inégalement en 20 genres (deux genres, *Senna* Mill. et *Chamaecrista* Moench., comptent 490 des espèces). Les caractéristiques florales qui distinguent la tribu des *Cassieae* des autres tribus des *Caesalpinioideae* sont l'absence d'hypanthium ou la présence d'un hypanthium très court, des anthères s'ouvrant par une fente latérale ou plus souvent par un pore apical ou basal, et par la présence de sépales libres (Cowan, 1981).

Lors d'une révision des *Cassieae*, Irwin et Barneby (1981;1982) créent, pour satisfaire la diversité observée, cinq sous-tribus dont trois totalisent quatre espèces. Irwin et Barneby (1981) mentionnent que les cinq sous-tribus proposées méritent le rang de tribus. Cependant, ils craignent qu'un tel changement taxonomique diminue la valeur allouée au statut de tribu.

Toutes les analyses cladistiques, sans exception, présentent la tribu des *Cassieae* comme un groupe polyphylétique. La seule sous-tribu qui semble monophylétique est la sous-tribu des *Dialiinae* (Tucker 1998; Bruneau *et al.*, 2000) caractérisée, entre autres, par un fruit modifié en drupe ou samare (Irwin et Barneby, 1981). D'après les analyses moléculaires, la sous-tribu des *Labicheinae*, bien que moins étudiée, serait elle aussi monophylétique (Tucker, 1998). La sous-tribu *Cassinieae*, qui inclut les deux plus gros genres de la tribu, *Senna* et *Chamaecrista*, ainsi que le genre *Cassia*, est paraphylétique. Une étude de l'ontogénèse florale indique que les ressemblances florales entre les trois genres de la sous-tribu *Cassinieae* résulterait d'une convergence évolutive et non d'un réel lien phylogénétique (Tucker, 1996).

L'étroite parenté entre les *Cassieae* et les *Caesalpinieae* doit être prise en considération dans une future révision taxonomique de ces groupes.

### *Cercideae*

La tribu des *Cercideae* est présentement formée de cinq genres: *Cercis* L. (6 sp), *Griffonia* Baill. (4 sp), *Adenolobus* (Harv. ex Benth) Torre & Hillcoat (2 sp), *Brenierea* Humbert (1 sp) et *Bauhinia* L. (225 sp). La tribu des *Cercideae* se distingue, entre autres, par des feuilles simples, souvent bilobées et à nervation palmée, par des sépales joints au-dessus de l'hypanthium, par un hypanthium profondément lobé ou spatulé et par des graines dont le funicule et le micropyle sont situés du même côté que la région hilaire (Capitaine, 1912; Wunderlin *et al.*, 1981).

La tribu des *Cercideae* fut l'objet de plusieurs remaniements taxonomiques causé par la présence de caractères archaïques dans la structure foliaire et la ressemblance superficielle de ses fleurs avec celles de la sous-famille des *Papilionoideae* (Wunderlin, 1979).

Les genres *Bauhinia* et *Cercis* sont les seuls représentant de la tribu des *Cercideae* utilisés lors des différentes analyses phylogénétiques. Ces deux genres forment toujours un clade monophylétique qui semble être l'une des

premières lignées à être apparues chez les Légumineuses (Kaas et Wink 1992; Doyle, 1994a; Doyle, 1997; Chappill, 1997). Les données paléontologiques semble aussi supporté cette théorie (Herendeen *et al.*, 1992). Les données ontogénétiques indiquent cependant que la tribu des *Cercideae* serait une tribu plus évoluée au cœur de la sous-famille des *Caesalpinioideae* (Tucker et Douglas, 1994).

### *Detarieae* et *Macrolobieae*

Les deux autres tribus, *Detarieae* et *Macrolobieae*, comptent pour plus de la moitié des genres de la sous-famille. Ces deux tribus sont proches parentes et elles sont souvent traitées comme un seul groupe (Polhill, 1994). Elles se différencient assez clairement des autres *Caesalpinioideae* par des caractères végétatifs tels que des stipules interpétiolaires, des cellules de transfert dans le phloème de la feuille et des bractées relativement bien développées (Cowan et Polhill, 1981). Ce dernier caractère est à la source de la séparation des deux tribus. En plus d'être bien développé, les bractées des *Macrolobieae* recouvrent le bourgeon florale jusqu'à l'anthèse.

Ces deux tribus ont été l'objet de plusieurs révisions taxonomiques au cours du siècle (Harms, 1915; Baker, 1930; Léonard, 1957; Hutchinson, 1964; Cowan et Polhill, 1981; Breteler, 1995). Le nombre de genres formant ces tribus a grandement augmenté pendant ce temps, passant de 31 en 1915 à plus de 80 aujourd'hui. Les caractères morphologiques qui servaient à diviser les tribus au début du siècle s'avèrent inappropriés pour bien définir les deux tribus avec l'ajout ces nouvelles espèces.

Les *Detarieae* et *Macrolobieae* sont souvent sous-représentés dans les études phylogénétiques. Ces deux tribus se regroupent toujours ensemble pour former un clade bien délimité, mais dans lequel elles ne sont pas distincte l'une de l'autre. L'analyse phylogénétique, utilisant l'intron du gène chloroplastique *trnL* de Bruneau *et al.* (2000), est la seule étude cladistique s'appuyant sur un échantillonnage élaboré de *Detarieae* et *Macrolobieae*. Plus de 130 espèces représentant 79 genres de *Detarieae* et

*Macrolobieae* ont servi à l'analyse. D'après les théories évolutives de Polhill *et al.*, 1981, la tribu des *Macrolobieae* dériverait des *Detarieae*. L'analyse de l'intron chloroplastique supporte cette théorie. Dans l'analyse de Bruneau *et al.* (2000), les *Detarieae* apparaissent comme une tribu polyphylétique. Aucun des groupements informels reconnus par Cowan et Polhill (1981) dans les *Macrolobieae* et *Detarieae* y apparaissent comme étant monophylétiques.

### La tribu des *Macrolobieae*

La tribu des *Macrolobieae* comprend 23 genres d'arbres tropicaux majoritairement africains. La tribu se différencie des *Detarieae* par le fait que les bractéoles enveloppent le bouton floral jusqu'à l'anthèse, remplaçant la fonction protectrice des sépales (Breteler, 1995).

Breteler (1995) révisa la composition des *Detarieae* et les *Amherstieae* (*Macrolobieae*) dans le but de rendre les deux tribus plus naturelles. Il reconnut une nouvelle tribu, les *Macrolobieae*, qui comprend la majorité des anciens *Amherstieae*. Les *Amherstieae* se distinguent des *Macrolobieae* par le fait que les bractéoles y sont valvaires, mais ne protègent pas obligatoirement le bourgeon floral jusqu'à l'anthèse. Il en résulta un transfert de 3 genres vers les *Detarieae* (*Amherstia*, *Tamarindus* et *Humboldtia*). Breteler et Wieringa (1999) ont récemment présenté de nouveaux groupements de genres à l'intérieur des *Macrolobieae*. Cette classification n'est pas encore publiée.

Les études moléculaires récentes n'ont pas supporté la monophylie de la tribu des *Macrolobieae* (Bruneau *et al.*, 2000). Le genre américain *Macrolobium* forme un clade avec des *Detarieae* américaines. De plus, plusieurs genres de *Macrolobieae* forment une polytomie avec des représentants de la tribu des *Detarieae*. Un des clades obtenu à l'intérieur des *Macrolobieae*, à partir de l'analyse de l'intron chloroplastique, comprend les représentants étudiés et discutés au chapitre 2.

Dans l'étude de Chappill (1995), le groupe *Amherstia* (principalement représenté par *Tamarindus*) se positionne curieusement à la base des *Mimosoideae*. Pour expliquer ce résultat insolite, Chappill explique que plusieurs des caractères qui placent *Amherstia* à cette position n'ont pas été évalués dans le reste des *Amherstieae*. Elle écrit qu'aucune conclusion taxonomique ne peut être déduit à partir de ces résultats à cause du manque d'information et de stabilité des résultats obtenus. Le projet d'étude de Chappill a été créé comme un projet à plus long terme. Déjà de nouveaux résultats ont été obtenus en utilisant des caractères additionnels et *Amherstia* ne se retrouve plus comme groupe frère des *Mimosoideae* (Doyle et Chappill, 1999).

## Problèmes dans le groupe

### Manque de matériel

Un problème majeur lorsqu'on veut examiner la taxonomie de la sous-famille est le manque de matériel. La plupart des espèces sont des arbres tropicaux, souvent très grands. Cela rend la cueillette de spécimens en fleurs plus difficile (Wieringa 1994). Ce problème est particulièrement notable pour les *Macrolobieae* qui se trouvent dans des régions souvent difficiles d'accès en Afrique tropicale.

### Réduction des caractères floraux

La tribu des *Macrolobieae* est caractérisée par des séries de réduction des organes floraux (perte ou réduction de sépales et pétales). Les bractéoles, qui protègent le bourgeon floral jusqu'à l'anthèse, remplacent les sépales (et pétales) dans leur fonction de protection des organes reproducteurs, relâchant ainsi la pression évolutive sur ces organes. Les réductions du calice et de la corolle ne sont pas des événements automorphiques délimitant des groupe précis mais plutôt des homoplasies qui peuvent parfois être reconnues par des études ontogénétiques (Tucker, 1999).

En plus de la difficulté d'obtenir des spécimens, les études morphologiques nécessitent l'utilisation d'un grand nombre de spécimens afin d'observer les variations intraspécifiques. Dans une étude moléculaire, un seul spécimen bien identifié peut suffire pour obtenir un nombre élevé de caractères. De plus, les fragments de feuilles sont suffisants pour obtenir l'ADN nécessaire aux études moléculaires.

### Flores régionales

Un autre problème concernant les *Macrolobieae* (et la sous-famille en général) vient du fait que la plupart des traités de taxonomie portent sur des flores locales qui ne présentent qu'une partie de la diversité des groupes taxonomiques. La délimitation taxonomique des genres ou des groupes de genres d'une région floristique ne représente pas toujours adéquatement la diversité présente dans tout le groupe. Il en résulte qu'au fur et à mesure que des nouvelles espèces sont découvertes, la taxonomie du groupe doit être revue.

### Grand genre sous révision

En grande partie, les genres de *Macrolobieae* qui comprennent plusieurs espèces, ont besoin d'être redéfinis. Des études portant sur *Berlinia* Hook.f. et Benth. (Mackinder, 1999), *Brachystegia* Benth. (Chikuni, 1996) et *Monopetalanthus* Harms (Wieringa, 1999 et voir chapitre 2) sont présentement en cours. Plusieurs autres genres méritent des révisions sérieuses, par exemple *Julbernardia* Pellegr. qui doit être redéfini avec ou sans *Julbernardia pellegriniana* (*Paraberlinia pellegriniana*), et *Anthonotha* P. Beauv. qui ne semble pas monophylétique dans les analyses moléculaires (Bruneau et al., 2000; voir chapitre 2).

*Monopetalanthus* Harms est un des genres qui est actuellement en révisions (Wieringa, 2000; voir chap 2). Il s'agit du cinquième genre en importance dans la tribu après *Macrolobium* Schreb., *Brachystegia* Benth., *Anthonotha* P. Beauv. et *Gilbertiodendron* J.Leon. L'échantillonnage et le manque de matériels récoltés ont fait en sorte que des espèces montrant des homoplasies furent regroupées ensemble pour former le genre

*Monopetalanthus*. Des analyses morphologiques récentes ont soulevé ce point (Wieringa, 1999; Tucker 1999). Les analyses moléculaires en cours vont aider à mieux identifier les groupes naturels à l'intérieur du genre.

## **Conclusion**

La sous-famille des *Caesalpinioideae* est un groupe très ancien et très diversifié. La difficulté à obtenir du matériel suffisant et le nombre croissant d'espèces décrites expliquent le besoin de nouvelles révisions taxonomiques. Les connaissances actuelles ne sont pas suffisantes pour produire une nouvelle taxonomie du groupe.

