

Délimitation taxonomique et étude de la biologie de la reproduction du genre africain *Cyrtorchis* Schltr. (Orchidaceae)

Thèse présentée par Laura Azandi Ngnintedem

en vue de l'obtention du grade académique de *Docteur/Ph.D.* en *Biologie des Organismes Végétaux spécialité Botanique et Ecologie* (Université de Yaoundé I) et de *Docteur en Sciences* (Université Libre de Bruxelles)

Année académique 2020-2021

Sous la direction du Professeur Bonaventure Sonké, promoteur
(Université de Yaoundé I),
du Docteur Vincent Droissart, co - promoteur
(Institut de Recherche pour le Développement)

et du Professeur Olivier Hardy, promoteur
(Université Libre de Bruxelles),
du Docteur Tariq Stévant, co - promoteur
(Jardin Botanique du Missouri/Université Libre de Bruxelles)

Jury de thèse :

Patrick Mardulyn (Président)	(Université Libre de Bruxelles, Belgique)
Pierre Meerts (Secrétaire)	(Université Libre de Bruxelles, Belgique)
Olivier Hardy (Promoteur)	(Université Libre de Bruxelles, Belgique)
Bonaventure Sonké (Promoteur)	(Université de Yaoundé I, Cameroun)
Tariq Stévant (Co-promoteur)	(Jardin Botanique du Missouri/Université Libre de Bruxelles, Belgique)
Vincent Droissart (Co-promoteur)	(Institut de Recherche pour le Développement, France)
Timothée Le Péchon (Examineur)	(Meise Botanic Garden, Belgique)
Louis Zapfack (Examineur)	(Université de Yaoundé I, Cameroun)

DEDICACE

Je dédie cette thèse
*à mes parents **Felix et Esther Ngintedem***
*et à ma fille **Datchieu Monthé Adrielle Faustine***
pour tout l'amour et les encouragements indéfectibles.

REMERCIEMENTS

Au terme de cette formidable aventure de thèse parsemée d'embûches, grande est mon émotion en ce moment où je m'apprête à dire mille mercis à toutes ces merveilleuses personnes qui de prêt et de loin ont œuvré pour l'aboutissement de ces longues années d'études. Vous trouverez en ces quelques lignes, l'expression de ma profonde gratitude.

Mes premiers remerciements vont logiquement à l'endroit de mes promoteurs, les initiateurs de ce projet de thèse : les Drs. **DROISSART Vincent** et **STEVART Tariq** et le Prof. **SONKE Bonaventure**. Ils ont cru en moi et en me donnant l'opportunité de réaliser ce projet de thèse, j'espère avoir été à la hauteur de vos attentes...

Tout d'abord à **Vincent DROISSART**, pour avoir accepté d'encadrer une jeune étudiante désespérément à la recherche d'un stage pour la finalisation de son master en janvier 2014. Je te suis entièrement reconnaissante d'avoir accepté de m'accompagner depuis ce mémoire de master jusqu'à l'aboutissement de cette thèse. Merci pour l'initiation à la vie, la systématique et la biologie des orchidées. Le temps passant, je pèse le poids de ces nombreux sacrifices consentis à mon égard, surtout les innombrables relectures de rapports et d'articles et aussi l'accompagnement pour les missions de terrain. Je reconnais surtout ta rigueur et ton souci du travail bien fait, j'espère avoir honoré tes espérances.

A toi **Tariq STEVART**, je ne te dirai jamais assez merci pour tout ce que tu m'as apporté sur le plan humain et surtout scientifique. Merci pour ta participation à mon encadrement depuis mon master et de m'avoir donné l'opportunité de continuer la recherche à travers une thèse. Je reconnais également ta rigueur et ton fouet qui n'était toujours pas loin lorsque je dérapais (comme quoi qui aime bien, châtie bien ! ^^). Merci, surtout, pour ton humour légendaire et ta bonne humeur, particulièrement, lorsque j'avais le moral au talon ! Merci pour tes paroles réconfortantes et tes nombreux conseils scientifiques durant ces années intenses d'apprentissage.

Au Prof. **SONKE Bonaventure**, qui sans me connaître m'a ouvert les portes du Laboratoire de Botanique Systématique et d'Ecologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé (LaBosystE) depuis mars 2014. Je vous remercie très sincèrement pour la gestion efficace de toutes les lourdes procédures administratives à l'Université de Yaoundé I, malgré vos multiples occupations. Je vous suis également reconnaissante pour les encouragements et les conseils pendant les moments de difficultés traversés au cours de cette thèse.

Un tout grand merci à Dr. **Olivier HARDY**, pour avoir accepté de Co-encadrer ce travail de thèse et d'avoir facilité mon inscription à l'Université Libre de Bruxelles (ULB) d'abord au Certificat International

de formation à la Recherche Doctorale (CIRD) pour mes séjours en Belgique et ensuite à la Faculté des Science de l'ULB. Merci pour ta disponibilité malgré tes nombreuses charges.

J'adresse ma profonde gratitude au Dr. **SIMO-DROISSART Murielle** pour sa disponibilité, sa pédagogie, ses critiques constructives et ses nombreuses relectures attentives des articles produits durant cette thèse. Merci « grande sœur » pour les heures de discussion et tes conseils qui m'ont permis d'améliorer ce travail.

Merci aussi aux différents membres de mon comité d'accompagnement : Prof. **MEERTS Pierre** et Dr. **MARDULYN Patrick**, pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail, même si le comité de thèse n'a pu se faire qu'une seule fois.

Ce travail a également bénéficié de l'apport scientifique, matériel et moral de plusieurs autres personnes de divers horizons et d'environnements de travail.

J'adresse ma sincère gratitude aux différents curateurs et personnels des herbaria visités ou non (BAS, BM, BOL, FHI, BR, BRLU, GDA, K, LISC, LISU, LY, MA, MO, MPU, P, UCJ, WAG, et YA) pour la mise à disposition de leurs collections à travers des prêts et pour m'avoir permis de profiter des facilités disponibles dans leurs institutions pour la consultation des spécimens. Un grand merci à l'équipe de suivi et d'entretien des ombrières, particulièrement à Jean Philippe Biteau de l'ombrière à orchidées JardiGab au Gabon pour la collecte d'échantillons pour ce travail.

Je remercie chaleureusement tous les membres du LaBosystE pour l'accueil, les conseils et pour les bons moments partagés, je pense à mes « grands » Drs. Libalah et Momo pour leurs encouragements, conseils et apports indéniables dans ce travail surtout pour les analyses statistiques. À l'équipe « orchidées » du labo notamment Gyslène, Sandrine, Lydie, Narcisse pour l'accueil, la formation, l'aide et l'entretien de l'ombrière à orchidées de Yaoundé qui permis de produire un grand nombre de matériels et de données utilisées dans ce travail de thèse. Je n'oublie pas les autres membres qui ont contribué à leur manière à mon épanouissement et mon bien-être dans le labo à savoir : Herman, Lyse, Donatien, Gislain, Suzanne, Felix, Francine, Le Bienfaiteur, Nelly, Dubrel. Merci également à Marie Savignac pour sa disponibilité et son coup de main sur le terrain dans le Dja et au laboratoire pour l'analyse et le visionnage des vidéos de suivi des pollinisateurs. Je pense aussi à Lydie, Merci « ma petite ^^ » pour ton accompagnement et ton dynamisme dans la collecte des données sur le terrain et à l'ombrière. Vous avez été de très bonnes co-équipières !

Merci également à Dr. Vincent DEBLAUWE pour ces longues journées de formation à l'utilisation et la gestion des caméras Raspberry Pi (ça en valait la peine !) même si ça n'a pas été facile pour vous deux les Vincent ! Merci également pour les scans des spécimens d'herbiers réalisés lors de ta visite au

Forest Herbarium of Ibadan (FHI) au Nigéria et pour m'avoir permis d'utiliser ton jardin pour le suivi des pollinisateurs.

Je voudrais également exprimer ma gratitude au Dr. ROUGERIE Rodolphe, Entomologiste et spécialiste de la famille de Sphingidae au Muséum d'Histoire Naturelle de Paris pour son aide à l'identification des insectes pollinisateurs.

