

2m11. 2701. 3

Université de Montréal

**Implications des analyses phylogénétiques et biogéographiques
de l'espaceur des gènes ribosomiaux 5S chez le genre *Corylus* (Betulaceae)**

par

Félix Forest

Institut de recherche en biologie végétale

Département des sciences biologiques

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.)

Avril 1999

© Félix Forest, 1999



QK

3

U54

1999

V.001

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Implications des analyses phylogénétiques et biogéographiques
de l'espaceur des gènes ribosomiaux 5S chez le genre *Corylus* (Betulaceae)**

présenté par :
Félix Forest

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

François-Joseph Lapointe, président-rapporteur
Anne Bruneau, directrice de recherche
Luc Brouillet, membre du jury

Mémoire accepté le ²⁵ mai 1999

SOMMAIRE

Le premier chapitre aborde d'abord une revue historique de la littérature concernant les divers traitements taxonomiques qui ont précédé la désignation actuelle des composants de la famille des Betulaceae. Cette revue est suivie d'une énumération et d'une synthèse des analyses cladistiques et comparées qui ont été exécutées au sein de la famille des Betulaceae. La position des Betulaceae par rapport aux autres familles de la sous-classe des Hamamelididae et la paléobotanique sont également discutées.

Une revue des différentes études comparées montre que, dans l'ensemble, les résultats concordent en ce qui concerne les relations génériques chez les Betulaceae. Les trois analyses cladistiques discutées apportent généralement une vue identique des relations phylogénétiques entre les genres de cette famille, avec quelques discordances que l'on peut considérer comme mineures ou discutables. Suite à la compilation de toutes ces études, autant comparatées que cladistiques, on en vient à élaborer une hypothèse relativement bien soutenue de la phylogénie des Betulaceae. Les deux sous-familles maintenant reconnues, les Betuloideae (*Alnus* et *Betula*) et les Coryloideae (*Carpinus*, *Corylus*, *Ostrya*, *Ostryopsis*), sont des regroupements naturels, majoritairement définis par les études comparées et soutenus par les diverses analyses cladistiques moléculaires et morphologiques. De même, il est maintenant généralement accepté qu'au sein de la sous-famille des Coryloideae, *Corylus* forme seul la tribu des Coryleae et constitue le taxon-frère de la tribu des Carpineae formée de *Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis*.

Des analyses phylogénétiques de la famille, fondées sur des caractères morphologiques, ont été exécutées incluant séparément et simultanément trois genres fossiles (*Asterocarpinus*, *Cranea* et *Paleocarpinus*). Dans le cas de *Cranea* et d'*Asterocarpinus*, les analyses séparées de chacun de ces taxons éteints ont donné des arbres phylogénétiques montrant des relations qui concordent relativement bien avec les hypothèses avancées par divers auteurs. Dans le cas

de *Paleocarpinus*, les résultats tendent à contredire certaines hypothèses concernant la position phylogénétique proposée par plusieurs.

Le second chapitre se consacre à l'étude de la phylogénie et de la biogéographie du genre *Corylus*. Les noisetiers comprennent une vingtaine de taxons spécifiques et infraspécifiques se retrouvant dans la zone tempérée de l'hémisphère nord, majoritairement en Eurasie, et présentant un patron de distribution boréotropical typique. Une hypothèse sur les relations phylogénétiques entre les différentes espèces du genre *Corylus*, fut proposée suite à l'analyse cladistique des séquences d'ADN de l'espaceur non-transcrit des gènes ribosomiaux 5S. Le genre asiatique *Ostryopsis*, étant considéré comme étant proche du genre *Corylus* d'après des caractères morphologiques, fut utilisé comme extra-groupe dans les analyses. Les résultats tendent à appuyer les regroupements traditionnellement reconnus dans la littérature. Le sous-genre *Acanthochlamys* (involucre épineux) est le groupe-frère des sous-genres *Siphonochlamys* (involucre tubulaire) et *Phyllochlamys* (involucre foliacé). L'arbre phylogénétique obtenu, combiné aux registres fossilifères de *Corylus* et de la famille des Betulaceae, permet d'émettre l'hypothèse que le genre *Corylus* serait parvenu en Amérique du Nord via le Détroit de Béring à partir de l'Asie de l'Est. Les noisetiers indigènes de l'Europe seraient également issus de l'Asie de l'Est, la région où le genre *Corylus* est le plus diversifié.

Le second chapitre est écrit sous forme d'article et sera soumis pour publication dans *American Journal of Botany*.

TABLE DES MATIÈRES

Page de titre	i
Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Sigles et abréviations	xii
Dédicace.....	xiii
Remerciements	xiv
Introduction générale	1
CHAPITRE I. LA FAMILLE DES BETULACEAE	
Revue de la littérature et analyses phylogénétiques incluant certains	
taxons fossiles.	3
1.1. Introduction	3
1.2. Revue de la littérature concernant la famille des Betulaceae	5
1.2.1. Revue des différents traitements taxonomiques	5
1.2.2. Analyses cladistiques moléculaires et morphologiques.....	13
1.2.2.1. Introduction	13
1.2.2.2. La position des Betulaceae dans la sous-classe des	
Hamamelididae	13
1.2.2.3. Caractères morphologiques.....	15
1.2.2.4. Caractères moléculaires – <i>rbcL</i>	17
1.2.2.5. Caractères moléculaires – ITS.....	19
1.2.3. Comparaisons quantitatives	20
1.2.4. Caractères sérologiques.....	21
1.2.5. Anatomie du bois.....	23
1.2.6. Morphologie des trichomes des surfaces foliaires	24

1.2.7. Structure des bourgeons hivernaux et croissance foliaire	25
1.2.8. Discussion et synthèse des relations proposées	27
1.3. Analyses phylogénétiques incluant certains taxons fossiles	29
1.3.1. Les fossiles	29
1.3.1.1. Les genres actuels	29
1.3.1.1.1. Introduction	29
1.3.1.1.2. <i>Alnus</i>	29
1.3.1.1.3. <i>Betula</i>	31
1.3.1.1.4. <i>Corylus</i>	32
1.3.1.1.5. <i>Carpinus</i>	33
1.3.1.1.6. <i>Ostrya</i>	33
1.3.1.2. Les genres éteints	34
1.3.1.2.1. Introduction	34
1.3.1.2.2. <i>Palaeocarpinus</i> Crane (1981)	34
1.3.1.2.3. <i>Cranea</i> Manchester et Chen (1998)	36
1.3.1.2.4. <i>Asterocarpinus</i> Manchester et Crane (1987)	37
1.3.1.2.5. <i>Corylocarpinus</i> Straus (1969)	38
1.3.1.2.6. <i>Carpinoxylon ostryopsoides</i> Page (1970, 1980)	38
1.3.1.2.7. <i>Atriplex borealis</i> (Heer) Laurent (1912)	39
1.3.2. Matériel et méthodologie	39
1.3.3. Description des caractères	41
1.3.4. Résultats	43
1.3.5. Discussion	49
1.4. Conclusion	52

CHAPTER II – PHYLOGENY AND BIOGEOGRAPHY OF HAZELS

The non-transcribed spacer of the 5S ribosomal RNA genes in hazels

(*Corylus* L.:Betulaceae) : phylogenetic and biogeographical inferences 54

1.1. Introduction	54
1.2 Material and Methods	59
1.2.1. Taxon selection	59

1.2.2. Molecular methodology	62
1.2.3. Phylogenetic analyses.....	66
1.2.4. Gap and duplication coding	67
1.3. Results	68
1.3.1. The 5S spacer in <i>Corylus</i>	68
1.3.2. Multiple sequence alignment.....	72
1.3.3. Phylogenetic reconstructions	74
1.4. Discussion	83
1.4.1. Organization of the 5S rDNA spacer in hazels.....	83
1.4.2. Evolution of the 5S rDNA spacer in hazels	86
1.4.3. Phylogenetic inferences.....	88
1.4.3.1. Phylogeny of hazels	88
1.4.3.2. Hybrid taxa	94
1.4.4. Biogeographical inferences	96
1.4.4.1. The fossil record	96
1.4.4.2. Biogeographical patterns	97
Conclusions générales et études futures.....	102
Bibliographie	104
Annexes.....	118
Annexe 1- Liste des fossiles de <i>Corylus</i> et des taxons affiliés	118
Annexe 2- Distances moyennes et absolues de la matrice des caractères morphologiques de l'analyse des Betulaceae.....	121
Annexe 3- Arbre résultant de l'analyse Neighbor Joining de la famille des Betulaceae incluant tous les taxons fossiles	123

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Quelques caractères morphologiques sélectionnés définissant les subdivisions au sein de la famille des Betulaceae	12
Tableau II. Tableau synoptique des premières présences dans les registres fossilifères des genres actuels et éteints de la famille des Betulaceae selon leur répartition continentale	30
Tableau III. Tableau synoptique des divers taxons fossiles traités dans la présente étude (localités, époques et références).....	35
Table IV. Species and samples of <i>Corylus</i> and <i>Ostryopsis</i> sequenced for the 5S DNA spacer in a phylogenetic analysis of the genus <i>Corylus</i>	60
Table V. Results of the restriction sites digestions performed for the preliminary choice of clones to be sequenced for the 5S spacer of <i>Corylus</i> and <i>Ostryopsis</i> , including the number of clones amplified and sequenced.....	65
Table VI. Variation in length and sequence divergence in the 5S spacer sequences of species included in the phylogenetic analysis of <i>Corylus</i> and <i>Ostryopsis</i>	73

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Infrutescences de cinq des six genres de la famille des Betulaceae (<i>Ostryopsis</i> n'est pas montré)	4
Figure 2. Éventail des différentes subdivisions proposées pour la famille des Betulaceae définies comme étant une seule famille	7
Figure 3. Subdivisions proposées de la famille des Betulaceae en deux et trois familles distinctes	8
Figure 4. Quatre classifications intrafamiliales et infragénériques de la famille des Betulaceae	9
Figure 5. Arbre phylogénétique de la famille des Betulaceae, d'après Crane (1989). Caractères morphologiques des structures reproductives	16
Figure 6. Arbre phylogénétique de la famille des Betulaceae, d'après Bousquet <i>et al.</i> (1992). Caractères morphologiques et séquences de <i>rbcL</i>	17
Figure 7. Arbre phylogénétique de la famille des Betulaceae, d'après Chen <i>et al.</i> (soumis). Caractères des séquences de l'ITS.	20
Figure 8. Relations phylogénétiques au sein de la famille des Betulaceae, d'après Hall (1952). Caractères anatomiques du bois.	23
Figure 9. Relations génériques proposées pour les genres de la famille des Betulaceae, d'après Hardin & Bell (1986). Caractères morphologiques de la surface foliaire.	24
Figure 10. Dendrogramme de la famille des Betulaceae, d'après Kikuzawa (1982). Croissance des feuilles et structure des bourgeons	26

Figure 11. Matrice des caractères morphologiques utilisés dans l'analyse phylogénétique des taxons actuelles et de certains taxons fossiles de la famille des Betulaceae	42
Figure 12. Consensus strict (A) et un des 14 arbres les plus parcimonieux (B) résultant de l'analyse cladistique de la famille des Betulaceae incluant les taxons fossiles <i>Cranea</i> , <i>Asterocarpinus</i> et quatre espèces de <i>Palaeocarpinus</i>	45
Figure 13. Unique arbre résultant de l'analyse cladistique de la famille des Betulaceae, incluant seulement <i>Cranea</i> comme taxon fossile	46
Figure 14. Unique arbre résultant de l'analyse cladistique de la famille des Betulaceae, incluant seulement <i>Asterocarpinus</i> comme taxon fossile	47
Figure 15. Consensus strict et un des sept arbres les plus parcimonieux résultant de l'analyse cladistique de la famille des Betulaceae, incluant seulement quatre espèces du genre fossile <i>Palaeocarpinus</i>	48
Figure 16. The genus <i>Corylus</i> , carpellate and staminate inflorescences and infructescence	56
Figure 17. The 5S DNA unit showing the position of the primers used in the amplification of the 5S DNA spacer of <i>Corylus</i> and <i>Ostryopsis</i> (after Cox <i>et al.</i> 1992)	63
Figure 18. Gel showing the distinct ladder pattern of the 5S DNA spacer amplified with primer PI and PII of Cox <i>et al.</i> (1992) in <i>Corylus</i>	68
Figure 19. Gel showing the restriction site pattern for the endonuclease <i>HaeIII</i> in eight clones of the 5S DNA spacer of <i>Corylus chinensis</i>	68
Figure 20. Sequence variation in the 5S DNA spacer of the 89 clones of <i>Corylus</i> included in this study	70

- Figure 21.** Strict consensus of the 2448 most parsimonious trees of 366 steps resulting from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S DNA spacer, including all clones except hybrid taxa. Indels and duplications were binary coded in this analysis75
- Figure 22.** One of the most 2448 parsimonious trees of 366 steps retrieved from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S DNA spacer, including all clones except hybrid taxa. Indels and duplications were binary coded in this analysis.....76
- Figure 23.** The duplication in the complex *C. americana/C. heterophylla* highlighted on the strict consensus of the 2448 most parsimonious trees resulting from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S DNA spacer (same parameters as Figure 22)78
- Figure 24.** Strict consensus and one of the 6929 most parsimonious trees of 358 steps resulting from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S rDNA spacer, including all clones except hybrid taxa. Indels and duplications were not binary coded in this analysis.....81
- Figure 25.** Strict consensus and one of the 5984 most parsimonious trees of 383 steps resulting from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S DNA spacer, including all clones and hybrid taxa, indels and duplications binary coded..... 82
- Figure 26.** The actual worldwide distribution of *Corylus* et *Ostryopsis* 98

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

$\mu\text{g/ml}$:	Microgram per milliliter (microgramme par microlitre)
μg :	Microgram (microgramme)
μl :	Microliter (microlitre)
μM :	Micromolar (micromolaire)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
bp :	Base pair (paires de bases)
BSA:	Bovine serum albumine
CaCl_2 :	Calcium chloride (chlorure de calcium)
CTAB :	Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide
DNA :	Desoxyribonucleic acid
dNTPs:	Deoxynucleotide triphosphates
dTTPs:	Deoxythymine triphosphates
IPTG:	Isopropyl- β -thiogalactopyranoside
ITS :	Internal transcribed spacer (espaceur transcrit interne)
M:	Molar (molaire)
MgCl_2 :	Magnesium chloride (chlorure de magnésium)
mM:	Millimolar (millimolaire)
mm^2 :	Millimeter square (millimètre carré)
$^{\circ}\text{C}$:	Degree Celcius (degré Celcius)
PCR :	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
<i>rbcl</i> :	Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase, large subunit
RNA :	Ribonucleic acid (acide ribonucléique)
rpm:	Revolution per minute (révolutions par minutes)
rRNA :	Ribosomal ribonucleic acid (acide ribonucléique ribosomal)
<i>s.l.</i> :	<i>sensu lato</i>
<i>s.s.</i> :	<i>sensu stricto</i>
TBR:	Tree bisection and reconnection
Vcm^{-1} :	Volt per centimeter (Volts par centimètre)
X-gal:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Il y a bien longtemps, je me suis promis de lui dédier le premier grand projet de ma vie. À elle, ainsi qu'à tout ceux qui nous ont soutenu dans ces moments difficiles... Merci.

À la mémoire de ma mère, Maryse Bergevin-Forest

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier une personne dont le support constant m'a permis de produire ce texte, de la première extraction d'ADN au dernier point de la conclusion. Sa compétence, sa disponibilité, son enthousiasme, son intérêt, sa confiance et sa patience (quelques fois mise à l'épreuve...désolé...) font d'elle une personne d'une grande valeur que j'apprécie beaucoup. Je crois sincèrement que je n'aurai pas pu trouver une meilleure directrice de recherche. Merci Anne.

Je voudrais également remercier le personnel des collections du Jardin Botanique de Montréal pour leur aide et ceux de l'Arnold Arboretum de Boston pour leur accueil et le support technique lors de mes visites ainsi que le personnel des herbiers Marie-Victorin, DAO et Gray Herbarium. Je dois aussi mentionner la participation financière de l'Institut de recherche en biologie végétale qui a subventionné en partie mes déplacements aux Etats-Unis. Je remercie également Bill Baker pour avoir suggéré l'utilisation du 5S, alors que la situation devenait critique ou presque.

Merci au monde de l'IRBV, avec qui j'ai passé de bien bons moments et avec qui j'espère garder contact. Merci à Sylviane pour son amitié et sa confiance. Le plâtre, c'est bien différent sans toi. Merci à Chantale, j'aimerais çà ploguer une « inside » ici mais il y en a trop! À Martin, un très bon ami, qui est malheureusement biologiste moléculaire. À Josée Nadia et René, mes compagnons d'infortune avec qui j'ai survécu à l'épopée automobile de Boston! À Luc, qui m'initia à la systématique et à la taxonomie lors de ses cours (s'il avait su!). À Sier-Ching et Annie, Fannie, Marie and Iris, Jihad, Stu, Pierre, « Machoman », Nasha, Hélène, Julie, Sébastien, Frédéric, Louise. J'ai l'affreuse impression d'oublier quelqu'un ici (ou même plusieurs!). Si c'est le cas, je m'en excuse profondément et je me précipite, en sanglots, à vos pieds afin d'implorer votre pardon!

Un merci à la gang de l'Outaouais, Christian, Manuel et Brigitte, que j'ai quelque peu négligés au cours de mes études dans la grande ville,... s'cusez.

Il serait impardonnable d'omettre l'aide et le support que m'ont apporté ma tante Michelle, mon oncle François et Marie, ma cousine préférée du côté de mon père. Leur accueil, leur aide et leur intérêt dans ce que je faisais (et ce avant, pendant et sûrement après ma maîtrise) m'ont toujours été d'un grand bienfait et j'espère bien leur rendre la pareille un jour.

J'ai souvent eu tendance à prendre pour acquis son aide, son support, son intérêt et sa confiance, probablement parce qu'il me les a toujours donné sans retenue. Je suis convaincu qu'il sait que je l'apprécie, sans que je n'ai jamais eu à lui dire ouvertement.

Merci pour tout son père...

Montréal, le 1^{er} avril 1999.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les Betulaceae comprennent six genres et environ 150 espèces (le bouleau (*Betula*), l'aulne (*Alnus*), le charme (*Carpinus*), le noisetier (*Corylus*), l'ostryer (*Ostrya*) et *Ostryopsis*). La famille est généralement séparée en deux sous-familles, les Betuloideae et les Coryloideae, possédant des caractères morphologiques distincts. Tous les genres se retrouvent dans la zone tempérée sur les trois continents de l'Hémisphère Nord, sauf *Ostryopsis* qui est endémique à l'Est de l'Asie.

La famille des Betulaceae est un groupe qui fut largement étudié sous différents angles. Avant les premières analyses cladistiques de la famille, plusieurs études ont proposé des hypothèses pour expliquer les relations entre les genres en se basant sur des comparaisons mathématiques, l'anatomie du bois, la pousse des feuilles et des bourgeons, les caractéristiques de la surface foliaire et les caractères sérologiques. Les analyses cladistiques récentes tendent à démontrer de façon relativement claire les relations entre les genres de la famille. D'une façon très générale, les résultats de toutes ces études sont similaires et leurs grandes conclusions concordent.

Les registres fossilifères très bien documentés de la famille des Betulaceae ainsi que les descriptions exhaustives de certains taxons fossiles m'ont permis d'exécuter des analyses phylogénétiques de la famille en incluant séparément et ensemble trois genres fossiles (*Asterocarpinus*, *Cranea* et *Paleocarpinus*). Les résultats ainsi obtenus seront comparés aux hypothèses proposées dans les différentes publications concernant ces fossiles. Une telle étude ne semble pas avoir déjà été produite.

En second lieu, il sera question de la phylogénie des noisetiers et de son utilité dans le discernement d'un patron biogéographique pour ce genre. *Corylus* est un genre formé d'espèces arbustives pour la plupart et de quelques espèces arborescentes. Leurs fruits sont cultivés à plusieurs endroits dans le monde. Malgré leur grande importance économique, les noisetiers n'ont pratiquement pas fait l'objet d'études systématiques poussées.

En bref, ce travail est divisé en deux parties distinctes. Tout d'abord, des analyses cladistiques de la famille des Betulaceae, utilisant des caractères morphologiques, seront exécutées incluant certains taxons fossiles. Ces analyses sont précédées d'une revue de la littérature concernant cette famille. Ensuite, l'espaceur des gènes ribosomiaux 5S sera utilisé dans des analyses phylogénétiques dans le but de proposer une hypothèse concernant la phylogénie du genre. L'espaceur 5S est extrêmement variable et son utilisation dans des analyses phylogénétiques comporte des difficultés. La variabilité de l'espaceur 5S s'observe jusqu'au niveau intragénomique, c'est-à-dire entre les différents espaceurs disposés en tandem ou entre les espaceurs de différents loci chez un même individu. Cette variation intragénomique des espaceurs 5S rDNA ont rendu nécessaire l'utilisation de techniques de clonage pour permettre l'isolation des espaceurs. La phylogénie produite par ces analyses servira ensuite de base dans l'élaboration d'une hypothèse pour expliquer la répartition actuelle des noisetiers.

CHAPITRE – I

La famille des Betulaceae

Revue de la littérature et analyses phylogénétiques
incluant certains taxons fossiles.

1.1. INTRODUCTION

Les Betulaceae comprennent six genres et environ 150 espèces (Furrow 1990). Cinq de ces six genres (*Betula* L., *Alnus* Mill., *Corylus* L., *Carpinus* L. et *Ostrya* Scop.) se retrouvent dans la zone tempérée de l'Hémisphère Nord et ont un patron de distribution boréo-tempéré. Les deux espèces du sixième genre, *Ostryopsis* Decn., sont endémiques au sud-ouest de la Chine. *Alnus* est le seul genre des Betulaceae que l'on retrouve en Afrique (*A. glutinosa* (L.) Gaertn.) et au sud de l'équateur (certaines variétés de l'*A. jorullensis* H.B.K.; ex., Colombie, Pérou, Argentine) (Winkler 1904).

Les Betulaceae sont monoïques. Ce sont des arbres ou des arbustes décidus et anémophiles. Leurs feuilles sont simples, pétiolées, disposées de façon alterne et spiralée, à marge dentée et nervation pennée, avec présence de stipules décidus. Les fleurs staminées sont réduites, parfois sans périanthe, formant des chatons cylindriques, allongés et pendants, compacts ou non. Les fleurs carpellées, également réduites, avec ou sans périanthe, forment des inflorescences soit en chatons pendants ou ascendants, soit ayant l'apparence de bourgeons. Les fruits sont des samares doublement ailées ou des noix, possédant une seule graine, souvent incluse dans un involucre formé d'une à trois bractées (Winkler 1904; Furrow 1990, 1997) (Figure 1).

Les Betulaceae ont été le sujet d'une multitude d'analyses cladistiques et comparées ayant entre autres pour but de résoudre les relations phylogénétiques entre les genres de la famille. Pratiquement toutes les sources de caractères furent exploitées, des séquences d'ADN aux différents types de caractères morphologiques en passant par la sérologie et les caractères



Betula, Infrutescence. (F. Forest)



Alnus, Infrutescence et inflorescences staminées de l'année suivante (F. Forest)



Carpinus, Infrutescence. (F. Forest)



Ostrya, Infrutescence. (J. Labrecque)



Corylus, Infrutescence.
(F. Forest)

Figure 1. Infrutescence de cinq des six genres de la famille des Betulaceae (*Ostryopsis* non montré).

influencés par l'environnement (Anderson & Abbe 1934; Hall 1952; Brunner & Fairbrothers 1979; Kikuzawa 1982; Hardin & Bell 1986; Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.* soumis). J'ai tenté de faire ici un résumé des résultats obtenus par différentes séries de caractères et d'en faire une synthèse globale. Une attention particulière sera portée aux récentes analyses cladistiques qui sont, en général, en accord sur la topologie interne de la famille [(*Betula-Alnus*)-(*Corylus*-(*Ostryopsis*-(*Carpinus-Ostrya*)))]. Une analyse cladistique préliminaire est exécutée avec l'inclusion de trois taxons fossiles parmi les genres actuels des Betulaceae (*Asterocarpinus* (Cockerell) Manchester & Crane, *Cranea* Manchester & Chen et *Palaeocarpinus* Crane). Cette analyse, utilisant surtout des caractères morphologiques des organes de reproduction, tente de déterminer la position des taxons fossiles par rapport aux taxons actuels.

1.2. REVUE DE LA LITTÉRATURE CONCERNANT LA FAMILLE DES BETULACEAE

1.2.1. REVUE DES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS TAXONOMIQUES

Tous les genres de la famille des Betulaceae telle que définie aujourd'hui, à l'exception du genre *Ostryopsis* qui sera défini par Decaisne en 1873, furent décrits pour la première fois au XVIII^e siècle (*Corylus* L., 1737; *Carpinus* L., 1737; *Betula* L., 1753; *Ostrya* Scop., 1760; *Alnus* Gaertn., 1791). Avant la première description d'*Ostryopsis*, divers traitements taxonomiques ont été proposés pour les genres actuels des Betulaceae. Parmi les premiers, certains plaçaient les cinq genres de l'époque avec certains membres des Fagaceae. Adanson (1763) inclut les genres *Betula*, *Carpinus* et *Corylus* avec les genres *Quercus* L. et *Castanea* Mill. (Fagaceae) dans une des trois sections de la famille des Castaneae. Jussieu (1789), quant à lui, a divisé sa famille des Amentaceae en trois sections d'après le type de fleur. Il plaça *Betula* (incluant *Alnus*), *Carpinus* (incluant *Ostrya*) et *Corylus* avec, entre autres, certains membres des Fagaceae (ex., *Quercus*) et des Hamamelidaceae (ex., *Liquidambar* L.). La classe des Amentaceae telle que définie par Hartling (1830), comprend cinq ordres dont l'ordre des Betulaceae (*Betula* et *Alnus*) et l'ordre des

Cupuliferae qui inclut *Carpinus*, *Ostrya*, *Corylus* ainsi que trois membres actuels des Fagaceae (ex., *Fagus* L., *Quercus*, *Castanea*).

Par la suite, les Betulaceae et les Fagaceae actuelles furent différenciées. Baillon (1877) séparait les Betulaceae en deux groupes, soit *Betula* et *Alnus* dans la série des Bouleaux, et *Corylus*, *Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis* dans la série des Coudriers. Ces deux groupes faisaient partie de la famille des Castaneaceae. La famille des Cupuliferae de Burkill (1899) est divisée en trois sections dont les Betuleae (*Betula* et *Alnus*), les Coryleae (*Carpinus*, *Ostrya*, *Ostryopsis* et *Corylus*) et les Quercineae (*Quercus*, *Castanopsis* (D. Don) Spach et *Castanea*). Warming (1904) divisa la famille des Querciflorae en trois ordres dont les Betuleae (*Betula* et *Alnus*) et les Coryleae (*Carpinus* et *Corylus*), ne faisant pas mention d'*Ostrya* et d'*Ostryopsis*. Le troisième ordre, celui des Cupuliferae, comprend *Quercus*, *Fagus* et *Castanea*.

Les traitements subséquents placent les genres des Betulaceae dans une, deux ou trois familles distinctes des Fagaceae et des autres familles de la sous-classe des Hamamelidae (*sensu* Cronquist 1981, 1988). Les Betulaceae *s.l.* sont plus souvent divisées en deux, mais avec des rangs taxonomiques différents, soit en deux tribus (Prantl 1894, Winkler 1904), deux sous-familles (Rendle 1925; Jury 1978; Takhtajan 1980; Thorne 1983; Furlow 1990; Kubitzki 1993) ou deux familles (LeMaout & Decaisne 1868; Hutchinson 1967; Dahlgren 1980). Jury (1978) et Furlow (1990) vont plus loin en subdivisant la sous-famille des Coryloideae en deux tribus (Figure 2). Certains autres auteurs divisent également la famille en trois tribus (Chen 1991, cité par Manchester & Chen 1998) ou en trois familles (Kuprianova 1963) (Figures 2 et 3).

La définition des genres a quelque peu varié. Dans le *Prodromus* de De Candolle (1864), la famille des Betulaceae *s.l.* est traitée par De Candolle (Corylaceae) et Regel (Betulaceae *s.s.*) (Figure 4a). Regel (1868) définit les genres *Betula* et *Alnus* tels qu'acceptés actuellement, variant seulement dans les divisions infragénériques. Cependant, De Candolle (1864), qui divise la famille des Corylaceae en deux tribus (les Coryleae et les Carpineae), reconnaît un genre de plus dans la tribu des Carpineae, soit *Distegocarpus* Sieb. & Zucc.,

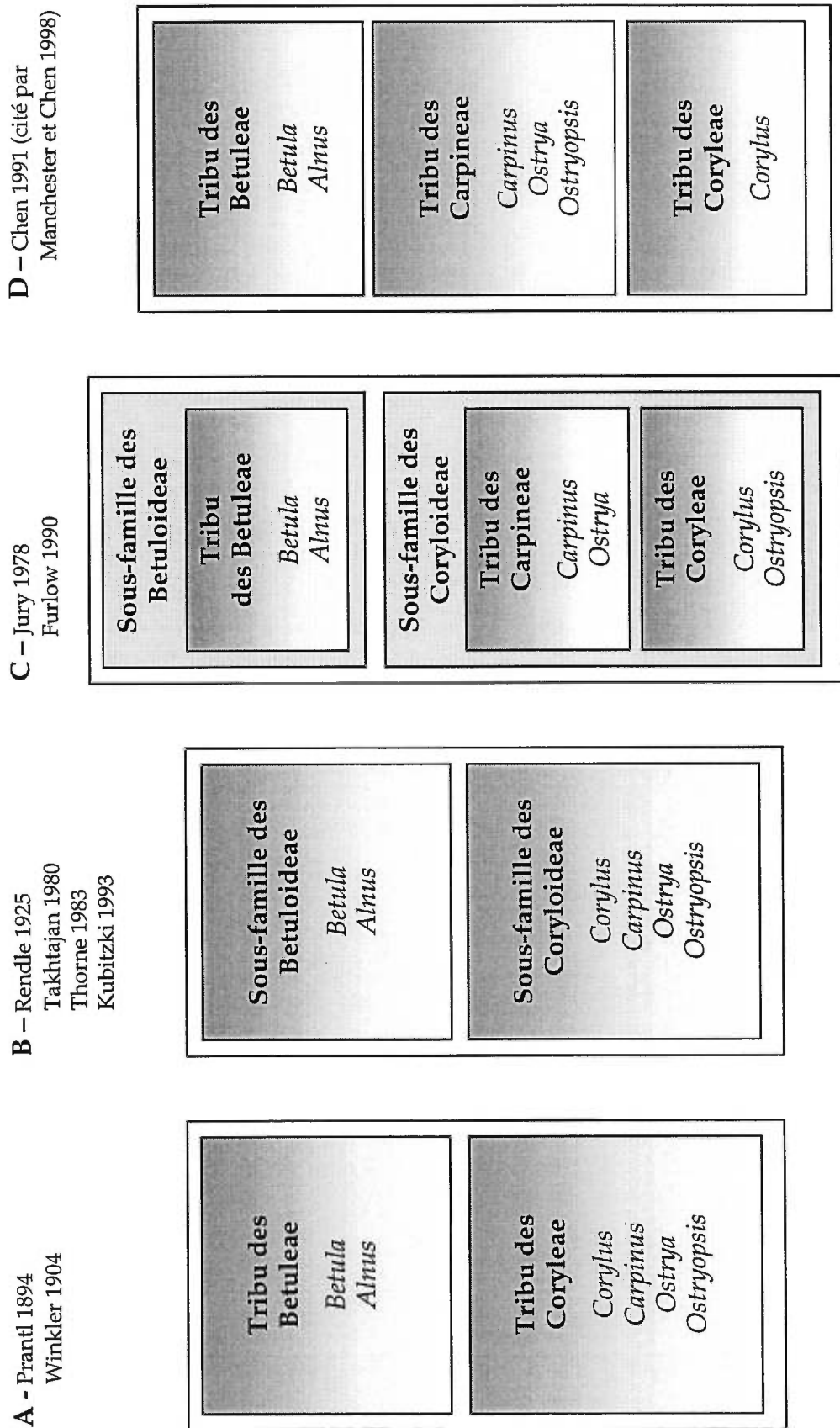
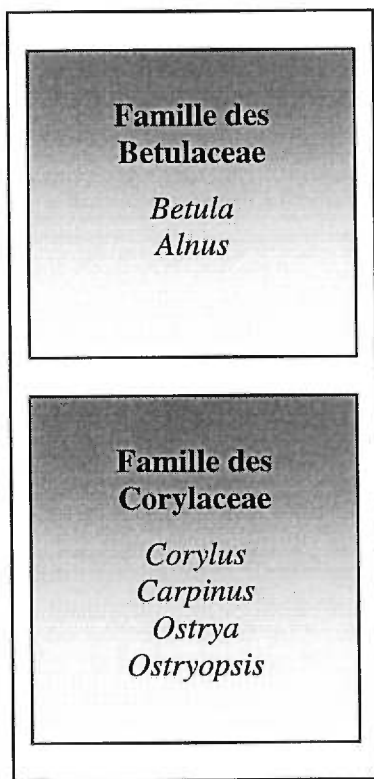


Figure 2. Eventail des différentes subdivisions pour la famille des Betulaceae comme famille unique proposées dans certains traitements taxonomiques, ainsi que les rangs taxonomiques qui leur sont attribués par leur auteur.

A – LeMaout & Decaisne 1868
Hutchinson 1967
Dahlgren 1980
Hjelmqvist 1948



B – Kuprianova 1963



Figure 3. Subdivisions proposées de la famille des Betulaceae *s.l.* en deux (A) ou trois (B) familles.

A - Spach 1841, 1842 a-c

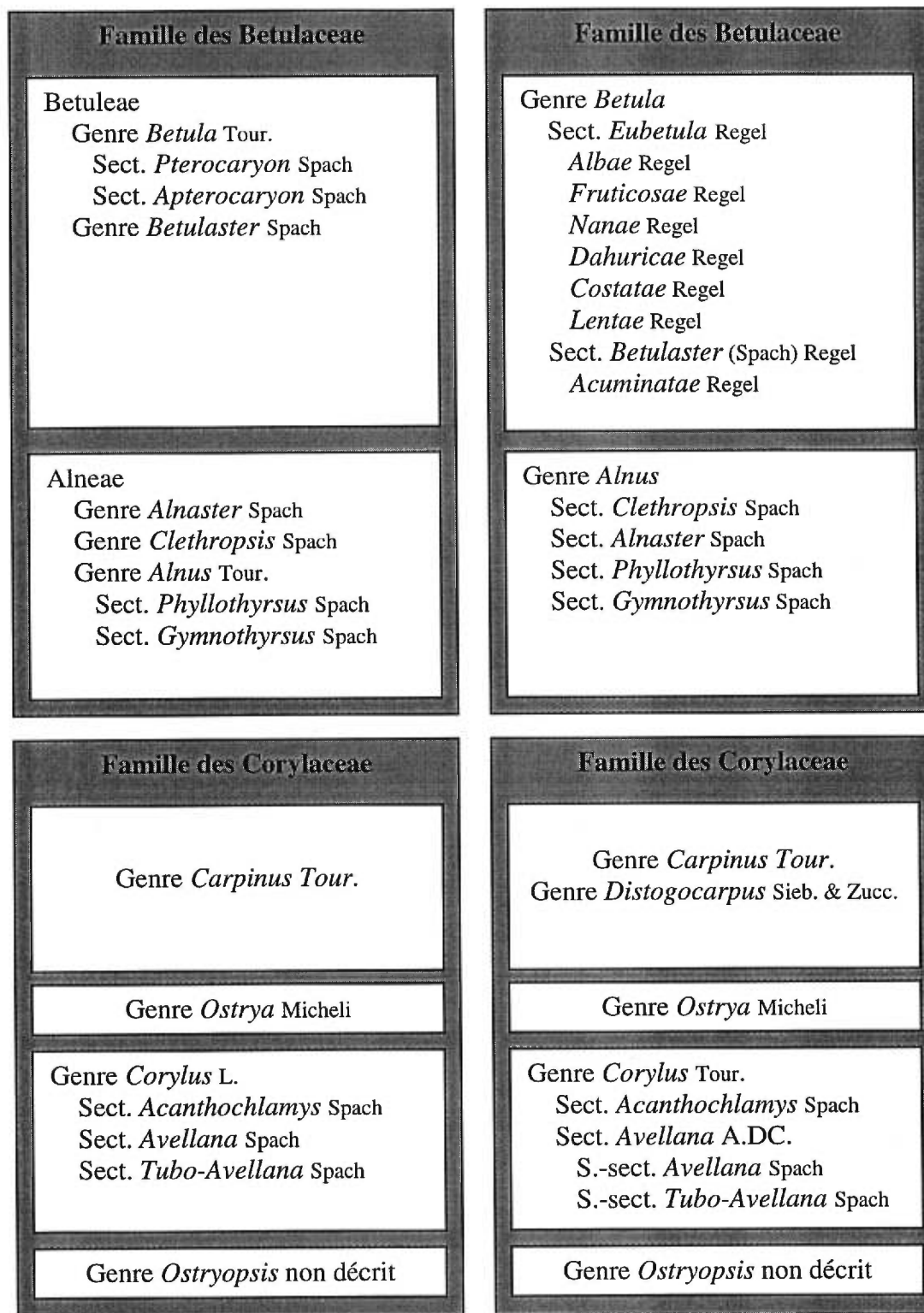
B – *Prod. Syst. Univ. Reg. Veg.*
(De Candolle 1864 et Regel 1868)

Figure 4a – Classification intrafamiliale et infragénérique de la famille des Betulaceae *s.l.*
(A et B, deux familles).