Par contre, nous savons clairement quels sont les groupes qui ont besoin d'être révisés. De façon générale, les tribus *Caesalpinieae* et *Cassieae* doivent être travaillées conjointement à cause de leurs relations phylogénétiques. Les trois genres des *Cercideae* jamais inclus dans les analyses doivent être ajoutés à une analyse globale afin de s'assurer de la monophylie des *Cercideae*. Un autre problème est la délimitation entre les *Detarieae* et les *Macrobieae*. La séparation ou la fusion de ces deux tribus doit être confirmée par une étude phylogénétique.

Les problèmes taxonomiques rencontrés dans la sous-famille des *Caesalpinioideae* ne touchent pas seulement la délimitation des tribus ou de leur interrelation mais également la circonscription des grands genres et la relation entre genres apparentés. Les études en cours commencent à résoudre une partie des problèmes et le neuvième volume de *Advances in Legumes Systematic*, prévu pour la fin de l'année nous révélera les nouvelles connaissances acquises récemment dans le domaine.

**Molecular systematics of *Monopetalanthus* Harms  
(Fabaceae:Caesalpinioideae: Macrolobieae) and related  
genera**

G.Y. Fannie Gervais and Anne Bruneau

Département de Sciences Biologiques, Institut de Recherche en Biologie  
Végétale, Université de Montréal,  
4101 Sherbrooke Est, Montréal, PQ, Canada, H1X 2B2

**Résumé.**

L'espaceur ITS des gènes ribosomiques nucléaires et l'espaceur chloroplastique *psbA-trnH* sont utilisés pour évaluer la nouvelle taxonomie de *Monopetalanthus* proposée par Wieringa. La phylogénie obtenue par les analyses séparées et combinée des deux séquences démontre clairement la nature polyphylétique du genre *Monopetalanthus*. Les données moléculaires supportent le transfert de *M. longiracemosus* vers le genre *Tetraberlinia*, ainsi que la création du nouveau genre *Bikinia*, mais avec une exception. L'espèce *Bikinia congensis* possède des clones d'ITS très différents des autres espèces du genre *Bikinia*. De plus, les analyses de parcimonie placent cette espèce avec les extra-groupes. Les données moléculaires ne supportent pas la nouvelle délimitation du genre *Aphanocalyx*, proposée par Wieringa(1999), qui inclut les espèces de *Monopetalanthus* présentant un foliole réduit du côté distal. Ce genre n'est pas monophylétique à cause du sous-genre *Antherodonthus* qui forme un clade avec *Julbernardia pellegriniana* et non avec le reste des espèces du genre *Aphanocalyx*. Les analyses moléculaires appuient la taxonomie de Wieringa qui dissout le genre *Monopetalanthus* pour répartir ses espèces dans d'autres genres.



**Abstract.**

The ITS of the nuclear ribosomal gene and the chloroplast *psbA-trnH* spacer were used to assess the new taxonomy of *Monopetalanthus* proposed by Wieringa. The phylogeny obtained by the analysis of the two sequences, separate or combined, clearly indicates the polyphyletic nature of *Monopetalanthus*. The molecular data support the transfer of *M. longiracemosus* to *Tetraberlinia* and the creation of the new genus *Bikinia*, but with one exception. The new species *Bikinia congensis* provides ITS clones clearly different from those of the other *Bikinia*. In the parsimony analysis, this species occurs in the outgroup taxa. The molecular data do not support the new definition of *Aphanocalyx*, which in the new classification includes all the previous *Monopetalanthus* species having leaflets with a marginal vein. The subgenus *Antherodontus* of *Aphanocalyx* forms a clade with *Julbernardia pellegriniana* and not with the rest of *Aphanocalyx*. However, in general the molecular phylogeny strongly supports the taxonomy of Wieringa in subdividing the genus *Monopetalanthus* into distinct groups, none of which retain the name *Monopetalanthus*.

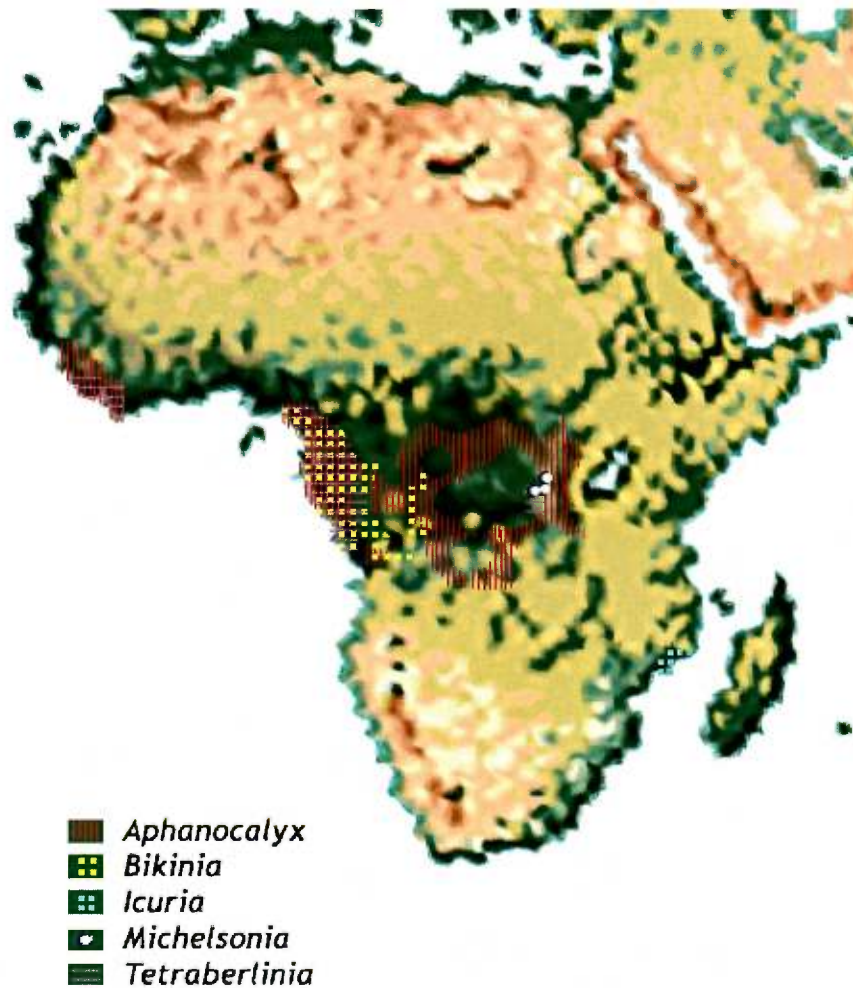
## Introduction

The genus *Monopetalanthus* Harms (Caesalpinioideae: Macrolobieae) consisted of 17 species (Lock, 1989) of trees growing in west tropical Africa (Figure 1). The genus was one of the 23 genera placed in tribe Macrolobieae of the Caesalpinioideae. In a recent taxonomic revision, Wieringa (1999) divided the genus into three different genera: ten species were transferred to the previously known genus *Aphanocalyx* Oliver, one species, *M. longiracemosus*, was transferred to the genus *Tetraberlinia* (Harms) Hauman, and the six others species became the new genus *Bikinia* Wieringa.

Morphological studies had already suggested that *Monopetalanthus* could be distinguished into at least two groups, but those groups were never taxonomically acknowledged (Pellegrin, 1942; Léonard, 1957). The main vegetative character separating the two groups was leaflet morphology.

When the genus *Monopetalanthus* (with *M. pteridophyllus*) was first recognised (Engler and Prantl, 1897; Harms, 1899), it was described as having "the upper border of the leaflet reduced to become parallel with the leaflet rachis" thus describing a leaflet with a marginal vein. The generic description of *Monopetalanthus* was broadened by Hutchinson and Dalziel (1928) when they described *M. emarginatus*. This species was described from two herbarium specimens, one with fruit from Sierra Leone, and a sterile one collected in Ivory Coast, both wrongly identified as *M. pteridophyllus*. These specimens did not respect the original definition of the genus in terms of their leaflet morphology. Instead, their leaflets were described as having an "apex emarginate mucronated on either side..." thus broadening the generic definition to include species with a mid-vein on their leaflets.

**Figure 2.1:** Distribution map of *Aphanocalyx*, *Bikinia*, *Icuria*, *Michelsonia* and *Tetraberlinia*.



Pellegrin (1942) acknowledged that *M. emarginatus* had been wrongly defined. A new specimen collected in Ivory Coast had the same leaflets as *M. emarginatus*, but this new specimen had flowers of *Hymenostegia* (Benth) Harms, a genus from the closely related tribe Detarieae. Thus, *M. emarginatus* became synonymous with *Hymenostegia emarginata*. But Pellegrin also mentioned that Le Testu had found flowers in Gabon from a specimen with leaflets similar to those of *M. emarginatus*, but with flowers similar to those of *Monopetalanthus*. The name *M. emarginatus* was retained for the Gabon specimen.

In his taxonomic revision, Wieringa (1999) grouped into the new genus *Bikinia*, species of *Monopetalanthus* having a medial mid-vein on their leaflets. The only exception is *M. longiracemosus* which was transferred to the genus *Tetraberlinia* on the basis of a variety of characters, including stipule and sepal morphology, anther colour, and pod texture.

The other species, those which respected the original description of the genus with respect to leaflet morphology, were united with *Aphanocalyx* (Oliver, 1870), a small genus of three species endemic to west tropical Africa whose relationship with *Monopetalanthus* had already been acknowledged (Léonard, 1956). This transfer resulted in the loss of the name *Monopetalanthus* because the name *Aphanocalyx* preceded it.

The goal of this study is to examine the phylogenetic relationships of the traditionally described genus *Monopetalanthus* using molecular data and to test relationships as proposed by Wieringa (1999). The taxa analysed include most of the species traditionally known as *Monopetalanthus* and also newly described species of *Aphanocalyx* and *Bikinia* (Wieringa, 1999). The taxon selection was limited because some species may be extinct or critically endangered. This study was done using sequences from the internal transcribed spacer of the nuclear 18S-26S ribosomal gene (ITS) and the chloroplast *psbA-trnH* spacer. The nuclear ribosomal ITS region is now widely used at various taxonomical levels: from closely related species to generic level relationships (for review: Baldwin *et al.*, 1995). Previous studies indicated that the chloroplast *psbA-trnH* spacer also could provide, in addition to its point mutations, phylogenetically informative insertion/deletion events above the species level (Sang *et al.*, 1997; Aldrich *et al.*, 1988).

## Materials and methods

### Taxon sampling

The taxa used in this study represent 17 of the 23 species included in the genera *Aphanocalyx* (Oliver) Wieringa and *Bikinia* Wieringa (genera in which *Monopetalanthus* Harms species were transferred into). When morphological variation was observed within a species, more than one specimen was used whenever possible. To verify the monophyly of *Monopetalanthus*, 19 genera which were suggested to have a close phylogenetic relationship with *Monopetalanthus* based on the chloroplast *trnL* intron sequences (Bruneau *et al.*, 2000) and on morphological studies (Cowan et Polhill, 1981; Breteler, 1995), were included. A total of 52 species and subspecies are represented by 60 specimens. The complete list of taxa included in the analysis, voucher information and GenBank sequence accession numbers are given in Table 2.1.

Taxa not used in this study due to unavailability of material, but which would have been of interest, are *Aphanocalyx jenseniae* (Gram) Wieringa (collected once in 1923, critically endangered species), *Aphanocalyx pteridophyllus* (Harms) Wieringa (the most recently collected specimen is from 1970), *Aphanocalyx richardsiae* (J. Léonard) Wieringa (the herbarium specimen of Breteler 11923 collected in 1992 did not provide DNA), *Aphanocalyx libellula* Wieringa (new species created from a unique herbarium specimen collected in 1971), *Tetraberlinia baregarum* Wieringa (new species created from part of one herbarium specimen collected in 1943, possibly extinct) and *Tetraberlinia tubmaniana* J. Léonard (last collected in 1971).