Je souhaite aussi remercier l'Unité Mixte de Recherche (UMR) botanique et bioinformatique de l'Architecture des Plantes l'UMR AMAP à Montpellier pour l'accueil au sein de l'équipe et tous les moyens logistiques mis en place lors de mes séjours pour la réalisation de cette thèse. J'ai une pensée particulière pour les Drs. Pierre COUTERON et Raphaël PELISSIER sans qui mes séjours à Montpellier n'auraient pas été possibles.

Mes remerciements vont également à l'endroit de mes collègues et amis de l'équipe de BRLU notamment les autres « Nearly Drs » João, Tania et Nicolas (on va y arriver les gars !!!), à Geoffrey FADEUR et à Pierre MEERTS pour leur chaleureux accueil, leur aide et leur dynamisme de travail.

Un grand merci aussi aux membres de l'unité Evolution Biologique et Ecologie (EBE/ULB) que j'aurais croisée à un moment ou un autre et surtout de l'équipe d'Olivier HARDY. Nommément, je remercie Esra KAYMAK pour sa disponibilité pour la production des séquences d'ADN utilisé au cours de cette thèse et ses réponses à mes multiples interrogations. Je pense aussi à Arthur, Nicolas, Katarina, Oscar, Simon, Valère, Jérémy, merci pour votre bonne humeur et vos encouragements.

Je remercie également tout le corps enseignant du département de Biologie Végétale à l'Université de Dschang pour les enseignements rigoureux et pour avoir stimulé en moi, cet amour pour la recherche scientifique. Je n'oublie pas mes chers collègues et amis de ma promotion de B.V. notamment Yannick, Junior, Carine, Arsèle, Boniface, Elie, Roger et Gaby.

Un merci tout particulier à ma famille à Gembloux : Caroline pour les soirées « Futu », Blandine, Christian, et leurs enfants Andy, Ylan et Ryan, pour la bonne humeur et le réconfort ! Je ne vous oublie pas les futurs mariés Daniel et Danièle ! Merci pour votre attention et votre présence malgré vos multiples occupations.

Je ne saurais finaliser ces pages sans remercier ma famille d'adoption, la famille LEUNAH, je pense particulièrement à Papa LEUNAH Boniface et maman LEUNAH Geneviève pour l'accueil, l'attention et les encouragements indéfectibles à mon égard ! Je me suis toujours senti chez moi dans votre demeure, vous êtes comme mes beaux-parents que je n'ai pas eu l'occasion de connaître. Je ne vous oublie pas, mes sœurs et frères d'une autre mère : Nadège, Blandine, Adélaïde, Léonie, Gwladys, Ida, Gaël et Guy, sans oublier mes petites Angy et Océane.

J'exprime également toute ma reconnaissance à ma belle-famille, mes « braves maris » Eric, Serge, Dylan, Kevin et ma tata Leo, tata Lionelle, je n'oublie pas les petits : Sheila, Ivana, Foo, Aurélie et Océane. Merci pour votre soutien et l'amour que vous avez toujours portés à mon égard.

Je voudrais enfin exprimer ma profonde gratitude à ma famille nucléaire, mes parents Felix et Esther NGNINTEDEM, mon grand frère Dr TANGOMO Armel loin des yeux, mais prêts du cœur, à mes petits frères et sœurs Maryline, Védrine (La prof de Minla'a ! ^^), Berthold (Le futur ingénieur mécano ! ^^), Bricelle, Junior et la Lucile, merci pour avoir toujours cru en moi, pour les encouragements et le soutien durant ces longues années de thèse. J'ai également une pensée profonde pour ma défunte sœur Larissa, merci pour ton courage et ta détermination contagieuse, je sais que tu veilles sur nous de là-haut !

Pour finir ce récit, je voudrais remercier infiniment mon « Mbieug Ngah » pour la patience et la compréhension, ça n'a pas toujours été facile durant ces longues années de vie de couple à distance. J'espère avoir été à la hauteur malgré les obstacles et que cette thèse te donnera satisfaction. Ma petite « choupinette » Adrielle, ma source d'inspiration et de courage, tu as toujours été si brave et courageuse depuis ta naissance et m'as toujours facilité la tâche chaque fois que je te laissais avec grand-mère pour mes séjours en Europe comme pour dire « maman va sans crainte ! ». Merci pour toute votre affection !

FINANCEMENTS

Cette thèse a été financée par diverses bourses et fonds de recherche :

- ✚ Le financement du National Science Foundation (**NSF, 1051547**) obtenu par le Missouri Botanical Garden.
- ✚ La bourse de l'American Orchid Society (**AOS**)
- ✚ La bourse du gouvernement français via le Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'ambassade de France au Cameroun (**SCAC**)
- ✚ La subvention de la "Fondation pour Favoriser la Recherche sur la Biodiversité en Afrique" (**FFRBA**)
- ✚ Le financement du National Geographic Society (NGS, Grant C303-15, V. Droissart comme PI) obtenu par le LaBosystE
- ✚ La bourse **Aspire** du « Conservation Action Research Network »
- ✚ La subvention de la **Leonardo DiCaprio Foundation**
- ✚ Le **Fonds David et Alice Van Buuren**
- ✚ La bourse de fin de thèse de l'**ARES**

RESUME

Le genre *Cyrtorchis*, groupait 18 espèces d'orchidées angraecoïdes endémiques d'Afrique tropicale, était connu pour ses grandes fleurs blanches, odorantes à long éperon bien adaptées pour des études sur la biologie de la reproduction. Il était également connu pour ses problèmes de délimitation taxonomique qui peuvent s'avérer préjudiciables pour la conservation des espèces.

La présente thèse de doctorat ambitionne de résoudre les problèmes de délimitation au sein du genre au niveau inter et intraspécifique en utilisant une approche de taxonomie intégrative et de documenter sa biologie de la reproduction.

Une inspection visuelle de 1752 spécimens, les analyses morphométriques et phylogénétiques ont été utilisées pour clarifier la taxonomie au sein du genre. L'inspection visuelle a permis de délimiter 27 morphogroupes à priori, desquels un échantillonnage de 171 spécimens représentant 20 morphogroupes a été utilisé pour les analyses morphométriques. Pour les reconstructions phylogénétiques, 69 spécimens représentant 21 des 27 morphogroupes ont été séquencés à partir de six marqueurs moléculaires. La caractérisation des patrons de floraison et l'observation et des pollinisateurs ont été réalisées au Cameroun grâce à un suivi phénologique en ombrière sur trois ans de 494 spécimens vivants représentant 15 taxons, et un suivi de la pollinisation naturelle *in situ* de deux de ces taxons. L'évaluation des facteurs affectant la production des fruits et des graines viables a été réalisée chez deux espèces du genre à travers 448 tests de pollinisation manuelle pour lesquels l'effet du système de pollinisation et de la limitation des ressources ont été examinés.

Les approches morphologiques permettent de distinguer deux groupes correspondant aux deux sections préalablement identifiées pour le genre *Cyrtorchis*. Les analyses moléculaires quant à elles ne soutiennent que la monophylie d'une des deux sections, *Cyrtorchis* sect. *Cyrtorchis*. Huit taxons morphologiquement définis dans le genre incluant trois nouvelles espèces sont également bien supportés par les analyses morphométriques et phylogénétiques. Le point d'insertion des stipites au tier supérieur du viscidium semble être l'un des principaux caractères reproducteurs soutenant la monophylie du genre alors que d'autres traits (tels que la structure du viscidium, la forme des stipites et des lobes latéraux du rostelle) se révèlent être d'importants critères permettant d'inférer des relations phylogénétiques au sein du genre. Au final, cette analyse met en évidence 27 taxons au sein du genre (incluant six nouveaux taxons à décrire), dont 12 taxons, confirmé par les approches morphométriques et/ou phylogénétiques. La phénologie de la floraison des espèces en ombrière montre un pic de floraisons à la grande saison de pluie (entre août et octobre). Un décalage de la floraison est observé chez certains taxons distribués en sympatrie et un asynchronisme de la floraison entre population de la même espèce. La pollinisation naturelle est un événement rare et difficile à observer chez les deux espèces étudiées (*C. letouzeyi* et *C. okuensis*). En effet, le taux de pollinisation/fructification est globalement faible (39 % de fleurs avec les pollinies emportées et 16 % de fruits produits chez *C. okuensis* ; 31-15 % de fleurs avec les pollinies emportées et 7-4 % de fruits produits chez *C. letouzeyi*), et ce, à cause du nombre réduit des visites des pollinisateurs. Par ailleurs, les pollinisateurs des deux espèces ont été identifiés et la pollinisation par les sphinx est confirmée dans le genre. Les tests de pollinisation manuelles ont révélé que la pollinisation croisée semble être le système de pollinisation le plus efficace pour la production de fruits et de graines viables. Cependant, davantage d'espèces devront être testées pour confirmer ce patron.