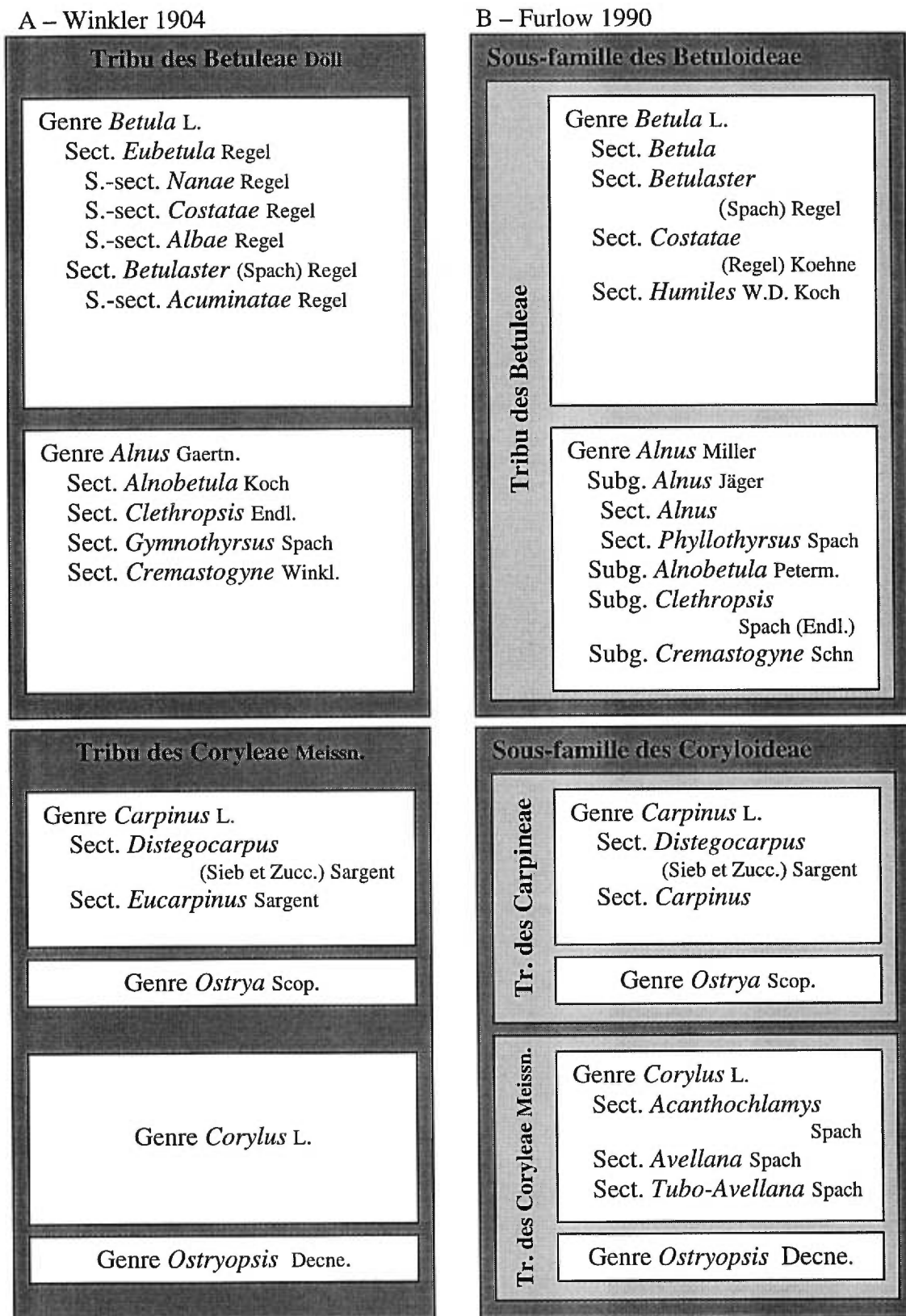


Figure 4b – Classifications intrafamiliales et infragénériques de la famille des Betulaceae s.l. (A et B, une famille).

maintenant reconnu comme une section du genre *Carpinus* (Figure 4a-b; Winkler 1904; Furlow 1990). Spach (1841, 1842a, b, c) est celui qui reconnaît le plus de genres chez les *Betulaceae s.l.*, soit huit, excluant *Ostryopsis*, car ce genre n'était pas encore décrit à l'époque (Figure 4a-b). Baillon (1877) a placé le genre *Ostryopsis* à l'intérieur du genre *Corylus* sous le nom *Corylus davidiana*.

Quatre traitements infragénériques sont présentés ici (Spach 1841, 1842 a-c; De Candolle 1864 et Regel 1868; Winkler 1904; Furlow 1990; Figures 4a-b). Les genres *Ostrya* et *Ostryopsis* (comprenant sept et deux espèces respectivement; Furlow 1990, 1997) ne sont jamais subdivisés. Les subdivisions sont généralement semblables selon les différents traitements taxonomiques pour les quatre autres genres. *Betula* est divisé en quatre groupes de rangs taxonomiques différents selon les auteurs (Figures 4a-b). Regel (1868) reconnaît cependant sept groupes chez les bouleaux répartis en deux sections, *Eubetula* Regel et *Betulaster* (Spach) Regel (Figure 4a), la dernière n'ayant qu'une sous-section, *Acuminatae* Regel, également reconnue par Winkler (1904) et Furlow (1990). Winkler (1904) ne reconnaît aucune subdivision chez *Corylus* contrairement à Spach (1842), De Candolle (1864) et Bobrov (1936).

La façon la plus appropriée de traiter la famille des *Betulaceae*, d'après les résultats obtenus lors d'analyses cladistiques récentes (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.* soumis), est de la séparer en deux sous-familles, les Coryloideae (*Carpinus*, *Ostrya*, *Ostryopsis*, *Corylus*) et les Betuloideae (*Alnus*, *Betula*) et de diviser la sous-famille des Coryloideae en deux tribus, soient les Carpineae (*Carpinus*, *Ostrya*, *Ostryopsis*) et les Coryleae (*Corylus*). Toujours selon ces analyses cladistiques, les deux sous-familles (Betuloideae et Coryloideae) ainsi définies seraient monophylétiques et les deux tribus de la sous-famille des Coryloideae (Carpineae et Coryleae) seraient également monophylétiques. Plusieurs caractères morphologiques de toutes sortes appuient cette subdivision de la famille des *Betulaceae*.

La sous-famille des Betuloideae est différenciée de celle des Coryloideae par le nombre de fleurs par cymule, la présence ou l'absence de périanthe chez les fleurs, le type de fusion des pièces florales, des fruits ailés et comprimés

dorsiventralement ainsi que diverses caractéristiques anatomiques du bois (Tableau I).

Tableau I – Quelques caractères morphologiques sélectionnés supportant les subdivisions au sein de la famille des Betulaceae (d’après Abbe 1935, 1938; Helmqvist 1948; Crane 1989; Furlow 1990; Chen *et al.* soumis)

Sous-famille des Betuloideae Tribu des Betuleae	Sous-famille des Coryloideae	
	Tribu des Carpineae	Tribu des Coryleae
2-3 fleurs pistillées / cymule	2 fleurs pistillées / cymule	2 fleurs pistillées / cymule
Bractées de la fleur pistillée non fusionnée en involucre	Bractées de la fleur pistillée fusionnée en involucre	Bractées de la fleur pistillée fusionnée en involucre
Fruits ailés et comprimés dorsiventralement	Fruits non ailés et non comprimés	Fruits non ailés et non comprimés
Périanthe sur fleurs pistillées absent	Périanthe sur fleurs pistillées présent	Périanthe sur fleurs pistillées présent
Épaississement spiralé dans les vaisseaux présent	Épaississement spiralé dans les vaisseaux absent	Épaississement spiralé dans les vaisseaux absent
Trachéides présentes	Trachéides absentes	Trachéides absentes
Périanthe sur fleurs staminées Présent	Périanthe sur fleurs staminées absent	Périanthe sur fleurs staminées parfois présent
Épaississement de l’endexine adjacente aux pores du pollen présent	Épaississement de l’endexine adjacente aux pores du pollen absent	Épaississement de l’endexine adjacente aux pores du pollen présent

Le traitement taxonomique pour la famille des Betulaceae mentionné dans le paragraphe précédent correspond à celui proposé par Chen (1991, cité par Manchester & Chen 1998). Kuprianova (1963) a proposé un regroupement similaire des genres, mais leur a donné le rang de famille au lieu de tribu. D’autres traitements taxonomiques incluent le genre *Ostryopsis* dans la même tribu que *Corylus*, celle des Coryleae (Jury 1978; Furlow 1990; Figures 4a-b). Cependant, le regroupement de *Corylus* et *Ostryopsis* dans un même taxon supragénérique distinct de *Carpinus* et *Ostrya*, formerait un groupe paraphylétique selon les récentes analyses cladistiques (Crane 1989, Bousquet *et al.* 1992, Chen *et al.* soumis). Même si nombre de caractères morphologiques semblent lier le genre *Ostryopsis* à celui des noisetiers (ex., infrutescence courte avec un petit nombre de fruits, tyloses absentes, surface du fruit sans sillons

longitudinaux, rayons hétérocellulaires), plusieurs autres favorisent l'inclusion d'*Ostryopsis* dans la tribu des Carpineae (ex., épaissement de l'endexine du pollen adjacente aux pores, absence de périanthe chez la fleur staminée, filament séparé jusqu'à la base, germination épigéale).

1.2.2. ANALYSES CLADISTIQUES MOLÉCULAIRES ET MORPHOLOGIQUES

1.2.2.1. INTRODUCTION

Les prochaines lignes présentent les résultats de publications récentes dont les analyses cladistiques morphologiques de Crane (1989) et Bousquet *et al.* (1992), la deuxième étude reprenant certains caractères définis par la première. Une troisième analyse cladistique fut également effectuée à l'aide de caractères morphologiques, mais utilise un extra-groupe différent des deux autres (Chen *et al.* soumis). Les analyses moléculaires entreprises utilisent soit le gène chloroplastique codant pour la grande sous-unité de la RuBisCo, *rbcL* (Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.* soumis) ou les espaceurs internes transcrits (ITS) des gènes ribosomiaux 18S-5.8S-26S nucléaires (Chen *et al.* soumis). L'analyse cladistique de Bousquet *et al.* (1992) fut reprise par Chen *et al.* (soumis) à laquelle ces derniers ont ajouté la séquence *rbcL* d'*Ostryopsis* et utilisé différents extra-groupes. Il sera aussi question du choix du ou des taxons qui forment l'extra-groupe dans les analyses phylogénétiques des Betulaceae. Certaines analyses utilisent seulement un ou deux extra-groupes (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992) tandis que d'autres en utilisent plusieurs en différentes combinaisons (Chen *et al.* soumis)

1.2.2.2. LA POSITION DES BETULACEAE DANS LA SOUS-CLASSE DES HAMAMELIDIDAE.

La sous-classe des Hamamelididae, telle que définie par Cronquist (1981), Takhtajan (1980) et Thorne (1983), n'est pas monophylétique (Chase *et al.* 1993; Manos *et al.* 1993; Nickrent & Soltis 1995; Soltis *et al.* 1997; Källersjö *et al.* 1998). La sous-classe des Hamamelididae fut divisée de façon informelle en deux groupes, les Hamamelididae inférieurs et les Hamamelididae supérieurs (Crane & Blackmore 1989). Les Hamamelididae inférieurs

comprennent entre autres les Hamamelidaceae, les Platanaceae et les Cercidiphyllaceae. Les Betulaceae se retrouvent dans les Hamamelididae supérieurs avec, entre autres, le reste des Fagales, les Casuarinaceae, les Juglandales et les Urticales (*sensu* Cronquist 1981). L'analyse du gène chloroplastique *rbcL* comprenant 499 taxons dont le genre *Betula* (Chase *et al.* 1993) ainsi qu'une analyse de sites de restriction pour les Hamamelididae et les genres apparentés (Manos *et al.* 1993) présentent la sous-classe des Hamamelididae comme étant polyphylétique et appuie la séparation de la sous-classe en plusieurs groupes.

L'unique représentant de la famille des Betulaceae dans l'analyse de Chase *et al.* (1993), le genre *Betula*, a comme groupe-frère le genre *Casuarina* (Casuarinaceae). *Betula* et *Casuarina* sont inclus dans un clade formé par des membres de différentes familles pas nécessairement monophylétiques (Fagaceae, Myricaceae, Nothofagaceae). Les Betulaceae (*Alnus*) et les Casuarinaceae (*Casuarina*) ressortent également comme groupes-frères dans l'analyse cladistique basée sur les séquences du gène ribosomal 18S (Soltis *et al.* 1997) et dans l'analyse des Hamamelididae supérieurs basée sur le gène *rbcL* (Manos & Steele 1997). Cependant, les Betulaceae et les Casuarinaceae sont très éloignées l'une de l'autre selon l'étude de la corrélation des caractères végétatifs et floraux menée par Barabé *et al.* (1987). Selon cette étude, les Betulaceae auraient comme groupe-frère les Fagaceae, ces deux familles étant elles-mêmes groupe-frère des Ulmaceae (Barabé *et al.* 1987). Nixon (1989), quant à lui, place le genre *Nothofagus* Blume (Nothofagaceae) comme groupe-frère des Betulaceae, et les Betulaceae-Nothofagaceae comme groupe-frère de la famille des Fagaceae. Une analyse cladistique utilisant des sites de restriction des régions répétées inversées du génome chloroplastique propose d'autres relations (Manos *et al.* 1993). Dans cette analyse, les Betulaceae forment une polytomie avec les Myricaceae (*Myrica* L.), les Juglandaceae (*Juglans* L.) et les Casuarinaceae (*Casuarina*).

Les Betulaceae et les Fagaceae ont été traditionnellement placées proches l'une de l'autre (Crane 1989). De récentes analyses phylogénétiques basées sur

des caractères moléculaires ont montré, sans nier les étroites relations entre les Betulaceae et les Fagaceae, que ces dernières ne seraient pas la famille la plus proche des Betulaceae. Les résultats d'analyses cladistiques basées sur le gène chloroplastique *matK* placent les Betulaceae comme groupe-frère d'une famille monotypique, les Ticodendraceae (Manos & Steele 1997). La paire ainsi formée est groupe-frère du genre *Casuarina*.

Les analyses phylogénétiques récentes utilisent généralement les Fagaceae (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992) ou les Nothofagaceae (Chen *et al.* soumis) comme extra-groupe. *Nothofagus* semble être un extra-groupe à ne pas rejeter (Nixon 1989). Cependant, des analyses utilisant un échantillonnage plus vaste des Hamamelididae supérieurs semblent préconiser d'autres taxons comme *Ticodendron* Gómez-Laurito & Gómez (Manos & Steele 1997) ou les Casuarinaceae (Chase *et al.* 1993, Manos & Steele 1997, Soltis *et al.* 1997, Chen *et al.* soumis).

1.2.2.3. CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Crane (1989) utilise 14 caractères binaires des grains de pollen et des structures reproductrices, tous informatifs du point de vue de la parcimonie. Les différents caractères autapomorphes pour chaque genre sont exclus mais tout de même mentionnés. Deux analyses cladistiques furent entreprises, l'une utilisant les Fagaceae comme extra-groupe, l'autre utilisant les Hamamelidaceae. Les deux produisent le même résultat (Figure 5). La seule différence entre elles est au niveau de l'interprétation de trois caractères comme étant synapomorphes ou non pour les Betulaceae (déhiscence du fruit, nombre de carpelles dans le gynécée et fleurs unisexuées ou bisexuées). Le résultat de ces analyses donne une topologie identique à celle du modèle généralement accepté pour la famille.

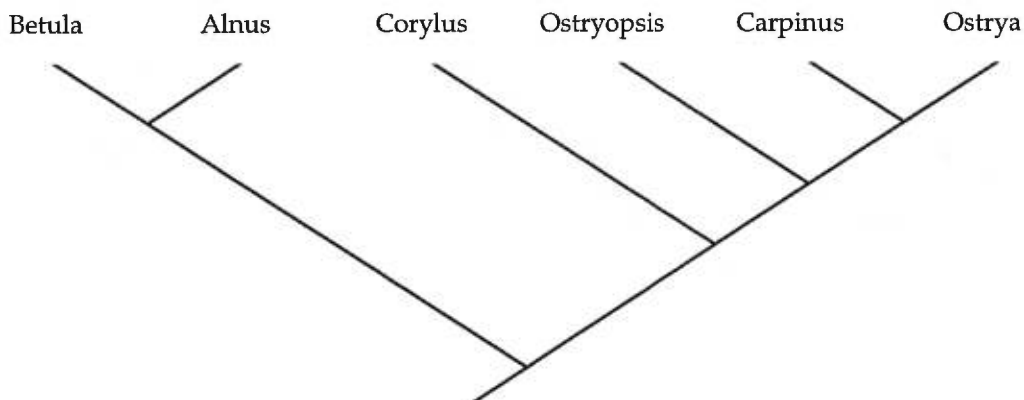


Figure 5 – Arbre phylogénétique de la famille des Betulaceae, d'après Crane (1989), à partir de caractères morphologiques du pollen et des structures reproductrices.

Onze des quatorze caractères inclus dans l'analyse cladistique de Crane (1989) furent repris par Bousquet *et al.* (1992) auxquels ils ont ajouté 24 autres caractères provenant de la littérature sur l'anatomie du bois, les structures reproductrices et foliaires, les phénylpropanoïdes et la cytologie. Comme l'avait fait Crane (1989), ils ont utilisé les Fagaceae et les Hamamelidaceae comme extra-groupes. Ils ont cependant inclu ces deux familles ensembles dans leur analyse contrairement à Crane (1989) qui les a traitées séparément. Le seul arbre obtenu par l'analyse de Bousquet *et al.* (1992) présente une topologie identique à celle généralement acceptée pour la famille (Figure 6). L'emploi des Fagaceae seules comme extra-groupe n'a pas changé la topologie à l'intérieur des Betulaceae (Bousquet *et al.* 1992).

Un seul arbre plus parcimonieux fut produit par l'analyse cladistique des 22 caractères morphologiques de Chen *et al.* (soumis). Ces caractères sont issus de différentes sources littéraires et de l'observation de spécimens. Les résultats de cette analyse varient selon que les caractères à états multiples sont ordonnés ou non. Dans les deux cas, la topologie de la sous-famille des Coryloideae est identique [*Corylus*-(*Ostryopsis*-(*Carpinus*-*Ostrya*))]. Cependant, lorsque les caractères à états multiples sont ordonnés, la sous-famille des Betuloideae devient paraphylétique et *Alnus* devient le taxon-frère du reste de la famille (Chen *et al.* soumis). Lorsque les caractères à états multiples sont

non-ordonnés, l'analyse produit deux arbres dont un est identique à celui de l'analyse précédente tandis que l'autre correspond à la topologie de la famille généralement acceptée, soit deux sous-familles monophylétiques (Chen *et al.* soumis).

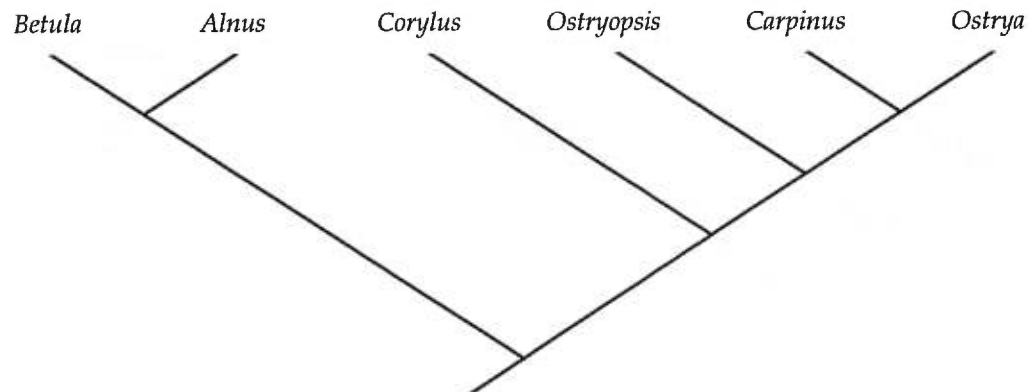


Figure 6 - Arbre phylogénétique de la famille des Betulaceae, d'après Bousquet *et al.* (1992). Caractères morphologiques et séquences *rbcL* donnent la même topologie malgré l'absence de la séquence *rbcL* d'*Ostryopsis*.

1.2.2.4. CARACTÈRES MOLÉCULAIRES – *RBCL*

Le gène chloroplastique *rbcL* est largement utilisé pour les analyses phylogénétiques chez les plantes, entre autres au niveau interfamilial (ex., Chase *et al.* 1993; Hasebe *et al.* 1995; Källersjö *et al.* 1998). La séquence de ce gène est relativement conservée et ne varie pratiquement pas en longueur excepté à son extrémité 3'. Kellogg & Juliano (1997) rapportent que sur les 476 acides aminés que code la séquence d'ADN du gène *rbcL*, 22% d'entre elles (105) ne présentent aucune variation parmi les 499 espèces de plantes utilisées par Chase *et al.* (1993). De plus, 110 autres sont variables seulement pour une de ces 499 espèces (autapomorphies).

L'analyse cladistique produite à l'aide de séquences d'ADN du gène chloroplastique *rbcL* sont au nombre de deux (Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.* soumis). La matrice de données de la première étude comporte une espèce de chacun des genres des Betulaceae (à l'exception d'*Ostryopsis*) ainsi que *Quercus rubra* L. (Fagaceae) et *Liquidambar styraciflua* L. (Hamamelidaceae) utilisés

comme extra-groupes (Bousquet *et al.* 1992). En plus du gène *rbcL*, cette analyse inclut les 100 nucléotides présents en amont de l'extrémité 3' du gène. Les analyses de Bousquet *et al.* (1992) exécutées avec le gène *rbcL* donnent une topologie d'arbre identique à celle trouvée par leur analyse utilisant des caractères morphologiques [*i.e.* (*Betula-Alnus*)-(*Corylus*-(*Carpinus-Ostrya*))] et ce malgré l'absence d'*Ostryopsis* (Figure 6).

La seconde étude (Chen *et al.* soumis) est plus complète en ce sens qu'elle inclut la séquence *rbcL* d'*Ostryopsis* et qu'elle inclut également, en plus de *Quercus rubra* et de *Liquidambar styraciflua*, 18 autres espèces de différentes familles (Fagaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Juglandaceae, Rhoipteleaceae, Nothofagaceae, Cercidiphyllaceae, Hamamelidaceae, Ulmaceae, Urticaceae, Moraceae et Cunoniaceae) mais, aucun représentant de la famille des Ticodendraceae. Chen *et al.* (soumis) ont procédé de deux façons quant à la définition du ou des extra-groupes, soit l'utilisation des Cunoniaceae seulement dans un premier temps et l'utilisation conjointe des Cercidiphyllaceae et des Hamamelidaceae ensuite. Toutes les autres familles non-définies comme faisant partie de l'extra-groupe sont incluses dans le groupe interne dans le but de déterminer laquelle d'entre elles est la plus proche des Betulaceae. Les consensus stricts de ces deux analyses ont donné la même topologie chez les espèces n'appartenant pas aux Betulaceae (Chen *et al.* soumis). La topologie de la sous-famille des Coryloideae est identique à celle décrite plus haut, *Corylus* étant le taxon frère de *Ostryopsis-Carpinus-Ostrya* et *Ostryopsis* étant le taxon frère de *Carpinus* et *Ostrya*. *Alnus* et *Betula* ne sont pas réunis mais forment plutôt une polytomie avec la sous-famille des Coryloideae (Chen *et al.* soumis). Les Betulaceae et les Casuarinaceae forment un groupe monophylétique dans le consensus strict.

1.2.2.5. CARACTÈRES MOLÉCULAIRES – ITS

Les séquences des espaceurs transcrits (ITS) des gènes ribosomiaux 18S-5.8S-26S présentent environ vingt fois plus de sites phylogénétiquement informatifs que les séquences *rbcL* (Chen *et al.* soumis). La pertinence de leur utilisation, comparée à celle du gène chloroplastique *rbcL* et du gène nucléaire 18S pour les analyses intrafamiliales chez les Betulaceae, a déjà été démontrée (Savard *et al.* 1993; Chen *et al.* soumis). De plus, aucune différence ne fut relevée entre les séquences *rbcL*, de même qu'entre les séquences du gène nucléaire 18S, au niveau infragénérique chez certaines espèces du genre *Alnus* (Savard *et al.* 1993). Le gène *rbcL* présente peu de variations au niveau intrafamilial chez les Betulaceae, ce qui explique la trichotomie impliquant *Alnus*, *Betula* et la sous-famille des Coryloideae dans l'analyse cladistique de Chen *et al.* (soumis). En somme, la région des ITS est plus pertinente pour les analyses phylogénétiques au niveau intrafamilial et intersectionnel chez les Betulaceae que les régions codantes du gène chloroplastique *rbcL* et du gène nucléaire 18S.

Un seul arbre fut produit par l'analyse cladistique des séquences d'ADN de l'ITS de 17 espèces de Betulaceae représentant les six genres de la famille et ayant comme extra-groupe une espèce de *Nothofagus* (Chen *et al.* soumis). La séparation des Betulaceae en deux sous-familles ainsi que la plupart des relations généralement observées à l'intérieur de la sous-famille des Coryloideae sont appuyées par cet arbre. Cet arbre diffère du modèle généralement accepté en raison de la paraphylie du genre *Carpinus*, la section *Distegocarpus* étant le taxon-frère du clade formé de la section *Eucarpinus* de *Carpinus* et du genre *Ostrya* (Figure 7; Chen *et al.* soumis).

Contrairement aux études qui ont proposé des relations génériques en se basant sur des caractères de diverses natures (voir plus loin), les analyses cladistiques morphologiques et moléculaires montrent beaucoup moins de divergence quant à la topologie de l'arbre phylogénétique de la famille. Selon ces analyses, les deux sous-familles, celle des Betuloideae (*Alnus* et *Betula*) et celle des Coryloideae (*Corylus*, *Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis*) forment des

groupes monophylétiques (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.* soumis). L'organisation des genres à l'intérieur des Coryloideae est plus souvent sujette à discussion. Néanmoins, les analyses cladistiques récentes placent, au sein de la sous-famille des Coryloideae, *Corylus* comme le taxon frère du reste de la sous-famille et *Ostryopsis* comme le taxon frère de *Carpinus* et *Ostrya* (Figures 5, 6 et 7).

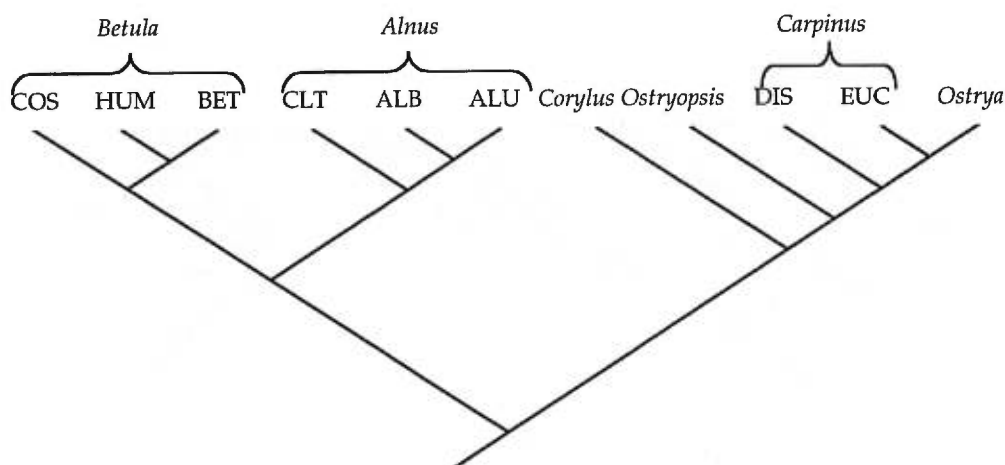


Figure 7 - Arbre phylogénétique des Betulaceae obtenu par l'analyse des séquences ITS, d'après Chen *et al.* (soumis). Les noms des sections des genres *Alnus*, *Betula* et *Carpinus* sont abrégés (COS, sect. *Costatae*; HUM, sect. *Humiles*; BET, sect. *Betula*; CLT, subg. *Clethroopsis*; ALB, subg. *Alnobetula*; ALU, subg. *Alnus*; DIS, sect. *Distegocarpus*; EUC, sect. *Eucarpinus*)

1.2.3. COMPARAISONS QUANTITATIVES

Anderson & Abbe (1934) ont utilisé six caractères quantitatifs pour lesquels ils ont calculé un indice, la « aggregate difference », donné par la racine carrée de la somme des carrés des caractères. Quarante espèces de Betulaceae sont incluses dans cette analyse, incluant des représentants de chacun des six genres de la famille et de plusieurs sections. Certaines sections infragénériques ne sont pas représentées comme par exemple le sous-genre *Acanthochlamys* de *Corylus* et le sous-genre *Cremastogyne* de *Alnus*. Pour établir leur modèle tridimensionnel de distances, ils ont compilé la moyenne des distances entre les genres. Les auteurs prennent soin de souligner que ce modèle ne représente pas des relations phylogénétiques, mais bien des distances. Cette analyse

semble diviser la famille en deux groupes, l'un formé par *Betula* et *Alnus* et l'autre par *Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis*. L'appartenance de *Corylus* à l'un des deux groupes demeure ambiguë. Les genres *Carpinus* et *Ostrya* sont ceux avec la plus petite moyenne de distances.

Les résultats obtenus par cette analyse de distances concordent généralement bien avec les regroupements proposés par les analyses moléculaires et morphologiques (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.* soumis). La séparation de la famille en deux sous-familles est soutenue par l'analyse quantitative d'Anderson & Abbe (1934) qui placent *Betula* et *Alnus* dans un groupe (sous-famille des Betuloideae) et *Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis* dans un autre groupe (sous-famille des Coryloideae tribu des Carpineae). L'incertitude concernant la position de *Corylus* dans le modèle proposé par Anderson & Abbe (1934) n'est pas vraiment déconcertante étant donné que certains traitements taxonomiques placent ce genre dans un taxon supragénérique différent de celui des trois autres membres de la sous-famille des Coryloideae (famille des Corylaceae, Kuprianova 1963; tribu des Coryleae, Chen 1991, cité par Manchester & Chen 1998). De plus, il est généralement accepté que *Corylus* représente le taxon frère du groupe formé par *Ostryopsis*, *Ostrya* et *Carpinus* (ex., Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992).

1.2.4. CARACTÈRES SÉROLOGIQUES

Afin de déterminer les affinités sérologiques entre différentes espèces au sein de la famille de Betulaceae, Brunner & Fairbrothers (1979) ont utilisé quatre méthodes sérologiques différentes (double diffusion de Ouchterlony, présaturation des antisérums, immunoélectrophorèse et la méthode de Boyden). Leur étude incluait cinq des six genres de Betulaceae (*Ostryopsis* étant exclu) et neuf espèces qui ne représentent pas toutes les divisions infragénériques (deux de *Alnus*, trois de *Betula*, une de *Carpinus*, deux de *Corylus* et une d'*Ostrya*). Les protéines (antigènes) furent extraites de grains de pollen provenant de plusieurs populations pour chaque espèce.

Les données de cette étude (Brunner & Fairbrothers 1979) maintiennent les cinq genres échantillonnés à l'intérieur d'une seule famille et la séparation de cette famille en trois groupes infragénériques, soit un premier incluant uniquement *Alnus*, un second uniquement *Betula* et un troisième comprenant les genres *Carpinus*, *Ostrya* et *Corylus*. La séparation de l'*Alnus* et de *Betula* en deux groupes distincts est rarement proposée (mais voir analyse des caractères morphologiques de Chen *et al.* soumis). Le genre *Alnus* présente une moyenne de 55% de dissimilarité protéinique (« protein dissimilarity ») avec le groupe *Carpinus-Ostrya-Corylus*, ce qui le place légèrement plus proche de ce groupe qu'il ne l'est de *Betula* (58% de dissimilarité protéinique entre *Alnus* et *Betula*). Néanmoins, le genre *Alnus* est plus proche de *Betula* que ne l'est le groupe *Carpinus-Ostrya-Corylus*. Ainsi, le genre *Betula* est le plus isolé de la famille, du point de vue sérologique (Brunner & Fairbrothers 1979). Brunner & Fairbrothers (1979) considèrent *Carpinus*, *Ostrya* et *Corylus* comme un groupe sérologiquement peu différencié avec 82% de similarité protéinique entre eux, ce qui est relativement élevé considérant le fait que cette valeur est similaire à celles obtenues au niveau infragénérique pour les genres *Alnus* (87%) et *Betula* (91%).

En évaluant les résultats des tests sérologiques, il est compréhensible que les auteurs aient préconisé la formation de deux groupes taxonomiques différents pour *Alnus* et *Betula*, même si quelques réserves doivent être émises concernant ces conclusions. Néanmoins, le regroupement des trois genres appartenant à la sous-famille des Coryloideae (*Carpinus*, *Ostrya* et *Corylus*) et leur étroite union concordent avec les analyses cladistiques de Crane (1989), Bousquet *et al.* (1992) et Chen *et al.* (soumis).

1.2.5. ANATOMIE DU BOIS

L'étude de l'anatomie du bois chez les Betulaceae incluait un large échantillonnage de 79 espèces représentant tous les genres et tous les groupes infragénériques à l'exception du sous-genre *Acanthochlamys* de *Corylus* et la section *Clethroopsis* de *Alnus* (Hall 1952). Cette analyse approfondie du bois des Betulaceae permet d'établir certaines relations aux niveaux intergénériques et infragénérique (Figure 8; Hall 1952). Les deux sous-familles Coryloideae et Betuloideae sont bien définies comme étant monophylétiques. Les Betuloideae se distinguent des Coryloideae entre autres par la présence de trachéides (absentes chez les Coryloideae), l'absence d'épaississement spiralé dans les vaisseaux (présent chez les Coryloideae) et un nombre plus élevé de barres dans les plaques de perforations des vaisseaux.