**Table 2.1:** List of specimens studied in a molecular phylogenetic analysis of *Monopetalanthus* and its close relatives.

Taxon names are based on the Wieringa (1999) taxonomy. Voucher information and Genbank accession numbers are given.

Taxon	Source and voucher*	Genbank accession	
		PsbA-trnH spacer	rDNA ITS regions
<i>Aphanocalyx</i> subgenus <i>Aphanocalyx</i>			
<i>Aphanocalyx cynometroides</i> Olivier	J.J. Wieringa 2355(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx djimnensis</i> (De Wild.) J. Léonard	F.J. Bretelet 13056(WAG)	*	**
<i>Aphanocalyx ledermannii</i> (Harms) Wieringa	J.J. Wieringa 2763(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx ledermannii</i> (Harms) Wieringa	J.J. Wieringa 1310(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx margimmerwani</i> J. Léonard	F.J. Bretelet 12346(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx microphyllus</i> subsp. <i>compactus</i> (Hutchinson ex Lane-Poole) Wieringa	F.J. Bretelet 13356(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx microphyllus</i> subsp. <i>microphyllus</i> (Harms) Wieringa	J.J. de Wilde 11635(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx microphyllus</i> subsp. <i>microphyllus</i> (Harms) Wieringa	C.E.N. Ewango 852(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx obscurus</i> Wieringa	J.J. Wieringa 1541(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx pectinatus</i> (A. Cheval.) Wieringa	F.J. Bretelet 13282(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx pectinatus</i> (A. Cheval.) Wieringa	J.J. Wieringa 3102(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx trapnellii</i> (J. Léonard) Wieringa	F.J. Bretelet 13001(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx</i> subgenus <i>Antherodontus</i> Wieringa			
<i>Aphanocalyx heidinii</i> (A. Cheval.) Wieringa	M.Pom 1832(WAG)	*	*
<i>Aphanocalyx heitzi</i> (Pellegr.) Wieringa	J.J. Wieringa 2439(WAG)	*	*
<i>Bikinia</i> Wieringa			
<i>Bikinia aciculifera</i> Wieringa	J.J. Wieringa 2920(WAG)	*	**
<i>Bikinia breynei</i> (Bamps) Wieringa	F.J. Bretelet 14198(WAG)	*	*
<i>Bikinia congensis</i> Wieringa	J.J. Wieringa 3466(WAG)	*	*
<i>Bikinia coriacea</i> (Morel ex Aubrev.) Wieringa	F.J. Bretelet 12972(WAG)	*	*
<i>Bikinia durandii</i> (F. Halle & Normand) Wieringa	J.J. Wieringa 3021(WAG)	*	*
<i>Bikinia evrardii</i> (P. Bamps) Wieringa	J.J. Wieringa 1667(WAG)	*	*
<i>Bikinia grisea</i> Wieringa	F.J. Bretelet 13334(WAG)	*	*
<i>Bikinia le-testui</i> subsp. <i>le-testui</i> (Pellegr.) Wieringa	J.J. Wieringa 2123(WAG)	*	*
<i>Bikinia le-testui</i> subsp. <i>mayumbensis</i> Wieringa	J.J. de Wilde 11088(WAG)	*	*
<i>Bikinia media</i> Wieringa	J.J. Wieringa 3125(WAG)	*	*

Table 2.1. Continued

Taxon	Source and voucher*	Genbank accession	
		PsbA-trnH spacer	rDNA ITS regions
<i>Bikinia media</i> Wieringa	J.J. Wieringa 3180(WAG)	*	*
<i>Bikinia pellegriini</i> (A. Cheval.) Wieringa	F.J. Breteler 13305(WAG)	*	*
<i>Bikinia pellegriini</i> (A. Cheval.) Wieringa	J.J. Wieringa 2828(WAG)	*	*
<i>Tetraberlinia</i> (Harms) Hauman			
<i>Tetraberlinia bifoliolata</i> (Harms) Hauman	J.J. Wieringa3304(WAG)	*	*
<i>Tetraberlinia korupensis</i> Wieringa	D. Thomas 1723 (K)	*	
<i>Tetraberlinia longiracemosa</i> (A. Cheval.) Wieringa	J.J. Wieringa 3270(WAG)	*	*
<i>Tetraberlinia moreliana</i> Aubrev	J.J. Wieringa 2366(WAG)	*	*
<i>Tetraberlinia moreliana</i> Aubrev	J.J. Wieringa 3165(WAG)	*	**
<i>Tetraberlinia moreliana</i> Aubrev.	F.J. Breteler 13097(WAG)	*	*
<i>Tetraberlinia polyphylla</i> (Harms) J.L. Léonard ex Voorh.	J.J. Wieringa 3123(WAG)	*	**
<i>Tetraberlinia polyphylla</i> (Harms) J.L. Léonard ex Voorh.	J.J. Wieringa 3151(WAG)	*	*
<i>Icuvia dimensis</i> Wieringa	Dold 3362	*	**
Outgroup taxa			
<i>Anthonotha fragrans</i> (E.G. Baker) Exell & Hillc.	F.J. Breteler 13767 (WAG)	*	
<i>Anthonoth gabunense</i> (J. Léonard) Aubrev.	F.J. Breteler 14744(WAG)	*	*
<i>Anthonotha macrophylla</i> P. Beauv.	J.J. Wieringa 2996(WAG)	*	*
<i>Anthonotha pynaertii</i> (De wild.) Exell. & Hillc.	F.J. Breteler 12781 (WAG)	*	
<i>Berlinia confusa</i> Hoyle	F.J. Breteler 13373(WAG)	*	-
<i>Brachystegia busei</i> Harms	P.S. Herendeen 20-xii-97-2(US)	*	
<i>Brachystegia laurentii</i> (De Wild.) J. Louis ex J. Léonard	J.J. Wieringa 2925(WAG)	*	
<i>Brachystegia leonensis</i> Burtt-Davy & Hutch	F.J. Breteler 13353(WAG)	*	
<i>Brachystegia longifolia</i> Benth.	P.S. Herendeen 21-xii-97-2(US)	*	*
<i>Brachystegia mildbraedii</i> Harms	J.J. de Wilde 11718(WAG)	*	*

Table 2.1. Continued

Taxon	Source and voucher*	Genbank accession	
		PsbA-trnH spacer	nrDNA ITS regions
<i>Brachystegia spiciformis</i> Benth.	P.S. Herendeen 9-xii-97-9(US)	*	*
<i>Cryptosepalum tetraphyllum</i> Benth.	F.J. Breteler 13375(WAG)	*	*
<i>Didelotia africana</i> Baill.	F.J. Breteler 12529(WAG)	*	*
<i>Didelotia brevipaniculata</i> J. Léonard	J.J. Wieringa 2412(WAG)	*	*
<i>Gilbertiodendron preussii</i> (Harms) J. Léonard	F.J. Breteler 13760(WAG)	*	*
<i>Hymenostegia talbotii</i> E. G. Baker	J.J. Wieringa 2358(WAG)	*	*
<i>Isoberlinia doka</i> Craib & Stapf	C. Jongkind 2552a (WAG)	*	*
<i>Jubbernardia brieyi</i> (De Wild.) Troupin	J.J. Wieringa 3348(WAG)	*	*
<i>Jubbernardia hochreutheri</i> Pellegr.	F.J. Breteler 13009(WAG)	*	*
<i>Jubbernardia mengis stipulata</i> (Harms) Troupin	Herendeen-15-xii-97-1(US)	*	*
<i>Jubbernardia pellegrii</i> Troupin	M. Leal 40(WAG)	*	*
<i>Librevillea klanei</i> (Pierre ex Harms) Hoyle	J.J. Wieringa 2554(WAG)	*	*
<i>Michelsonia microphylla</i> (Troupin) Hauman	Lisowski 15302	*	-
<i>Microberlinia brazzavillensis</i> A. Cheval.	J.J. Wieringa 2516a(WAG)	*	*
<i>Oddoniodendron normandii</i> Aubrev.	F.J. Breteler 12608(WAG)	*	*
<i>Pellegriniodendron diphyllum</i> (Harms) J.Léonard	F.J. Breteler 13010(WAG)	*	*



## Molecular methodology

DNA was extracted from material dried in silica gel or from herbarium specimens. Total DNA was extracted using a modified CTAB protocol from Doyle and Doyle (1987) where the initial precipitation time was extended from 3 to 7 days and the centrifugation time was extended from 10 min to 25 min at 4C to increase the yield of DNA .

PCR reactions were composed of 0.5% Taq DNA polymerase (5 Unit/ $\mu$ l) (Boehringer Mannheim), 1X Taq DNA polymerase buffer (supplied by manufacturer, containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.15mM dNTP, 0.25 $\mu$ M of each primer, and 1% total DNA, in a 50  $\mu$ l volume. PCR amplification conditions are described in Table 2.2. Amplifications were performed on a GeneAmp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems). Primers *psbA-F* and *trnH-R* from Sang *et al.* (1997) were used for the amplification and sequencing of the *psbA-trnH* spacer. The nrITS were amplified and sequenced using primers AB101 and AB102 from Sun *et al.* (1994). Additional sequencing primers were created for the ITS sequence starting in the middle of the 5,8S ribosome gene. (**5.8S-F** 5' TGAACCATCGAGTCTTGA 3'; **5.8S-R** 5' ACGTTGCGTGACACCCA 3'). PCR products were cleaned using Wizard mini-preps (Promega) or Quiaquick spin columns (Quiagen) following manufacturer instructions.

**Table 2.2 :** Amplification conditions

ITS	Chloroplast <i>psbA-trnH</i> spacer
Denaturation : 1min at 97°C	Denaturation : 2min at 95°C
Amplification (29 cycles):	Ramping Amplification (in four step):
1min at 97°C	• 5 cycles : 1min at 95°C, 1.5min at 48°C, 2.5min at 72°C
1min at 48°C	• 5 cycles : 1min at 95°C, 1.5min at 52°C, 2.5min at 72°C
3min at 72°C	• 5 cycles : 1min at 95°C, 1.5min at 54°C, 2.5min at 72°C
Extention: 7min at 72°C	• 19 cycles : 1min at 95°C, 1.5min at 56°C, 2.5min at 72°C
Final hold: 4°C	Extention: 7min at 72°C
	Final hold: 4°C

PCR products from the ITS sequences were cloned prior to sequencing as described in Forest and Bruneau (2000). The insertion lengths were determined by a 10  $\mu$ l PCR reaction, performed on a part of the colony. The amplified products were migrated on a 0,7% agarose gel containing  $5 \times 10^{-4}$  mg/ml of Ethidium Bromide. The gel was visualised under an UV lamp.

Automatic sequencing was performed on ABI prism 310 using Big Dye<sup>tm</sup> terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit from PE Applied Biosystem following instructions from the manufacturer.

## Analyses

The alignment of sequences was obtained using Clustalx (Thompson *et al.*, 1997) with a gap opening penalty of 15 and a gap length penalty of 6,66. The alignment was reviewed manually.

*PsbA-trnH* Insertions/deletions and inversions were identified in the spacer and coded as present/absent characters. A series of T's in the middle of the spacer region were omitted from the analysis because of irreproducibility in length. Phylogenetic analyses were performed on Paup\*4.0.0b2 (Swofford 1999). A preliminary analysis was performed using a full heuristic search with 100 replicates of random addition of taxa and retaining 10 trees per replicate. From the shortest trees found, a second analysis was started using TBR branch swapping. Branches with a minimum length of zero were collapsed and duplicate trees were eliminated from the set of most parsimonious trees. Trees obtained were internally validated by comparing their length with the distribution of the lengths of 10 000 randomly generated trees.

The ITS sequences obtained were submitted to a blast search in GenBank and sequences were then divided into three lots: DNA alien to the Caesalpinioideae, pseudogenes and sequences of interest. Pseudogenes were found to lack all or most of the 5,8S gene region.

The ITS sequences were analysed using all the characters in a full heuristic search with 100 replicates of random taxa addition and TBR branch swapping.