Les approches multidisciplinaires développées dans ce travail sont des bases solides pour la définition et la mise en œuvre de stratégies efficaces de conservation pour les espèces d'orchidées menacées. Afin de produire une révision taxonomique complète du genre, une phylogénie complète incluant les cinq taxons restants et ceux encore non résolus est nécessaire. Les nouveaux taxons identifiés devraient être décrits et les statuts de conservation évalués pour l'ensemble des espèces reconnues dans le genre.

Mots clés : Angraecoïdes, conservation, phénologie, phylogénie, morphométrie, banque de graine, sphingophilie, systématique.

ABSTRACT

The genus *Cyrtorchis*, grouped of 18 angraecoid orchids species endemic to tropical Africa, and was known for its large, white, fragrant flowers with a long spur well suited for studies on reproductive biology. It was also known for its taxonomic delimitation problems, which can be detrimental to the conservation of the species.

This PhD thesis aims to address the delimitation problems within the genus at the inter- and intraspecific level using an integrative taxonomic approach and to investigate its reproductive biology.

Visual inspection of 1752 specimens, morphometric and phylogenetic analyses was used to clarify the taxonomy within the genus. Visual inspection delineated 27 a priori morphogroups, from which a sample of 171 specimens representing 20 morphogroups was used for morphometric analyses. For phylogenetic reconstructions, 69 specimens representing 21 of the 27 morphogroups were sequenced with six molecular markers. The characterization of flowering patterns and the observation of pollinators were carried out respectively through a three-year shadehouse phenological survey of 494 living specimens representing 15 taxa and a survey of the natural *in situ* pollination of two taxa in Cameroon. The assessment of factors affecting fruit and viable seed production was carried out in two species of the genus through 448 hand pollination tests for which the effect of pollination system and resource limitation were examined.

Morphological approaches allow to distinguish two groups corresponding to the two sections previously identified for the genus *Cyrtorchis*. Molecular analyses support only the monophyly of one of the sections, *Cyrtorchis* sect. *Cyrtorchis*. Eight morphologically defined taxa including three new species are also well supported by morphometric and phylogenetic analyses. The insertion point of the stipites at the rear third of the length of the viscidium appears to be one of the main reproductive characters supporting the monophyly of the genus while other traits (such as the viscidium structure, the shape of the stipites and the lateral lobes of the rostellum) are found to be important criteria for inferring phylogenetic relationships within the genus. Finally this analysis highlights 27 taxa within the genus (including six new taxa to be described), of which 12 taxa, confirmed by morphometric and/or phylogenetic approaches. Flowering of most species at the shadehouse is peaking during the main rainy season (between August and October). However, some sympatric species present non-overlapping flowering periods and an asynchronism of flowering between populations of the same species. Natural pollination is a rare event and difficult to observe in the two studied species. Indeed, the overall pollination/fruitletting rate is low (39% of flowers with pollinia removed and 16% of fruits produced in *C. okuensis*; 31-15% of flowers with pollinia removed and 7-4% of fruits produced in *C. letouzeyi*) because of the reduced number of pollinators visits. Additionally, both species were found to be pollinated by hawkmoths. Manual pollination tests revealed that cross-pollination appears to be the most efficient pollination system to produce fruits and viable seeds. However, more species will need to be tested to confirm this pattern.

The multidisciplinary approaches developed in this work provide a solid basis to define and implement effective conservation strategies for threatened orchid species. To produce a complete taxonomic revision of the genus, a completed phylogeny including the five remaining and the yet unresolved taxa is required. The newly identified taxa should be described and the conservation status assessed for all species recognised in the genus.

Keywords: angraecoids, conservation, phenology, phylogeny, morphometry, seed Bank, sphingophily, systematics.

PUBLICATIONS

ARTICLES A COMITE DE LECTURE INTERNATIONAL PUBLIES

- ✚ **Azandi L.**, Droissart V., Sonké B., Simo-Droissart, M., D'hajjère, T., Farminhão, J.N.M., Verlynde, S., Kaymak, E., Stévant, T. (**sous presse**) A near comprehensive phylogenetic framework gives new insights towards a natural classification of the African genus *Cyrtorchis* (Angraecinae, Orchidaceae). *Taxon*. DOI: 10.1002/tax.12511
- ✚ **Azandi L.**, Stévant T., Avana M.L., Sonké B., Simo-Droissart M. & Droissart V., 2016. Synoptic revision of the genus *Cyrtorchis* Schltr. (Angraecinae, Orchidaceae) in Central Africa with a new species from Cameroon, Equatorial Guinea and Republic of the Congo. *Phytotaxa* 267 (3): 165-186.

ARTICLE SANS COMITE DE LECTURE INTERNATIONAL

- ✚ **Azandi L.**, Droissart V., Sonké B., Simo-Droissart M. & Stévant T. 2018. The genus *Cyrtorchis* in Central Africa with a focus on its two sections. *Orchids* 87 (1): 48-55.

VULGARISATION/PRESSE

- ✚ **Azandi L.**, Savignac M. & Droissart V. 2018. Solving a plant-pollinator mystery at Bouamir. <https://www.cbi.ucla.edu/watch-solving-a-plant-pollinator-mystery-at-bouamir/>
- ✚ **Azandi L.**, Droissart V. 2017. Pollinisation et écologie d'une nouvelle espèce d'orchidée découverte à Oku (Nord-Ouest Cameroun). 14 Juin 2017. <http://www.cameroun.ird.fr/toute-l-actualite/l-actualite/pollinisation-et-ecologie-d-une-nouvelle-espece-d-orchidee-decouverte-a-oku-nord-ouest-cameroun;> <https://cm.ambafrance.org/Pollinisation-et-ecologie-d-une-nouvelle-espece-d-orchidee-decouverte-a-Oku>

ARTICLES SOUMIS

- ✚ **Azandi, L.**, Stévant, T., Sonké, B., Simo-Droissart, D'hajjère, T. & Droissart, V. (**en révision**). Taxonomic description and pollination ecology of *Cyrtorchis okuensis* (Orchidaceae, Angraecinae), a new orchid species endemic to the Cameroon Volcanic Line. *Plant Ecology and Evolution*.
- ✚ Droissart, V., **Azandi, L.**, Savignac, M., & Onguene, E., Thomas B. Smith, Deblauwe, V. 2021. PICT: a low cost, modular, open-source camera trap system to study plant-insect interactions. *Methods in Ecology and Evolution*. DOI: 10.1111/2041-210X.13618.
- ✚ Droissart, V., **Azandi, L.**, Savignac, M., & Onguene, E., Thomas B. Smith, Deblauwe, V. (**sous presse**). A practical guide with computer code and step by step instructions for building PICT, using in the field and post-processing movies is archived at <https://doi.org/10.5281/zenodo.4139839>.

ARTICLE EN PREPARATION


-  **Azandi, L.***, Messado, L.*, Sonké, B., Simo-Droissart, M., Hardy, O., Savignac, & Droissart, V. (**en préparation**). Factors affecting viable seed production in two species of the genus *Cyrtorchis* schltr. (Orchidaceae) in Cameroon (*Seed Science Research*).