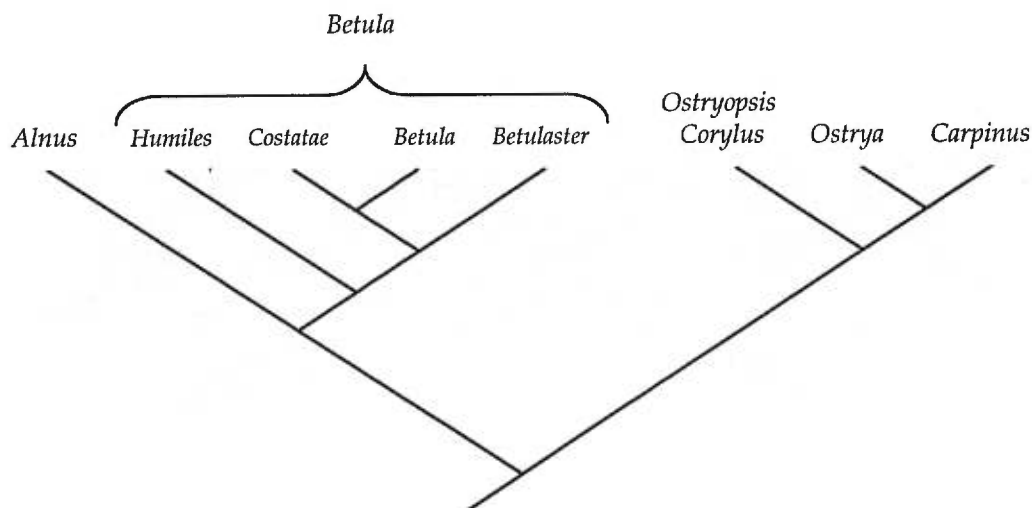


Figure 8 - Relations phylogénétiques au sein de la famille des Betulaceae, telles que proposées par Hall (1952). Caractères anatomiques du bois.

L'échantillonnage adéquat des espèces du genre *Betula* a permis d'établir les relations phylogénétiques possibles entre les différentes sections du genre. La section *Betulaster* est la plus développée et ce en raison de plusieurs caractères anatomiques (ex., nombre restreint de vaisseaux au mm², les fibres-trachéides sont plus nombreuses que les trachéides). Les sous-sections *Costatae* et *Betula* sont proches et groupe-frère de la section *Betulaster*.

Ces trois sections ont comme groupe-frère la sous-section *Humiles* (Figure 8). Les relations entre les sections du genre *Alnus* ne sont pas discutées car l'échantillonnage restreint d'une des quatre sections et l'absence de représentant d'une autre ne le permet pas. Les genres *Ostryopsis* et *Corylus* ne peuvent être différenciés selon les caractères anatomiques de leur bois. D'après Hall (1952), *Ostrya* et *Carpinus* seraient les genres les plus dérivés de la famille, *Ostrya* considéré comme ayant le bois le plus spécialisé.

1.2.6. MORPHOLOGIE DES TRICHOMES DES SURFACES FOLIAIRES

Les différents trichomes retrouvés sur la surface du limbe foliaire dans la famille des Betulaceae seraient issus d'un trichome simple et unicellulaire qui aurait donné naissance à deux lignées distinctes (Hardin & Bell 1986). Ces deux lignées sont caractérisées, l'une par des trichomes unisériés et non-glandulaires et l'autre par des trichomes mutisériés et glandulaires. Un accroissement de la complexité de l'apex glandulaire des trichomes aurait eu lieu au cours de l'évolution de la deuxième lignée (Hardin & Bell 1986). Les types de trichomes reconnus par cette étude (Hardin & Bell 1986) sont au nombre de six (aciculaire, filiforme, spiralé, subulé, glandulaire-stipité et écaille peltée).

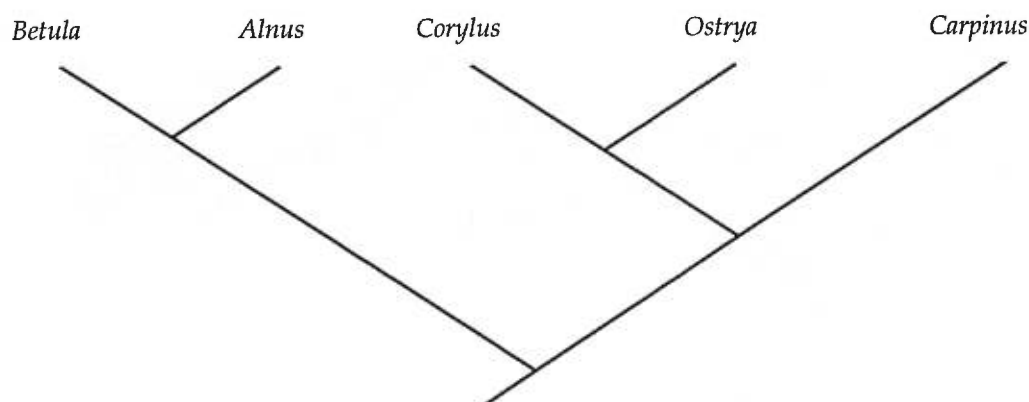


Figure 9 – Relations génériques proposées pour les genres de la famille des Betulaceae, d'après Hardin & Bell (1986), basé sur des caractères morphologiques de la surface foliaire.

L'hypothèse de Hardin & Bell (1986) soutient la reconnaissance de deux groupes au sein de la famille des Betulaceae, l'un formé de l'*Alnus* et *Betula* et l'autre formé de *Carpinus*, *Ostrya* et *Corylus* (Figure 9). La position du genre asiatique *Ostryopsis* n'est pas discutée dans cette étude. Cinq des six types de trichomes de surface foliaire sont présents chez tous les genres. Les écailles peltées font exception, étant retrouvées seulement chez *Alnus* et *Betula*. Ces trichomes sont considérés comme étant le type de trichome le plus évolué chez les Betulaceae. Le genre *Betula* est le seul qui ne possède pas de trichomes glandulaires-stipités. Hardin & Bell (1986) considèrent que ce type de trichome aurait disparu au cours de l'évolution du genre *Betula*.

L'arrangement proposé pour la sous-famille des Coryloideae est moins conventionnel. Selon Hardin & Bell (1986), *Carpinus* serait le genre le plus primitif de la sous-famille des Coryloideae en raison du fait qu'il possède des trichomes glandulaires avec un pédicelle unisérié. La présence de trichomes glandulaires multisériés chez *Ostrya* et *Corylus* feraient de ces deux genres des taxons-frères, plus évolués que *Carpinus*. Les trichomes multisériés glandulaires seraient issus de trichomes unisériés glandulaires, avec un accroissement de la complexité de l'apex glandulaire (Hardin & Bell 1986).

1.2.7. STRUCTURE DES BOURGEONS HIVERNAUX ET CROISSANCE FOLIAIRE

La croissance des feuilles et la structure des bourgeons hivernaux ont été observées pendant quelques années chez douze espèces de cinq genres de Betulaceae (Kikuzawa 1982). L'unité de base des rameaux chez les Betulaceae est définie comme étant une feuille et deux stipules de taille égale. L'espèce ancestrale hypothétique des Betulaceae, selon Kikuzawa (1982), possède des rameaux composés uniquement de ces unités de base. Chez les Betulaceae, l'accroissement du nombre de bractées sur les bourgeons (dérivés des unités de base), et conséquemment la réduction du nombre de feuilles par rameaux, sont le résultat d'un état dérivé, d'une tendance vers la réduction (Kikuzawa 1982). D'après les observations de Kikuzawa (1982), la section *Gymnothyrsus* (sect. *Alnus*, Furlow 1990) du genre *Alnus* est la plus primitive chez les Betulaceae car

ses rameaux ne possèdent aucune spécialisation avec cependant une légère réduction du limbe foliaire. Dans la marche vers la spécialisation, la section *Gymnothyrsus* est suivie de la section *Alnaster* (sect. *Alnobetula*, Furlow 1990) du genre *Alnus* puis de *Betula*, *Corylus* et du duo *Ostrya-Carpinus* (Figure 10).

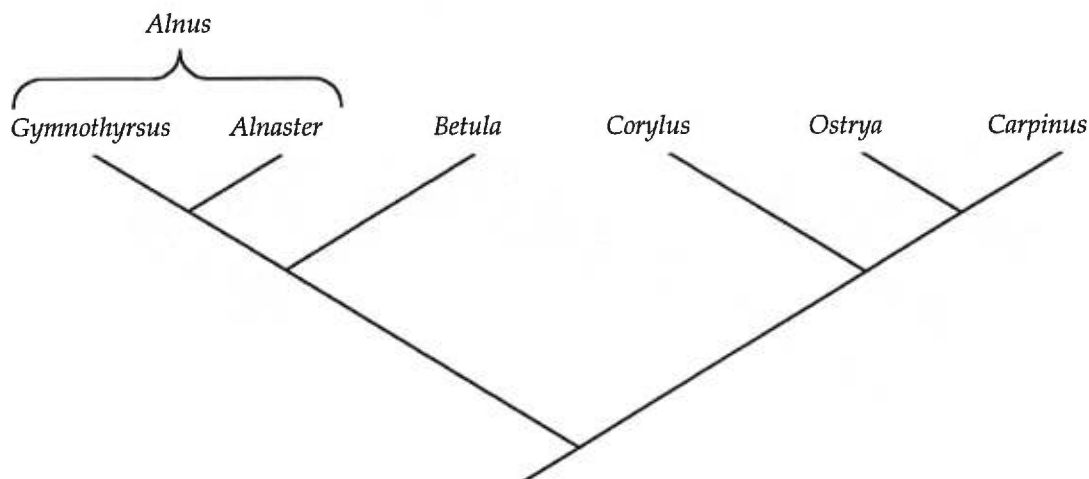


Figure 10 – Dendrogramme schématisé de la famille des Betulaceae d’après Kikuzawa (1982), basé sur la croissance des feuilles et la structure des bourgeons.

Chez l’espèce ancestrale, l’émergence et l’abscission des feuilles se font de façon graduelle au cours de la saison de croissance. Si cette espèce ancestrale se trouvait en région tempérée froide, la représentation graphique du nombre de feuilles sur le rameau, observé à intervalle régulier durant la saison, donnerait une courbe en cloche. Plus l’émergence et l’abscission des feuilles sont rapides et ponctuelles, plus la courbe prendra la forme d’un trapèze. Les observations de Kikuzawa (1982) montrent une tendance croissante vers la forme trapèze de cette courbe dans la séquence *Gymnothyrsus* – *Alnaster* – *Betula* – *Corylus* - (*Ostrya* - *Carpinus*). Kikuzawa (1982) explique ce phénomène en autres par le fait que *Alnus* et *Betula* sont des genres qui colonisent de nouveaux habitats et forment des populations uniformes d’une espèce, donc sans compétition interspécifique, où la pousse des feuilles se fait de façon plus graduelle. Alors que *Corylus*, *Ostrya* et *Carpinus* forment des populations mixtes, plus sujettes à la compétition ce qui explique la pousse rapide des feuilles et la courbe en forme de trapèze.

De plus, Kikuzawa (1982) affirme que l'humidité du sol est probablement le facteur environnemental qui a le plus affecté l'histoire évolutionnaire des Betulaceae. Le nombre de bractées protégeant les bourgeons contre la dessiccation et le froid semble augmenter en fonction des conditions d'humidité de l'habitat. Par exemple, les espèces de la section *Gymnothyrsus* (ex., *A. hirsuta* Turcz., sans bractées sur le bourgeon) croissent proche de sources d'eau (ex., marais, plaines inondées) tandis que les *Carpinus* (24 bractées sur leurs bourgeons) croissent habituellement sur des terrains en pente, plus secs (Kikuzawa 1982).

1.2.8. DISCUSSION ET SYNTHÈSE DES RELATIONS PROPOSÉES

À la lumière des résultats obtenus par les multiples analyses cladistiques et par les études qui ont proposé diverses hypothèses schématisant les relations phylogénétiques entre les genres des Betulaceae, la première conclusion à laquelle on en vient est que la monophylie des deux sous-familles des Betulaceae est généralement acceptée. Les résultats de certaines études, sans nécessairement proposer le contraire, soulignent la fragilité de la monophylie de la sous-famille des Betuloideae (Brunner & Fairbrothers 1979; Chen *et al.* soumis). L'étude sérologique de Brunner & Fairbrothers (1979) propose la monophylie de la sous-famille des Coryloideae, mais cette dernière forme une trichotomie à la base de la famille avec *Betula* et *Alnus*. Le consensus strict des deux arbres les plus parcimonieux obtenus de l'analyse des séquences *rbcl* de Chen *et al.* (soumis) donne la même trichotomie. L'analyse cladistique des données morphologiques de Chen *et al.* (soumis) exécutée avec les caractères à états multiples ordonnés présente une sous-famille des Betuloideae paraphylétique, *Alnus* étant le groupe-frère du reste de la famille. Cependant, l'analyse combinée des trois types de données (morphologique, séquences de l'ITS et de *rbcl*) donne une topologie appuyant la monophylie des deux sous-familles (Chen *et al.* soumis).

D'après les résultats qu'ils ont obtenus, Anderson & Abbe (1934) notent la position ambiguë de *Corylus*. Ils hésitent entre placer les noisetiers avec les

Betuloideae ou avec les Coryloideae. Si *Corylus* est placé avec les Coryloideae, la topologie extrapolée résultante est conforme aux grandes lignes de celle généralement acceptée pour la famille. La position de *Corylus* avec *Alnus* et *Betula* est fort douteux et est contredit par nombre de caractères morphologiques et par les analyses cladistiques récentes.

La monophylie des Coryloideae est appuyée par l'ensemble des études et analyses dont il est question ici à l'exception de celle d'Anderson & Abbe (1934) qui émettent des doutes quant à la position de *Corylus*. D'une façon générale, la topologie *Corylus* – (*Ostryopsis* – (*Carpinus* – *Ostrya*)) est acceptée (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.* soumis). Toutes les séries de caractères analysées par Chen *et al.* (soumis), sauf les séquences des ITS, acceptent également cette topologie. Les séquences des ITS présentent le genre *Carpinus* comme étant paraphylétique, la section *Distegocarpus* étant le taxon frère de la section *Eucarpinus* et du genre *Ostrya*. Malgré le fait que Kikuzawa (1982) n'ait pas inclus *Ostryopsis* dans son étude, les relations phylogénétiques entre *Corylus*, *Carpinus* et *Ostrya* demeurent identiques à celles dépeintes par les analyses cladistiques récentes. *Corylus* et *Ostryopsis* ne sont pas différenciés par l'étude de l'anatomie de leur bois de Hall (1952). Néanmoins, les mêmes relations sont conservées entre *Carpinus*, *Ostrya* et la paire *Ostryopsis/Corylus* en ce qui concerne les caractéristiques du bois (Hall 1952).

Carpinus et *Ostrya* sont topologiquement maintenus ensembles dans la quasi-totalité des études. Ils sont généralement considérés comme les genres les plus dérivés de la sous-famille des Coryloideae. Cependant, une situation différente est observée à deux reprises. Premièrement, Brunner & Fairbrothers (1979), d'après leurs données sérologiques, ne déterminent pas de regroupement au sein de la sous-famille des Coryloideae. Ensuite, les caractères des surfaces foliaires de Hardin & Bell (1986) placent *Corylus* et *Ostrya* ensembles, comme taxons frères de *Carpinus*.

1.3. ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES INCLUANT CERTAINS TAXONS FOSSILES

1.3.1. LES FOSSILES

1.3.1.1. LES GENRES ACTUELS.

1.3.1.1.1. INTRODUCTION

Les Betulaceae sont l'une des familles d'angiospermes les mieux représentées dans les registres fossilifères. La famille du bouleau était présente dans une grande quantité d'environnements dès la fin du Crétacé et au Tertiaire, comme le démontrent l'abondance et la richesse des fossiles découverts (Crane 1989). La majorité des genres actuels des Betulaceae sont bien représentés dans les registres fossilifères, sauf le genre *Ostryopsis* dont aucun fossile n'a été retrouvé à ce jour. Le tableau II présente les principaux endroits et époques où les fossiles des différents genres éteints et actuels des Betulaceae furent retrouvés. Les restes fossiles les plus anciens attribués aux genres actuels de la famille des Betulaceae sont des grains de pollen avec certaines caractéristiques du genre *Alnus* datant du Santonien (réf. dans Muller 1981). L'attribution de ces microfossiles au genre *Alnus* est cependant incertaine. Les plus anciens restes macrofossiles identifiés sans équivoque datent de l'Oligocène pour *Ostrya* (Chaney 1927, cité par Crane 1989), de l'Eocène moyen pour *Corylus* (Wehr 1995), de l'Eocène moyen pour *Betula* (Crane & Stockey 1987), de l'Eocène supérieur pour *Carpinus* (Tanai 1972) et du Paléocène pour *Alnus* (réf. dans Crane 1989).

1.3.1.1.2. ALNUS

Lorsqu'on mentionne les plus anciens restes fossiles d'un taxon quelconque, on fait pratiquement toujours référence au pollen. Le genre *Alnus* ne fait pas exception à cette règle. *Alnipollenites eminens*, datant du Santonien japonais, est le plus ancien reste de pollen de type *Alnus* retrouvé à ce jour (Miki 1977, cité par Muller 1981). Ce type de pollen fut également retrouvé en abondance au Campanien du Japon et au Meastrichtien et Paléocène de l'Amérique du Nord et de l'Eurasie (réf. dans Muller 1981 et Crane 1989). Les plus anciens fossiles de pollen de type *Alnus* découverts en Europe datent du

Tableau II. Tableau synoptique des premières présences dans les registres fossilifères des genres actuels et éteints de la famille des Betulaceae selon leur répartition sur les trois continents de l'hémisphère nord (Abbréviations : FR = fruits et / ou infrutescences; FL = fleurs et inflorescences; FE = feuilles; PO = pollen).

Périodes et époques	Amérique du Nord	Europe	Asie
Pléiocène		<i>Corylocarpinus</i> (FR)	
Miocène			
Oligocène	<i>Ostrya</i> (FR, FE)		
	<i>Asterocarpinus</i> (FR)		
Éocène	<i>Alnus</i> (FR, FL, FE)	<i>Carpinus</i> (FR)	<i>Carpinus</i> (FR)
	<i>Corylus</i> (FR) <i>Betula</i> (FR, FL, FE)		
Paléocène	<i>Cranea</i> (FR, FL, FE, PO)	<i>Atriplex borealis</i> (FR)	<i>Palaeocarpinus orientalis</i> (FR)
	<i>Palaeocarpinus joffrensis</i> (FR)	<i>Alnus</i> (PO) <i>Betula</i> (PO)	<i>Alnus</i> (FR) <i>Carpinus</i> (PO)
	<i>Palaeocarpinus aspinosa</i> (FR)	<i>Palaeocarpinus laciniata</i> (FR)	
Crétacé	<i>Alnus</i> (PO) <i>Betula</i> (PO)	<i>Corylus</i> (PO)	<i>Alnus</i> (PO) <i>Betula</i> (PO) <i>Corylus</i>
	<i>Carpinoxylon ostryopoides</i> (bois)		

Fertilité

Paléocène inférieur (*Polyvestibulopollenites* sp.; réf. dans Muller 1981). La présence d'un épaississement de l'ectexine liant les pores (« arc ») est une structure diagnostique du pollen de l'*Alnus* (Crane 1989). Les différents pollens de type *Alnus* découverts laissent croire que le genre était plus diversifié qu'actuellement (Crane 1989).

Parmi les premières infrutescences attribuées sans équivoque au genre *Alnus*, on retrouve des fossiles datant du Paléocène (*Alnus* sp, Péninsule de Kenai), du Paléocène et de l'Eocène (*A. beringiana*, ancienne URSS) et de l'Eocène moyen (*A. poolensis*, Angleterre) (réf. dans Crane 1989). De plus, des fruits de l'*A. parviflora* (Berry) Wolfe & Wehr furent découverts dans la Republic flora, état de Washington (Wehr & Manchester 1996). Le matériel fossile le plus complet concernant *Alnus* provient de la Formation Clarno en Oregon, datant de l'Eocène moyen, où l'on a retrouvé des inflorescences staminées et pistillées ainsi que des feuilles (Manchester & Crane, cité par Crane 1989). En Chine, les plus anciens fossiles de l'*Alnus* découverts datent de la fin du Crétacé (Hsü 1983).

1.3.1.1.3. BETULA

C'est au Sénonien inférieur, au Canada, que l'on retrouve les restes de pollen les plus anciens de type *Betula* (*Betulaceoipollenites* sp.; Jarzen & Norris 1975, cités par Muller 1981). L'âge de ce fossile n'est pas certain, il pourrait dater du Santonien ou même du Coniacien (Muller 1981). Crane (1989) croit que ce pollen serait primitif pour les Betulaceae. Le pollen de type *Betula* est également rapporté du Campanien et du Maestrichtien du Japon (*Betulaepollenites* sp.; réf. dans Muller 1981) et du Paléocène de l'Europe (*Trivestibulopollenites*, réf. dans Muller 1981).

Les feuilles et les structures reproductrices datant de l'Eocène moyen retrouvées dans la formation d'Allenby au sud de la Colombie-Britannique, constituent la découverte la plus ancienne et les restes les plus complets pour le genre *Betula* (Crane & Stockey 1987). Les feuilles sont attribuées à la paléo-espèce *Betula leopoldae* Wolfe & Wehr et les fruits, infrutescences, inflorescence

staminées et pollen qui leur sont associés, sont considérés comme appartenant également à cette paléo-espèce. Il semblerait que *B. leopoldae* soit proche des espèces de la section *Costatae* du genre *Betula* en raison de certains caractères de l'infrutescence et de la feuille (ex., bractées larges, trilobées et persistentes et feuilles avec plus de sept paires de veines secondaires; Crane & Stockey 1987).

Plusieurs autres fossiles de structures reproductrices et végétatives ressemblant au genre *Betula* ont été découverts du Paléocène à l'Eocène inférieur, mais leur identification sans équivoque est difficile (réf. dans Crane 1989). Les fossiles les plus anciens de *Betula* retrouvés en Chine datent du Crétacé supérieur (Hsü 1983).

1.3.1.1.4. CORYLUS

Triporopollenites mullensis est le plus ancien fossile de pollen de type *Corylus* découvert, datant du Maestrichtien de l'Écosse (Srivastava 1975, cité par Muller 1981). *Triporopollenites* est également rapporté au Paléocène supérieur et à l'Eocène, en France (Gruas-Cavagnetto 1978, cité par Muller 1981), ainsi que du Maestrichtien à l'Oligocène supérieur de l'Amérique du Nord (réf. dans Muller 1981 et Taylor 1990).

Des fruits fossiles solitaires datant du Paléocène de l'Écosse, du Groenland et du Montana, ressemblent à ceux de *Corylus*, mais ils ne peuvent être attribués à ce genre sans équivoque en raison du fait qu'ils soient plus petits que les fruits des noisetiers actuels (réf. dans Crane 1989). *Corylus insignis* du Paléocène du Montana est assigné au genre *Corylus* avec moins d'incertitude en raison d'une cicatrice d'attachement sur le fruit similaire à celles qui sont retrouvées chez les espèces actuelles du genre *Corylus* (Brown 1962, dans Crane 1989 et Taylor 1990). Le fruit fossile le plus ancien que l'on peut attribuer au genre *Corylus* avec certitude date de l'Eocène moyen de la Republic flora, Washington (Wolfe & Wehr 1987, cité par Crane 1989, Wehr 1995, Wehr & Manchester 1996). Plusieurs fossiles de *Corylus* datant du Crétacé supérieur au Miocène furent également trouvés en Chine (Hsü 1983).

1.3.1.1.5. *CARPINUS*

Le registre fossilifère de *Carpinus* est le mieux connu de la sous-famille des Coryloideae (Crane 1981). Plusieurs relevés mentionnent la présence de pollen de type *Carpinus* en Europe, du Paléocène à l'Oligocène (*Carpinuspollenites*, Paléocène supérieur et Oligocène; *Polyporopollenites carpinoides*, Eocène inférieur; réf. Muller 1981).

Des fruits avec leurs involucre appartenant au genre *Carpinus* datant du Eocène supérieur du Japon constituent les plus anciens restes découverts de ce genre (Tanai 1972). Les fruits et les involucre de *Carpinus* sont abondants et largement distribués en Europe et en Asie durant l'Eocène, l'Oligocène et le Néogène (réf. dans Crane 1989). Environ une vingtaine d'espèces fossiles de *Carpinus* ont été décrites pour la Japon seulement (Tanai 1972). Cependant, la représentation de *Carpinus* dans les registres fossilifères de l'Amérique du Nord est pauvre (Tanai 1972, Crane 1989). Les premiers fossiles de *Carpinus* retrouvés en Chine datent de l'Oligocène (Hsü 1983).

1.3.1.1.6. *OSTRYA*

Ostrya est pour la première fois présent sous forme d'involucre dans les registres fossilifères de l'Oligocène de l'Amérique du Nord (Chaney 1927, cité par Crane 1989). Des feuilles et des fruits de l'espèce *Ostrya oregoniana* sont retrouvés dans la formation John Day (Oligocène inférieur), avec des feuilles de *Paracarpinus* et des involucre d'*Asterocarpinus* (Crane 1989, Manchester & Crane 1987). En somme, les restes d'*Ostrya* sont plutôt rares dans les registres fossilifères (Crane 1981).

1.3.1.2. LES GENRES ÉTEINTS

1.3.1.2.1. INTRODUCTION

L'inclusion de taxons fossiles dans les analyses phylogénétiques n'est pas chose courante, principalement en raison des sources de caractères incomplètes. Les taxons fossiles sont généralement décrits d'après un seul type d'organe, que ce soit les fruits, les fleurs ou les feuilles (ex., Crane 1981; Page 1970, 1980). Lorsque plusieurs structures de nature différente sont associées à un taxon fossile, elles le sont habituellement sur une base spatio-temporelle plutôt que par une connexion physique entre elles (ex., Sun & Stockey 1992; Manchester & Chen 1998). L'appartenance à une seule et unique espèce des structures reproductrices et de feuilles est généralement soutenue par leur présence commune et en très grand nombre dans des sites différents de la même époque. En plus de leur présence simultanée en un lieu, elles sont généralement toutes deux absentes en d'autres sites. Le fait que ces structures soient souvent retrouvées dans la même strate est un autre facteur favorisant l'acceptation de leur appartenance à une seule espèce (Crane 1981).

Cette section présente une analyse cladistique sommaire de la famille des Betulaceae incluant certains taxons fossiles et basée principalement sur des caractères morphologiques des organes de reproduction (tableau III). Les différents fossiles attribués à la famille des Betulaceae seront d'abord décrits brièvement.

1.3.1.2.2. *PALAEOCARPINUS* CRANE (1981)

Ce genre était le représentant le plus diversifié et le plus répandu de la sous-famille des Coryloideae au Paléocène, en Europe (Crane 1981), en Amérique du Nord (Crane *et al.* 1990; Sun & Stockey 1992; Manchester & Chen 1996; Wehr 1995; Wehr & Manchester 1996) et en Asie (Manchester & Guo 1996). Si l'apparition des Coryloideae a bien eu lieu au Paléocène, le genre *Palaeocarpinus* est l'un des représentants les plus anciens de cette sous-famille de concert avec le genre *Corylus* (Crane 1989). Le genre est caractérisé par son fruit, une noix de forme ovée à elliptique, comprimée et couverte de sillons sur les deux faces,

et par l'involucre qui la sous-tend, formé de deux bractées de grandeur égale ou presque (Crane 1981).

Tableau III. Tableau synoptique des divers taxons fossiles traités dans ce chapitre. L'astérisque (*) identifie les références originales de la description de ces taxons fossiles.

Taxons	Périodes	Localités	Références
<i>Palaeocarpinus laciniata</i>	Paléocène supérieur	Readings Beds, Newberry (Angleterre)	Crane (1981)*
<i>P. aspinosa</i>	Paléocène	Antelope Butte, Bison Basin, East Salt Wells Creek, Patrick Draw, Rairden et Washakie Castle Gardens (Wyoming, USA)	Manchester & Chen (1996)*
<i>P. joffrensis</i>	Paléocène	Paskapoo Formation, Muncé's Hill, Joffre (Alberta, Canada)	Sun & Stockey (1992)*
<i>P. orientalis</i>	Paléocène	Wulonggu Formation, Altai (Xinjiang, Chine)	Manchester & Guo (1996)*
<i>Cranea wyomingensis</i>	Paléocène et Eocène inférieur	Fort Union Formation et Willwood Formation (Wyoming, USA)	Manchester & Chen (1998)*
<i>Asterocarpinus perplexans</i>	Oligocène	John Day Formation (Oregon, USA), Florissant (Colorado, USA) et Grant (Montana, USA)	Manchester & Crane (1987)*
<i>Corylocarpinus szaferowae</i>	Pliocène	Willershausen (Allemagne)	Crane (1981) Crane (1989)
<i>Carpinoxylon ostryopsoides</i>	Crétacé supérieur (Campanien)	Formation Panoche et Del Puerto Creek (Californie, USA)	Page (1970)* Page (1980)*
<i>Atriplex borealis</i>	Paléocène	Menat, Puy-de-Dôme (France)	Crane (1981) Crane (1989)

Ce genre fossile fut pour la première fois décrit à partir de restes de fruits et de leurs bractées trouvés dans la localité de Readings Beds dans le sud de l'Angleterre (Crane 1981). Les bractées et les fruits furent attribués à la nouvelle espèce *Palaeocarpinus laciniata* Crane. Les restes de feuilles sont attribués à la nouvelle espèce *Craspedodromophyllum acutum* Crane.

Deux autres espèces de *Palaeocarpinus* ont été identifiées, l'une du Paléocène de Muncé's Hill en Alberta (*P. joffrensis*, Sun & Stockey 1992) et l'autre du Paléocène du sud-ouest de la Chine (*P. orientalis*, Manchester & Guo 1996). Ces deux espèces sont similaires morphologiquement, ne différant que pour certains caractères de l'inflorescence staminée (ex., apex de la bractée primaire plus ronde et inflorescence plus grande chez *P. orientalis*) (Manchester

& Guo 1996). D'autres distinctions entre ces deux espèces pourraient être observées chez leurs noix, mais les fossiles du *P. orientalis* ne révèlent aucun détail de la structure du fruit et de sa surface (Manchester & Guo 1996).

Des restes fossiles d'infrutescence datant du Paléocène trouvés dans le sud-ouest de l'état du Wyoming, ont permis de décrire une nouvelle espèce, *Palaeocarpinus aspinosa*, caractérisée par des bractées involucreales à marge entière ou faiblement disséquée (Manchester & Chen 1996). Cette caractéristique de la marge des bractées sous-tendant le fruit est une première pour *Palaeocarpinus* chez qui on avait jusqu'alors retrouvé seulement des espèces avec des bractées à marge disséquée. De plus, chez cette espèce, le nombre de fruits par infrutescence est inférieur à celui des autres espèces décrites et les cymes sont plus espacées sur l'axe. À part ces aspects de la morphologie de l'infrutescence, cette espèce possède des caractères similaires à ceux retrouvés chez la plupart des autres espèces de *Palaeocarpinus*. Les feuilles qui sont associées à ces fruits sont similaires à celles associées à *P. joffrensis* et *P. orientalis*, ainsi qu'à celles de *Corylus*, et sont décrites comme appartenant au genre *Corylites*. Lorsqu'un reste fossile de feuille est attribué au genre *Corylites*, cela signifie que ces feuilles pourraient appartenir à *Corylus* ou à *Palaeocarpinus*, mais que leur morphologie ne permet pas de les distinguer (Manchester & Guo 1996). Ces feuilles diffèrent cependant de celles associées au *P. laciniata* (*Craspedodromophyllum acutum*, Crane 1981).

1.3.1.2.3. CRANEA MANCHESTER & CHEN (1998).

Ostryopsis est le seul genre de la famille des Betulaceae à ne pas être représenté dans les registres fossilifères. Cependant, un genre décrit récemment appartenant à la sous-famille des Coryloideae, possède certains caractères semblables à ceux d'*Ostryopsis*. Le genre *Cranea*, dont le spécimen type a été nommé *C. wyomingensis*, fut décrit à partir de restes datant du Paléocène trouvés en plusieurs localités de la Formation de Fort Union au Wyoming (Manchester & Chen 1998). *Cranea* fut également découvert dans une localité de la Formation de Willwood (Wyoming), datant de l'Eocène

(Manchester & Chen 1998). Les fruits et les involucre de *Cranea* sont semblables à ceux d'*Ostryopsis*. Cependant, l'infrutescence est plus allongée chez *Cranea* et les involucre situés à ses extrémités sont plus petits que ceux d'*Ostryopsis* qui sont tous de taille égale (Manchester & Chen 1998). Des fruits petits, non-ailés, ellipsoïdes avec des sillons longitudinaux et un périanthe persistant tendent à placer *Cranea* dans la tribu des Carpineae (avec *Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis*). Le fait que les involucre restent attachés à l'infrutescence suite à la dispersion est un autre critère qui rapproche *Cranea* et *Ostryopsis*.

1.3.1.2.4. ASTEROCARPINUS MANCHESTER & CRANE (1987)

Le spécimen type décrivant le genre, *Asterocarpinus perplexans* (Cockerell) Manchester & Crane, fut découvert sur plusieurs sites datant de l'Oligocène, de la Formation John Day du centre de l'Oregon (Manchester & Crane 1987). D'autres spécimens furent trouvés au Montana et au Colorado. Ce genre se démarque des autres genres fossiles et actuels des Betulaceae par la forme de son involucre. L'involucre est formé de quatre à sept bractées de forme élancée, à marge entière, disposées en étoile à la base d'un fruit couvert de sillons longitudinaux (Manchester & Crane 1987). C'est à son involucre qu'il doit son statut de genre. *Asterocarpinus* est placé dans la sous-famille des Coryloideae en raison de certains caractères de son fruit (ex., sillons longitudinaux sur la surface) et de son involucre (ex., formant une aile) (Manchester & Crane 1987). Un nouveau genre fut également créé pour classer les restes de feuilles associés à *Asterocarpinus*. Le genre *Paracarpinus* occupe une fonction similaire à celle de *Corylites*, en regroupant les restes de feuilles qui présentent des caractéristiques de *Carpinus* (Manchester & Crane 1987). Manchester & Crane (1987) croient que le genre *Asterocarpinus* pourrait être apparu à la même période que *Carpinus* et *Ostrya*. En effet, certains caractères rapprochent *Asterocarpinus* de *Carpinus* (ex., morphologie du fruit, nervation pennée de l'involucre) et de *Ostrya* (ex., morphologie du fruit, symétrie radiale de l'involucre). *Asterocarpinus*, probablement contemporain des premiers

Carpinus et *Ostrya* (Crane 1989), s'est éteint à la fin de l'Oligocène (Manchester & Crane 1987).

1.3.1.2.5. *CORYLOCARPINUS* STRAUS (1969)

Le genre *Corylocarpinus* est le plus récent des genres éteints, datant du Pliocène de Willershausen (Allemagne). Le specimen type, *Corylocarpinus szaferowae* Straus (1969, cité par Crane 1981, 1989) fut retrouvé avec des restes fossiles de fruits et d'involucre de types *Carpinus betulus* et *C. orientalis*. Le fruit ressemble à la noix de *Corylus* mais comprimée et plus petite, sous-tendue par deux bractées, l'une large avec un ratio de taille noix/involucre similaire à celui de *Carpinus* et l'autre très réduite, considérée plutôt comme un appendice. Crane (1989) croit que ce specimen pourrait être un fruit mal conservé de *Corylus*.

1.3.1.2.6. *CARPINOXYLON OSTRYOPOIDES* PAGE (1970, 1980)

Les restes de *Carpinoxylon ostryopoides* datent du Crétacé supérieur (Campanien) de la Formation Panoche, au centre de la Californie (Page 1970). Un second specimen, similaire à celui de la Formation Panoche, fut décrit de la localité de Del Puerto Creek également du centre de la Californie (Page 1980). Ce bois fossile est un des restes les plus anciens retrouvés à ce jour ayant des caractères appartenant à la sous-famille des Coryloideae (Crane 1989). En fait, tous les caractères observés chez ce fossile sont présents chez les espèces de Coryloideae. La distribution des pores et la longueur des éléments de vaisceaux sont similaires à ceux d'*Ostryopsis* (Page 1970). La combinaison de caractères que présente le bois de *C. ostryopoides* ne permet pas de l'assigner à un des genres actuels. De plus, plusieurs caractères présents chez ce fossile sont également observés chez les espèces de la sous-famille des Betuleae ainsi que chez certaines espèces de Fagaceae et de Casuarinaceae (Page 1970).