The ITS and *psbA-trnH* matrices were combined. Samples unique to one of the two analyses were removed, except for *Aphanocalyx hedinii* and *Bikinia congensis* for which the *psbA-trnH* sequences were missing. These two species were retained in the analyses because of the relationships suggested in the ITS analyses. In cases where more than one clone was obtained for the ITS analysis, the unique chloroplast sequence was combined with the different clones.

To verify whether there was a significant amount of incongruence between data sets, the test of Farris *et al.* (1995) was performed using the partition-homogeneity test as implemented in Paup\*. This test compares the sums of the lengths of the most parsimonious trees obtained in the separate analyses (D) to the distribution of the sum of length of the most parsimonious trees obtained from a random partition of the characters to form new data sets of the same size as the original ones. The probability is  $P = 1 - (S/W)$ , where W is the number of partitions tested and S is the number of partitions in which the sum of the most parsimonious trees is smaller than the value D (the sum of the lengths of the most parsimonious trees in the original data sets). The test implemented in Paup\* is a variation of the Farris *et al.* (1995) test where S is replaced by the amount of partition with a sum of the lengths of the most parsimonious trees higher than the value D. So for the incongruence to be considered not significant, the P value has to be lower than 5% instead of higher than 95% as in the original Farris Test.

The test was performed with 100 replications ( $W=100$ ). Each replication consisted of a heuristic search of 100 replicates of random taxon addition and TBR branch swapping. Tree branches were collapsed to create polytomies if the maximum branch length was equal to zero.

The test was performed a second time with the same parameter but without the species *Aphanocalyx hedinii* and *Bikinia congensis* from which the chloroplast sequence were missing.

The combined analysis, using all the characters, was performed using a full heuristic search with 100 replications of random taxon additions and TBR branch swapping. Gaps and inversions in the *psbA-trnH* sequence were coded as

present/absent characters. Tree length obtained was compared with the distribution of 100 000 randomly generated trees.

## Results

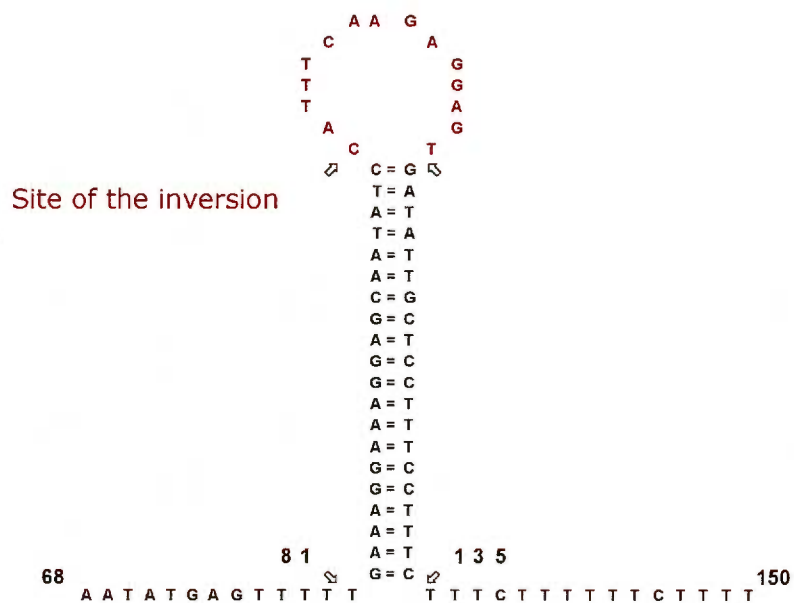
### *PsbA-trnH*

A total of 57 specimens were sequenced for the *psbA-trnH* spacer. Sequence length varied from 307 bp in *Michelsonia microphylla* to 493 bp in *Aphanocalyx ledermannii*. Most other sequences varied in length from 430 bp to 460 bp. The spacer provided 160 variable characters of which 76 were parsimony informative. Of those, 23 were insertion, deletion or duplication events, and one was an inversion of 15 bp (Figure 2.2)(Aldrich *et al.* 1988) ; they were coded as present/absent characters. The end points of the inversion are found within the loop of a conserved hairpin structure (Figure 2.2). All angiosperm sequences deposited in the GenBank database have a conserved stem sequence for this hairpin structure. However, the sequence of the loop area is not conserved among groups of angiosperm.

In the first analysis, 3 trees that had a length of 266 steps were found. TBR branch swapping was performed on those trees and 503 distinct trees of 265 steps were found with CI=0.689 and RI=0.729. A single most parsimonious tree is shown in Figure 2.3. The character requiring the highest amount of steps to be optimised (CI low) is the inversion. Figure 2.4 shows the strict consensus obtained from all most parsimonious trees; species previously known as *Monopetalanthus* are shown in bold. The *psbA-trnH* chloroplast spacer provided only a low level of resolution.

The chloroplast spacer clearly presents *Monopetalanthus* as polyphyletic. All the representatives of *Monopetalanthus* are within a largely unresolved clade formed by *Aphanocalyx*, *Bikinia*, *Brachystegia*, *Icuria*, *Julbernardia*, *Michelsonia*, *Microberlinia* and *Tetraberlinia*. This relationship was previously obtained in the analysis of the *trnL* spacer by Bruneau *et al.* (2000). The new genus *Bikinia*, including some *Monopetalanthus* species and some newly described species (Wieringa, 1999), is grouped with the genus *Tetraberlinia* in an unresolved clade. The genus *Aphanocalyx*, which includes the remaining *Monopetalanthus* species, is not supported as monophyletic in the strict consensus.

**Figure 2.2 :** Secondary structure of the DNA forming a hairpin structure near the site of the chloroplast inversion located in the spacer between the *psbA* and *trnH* genes. The sequence shown is that of *Aphanocalyx microphyllus* ssp. *compactus*.



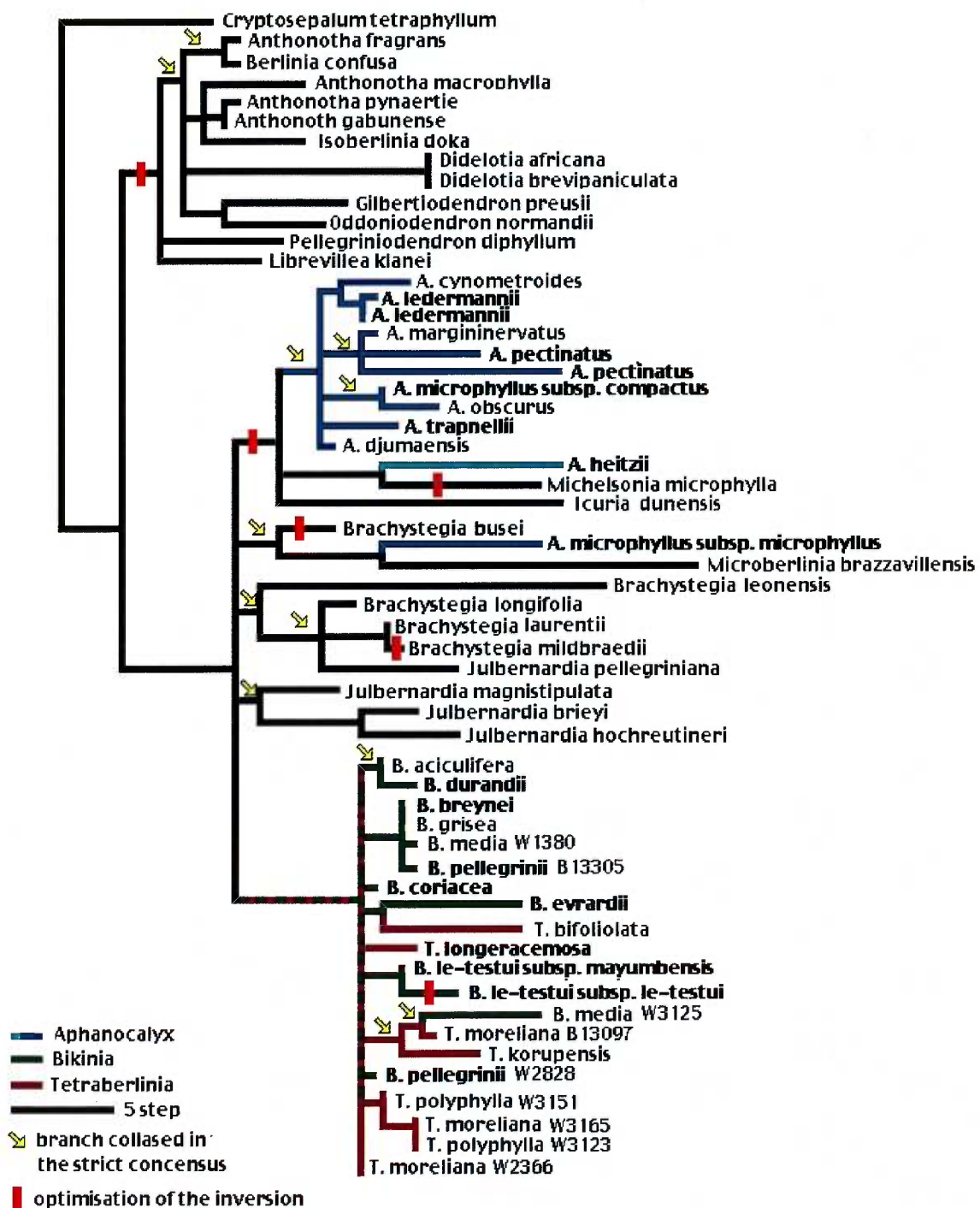
The randomly generated trees produced a shortest tree of 414 steps, 149 steps longer than the most parsimonious trees. The chances of obtaining a tree that short from a random taxon relationship is less than 0,001%.

### ITS of the nuclear ribosomal region

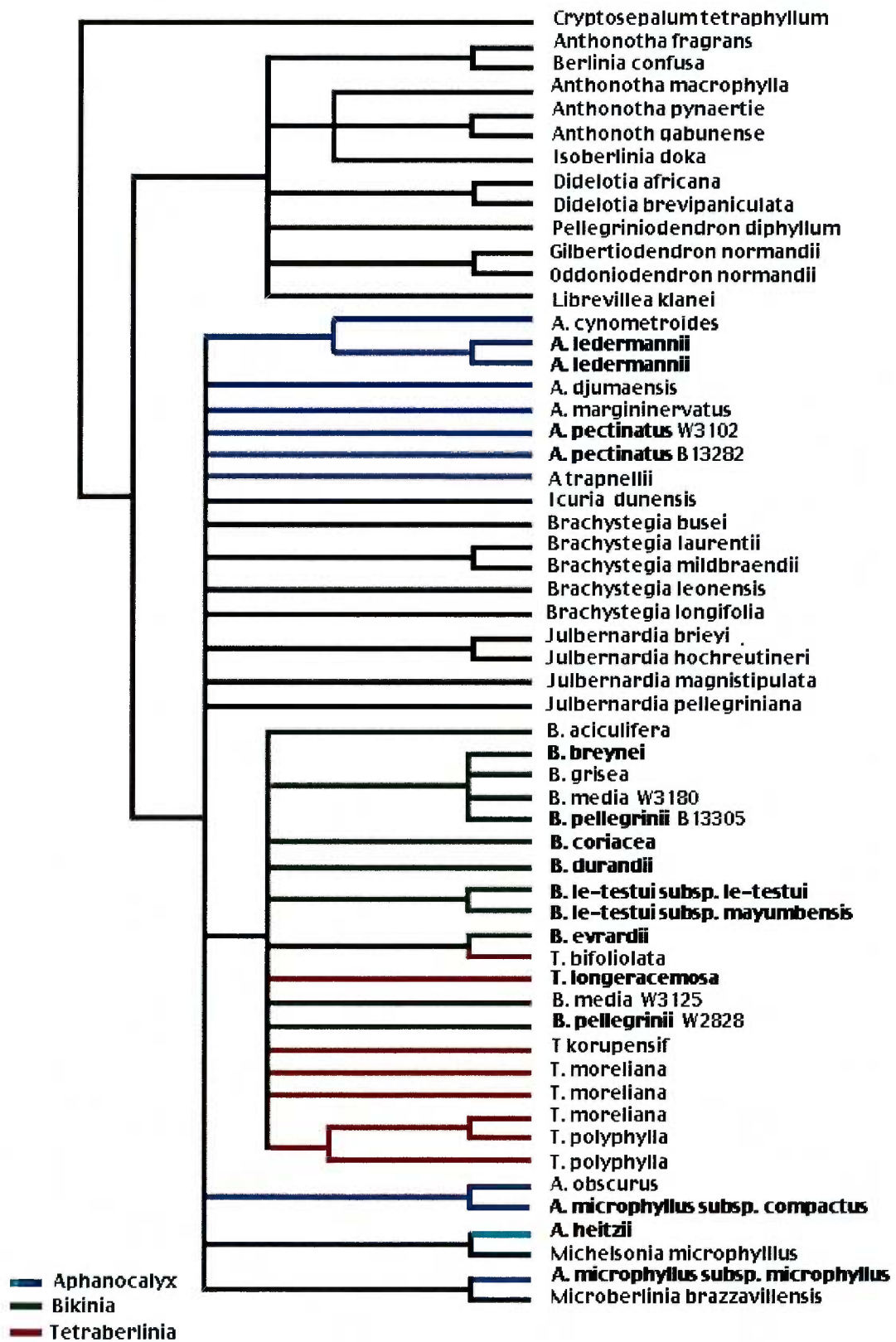
The region sequenced encompassed the last 129 bp of the 18S gene to the first 139 bp of the 26 S gene.