TABLE DES MATIERES

Dédicace	i
Remerciements	ii
Financements	vi
Résumé	vii
Abstract	viii
Publications	ix
Table des matières	xi
Liste des figures	xv
Liste des tableaux	xxii
Liste des annexes	xxiii
Liste des abréviations et Acronymes	xxv
Chapitre I Introduction Générale	1
I.1 Contexte	2
I.2 Revue de la littérature	6
I.2.1 Notion d'espèce et implication pour la conservation	6
I.2.2 Délimitation des espèces : une approche intégrative indispensable pour la conservation	7
I.2.2.1 Famille des Orchidaceae	8
I.2.2.2 Angraecoides	17
I.2.2.3 Caractères généraux des angraecoides	18
I.2.2.4 Le genre <i>Cyrtorchis</i> Schlechter	19
I.2.3 Biologie de la pollinisation chez les orchidées	24
I.2.3.1 Phénologie et patrons de floraison chez les orchidées	25
I.2.3.2 Interaction plantes-pollinisateurs chez les orchidées	26
I.2.3.3 Syndromes de pollinisation	27
I.2.3.4 Sphingophilie et hypothèses d'évolution	29
I.2.4 Système de reproduction et limitation des ressources pour le succès reproducteur : Banque de graine	32
I.2.4.1 Banque de graines	32
I.2.4.2 Système de reproduction	33
I.2.4.3 Limitation des ressources	34
I.2.4.4 Succès reproducteur	35
I.3 Hypothèses de recherche et objectifs	35
I.3.1 Hypothèses globale et spécifiques	35
I.3.2 Objectifs général et spécifiques	36
Chapitre II Matériel et Méthodes	38
II.1 Méthodologie pour l'étude taxonomique	39

II.1.1	Stratégie de collecte des données sur le terrain et dans le réseau d'ombrières.....	40
II.1.2	Examens visuels et délimitations des espèces connues et des morphogroupes.....	42
II.1.2.1	Visite et collecte de données dans les différents herbaria.....	43
II.1.3	Construction de la matrice de caractères morphologiques pour les analyses morphométriques	43
II.1.4	Analyses morphométriques	45
II.1.5	Echantillonnage et analyses phylogénétiques	45
II.2	Méthodologie pour l'étude de la biologie de la reproduction	46
II.2.1	Caractérisation des patrons de floraison : collecte et analyses des données.....	46
II.2.2	Observation des visiteurs, pollinisateurs et des syndrome de pollinisation : échantillonnage et analyses des données.....	47
II.2.3	Evaluation des facteurs influençant la production des fruits et des graines viables	50
II.2.3.1	Collecte de données	50
II.2.3.2	Méthodes d'analyses des données	51
Chapitre III	Résultats	53
III.1	Contribution à la connaissance du genre <i>Cyrtorchis</i> et délimitation taxonomique et phylogénétique	54
III.1.1	Contribution à la connaissance du genre <i>Cyrtorchis</i> et révision synoptique des espèces d'Afrique centrale	55
III.1.1.1	The genus <i>Cyrtorchis</i>	57
III.1.1.2	Morphological description and ecological requirement of the genus	58
III.1.1.3	Two sections based on reproductive floral parts	58
III.1.1.4	Growing <i>Cyrtorchis</i> species in tropical Africa	69
III.1.2	Révision synoptique du genre <i>Cyrtorchis</i> Schltr. (Angraecinae, Orchidaceae) en Afrique centrale et description d'une nouvelle espèce restreinte à la végétation submontagnarde	72
III.1.2.1	Introduction.....	74
III.1.2.2	Material and methods	75
III.1.2.3	Taxonomic treatment	75
III.1.3	Délimitation taxonomique et phylogénétique.....	105
III.1.3.1	Introduction.....	108
III.1.3.2	Material and methods	111
III.1.3.3	Morphological analysis.....	111
III.1.3.4	Phylogenetic analysis.....	112
III.1.3.5	Results	116
III.1.3.6	Discussion	129
III.2	Contribution à l'étude de la biologie de reproduction du genre <i>Cyrtorchis</i>	165
III.2.1	Caractérisation des patrons de floraison à l'ombrière de Yaoundé	165
III.2.2	Caractérisation de l'écologie et de la biologie de la reproduction de deux espèces de <i>Cyrtorchis</i>	168
III.2.2.1	Phenologie, syndrome de pollinisation et pollinisateur chez <i>cyrtorchis okuensis</i>	168

III.2.2.2	Phénologie, syndrome de pollinisation et pollinisateur chez <i>Cyrtorchis letouzeyi</i>	190
III.3	Facteurs influençant la production des fruits et de graines viables	201
III.3.1	Introduction	203
III.3.2	Material and Methods	204
III.3.2.1	The study site	204
III.3.2.2	Data analysis	207
III.3.3	Results	207
III.3.3.1	Breeding system evaluation in <i>c aschersonii</i>	207
III.3.3.2	Breeding system evaluation in <i>Cyrtorchis ringens</i>	208
III.3.3.3	Resource limitation assessment in <i>Cyrtorchis aschersonii</i>	209
III.3.3.4	Resource limitation assessment in <i>Cyrtorchis ringens</i>	211
III.3.4	Discussion	213
III.3.4.1	Breeding system efficiency	213
III.3.4.2	Resource limitation parameter	214
III.3.5	Conclusion	215
Chapitre IV	Discussion générale	220
IV.1	Un premier cadre phylogénétique pour la révision du genre <i>Cyrtorchis</i>	221
IV.2	Importance d'une approche intégrée de morphométrie et de phylogénie pour la délimitation taxonomique au sein du genre <i>Cyrtorchis</i>	222
IV.3	Valeur taxonomique des caractères végétatifs vs caractères floraux	225
IV.4	Phénologie de la floraison : outil supplémentaire de délimitation taxonomique	226
IV.5	Confirmation de la sphingophilie chez le genre <i>Cyrtorchis</i>	229
IV.6	Limitation de la pollinisation naturelle et du succès reproducteur	231
IV.7	Prédation et herbivorie	233
IV.8	Optimisation de la viabilité des graines	234
IV.8.1	Influence du système de pollinisation	235
IV.8.2	influence de la limitation des ressources	235
Chapitre V	Conclusion générale et perspectives	238
V.1	Conclusion générale	239
V.2	perspectives	241
BIBLIOGRAPHIE		243
INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES SUR LES APPROCHES MOLECULAIRES		263
Complément 1.	Extraction et purification de l'ADN	263
Complément 2.	Amplification de l'ADN	264
Complément 3.	Electrophorèse sur gel d'agarose	268
Complément 4.	Purification des produits PCR et réaction de séquençage	269
Complément 5.	Assemblage, édition et alignement des séquences	270
Complément 6.	Analyse du maximum de vraisemblance	271

Complément 7. Analyse bayésienne	272
Complément 8. Reconstruction des états ancestraux	272

LISTE DES FIGURES

- Figure I-1.** Approche intégrative de la systématique et la biologie de la reproduction dans le développement des stratégies de conservation des espèces..... 5
- Figure I-2.** Structure de la fleur des Orchidaceae. (a) Vue latérale ; (b) vue frontale ; (c) détails du gynostème ; (d) détail du pollinarium. (a), (b) (c) et (d) modifiés d'après Dressler (1981)..... 10
- Figure I-3.** Structure d'un fruit et des graines d'orchidées. A. Fruit mûr de *Cyrtorchis aschersonii* (Epidendroideae). B. Fruit ouvert de *C. aschersonii* laissant entrevoir les petites graines matures en forme de poudre de couleur marron à l'intérieur. C. Peintures et photographies montrant la grande diversité des graines d'orchidées (adapté d'après Arditti et Ghani, 2000)..... 11
- Figure I-4.** Arbre résumant la classification des sous-familles, tribus et sous-tribus chez les Orchidaceae reproduit d'après Chase *et al.* (2015)..... 16
- Figure I-5.** Distribution de la richesse spécifique du genre *Cyrtorchis* en Afrique (reproduite d'après Pridgeon *et al.*, 2014). 19
- Figure I-6.** Illustrations de la diversité des espèces du genre *Cyrtorchis*. A. Inflorescences de *C. arcuata* subsp. *arcuata*. B. Fleur de *C. aschersonii*. C. Inflorescence de *C. ringens*. D. Feuilles et inflorescence de *C. monteiroae*. E. Fleurs de *C. hamata*. F. Plantes de *C. chailluana* avec plusieurs inflorescences. G. feuilles et inflorescence de *C. letouzeyi*. H. Fleurs et feuilles de *C. submontana*. I. Plante de *C. okuensis*. J. Inflorescence de *C. arcuata* subsp. *whytei*..... 23
- Figure I-7.** Patrons évolutifs de convergence et d'émergence des traits floraux en réponse aux préférences du pollinisateur. A. Trois exemples de syndromes de pollinisation où des espèces de plantes non apparentées montrent une convergence de leur signaux floraux. B. Différents systèmes de mimétisme floral orientés vers différents modèles (cases ombrées) sous l'influence de la sélection des pollinisateurs.(reproduite d'après Schiestl et Johnson, 2013)..... 29
- Figure I-8.** Illustration de la sphingophilie chez trois espèces de plante. Première preuve de la pollinisation de l'espèce emblématique de Darwin *Angraecum sesquipedale* (Orchidaceae) par *Xanthopan morgani praedicta* à Madagascar (a et b reproduites d'après Wasserthal (1997)) ; Pollinisation de *Mystacidium capense* (Orchidaceae) en Afrique du sud par *Hippotion celerio* (c reproduite d'après Micheneau *et al.* (2009)) ; Pollinisation de *Crinum bulbispermum* (Amaryllidaceae) par *Agrius convolvuli* (d reproduite d'après Johnson et Raguso (2016)). 30
- Figure I-9.** Deux hypothèses contrastées sur l'évolution des éperons exceptionnellement longs. Le modèle Coevolutionary race (course évolutive) de Darwin (a, b), qui postule une augmentation progressive des longueurs du proboscis et de l'éperon de la plante, et le modèle *Pollinator shift* (changement de pollinisateur)(c, d), où la longueur de l'éperon évolue en raison du passage à un nouveau pollinisateur avec un proboscis plus long. Ces modèles diffèrent selon que les pics d'adaptation sont en constante augmentation (b), ou s'il s'agit d'optima relativement fixes basés sur les longueurs de proboscis des pollinisateurs préexistants (d). Ils diffèrent également selon que l'évolution de la longueur de l'éperon se fait progressivement (b) ou de manière ponctuelle (reproduite d'après Whittall et Hodges, 2007). 31
- Figure II-1.** Localisation des ombrières à orchidées en activité en Afrique tropicale et à Madagascar (reproduite de Stévant *et al.*, 2020). Ce réseau compte actuellement neuf ombrières dans cinq pays, totalisant, 32 013 orchidées vivantes de plus de 500 espèces (Stévant *et al.*, 2020). Parmi ces ombrières, celle de Yaoundé créée en 2004 au Laboratoire de Botanique systématique et d'Ecologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé abrite la plus grande collection *ex situ* d'orchidées vivantes africaines. Couvrant plus de 200 m², cette ombrière a