1.3.1.2.7. *ATRIPLEX BOREALIS* (HEER) LAURENT (1912)

Ce fossile a connu une épopée taxonomique intéressante. Il fut d'abord décrit comme appartenant à un genre des Violaceae (*Anchietia*) par Heer (1859, cité par Crane 1981). Il fut ensuite attribué au genre *Corylus* par Saporta et Marion (1885, cités par Crane 1981) qui ont interprété la structure de ses bractées comme étant similaires à celles de *Corylus* et les caractéristiques de son fruit comme étant similaires à ceux de *Carpinus*. Le fossile fut renommé *Corylus lamottii* et associé aux feuilles fossiles de *Corylus macquarrii* Forbes. Plus tard, Laurent (1912, cité par Crane 1981) changea l'identification de Saporta et Marion en attribuant le fossile au genre *Atriplex* (Chenopodiaceae), le nommant *A. borealis*. Ce qui motiva Laurent à exclure le fossile du genre *Corylus* fut la présence d'un pédoncule sur le fruit, la taille et la position du fruit par rapport à l'involucre, et la taille et la véneration des bractées. Crane (1981) affirme que *Atriplex borealis* montre des caractères similaires à *Palaeocarpinus laciniata* et recommande un examen plus détaillé de ce fruit fossile.

1.3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE

Seuls les taxons fossiles ayant des structures reproductrices décrites dans la littérature ont été inclus dans cette analyse, soit *Asterocarpinus*, *Cranea* et quatre espèces de *Palaeocarpinus*. Le genre *Corylocarpinus* ne fut pas retenu étant donné qu'il n'est connu que de fruits qui pourraient n'être que des fruits mal conservés du genre *Corylus* (Crane 1989). *Atriplex borealis* ne fut pas inclus pour des raisons similaires. *Carpinoxylon* fut également exclu en parce qu'il n'est décrit qu'à partir de restes fossiles de bois (Page 1970, 1980).

Les caractères des taxons fossiles utilisés dans cette analyse cladistique sont entièrement tirés de la littérature. Les caractères morphologiques pour les genres actuels de la famille des Betulaceae proviennent également de diverses sources littéraires (Crane 1989; Furlow 1990, 1997; Chen *et al.* soumis). Le choix des caractères inclus dans cette analyse est grandement fonction de leur disponibilité chez les taxons fossiles. Parmi les 14 caractères codés pour cette

analyse, 12 sont basés sur la morphologie des organes de reproduction (fleurs pistillées, fleurs staminées, fruits, pollen) et deux concernent l'anatomie du bois. Cinq de ces caractères codent pour les taxons actuels seulement.

Aucun caractère de feuilles ne fut utilisé. Généralement, dans le cas des taxons fossiles, les feuilles sont associées aux organes de reproduction sur une base spatio-temporelle et non suite à l'observation d'un rattachement physique. Donc, un certain doute demeure toujours quant à la relation entre les feuilles et les organes reproductifs chez les taxons fossiles malgré qu'il soit généralement faible. De plus, une grande majorité de taxons fossiles sont d'abord décrits d'après des restes d'inflorescences et d'infrutescences.

Quatre analyses ont été exécutées, une incluant tous les taxons fossiles et les trois autres incluant seulement l'un des genres fossiles (*Cranea*, *Asterocarpinus* et *Palaeocarpinus*). Les analyses phylogénétiques ont été exécutées à l'aide du logiciel PAUP*4.0, versions test (Swofford 1998, avec la permission de l'auteur). Tous les caractères possèdent la même pondération et sont non-ordonnés. Les analyses utilisent l'option de recherche heuristique, la permutation de branches à l'aide de l'option TBR (« tree bisection and reconnection ») et la séquence d'addition aléatoire (100 réplicats). Tous les arbres les plus parcimonieux, lorsque plus d'un, sont conservés (option MULPARS activée) et les branches ayant une longueur minimum de zéro ne sont pas retenues. Les analyses de bootstrap et de jackknife utilisent les paramètres décrit plus haut sauf pour l'analyse incluant tous les taxons fossiles. Cette dernière fait appel à l'option « fast stepwise addition ». Mille réplicats sont effectués pour ces analyses, et 50% des caractères sont retirés à chacun de ces réplicats en ce qui concerne les analyses de jackknife. La distribution des caractères fut examinée et cartographiée à l'aide du logiciel MacClade, version 3.0 (Maddison et Maddison 1992).

Le choix de l'extra-groupe s'est fait en premier lieu d'après les analyses phylogénétiques antérieures de la famille des Betulaceae et de la sous-classe des Hamamelididae. Plusieurs familles furent proposées comme groupe-frère des Betulaceae et différents taxons servirent d'extra-groupe pour les analyses

cladistiques précédentes de cette famille [ex., Fagaceae (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992); Nothofagaceae (Chen *et al.*, soumis); Hamamelidaceae (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992)]. Dans le cas d'une analyse de ce type, c'est-à-dire basée sur des caractères extraits de sources littéraires, le parachèvement de la matrice de données est également tributaire du détail des descriptions publiées. Les informations sur les caractères utilisés étant plus complètes pour le genre *Nothofagus* (Nothofagaceae), il fut donc utilisé comme taxon extra-groupe.

1.3.3. DESCRIPTION DES CARACTÈRES.

Les taxons ont été codés tel que présentés à la Figure 11.

1. *Surface du fruit*; (0) lisse, (1) présence de sillons longitudinaux. Ce caractère est issu de l'analyse de Crane (1989) et fut repris par Bousquet *et al.* (1992). Les sillons sont de fines rides disposées à la surface du fruit. Codées pour l'ensemble des taxons, la présence ou l'absence des sillons longitudinaux semble relativement facile à observer sur des fruits fossiles.

2. *Involucre persistant*; (0) absent, (1) présent. Chez certains genres des Betulaceae, le fruit demeure attaché à l'involucre, comme c'est le cas chez *Ostrya*. Utilisé par Chen *et al.* (soumis) et complet dans la matrice.

3. *Attachement du fruit*; (0) sessile ou plus ou moins sessile, (1) pédicellé.

4. *Aile sur le fruit*; (0) absente, (1) présente. Ce caractère différencie principalement *Alnus* et *Betula* du reste de la famille des Betulaceae. Ces deux genres possèdent de très petits fruits compressés dorsiventralement avec une fine aile de chaque côté. Ce caractère est également codé chez tous les taxons et fut utilisé précédemment par Chen *et al.* (soumis).

5. *Périanthe des fleurs staminées*; (0) absent, (1) présent. Le périanthe de la fleur staminée chez *Corylus* est considéré comme étant anormal ou présents occasionnellement (Abbe 1935, 1938; Hjelmqvist 1948). Chen *et al.* (soumis) le codent comme étant présent tandis que Crane (1989) et Bousquet *et al.* (1992) le codent comme étant absent. Dans la présente analyse, le périanthe de la fleur staminée sera codé présent pour *Corylus* car il a déjà été observé chez certains individus (Abbe 1935, 1938; Hjelmqvist 1948).

6. *Marge des bractées de l'involucre*; (0) entière, (1) non entière. Le terme « non entière » définit les marges dentées, lobées, etc. Tous les taxons sont codés pour ce caractère.

7. *Périanthe des fleurs pistillées*; (0) distinct, (1) absent. Quoique les fleurs pistillées soient très réduites chez les Betulaceae (tout comme les fleurs staminées), certains genres possèdent un périanthe composé de tépales formés par une fine lamelle de tissu adnée ou non à l'ovaire (Abbe 1935, Hjelmqvist 1948, Furlow 1990, 1997). Ce caractère est utilisé d'abord par Crane (1989), puis par Bousquet *et al.* (1992).

8. *Bractées et bractéoles des fleurs pistillées*; (0) variées, (1) fusionnées en une écaille.

9. *Bractéoles des fleurs pistillées*; (0) variées, (1) fusionnées en un involucre.

10. *Pollen - aperture*; (0) poré, (1) colpé ou colporé.

11. *Pollen - opercule*; (0) absent, (1) présent.

12. *Épaississement de l'endexine dans la région aperturale*; (0) non épaissie, (1) épaissie.

13. *Trachéïdes*; (0) absentes, (1) présentes.

14. *Perforations dans les vaisseaux*; (0) scalariformes, (1) simples.

	11111
	12345678901234
<i>Betula</i>	000111111010110
<i>Alnus</i>	000111111010110
<i>Corylus</i>	00001100110100
<i>Ostryopsis</i>	00000100111000
<i>Carpinus</i>	11100100111001
<i>Ostrya</i>	11100000111001
<i>P. aspinosa</i>	10? 010??? 100??
<i>P. laciniata</i>	100011????????
<i>P. joffrensis</i>	101011???? 1????
<i>P. orientalis</i>	1000? 1??? 1? 1??
<i>Cranea</i>	000010???? 1? 0??
<i>Asterocarpinus</i>	1000? 00????????
<i>Nothofagus</i>	00011100000? 11

Figure 11. Matrice des caractères morphologiques utilisés dans l'analyse phylogénétique des taxons actuels et de certains taxons éteints de la famille des Betulaceae.

1.3.4. RÉSULTATS

Dans les quatre analyses cladistiques effectuées (Figures 12-15), la sous-famille des Betuloideae (*Betula* et *Alnus*) est monophylétique, appuyée par deux caractères, l'absence de périanthe chez les fleurs pistillées et la fusion des bractées et bractéoles des fleurs pistillées pour former une écaille. Les genres *Alnus* et *Betula* sont les seuls genres actuels des Betulaceae possédant des fruits pourvus d'une aile et un bois avec des trachéides. Ils partagent ces traits avec l'extra-groupe *Nothofagus*. La sous-famille des Coryloideae (*Corylus*, *Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis*) est également monophylétique grâce à la fusion des bractéoles des fleurs pistillées en un involucre, l'absence de trachéides dans leur bois et l'absence d'aile sur leurs fruits. Les caractères décrivant les tribus des Coryleae (*Corylus*) et des Carpineae (*Ostryopsis*, *Carpinus* et *Ostrya*) varient selon les analyses, c'est-à-dire selon le taxon fossile introduit.

Quatorze arbres de 19 pas chacun sont produits par l'analyse phylogénétique comprenant les trois genres fossiles (*Asterocarpinus*, *Palaeocarpinus* et *Cranea*). L'inclusion simultanée dans une analyse de tous les taxons fossiles codés dans la matrice de données donne un consensus strict avec très peu de résolution au niveau de la sous-famille des Coryloideae (Figure 12). Comme je le souligne plus haut, la sous-famille des Betuloideae est monophylétique. Les Coryloideae sont également monophylétiques, formant une polytomie au sein de laquelle on retrouve un seul regroupement, le duo *Carpinus*-*Ostrya*. Aucun des trois regroupements observés dans cet arbre n'est supporté à 100% (bootstrap et jackknife respectivement : Betuloideae, 80%/66%; Coryloideae, 74%/65%; *Carpinus*-*Ostrya*, 76%/64%; Figure 12).

L'analyse phylogénétique de la famille des Betulaceae n'incluant que *Cranea* comme taxon fossile, a produit un seul arbre plus parcimonieux (Figure 13). On retrouve *Cranea* dans la sous-famille des Coryloideae, comme groupe-frère de la tribu des Carpineae actuelles (*Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis*). D'après l'arbre phylogénétique, la tribu des Carpineae est caractérisée par l'absence de périanthe chez la fleur staminée. La tribu des Carpineae, incluant le genre *Cranea*, est caractérisée par une endexine non épaissie dans la région

aperturale du pollen. L'optimisation des caractères attribue la présence d'un opercule sur le pollen de *Cranea* sans que ce soit cependant confirmé.

L'addition du genre éteint *Asterocarpinus* à l'analyse a également produit un seul arbre (Figure 14). *Asterocarpinus* est le taxon-frère de *Ostrya* et *Carpinus*. Le trio *Asterocarpinus-Carpinus-Ostrya* est appuyé par trois caractères dont un seul est synapomorphe pour le groupe soit la présence de sillons longitudinaux sur le fruit. La marge entière des bractées caractérise aussi ce groupe mais subit une réversion chez *Carpinus*. Le troisième, la présence de perforations simples des vaisseaux vasculaires, est attribué au genre *Asterocarpinus* via l'optimisation des caractères. Il est évidemment impossible de savoir si *Asterocarpinus* possède de telles structures.

L'analyse cladistique incluant quatre espèces du genre éteint *Palaeocarpinus* (*P. aspinosa*, *P. laciniata*, *P. joffrensis* et *P. orientalis*) produit sept arbres de 18 pas chacun (Figure 15). Le consensus strict de ces arbres montre relativement peu de résolution, mais les groupes conservés dans le consensus strict sont relativement bien conservés (valeurs de bootstrap et de jackknife, Figure 15). La sous-famille des Betuloideae (*Betula* et *Alnus*) est monophylétique ainsi que celle des Coryloideae, incluant *Palaeocarpinus*. *Corylus* est le groupe-frère du reste des Coryloideae et *Carpinus* et *Ostrya* sont taxons-frères.

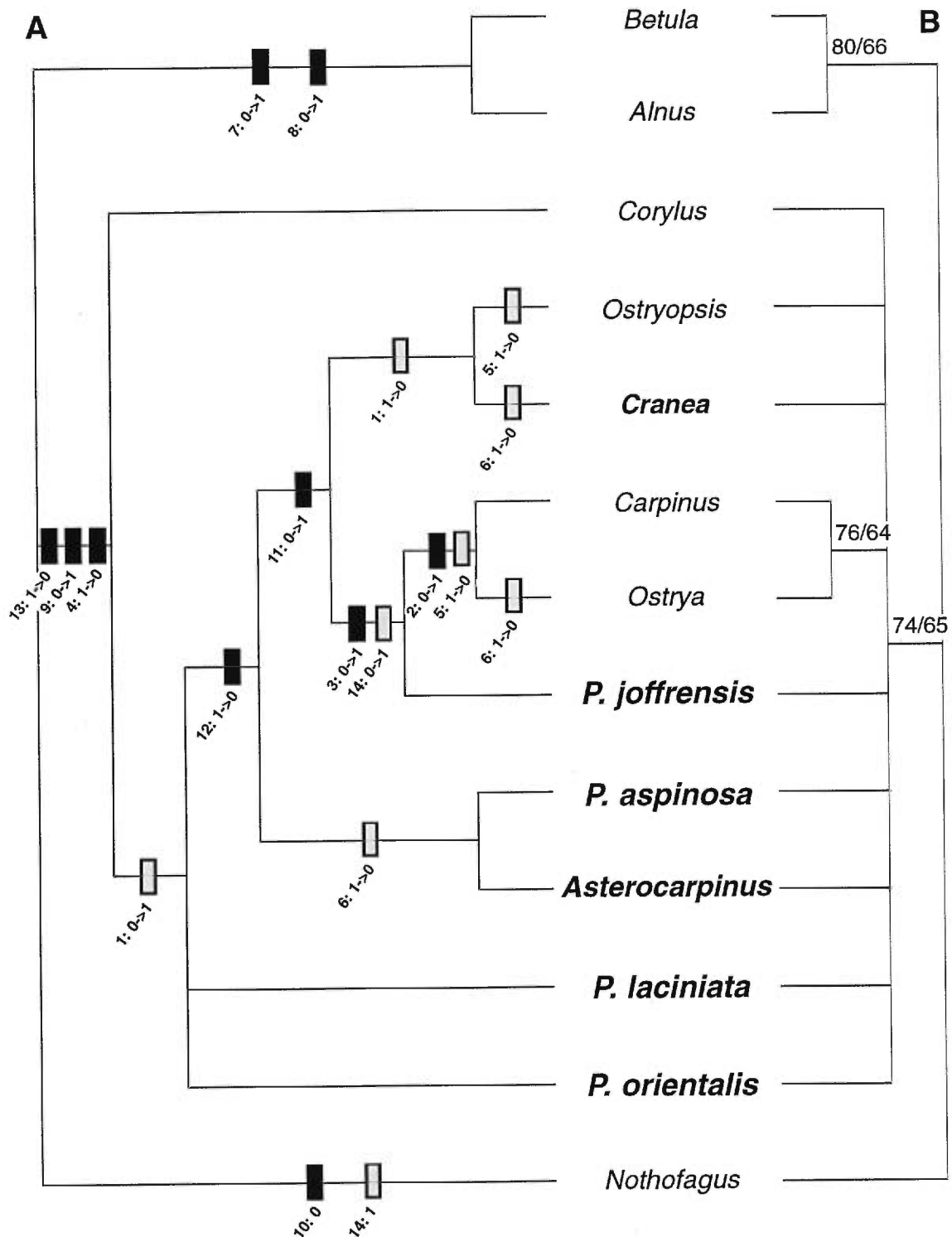


Figure 12. Un des 14 arbres les plus parcimonieux (**A**) et consensus strict (**B**) résultant de l'analyse cladistique de la famille des Betulaceae basée sur des caractères morphologiques, incluant les taxons fossiles *Cranea*, *Asterocarpinus* et les quatre espèces de *Palaeocarpinus* (19 pas, CI = 0.737, RI = 0.821). Les caractères sont cartographiés sur l'arbre **A** avec les changements d'états (optimisation ACCTRAN). Les nombres au-dessus des branches sur le consensus strict (**B**) représentent les valeurs de bootstrap et de jackknife (> 50%). Les taxons fossiles sont identifiés en caractères gras. (PTP: P=0.01)

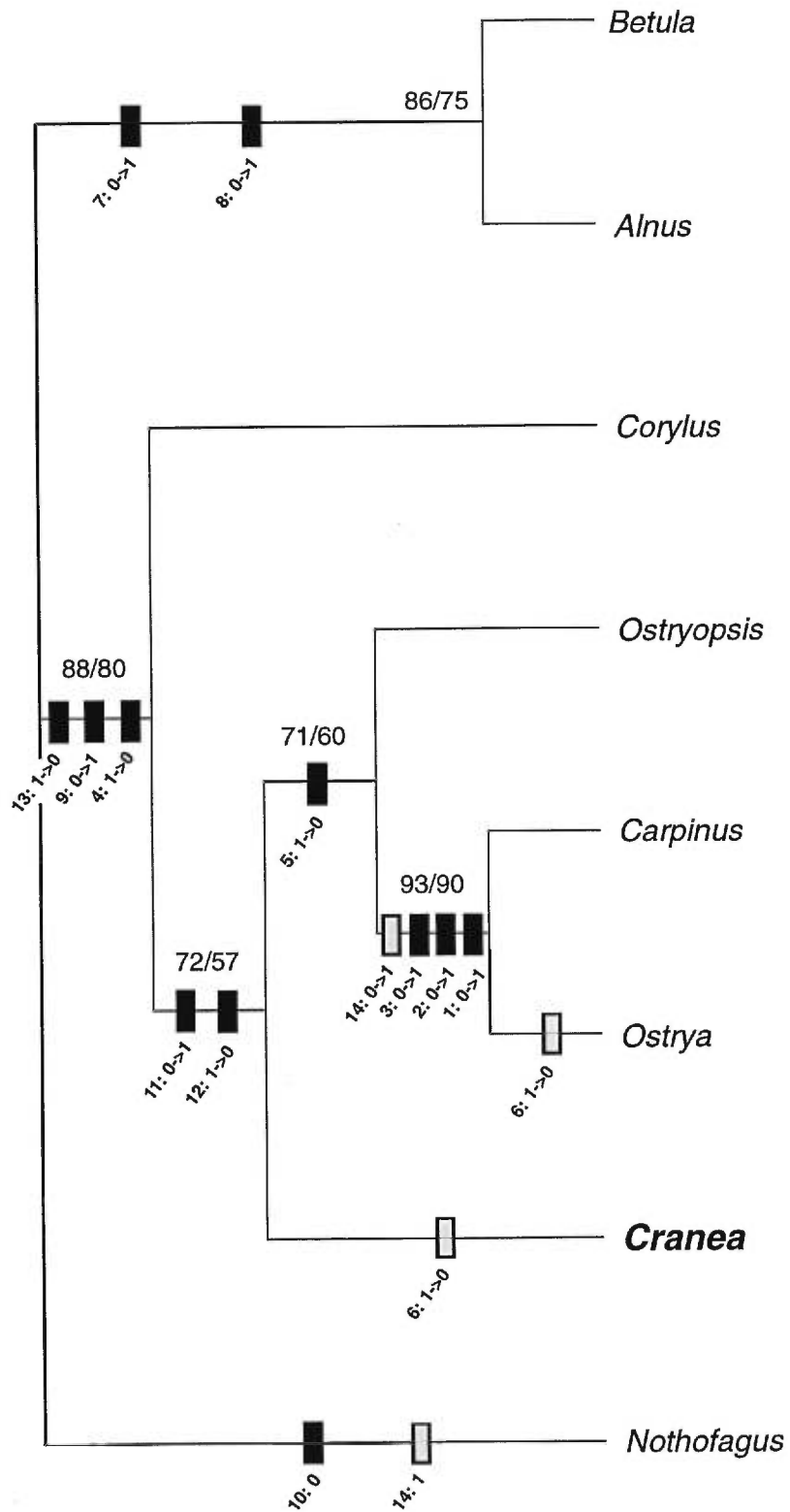


Figure 13. Unique arbre le plus parcimonieux trouvé par l'analyse cladistique de la famille des Betulaceae basée sur des caractères morphologiques, incluant seulement *Cranea* comme taxon fossile (16 pas, CI = 0.875, RI = 0.900). Les caractères sont cartographiés sur l'arbre avec leurs changements d'états (optimisation ACCTRAN). Les nombres au-dessus des branches représentent respectivement les valeurs de bootstrap et de jackknife (> 50%). (PTP: P=0.01)

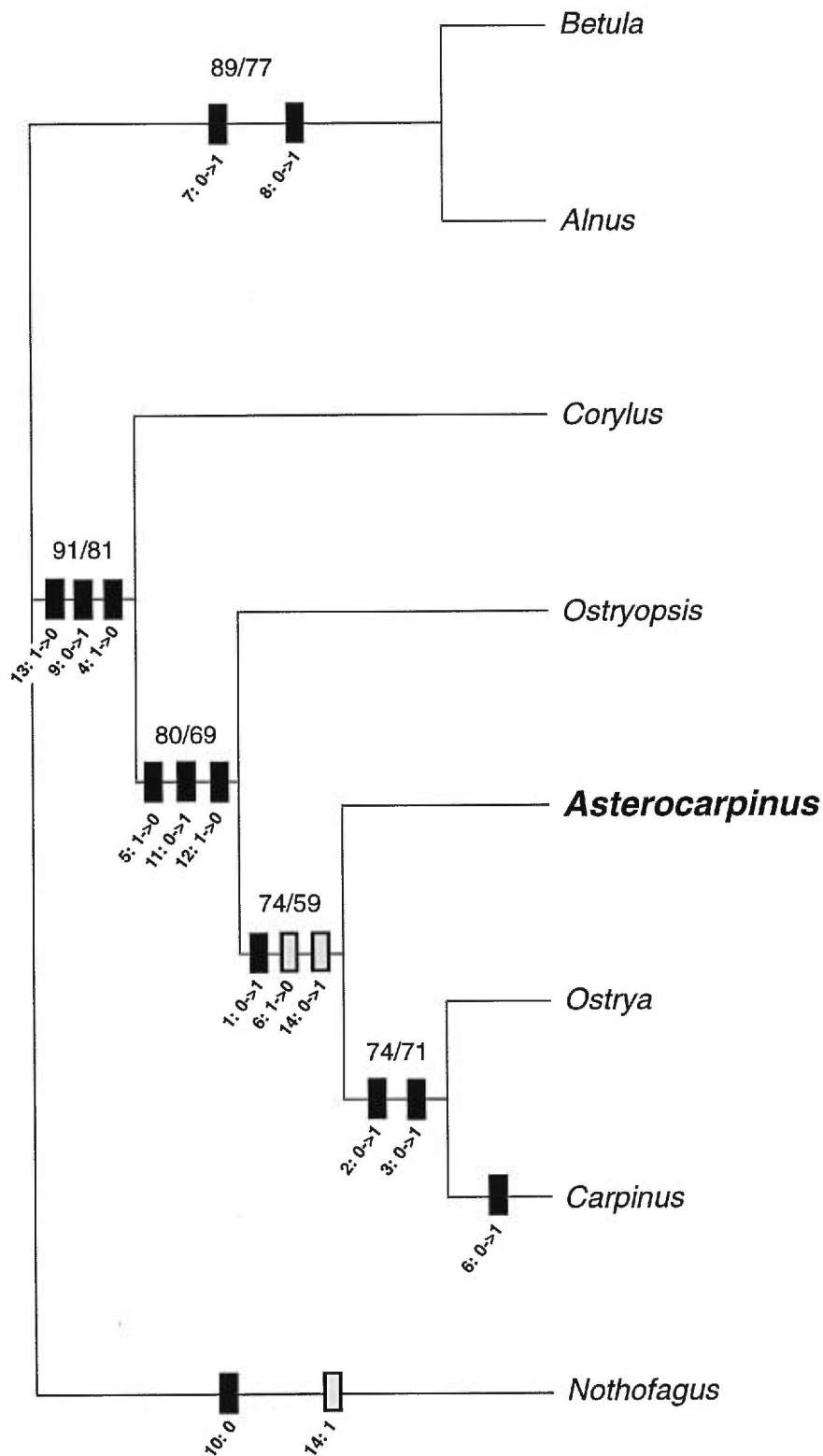


Figure 14. Unique arbre le plus parcimonieux trouvé par l'analyse cladistique de la famille des Betulaceae basée sur des caractères morphologiques, incluant seulement *Asterocarpinus* comme taxon fossile (16 pas, CI = 0.875, RI = 0.905). Les caractères sont cartographiés sur l'arbre avec leurs changements d'états (optimisation ACCTRAN). Les nombres au-dessus des branches représentent respectivement les valeurs de bootstrap et de jackknife. (PTP: P=0.01)

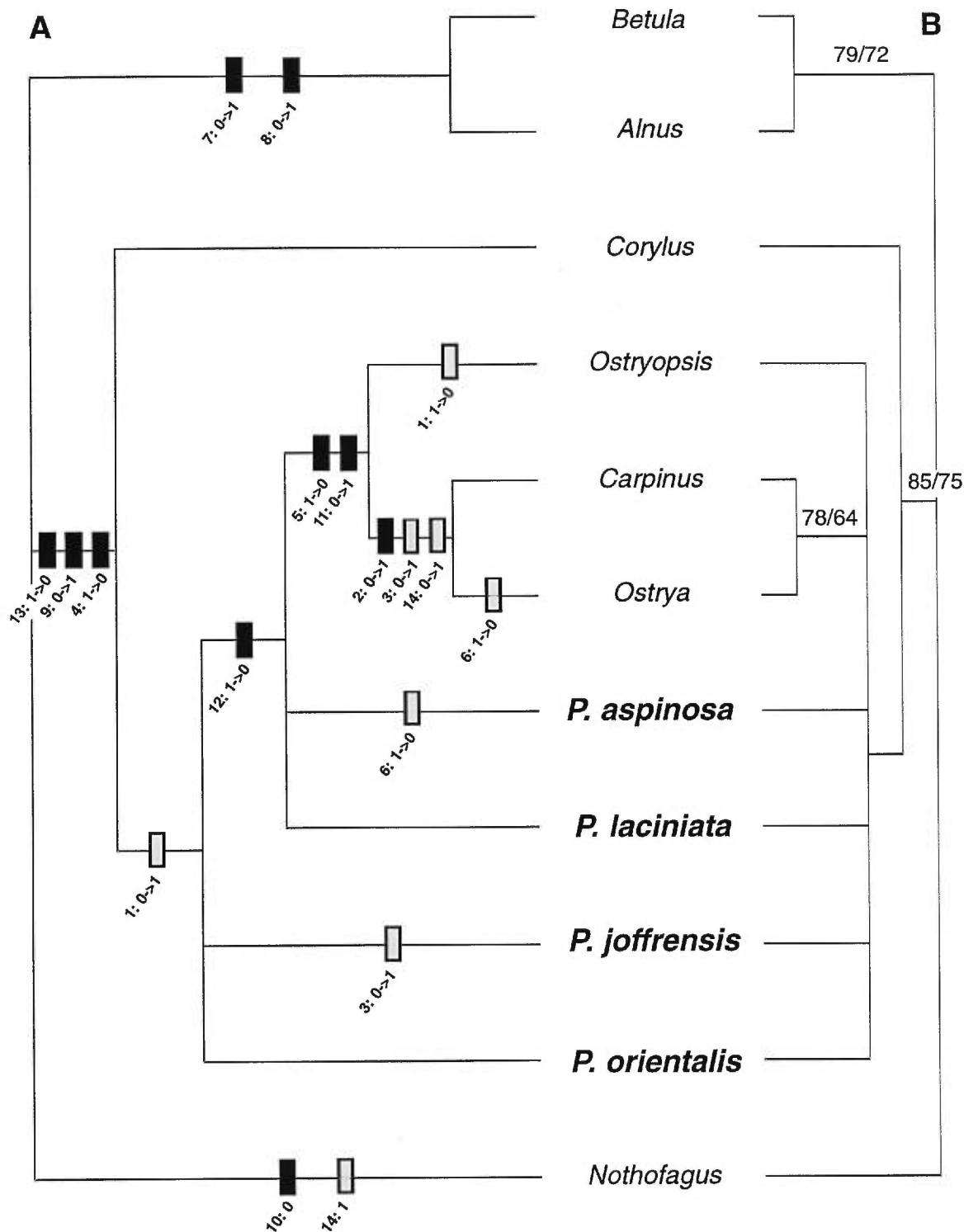


Figure 15. Un des sept arbres les plus parcimonieux (A) et consensus strict (B) résultant de l'analyse cladistique de la famille des Betulaceae basée sur des caractères morphologiques, incluant seulement les quatre espèces de *Palaeocarpinus* comme taxons fossiles (18 pas, CI = 0.778, RI = 0.840). Les caractères sont cartographiés sur l'arbre A avec les changements d'états (optimisation ACCTRAN). Les nombres au-dessus des branches sur le consensus strict (B) représentent les valeurs de bootstrap et de jackknife (> 50%). (PTP: P=0.01)

1.3.5. DISCUSSION

Manchester & Chen (1998), qui ont décrit le genre fossile *Cranea* pour la première fois, l'ont placé sans hésitation dans la sous-famille des Coryloideae, en se basant sur des caractères des fruits, des feuilles et du pollen (). L'absence d'ailes sur les fruits de *Cranea* est l'un des caractères qui l'exclut de la sous-famille des Betuloideae. Les caractères retrouvés chez ce fossile sont typiques de la tribu des Carpineae (sous-famille des Coryloideae), mais aucun genre de cette tribu ne présente la combinaison de caractères particulière à *Cranea*. Selon Manchester & Chen (1998), *Cranea* ressemble à *Ostryopsis* par son infrutescence et ses fruits.

La position de *Cranea* dans l'arbre comme groupe-frère de la tribu des Carpineae est en accord avec l'apparition de ce fossile et des premiers membres des Carpineae dans les registres fossilifères. Les fossiles de *Cranea* datent du Paléocène alors que les premiers fossiles confirmés de la tribu des Carpineae datent de l'Eocène (*Carpinus*; Tanai 1972) et de l'Oligocène (*Ostrya*, Chaney 1927, cité par Crane 1989).

La présente analyse montre que *Asterocarpinus* est un membre de la sous-famille des Coryloideae et probablement de la tribu des Carpineae. En se fondant sur certains caractères comme les sillons longitudinaux sur le fruit et le périgone épigyné (tous des caractères retrouvés chez *Carpinus* et *Ostrya*), Manchester & Crane (1987) ont placé le genre *Asterocarpinus* dans la sous-famille des Coryloideae. L'apparition tardive du genre *Asterocarpinus* par rapport aux autres Coryloideae (Oligocène) est tout de même quasi-concordante avec la différenciation de *Carpinus* et *Ostrya* (Manchester & Crane 1987). Ceci renforce les relations de taxons-frères proposées par l'analyse cladistique incluant seulement *Asterocarpinus* comme taxon fossile (Figure 14).

On peut affirmer que *Palaeocarpinus* fait partie de la sous-famille des Coryloideae, malgré le fait que les quatre espèces forment une polytomie avec *Ostryopsis* et le duo *Carpinus*-*Ostrya* (Figure 15). Par ailleurs, il semblerait que *Palaeocarpinus* soit un membre de la tribu des Carpineae, position retrouvée dans chacun des sept arbres les plus parcimonieux produit par l'analyse (non

montrés). Cette analyse cladistique n'apporte que peu d'information sur les relations interspécifiques au sein du genre *Palaeocarpinus*.

Palaeocarpinus laciniata possède une combinaison de caractères qui ne permet pas d'attribuer ces restes à aucun des genres actuels des Betulaceae (Crane 1981). Le fruit du *P. laciniata* est similaire à celui de *Carpinus* mais le fait qu'il ne soit pas pédonculé le rapproche de *Corylus* et du genre *Ostryopsis*. Les bractées entourant le fruit sont également similaires à celles retrouvées chez le genre *Corylus* et leurs marges dissequées rappellent celles de *Corylus colurna* (Crane 1981).

La majorité des restes attribués au genre *Palaeocarpinus* ont été découverts en Amérique du nord, dans plusieurs localités des montagnes Rocheuses et des grandes plaines du centre du continent (Crane 1989). Des infrutescences semblables à celles de *Carpinus* et *Ostrya* ont été retrouvées dans une formation du Paléocène à Almont dans le Dakota du Nord et sont attribuées au genre *Palaeocarpinus* (Crane *et al.* 1990). Elles possèdent des fruits de taille et d'anatomie similaires à ceux de *Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis*, tandis que leurs bractées se rapprochent de celles observées chez les espèces actuelles de *Corylus*.

Les espèces *P. joffrensis* (Amérique du Nord) et *P. orientalis* (Chine) sont distinctes de l'espèce européenne, *P. laciniata* (Crane 1981) par des caractères de l'infrutescence et du fruit. *Palaeocarpinus laciniata* possède des bractées avec une surface laminaire plus grande et un plus grand nombre de lobes, ainsi qu'une noix plus petite par rapport aux bractées et moins striée que *P. joffrensis* et *P. orientalis*. Manchester & Guo (1996) concluent que *P. orientalis*, trouvé en Chine, a plus d'affinité avec les espèces nord-américaines qu'avec l'espèce européenne *P. laciniata*. Manchester & Chen (1996) croient que la marge entière des bractées de l'involucre chez *P. aspinosa* est dérivée par réduction d'une espèce à marge dissequée. Malgré que l'un des arbres les plus parcimonieux semble appuyer cette hypothèse (Figure 15), les présentes analyses ne permettent pas de l'affirmer sans équivoque.

D'après une autre analyse phylogénétique effectuée à l'aide de caractères morphologiques, la combinaison de caractères que présente le genre *Palaeocarpinus* au niveau des fruits et de leurs bractées le placerait comme ancêtre hypothétique de la sous-famille des Coryloideae (Crane 1989, Crane *et al.* 1990). Les résultats de l'analyse incluant seulement *Palaeocarpinus* comme taxon fossile contredisent cette hypothèse. *Palaeocarpinus* serait plutôt associé aux genres actuels de la tribu des Carpineae (*Ostryopsis*, *Carpinus* et *Ostrya*). Crane (1989) affirme que le genre est paraphylétique, ce qui est effectivement le cas d'après les résultats de l'analyse, mais cette topologie n'est pas retrouvée chez tous les arbres examinés. La paraphylie de *Palaeocarpinus* est soutenue par Manchester & Guo (1996) qui élaborent en affirmant que l'espèce chinoise (*P. orientalis*) et les espèces nord-américaines (*P. aspinosa*, *P. joffrensis*) ont plusieurs caractères similaires à ceux de *Corylus* et que, d'un autre côté, les feuilles de *Craspedodromophyllum acutum*, associées à l'espèce européenne *P. laciniata*, sont plus similaires à *Carpinus* qu'à *Corylus*. Manchester & Guo (1996) vont plus loin en proposant que les genres actuels *Carpinus* et *Corylus* soient dérivés d'un groupe ayant des fruits semblables à ceux de *Palaeocarpinus*, ce qui semblerait être plutôt le cas pour *Ostryopsis*, *Carpinus* et *Ostrya* selon la présente analyse, mais non pour *Corylus*.