In 6 specimens, all the clones were identified as pseudogenes. Most of them entirely lacked the 5.8S gene and most of the two ITS regions. In general, the pseudogenes identified after cloning were present in the original PCR. In other cases, we suspect that the pseudogenes are artefacts of the cloning process.

**Figure 2.3** : One of the most parsimonious trees obtained from *psbA-trnH* sequence analysis (L=265, CI=0.689 and RI=0.729). Species previously known as *Monopetalanthus* are presented in bold letters. The genera with abbreviated names are A for *Aphanocalyx*, B for *Bikinia* and T for *Tetraberlinia*. When more than one specimen per species was studied and when they do not form a natural taxon, the accession number follows the name (W: Wieringa, Br: Breteler).



**Figure 2.4** : Strict consensus tree of 503 most parsimonious trees (L=265, CI=0.689 and RI=0.729) obtained from the phylogenetic analysis of the chloroplast *psbA-trnH* sequences analysed in species of the former genus *Monopetalanthus* and its close relatives. Species previously known as *Monopetalanthus* are presented in bold letters. The genera with abbreviated names are A for *Aphanocalyx*, B for *Bikinia* and T for *Tetraberlinia*. When more than one specimen per species was studied and do not form a natural taxon, the accession number follows the name (W: J.J. Wieringa, Br: F.J. Breteler).





The genus *Tetraberlinia*, including *Monopetalanthus longiracemosus*, is paraphyletic. The genus *Bikinia* appears to be derived from within *Tetraberlinia* when *T. bifoliolata* is included in the genus. *Bikinia congensis* occurs outside the *Bikinia* clade. The new genus *Icuria* is placed within the *Bikinia* clade.

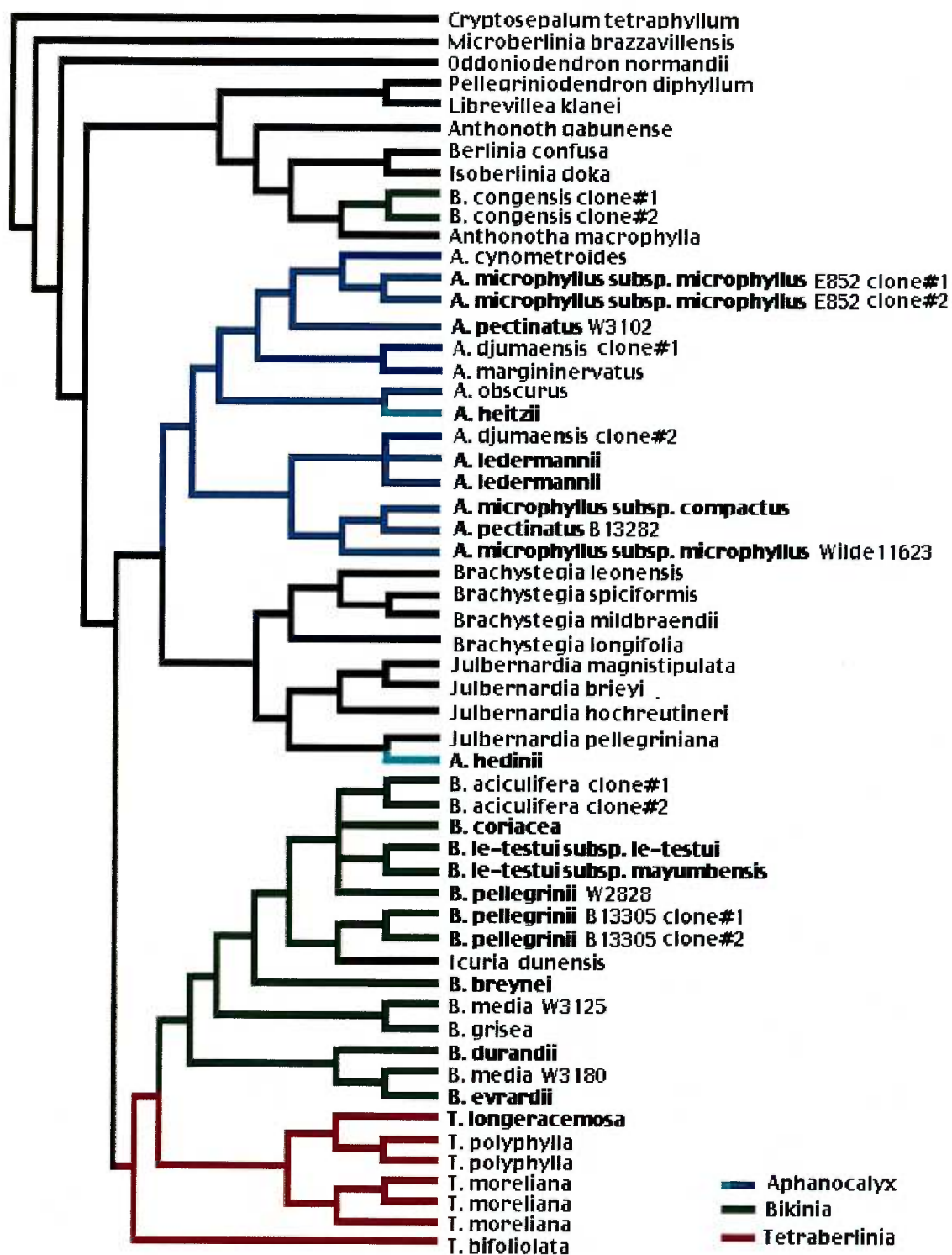
In this data set, the genus *Aphanocalyx* is not monophyletic because one species of subgenus *Antherodontus*, *Aphanocalyx hedinii*, is sister to *Julbernardia pellegriniana*. The other representative of subgenus *Antherodontus*, *Aphanocalyx heitzii* is derived within *Aphanocalyx*, rather than being sister to the rest of *Aphanocalyx* as in the *psbA-trnH* analysis.

The structure of the *Aphanocalyx* clade suggest that a duplication of the ITS locus have occurred in this genus. Indeed, the two clones of *A. djumaensis*, the two specimens of *A. pectinatus* and the two specimens of *A. microphyllus* subsp *microphyllus* are separated into two clades but conserving their respective relationship to one another in those clades.

#### Congruence of data sets

The partition-homogeneity test was performed and provided a P value of 0,02 indicating that a insignificant number of partitions had a smaller sum of lengths than that found in the original data. This clearly indicates that the incongruence between the ITS and the *psbA-trnH* analyses is not significant. When the partition-homogeneity test was performed the second time, without the species *Aphanocalyx hedinii* and *Bikinia congensis* from which the chloroplast sequences were missing, the P value was of 0,01. This suggest that a part of the incongruence was case by the missing data.

**Figure 2.5** : Strict consensus tree obtained from the 12 most parsimonious trees (L=2901, CI of 0,416 and RI= 0,573) in the phylogenetic analysis of the nuclear ITS region sequences in species of the former genus *Monopetalanthus* and its close relatives. Species previously known as *Monopetalanthus* are presented in bold letters. The genera with abbreviated names are A for *Aphanocalyx*, B for *Bikinia* and T for *Tetraberlinia*. When more than one specimen per species was studied and do not form a clade, the accession number follows the name (W: Wieringa, Br: Breteler, E: Ewango).



### Combined analysis

A total of 108 distinct shortest trees were found of 3067 steps, CI=0.443 and RI=0.582. Figure 2.6 represents the strict consensus tree of all most parsimonious trees.

The combined analysis from the nuclear ITS region and the *psbA-trnH* chloroplast spacer clearly suggests that *Monopetalanthus* is not a natural taxon. Its representatives are distributed mainly among three other genera.

*Aphanocalyx* presents the same dichotomy as in the ITS analysis. The monophyly of the genus is not supported, because subgenus *Antherodontus* forms a clade with *Julbernardia pellegriniana*. In 36 of the 108 trees, subgenus *Antherodontus* and *J. pellegriniana* are sister to the rest of *Aphanocalyx*.

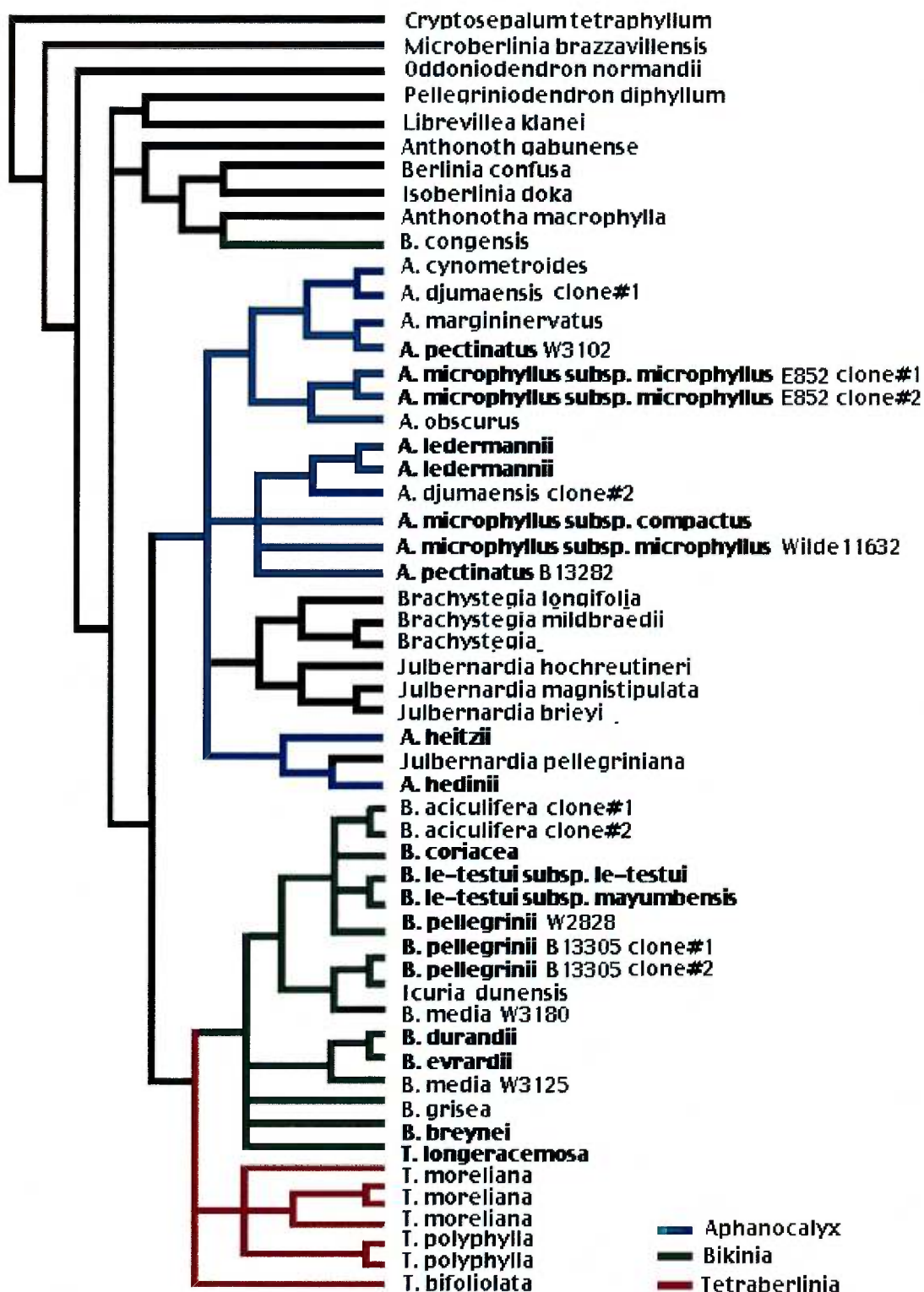
The genus *Bikinia* is mainly supported as monophyletic, except that *Bikinia congensis* occurs within the outgroup (see ITS analysis). *Bikinia* is the main cause of the variation between the most parsimonious trees. A low number of characters separate the species.