accueilli plus de 7500 spécimens vivants d'environ 250 espèces et a produit plus de 8500 spécimens d'herbier pour l'identification et les différentes études scientifiques. 41

Figure II-2. Spécimen vivant de *Cyrtorchis brownii* en culture a l'ombrière de Yaoundé montrant une étiquette bleue associée portant les références (numéro de culture et initiales du lieu de collecte) 42

Figure II-3. Illustration de *Cyrtorchis chailluana* (Szlachetko et Olszewski, 2001) illustrant les principaux caractères morphologiques considérés pour cette étude. A. Fleur (LGBR = Longueur de la bractée ; LGEP= Longueur de l'épéron), B. Labelle (LALA= Largeur du labelle ; LGLA= Longueur du labelle), C. Sépale latéral (LASL= Largeur du sépale latéral), D. Pétale latéral (LAPL= Largeur du pétale latéral ; LGPL= Longueur du pétale latéral), E. Sépale dorsale (LASD= Largeur du sépale dorsal ; LGSD= Longueur du sépale dorsal), F. Feuille (LGFE= Longueur de la feuille ; LAFE= Largeur de la feuille), G. Tige et inflorescence (LGIN= Longueur de l'inflorescence). 44

Figure II-4. Dispositif expérimental utilisé pour étudier la biologie de la pollinisation de *Cyrtorchis letouzeyi* dans la réserve de faune du Dja (Est Cameroun). A. Suivi journalier de la phénologie et de la pollinisation; B. Collecte de papillons de nuit au moyen d'un piège lumineux ; C. Dispositif de caméra piège utilisé pour l'observation des visiteurs; D. Mesure de l'épéron et quantification du nectar et sa concentration en sucre. A et C de Vincent Droissart..... 49

Figure II-5. Pollinisation et banque de graines. A) Pollinisation manuelle de *Cyrtorchis aschersonii* B) Fruits issus de la fécondation manuelle de *C. ringens*. C) Séchage de graines dans un dessiccateur. D) Graines sèches conservées dans des petits tubes. E) Graines issue de test de viabilité dans des Eppendorf D) Observation de graines viables (embryon colorée, flèche rouge) au microscope. C, D et E de Vincent Droissart. 51

Figure III-1. A. First author pointing out a plant of *Cyrtorchis letouzeyi* (by Vincent Droissart). B. *Cyrtorchis arcuata* subsp *arcuata* taken *in situ* (by Tariq Stévant). 58

Figure III-2. Comparison of the pollinarium structure in *Cyrtorchis*. By Laura Azandi..... 59

Figure III-3. *Cyrtorchis brownii* taken in shadehouse. By Vincent Droissart. 60

Figure III-4. A cultivated plant of *Cyrtorchis guillaumetii*. By Perez-vera (paratype Kew orchid iconography). ... 61

Figure III-5. *Cyrtorchis henriquesiana* taken in shadehouse cultivation. By Vincent Droissart..... 62

Figure III-6. *Cyrtorchis injoloensis* photographed in cultivation. The inset is a close-up of a single inflorescence. By Lourens Grobler..... 62

Figure III-7. *Cyrtorchis monteiroae* photographed in cultivation. The insert photograph of a mature plant was taken *in situ*. By Vincent Droissart. 63

Figure III-8. *Cyrtorchis ringens* photographed in cultivation. The insert is close-up of a single inflorescence. By Vincent Droissart..... 64

Figure III-9. *Cyrtorchis submontana* taken *in situ*. Note the diminutive stature of the plant (inset). By Vincent Droissart. 65

Figure III-10. A. *Cyrtorchis arcuata* subsp *whytei* taken shadehouse cultivation. B. *Cyrtorchis arcuata* subsp *arcuata* taken shadehouse cultivation. C. *Cyrtorchis aschersonii* in cultivation note the relative flower size (inset). By Vincent Droissart..... 66

Figure III-11. A colony of *Cyrtorchis chailluana* in Libreville, Gabon (West Central Africa). By Vincent Droissart.67