La sous-famille des Betuloideae est acceptée comme un groupe naturel par les différents traitements taxonomiques (ex., Winkler 1904; Takhtajan 1980; Thorne 1983; Kubitzki 1993; Furlow 1990, 1997) et les analyses phylogénétiques (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.* soumis; la présente analyse). Les registres fossilifères tendent à supporter cette union en raison de la présence de pollen attribué aux genres *Betula* et *Alnus* dès le Crétacé (réf. dans Muller 1981), avant les fossiles confirmant sans équivoque l'apparition des Coryloideae. Les genres *Alnus* et *Betula* étaient présents sans équivoque au milieu de l'Eocène (Crane & Stockey 1987).

Le registre des fossiles de la sous-famille des Coryloideae remonterait également au Crétacé supérieur avec la présence de pollen de type *Corylus* en Europe (réf. dans Muller 1981) et de bois de *Carpinoxylon* en Amérique du

Nord (Page 1970, 1980). Mais, ces fossiles ne sont pas attribués aux Coryloideae sans équivoque (Crane 1989). La découverte des fossiles de *Cranea* et de *Palaeocarpinus* démontre que la sous-famille des Coryloideae était différenciée dès le Paléocène, mais ne permet pas de dire si les tribus des Carpineae et des Coryleae l'étaient (Manchester & Chen 1998). Les registres fossilifères de *Carpinus*, *Ostrya* et *Corylus* couplés à ceux de *Cranea*, *Asterocarpinus* et de *Palaeocarpinus* suggèrent une radiation des Coryloideae durant l'Eocène et l'Oligocène (Manchester & Chen 1998). De plus, Manchester & Chen (1996) croient que l'Amérique du Nord du Paléocène serait le centre de diversification du genre *Palaeocarpinus*.

1.4. CONCLUSION

La fragilité des arbres obtenus par ces analyses laisse persister le doute dans certains cas. Il faudrait accroître le nombre de caractères codés dans la matrice et réduire le nombre de données manquantes. Ces deux améliorations ne pourront être apportées sans examiner directement les spécimens de fossiles.

La plupart des études présentées dans ce chapitre soutiennent la distinction de deux sous-familles au sein de la famille des Betulaceae, soit les Betuloideae et les Coryloideae. L'analyse incluant tous les taxons fossiles produit une polytomie à la base de la sous-famille des Coryloideae, mais soutient tout de même la séparation de la famille en deux sous-familles. La division de la sous-famille des Coryloideae en deux tribus, les Carpineae (*Carpinus*, *Ostrya* et *Ostryopsis*) et les Coryleae (*Corylus*), fait un peu moins l'unanimité (certains placent *Ostryopsis* avec le genre *Corylus* dans la tribu des Coryleae), mais demeure tout de même majoritairement soutenue. Les analyses cladistiques présentées précédemment donnent un aperçu des relations phylogénétiques entre les genres éteints et actuels de la famille des Betulaceae.

Dans le cas d'*Asterocarpinus*, sa position dans l'arbre comme groupe-frère de *Carpinus* et *Ostrya* correspond aux hypothèses formulées concernant ce

taxon fossile. Les hypothèses concernant les relations de *Cranea* avec les taxons actuels des Betulaceae (proche du genre *Ostryopsis*, avec des caractères retrouvés dans la tribu des Carpineae) sont également soutenues par l'inclusion de *Cranea* seul dans une analyse cladistique. Contrairement à ce qui est proposé, *Palaeocarpinus* ne serait pas aussi proche de *Corylus* que l'on aurait d'abord cru. Tous les arbres les plus parcimonieux résultants de l'analyse incluant seulement quatre espèces de *Palaeocarpinus* placent plutôt ce genre fossile parmi les Carpineae.

CHAPITRE - II

Phylogeny and biogeography of hazels

The non-transcribed spacer of 5S ribosomal RNA genes in hazels
(*Corylus* L.: Betulaceae): phylogenetic and biogeographical inferences.

Félix Forest and Anne Bruneau

1.1. INTRODUCTION

Hazels are important crops primarily cultivated in Turkey where the production represents nearly 70% of the world filbert production. The other 30% are cultivated mostly in Italy (20%), Spain (7%) and the United States (Oregon and Washington; 3%) (Rosengarten 1984). All these countries have coastal regions where the climate is suitable for the culture of hazels (Rosengarten 1984). *Corylus avellana*, the European Filbert, is the main species cultivated for commercial nuts, but *C. maxima*, the Giant Filbert, is also widely cultivated, as is *C. colurna*, the Turkish Filbert, but to a lesser extent (Rosengarten 1984, Duke 1989).

Hazels are monoecious and anemophilous shrubs or small trees, with a few large tree species. The leaves are deciduous, simple, alternate and have doubly serrate margins and two equal deciduous stipules. *Corylus* flowers are highly reduced. The carpellate flowers have four highly reduced tepals adherent to the ovary (Abbe 1935; Furlow 1990). The tepals in the staminate flowers are even more reduced and sometimes considered as lacking (Abbe 1935, 1938; Hjelmqvist 1948; Furlow 1990). Staminate flowers form cylindrical pendent catkins, often grouped in clusters, appearing in late summer and reaching anthesis at the same time as the carpellate flowers in early spring, long before the leaves appear (Figure 16). The carpellate flowers are grouped in a small bud-like inflorescence with only the red styles protruding at anthesis (Figure 16) (Furlow 1990). The fruit, a hard-shelled nut, is surrounded by a spiny, leafy or tubular involucre, variously dissected at the margin. Generally,

several nuts are grouped in dense clustered infructescences (Figure 16) (Winkler 1904; Furlow 1990).

Hazels are found in a variety of habitats, from open mixed forests to mountain slopes ranging in altitude from sea level up to several thousand meters. Generally, shrub species of *Corylus* grow in thickets, as understory plants, in clearings, in mixed forests or at the margin of woods and roadsides. Some tree species are found in shady mixed forests (e.g., *C. colurna*) or in mountainous regions (e.g., *C. chinensis*).

The genus *Corylus* comprises about fifteen to twenty specific and infraspecific taxa distributed throughout the Northern Hemisphere with most of the species found in Eurasia. As with four of the five other members of the Betulaceae (*Carpinus*, *Ostrya*, *Betula* and *Alnus*), *Corylus* is one of the many genera of angiosperms that have a disjunct distribution between North America and Eastern Asia (Wu 1983). The sixth genus, *Ostryopsis*, is the only member of the birch family whose distribution is restricted to Eastern Asia (China). Two species and one subspecies of *Corylus* are native to North America (see table IV). Only one species is strictly native to Europe, *C. avellana*, where it has been in cultivation for its fruits for centuries (Krüssmann 1976). *Corylus avellana* has been introduced in other parts of the world (e.g., British-Columbia, Canada; Furlow 1997). The other two species, which occur in Europe (*C. maxima* and *C. colurna*), are also found in Asia. Consequently, the majority of the diversity of the genus is located in Eastern Asia with about ten to fifteen native species. The number of taxa found in Asia varies depending on authors.

Since hazels were first described, the boundaries of the genus have been rarely modified. At the infrageneric level, several taxonomic treatments have been proposed, generally retaining the same species groupings. In a broad sense, three subgroups are recognized, in large part based on the morphology of the involucre surrounding the nut. The first group is formed by species with an involucre of one or two leaflike bracts (e.g., *C. americana*), the second includes species with a tubular involucreal beak (e.g., *C. cornuta*) and the third



Corylus americana, Infructescence. (F. Forest)



Corylus chinensis,
Staminate inflorescence. (F. Forest)



Corylus cornuta subsp. *cornuta*,
Carpellate inflorescence. (F. Forest)

Figure 16. The genus *Corylus* , carpellate and staminate inflorescences and infructescence.

includes species with a dense and spiny involucre resembling the fruit of the chestnut tree (e.g., *C. ferox*). Spach (1842a) recognized these subgroups, naming them sections *Avellana*, *Tubo-Avellana* and *Acanthochlamys* respectively. De Candolle (1864) also divided the genus into three groups with the difference that sections *Avellana* and *Tubo-Avellana* of Spach were considered subsections of a broader section *Avellana*. Bobrov (1936) recognized the same groups, naming them *Acanthochlamys*, *Phyllochlamys* (section *Avellana* Spach) and *Siphonochlamys* (section *Tubo-Avellana* Spach) and giving them a subgeneric rank. Bobrov (1936) also divided the subgenus *Phyllochlamys* into two sections: section *Diphyllon* (two-bracted involucre; e.g., *C. americana*) and section *Monophyllon* (one-bracted involucre; e.g., *C. maxima*). Bobrov (1936) further divided section *Diphyllon* into two series, *Lacerae* and *Incisae*, based on the various degree of dissection of the involucre bract margins. Winkler's (1904) complete monograph of the Betulaceae, the most recent for the family, does not recognize any subgroups within *Corylus*.

The Betulaceae have been the subject of several phylogenetic analyses based on molecular and morphological characters (e.g., Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.*, submitted). Other studies proposed hypotheses on generic relationships based on trichome morphology (Hardin & Bell 1986), wood anatomy (Hall 1952), winter bud structure and leaf growth (Kikuzawa 1982), quantitative comparisons (Anderson & Abbe 1934), floral morphology (Hjelmqvist 1948) and serological characters (Brunner & Fairbrothers 1979). Phylogenetic relationships were investigated at the sectional level in *Betula* and *Alnus* using several molecular markers (ITS, 18S and *rbcL*; Savard *et al.* 1993). But to date, no extensive phylogenetic study of the other genera of the family has been published.

The nuclear genes encoding ribosomal RNAs and their associated spacers have been valuable sources of characters for a multitude of systematic studies, but most have concentrated on the 18S-5.8S-26S ribosomal gene family. Several recent studies based on the 5S ribosomal RNA gene and its associated spacer also have been published in the past years [e.g., grass tribe Triticeae

(Scoles *et al.* 1988; Appels & Baum 1992; Baum & Appels 1992; Kellogg & Appels 1995), *Acacia* (Playford *et al.* 1992), *Oryza* (McIntyre *et al.* 1992), *Eucalyptus* (Udovicic *et al.* 1995), *Gossypium* (Cronn *et al.* 1996)]. The 5S rRNA genes are physically separated from other ribosomal RNA genes and may be found in many locations in the genome of eukaryotes. The 5S rDNA repeats form direct tandem arrays of up to several thousand units composed of a 120 bp long coding region with a non-transcribed spacer of various lengths (Long & Dawid 1980; Gottlob-McHugh *et al.* 1990; Sastri *et al.* 1992).

Species of the genus *Corylus* have been largely studied from a horticultural point of view, especially *C. avellana*. But in spite of their economic importance, hazels have been poorly investigated from a phylogenetic perspective. In this study we present a phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the non-transcribed spacer of the 5S nuclear ribosomal RNA genes. The spacer alone was used here in part because the coding region of the 5S DNA repeat has been considered of little use for phylogenetic analyses because of its small size (120 bp) and high level of sequence conservation (Halanych 1991; Steele *et al.* 1991). Cronn *et al.* (1996) demonstrated that the use of both gene and spacer in cladistic analyses does not necessarily increase tree resolution and tends to increase tree length and homoplasy. The short length of the 5S spacer makes it easy to sequence and the amount of variability observed in preliminary analyses seemed suitable for our studies within the genus *Corylus*. All these characteristics rendered the 5S spacer attractive for the present study even if intragenomic variability complicates the analyses and necessitates the use of cloning techniques prior to sequencing. Based on the resulting phylogenies and data from the fossil record, we propose a biogeographical pattern for the present worldwide distribution of hazel species. A second phylogenetic analysis of the genus *Corylus* has been performed based on the internal transcribed spacer (ITS) of the 18S-26S nuclear ribosomal genes (Whitcher & Wen 1998). The two data sets will eventually (in a further study) be combined to yield a strongly supported hypothesis of phylogenetic relationships within the genus *Corylus*.

1.2. MATERIALS AND METHODS

1.2.1. TAXON SELECTION.

The delimitation of species within the genus *Corylus* varies depending on the authors. However, we coarsely follow the taxonomic treatments of Winkler (1904) and Bobrov (1936), with some modifications suggested in regional treatments of the genus (e.g., Drumke 1965; Furlow 1997). Species from each of the three groups traditionally recognized are included in the analysis (Table IV). In North America, species delimitation is clear with three native taxa recognized (Furlow 1997): *Corylus americana*, *C. cornuta* subsp. *cornuta* and *C. cornuta* subsp. *californica*. All three are included in this analysis. Although additional North American infraspecific taxa have been described in the past, we follow the classifications of Drumke (1965) and Furlow (1997) that included them in one of the three taxa above. Leaf material of the three species native to Europe and nine species from Asia was also available (Table IV). Because species number and descriptions vary between authors, it is not possible to enumerate all the taxa that were not included in this analysis because of unavailability of material. However, among these, we find two of the three species forming section *Monophyllon* of subgenus *Phylloclamys* (*C. pontica* Koch and *C. colchica* Albov) and one of the two species of subgenus *Acanthochlamys*, *C. tibetica* Batalin. In addition, the impacts on tree topology of the inclusion of hybrid taxa of known parentage is also studied with the inclusion in the matrix of several clones of two named hybrids, *C. x vilmorinii* (*C. chinensis* x *C. avellana*) and *C. x colurnoides* (*C. avellana* x *C. colurna*).

The genus *Ostryopsis* is considered as the closest morphologically to *Corylus* (Furlow 1990). Recent phylogenetic analyses based on morphological and molecular characters support the close relationship between *Corylus* and *Ostryopsis* (Crane 1989; Bousquet *et al.* 1992; Chen *et al.*, submitted). Thus, it appears like the most suitable outgroup taxon for infrageneric studies in *Corylus*. *Ostryopsis* comprises two species restricted to China. Material from

Table IV. Species and samples of *Corylus* and *Ostryopsis* sequenced for the 5S spacer in a phylogenetic analysis of the genus *Corylus*. The taxonomy follows various authors (see text) and infrageneric classification coarsely follows Bobrov (1936) with exceptions (see text). Numbers following species name refer to individuals. Sources : Kew = Royal Botanic Gardens, Kew, U.K.; RBGE = Royal Botanic Gardens, Edinburgh, U.K.; JBM = Jardin Botanique de Montréal, Québec, Canada ; AA = Arnold Arboretum, Jamaica Plain, Massachusetts, USA ; DAO = Dominion Arboretum of Agriculture Canada, Ottawa, Ontario, Canada. Specimens collected by Charest *et al.* are from Terra Nova National Park, Newfoundland, Canada; specimens collected by Whitcher are from the states of Washington and Oregon, USA. Vouchers are deposited at MT and K. (* no variety mentioned in the literature)

Species	Origin	Source and Voucher information
Subgenus <i>Acanthochlamys</i> (Spach) Bobr. (Section <i>Acanthochlamys</i> Spach)		
<i>C. ferox</i> Wall. 1	Asia	RBGE 19930413B
Subgenus <i>Siphonochlamys</i> Bobr. (Section <i>Tubo-Avellana</i> Spach)		
<i>C. cornuta</i> Marsh. subsp. <i>cornuta</i> 1	North America	Forest 97-62 - JBM 2864-77 (MT)
<i>C. cornuta</i> Marsh. subsp. <i>cornuta</i> 2	North America	Charest <i>et al.</i> 96-2406 (MT)
<i>C. cornuta</i> Marsh. subsp. <i>cornuta</i> 3	North America	Charest <i>et al.</i> 97-3559 (MT)
<i>C. cornuta</i> Marsh. subsp. <i>cornuta</i> 4	North America	Forest <i>sp</i> (MT)
<i>C. cornuta</i> Marsh. subsp. <i>californica</i> (A. DC.) Murray 1	North America	Whitcher 98-111
<i>C. cornuta</i> Marsh. subsp. <i>californica</i> (A. DC.) Murray 2	North America	Whitcher 98-118
<i>C. sieboldiana</i> Blume 1*	Asia	Forest 97-30 - JBM 1472-53 (MT)
<i>C. sieboldiana</i> Blume var. <i>mitis</i> Maxim. 1	Asia	Forest 97-77 - AA 518-77-B (MT)
<i>C. sieboldiana</i> Blume var. <i>manshurica</i> . (Maxim.) Schneid. 1	Asia	Forest 97-33 - JBM 1165-57 (MT)
<i>C. sieboldiana</i> Blume var. <i>manshurica</i> . (Maxim.) Schneid. 2	Asia	Chase 6130 - Kew 1973-16153 (K)
<i>C. chinensis</i> Franch. 1	Asia	Forest 97-67 - AA 493-37-B (MT)
<i>C. chinensis</i> Franch. 2	Asia	Forest 97-68 - AA 763-82-A (MT)

Table IV. (continued).

Species	Origin	Source and Voucher information
<p>Subgenus <i>Phyllocllamys</i> Bobr. (Section <i>Avellana</i> Spach)</p> <p>Section <i>Diphyllon</i> Bobr. Serie <i>Lacerae</i> Bobr.</p>		
<p><i>C. avellana</i> L. 1 <i>C. avellana</i> L. 2 <i>C. colurna</i> L. 1 <i>C. colurna</i> L. 2 <i>C. colurna</i> L. 3 <i>C. jacquemontii</i> Decne. 1</p>	<p>Europe Europe Europe-Asia Europe-Asia Europe-Asia Asia</p>	<p>Forest 97-27 - JBM 1206-92 (MT) Forest 97-63 - AA 22905-A (MT) Forest 97-49 - JBM 2673-95 (MT) Forest 98-01 - JBM 1203-90 (MT) Forest 98-02 - JBM 2924-90 (MT) Forest 97-72 - AA 18147-B (MT)</p>
<p>Serie <i>Incisae</i> Bobr.</p> <p><i>C. heterophylla</i> Fisch. ex Trautv. 1 <i>C. heterophylla</i> Fisch. ex Trautv. 2 <i>C. heterophylla</i> Fisch. ex Trautv. 3 <i>C. heterophylla</i> Fisch. ex Trautv. var. <i>sutchuenensis</i> Franch. 1 <i>C. heterophylla</i> Fisch. ex Trautv. var. <i>sutchuenensis</i> Franch. 2 <i>C. heterophylla</i> Fisch. ex Trautv. var. <i>yunnanensis</i> Franch. 1 <i>C. heterophylla</i> Fisch. ex Trautv. var. <i>yunnanensis</i> Franch. 2 <i>C. americana</i> Walt. 1 <i>C. americana</i> Walt. 2 <i>C. americana</i> Walt. 3</p>	<p>Asia Asia Asia Asia Asia Asia Asia North America North America North America Europe-Asia</p>	<p>Forest 97-31 - JBM 725-41-71 (MT) Forest 97-70 - AA 15923-C (MT) Forest 97-71 - AA 7907-A (MT) Forest 97-64 - AA 1094-89-A (MT) Chase 6132 - Kew 1988-4598 (K) Forest 97-18 - AA 523-85 (MT) Forest 97-60 - JBM 1298-40 (MT) Forest 97-26 - JBM 912-65 (MT) Forest 97-59 - JBM ? (MT) Forest 97-65 - AA 1229-A (MT) Chase 6129 - Kew 1873-7610 (K)</p>
<p>Section <i>Monophyllon</i> Bobr.</p> <p><i>C. maxima</i> Mill. 1 <i>C. maxima</i> « <i>purpurea</i> » (Loud.) Rehd. 2</p>	<p>Europe-Asia</p>	<p>Forest 98-32 - JBM 1800-72-81 (MT)</p>
<p>Hybrids</p> <p><i>C. x vilmorinii</i> Rehd. 1 <i>C. x colurnoides</i> Schneid. 1</p>	<p>- - - - - -</p>	<p>Forest 97-38 - JBM 10879-37 (MT) Chase 6131 - Kew 1969-12909</p>
<p>Outgroups</p> <p><i>Ostryopsis davidiana</i> Decne 1</p>	<p>Asia</p>	<p>Forest 96-17 - DAO 99-147-31-52A21 (MT)</p>

only one species (*Ostryopsis davidiana*) was available for inclusion in this analysis.

All specimens were collected in botanical gardens and arboreta except for three of the four specimens of *C. cornuta* subsp. *cornuta*, which were collected from natural populations in Québec and Newfoundland, Canada and for the two specimens of *C. cornuta* subsp. *californica* which were collected in the United States (Oregon and Washington). Voucher specimens are deposited at Herbarium Marie-Victorin (MT) and Kew (K) (see Table IV).

1.2.2. MOLECULAR METHODOLOGY.

DNA was isolated from fresh, frozen or silica gel dried leaves using the CTAB method of Doyle & Doyle (1987). For fresh or frozen leaf material, between 1.0 g and 1.3 g was used for each extraction, while 0.3 g was required for silica gel dried material. Silica gel dried leaves were ground in liquid nitrogen, and fresh or frozen leaves were ground in hot CTAB buffer. DNA from specimens cultivated at Royal Botanic Gardens, Kew was isolated on location by staff of the Jodrell Laboratory (M. Chase, pers. comm.).

The polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed with primers PI located at the 3'-end of the gene (position 96-116) and PII located at the 5'-end of the gene (position 4-24) (Cox *et al.* 1992; Figure 17). Primers PIII and PIV of Cox *et al.* (1992) yielded weak or no amplifications in *Corylus*. The 100 µl PCR reaction contained 2.5 units of Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics), 1X Taq DNA polymerase buffer (supplied by the manufacturer, with 1.5 mM MgCl₂ included), 0.3 µM of each primer and 100 µM of dNTPs. Amplifications were performed on a PTC-100 MJ Research inc. thermocycler. The PCR program began with a one-minute denaturation step at 94°C, followed by 28 cycles of denaturation at 94°C for one minute, annealing at 53°C for one minute and extension at 72°C for 1.5 minutes. The amplification was completed by a two minute extension step at 72°C.

PCR products were cloned using either the pGEM-T Vector System II from Promega or following a similar procedure without the use of a commercial cloning kit. In the latter, T-vectors were constructed with an overnight digestion (16 hours) of the pGEM-5Zf(+) vector (Promega) with the blunt-end cutter *EcoRV* endonuclease, followed by a two hour incubation period at 72 °C of the cut vector with Taq DNA polymerase and dTTPs (Marchuk *et al.* 1990). This procedure adds a 3' thymidine overhang to both ends of the cut vector, enhancing its ligation efficiency with Taq DNA polymerase amplified PCR products having a 3' adenosine overhang (Marchuk *et al.* 1990).

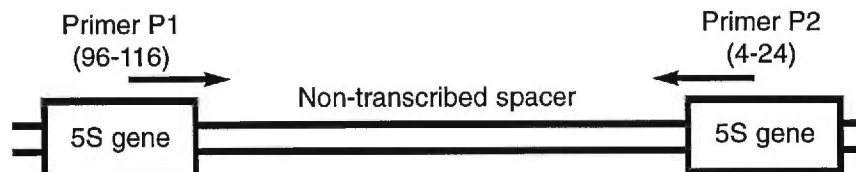


Figure 17. The 5S DNA unit showing the position of the primers used in the amplification of the 5S DNA spacer of *Corylus* and *Ostryopsis* (after Cox *et al.* 1992).

Ligation of the cleaned PCR product to the T-vector was performed overnight (16-20 hours) on the PCR block at 8°C. Each ligation reaction contains 3 units of T4 DNA ligase (Roche Diagnostics), 1X ligase buffer (supplied with the enzyme), and a 3:1 PCR product/T-vector ratio per volume. Purified water was added for a final volume of 10 µl.

Competent cells (XL1-MRF', Stratagene) were made using a standard protocol (Sambrook *et al.* 1989). Cells were left on ice in CaCl₂ 0.1 M solution overnight, as recommended. Competent cells were heat shocked in the presence of 2 µl of ligation product for 50 seconds, and then incubated in LB medium for 1.5 hour at 37°C with agitation (~200 rpm). The broth culture was plated on LB agar (IPTG 0.5mM, X-gal 80µg/ml, tetracycline 12.5µg/ml, ampicilline 100µg/ml) and incubated overnight at 37°C (16-20 hours). Each of the resulting white colonies (containing the vector with a PCR insert) were

dissolved in 10 μ l of purified water and used as template for a second PCR amplification of the 5S rRNA spacer (same reaction as above).

A 4:1 PCR product/T-vector ratio combined with the use of 5 μ l of ligation product instead of 2 μ l as recommended was found to improve the number of resulting white colonies. The white/blue colony screening, combined with tetracycline and ampicilline resistance, allowed for an efficient elimination of contaminants and non-transformed cells, resulting in a nearly hundred percent efficiency of the second PCR amplification. Larger products observed in the first PCR amplifications were attributed to the amplification of more than one repeat unit (Cox *et al.* 1992; Udovicic *et al.* 1995). In the second PCR amplification, the rare presence of multiple bands is explained by the insertion in the vector of one of these larger PCR products.

Because sequencing of all clones obtained was a time consuming and expensive procedure, a choice of clones to sequence was made using restriction site patterns. Between six and eighteen clones from each species were digested sequentially with two restriction enzymes, *Hae*III and *Alu*I. This technique permitted us to make a preliminary choice between the clones obtained. Five units of enzyme, 0.3 μ g of acetylated BSA and the appropriate concentration of buffer were mixed with the PCR product in a 25 μ l reaction. Following an incubation of five hours at 37°C, products were separated on 0.7% agarose gel, at 5 Vcm⁻¹, and stained with ethidium bromide. At least one clone from each of the restriction site patterns observed was sequenced (Table V). After preliminary analyses were performed, more clones were sequenced for certain species that appeared more problematic (e.g., clones not grouped together or not showing a clear possible duplication event). In species where clones showed only one restriction site pattern, three clones were arbitrarily chosen for sequencing. In addition, at least one clone of each individual included in the analysis was sequenced. In *Corylus*, three to eight clones were sequenced for each species.

Table V. Results of the restriction sites digestions performed for the preliminary choice of clones to be sequenced for the 5S spacer of *Corylus* and *Ostryopsis*, including the number of clones amplified and sequenced. The number of clones amplified represents the total number of clones that were successfully amplified by PCR. The three columns under *Grouping of restriction site patterns* show the number of clones for each distinct restriction site pattern observed.

Species	Number of clones amplified	Number of clones sequenced	Grouping of restriction site patterns		
			<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>AluI/HaeIII</i>
<i>C. ferox</i>	9	3	9	1+8	1+8
<i>C. cornuta</i> subsp. <i>cornuta</i>	8	5	8	8	8
<i>C. cornuta</i> subsp. <i>californica</i>	8	4	1+7	8	1+7
<i>C. sieboldiana</i>	16	6	7+9	4+9+3	3+4+3+6
<i>C. sieboldiana</i> var. <i>mitis</i>	9	3	9	9	9
<i>C. sieboldiana</i> var. <i>manshurica</i>	15	6	15	10+2+1+1+1	10+2+1+1+1
<i>C. avellana</i>	11	4	11	1+10	1+10
<i>C. heterophylla</i>	18	7	2+1+15	10+6+2	2+1+2+6+7
<i>C. heterophylla</i> var. <i>sutchuenensis</i>	11	4	1+8+2	8+1+1+1	1+2+1+1+6
<i>C. heterophylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	10	6	4+6	7+2+1	2+1+3+4
<i>C. americana</i>	12	7	3+9	5+7	7+2+3
<i>C. chinensis</i>	8	8	4+3+1	4+2+2	4+1+1+2
<i>C. jacquemontii</i>	15	6	4+2+9	4+11	4+9+2
<i>C. colurna</i>	12	4	12	12	12
<i>C. maxima</i>	14	6	2+12	9+1+4	2+1+2+9
<i>C. x vilmorinii</i>	8	4	1	4+4	4+4
<i>C. x colurnoides</i>	6	4	3+1+1+1	3+1+2	1+1+2+1+1
<i>Ostryopsis davidiana</i>	10	3	10	10	10

Products from the second PCR reaction were either sequenced using an ABI 377 or ABI 310 automated sequencer following instructions from the manufacturer. The same primers were used for sequencing as for the amplifications (PI and PII, Cox *et al.* 1992).

1.2.3. PHYLOGENETIC ANALYSES.

Complementary strands were assembled and computer basecalling was verified with sequence chromatograms using the program SEQUENCHER 3.0 (Gene Codes Corp.). Some sequences were submitted to a BLAST search on GenBank to ensure that no foreign DNA was amplified and sequenced. Resulting consensus sequences for each clone were aligned with the CLUSTAL X algorithm (Thompson *et al.* 1997) and verified visually. The first series of analyses was performed using the complete 5S DNA spacer matrix, but excluding hybrid taxa.

Phylogenetic analyses were performed using PAUP*4.0 test versions (Swofford 1998, with permission of the author). All characters were equally weighted and unordered. Analyses were conducted with the heuristic search option and branch swapping performed using TBR (tree bisection and reconnection) and random addition sequence (100 replicates). All optimal trees were kept in memory (MULPARS "on") and branches with a minimum length of zero were collapsed. Multistate characters were defined as uncertainties rather than polymorphisms because no polymorphism should be encountered as clones rather than individuals were sequenced. All three clones of *Ostryopsis davidiana* were defined as outgroup taxa in all analyses performed. Sequence insertions autapomorphic for genus *Ostryopsis* were excluded from the DNA matrix.

The second set of analyses was performed with the inclusion of the hybrid taxa. The same parameters were defined as for the first set of analyses. The two hybrid taxa (*C. x vilmorinii* and *C. x colurnoides*) were included in the analysis separately and together. This procedure was adopted because one

hybrid taxon can influence the position of the other and vice-versa, especially as the two studied hybrids possess one parent in common (*C. avellana*).

Bootstrap and jackknife analyses were performed on each of the three data matrices: with indels and duplications binary coded, without binary codings and with the hybrid taxa included. These analyses used the “fast stepwise-addition” type of search with 1000 replicates. Jackknife analyses used 50% character deletion.

1.2.4. GAP AND DUPLICATION CODING.

Binary and multistate coding of certain regions of the aligned sequences were performed prior to phylogenetic analyses. Several indels and duplications were observed in some clones and were coded as present or absent in the data matrix. Autapomorphic indels and duplications were not coded. Similar coding procedures were applied to a region with a repeated pattern of four bases (ACTT) observed in some clones. The ACTT repeated patterns could be coded either as a binary character (present or absent) or as a multi-state character (number of ACTT repeated patterns). Preliminary analyses using the multi-state coding of ACTT repeated patterns did not change dramatically the topology of the resulting phylogenetic tree or decreased its resolution. However, coding the number of repeated sequences could be phylogenetically misleading because such repeated sequences can be expanded by slipped-strand mispairing (Levinson & Gutman 1987). In addition, the occurrence of slipped-strand mispairing could become more frequent as the number of repeats is increased. For these reasons, ACTT repeated sequences in *Corylus* were coded as a presence/absence character rather than a multi-state character.

Characters resulting from the binary coding of both gaps and duplications were unordered and given the same weight as the nucleotide site mutations. Analyses were performed with and without these coding procedures.

Most of the gaps present in the aligned sequences are of various sizes, usually more than one or two residues. As stated by Lloyd and Calder (1991), multi-residue gaps in sequence alignments are probably not issued from more than one event. Homoplasy in such sequence features would require the same combination of length and position, which is unlikely to occur. This leads us to the assumption that considering gaps as a fifth base in analyses gives them too much weight, especially for the longer gaps. For this reason, gaps were treated as missing data instead of a fifth character in the phylogenetic analyses.

1.3. RESULTS

1.3.1. THE 5S SPACER IN *CORYLUS*.

Gel electrophoresis of products from the first PCR performed using total genomic DNA as template, shows a distinct ladder pattern that confirms the tandem repeated organization of the 5S DNA units in *Corylus* (Figure 18). The smallest bands represent the amplification of a single spacer. Each of the other larger bands is the result of the amplification of an odd number of genes and an even number of spacers. The use of restriction site patterns to make a preliminary choice of clones to be sequenced proved to be relevant. In 14 of the 17 taxa of *Corylus* included in this study, two to five different restriction site patterns were found (Table V and Figure 19).

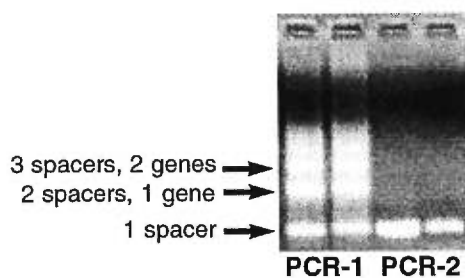


Figure 18. Agarose gel stained with ethidium bromide showing the distinct ladder pattern of the 5S DNA spacer amplified with primer PI and PII of Cox *et al.* (1992) (PCR-I, total genomic DNA; PCR-II, bacteria colony)

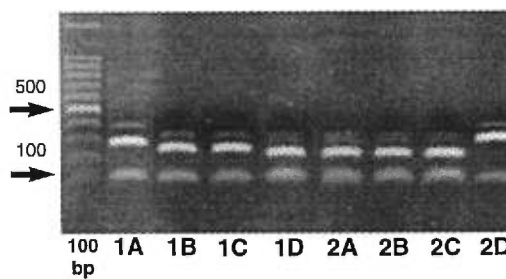


Figure 19. Restriction site patterns for the endonuclease *Hae*III in eight clones of the 5S DNA spacer of *Corylus chinensis* (1A to 1D and 2A to 2D).

The number of clones sequenced for each species depended on the different restriction site patterns observed. The combination of *AluI* and *HaeIII* restriction site patterns gave one to five different combined patterns within each *Corylus* species (Table V). In some species, only one restriction site occurred among all clones amplified (e.g., *C. ferox* for *AluI*) while in others no restriction sites were observed (e.g., *C. sieboldiana* var. *mitis* for *HaeIII*).

The 5S spacer in most *Corylus* clones ranges in length from 320 bp in *C. heterophylla* to 346 bp in *C. heterophylla* var. *sutchuenensis* with an average of 335 bp. All three clones of *Ostryopsis davidiana* have a length of 380 bp. Large deletions were found in two clones of *Corylus*. One clone of *C. manshurica* (clone 2A) is 239 bp in length due to two major deletions near the 5' end of the spacer (64 bp starting at position 14; 33 bp starting at position 117; I4 and I5 respectively, Figure 20). One of the seven clones sequenced of *C. americana* (clone 2B) also possesses a major deletion (84 bp starting at position 276; I6, Figure 20), but located near the 3' end of the mid-spacer region which results in a 248 bp spacer total length.

Much of the variation in length observed in the 5S spacer of *Corylus* is due to indels. Other than the two major deletions found in clone 2A of *C. manshurica* and the one found in clone 2B of *C. americana*, a small (seven bp) autapomorphic indel located at position 382 occurs in clone 1B of *C. sieboldiana*, and another autapomorphic indel 21 bp in length is found at position 46 of clone 2A of *C. heterophylla*. Three non-autapomorphic indels are found in some clones of section *Diphyllon* (*C. americana* 1A, 1B, 1C, 2A, 2B and 3B; *C. heterophylla* 3A, 3B, 3C and 3D; *C. heterophylla* var. *yunnanensis* 2A and 2B; *C. heterophylla* var. *sutchuenensis* 2B). Two are positioned at the 5' end of the mid-spacer region (14 bp at position 40 and 16 bp at position 47) and one is further in the median region (14 bp at position 195). After alignment was completed, it was decided that these indels would be coded as absence/presence characters.