The new monotypic genus *Icuria* is found within the *Bikinia* clade.

*Tetraberlinia* is sister to *Bikinia*. *Tetraberlinia bifoliolata* which occurs as a trichotomy with the *Bikinia* and *Tetraberlinia* clades, renders the genus paraphyletic.

The tree structure found in the combined analysis supports the finding from the two genes analysed independently. All three analyses, taken independently or together, agree in suggesting that *Monopetalanthus* is a polyphyletic genus. The analyses generally support the Wieringa (1999) taxonomic changes.

**Figure 2.6** : Strict consensus from the 108 most parsimonious trees obtained (L=3067, CI=0,443 RI=0,582) in the combined analysis of the *psbA-trnH* chloroplast spacer and nuclear ITS of the former genus *Monopetalanthus* and its close relatives. Species in bold letters were previously known as *Monopetalanthus*. The genera with abbreviated names are A for *Aphanocalyx*, B for *Bikinia* and T for *Tetraberlinia*. When more than one specimen per species was studied and do not form a natural taxon, the accession number follows the name (W: Wieringa, Br: Breteler).



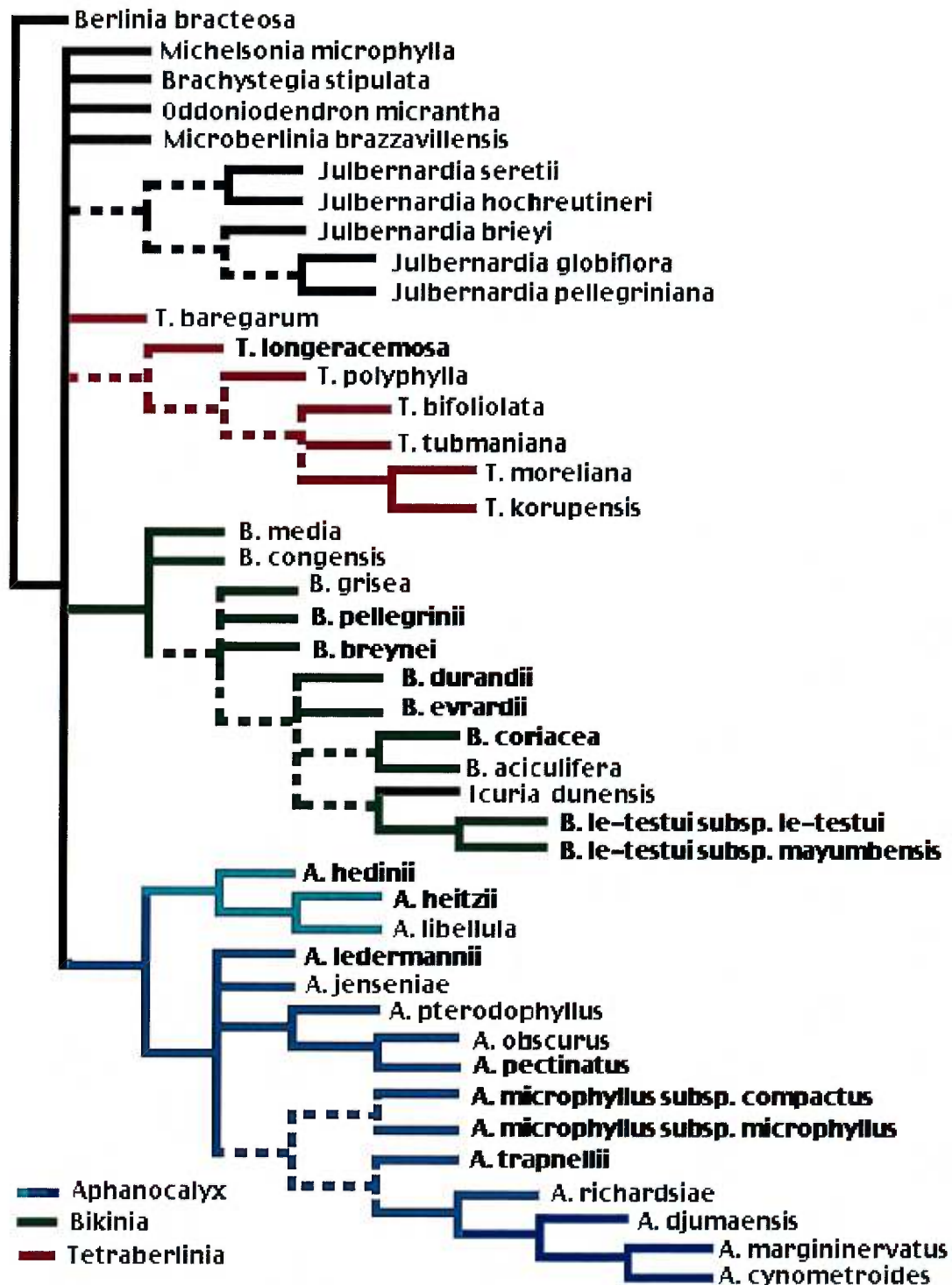
## Discussion

A cladistic analysis of the chloroplast *psbA-trnH* spacer and nuclear ITS sequences of genus *Monopetalanthus* both suggest that the genus is polyphyletic. The chloroplast spacer, with its slowly evolving sequence, clearly identified genera closely related to *Monopetalanthus*, but did not provide well-resolved trees. A previous molecular analysis, using the chloroplast *trnL* intron in the Caesalpinioideae, yielded similar relationships among genera (Bruneau *et al.* 2000). The nuclear ITS region sequences provided better resolution without conflict with the chloroplast data. *Monopetalanthus* was separated into distinct clades, showing close relationships with *Aphanocalyx*, *Bikinia*, *Julbernardia pellegriniana* and *Tetraberlinia*. Analysed separately or combined, the molecular characters suggest that *Monopetalanthus* is artificial.

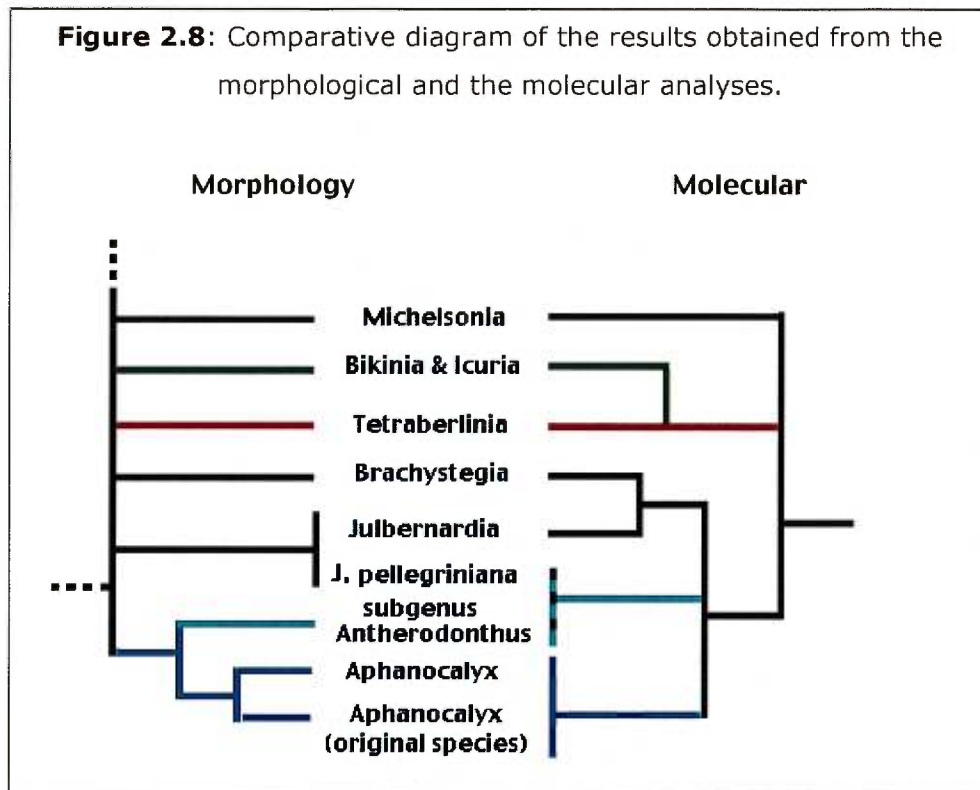
Morphological work performed on *Monopetalanthus* had already identified heterogeneity in the genus (Pellegrin 1942; Léonard 1957; Wieringa 1999 ) (Figure 2.7). A close relationship with *Aphanocalyx* had already been recognised (Léonard 1956; Cowan and Polhill 1981), but no transfer of *Monopetalanthus* species to *Aphanocalyx* was done prior to Wieringa's (1999) taxonomic study. Similarities with *Tetraberlinia* had been acknowledged for particular species, but they were taken to be mere parallelisms. In his taxonomic reclassification, Wieringa (1999) mentions that the distinction between the genera in which species of *Monopetalanthus* are now distributed are clear, but that the resolution of relationships within these genera, at the species level, are unstable or only weakly supported (Figure 2.7).

We examine below relationships in the four distinct clades in which species of the former *Monopetalanthus* occur and compare our results with those of the morphological analysis (Figure 2.8).

**Figure 2.7 :** Cladogram of the morphological analysis of species of *Aphanocalyx*, *Bikinia*, *Icuria* and *Tetraberlinia* as presented by Wieringa (1999:Figure 2.5.6 p.87). Species in bold letters were previously known as *Monopetalanthus*.







### *Tetraberlinia* (Harms) Hauman

*Tetraberlinia* currently comprises seven species of trees confined to the African tropical evergreen forest. It has recently been expanded with the addition of two newly described species and the transfer of *M. longiracemosus* to *Tetraberlinia* (Wieringa, 1999). Originally recognised as a section of *Berlinia* (Harms, 1913), *Tetraberlinia* was later transferred to *Julbernardia* as a section (Troupin, 1950), and finally given generic status (Hauman 1952). Recently, Breteler and Weiringa (1999) proposed that *Tetraberlinia* formed a group with *Aphanocalyx* and *Monopetalanthus*. Wieringa (1999) suggested that the genus has a close relationship with the newly described genus *Bikinia*.

Four species were used in the combined analysis. Molecular sequences of *psbA-trnH* and ITS clearly support the transfer of *M. longiracemosus* to *Tetraberlinia*. Among other morphological characters, *T. longiracemosa* possesses the yellow abaxial petal characteristic of *Tetraberlinia*. No

internal resolution was obtained in either the morphological or the molecular studies.