- Figure III-12.** A cultivated plant of *Cyrtorchis hamata*. By Vincent Droissart. 68
- Figure III-13.** A. *Cyrtorchis chailluana* in cultivation. B. *Cyrtorchis ringens* grown in cultivation. By Laura Azandi. 70
- Figure III-14.** Distribution of *Cyrtorchis submontana* in Atlantic central Africa. 80
- Figure III-15.** Illustrative pictures of some central African taxa of the genus *Cyrtorchis*. A. *C. arcuata*. B. *C. arcuata* subsp. *whytei*. C. *C. aschersonii*. D. *C. brownii*. E. *C. chailluana*. F. *C. hamata*. G. *C. henriquesiana*. H. *C. injoloensis*. I. *C. letouzeyi*. J. *C. monteiroae*. K. *C. ringens*. L. *C. submontana*. Photographs 'A-G' & 'I-L' by Droissart Vincent and 'H' by Lourens Grobler. 88
- Figure III-16.** *Cyrtorchis submontana* Stévant, Droissart & Azandi. A. Habit. B. Inflorescence. C. Flower. D. Ovary, section. E. Dorsal sepal. F. Lateral petal. G. Lateral sepal. H. Labellum with spur, frontal. I. Labellum with spur, side view. J. Column with part of opened spur. K. Column, side view. L. Column, frontal. M. Column, side view. N. Anther cap, above. O. Anther cap, frontal. P. Anther cap, from below. Q. Stipe with pollinia. R. Stipe, frontal. S. Stipe, side view. Stévant & Ndong Bokung 273 (A, B, D, K, M, Q, R, S) Droissart 112 (C, E, F, G, H, I, N, O, P) Stévant 1593 (J, L) (Drawing by Hans de Vries, 6 November 2015). 103
- Figure III-17.** Comparison of the viscidium or pollinarium structure in *Cyrtorchis*. A. *Cyrtorchis* sect. *Cyrtorchis* (from a specimen of *C. chailluana*) and B. *Cyrtorchis* sect. *Homocolleticon* (from a specimen of *C. ringens*). By Marie Savignac. 109
- Figure III-18.** Scatter plot of the first two axes of the extended principal component analysis using the Hill and Smith method based on 43 characters scored from 171 specimens representing 20 morphogroups of the genus *Cyrtorchis*: arc, *C. arcuata* subsp. *arcuata*; acu, *C. acuminata*; affpra, *C. aff. praetermissa*; affrin, *C. aff. ringens* sp1; asc, *C. aschersonii*; bro, *C. brownii*; cha, *C. chailluana*; cra, *C. crassifolia*; gui, *C. guillaumetii*; ham, *C. hamata*; hen, *C. henriquesiana*; inj, *C. injoloensis*; let, *C. letouzeyi*; mon, *C. monteiroae*; neg, *C. neglecta*; oku, *C. aff. guillaumetii* "Oku"; pra, *C. praetermissa*; rin, *C. ringens*; sub, *C. submontana*; why, *C. arcuata* subsp. *whytei*. Only the 13 variables showing the highest contribution to these two axes are represented. See Appendix III-2 for codes used for variables. 117
- Figure III-19.** Scatter plot of the first two axes of the extended principal component analysis using the Principal Component Analysis method based on 26 characters scored from 171 specimens representing 20 morphogroups of the genus *Cyrtorchis*: arc, *C. arcuata* subsp. *arcuata*; acu, *C. acuminata*; affpra, *C. aff. praetermissa*; affrin, *C. aff. ringens* sp1; asc, *C. aschersonii*; bro, *C. brownii*; cha, *C. chailluana*; cra, *C. crassifolia*; gui, *C. guillaumetii*; ham, *C. hamata*; hen, *C. henriquesiana*; inj, *C. injoloensis*; let, *C. letouzeyi*; mon, *C. monteiroae*; neg, *C. neglecta*; oku, *C. aff. guillaumetii* "Oku"; pra, *C. praetermissa*; rin, *C. ringens*; sub, *C. submontana*; why, *C. arcuata* subsp. *whytei*. Only the 13 variables showing the highest contribution to these two axes are represented. See Appendix III-2 for codes used for variables. 118
- Figure III-20.** Boxplot representing the variation ranges of the six most discriminant morphological characters among the 12 studied species of *Cyrtorchis* sect. *Homocolleticon*. a, Leaf width; b, Inflorescence length; c, Rostellum length; d, Bract length; e, Anther cap length; f, Leaf length; x axis: Mo, *C. monteiroae*; afPr, *C. aff. praetermissa*; Cr, *C. crassifolia*; Ri, *C. ringens*; afRi, *C. aff. ringens* sp1; He, *C. henriquesiana*; Pr, *C. praetermissa*; Ok, *C. aff. guillaumetii* "Oku"; In, *C. injoloensis*; Br, *C. brownii*; Gu, *C. guillaumetii*; Su, *C. submontana*. Boxes sharing at least one same letter means that species are not significantly different from each other. 120
- Figure III-21.** Boxplot representing the variation ranges of the six most discriminant features among the eight studied species of *Cyrtorchis* sect. *Cyrtorchis*. a Flower length. b Spur length. c Anther cap length. d Lip length. e Lateral sepal length. f Rostellum length. Ar *C. arcuata* subsp. *arcuata*. Ac *C. acuminata*. Wh *C. arcuata* subsp. *whytei*. As *C. aschersonii*. Ch *C. chailluana*. Ha *C. hamata*. Le *C. letouzeyi*. Ne *C. neglecta*. Boxes sharing at least one same letter means that species are not significantly different from each other. 121

Figure III-22. Phylogenetic relationships of the genus *Cyrtorchis* produced by the Bayesian inference of the combined nuclear (nrITS-1) and plastid (*matK*, *rps16*, *trnC-petN*, *trnL-trnF*, *ycf1*) regions (73 accessions, 21 taxa, 6558 characters). Posterior probabilities (PP) and bootstrap values (BS) from maximum likelihood analyses are indicated above the branches. The well-resolved clades from trees resulting from both analyses are here renamed with letters 124

Figure III-23. Ancestral character evolution in the genus *Cyrtorchis* based on the Bayesian consensus tree inferred by maximum likelihood ancestral-state reconstruction. Node and tip colors are explained on the associated legends. A, Insertion point of the stipites on the viscidium; B, Ovary and fruit shape; C, Stipites shape; D, Stipites apex shape; E, Viscidium structure; F, Shape of the lateral lobes of the rostellum. 126

Figure III-24. Variability of the viscidium structure in the genus *Cyrtorchis* and *Rangaeris longicaudata*. A, Viscidium structure in *Rangaeris longicaudata* showing the enlarged apices of the stipites and the uniformly hyaline texture of the viscidium; B, Viscidium structure in *C. sect. Cyrtorchis*; C, Viscidium structure in *C. aschersonii*; D, Viscidium structure in *C. sect. Homocolleticon*; E, Narrow stipites apices of *C. henriquesiana* with entire asymmetric acute apices; F, Narrow stipites apices of *C. praetermissa* with entire symmetric obtuse apices. — Scale bars: A–F = 1 mm. 127

Figure III-25. Variability of the rostellum structure and ovary and fruit shape in the genus *Cyrtorchis* and *Rangaeris longicaudata*. A, Face view of *R. longicaudata*, a column showing the uniformly widened lateral lobes of the rostellum (UW_LLRL); B, Side view of the *C. hamata* column showing the lateral lobes of the rostellum widened just above a narrow base (WUP_LLRL = widened upper part of the lateral lobes of the rostellum; NLP_LLRL = narrow lower part of the lateral lobes of the rostellum) characterizing *C. sect. Cyrtorchis*; C, Face view of the column of *C. henriquesiana* showing the narrowed almost parallel-sided lateral lobes of the rostellum (NPS_LLRL) characterizing the *C. sect. Homocolleticon*; D, Ovary and fruits of *Rangaeris longicaudata* in side view; E, Triquetrous fruits of *C. aschersonii* with three smooth sides; F, Triquetrous fruits of *C. monteiroae* with three ribbed sides; G, The not-ribbed and not-triquetrous ovary and fruits of *C. brownii*. — Scale bars: A–C = 1 mm. A by João Farminhão, D by Tariq Stévant and the others by Laura Azandi. 128

Figure III-26. Floraison cumulée des 15 taxons en culture à l'ombrière de Yaoundé entre 2017 et 2019. 167

Figure III-27. Pourcentages mensuels observés de la floraison de chaque espèce dans l'ombrière de Yaoundé sur la période de trois ans, de 2017 à 2019 inclus. Le nombre total d'individus par espèce étudiée est indiqué entre parenthèses. Seules sept espèces ayant au moins 30 individus cultivés dans l'ombrière ont été prises en compte. 167

Figure III-28. *Cyrtorchis okuensis* in its natural habitat, the shrubby savannah around the volcanic lake Oku. A. Panoramic view of *C. okuensis* habitat in the survey area. B. Individuals of *C. okuensis* growing on a 2 meter long branch of *Gnidia glauca*. C. A flowering individual of *C. okuensis* growing with mosses and the ferns *Lepisorus excavatus* and *Asplenium theciferum*. Photographs by Vincent Droissart (A) and Laura Azandi (B, C). 173

Figure III-29. *Cyrtorchis okuensis* Droissart, Azandi & M.Simo. A. Habit and inflorescence. B. Flower, frontal. C. Flower, side view. D. Fruit. E. Labellum with spur frontal. F. Dorsal sepal. G. Lateral sepal. H. Lateral petal. I. Anther cap, side view. J. Anther cap, frontal. K. Viscidium with stipites frontal. L. Column, frontal. M. Column, side view. N. Ovary section. O. Pollinia. K. Column, side view. N. Anther cap, above. O. Anther cap, frontal. P. Anther cap, from below. Q. Stipe with pollinia. R. Stipe, frontal. S. Stipe, side view. Azandi 26 (B, C, E, F, G, H, I, J, L, M, N, O). Plant cultivated in Yaoundé shadehouse Y 6377 BA, fruit ID 499 (D) Droissart & al. (*Ombrière de Yaoundé*) 5109 (K) (Drawing by Tania D'Haijère). 176

Figure III-30. Distribution of *Cyrtorchis okuensis* in Central Africa, along the Cameroon Volcanic Line. 180

Figure III-31. Visitor's activities on *Cyrtorchis okuensis* flowers. Results are based on a 25-days monitoring session with four camera traps (May 2017). 182

Figure III-32. Three pollinators of *Cyrtorchis okuensis* observed around the Lake Oku (North West Cameroon). A. Pictures recorded with camera trap showing a *Hippotion* sp. foraging on *C. okuensis* flowers. B-D. Sphinx moths captured during light trap sessions: *Hippotion celerio* (B), *H. eson* (C), *H. osiris* (D). Photographs by Laura Azandi. 183