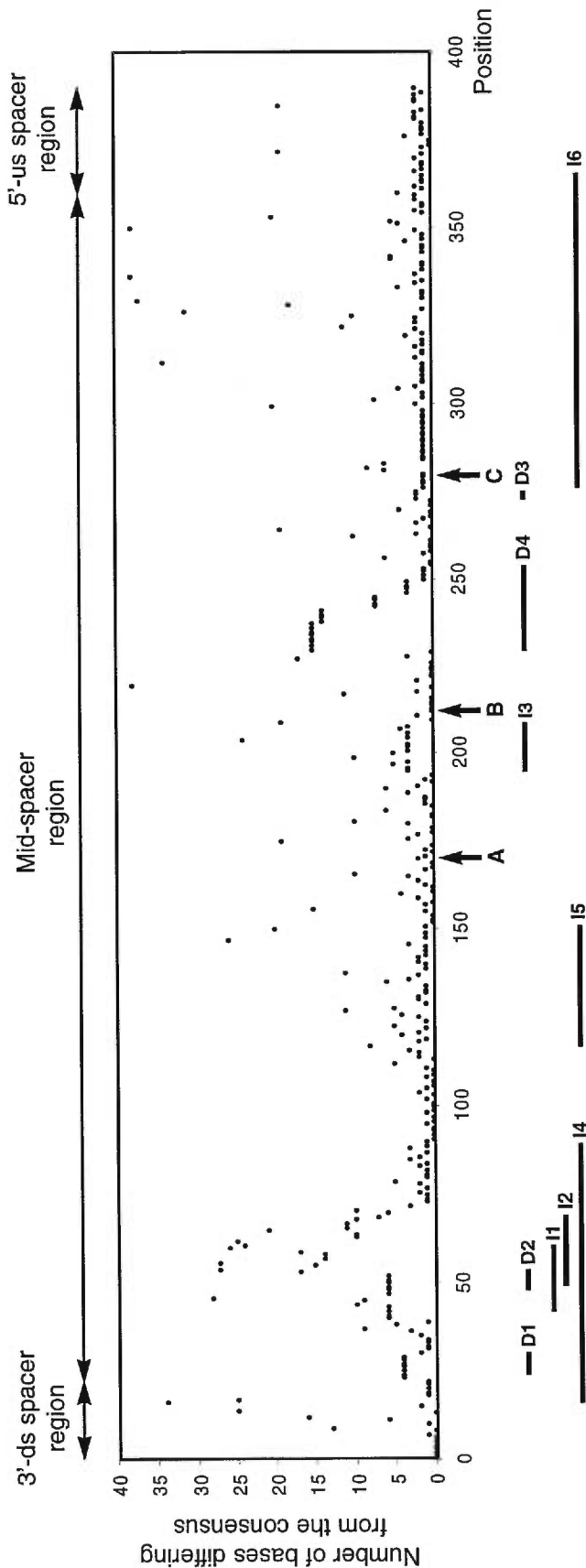


Figure 20. Sequence variation in the 5S DNA spacer of *Corylus* (compilation of the 89 clones included in this study). The putative position of the three spacer regions is shown by arrowed lines above the graph. Lines below the graph indicate the position of indels and duplications discussed in the text. Vertical arrows below the graph indicate the position of the three gap insertions necessary for the alignment of *Corylus* with *Ostryopsis* (A, 40 bp; B, 2 bp ; C, 37 bp).

Variation in size of the spacer is also caused by duplications. A complex duplication event occurs between positions 230 and 253 of the consensus sequence and consists in a repeated pattern of four nucleotides (ACTT) (D4, Figure 20). The number of repeats differs among clones, but all clones of *Corylus* possess at least two of these tetranucleotide duplications. A minority of clones has more than two ACTT repeated patterns (ranging from 4 to 8) found only in some clones of *C. americana*, *C. heterophylla*, *C. heterophylla* var. *sutchuenensis* and *C. heterophylla* var. *yunnanensis*, all of which are representatives of section *Diphyllon* of subgenus *Phyllocllamys*. Thus, these duplications are probably a good phylogenetic marker.

With the exception of the ACTT repeated pattern, duplications are generally short (less than eight bp) in the 5S spacer of *Corylus* and have little phylogenetic impact. However, three duplications confer some phylogenetic information. A first one, a seven bp duplication (CTTTTTG), is found in clone 3A of *C. cornuta* subsp. *cornuta* and clones 1A, 2A and 2C of *C. cornuta* subsp. *californica* (D1, Figure 20). The second occurs in six clones (*C. colurna* 1A, 1B and 2A; *C. x colurnoides* 1A, 1B and 1C) and is a six-bp repetition (TTTGGC) of the previous nucleotides in the sequence (D2, Figure 20). The last one, only three bp long (ATA), is found in two clones of *C. cornuta* subsp. *cornuta* (1A and 1B; D3, Figure 20). These duplications were coded either as presence/absence characters or as a string of individual nucleotides in the analysis. An autapomorphic duplication was also found in clone 1F of *C. jacquemontii* (5 bp, position 307).

Sequence divergence among clones within *Corylus* species ranges from 0,0072 (*C. maxima*) to 0,0880 (*C. sieboldiana* var. *manshurica*) (Table VI). Note that although clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica* is not included in the compilation of sequence divergence, this taxon remains the one with the highest rate of sequence divergence among *Corylus* species (0.0593; Table VI). Sequence divergence within *Ostryopsis davidiana* (0.0630) is slightly higher than that seen within most *Corylus* species (mean sequence divergence of 0,0540). *Corylus* and *Ostryopsis* differ by a mean sequence divergence of 0,1897. Some of

the clones sequenced are identical (pairwise distances equal zero), but they are very few (not shown).

1.3.2. MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT.

The final matrix comprises 89 sequences of *Corylus* clones and three of *Ostryopsis davidiana*. The boundaries of the spacers were determined with the alignment of the two primers used for amplification. Conserved nucleotides at both ends of the gene also permit clear positioning of the spacer sequence. In *Corylus* and *Ostryopsis*, the 5S rRNA gene ends with a CCCC at the 3' end and starts with a GGGT at the 5' end. This pattern agrees with those observed in previous studies of the 5S DNA repeat in plants (e.g., Hemleben & Werts 1988; Johnson *et al.* 1992; Udovicic *et al.* 1995).

The resulting consensus sequence is 390 bp long among *Corylus* clones alone and 469 bp when the three *Ostryopsis* clones are added (when sequence positions are mentioned, we refer to the consensus sequence of the *Corylus* clones alone). The addition of three clones from *Ostryopsis davidiana* forced the inclusion of three insertions (40 bp, 37 bp and 2 bp) located in the mid-spacer region of *Corylus* clones (Figure 20). The alignment of the 5S spacer sequences in *Corylus* was easily performed and the addition of new sequences to the initial matrix did not necessitate the use of alignment algorithms. However, near the 5' end of the median region, a small portion of the sequence (position 53 to 62) was more difficult to align in a minority of clones. Analyses performed with the exclusion of this small portion gave a similar tree topology with very little loss of resolution (not shown).

Table VI. Variation in length and sequence divergence in the 5S spacer sequences of species included in the phylogenetic analysis of *Corylus* and *Ostryopsis*. All clones are listed. Number between brackets are the number of clones with the given size. In the case of species having clones in different clades (see **Figure 21**), sequence divergence was compiled for each of these clades. Clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica* is not included in any of the two clades but is included in the species sequence divergence (* calculated without clone 2A).

Species	Sequence divergence (uncorrected p)	Sequence divergence (absolute)	Length variation (bp)
<i>C. ferox</i>	0,0420	14	334(1)-337(2)
<i>C. cornuta</i> subsp. <i>cornuta</i>	0,0221	7,4	333(2)-336(2)-340(1)
<i>C. cornuta</i> subsp. <i>californica</i>	0,0248	8,2	328(1)-335(1) 338(1)-340(1)
<i>C. sieboldiana</i>	0,0384	12,8	328(1)-335(5)-336(1)
Clade C	0,0205	6,8	
Clade E	0,0199	6,7	
<i>C. sieboldiana</i> var. <i>mitis</i>	0,0160	5,3	335(2)-336(1)
<i>C. sieboldiana</i> var. <i>manshurica</i>	0,0880 (0,0593*)	24,5 (19,7*)	239(1)-333(4)-334(1)
Clade E	0,0440	14,7	
<i>C. avellana</i>	0,0090	3	334(4)
<i>C. heterophylla</i>	0,0368	11,4	320(1)-324(3)
Clade B	0,0186	6	335(2)-338(1)
Clade C	0,0137	4,3	
<i>C. heterophylla</i> var. <i>sutchuenensis</i>	0,0303	10	334(1)-335(3)-346(1)
Clade B	0,0362	12	
Clade C	0,0200	0,7	
<i>C. heterophylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	0,0341	11,1	332(1)-334(3)
Clade B	0,0160	5,3	340(1)-346(1)
Clade C	0,0100	3,3	
<i>C. americana</i>	0,0251	7,3	248(1)-332(3)
Clade A	0,0151	6,8	334(1)-336(1)-340(1)
<i>C. chinensis</i>	0,0251	8,4	334(1)-335(7)
Clade C	0,0219	7,3	
Clade D	0,0119	4	
<i>C. jacquemontii</i>	0,0310	10,3	334(4)-335(1)-339(1)
Clade C	0,0200	6,7	
Clade D	0,0220	7,3	
<i>C. colurna</i>	0,0223	7,5	335(1)-342(3)
<i>C. maxima</i>	0,0072	2,4	334(6)
<i>C. x vilmorinii</i>	0,0095	3,2	334(4)
<i>C. x colurnoides</i>	0,0308	10,3	336(1)-241(1) 342(1)-344(1)
<i>Ostryopsis davidiana</i>	0,0630	8	380(3)
Mean sequence divergence within <i>Corylus</i>	0,0540	17,3	---
Mean sequence divergence between <i>Corylus</i> and <i>Ostryopsis</i>	0,1897	56,1	---

1.3.3. PHYLOGENETIC RECONSTRUCTIONS.

The final sequence alignment, including all *Corylus* and *Ostryopsis* clones, gave 208 variable characters of which 126 are parsimony informative and 82 are autapomorphic. Within *Corylus*, 175 characters are variable of which 87 are parsimony-informative and 88 are autapomorphic.

The first analysis includes the complete 5S DNA spacer matrix with the binary coding of duplications and indels. The analysis yielded 2448 most parsimonious trees of 366 steps with a consistency index (CI) of 0,61 and a retention index (RI) of 0,865. The strict consensus tree obtained is relatively well resolved (Figure 21). One of the most parsimonious trees is given to show character distributions (Figure 22). The monophyly of genus *Corylus* is strongly supported by 21 characters. Within *Corylus*, three groups are resolved in the strict consensus, broadly following the traditional subdivisions within the genus (subgenera *Acanthochlamys*, *Siphonochlamys* and *Phyllochlamys*). The three clones of *C. ferox*, the sole member in this analysis of subgenus *Acanthochlamys*, are supported as monophyletic and are sister to the remainder of the genus. *Corylus ferox* is the only species in which all clones form a monophyletic group.

The two consistently supported clades of subgenera *Phyllochlamys* and *Siphonochlamys* occur as sister groups in the strict consensus (clades A and E respectively, Figure 21). However, both subgenera, as shown by the present analysis, are paraphyletic because of the presence within subgenus

Figure 21. Strict consensus of the 2448 most parsimonious trees of 366 steps resulting from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S rDNA spacer, including all clones except hybrid taxa. Indels and duplications were binary coded in this analysis. Subgenera within *Corylus* and distributions are identified at the right of the tree. Subclades A, B, C, D and E mentioned in the text are identified. Numbers and letters after species names refer to individuals and clones respectively. Numbers on branches are respectively, bootstrap and jackknife values (ns = non-significative (<50%)). (⇒)

Figure 22. One of the 2448 arbitrarily selected most parsimonious trees of 366 steps retrieved from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S rDNA spacer, including all clones except hybrid taxa (CI = 0,610; RI = 0,865, calculated with parsimony-informative characters only). Indels and duplications were binary coded in this analysis. The number of supporting characters is given above the branches. Numbered boxes on branches show the change in state of manually coded indels and duplications.(⇒⇒)

Figure 21

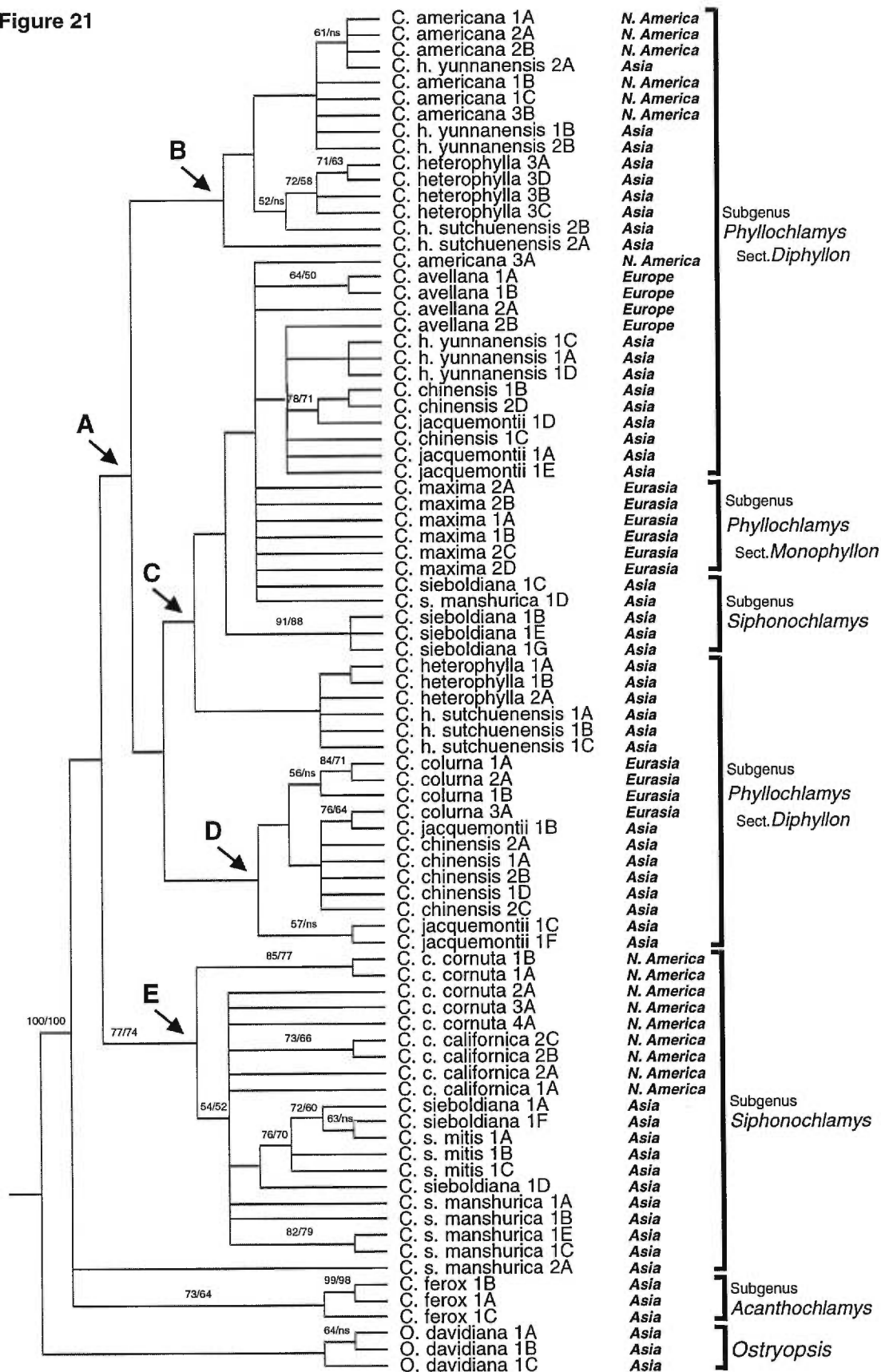


Figure 22



Phylloclamys clade of a few clones of species belonging to subgenus *Siphonochlamys* (Figure 21). All other clones of subgenus *Siphonochlamys* occur as a monophyletic group in subclade E (Figure 21).

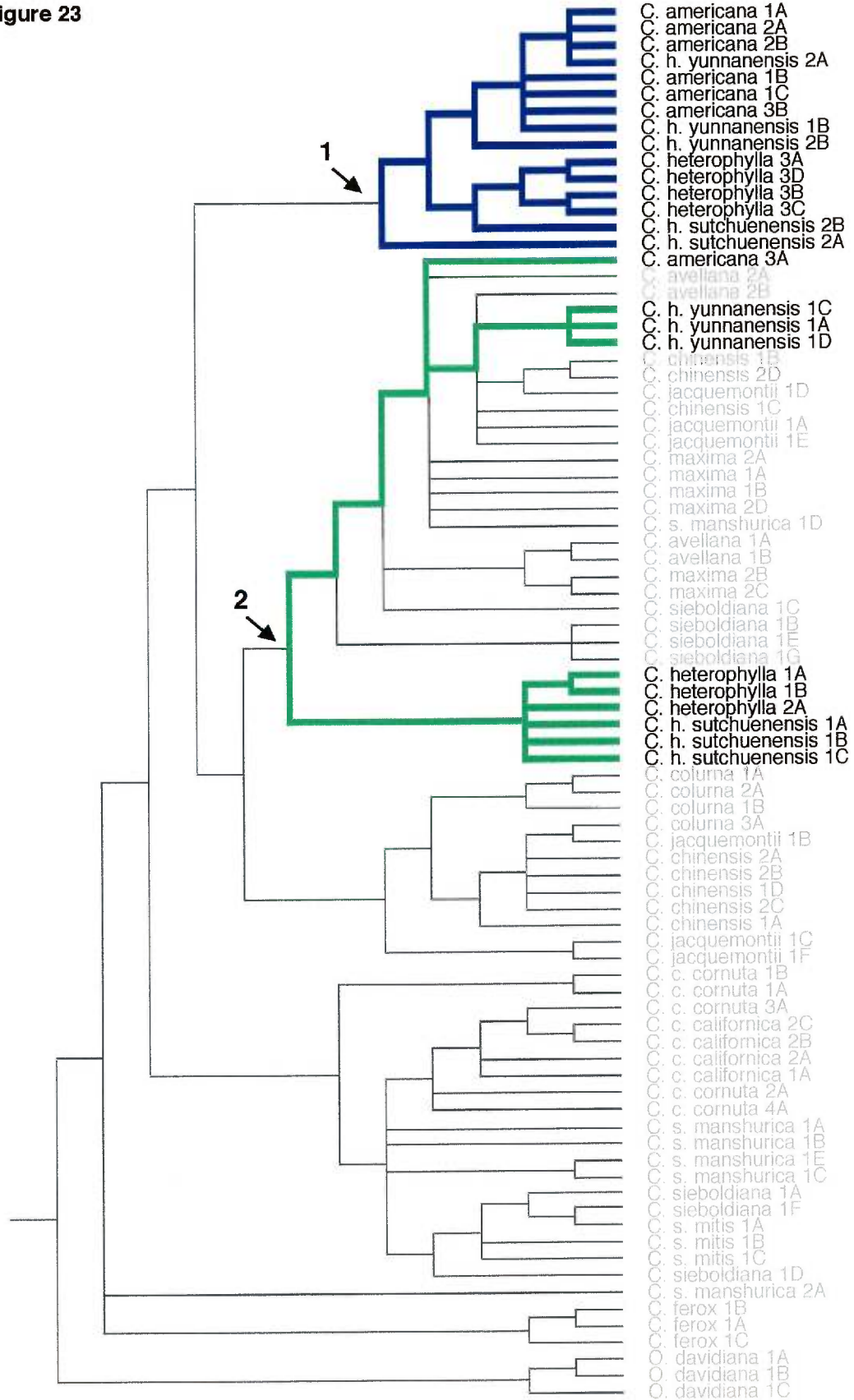
Within the subgenus *Phylloclamys* clade, several groups are supported and are named clades B, C and D (Figure 21). Subclades B and C comprise most of the species of subgenus *Phylloclamys*. All clones of *C. maxima* and most clones of *C. avellana* are found together at the “basal” node of a polytomy in subclade C, which also includes several other clones from different species (Figures 21, 22). All species found in subclade B have at least one clone present in subclade C (*C. americana*, *C. heterophylla*, *C. heterophylla* var. *yunnanensis* and *C. heterophylla* var. *sutchuenensis*). Position of these four species may reveal a duplication event as highlighted in Figure 23 and discussed further. Subclade D is formed by all four clones of *C. colurna*, five of the eight clones of *C. chinensis*, and three of the six clones of *C. jacquemontii*; the only three species included in this analysis with a tree habit.

The position of four clones of *C. sieboldiana* (clones 1B, 1C, 1E and 1G) and one of *C. sieboldiana* var. *manshurica* (clone 1D) in the cladogram renders subgenera *Phylloclamys* and *Siphonochlamys* paraphyletic. In the subclade of subgenus *Phylloclamys*, none of the species are monophyletic and all three subclades B, C and D are form of paraphyletic species.

The two clones, with large deletions that considerably shorten their size, show stable positions in the cladogram. Analyses always place the clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica* as “basal” in the genus, in a polytomy with the three monophyletic clones of *C. ferox* (Figure 21). Despite the presence of a large deletion in the 3' end of the spacer, the clone 2B of *C. americana* occurs in subclade B in all analyses, with five of the six other *C. americana* clones (Figure 21).

Figure 23. The duplication in the complex *C. americana*/*C. heterophylla* highlighted on the strict consensus of the 2448 most parsimonious trees resulting from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S rDNA spacer, including all clones except hybrid taxa. Indels and duplications were binary coded in this analysis. (⇒)

Figure 23



The analysis performed without the binary coding of indels and of the ACTT repeated pattern gave less resolution to the strict consensus than the previous analyses. Some of the most parsimonious trees of the analyses performed without the binary coding are very similar to the strict consensus of the analysis including them (Figure 24). The changes in topology obtained from analyses with different coding procedures of the indels and duplications only affect the clade of subgenus *Phylloclamys*.

Clones of the two hybrid taxa do not form monophyletic groups in the separate analyses (not shown) nor in the combined analysis (Figure 25), but the clones of *C. x colurnoides* and *C. x vilmorinii* always occur in the same positions whether they are included in the same or in separate analyses. In the strict consensus, the four clones of *C. x vilmorinii* occur as part of a large polytomy of one of the subclades of the subgenus *Phylloclamys* clade that also includes all clones of *C. avellana* and some of the clones of *C. chinensis*, its two parents (Figure 25). Three of the four clones of *C. x colurnoides* occur as a paraphyletic assemblage with three of the four clones of *C. colurna*, one of its two parents. The fourth clone occurs in a different clade, as a basal polytomy in the clade that includes *C. avellana*, the second parent (Figure 25).

Bootstrap analyses showed less than 50% support for the relationships among clades of subgenera within *Corylus*. In general, most of the subclades within the genus *Corylus* with more than 50% support have similar bootstrap and jackknife values with and without binary coding of indels and duplications (Figures 21, 24). *Siphonochlamys* is the best supported subgenus within *Corylus* with and without indels and duplications coded as binary characters (bootstrap values of 76% and 77% and jackknife values of 74% and 73% respectively; Figure 21). The main clade of subgenus *Acanthochlamys* is similarly supported by bootstrap and jackknife analyses. The main clade of subgenus *Phylloclamys* (subclade A, Figure 21) shows less than 50% support value, both in bootstrap and jackknife analyses. Minor subclades within it are more or less supported (Figure 21). The bootstrap analyses weakly support certain minor clades that were not found in the strict consensus (e.g., *C. maxima*

2B and 2C, 62% in the analysis with indels and duplications binary coded; *C.olurna* 1A and 2A, 64% in analysis excluding binary codings of indels and duplications.

Figure 24. Strict consensus (A) and one of the 6929 most parsimonious trees of 358 steps (B) resulting from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S rDNA spacer, including all clones except hybrid taxa (CI = 0,698 and RI = 0,867, calculated with parsimony-informative characters only). Indels and duplications were not binary coded in this analysis. Numbers on branches of the strict consensus are respectively, bootstrap and jackknife values. (⇒)

Figure 25. Results from the phylogenetic analysis of the genus *Corylus* based on the 5S DNA spacer, including all clones and hybrid taxa (*C. x vilmorinii* and *C. x colurnoides*), indels and duplications binary coded. Hybrid taxa are highlighted. Strict consensus (A) and one of the 5984 most parsimonious trees of 383 steps (B) retrieved from the analysis (CI = 0,604; RI = 0,865, calculated with parsimony-informative characters only); number of supporting characters is given above the branches. Numbers on branches of the strict consensus are respectively, bootstrap and jackknife values. (⇒⇒)

Figure 24

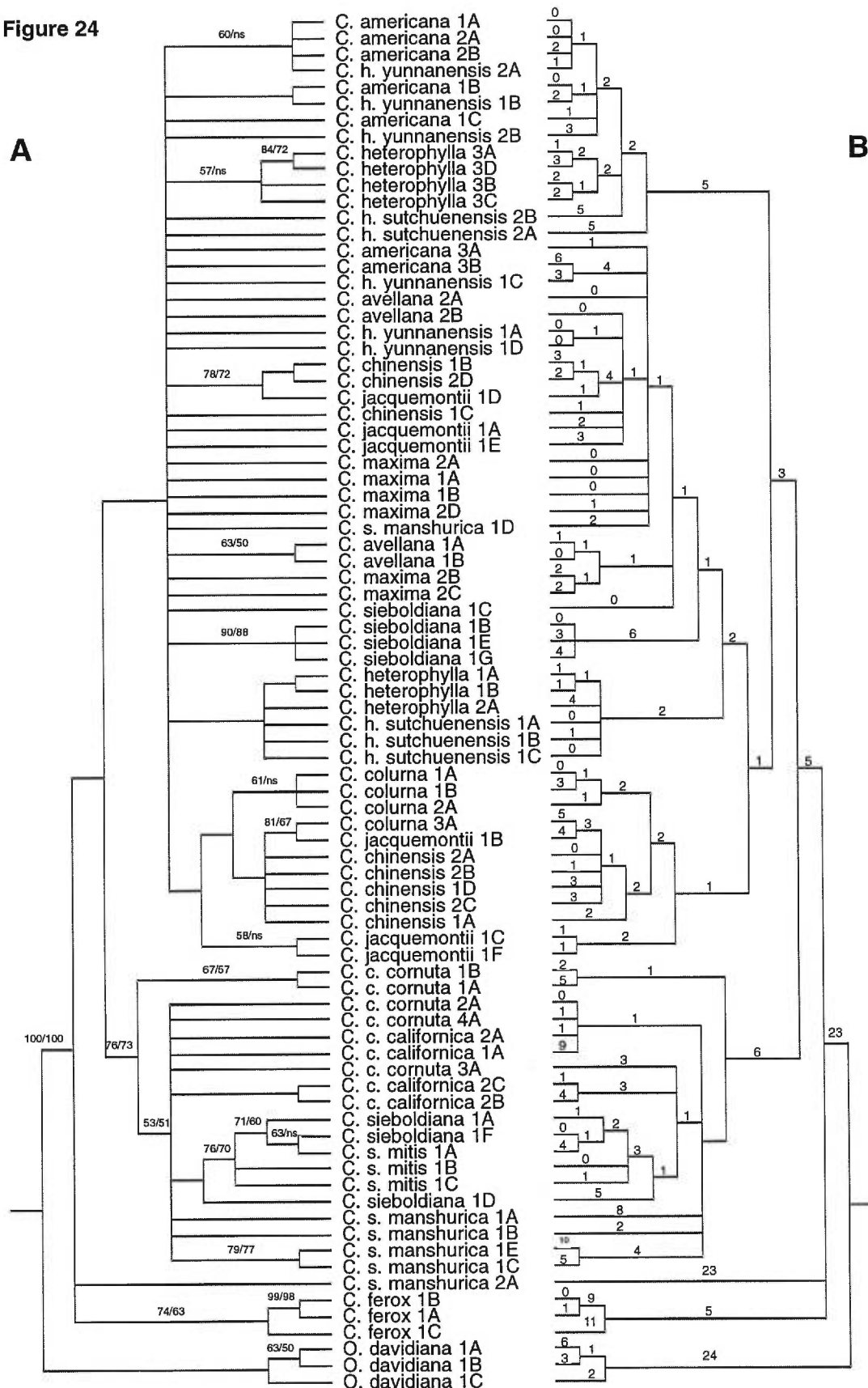
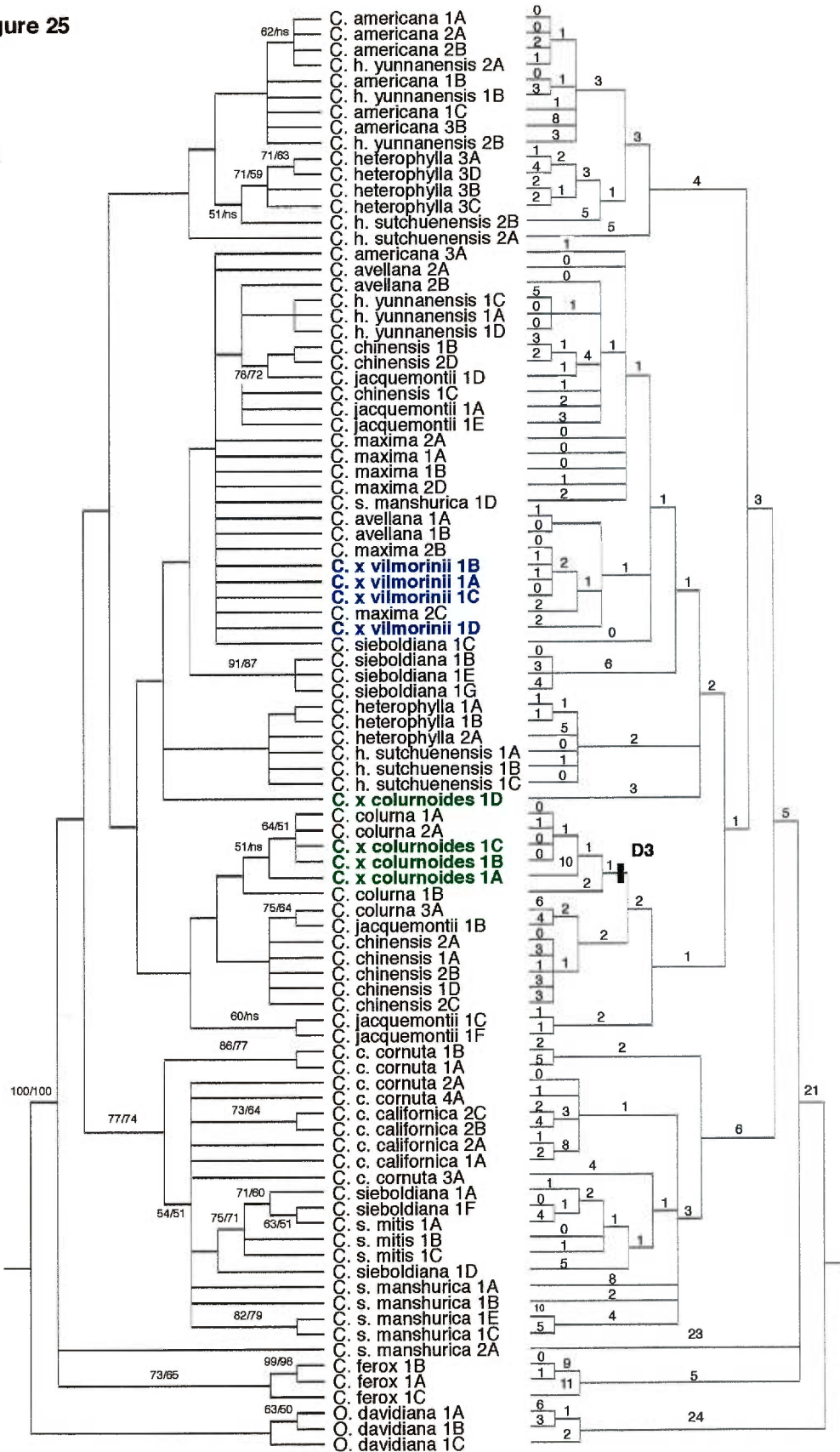


Figure 25

A

B



1.4. DISCUSSION

1.4.1. ORGANIZATION OF THE 5S rDNA SPACER IN HAZELS

In recent studies, the 5S DNA repeats have been divided into four regions of which one is the gene itself (Scoles *et al.* 1988; Sastri *et al.* 1992). The spacer is separated into three regions. The 3'-downstream spacer region is an A-T rich region located just beyond the 3' end of the gene, which may play a role in transcription termination. Tracts of T's and a TATAT motif sometimes present further downstream are features of this part of the spacer. The 5'-upstream spacer region is the most conserved portion of the spacer, at least in the grass tribe Triticeae (Scoles *et al.* 1988; Sastri *et al.* 1992). The central portion of the spacer is the most variable region in which numerous indels and point nucleotide substitutions are usually observed (see Figure 20).

Variation in the 5S spacer sequence of hazels seems equally distributed throughout the spacer (Figure 20). This situation renders the boundary definition between the three spacer regions more arbitrary. However, in *Corylus*, the 3'-downstream spacer region is the most definable of the three because of the presence of three tracts of T's of four to five bp in size. In *Corylus*, this region is 21 bp long, similar to that observed in the grass tribe Triticeae (15 to 19 bp long; Scoles *et al.* 1988). The third tract of T's of the 3'-downstream spacer region in clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica* is absent due to a large deletion. Thus, in this clone the 3'-downstream spacer region is 13 bp long and is the only example of variation in length for this region among all *Corylus* clones sequenced. In *Ostryopsis davidiana*, the 3'-downstream spacer region also is 13 bp long and contains two tracts of four to five T's, similar to clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica*. The 3'-downstream spacer region in *Corylus* does not feature the TATAT motif noted in other taxa (e.g., Sastri *et al.* 1992). Although there are two TATAT motifs observed in the 5S DNA spacers of *Corylus*, they are located much further downstream in the spacer. There is a possibility that the 3'-downstream spacer region is rather long, resulting in short mid-spacer and 5' end spacer regions (but see further). The 3'-downstream spacer region, characterized by tracts of four or more T's

separated by GC sequences as seen in *Corylus*, is thought to be involved in transcription termination (Hembelen & Werts 1988; Scoles *et al.* 1988).

Although the mid-spacer region in *Corylus* shows less variability than that observed in Triticeae (Scoles *et al.* 1988), it remains relatively variable. All indels and duplications found in the 5S spacer of *Corylus* are located in this region except for one small indel in clone 1B of *C. sieboldiana* (seven bp). They account for the great majority of the length variation in the spacer (Figure 20). Fewer mutations were observed in *Corylus* than in Triticeae, where deletions clearly marked the boundary of the mid-spacer and the 5'-upstream spacer region (Scoles *et al.* 1988). Two portions of the mid-spacer region are of particular interest. The first is located from position 66 to 94 of the consensus sequence; it is in this part of the spacer that the alignment was the most difficult. Two of the indels that were coded as present or absent are found in this region, as well as a duplication (see Figure 20). Exclusion of this portion of the spacer from the analyses did not result in dramatic changes in tree topology. One of the two major deletions observed in clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica* encompasses part of this region. The second portion, clearly visible as a staircase on the graph (Figure 20), is the region where the extra ACTT's are found (position 230 to 253).

In *Corylus*, the 5'-upstream spacer region is not as easily defined as in the grass tribe Triticeae (Sastri *et al.* 1992), but could be considered to comprise the last 35 nucleotides of the spacer, a region that is relatively more conserved (Figure 20). Based on comparisons of the upstream region of the 5S rRNA gene of several plant species, Venkateswarlu *et al.* (1991), noted three features of this part of the spacer. The first is the presence of a C just before the first nucleotide of the gene (position -1). This C residue is conserved in 87 of the 89 clones of the 5S spacer of *Corylus* sequenced for this study, as well as in all three clones of *Ostryopsis*. The second feature is a GC-rich sequence centered at position -13 that corresponds to a highly conserved GCG sequence located at positions -16 to -14 in almost all *Corylus* 5S clones (86 of 89) as well as in *Ostryopsis* clones. The third feature is an A-T-rich region that corresponds to a TATA sequence

(Venkateswarlu *et al.* 1991). This TATA element is also highly conserved in all clones examined (86 of 89 *Corylus* clones and all *Ostryopsis* clones) and is located at -29 to -24 in *Corylus*, at about the same position as in many other taxa including the Ascomycota *Neurospora crassa* (-29 to -24; Tyler 1987) and, the nematode *Caenorhabditis elegans* (-25; Nelson *et al.* 1998).