The monophyly of *Tetraberlinia* is not supported in the morphological analysis or in the molecular one. The genera *Bikinia* and *Icuria* seem to be derived of *Tetraberlinia*. The boundary of this genus needs to be re-evaluated or *Bikinia* and *Icuria* should be combine to *Tetraberlinia*.

### *Aphanocalyx* (Oliv.) Wieringa

Before Wieringa's revision, *Aphanocalyx* was composed of three species. He transferred to it *Monopetalanthus* species that possessed leaflets with a reduced distal half. According to his morphological analysis, the three original species of *Aphanocalyx* are derived from the newly transferred species. He also described subgenus *Antherodontus* and suggested that it is sister to the rest of *Aphanocalyx*. Subgenus *Antherodontus* is composed of *Aphanocalyx hedinii*, *Aphanocalyx heitzii* and *Aphanocalyx libelulea*.

The molecular analysis supports the new definition of *Aphanocalyx* except for the inclusion of subgenus *Antherodontus*. In our analysis, subgenus *Antherodontus* occurs with *Julbernardia pellegriniana* rather than with other species of *Aphanocalyx*. Their position as sister to the *Aphanocalyx* clade is not refuted in the combined analysis, but *J. pellegriniana* is still connected to them (Figure 2.6).

The different clones of the ITS sequence provides only partial resolution within this genus, insufficient to be able to compare it properly to the morphological study. We can see, none the less, that the original members of *Aphanocalyx* are not jointly derived from the rest of *Aphanocalyx*..

### *Bikinia* Wieringa

The recently described genus *Bikinia* includes newly described species, as well as species of *Monopetalanthus* with an entire leaflet that is mucronate in the subapical position. They also are distinguished from the other genera under study by their purple-red anthers.

The *psbA-trnH* analysis places *Bikinia* and *Tetraberlinia* together in a clade, but with neither monophyletic, while in the ITS and combined analyses, *Bikinia* is derived from *Tetraberlinia*.

*Bikinia pellegrinii* is morphologically variable in its flowers, leaves and pods, leading Wieringa (1999) to propose that many distinct species were grouped under this name. In the molecular analysis, two specimens of *B. pellegrinii*, representing two extremes of the morphological variation observed in the species, are not grouped together. The two samples of *B. media* studied also did not form a monophyletic group. One specimen of *B. media* is sister to *B. grisea*, two species which are difficult to tell apart from sterile specimens. The second specimen occurs at the base of the *Bikinia* clade in an isolated unresolved position (Figure 2.6). Furthermore, *B. congensis* appears in the outgroup with representatives of *Anthonotha* (Figures 6 and 7). The specimen identity was confirmed with Wieringa (pers.comm.) and *B. congensis* and *Anthonotha* specimens were never manipulated at the same time in the laboratory. We would need DNA samples from another specimen to corroborate its position.

### Problematic Taxa

*Icuria* Wieringa is a recently described monotypic genus that occurs in the coastal forests of Mozambique, far from any known species of *Aphanocalyx*, *Bikinia* or even *Tetraberlinia* (Figure 1). When the morphological analysis was performed, the flowers of this species were not yet known (Wieringa, 1999). The morphological analysis places this species within the *Bikinia* clade (Figure 2.7). Indeed, *Icuria* has specific characters of *Bikinia* such as

valvate stipules. The fruit morphology, pod shape, and its distinct nerve, also support its placement within *Bikinia*. When *Icuria* flowers were obtained, they supported its placement within the Macrolobieae, but not with any known genus. In particular, it has a reduced number of stamens 6 to 8, rather than 10 as in *Bikinia*. The anthers are the same colour as those of *Bikinia*, but of a lighter shade.

The position of *Icuria*, based on the molecular sequence, is variable. *Icuria* sequences possess numerous autapomorphies. The chloroplast data place *Icuria* as sister to *Aphanocalyx* (Figure 2.3). This resolution is lost in the strict consensus (Figure 2.4), not because *Icuria* varies in position, but because species of *Aphanocalyx* change position among the most parsimonious trees (only one is shown in Figure 2.3). In contrast, the nuclear sequence clearly places *Icuria* within *Bikinia* (Figure 2.5).

*Michelsonia* is known from a limited area within the eastern Congo and has been mostly destroyed by logging. This monotypic genus was once part of *Tetraberlinia* (Hauman 1952). *Michelsonia* can be distinguished from *Tetraberlinia* by its five white petals of mostly identical size as opposed to *Tetraberlinia*'s single larger petal and four smaller petals (Léonard, 1994).

The DNA material of *Michelsonia* came from a 1972 herbarium specimen that provided only very small amounts of extremely degraded DNA. Only the chloroplast spacer provided an amplification. Since the variation of the *psbA-trnH* spacer is low and little resolution is obtained from it, the exact position of *Michelsonia* is uncertain. The only confirmation is its closeness to *Aphanocalyx*, *Bikinia*, *Brachystegia*, *Julbernardia* and *Tetraberlinia*.

## Conclusion

*Monopetalanthus* is an unnatural taxa. The molecular evidence generally supports the taxonomic revision of Wieringa (1999). *Monopetalanthus* species with leaflets having a reduced distal half are grouped with *Aphanocalyx* as suggested by Wieringa, the others are transferred to

*Bikinia* or *Tetraberlinia*. Those three genera form a distinct clade in the tribe Macrolobieae with the genera *Brachystegia*, *Julbernardia* and *Michelsonia*.

The phylogenies obtained from the molecular characters are generally those expected from the recent morphological studies. Most of the newly defined genera are supported as monophyletic, except for a few more problematic taxa. Among those are: *Bikinia congensis*, *Icuria*, *Julbernardia pellegriniana* (once distinguished as the monotypic *Paraberlinia* Pellegr. (1943) because its receptacle shape is different from other *Julbernardia*), and *Aphanocalyx* subgenus *Antherodontus* (could be a link to *Michelsonia* and *J. pellegriniana*, forming a sister group relationship to the other *Aphanocalyx*).

## Conclusion Générale

Nous avons vu dans le chapitre 1 que la sous-famille des *Caesalpinioideae* nécessite encore beaucoup d'études avant que nous puissions connaître les liens phylogénétiques qui existent entre les espèces. Les études morphologiques, cytologiques, ontologiques et moléculaires ont aidé à fournir des indices sur l'évolution du groupe. Au fur et à mesure que nous accumulons les connaissances, la taxonomie à évoluer.

Nos connaissances sur l'évolution du groupe montrent que la taxonomie de la sous-famille n'est plus adéquate. La taxonomie actuelle nécessite une révision, mais un certain nombre de détails entre les liens phylogénétiques restent à déterminer avant de faire des changements majeurs. Il y a, entre autres, les délimitations des tribus *Cassieae* et *Caesalpinieae*, la limite entre la tribu *Detarieae* et la tribu *Macrolobieae* ainsi que la révision de certain grand genre.

Les études moléculaires ont rendu de grands services pour identifier les problèmes taxonomiques dans la sous-famille, surtout avec les problèmes d'homoplasie des caractères morphologiques et le nombre limité de matériels pour ce type d'étude.

Le chapitre II présente une étude moléculaire dans un des grands genres de *Caesalpinioideae*. *Monopetalanthus* Harms est un des genres de la tribu des *Macrolobieae* où il existe des problèmes taxonomiques. Une récente révision taxonomique fut proposée pour le genre *Monopetalanthus*. Cette révision, basé sur une analyse morphologique, séparent les espèces de *Monopetalanthus* pour les inclure dans trois autres genres. L'étude moléculaire a permis de confirmer la nouvelle taxonomie et a aussi aider a préciser comment sont divisés les groupes d'espèces de *Monopetalanthus*.

Les résultats obtenus a partir l'étude moléculaire de *Monopetalanthus* montrent que la méthode utilisé s'avère utile dans la solution problèmes taxonomiques dans sous-famille des *Caesalpinioideae*.

## Références

- Aldrich, J., B.W. Cherney, E. Merlin and L. Christopherson (1988) The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Curr. Genet.* 14(2): 137-146
- Baker, E.G. (1930) *The Leguminosae of tropical Africa*. Ostend.
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell and M.J. donoghue (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Garden* 82: 257-277
- Breteler, F.J. (1995) The boundary between Amherstieae and Detarieae (Caesalpinioideae). *In*: Crisp, M.D. and J.J. Doyle (eds.) (1995) *Advances in legume systematics: part 7, Phylogeny*. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp.53-62
- Breteler, F.J. and J.J. Wieringa (1999) Generic delimitation in Caesalpinioideae. XVI International Botanical Congress Abstract Number: 2741
- Britton, N.L. and J.N. Rose (1930) *Caesalpinaceae*. *North American Flora* 23(4): 201-268
- Brummitt, R.K. and M.S.M. Sosef (1998) Paraphyletic taxa are inherent in Linnaean classification- a reply to Freudenstein. *Taxon* 47(1): 411-412
- Bruneau, A., F.J. Breteler, J.J. Wieringa, and G.Y.F. Gervais (2000) Phylogenetic relationships in tribes Macrolobieae and Detarieae as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *In*: Herendeen, P.S. and A. Bruneau (eds.) (2000) *Advances in legume systematics: Part 9*, Royal Botanic Gardens, Kew. *In press*
- Capitaine, L (1912) *Les graines des Légumineuses: étude de morphologie externe, essai d'application à la systématique*. Emile Larose, Paul Lechevalier librairie -éditeur, Paris. 459p.
- Chappill, J.A. (1995) Cladistic analysis of the Leguminosae: the development of an explicit phylogenetic hypothesis. *In*: M.Crisp &

- J.J. Doyle (eds.)(1995) *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny*, Royal Botanic Gardens, Kew. pp.1-9.
- Chikuni, A. (1996) Species delimitation problems in *Brachystegia* Benth. (Caesalpinoideae- Leguminosae). *Oxf. Plant Syst.* 4 :8-9
- Cowan, R.S. (1981) Caesalpinoideae. *In*: M.Crisp & J.J. Doyle (eds.) (1981) *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny*. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp.57-64
- Cowan, R.S. and R.M. Polhill (1981) Amherstieae. *In*: Polhill, R. M. and P.H. Raven (eds.) (1981). *Advances in legume systematics: part 1*. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 135-142
- Crisp, M.D. and J.J. Doyle (eds.) (1995) *Advances in legume systematics: part 7, Phylogeny*. Royal Botanic Gardens, Kew. 371p.
- Davis, J.I. (1997) Evolution, evidence and the role of species concepts in phylogenetics. *Syst. Bot.* 22(2):373-403
- Dominguez, E. and Q.D. Wheeler (1997) Taxonomic stability is Ignorance. *Cladistics* 13(4):367-372
- Donoghue M.J. and Cantino P.D. (1988) Paraphyly, ancestors and the goals of taxonomy: a botanical defense of cladism. *Bot. Rev.* 54: 107-128
- Doyle, J.J. (1994a) Phylogeny of the legume family- An approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25:325-349
- Doyle, J. J. (1994b) DNA data and legume phylogeny: A progress report. Crisp, M.D. and J.J. Doyle (eds.) (1995) *Advances in legume systematics: part 7, Phylogeny*. Royal Botanic Gardens, Kew. p11-30
- Doyle, J. J. and J. Chappill (1999) Molecules and morphology: toward a comprehensive phylogenetic hypothesis for the Leguminosae. XVI International Botanical Congress. Abstract Number: 3702
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15
- Doyle, J.J., J.L. Doyle, J.A. Ballenger, E.E. Dickson, T. Kajita and H. Ohashi (1997) A phylogeny of the Chloroplast gene *rbcl* in the Leguminosae : taxonomic correlations and insights into the