Figure III-33. Reproductive phenology of *Cyrtorchis okuensis* per day in the studied population (total of 33 individuals) between 05 to 29 April 2017. A. Daily number of open flowers B. Daily number of flowers visited. C. Daily number of hawkmoth visits recorded with camera traps. 184

Figure III-34. Phénologie journalière de la reproduction de *Cyrtorchis letouzeyi* dans la population étudiée (31 individus) entre le 25 juin et le 09 juillet en 2018 et 2019. a. Nombre cumulé de fleurs ouvertes par jour. b. Nombre de fleurs visitées par jour (fleurs avec les pollinies emportées et/ou déposées sur le stigmate). c. Nombre de visites de sphinx enregistré par jour avec les caméras. 192

Figure III-35. Image illustrant la diversité des insectes visiteurs de *Cyrtorchis letouzeyi* dans la réserve de faune du Dja. Principaux insectes prédateurs représentés par une araignée (a) et une mante religieuse (b); les principaux insectes réalisant de l'herbivorie sur les fleurs et les feuilles (c, criquet; d, sauterelle; e-f, chenilles). Les autres visiteurs passifs (g, mouche; h, punaise). 194

Figure III-36. Caractérisation des visites des différents taxons animaux sur les fleurs de *Cyrtorchis letouzeyi* observés sur les enregistrements vidéo. Les barres représentent les durées totales des interactions enregistrées par taxons et les chiffres dans les étiquettes représentent le nombre de visites enregistrées par taxon. 196

Figure III-37. Observation et capture des pollinisateurs. Spécimen en fleur de *C. letouzeyi* avant la pollinisation par le sphinx (a). Capture d'une vidéo enregistrée avec la caméra montrant un individu de *Xanthopan morganii* butinant sur les fleurs (b). Individu de *Xanthopan morganii* capturé à l'aide d'un piège lumineux (c). Plante de *C. letouzeyi* développant des fruits après la visite du pollinisateur (c). 197

Figure III-38. Diversité des principaux visiteurs de *Cyrtorchis letouzeyi* enregistré dans la réserve du Dja pendant la période de suivi avec les caméras sur six individus. Les barres en couleur représentent le nombre total d'interactions enregistré pour chaque taxon visiteurs par heure. 198

Figure III-39. Boîtes à moustaches montrant la distribution des longueurs d'éperon, de colonne de nectar et de longueur de proboscis mesurées sur les fleurs suivies et les papillons pollinisateurs capturés. Les différentes lettres au-dessus des boîtes indiquent une différence significative entre les paramètres ($p < 0.05$) 200

Figure III-40. Correlation matrix chart displaying correlations between the number of leaves (NL), leaf area (LA), fruit set (FS) fruit abortion (FAB) and number of inflorescences (NIF) per pollination treatment in *C. aschersonii*. The filled colour intensity of the pie chart per pollination treatment is proportional to the correlation coefficient (-1 to 1). The cross (X) indicates variables with non-significant coefficients per significant level considered (p -value > 0.05). Positive correlations are displayed in green and negative ones in brown. 210

Figure III-41. Correlation matrix chart displaying correlations between viable seeds (VS), the number of leaves (NL), leaf area (LA), maturation time (MT), viable seed (VS) and mature fruit collected (MFC) per treatment in *C. aschersonii*. For each pollination treatment, the filled colour intensity of the pie chart is proportional to the correlation coefficient (-1 to 1). The cross (X) indicates variables with non-significant coefficients per significant level considered (p -value > 0.05). Positive correlations are displayed in green and negative ones in brown. 211

Figure III-42. Correlation matrix chart displaying correlations between the number of leaves (NL), leaf area (LA), fruit set (FS) fruit abortion (FAB) and number of inflorescences (NIF) per pollination treatment in *C. ringens*. The filled colour intensity of the pie chart per pollination treatment is proportional to the correlation coefficient (-1 to 1). The cross (X) indicates variables with non-significant coefficients per significant level considered (p -value

>0.05). Positive correlations are displayed in green and negative ones in brown. The question mark indicates that the correlation coefficient was not calculated due to the absence of variability in fruit set value. 212

Figure III-43. Correlation matrix chart displaying correlations between the number of leaves (NL), leaf area (LA), maturation time (MA), mature fruit collected (MFC) and viable seed (VS) per treatment in *C. ringens*. The filled color intensity of the pie charts is proportional to the correlation coefficients and the non-significant coefficient according to the significant level considered (p -value >0.05) are crossed. Positive correlations are displayed in green and negative one in brown. 213

Figure IV-1. Démarche de l'approche intégrative de systématique (morphométrie et phylogénie) pour la résolution taxonomique des espèces. 223

Figure IV-2. Variation de la floraison des trois espèces du clade C (*C. ringens*, *C. aff. ringens* sp1 et *C. okuensis*) dans l'ombrière de Yaoundé sur la période de trois ans. 228

Figure IV-3. Diversité des vecteurs d'herbivorie et /ou florivorie chez *C. letouzeyi* dans la réserve du Dja (a-e) et chez *C. okuensis* au mont Oku (f-g). a. criquet ; b. sauterelle ; c-d. chenilles ; e. *Cinnyris reichenowi*; f. *Linurgus olivaceus*. 234

Figure V-1. Positions et directions des amorces Tab-E (*trnL*(UAA)3') et Tab-F (*trnF*(GAA)) du marqueur *trnL-F*. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris de Taberlet *et al.*, 1991). 264

Figure V-2. Positions et directions des amorces *rps16-1F* et *rps16-2R* utilisées dans cette étude. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces. 264

Figure V-3. Positions et directions des amorces utilisées pour le marqueur matK. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris et modifié de Johnson et Soltis, 1994). 265

Figure V-4. Positions et directions des amorces *trnC* et *petN-1R* utilisées dans cette étude. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris de Lee et Wen, 2003). 265

Figure V-5. Positions et directions des quatre amorces utilisées pour le marqueur *ycf1*. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris et modifié de Neubig *et al.*, 2009). 265

Figure V-6. Positions et directions des amorces utilisées pour le marqueur nrITS-1. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris de Blattner, 1999). 266

Figure V-7. Edition de séquences consensus pour la portion ITS-A et ITS-C du marqueur nrITS-1(a) et e-f du marqueur *trnL-F* (b) avec le logiciel Geneious. Les marques jaunes et verts en dessous des nucléotides des chromatogrammes indiquent les bases corrigées. 270

Figure V-8. Alignement de plusieurs séquences consensus pour le marqueur nrITS-1 dans le logiciel Geneious. Les nucléotides encadrés de différentes couleurs illustrent le polymorphisme pour un même site nucléotidique. 271

Figure S1. Scatter plots of the first and third axes of the extended principal component analysis using the Hill-Smith method based on 43 characters scored from 171 representing 20 morphogroups of the genus *Cyrtorchis*: arc, *C. arcuata* subsp. *arcuata*; acu, *C. acuminata*; affpra, *C. aff. praetermissa*; affrin, *C. aff. ringens* sp1; asc, *C. aschersonii*; bro, *C. brownii*; cha, *C. chailluana*; cra, *C. crassifolia*; gui, *C. guillaumetii*; ham, *C. hamata*; hen, *C. henriquesiana*; inj, *C. injoloensis*; let, *C. letouzeyi*; mon, *C. monteiroae*; neg, *C. neglecta*; oku, *C. aff. guillaumetii* "Oku"; pra, *C. praetermissa*; rin, *C. ringens*; sub, *C. submontana*; why, *C. arcuata* subsp. *whytei*. Only the variables

showing the highest contribution on these two axes are represented. See Appendix III-2 for codes used for variables. 140

Figure S2. Scatter plots of the first and fourth axes of the extended principal component analysis using the Hill-Smith method based on 43 characters scored from 171 representing 20 morphogroups of the genus *Cyrtorchis*: arc, *C. arcuata* subsp. *arcuata*; acu, *C. acuminata*; affpra, *C. aff. praetermissa*; affrin, *C. aff. ringens* sp1; asc, *C. aschersonii*; bro, *C. brownii*; cha, *C. chailluana*; cra, *C. crassifolia*; gui, *C. guillaumetii*; ham, *C. hamata*; hen, *C. henriquesiana*; inj, *C. injoloensis*; let, *C. letouzeyi*; mon, *C. monteiroae*; neg, *C. neglecta*; oku, *C. aff. guillaumetii* "Oku"; pra, *C. praetermissa*; rin, *C. ringens*; sub, *C. submontana*; why, *C. arcuata* subsp. *whytei*. Only the variables showing the highest contribution on these two axes are represented. See Appendix III-2 for codes used for variables. 141