The upstream sequence of genes transcribed by polymerase I and II is generally characterized by a TATA box, a promoter element that seems to be involved in the definition of a particular starting point for the transcription by the binding of a transcription factor in most organisms. In contrast to other genes that are transcribed by polymerase I and II with an upstream regulation sequence, the transcription of the 5S rRNA genes by RNA polymerase III is generally initiated by a promoter located within the gene (Geiduschek & Tocchini-Valentini 1988). But, upstream sequences may be involved in the initiation of transcription (Morton & Sprague 1984; Tyler 1987; Nelson *et al.* 1998). Such conserved sequence regions have been observed in the 5S DNA repeats of plants (Rafalski *et al.* 1982; Hembelen & Werts 1988; Venkateswarlu *et al.* 1991), including here in *Corylus* and *Ostryopsis*. However, based on spacer comparisons, the TATA element does not seem to be essential to the transcription of the 5S rRNA genes by RNA polymerase III in plants (Hembelen & Werts 1988).

Features thought to be associated with the transcription initiation complex are highly conserved in the 5S spacer of *Corylus* and other Betulaceae. For example, the occurrence of a second TATA sequence feature, enclosed in a TTATATTAT sequence at position 268 to 279 of the consensus sequence, is also extremely conserved among most of the *Corylus* clones. The major deletion observed in clone 2B of *C. americana* includes all of the nucleotides between these TATA elements and one of the TATA elements. The observation that this deletion occurs between the two TATA elements, leaving intact the putative transcription initiation complex, may be a coincidence, but raises questions about the role played by sequences upstream of the 5S genes in plants.

1.4.2. EVOLUTION OF THE 5S rDNA SPACER IN HAZELS

The 5S rRNA genes are more conserved than their associated non-transcribed spacers because of the selective pressure associated with their function (Scoles *et al.* 1988; Cox *et al.* 1992; Sastri *et al.* 1992; Cronn *et al.* 1996). The assumption that the 5S rRNA gene sequences are highly conserved is supported by the ease of alignment between taxonomically distant taxa. As for other multigene families, the 5S DNA units are thought to be subjected to a group of homogenising mechanisms known as concerted evolution (Zimmer *et al.* 1980). However, gene conversion and recombination, mechanisms that define concerted evolution, may not be capable of homogenizing a complete array of many thousands of 5S rRNA genes and are thought to act more locally or infrequently (at least in the Triticeae; Kellogg & Appels 1995). The potentially high number of different repeats, resulting in intragenomic variability, may be caused, for example, by incomplete concerted evolution or presence of multiple loci.

Several studies have demonstrated the presence of many loci for the 5S ribosomal RNA genes in the nuclear genome. The number of loci for 5S genes ranges from one to as much as twelve [e.g., Reddy & Appels (1989); Mukai *et al.* (1990); Moran *et al.* (1992); Schneeberger & Cullis (1992); Fukui *et al.* (1994); Brown & Carlson (1997)]. The number of loci of a gene can be determined by *in situ* hybridization (e.g., Reddy & Appels 1988; Fukui *et al.* 1993; Brown & Carlson 1997), or indirectly by the detection of different length classes of the 5S DNA unit. In *Corylus*, the length variation of the 5S spacer within a species is not sufficient to allow the differentiation between loci. The small range of size variation found in other Betulaceae (*Betula papyrifera* Marshall and *Alnus incana* (L.) Moench) was also considered too low to suggest the presence of two classes of 5S DNA repeats (Johnson *et al.* 1991). It is unlikely that the two short clones found in *Corylus* (*C. americana* 2B and *C. sieboldiana* var. *manshurica* 2A) are issued from a different locus than the other 87 clones sequenced even if a given locus can be less important in the expression of a gene. These shorter

spacers, not revealed by gel electrophoresis, are probably present in very small number, at least in these two species, if not in all of them.

The disjunct position of clones of a single species in the phylogenetic analyses, as observed in *Corylus*, suggests the presence of multiple 5S loci in this genus. A duplication pattern is easily discernable in the phylogenetic analyses by the presence of two clades, each containing clones of the same species with identical relationships among them (subclades 1 and 2 in Figure 23). In both of these clades, *C. americana* and *C. heterophylla* var. *yunnanensis* are sister taxa and both of them are sister taxa to *C. heterophylla* and *C. heterophylla* var. *sutchuenensis*. The only difference between these two subclades is the presence in subclade 2 of clones from other species of subgenus *Phyllocllamys* and some of subgenus *Siphonochlamys*.

Subclade D (Figure 21) comprises most of the clones of species with a tree habit (*C. colurna*, *C. chinensis* and *C. jacquemontii*). The presence of clones of *C. chinensis* and *C. jacquemontii* in subclade C as well, suggests the possibility for a similar duplication event. Furthermore, the same phenomenon may explain the disjunct positions of clones of *C. manshurica* and *C. sieboldiana*, which occur in both the *Siphonochlamys* and the *Phyllocllamys* clades (subclade C, Figure 21).

The presence of two clades with identical relationships among the species in common is strong evidence for the presence of two loci of the 5S DNA repeats in *Corylus*. These loci could have arisen by duplication of the complete array prior to speciation with loss of one copy in certain species, such as *C. avellana* and *C. maxima*. It is also possible that the samples sequenced simply do not include the second locus in *C. avellana* and *C. maxima*. Another possibility is that interlocus concerted evolution has homogenized one locus relative to the other one. However, concerted evolution between two different loci has not been observed in 5S rDNA repeats in other taxa, although it has been reported for the internal transcribed spacers of the 18S-5.8S-28S ribosomal gene family in plants (Wendel *et al.* 1995; Cronn *et al.* 1996). Finally, the disjunction observed between clones in certain species could be the result of

the presence of two different 5S DNA units within a locus (Graham 1995) if concerted evolution is not a strong enough force to homogenize all the 5S DNA units of an array due to its large size in certain species of plants.

1.4.3. PHYLOGENETIC INFERENCES

1.4.3.1. PHYLOGENY OF HAZELS.

The results of the phylogenetic analysis of *Corylus* species based on the spacer of the 5S rRNA genes provide information on the relationships between species and subgenera of *Corylus*. The strict consensus of the 2448 most parsimonious trees broadly shows the relationships between the three groups traditionally recognized (Spach 1842a; De Candolle 1864; Bobrov 1936). None of the clones of a given species form monophyletic group, except those of *C. ferox* (Figure 21). This is the main obstacle that renders relationships between species less obvious to determine.

The three clones of *C. ferox*, the unique representative of subgenus *Acanthochlamys* in this study, form a monophyletic group sister to the remainder of the genus. *Acanthochlamys* is the smallest of the three subgenera described within *Corylus*, including only two species, *C. ferox* and *C. tibetica*, the latter not included in the present study because of unavailability of material. Subgenus *Acanthochlamys* would likely remain monophyletic with the inclusion of *C. tibetica* because these species are morphologically very similar. *Corylus tibetica* was considered a variety of *C. ferox* by some authors (e.g., Burkill 1899; Franchet 1899; Winkler 1904). Both species are characterized by an involucre formed of two very spiny bracts, the main defining character of subgenus *Acanthochlamys*. Morphological characters that distinguish these two species are branchlet pubescence (glabrescent in *C. ferox*, glabrous in *C. tibetica*), leaves broader in *C. tibetica*, and an involucre wall visible through the spines (*C. ferox*) or hardly visible (*C. tibetica*).

Our analyses of the 5S rDNA spacer clearly show that subgenus *Phyllochlamys* is sister to subgenus *Siphonochlamys*, although neither is supported as strictly monophyletic (Figure 21). Five clones of two species

(*C. sieboldiana* and *C. sieboldiana* var. *manshurica*), considered as members of subgenus *Siphonochlamys*, are found within the large clades comprising subgenus *Phyllochlamys* (clade A, Figure 21) and subgenus *Siphonochlamys* (clade E, Figure 21). *Corylus sieboldiana* and *C. sieboldiana* var. *manshurica* are expected to be found within the subgenus *Siphonochlamys* since they possess involucre characters that undoubtedly placed them in this subgenus.

Other than the ambiguous position of the different *C. sieboldiana* and *C. sieboldiana* var. *manshurica* clones, subgenus *Siphonochlamys* is supported as monophyletic by the 5S rDNA analyses. The monophyly of the subgenus is also supported by morphological characters such as the involucre bracts fused into a tube, constricted above the nut. Relationships among species within subgenus *Siphonochlamys* are difficult to interpret based on the 5S rDNA analyses, due to the low resolution obtained within the clade (subclade E, Figure 21).

Subgenus *Phyllochlamys* comprises about half of the species of genus *Corylus*, all of them having an involucre formed of one or two foliaceous bracts. The clade of subgenus *Phyllochlamys* (subclade A, Figure 21) is divided into three consistently supported subclades (subclades B, C and D; Figure 21).

Bobrov (1936), based on characters of the involucre bracts, divided subgenus *Phyllochlamys* into two sections, section *Monophyllon* and section *Diphyllon*, the latter further subdivided into series *Lacerae* and *Incisae*. Sampling of section *Diphyllon* is nearly complete with most of the species included. However, sampling of section *Monophyllon* is less optimal since only one of the three species is included in this analysis. Despite the low sampling in section *Monophyllon*, the results of our 5S DNA spacer analyses indicate that members of section *Monophyllon*, here the six clones of *C. maxima*, may be derived from within section *Diphyllon*. If this hypothesis of relationships is supported, two bracts enveloping the fruit would be the ancestral state for *Corylus*, since species included in section *Monophyllon* are the only ones in the genus with a single involucre bract. All other *Corylus* species have an involucre formed of two bracts, either foliaceous, fused into a tube or spiny (as

C. ferox, sister to the remainder of the genus; Figure 21). Inclusion of the other two species of section *Monophyllon*, *C. colchica* and *C. pontica*, remains necessary to more strongly establish relationships between the two sections within subgenus *Phylloclamys*.

The division of section *Diphyllon* into two series, *Lacerae* and *Incisae* (Bobrov 1936), is more or less supported by this cladistic analysis of the 5S DNA spacer. Series *Lacerae* comprises species with deeply dissected involucre bracts (to half their length or more) and unequal lanceolate lobes (*C. colurna*, *C. jacquemontii* and *C. avellana*). In the resulting strict consensus tree, *C. colurna* and *C. avellana* do not occur together, being separated by 11 to 22 characters, depending on which clones are compared (Figure 22). The bracts in *C. avellana* are not as dissected and large as those of *C. colurna*, and resemble more closely those of species of series *Incisae* (e.g., *C. americana*) based on bract dissection (pers. obser.). However, a close relationship between *C. avellana* and the species of series *Incisae* (the *C. americana* - *C. heterophylla* complex) is not supported by the molecular analyses because *C. avellana* does not possess two cladistically different 5S DNA spacer as in the species of the *C. americana* - *C. heterophylla* complex (Figures 21 and 23). Extended sampling of the 5S DNA spacer of *C. avellana* might reveal a second type of spacer.

Taxa included in series *Incisae* (*C. americana*, *C. heterophylla* and *C. heterophylla* var. *sutchuenensis*) have bracts dissected 1/3 to 1/6 of their length and subequal lobes (Bobrov 1936). Bobrov (1936) placed *Corylus heterophylla* var. *yunnanensis* in subgenus *Siphonochlamys*, giving it the rank of species. The involucre of *C. heterophylla* var. *yunnanensis* is clearly not tubular as in other species of subgenus *Siphonochlamys*, but rather is formed of two foliaceous bracts. In the cladistic analysis of the 5S rDNA spacer, all clones of *C. heterophylla* var. *yunnanensis* are found in the *Phylloclamys* clade, supporting the position of this species as a member of subgenus *Phylloclamys*, section *Diphyllon*. With the inclusion of *C. heterophylla* var. *yunnanensis*, our analysis indicates that series *Incisae* forms a natural group (Figure 21).

Subclade D is formed of the only species included in this analysis that have a tree habit and includes clones of *C. colurna*, *C. jacquemontii* and *C. chinensis*. Subclade D represents a group within *Corylus* that is not widely recognized in taxonomic treatments, except in Winkler's (1904) monograph of the Betulaceae where *C. jacquemontii* and *C. chinensis* are considered as varieties of *C. colurna* (Winkler (1904) did not recognize any formal taxonomic groups in his treatment). Burkill (1899) also considered *C. chinensis* as a variety of *C. colurna*. The tree habit is probably one of the reasons why *C. jacquemontii* and *C. chinensis* were given the rank of variety within *C. colurna*. Although it is difficult to establish relationships within this group because of the paraphyly of the clones of the three species in subclade D, most clones of *C. jacquemontii* occur as sister to the *C. chinensis* and *C. colurna* clones. Both *C. colurna* and *C. jacquemontii* have deeply dissected involucre bracts that are very similar, differing by the presence of stipitate-glands on the bracts of *C. colurna*. However, no morphological characters are available to support the inclusion of *C. chinensis* in this group other than the tree habit.

Corylus chinensis was first described by Franchet (1899), who placed it near species of subgenus *Siphonochlamys* based on the tubular form of the bracts, typical of this subgenus. Bobrov (1936) also considered *Corylus chinensis* as part of subgenus *Siphonochlamys*. However, Franchet (1899) observed that the fruits and especially the leaves of *C. chinensis* were different from those of species included within subgenus *Siphonochlamys*. Franchet (1899) also noted that the dissection of the margin of the involucre bracts is similar to that observed in *C. colurna* and *C. jacquemontii*, two members of subgenus *Phyllochlamys*. Burkill (1899) places Franchet's *C. chinensis* as a variety of *C. colurna* and this taxonomic status was later supported by Winkler (1904).

Our cladistic analyses of the 5S spacer support the hypotheses of close relationships between *C. chinensis*, *C. colurna* and *C. jacquemontii* proposed by Burkill (1899) and Winkler (1904). Furthermore, the tubular involucre of *C. chinensis* is not as constricted as the one of the *C. cornuta* and other species of subgenus *Siphonochlamys*, and the involucre bracts in *C. chinensis* are more

dissected than those found in species of subgenus *Siphonochlamys*. The results of the analysis presented here clearly place *C. chinensis* with *C. colurna* and *C. jacquemontii*. In addition, none of the eight clones of *C. chinensis* sequenced were found within the main *Siphonochlamys* subclade (Figures 21 and 22).

The presence of the ACTT repeated sequence appears to be a good phylogenetic marker, characterizing all clones (except *C. heterophylla* var. *sutchuenensis* 2A) of one of the subclades issued from the duplication of the 5S spacer in the *C. americana* / *C. heterophylla* complex (subclade B, duplication D4, Figure 22). Only one clone with the additional ACTT repeats is found outside of this subclade (*C. heterophylla* 2A, subclade C; Figure 22). The analysis performed without any particular coding procedure for the ACTT repeated patterns and other binary sequence features shows a less resolved strict consensus for the subgenus *Phyllochlamys* clade (Figure 24). A majority of the most parsimonious trees found in the analysis excluding binary coded characters have a similar topology to the strict consensus of the analysis performed with the binary coding of indels and duplications (Figure 24).

Two clones of *Corylus* possess major deletions that result in considerable shortening in the length of the spacer. The position of these two clones in the phylogenetic tree brings to light the possibility of an unequal distribution and phylogenetic value of parsimony-informative characters in the 5S DNA spacer of *Corylus*. The two large deletions (64 bp and 33 bp for a total of 97 bp) found in clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica* are located in the 5'-half of the spacer (Figure 20). The cladistic analysis places this clone in a polytomy with the monophyletic *C. ferox* clones and the remainder of the genus (Figure 21). In contrast, even with a large deletion of 84 bp located in the 3'-half of the spacer, clone 2B of *C. americana* is placed in the phylogenetic tree with five of the seven other clones of this species (Figures 20 and 21). Both clones have a similar number of nucleotides deleted but at different locations in the spacer. Does this mean that a significant number of parsimony-informative characters are located at the beginning of the 5S DNA spacer in *Corylus*? If parsimony-

informative characters are equally distributed, are they of different value for cladistic analysis in *Corylus*?

To address these questions, two additional cladistic analyses were performed, each excluding for all clones, the portion of the sequence corresponding to the deletions in each shorter clones. The analysis performed without the portion corresponding to the two major deletions in clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica* resulted in loss of almost all resolution in the subgenus *Phylloclamys* clade and a sister relationship between subgenera *Acanthochlamys* and *Siphonochlamys* (not shown). The analysis excluding the portion of the sequence where the major deletion in clone 2B of *C. americana* is found, yielded a topology similar to analyses with total sequence length, both for the strict consensus and the most parsimonious trees (not shown). However, slightly less resolution is observed in the strict consensus within subgenus *Phylloclamys*.

The higher resolution retained in the second analysis compared to the first analysis may explain why clone 2B of *C. americana* is placed with other *C. americana* clones in the full sequence analysis whereas clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica* never occurs with the other *C. sieboldiana* var. *manshurica* clones. Among the 83 parsimony-informative characters in the 5S DNA spacer of genus *Corylus* (excluding hybrids), 28 are found in the portion of the sequence corresponding to the two deletions in clone 2A of *C. sieboldiana* var. *manshurica*, while only 19 occur in the portion corresponding to the deletion in clone 2B of *C. americana*. However, this corresponds roughly to the same amount of parsimony-informative characters in proportion to the length of the deletions (28,9% and 25% respectively). Thus, the 5' end of the spacer does not contain more parsimony-informative characters than the 3' end, but the former are of greater phylogenetic value.

Similarly, previous studies have shown that intragenomic variability in nucleotide composition is equally distributed within the gene and the spacer in the 5S rDNA array of certain plants species (e.g., Playford *et al.* 1992; Kellogg & Appels 1995; Cronn *et al.* 1996), but that variation in the gene is more

homoplasious, thus less useful for phylogenetic reconstruction. Since sequences in the 3' end are thought to have a regulatory function in the initiation of transcription (e.g., Hembelen & Wertz 1988; Venkateswarlu *et al.* 1991), they may contain more homoplasious characters than the rest of the spacer, as does the 5S rRNA gene.

The bootstrap and jackknife analyses support the division of the genus *Corylus* into three subgenera. However, the resolution within subgenus *Phyllocllamys* and relationships among subgenera are weakly supported. Bootstrap and jackknife only support minor clades in subgenus *Phyllocllamys*. The weak support of subgenus *Phyllocllamys* is not surprising since exclusion of binary codings from the analysis resulted in loss of resolution at the base of this clade (Figure 24). The inclusion of hybrids did not significantly alter bootstrap support on branches where those taxa are found nor were major topological rearrangements created (Figures 21, 25). The weak support within subgenus *Phyllocllamys* and among subgenera has very little effect on biogeographical hypotheses exposed further.

1.4.3.2. HYBRID TAXA.

When hybrids are included in phylogenetic analyses, they are thought to cause a number of disturbances such as increased homoplasy, higher number of most parsimonious trees resulting in less resolved consensus trees and alteration of tree topology (reviewed in McDade 1992). However, the study of the impact of hybrids on cladistic analysis performed by McDade (1992) showed that the addition of hybrids does not affect the resulting trees any more than the addition of non-hybrid taxa. When the number of hybrid taxa included in an analysis is low, changes in tree topology are usually minor or inexistent (McDade 1992). Both hybrids included in this study have parents from the same subgenus, subgenus *Phyllocllamys*. Addition of hybrids with parents from different subgenera is expected to cause more disturbance in tree topology.

Results of the addition of hybrid taxa in the *Corylus* 5S rDNA spacer data set generally support the conclusions of McDade (1992). Clones from hybrid taxa have no or little effect on tree topology. The addition of *C. x colurnoides* has absolutely no effect on the topology of other species. This hybrid also has sequence features similar to one of its parents, *C. colurna*. Among the duplications that are binary coded, one (D2, Figure 20) occurs in three of the four clones of *C. x colurnoides* (1A, 1B and 1C) and also in three of the four clones of *C. colurna* (1A, 1B and 2A). These clones are grouped together in the phylogenetic analysis, supported in part by this duplication (D2, Figure 25). Extra residues are observed (A at position 156 and C at position 256) in these clones, conferring additional support for the clade. Changes in tree topology with the addition of *C. x vilmorinii* are slight and confined to a subclade of subgenus *Phyllocllamys*, resulting in an identical polytomy in the strict consensus trees of analyses including and excluding hybrid taxa (Figures 21 and 25). Three of the four clones of *C. avellana*, one of the parents of *C. x vilmorinii*, occur in this polytomy with the four clones of the hybrid.

In contrast to the conclusions of McDade (1992), hybrid clones in *Corylus* do not tend to be placed at the base of the clade containing their most derived parent. Rather the clones of the hybrids generally occur as sister taxa to one of their parents. *Corylus x colurnoides* occurs as sister to *C. colurna* and has leaves, an involucre and a habit similar to those of *C. colurna*. The involucre of *C. x colurnoides* is deeply dissected with glandular hairs, as in *C. colurna*. Clones of *C. x vilmorinii* occur in a polytomy with several clones from other species (e.g., *C. avellana*, *C. maxima* and some clones of *C. chinensis*; Figure 25). The involucre of *C. x vilmorinii*, shorter than that of *C. chinensis*, with slight constriction above the nut and sometimes open on the sides (Rehder 1926), seems intermediate between its two parents (*C. chinensis* and *C. avellana*), at least more than is *C. x colurnoides*.

The position of the hybrids in close proximity to one of the parents could be the result of the action of concerted evolution yielding a 5S DNA unit

more similar to that of one of the parents instead of a mixture of both parents. This could be the case for *C. x colurnoides*, where most of the clones of the hybrid occur with most of the clones of one of the parents, *C. colurna* (Figure 25). Such results have been observed in other studies (e.g., Hillis *et al.* 1991), which has led some authors to propose that concerted evolution is acting between loci (ITS of the 18S-5.8S-28S ribosomal multigene family in *Gossypium*, Wendel *et al.* 1995). It would be reckless to support such an assumption in *Corylus* since the presence of multiple loci has not yet been demonstrated via *in situ* hybridization. In addition, if multiple loci of 5S rDNA units occur in *Corylus*, the several disjunctions between clones in certain species leads us to think that there was probably no 5S rDNA unit interlocus concerted evolution in this genus. Study of allopolyploid *Gossypium* species, in which equal proportions of two genome (A and D) occur both in the natural and synthetic hybrids, have not demonstrated the presence of interlocus concerted evolution in 5S rRNA units (Cronn *et al.* 1996). Although not supported by the 5S DNA spacer sequences in *Corylus*, it is also possible that the sequences observed in hybrid taxa could be unique, resulting from the interactions between the genomes of their parents (Elder & Turner 1995).

1.4.4. BIOGEOGRAPHICAL INFERENCES

1.4.4.1. THE FOSSIL RECORD

The Betulaceae have an extensive fossil record. Although not as extensive as that of *Betula*, *Alnus* and *Carpinus*, fossils of genus *Corylus* are relatively well documented (see Appendix 1). The earliest fossil record of *Corylus* is known from the Maestrichtian of Scotland where a *Corylus* pollen type, *Triporopollenites*, is found (Muller 1981). Pollen of the *Triporopollenites* type also occurs in North America (mostly in the western part) from the Maestrichtian until the Upper Oligocene, and in the Paleocene of France (reviewed in Muller 1981 and Taylor 1990). However, the unequivocal assignation of *Triporopollenites* pollen to genus *Corylus* or to other members of subfamily Coryloideae (*Carpinus*, *Ostrya* and *Ostryopsis*) needs further

examination (Crane 1989). Pollen attributed to the genus *Corylus* itself is also well documented from the Paleocene to the Lower Oligocene of North America (reviewed in Taylor 1990).

Among the oldest macrofossils known for *Corylus*, are those found in the Paleocene of Scotland, Montana and Northwest Greenland (reviewed in Crane 1989). These *Corylus*-like fruits, lacking involucre bracts, are smaller than the usual *Corylus* fruits and could be mistaken for other angiosperm fruits (Crane 1989; Wehr 1995). *Corylus insignis* from the Paleocene of Montana is less equivocal, having an attachment scar on the nut similar to extant *Corylus* species (Brown 1962, in Crane 1989 and Taylor 1990). Fruits from the Eocene of Republic, Washington State, are the oldest fossils of *Corylus* found with closely associated involucre bracts (Wehr 1995; Wehr & Manchester 1996). Several fossils are also found from the Upper Cretaceous to the Miocene of China (Hsü 1983).

1.4.4.2. BIOGEOGRAPHICAL PATTERNS

The genus *Corylus* is distributed in the temperate regions throughout the Northern Hemisphere (Figure 21 and 26). Subgenus *Phylloclamys* is found in North America, Europe and Asia, subgenus *Siphonochlamys* in North America and Asia and subgenus *Acanthochlamys* is endemic to Asia. The genus *Ostryopsis* is also endemic to Asia.

Our analysis of the 5S DNA spacer indicates a likely Southeast Asian origin for the genus, the region in which *Corylus* is the most diversified. This hypothesis is supported by the sister relationship of the Asian species *C. ferox* (from the Asian endemic subgenus *Acanthochlamys*) to the remainder of genus *Corylus* (Figure 21). The three taxa of *Corylus* found in North America, *C. americana* from subgenus *Phylloclamys*, and the two subspecies of *C. cornuta* from subgenus *Siphonochlamys*, do not form a monophyletic group. Thus, the presence of these taxa of *Corylus* in North America requires two independent Asian - North American vicariance events.

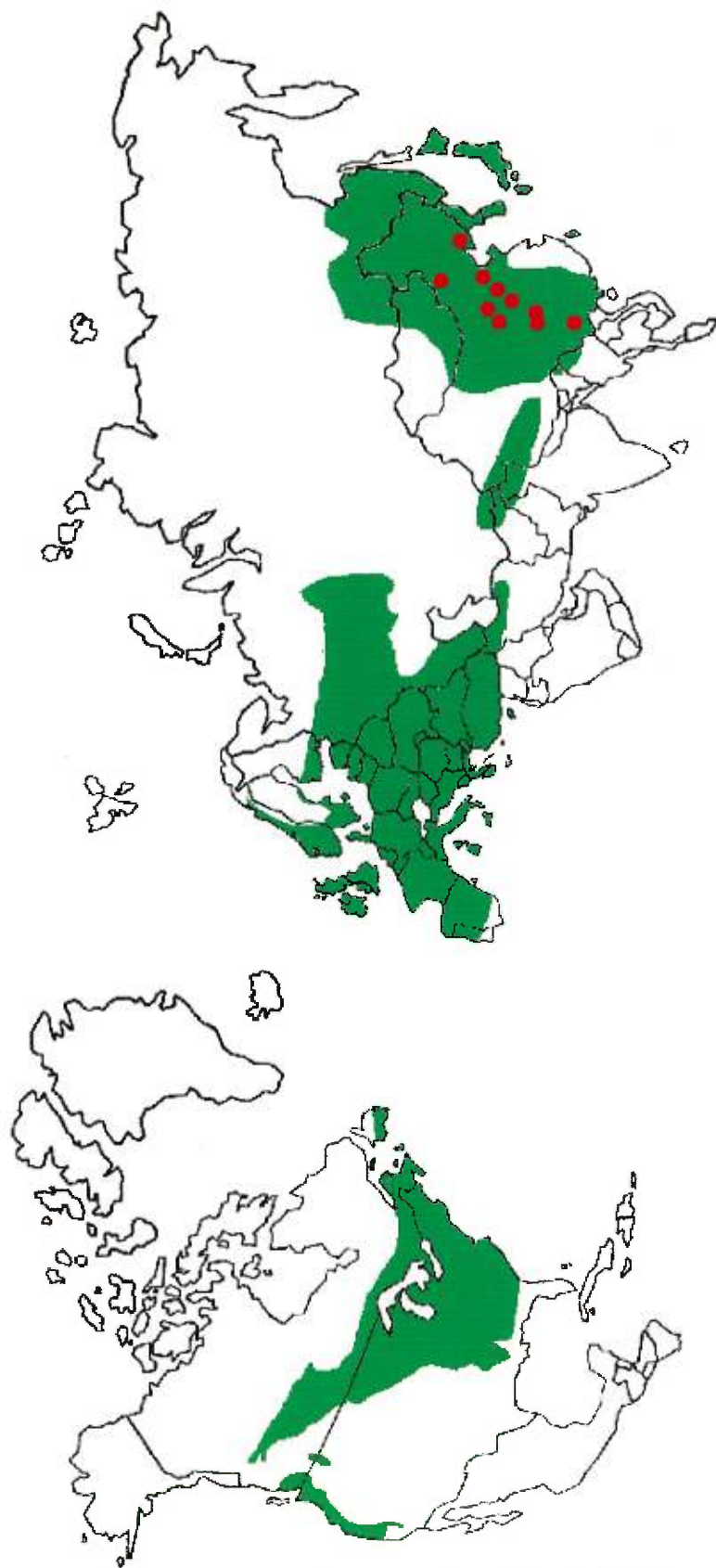


Figure 26. The actual worldwide distribution of the genus *Corylus* (in green) and of the genus *Ostryopsis* (in red). *Corylus* distribution after Bobrov (1936), Krüssmann (1976) and Furlow (1997). *Ostryopsis davidiana* and *O. nobilis* of The Flora of China website (www.mobot.org/MOBOT/TROPICOS/China/).

To explain the actual distribution of north temperate taxa such as *Corylus*, Wolfe (1969, 1977, cited by Tiffney 1985a) suggests that temperate taxa evolved in parallel, in Asia and North America, from ancestral taxa of the boreotropical flora that were spread throughout the Northern Hemisphere due to the warm temperatures in the first half of the Eocene. This option seems unlikely for the genus *Corylus*. If such a hypothesis were shown to be true, all North American hazel taxa would be expected to form a monophyletic group as would the eastern Asian taxa, which is not the case. The presence of *Corylus* in the Paleocene fossil record on all three continents of the Northern Hemisphere also tends to eliminate the possibility that *Corylus* species may be derived from ancestral taxa that were distributed throughout the Northern Hemisphere in the Eocene. The cladistic analyses of the 5S DNA spacer and morphological characters, suggest that the possibility of parallel evolution on different continents of species from a given subgenus is unlikely (e.g., subgenus *Siphonochlamys*; *C. cornuta* and *C. sieboldiana*). Other taxa with an eastern Asian – eastern North American distribution seem to have evolved at different times during the Tertiary, indicating that this pattern of distribution is not the result of a single event (Tiffney 1985a).

The third alternative proposed by Tiffney (1985a) implies the moving of taxa from one part of the Northern Hemisphere to another by use of land bridges during the Tertiary. Based on the results of the analysis of the 5S spacer and on the fossil record, the movement of taxa via land bridges seems to be the most probable mechanism to explain the present distribution of the genus *Corylus*. Hazels could have attained North America from Asia in two ways, via the Bering Land Bridge or via Europe and the North Atlantic Land Bridge.

The role played by the North Atlantic Land Bridge relative to the migration of *Corylus* species to North America is questionable. The absence of extant species of subgenus *Siphonochlamys* in Europe and western Asia eliminates the possibility that the ancestor of the *C. cornuta* subspecies could

have crossed from Asia to North America via Europe and the North Atlantic Land Bridge. It seems more likely that the ancestor of *C. cornuta* migrated through the Bering Land Bridge to reach North America from Asia.

The land bridge used by the ancestor of the eastern North American species *C. americana* (subgenus *Phylloclamys*) for its migration to North America is more difficult to determine. The discovery of a fossilized *Corylus*-like fruit from the Paleocene of Northwestern Greenland coupled with the eastern North American distribution of *C. americana*, may imply a migration of *Corylus* via the North Atlantic Land Bridge, knowing that this route was open in the late Paleocene until the end of the Eocene. The identification of this fruits and others found elsewhere (Scotland and Montana) is equivocal and could be attributed to other angiosperms (Crane 1989).

A fossil *Corylus* fruit with an involucre bract, found in the Eocene of Republic Flora of Washington, and attributed unequivocally to a species similar to *C. heterophylla* (Wehr 1995; Wehr & Manchester 1996), tends to support a passage via the Bering Land Bridge of the ancestral taxon of *C. americana*. Numerous other *Corylus* fossils found from the Paleocene to the Upper Oligocene of the Northwest Territories, British Columbia and central and western United States also tend to support this hypothesis. The migration of *C. americana* from Asia to North America is possible relative to the presence of the Bering Land Bridge through the Tertiary. The Bering Land Bridge was closed by climatic barriers only at the end of Tertiary and briefly in the first half of the Eocene.

It seems likely, as for the *C. cornuta* subspecies, that *C. americana* migrated to North America via the Bering Land Bridge. The fossil record (e.g., *Corylus*-fruit from the Republic Flora) and the fact that *C. americana* has less sequence divergence with species of the eastern Asian *C. heterophylla* complex than with the European species *C. avellana* support this hypothesis. The epicontinental seaway present on the North American continent during the Maestrichtian and the Paleocene blocked exchanges between eastern and western North America, but disappeared during the Paleocene (reviewed in

Tiffney 1985b), rendering possible the migration of *C. americana* to eastern North America.

The two vicariance events needed to explain the actual distribution of *Corylus* in North America may have occurred in parallel or at different times. The presence of *Corylus* in the fossil record of the Paleocene of North America suggests that these events occurred early in the Tertiary via the Bering Land Bridge. The presence of *Corylus* fossils in the Paleocene of Europe also suggests an early migration to Europe from Asia.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET ÉTUDES FUTURES

La revue de littérature et les analyses phylogénétiques exécutées avec des taxons fossiles combinées à l'étude de l'espaceur des gènes ribosomaux 5S chez les noisetiers ont pavé le chemin à de nouvelles études potentielles. Les analyses phylogénétiques entreprises au niveau de la famille des Betulaceae avec des caractères morphologiques qui permettent l'inclusion de taxons fossiles ont produit des résultats qui méritent d'être approfondis. En effet, dans le présent travail, les caractères utilisés provenaient uniquement de la littérature, ce qui limitait leur nombre. L'observation directe des fossiles décrits dans ces publications permettrait peut-être d'accroître la quantité des caractères servant à cette analyse, en plus de vérifier ceux déjà codés. L'examen des fossiles permettrait peut-être d'inclure des caractères foliaires. Une analyse cladistique plus exhaustive des genres actuels et éteint de la famille des Betulaceae pourrait apporter beaucoup de nouvelles informations quant à l'évolution des Betulaceae.

L'espaceur des gènes ribosomaux 5S s'est montré pertinent pour les analyses phylogénétiques au niveau intragénérique chez *Corylus*. Il a permis d'élaborer des hypothèses concernant les relations évolutives entre les différents sous-genres et entre les espèces, avec quelques exceptions cependant. L'espaceur 5S a également permis la formulation d'hypothèses au sujet de la répartition actuelle du genre *Corylus*, ainsi que les différents événements qui ont pu produire le patron biogéographique observé de nos jours.

Les questions soulevées par l'étude de l'espaceur 5S chez les noisetiers et par la phylogénie des Betulaceae sont toutes aussi intéressantes. La littérature ne semble pas faire mention d'aucune analyse cladistique incluant un représentant de chaque groupe infragénérique de chacun des genres de la famille des Betulaceae. Une telle analyse, utilisant le gène 5S et son espaceur, pourrait s'avérer pertinente tant au point de vue de la phylogénie des Betulaceae qu'au point de vue de l'organisation et de l'évolution des unités 5S de l'ADN ribosomal.