- evolution of nodulation. *Am. J. Bot.* 84:541-554
- Engler, A. and K. Prantl (1897) *Die Natürlichen pflanzenfamilien.* p.195
- Farris, J.S., M. Källersjö, A.G. Kluge and C. Bult (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319
- Ferguson, I.K. and S.C. Tucker (eds.) (1994) *Advances in legume systematics: part 6, structural botany.* Royal Botanic Gardens, Kew. 259p.
- Forest, F. and A. Bruneau (2000) Phylogenetic analyses, organisation and molecular evolution of the non-transcribed spacer of 5S ribosomal RNA genes in *Corylus* (Betulaceae). *Int. J. Plant Sci.* *In press.*
- Harms, H. (1899) *Leguminosae africanae. II.* *In: A. Engler. Beiträge zur Flora von Afrika XVII: Bot. Jahrb.* 26 p. 265-266
- Harms, H. (1913) *Leguminosae africanae. VI.* *In: A. Engler. Beiträge zur Flora von Afrika XLI. Bot. Jahrb.* 49 p. 419-454
- Harms, H. (1915) *Leguminosae africanae. VIII.* *In: A. Engler. Beiträge zur Flora von Afrika XLV. Bot. Jahrb.* 49 p. 455-476
- Hauman, L. (1952) Note sur le genre *Berlinia* Soland. et sur les genres voisins. *Bulletin des séances. Inst. Royal. Col. Belge v.23:* 475-482
- Hennig W. (1979) *Phylogenetic systematics.* translated by D.D. Davis and R. Rainer. University of Illinois Press, Urbana. 263p.
- Herendeen, P.S., W.L. Crepet and D.L. Dilcher (1992) The fossil history of the Leguminosae: Phylogenetic and biogeographic implications. *In: Herendeen, P.S. and D.L. Dilcher (eds.)(1992) Advances in legume systematics: part 4, the fossil record.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp 303-316
- Herendeen, P.S. and D.L. Dilcher (eds.)(1992) *Advances in legume systematics: part 4, the fossil record.* Royal Botanic Gardens, Kew. 326p.
- Herendeen, P.S. and A. Bruneau (eds.)(2000) *Advances in legume systematics: Part 9,* Royal Botanic Gardens, Kew. *In press.*
- Hou, D. (1994) Studies in malesian Caesalpinioideae (Leguminosae) .1. the genera *Acrocarpus*, *Afzelia*, *Copaifera* and *Intsia*. *Blumea* 38: 313-330

- Hutchinson, J. (1964) The genera of flowering plant (Angiospermae) Vol 1. Oxford at the Clarendon Press. 516p.
- Hutchinson, J. and J.M. Dalziel (1928) LVIII. Tropical African Plants: VI. Bull. of miscellaneuous information. Roy. Bot. Garden, Kew. No 10. P.397-398
- Irwin, H.S. and R.C. Barnaby (1981) Cassieae. *In*: Polhill, R. M. and P.H. Raven (eds.)(1981) Advances in legume systematics: part 1. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 97-106
- Irwin, H.S. and R.C. Barneby (1982) The american Cassiinae: a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. Mem. New. York. Bot. Gerd. 35(1) (2). 918p.
- Judd, W.S. , C.S. Campbell, E.A.Kellogg, P.F.Stevens (1999) Plant systematics a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusetts, USA. 464p.
- Käss, E. and M. Wink (1996) Molecular evolution of the leguminosae- Phylogeny of the three subfamilies based on rbcL sequences. Biochem. Syst. Ecol. 24:365-378
- Lawrence, G.H.M. (1951) Taxonomy of vascular plants. The Macmillan compagny. USA 823p.
- Léonard, J. (1956) *Monopetalanthus richardsiae*. *In*: Carrisso (1956) Consp. Fl. Angol. ii. 204
- Léonard, J. (1957) Genera des Cynometreae et des Amherstieae africaines (Leguminosae- Caesalpinioideae) Essai de blastogénie appliquée à la systématique. Mém. Acad. Roy. Belg. 8vo., Cl. Sci., Sér. 2, xxx. Fasc. 2. Pp.1-314
- Léonard, J. (1994) Les délimitations des genres chez les Caesalpinioideae africaines (Detarieae et Amherstieae) (1957-1994). *In*: L.J.G. van der Maesen, X.M. van der Burgt and J.M. van Medenbach de Rooy (eds.)(1994) The biodiversity of African plants. Proceedings XIV th AETFAT Congress. Kluwer academic publishers. Pp.443-455
- Lewis, G.P. et Schrire (1995) A reappraisal of the Caesalpinia group (caesalpinioideae: Caesalpinieae) using Phylogenetic analysis. *In*: M.Crisp & J.J. Doyle (eds.). Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp.41-52

- Lock, J.M. (1989) Legumes of Africa: a check list. Royal Botanic Gardens Kew. 620p.
- Luckow, M. (1999) Relationships among genera in the mimosoid legume tribes Parkieae and Mimoseae. XVI International Botanical Congress. Abstract Number: 2865
- Mackinder B. (1999) Is *Berlinia* SOL (Leguminosae – Caesalpinioideae) monophyletic? XVI International Botanical Congress Abstract Number: 3815
- Oliver, D. (1870) *Aphanocalyx cynometroides*, Oliv. In: Hook. Ic.Pl. xi. 53t. 1066.
- Pellegrin, F. (1942) Les *Monopetalanthus* (Césalpiniiées). Bull. Soc. Bot. France. Tome 89. Pp118-121
- Pellegrin, F. (1943) *Paraberlinia* genre nouveau de Césalpiniiées du Gabon. Bull. Soc. Bot. France, 90: 79-80
- Pettigrew, C.J. and L. Watson (1977) On the classification of Caesalpinioideae. Taxon 26: 57-64
- Pickersgill, B. and J.M. Lock (eds.)(1996) Advances in legume systematics: part 8, legumes of economic importance. Royal Botanic Gardens, Kew. 143p.
- Polhill, R. M. (1994) Complete synopsis of the legume genera. In: Fisby F.A., J. Buckingham and J.b. Harborne (1994) Phytochemical dictionnay of the legumnosae, volume 1. pp xlix-liv
- Polhill, R. M. and P.H. Raven (eds.)(1981a.) Advances in legume systematics: part 1. Royal Botanic Gardens, Kew. 425p.
- Polhill, R. M. and P.H. Raven (eds.)(1981b.) Advances in legume systematics: part 2. Royal Botanic Gardens, Kew. 1050p.
- Polhill, R.M. (1981) Papilionoideae. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.)(1981) Advances in Legume Systematics Part 1. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp.191-204
- Polhill, R.M. and J.E. Vidal (1981) Caesalpinieae. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.)(1981) Advances in Legume Systematics Part 1. Pp.81-95. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 81-96
- Polhill, R.M., P.H. Raven and C.H. Stirton (1981) Evolution and Systematics of the Leguminosae. In: R.M. Polhill & P.H. Raven

- (eds.)(1981) *Advances in Legume Systematics Part 1*. Pp.1-26. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 1-27
- Rieseberg, L.H. and L. Brouillet (1994) Are many plant species paraphyletic. *Taxon* 43(1):21-32
- Robertson, K.R. and Y. Lee (1976). The genera of Caesalpinioideae (Leguminosae) in the southeastern United States. *J. Arn. Arb.* 57:1-53
- Sang, T., D.J. Crawford and T.F. Stuessy (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulated evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Amer. J. Bot.* 84: 1120-1136
- Sosef, M.S.M. (1997) Hierarchical models, reticulate evolution and the inevitability of paraphyletic supraspecific taxa. *Taxon* 46(1): 75-85
- Sprent, J.I. and D. Mckey (eds.)(1994) *Advances in legume systematics: part 5, the nitrogen factor*. Royal Botanic Gardens, Kew. 241p.
- Steenis, C.G.G.J. van (1975) A review of the genus *Sympetalandra* Stapf and its position in Caesalpinioideae. *Blumea* 22:159-167
- Stirton, C.H. (editor)(1987) *Advances in legume systematics: part 3*. Royal Botanic Gardens, Kew. 466p.
- Sun, Y., D.Z. Skinner, G.H. Liang and S.H. Hulbert (1994) Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *TAG* 89(1):26-32
- Swofford, D. L. (1999) PAUP\*, version 4.0, computer program. Sinauer Associates.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882
- Troupin, G. (1950) Contribution a l'etude systematique de *Berlinia soland*. Et genres voisins (Caesalpinioideae- Amherstieae). *Bull. Jard. Bot. État Brux.* XX: 285-324
- Tucker, S.C. (1989) Evolutionary implications of floral ontogeny in Legumes. *In*: C.H. Stirton & J.L. Zarucchi (eds.) *Advances in Legumes Biology Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 29:59-

75.

- Tucker, S.C. (1996) Trends in evolution of floral ontogeny in *Cassia sensu stricto*, *Senna*, and *Chamaecrista* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae; Cassiinae); a study in convergence. *Amer. J. Bot.* 83:687-711
- Tucker, S.C. (1998) Floral ontogeny in Legume genera *Petalostylis*, *Labichea*, and *Dialium* (Caesalpinioideae, Cassieae), a series in floral reduction. *Amer. J. Bot.* 85 (2):184-208
- Tucker, S.C. (1999) Evolutionary loss of sepals and/or petals in detarioid legume taxa *Aphanocalyx*, *Brachystegia*, and *monopetalanthus* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Am. J. Bot.* 87:608-624
- Tucker, S.C. et A.W. Douglas (1994) Ontogenetic evidence and phylogenetic relationship among basal taxa of Legumes. *In*: I.K. Fergusson and S. Tucker (eds.). *Advances in legume systematics. 6: structural botany.* Royal Botanic Gardens, Kew. Pp.11-32
- van Welzen, P.C. (1997) Paraphyletic groups or what should a classification entail. *Taxon* 46: 99-103
- Watson, L. (1981) An automated system of generic descriptions for the Caesalpinioideae, and its application to classification and key making. *In*: Polhill, R. M. and P.H. Raven (eds.) (1981) *Advances in legume systematics: part 1.* Royal Botanic Gardens, Kew. Pp.65-80
- Wieringa, J.J. (1994) Tree climbing on a free rope. *In*: L.J.G. van der Maesen, X.M. van der Burgt and J.M. van Medenbach de Rooy (eds.) (1994) *The biodiversity of African plants. Proceedings XIV th AETFAT Congress.* Kluwer academic publishers. Pp.819-822
- Wieringa, J.J. (1999) *Monopetalanthus* exit. A systematic study of *Aphanocalyx*, *Bikinia*, *Icuria*, *Michelsonia* and *Tetraberlinia* (Leguminosae, Caesalpinioideae). Wageningen Agric. Univ. Papers 99-4
- Wunderlin R.P. (1979) Consideration of *Barklya* and the subtribes of the cercideae (Caesalpinioideae: Fabaceae). *Phytologia* 44:325-327
- Wunderlin R.P., K. Larsen and S.S. Larsen (1981) Cercideae. *In*: Polhill, R. M. and P.H. Raven (eds.) (1981) *Advances in legume systematics:*

part 1. Royal Botanic Gardens, Kew. p.107-116

## Remerciements

Il est d'usage d'écrire une longue liste de remerciements, remerciant à gauche et à droite. Je ne comprenais pas la raison de cette section jusqu'à ce jour. J'ai enfin terminé, presque terminé! Et je réalise enfin le pourquoi des remerciements. Un tel travail ne se fait pas seul, alors oui, j'ai une liste de gens à remercier.

J'aimerais remercier Suzanne Bill Pohjola pour ces nombreux commentaires (à n'importe quel heure) sur la partie anglophone de ma thèse, Jennifer Kulin pour avoir été mon dictionnaire, Marie-Noel Fredette pour avoir ri de mon résumé et indiqué certaine des erreurs. J'aimerais remercier mon amour, Christopher Scott, pour me remonter le moral lorsque je n'arrivais pas à respecter les délais et mon directeur, Anne Bruneau, pour avoir été patiente lorsque je ne respectais pas les délais. Anne mérite beaucoup plus de remerciement que cela, mais si je commence à énumérer la liste pour tout ce don elle nécessite d'être remercier, je ne finirai pas cette section. Alors, simplement merci.

J'aimerais également remercier le ministère des affaires indiennes pour la bourse de soutien aux étudiants autochtones qui m'a permis de payer la majeure partie de mes études universitaires jusqu'à ce jour.