Le séquençage de 92 espaceurs 5S chez une quinzaine de taxons du genre *Corylus*, a révélé plusieurs caractéristiques méritant qu'on s'y attarde. La présence de structures particulières au début et à la fin de la séquence de l'espaceur pourraient jouer un rôle dans l'arrêt et l'initiation de la transcription du gène 5S, rôle attribué traditionnellement à des structures intragéniques chez les plantes. Il serait fort intéressant de vérifier si de telles structures se retrouvent de façon constante chez les autres genres de Betulaceae. La variation intragénomique observée chez toutes les espèces incluses dans l'analyse cladistique des noisetiers mèneront à un séquençage plus exhaustif de l'espaceur et du gène 5S chez plusieurs populations du *Corylus cornuta*, dans le but d'étudier plus en profondeur l'évolution de ces structures.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbe, E.C., 1935.** Studies in the phylogeny of the Betulaceae I. Floral and inflorescence anatomy and morphology. *The Botanical Gazette* 97:1-67.
- Abbe, E.C., 1938.** Studies in the phylogeny of the Betulaceae II. Extremes in the range of variation of floral and inflorescence morphology. *The Botanical Gazette* 99:431-469.
- Adanson, M., 1763.** *Famille des Plantes vol 2.*, Paris.
- Anderson, E. & E.C. Abbe, 1934.** A quantitative comparison of specific and generic differences in the Betulaceae. *Journal of the Arnold Arboretum* 15:43-49.
- Appels, R. & B. Baum, 1992.** Evolution of the *Nor* and 5S DNA loci in the Triticeae. In. *Molecular Systematics of Plants* (P.S. Soltis, D.E. Soltis & J.J. Doyle, eds.). Chapman and Hall, pp. 92-116.
- Baillon, H., 1877.** Castanéacées. In. *Histoire des Plantes, volume 6.*, Paris
- Barabé, D., Y. Bergeron & G. Vincent, 1987.** La répartition des caractères dans la classification des Hamamelididae (Angiospermae). *Canadian Journal of Botany* 65:1756-1767.
- Baum, B. & R. Appels, 1992.** Evolutionary change at the 5S DNA loci of species in the Triticeae. *Plant Systematic and Evolution* 183:195-208.
- Bebout, J.W., 1977.** Palynology of the Paleocene-Eocene Golden Valley Formation of western North Dakota. Ph.D. Diss. The Pennsylvania State University, University Park.
- Bobrov, E.G., 1936.** History and systematics of genus *Corylus* (en Russe). *Sovetskaia Botanica* 4:11-39.
- Bousquet, J., S.H. Strauss & P. Li, 1992.** Complete congruence between morphological and *rbcl*-based molecular phylogenies in birches and related species (Betulaceae). *Molecular Biology and Evolution* 9(6):1076-1088.
- Brown, R.W., 1962.** Paleocene floras of the Rocky Mountains and Great Plains. *United States Geological Survey Professional Paper* 375:1-119.

- Brown, G.R. & J.E. Carlson, 1997.** Molecular cytogenetics of the genes encoding 18S-5.8S-28S rRNA and 5S rRNA in two species of spruce (*Picea*). *Theoretical and Applied Genetic* 95:1-9.
- Brunner, F. & D.E. Fairbrothers, 1979.** Serological investigation of the Corylaceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 106:97-103.
- Burkill, I.H., 1899.** Cupuliferae : Betuleae. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 26:496-505.
- Chaney, R.W., 1927.** Geology and palaeontology of the Crooked River Basin, with special reference to the Bridge Creek flora. *Carnegie Institution of Washington Publication* 346:45-138.
- Chase, M.W., D.E. Soltis, R.G. Olmstead, D. Morgan, D.H. Les, B.D. Mishler, M.R. Duvall, R.A. Price, H.G. Hills, Y.-L. Qiu, K.A. Kron, J.H. Rettig, E. Conti, J.D. Palmer, J.R. Manhart, K.J. Sytsma, H.J. Michaels, W.J. Kress, K.G. Karol, W.D. Clark, M. Hedrén, B.S. Gaut, R.K. Jansen, K.-J. Kim, C.F. Wimpee, J.F. Smith, G.R. Furnier, S.H. Strauss, Q.-Y. Xiang, G.M. Plunkett, P.S. Soltis, S.M. Swensen, S.E. Williams, P.A. Gadek, C.J. Quinn, L.E. Eguiarte, E. Golenberg, G.H. Learn Jr., S.W. Graham, S.C.H. Barrett, S. Dayanandan & V.A. Albert, 1993.** Phylogenetic of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80:528-580.
- Chen, Z.-D., 1991.** Pollen morphology of the Betulaceae. *Acta phytotaxonomica Sinica* 29:494-503 (en chinois avec sommaire anglais).
- Chen, Z.-D., S.R. Manchester & H.-Y. Sun.** An integrated analysis of DNA sequences, morphology and paleobotany for the phylogenetic relationships of the Betulaceae. *Soumis*.
- Cox, A.V., M.D. Bennett & T.A. Dyer, 1992.** Use of the polymerase chain reaction to detect spacer size heterogeneity in plant 5S-rRNA gene clusters and to locate such clusters in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 83:684-690.
- Crane, P.R., 1981.** Betulaceous leaves and fruits from the British Upper Palaeocene. *Botanical Journal of the Linnean Society* 83:103-136.

- Crane, P.R., 1989.** Early fossil history and evolution of the Betulaceae. In *Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae, vol. 2 : 'Higher' Hamamelidae*, eds. P.R. Crane and S. Blackmore, Systematics Association Special Volume No. 40B, pp 87-116, Clarendon Press, Oxford.
- Crane, P.R. & S. Blackmore, 1989.** *Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae, vol. 1-2 : 'Higher' Hamamelidae*, Systematics Association Special Volume No. 40B. Clarendon Press, Oxford.
- Crane, P.R. & R.A. Stockey, 1987.** *Betula* leaves and reproductive structures from the Middle Eocene of British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Botany* 65:2490-2500.
- Crane, P.R., S.R. Manchester, & D.L. Dilcher, 1990.** A preliminary survey of fossil leaves and well-preserved reproductive structures from the Sentinel Butte Formation (Paleocene) near Almont, North Dakota. *Fieldiana, Geology, new series*, no. 20.
- Cronn, R.C., X. Zhao, A.H. Paterson & J.F. Wendel, 1996.** Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *Journal of Molecular Evolution* 42:685-705.
- Cronquist, A., 1981.** *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York.
- Cronquist, A. 1988.** *The evolution and classification of flowering plants*. 2nd ed. New York Botanical garden, New York.
- Dahlgren, R.M.T., 1980.** A revised system of classification of the angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society* 80:91-124.
- De Candolle, A., 1864.** *Corylaceae*. In *Prodromus Systematis Universalis Regni Vegetabilis*, XVI.2, pp. 124-133.
- Doyle J.J. & J.L. Doyle, 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19:11-15.
- Drumke, J.S., 1965.** A systematic survey of *Corylus* in North America. *Dissertation Abstracts* 25:4925-4926.
- Duke, J.A., 1989.** *Handbook of nuts*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Elder Jr., J.F. & B.J. Turner, 1995.** Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology* 70:297-320.
- Franchet, A, 1899.** *Plantarum Sinensium, Ecloge tertia, Corylus*. *Journal de Botanique* 13:197-208.
- Frederiksen, N.O., T.A. Ager & L.E. Edwards, 1988.** Palynology of Maestrichtian and Paleocene rocks, lower Coville River region, North Slope of Alaska. *Canadian Journal of Earth Science* 25:512-527.
- Fukui, K., Y. Kamisugi & F. Sakai, 1994.** Physical mapping of 5S rDNA loci by direct-cloned biotinylated probes in barley chromosomes. *Genome* 37:105-111.
- Furlow, J.J., 1990.** The genera of Betulaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 71:1-67.
- Furlow, J.J., 1997.** Betulaceae, Birch family. In *Flora of North America, north of Mexico, volume 3*, pp. 507-538. The Flora of North America Editorial Committee.
- Geiduschek, E.P. & G.P. Tocchini-Valentini, 1988.** Transcription by RNA polymerase III. *Annual Review of Biochemistry* 57:873-914.
- Gottlob-McHugh, S.G., M. Lévesque, K. MacKensie, M. Olson, O. Yarosh, & D.A. Johnson, 1990.** Organisation of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rRNA repeat structure in higher plants. *Genome* 33: 486-494.
- Graham, G.J., 1995.** Tandem genes and clustered genes. *Journal of Theoretical Biology* 175:71-87.
- Gruas-Cavagnetto, C., 1978.** Étude palynologique de l'Éocène du Bassin Anglo-Parisien. *Mémoires de la Société Géologique de France, Nouvelle Série* 56. Mémoire 131:1-64.
- Halanych, K.M., 1991.** 5S ribosomal RNA sequences inappropriate for phylogenetic reconstruction. *Molecular Biology and Evolution* 8:249-253.
- Hall, J.W., 1952.** The comparative anatomy and phylogeny of the Betulaceae. *Botanical Gazette* 113(3):235-270.

- Hardin, J.W. & J.M. Bell, 1986. Atlas of foliar surface features in woody plants, IX - Betulaceae of Eastern United States. *Brittonia* 38(2):133-144.
- Hartling, T.F., 1830. *Ordines Naturales Plantarum*.
- Hasebe, M., T. Omori, M. Nakazawa, T. Sano, M. Kato & K. Iwatsuki, 1995. *rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proceedings of the national academy of science USA* 91:5730-5734.
- Heer, O., 1859. *Flora tertiaria Helvetia - die tertiare Flora der Schweiz. III Winterthur*.
- Hemleben, V. & D. Werts, 1988. Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S rRNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Matthiola incana*). *Gene* 62:165-169.
- Hickey, L.J., 1977. Stratigraphy and paleobotany of the Golden Valley Formation (early Tertiary) of western North Dakota. *Geological Society of America Memoirs* 150:1-181.
- Hillis, D.M., C. Moritz, C.A. Porter & R.J. Baker, 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* 251:308-310.
- Hjelmqvist, H., 1948. Studies on the floral morphology and phylogeny of the Amentiferae. *Botaniska Notiser. Suppl.* 2, pp.5-171.
- Hopkins, W.S., Jr., 1969. Palynology of the Eocene Kitsilano Formation, southwest British Columbia. *Canadian Journal of Botany* 47:1101-1131.
- Hutchinson, J., 1967. The genera of flowering plants, vol 2 – Dicotyledons. Oxford at the Clarendon Press.
- Hsü, J., 1983. Late Cretaceous and Cenozoic vegetation in China, emphasizing their connections with North America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70:490-508.
- Jarzen, D.M. & G. Norris, 1975. Evolutionary significance and botanical relationships of Cretaceous angiosperm pollen in the western Canadian interior. *Geoscience and Man* 11:47-60.

- Johnson, D.A., C.-Y. Chan, S.G. Gottlob-McHugh, K. Mackensie, L. Marengère & M.C. Prud'homme, 1992.** Structure of the 5S rRNA genes in birch (*Betula papyrifera*) and alder (*Alnus incana*). *Genome* 35:337-341.
- Jury, S.L., 1978.** Betulaceae In *Flowering plants of the world* (ed. V.H. Heywood). p. 59-60. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Jussieu, A.L. de, 1789.** *Genera plantarum*. Paris.
- Källersjö, M., J.S. Farris, M.W. Chase, B. Bremer, M.F. Fay, C.J. Humphries, G. Petersen, O. Seberg & K. Bremer, 1998.** Simultaneous parsimony jackknife analysis of 2538 rbcL DNA sequences reveals support for major clades of green plants, land plants, seed plants, and flowering plants. *Plant Systematics and Evolution* 213:259-287.
- Kedves, M. & E.A. Stanley, 1976.** Electronmicroscopical investigation of the Normapolles group and some other selected European and North American pollen II. *Pollen & Spores* 18:105-127.
- Kellogg, E.A. & R. Appels 1995.** Intraspecific and interspecific variation in 5S RNA genes are decoupled in diploid wheat relatives. *Genetics* 140:325-343.
- Kellogg, E.A. & N.D. Juliano, 1997.** The structure and function of RuBisCo and their implications for systematic studies. *American Journal of Botany* 84:413-428.
- Kikuzawa, K., 1982.** Leaf survival and evolution in Betulaceae. *Annals of Botany* 50:345-353.
- Koch, B.E., 1978.** Some fossil angiospermous fruits from the Danian of west Greenland. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg* 30, 47-53.
- Krüssmann, G., 1976.** *Manual of cultivated broad-leaves trees and shrubs*. Timber Press, Beaverton OR.
- Kubitzki, K., 1993.** Betulaceae In *The families and genera of vascular plants vol 2*. (eds. K. Kubitzki, J.G. Rohwer & V. Brittrich). Springer-Verlag, Berlin.
- Kuprianova, L.A., 1963.** On a hitherto undescribed family belonging to the Amentiferae. *Taxon* 12:12-13.

- Laurent, L., 1912.** Flore fossile des Schistes de Menat (Puy-de-Dôme). Annales du Musée d'Histoire Naturelle de Marseille, Géologie, 14:1-246.
- LeMaout, E. & J. Decaisne, 1868.** *Traité général de botanique descriptive et analytique*. Firmin Didot frères, fils et cie. Paris.
- Levinson, G. & G.A. Gutman, 1987.** Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4:203-221.
- Lloyd, D.G. & V.L. Calder, 1991.** Multi-residue gaps, a class of molecular characters with exceptional reliability for phylogenetic analyses. *Journal of Evolutionary Biology* 4:9-21.
- Long, E.O. & I.B. Dawid, 1980.** Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* 43:727-764.
- Maddison, W.P. & D.R. Maddison, 1992.** *MacClade, Analysis of phylogeny and character evolution, version 3*. Sinauer Associates inc, Sunderland, MA, USA
- Manchester, S.R. & P.R. Crane, 1987.** A new genus of Betulaceae from the Oligocene of western North America. *The Botanical Gazette* 148:263-273
- Manchester S.R. & S.-X. Guo, 1996.** *Palaeocarpinus* (extinct Betulaceae) from the northwestern China: new evidence for Paleocene floristic continuity between Asia, North America, and Europe. *International Journal of Plant Sciences* 157:240-246.
- Manchester, S.R. & Z.-D. Chen, 1996.** *Palaeocarpinus aspinosa* sp. nov. (Betulaceae) from the Paleocene of Wyoming, U.S.A. *International Journal of Plant Science* 157:644-655.
- Manchester, S.R. & Z.-D. Chen 1998.** A new genus of Coryloideae (Betulaceae) from the Paleocene of North America. *International Journal of Plant Sciences* 159:522-532.
- Manos, P.S., K.C. Nixon & J.J. Doyle, 1993.** Cladistic analysis of restriction site variation within the chloroplast DNA inverted repeat region of selected Hamamelididae. *Systematic Botany* 18: 551-562.

- Manos, P.S. & K.P. Steele, 1997.** Phylogenetic analyses of "Higher" Hamamelididae based on plastid sequence data. *American Journal of Botany* 84:1407-1419.
- Marchuk, D., M. Drumm, A. Saulino & F.S. Collins, 1990.** Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research* 19:1154.
- McDade, L.A., 1992.** Hybrids and phylogenetic systematics II. The impact of hybrids on cladistic analysis. *Evolution* 46:1329-1346.
- McIntyre, C.L., B. Winberg, K. Houchins, R. Appels & B.R. Baum, 1992.** Relationships between *Oryza* species (Poaceae) based on 5S DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution* 183:249-264.
- Miki, A., 1977.** Late Cretaceous and spore floras of Northern Japan: composition and interpretation. With appendix : the list of late Cretaceous pollen and spores of Northern Japan. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Serie IV, Geology and Mineralogy* 17:399-437.
- Moran, G.F., D. Smith, J.C. Bell & R. Appels, 1992.** The 5S RNA genes in *Pinus radiata* and the spacer region as a probe for relationships between *Pinus* species. *Plant Systematic and Evolution* 183:209-221.
- Morton, D.G. & K.U. Sprague, 1984.** *In vitro* transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 81:5519-5522.
- Mukai, Y., T.R. Endo & B.S. Gill, 1990.** Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *The Journal of Heredity* 81:290-295.
- Muller, J., 1981.** Fossil pollen records of extant Angiosperms. *The Botanical Review* 47:1-142.
- Nelson, D.W., R.M. Linning, P.J. Davison & B.M. Honda, 1998.** 5'-flanking sequence required for efficient transcription in vitro of 5S RNA genes, in the related nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Gene* 218:9-16.

- Nickrent, D.L. & D.E. Soltis, 1995.** A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rDNA and *rbcL* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82:208-234.
- Nielsen, J.N., C. Hallenberg, S. Frederiksen, P.D. Sorensen & B. Lomholt, 1993.** Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence. *Nucleic Acids Research* 21:3631-3636.
- Nixon, K.C., 1989.** Origins of Fagaceae. In *Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae, vol. 2 : 'Higher' Hamamelidae*, eds. P.R. Crane and S. Blackmore, Systematics Association Special Volume No. 40B, pp. 23-43, Clarendon Press, Oxford.
- Norris, G., 1986.** Systematic and stratigraphic palynology of Eocene to Pliocene strata in the Imperial Nuktak C-22 well, Mackenzie Delta region, District of Mackenzie, N.W.T.. *Bulletin of the Geological Survey of Canada* 340:1-89.
- Norton, H.J. & J.W. Hall, 1969.** Palynology of the Upper Cretaceous and Lower Tertiary in the type locality of the Hell Creek Formation, Montana, U.S.A.. *Palaeontographica, Abt. B, Palaeophytology* 125:1-64.
- Oltz, D.F., Jr., 1969.** Numerical analyses of palynological data from Cretaceous and early Tertiary sediments in east central Montana. *Palaeontographica, Abt. B, Palaeophytology* 128:90-166.
- Page, V.M., 1970.** Angiosperm wood from the Upper Cretaceous of central California, III. *American Journal of Botany* 57:1139-1144
- Page, V.M., 1980.** Dicotyledonous wood from the upper Cretaceous of central California, II. *Journal of the Arnold Arboretum* 61:723-748.
- Piel, K.M., 1971.** Palynology of Oligocene sediments from central British Columbia. *Canadian Journal of Botany* 49:1885-1920.
- Playford, J., R. Appels & B.R. Baum, 1992.** The 5S DNA units of *Acacia* species (Mimosaceae). *Plant Systematics and Evolution* 183:235-247.
- Prantl, K., 1894.** Betulaceae In. A. Engler, *Die natürlichen pflanzenfamilien*

- Rafalski, J.A., M. Wiewiorowski & D. Söll, 1982.** Organization and nucleotide sequence of nuclear 5S rRNA genes in yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Nucleic Acids Research* 10:7635-7642.
- Reddy, P. & R. Appels, 1989.** A second locus for the 5S multigene family in *Secale* L.: sequence divergence in two lineages of the family. *Genome* 32:456-467.
- Rehder, A., 1926.** New species varieties and combinations from the Herbarium and the collections of the Arnold Arboretum. *Journal of the Arnold Arboretum* 7:145-149.
- Regel, E. 1868.** Betulaceae In *Prodromus Systematis Universalis Regni Vegetabilis*, XVI.2, pp. 161-189.
- Rendle, A.B., 1925.** *The classification of flowering plants. Vol. 2 – Dicotyledones.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Rosengarten Jr, F. 1984.** *The book of edible nuts.* Walker and Company, New York.
- Rouse, G.E., 1977.** Paleogene palynomorph ranges in western and northern Canada. *American Association of Stratigraphy and Palynology, Contr. Ser.* 5A:48-65.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis, 1989.** *Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Saporta, G. & A.F. Marion, 1885.** *L'évolution du Règne végétal; volume 2, Phanérogames.* Paris, Alcan.
- Sastri, D.C., K. Hilu, R. Appels, E.S. Lagudah, J. Playford, & B.R. Baum, 1992.** An overview of evolution in plant 5S DNA. *Plant Systematics and Evolution* 183:169-181.
- Savard, L., M. Michaud & J. Bousquet, 1993.** Genetic diversity and phylogenetic relationships between birches and alders using ITS, 18S rRNA, and rbcL gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2:112-118.

- Schneeberger, R.G. & C.A. Cullis, 1992.** Intraspecific 5S rRNA gene variation in flax, *Linum usitatissimum* (Linaceae). *Plant Systematics and Evolution* 183:265-280.
- Scoles, G.J., B.S. Gill, Z.-Y. Xin, B.C. Clarke, C.L. McIntyre, C. Chapman & R. Appels, 1988.** Frequent duplication and deletion events in the 5S RNA genes and the associated spacer regions of the Triticeae. *Plant Systematics and Evolution* 160:105-122.
- Seward, A.C. & R.E. Holltum, 1924.** Tertiary plants from Mull. In *Tertiary and Post-Tertiary geology of Mull, Loch Aline and Oban. Memoirs of the Geological Survey of Scotland* (eds. E.B. Bailey *et al.*), pp. 67-90. HMSO, Edinburgh.
- Soltis, D.E., P.S. Soltis, D.L. Nickrent, L.A. Johnson, W.J. Hahn, S.B. Hoot, J.A. Sweere, R.K. Kuzoff, K.A. Kron, M.W. Chase, S.M. Swensen, E.A. Zimmer, S.-M. Chaw, L.J. Gillespie, W.J. Kress & K.J. Systma, 1997.** Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84:1-49.
- Spach, E., 1841.** Revisio Betulacearum. *Annales des Sciences Naturelles II* 15:182-212.
- Spach, E., 1842a.** Notes sur les *Corylus*. *Annales des Sciences Naturelles II*, 16:98-108.
- Spach, E., 1842b.** Notes sur les *Ostrya*. *Annales des Sciences Naturelles II*, 16:243-248.
- Spach, E., 1842c.** Notes sur les *Carpinus*. *Annales des Sciences Naturelles II*, 16:248-254.
- Srivastava, S.K., 1975.** Maastrichtian microspore assemblages from the interbasaltic lignites of Mull, Scotland. *Palaeontographica B* 150:125-156.
- Stanley, E.A., 1965.** Upper Cretaceous and Paleocene plant microfossils and Paleocene dinoflagellates and hystrichosphaerids from northwestern South Dakota. *Bulletins of American Paleontology* 49:179-378.

- Steele, K.P., K.E. Holsinger, R.K. Jansen & D.W. Taylor, 1991.** Assessing the reliability of 5S rRNA sequence data for phylogenetic analysis in green plants. *Molecular Biology and Evolution* 8:240-248.
- Straus, A., 1969.** Beiträge zur Kenntnis der Pliozänflora von Willershausen (VII) - Die Angiosperm - Früchte und Samen. *Argumenta Palaeobotanica* 3:163-197.
- Sun, F. & R.A. Stockey 1992.** A new species of *Palaeocarpinus* (Betulaceae) based on inflorescences, fruits, and associated staminate inflorescences and leaves from the Paleocene of Alberta, Canada. *International Journal of Plant Sciences* 153:136-146.
- Swofford, D.L., 1998.** *PAUP : Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, 4.0 test versions. Champaign : Illinois Natural History Survey.
- Tanai, T., 1972.** Tertiary history of vegetation in Japan. In. *Floristics and paleofloristics of Asia and eastern North America* (ed. A. Graham), pp. 235-255. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New-York.
- Taylor, D.W., 1990.** Paleobiogeographic relationships of Angiosperms from the Cretaceous and early Tertiary of the North American area. *The Botanical Review* 56:279-417.
- Takhtajan, A.L., 1980.** Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *The Botanical Review* 46:225-359.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D.G. Higgins, 1997.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.
- Thorne, R.F., 1983.** Proposed new realignments in the angiosperms. *Nordic Journal of Botany* 3:85-117.
- Tiffney, B.H., 1985a.** Perspectives on the origin of the floristic similarity between Eastern Asia and Eastern North America. *Journal of the Arnold Arboretum* 66:73-94.

- Tiffney, B.H., 1985b.** The Eocene North Atlantic Land Bridge : its importance in Tertiary and modern phytogeography of the Northern Hemisphere. *Journal of the Arnold Arboretum* 66:243-273.
- Tyler, B.M, 1987.** Transcription of *Neurospora crassa* 5S rRNA genes requires a TATA box and three internal elements. *Journal of Molecular Evolution* 196:801-811.
- Udovicic, F., G.I. McFadden & P.Y. Ladiges, 1995.** Phylogeny of *Eucalyptus* and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4:247-256.
- Venkateswarlu, K., S.-W. Lee & R.N. Nazar, 1991.** Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene* 105:249-253.
- Warming, E., 1904.** *A handbook of systematic botany.* George Allen and Unwin ltd., London.
- Wehr, W.C., 1995.** Early Tertiary flowers, fruits, and seeds of Washington State and adjacent areas. *Washington Geology* 23:3-16.
- Wehr, W.C. & S.R. Manchester, 1996.** Paleobotanical significance of Eocene flowers, fruits, and seeds from Republic, Washington. *Washington Geology* 24:25-27.
- Wendel, J.F., A. Schnabel & T. Seelanan, 1995.** Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92:280-284.
- Whitcher, I.N. & J. Wen, 1998.** Phylogeny and biogeography of *Corylus* L. (Betulaceae): inference from the ITS sequence data (abstract). *American Journal of Botany* 85(6, suppl.):166-167.
- Winkler, H., 1904.** Betulaceae. In A. Engler, *Das Pflanzenreich. Regni vegetabilis conspectus*, 19 (IV, 61).
- Wolfe, J.A., 1969.** Neogene floristic and vegetational history of the Pacific Northwest. *Madroño* 20:83-110.

- Wolfe, J.A., 1977.** Paleogene floras from the Gulf of Alaska region. United States Geological Survey Professional Paper 997:1-108.
- Wolfe, J.A. & W. Wehr, 1987.** Middle Eocene dicoyledonous plants from Republic, northeastern Washington. United States Geological Survey Bulletin 1597:1-26.
- Wu, Z., 1983.** On the significance of pacific intercontinental discontinuity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70:577-590.
- Zimmer, E.A., S.L. Martin, S.M. Beverley, Y.W. Kan & A.C. Wilson, 1980.** Rapid duplication and loss of genes coding for the α chains of hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 77(4) : 2158-2162.

Annexe 1

Liste des fossiles du genre *Corylus*

Annexe 1. Liste des fossiles du genre *Corylus* et de quelques genres éteints affiliés (Abréviations : TNO, Territoires-du-Nord-Ouest; CB, Colombie-Britannique; USA, États-Unis d'Amérique; ds, cité dans).

Fossiles	Localités	Périodes	Structures	Références
<i>Tripoporollenites mullensis</i>	Écosse	Maestrichtien	Pollen	Srivastava 1975 ds Muller 1981
<i>T. robustus</i> , <i>T. spackmanii</i> , <i>T. costatus</i> , <i>T. nointelensis</i>	France	Paléocène / Éocène inférieur	Pollen	Gruas-Cavagnetto 1978 ds Muller 1981
Type <i>Corylus</i>	Republic Flora, Washington, USA	Éocène	Fruits avec involucre	Wehr 1995, Wehr & Manchester 1996
Type <i>Corylus</i>	Mull, Écosse; Montana, USA; NO Groenland	Paléocène	Fruit sans involucre	Seward & Hollum 1924, Brown 1962 et Koch 1978 ds Crane 1989
<i>Tripoporollenites</i>	Canada TNO	Oligocène supérieur	Pollen	Norris 1986 ds Taylor 1990
<i>Tripoporollenites</i>	Canada TNO	Oligocène supérieur	Pollen	Norris 1986 ds Taylor 1990
<i>Corylus</i>	Canada CB	Oligocène inférieur	Pollen	Piel 1971 ds Taylor 1990
<i>Corylus</i>	Canada CB	Éocène supérieur	Pollen	Hopkins 1969 ds Taylor 1990
<i>Tripoporollenites</i>	Canada TNO	Éocène moyen	Pollen	Norris 1986 ds Taylor
<i>Corylus</i>	Dakota Nord, USA	Éocène inférieur	Pollen	Bebout 1977 ds Taylor 1990
<i>Tripoporollenites robustus</i>	Mississippi, USA	Éocène inférieur	Pollen	Kedves & Stanley 1976 ds Taylor 1990
<i>Tripoporollenites</i>	Arkansas, USA	Paléocène	Pollen	Frederiksen <i>et al.</i> 1988 ds Taylor 1990
<i>Corylus</i>	Dakota Nord, USA	Paléocène	Feuilles	Brown 1962 ds Taylor 1990
<i>Corylus granilabrata</i>	Dakota Sud, USA	Paléocène	Pollen	Stanley 1965 ds Taylor 1990 et ds Crane 1989
<i>Corylus</i>	Montana, USA	Paléocène	Pollen	Brown 1962 ds Taylor 1990
<i>Corylus insignis</i>	Fort Union Formation, Montana, USA	Paléocène	Fruits	Brown 1962 ds Taylor 1990 et ds Crane 1989
<i>Corylus</i>	Montana, USA	Paléocène	Fleurs ?	Brown 1962 ds Taylor
<i>Tripoporollenites</i>	Montana, USA	Paléocène	Pollen	Norton & Hall 1969 ds Taylor 1990
<i>Tripoporollenites</i>	Montana, USA	Paléocène	Pollen	Oltz 1969 ds Taylor 1990
<i>Corylus</i>	Wyoming, USA	Paléocène	Feuilles	Brown 1962 ds Taylor 1990
<i>Tripoporollenites mullensis</i>	Canada TNO	Paléocène	Pollen	Rouse 1977 ds Taylor 1990
<i>Corylus</i>	Dakota Nord, USA	Paléocène	Pollen	Bebout 1977 ds Taylor 1990
<i>Corylus</i>	Dakota Nord, USA	Paléocène	Feuilles	Hickey 1977 ds Taylor 1990
<i>Corylus</i>	Dakota Nord, USA	Paléocène	Fleurs ?	Hickey 1977 ds Taylor 1990
<i>Tripoporollenites mullensis</i>	Canada TNO	Paléocène	Pollen	Rouse 1977 ds Taylor 1990

Annexe 1. (suite)

Fossiles	Localités	Périodes	Structures	Références
<i>Triporopollenites</i>	Arkansas, USA	Maestrichtien	Pollen	Frederiksen <i>et al.</i> 1988 ds Taylor 1990
<i>Corylocarpinus</i>	Willershausen, Allemagne	Pliocène	Fruits	Strauss 1969 ds Crane 1989
<i>Corylus</i>	Nord-Est Chine	Crétacé supérieur	Non-mentionnée	Hsü 1983
<i>Corylus</i>	Fushun, Nord-Est Chine	Éocène supérieur	Non-mentionnée	Hsü 1983
<i>Corylus</i>	Jiangxi, Chine centrale	Paléocène	Non-mentionnée	Hsü 1983
<i>Corylus</i>	Jiangsu, Zhejiang, Fujian, Est Chine	Paléocène -Éocène	Non-mentionnée	Hsü 1983
<i>Corylus</i>	Xinjiang, Qinghai, Gansu, Nord-Ouest Chine	Miocène	Non-mentionnée	Hsü 1983
<i>Corylus</i>	Shandong, Nord-Est & Nord Chine	Miocène supérieur	Non-mentionnée	Hsü 1983
<i>Corylus</i>	Centre & Est Chine	Miocène	Non-mentionnée	Hsü 1983

Annexe 2

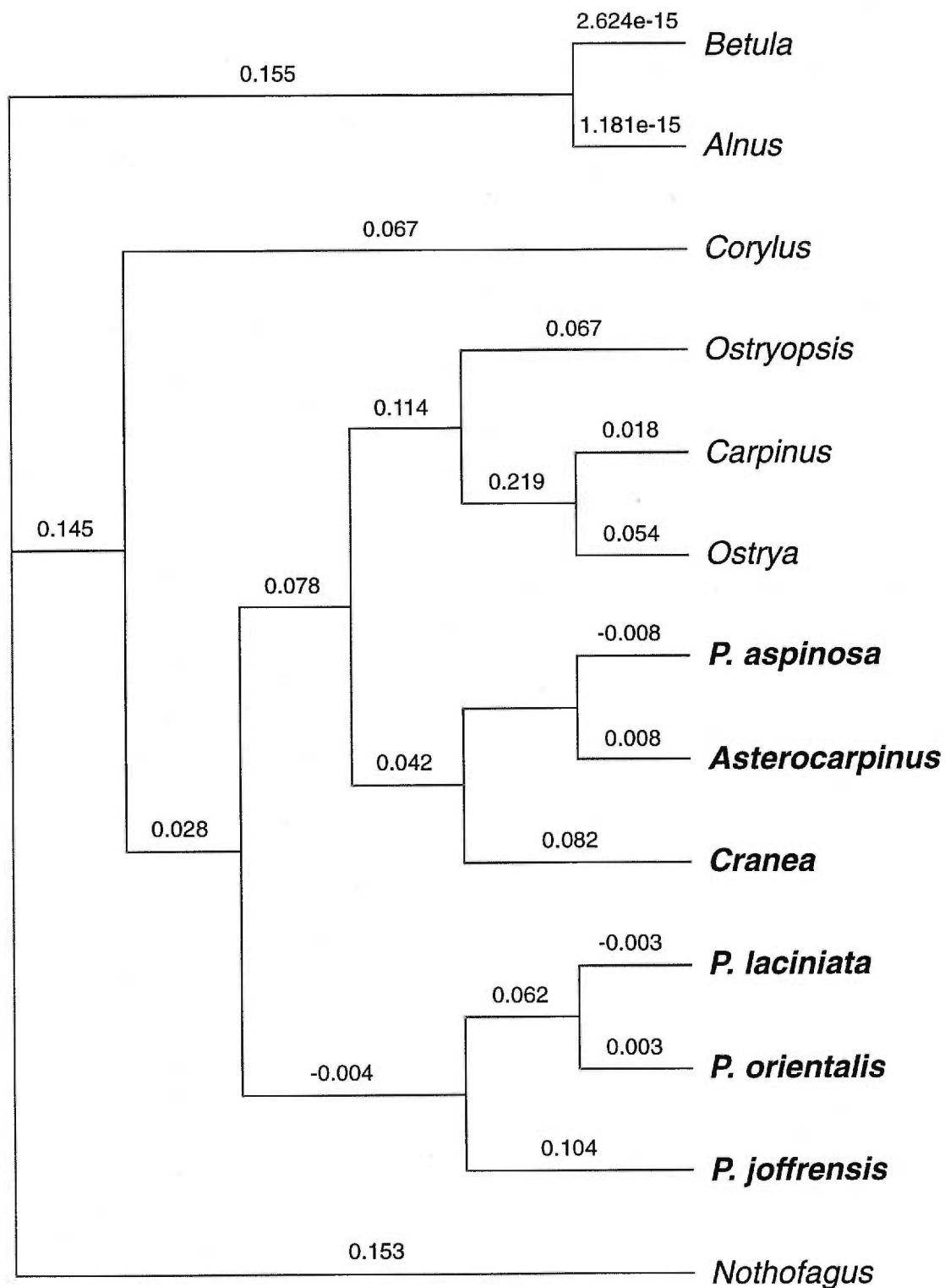
Table des distances moyennes et absolues des
taxons de l'analyse phylogénétique des
Betulaceae incluant des genres fossiles

Annexe 2. Distances entre les taxons actuels et fossiles utilisés dans l'analyse phylogénétique de la famille des Betulaceae incluant certains genres fossiles. Les distances moyennes sont présentées au-dessus de la diagonale et les distances absolues sous la diagonale. (Calculées à l'aide de PAUP 3.0, "Distance matrix").

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1-Betula	-	0,000	0,357	0,571	0,857	0,929	0,500	0,333	0,429	0,286	0,375	0,667	0,308
2-Alnus	0	-	0,357	0,571	0,857	0,929	0,500	0,333	0,429	0,286	0,375	0,667	0,308
3-Corylus	5	5	-	0,214	0,500	0,571	0,375	0,167	0,286	0,143	0,250	0,333	0,385
4-Ostryopsis	8	8	3	-	0,286	0,357	0,500	0,333	0,429	0,286	0,250	0,333	0,538
5-Carpinus	12	12	7	4	-	0,071	0,500	0,500	0,286	0,429	0,625	0,500	0,692
6-Ostrya	13	13	8	5	1	-	0,375	0,667	0,429	0,571	0,500	0,333	0,769
7-P. aspinosa	4	4	3	4	4	3	-	0,200	0,167	0,333	0,143	0,000	0,571
8-P. laciniata	2	2	1	2	3	4	1	-	0,167	0,000	0,333	0,200	0,333
9-P. joffrensis	3	3	2	3	2	3	1	1	-	0,167	0,429	0,400	0,571
10-P. orientalis	2	2	1	2	3	4	2	0	1	-	0,429	0,200	0,500
11-Cranea	3	3	2	2	5	4	1	2	3	3	-	0,200	0,429
12-Asterocarpinus	4	4	2	2	3	2	0	1	2	1	1	-	0,500
13-Nothofagus	4	4	5	7	9	10	4	2	4	3	3	3	-

Annexe 3

Arbre résultant de l'analyse *Neighbor Joining* de
la famille des Betulaceae incluant tous les
taxons fossiles



Annexe 3. Arbre résultant de l'analyse *Neighbor Joining* de la famille des Betulaceae incluant tous les taxons fossiles (utilisant les distances moyennes). Les nombres au-dessus des branches sont la longueur de ces dernières. Les taxons fossiles sont en caractères gras.