Figure S3. Phylogenetic relationships of the genus *Cyrtorchis* produced by the Bayesian inference of the plastid (*matK*, *rps16*, *trnC-petN*, *trnL-trnF*, *ycf1*) regions (72 accessions, 21 taxa, 6178 characters). Posterior probabilities (PP) and bootstrap values (BS) from maximum likelihood analyses are indicated above the branches. The well-resolved clades from trees resulting from both analyses are here renamed with letters. 142

Figure S4. Phylogenetic relationships of the genus *Cyrtorchis* produced by the Bayesian inference of the nuclear (*nrlTS-1*) marker (67 accessions, 21 taxa, 380 characters). Posterior probabilities (PP) and Bootstrap values (BS) from Maximum likelihood analyses are indicated above the branches. The well-resolved clades from trees resulting from both analyses are here renamed with letters. 143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1. Résumé des différents traitements taxonomiques du genre depuis sa description à ce jour	20
Tableau II-1. Caractéristiques distinctives des deux espèces pour l'étude de la biologie de la pollinisation.....	48
Tableau III-1. Diagnostic characters (in bold) distinguishing the 15 recognized taxa of the genus <i>Cyrtorchis</i> present in central Africa.	81
Tableau III-2. Comparison of key morphological characters distinguishing the 27 species and morphogroups of <i>Cyrtorchis</i> . Character states in bold are the most discriminant one. Clade column: indicates clade in the phylogenetic trees (Figure III-21, Figures S3 & S4,); M column: X indicates taxa that were resolved with morphometric analyses; taxa names followed by a * are new taxa to be described.	132
Tableau III-3. Phénologie de la floraison par taxon suivi à l'ombrière de Yaoundé durant les trois années. Le symbole (-) indique que l'espèce n'était pas encore en culture à l'ombrière.	166
Tableau III-4. Breeding system and reproductive success assessments of <i>Cyrtorchis okuensis</i> under natural and manual, controlled pollination experiments. Values in brackets represent the percentage of sample size (total number of flowers used or fruits produced) per treatment.	185
Tableau III-5. Phénologie de la floraison et évaluation du succès reproducteur dans la population de <i>Cyrtorchis letouzeyi</i> au cours de deux années consécutives (2018 et 2019) dans la réserve de faune du Dja.....	191
Tableau III-6. Fréquence et durée des différents types d'interactions observés chez <i>Cyrtorchis letouzeyi</i>	195
Tableau III-7. Liste des Sphingidae capturés à l'aide du piège lumineux et identifiés (nombre d'individus capturés et longueur moyenne du proboscis).	199
Tableau III-8. Mean parameters of the reproductive success for pollinated individuals of <i>C. aschersonii</i> . Viable seed weight in milligrams and Maturation time in days.....	208
Tableau III-9. Mean parameters of reproductive success for pollinated individuals of <i>C. ringens</i> . Viable Seed weight in milligrams and Maturation time in days.	209
Tableau IV-1. Récapitulatif des différences de distribution et des paramètres de reproduction de quelques espèces basée sur les données de littérature (distribution) et de suivi phénologique à l'ombrière de Yaoundé et sur le terrain (Floraison, éperon et pollinisateur).....	229
Tableau V-1. Locus, séquences des amorces et noms des programmes d'amplification correspondants.....	267
Tableau V-2. Programme d'amplification PCR utilisés pour les différentes régions au laboratoire EBE.....	268
Tableau V-3. Programme utilisé pour la réaction de séquençage.	269

LISTE DES ANNEXES

Appendix III-1. Taxon list of the 255 specimens representing 27 morphospecies used for morphological study including the 171 used for morphometric analysis of the genus <i>Cyrtorchis</i> . Species; country; locality and additional information; voucher (+ herbarium code). Numbers followed by “*” identify specimens used for morphometric analyses and “x” indicates specimens used for both the molecular and morphological analyses.	144
Appendix III-2. List of variables assessed for the study of species of the genus <i>Cyrtorchis</i> . The characters used in morphometric analyses are indicated with the symbol “X” in the 5 th column and those used in the morphological character evolution are indicated with the symbol “*” in the 6 th column.....	149
Appendix III-3. Taxon list of the 73 individuals sampled for the molecular analysis in the current study including the four outgroups species. Species are listed in alphabetical order. Specimens identifier is in front of species name. The herbarium cited in brackets indicates where the silica gel sample is currently housed. GenBank accession numbers are included for each of the six genic regions used in the current study (ITS, <i>trnL-trnF</i> intergenic spacer, <i>matK</i> , <i>rps16</i> , <i>trnC-petN</i> intergenic spacer and <i>ycf1</i>). An asterisk (*) indicates sequences newly generated in this study; an en-dash (–) indicates unsequenced regions. GenBank accession numbers for sequences of unpublished taxa are not provided and are indicated with an en-dash followed by an asterisk (–*).	153
Appendix III-4. Diagnostic characters for the 27 identified morphospecies of the genus <i>Cyrtorchis</i> . The most discriminant features are represented in bold.	156
Appendix III-5. Percentage of variance and cumulative percentage of variance explained by the four first axes and loading of variables on these four-principal components of the Hill and Smith analysis with discrete characters on the 171 specimens of the genus <i>Cyrtorchis</i> . Values in bolds are the highest loadings of the principal component and those followed by the symbol * are the highest loadings of the principal component included in the scatter plots.	160
Appendix III-6. Percentage of variance and cumulative percentage of variance explained by the two first axes and loading of variables on these two-principal components of PCA analysis with discrete characters on the 171 specimens of the genus <i>Cyrtorchis</i> . Values in bolds are the highest loadings of the principal component and those followed by the symbol * are the highest loadings of the principal component included in the scatter plots. .	161
Appendix III-7. Morphological character matrix used for the ancestral character-state reconstructions of the genus <i>Cyrtorchis</i> . Full character names are as follow: Viscidium structure: uniformly linear with hyaline texture (0), broad indurated upper part and thin hyaline part (1); Stipites shape: enlarged toward the apex (0), thinner toward the apex (1); Stipites apex shape: bilobed (0), entire asymmetric acute (1), entire symmetric obtuse (2), entire symmetric acute (3); Lateral lobes of rostellum shape: not widened, almost parallel-sided (0), widened just above the very narrow base (1), widened all along (2); Insertion point of stipites: halfway along the length of the viscidium (0), at the rear third of the length of the viscidium (1); Ovary and fruit shape: not triquetrous not ribbed (0), triquetrous with three smooth sides (1), triquetrous with three ribbed sides (2), rounded in cross section (3).	162
Appendix III-8. Feature and statistics of DNA datasets used in this study for each marker.....	164
Appendix III-9. Image of scanned slide of <i>C. aschersonii</i> (A-B) and <i>C. ringens</i> (C). (Red seeds= viable seeds, white seeds=non-viable seeds). Scanned slides with 100% viable seeds, with 50% viable seeds (B), scanned slide with 5% of viable seeds (C).	217

Appendix III-10. Correlation of the variables with the treatments (Spearman's rank correlation) in *Cyrtorchis aschersonii*. $p = P\text{-value}$, $\rho = rho$ 217

Appendix III-11. Correlation of variables with the treatments (Spearman's rank correlation) in *C. ringens*. $p = P\text{-value}$, $\rho = rho$ 219

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN : Acide désoxyribonucléique (deoxyribonucleic acid)

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

CDB : Convention pour la diversité biologique

CITES : Convention sur le Commerce International des Espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (Convention on International Trade of Endangered Species)

GSPC : La Stratégie mondiale pour la conservation des plantes (Global Strategy for Plant Conservation)

Chapitre I Introduction Générale



@ Vincent Droissart

Mont Oku Nord-Ouest Cameroun, Mai 2017

1.1 CONTEXTE

La biodiversité des forêts tropicales africaines est de plus en plus fragilisée par la dégradation des milieux en réponse aux changements climatiques en cours et aux pressions anthropiques croissantes (Aleman *et al.*, 2018; Couvreur *et al.*, 2021). D'après Stévant *et al.* (2019), un tiers de cette biodiversité serait potentiellement menacé d'extinction dans un avenir proche. Pourtant, ces forêts sont universellement connues pour leurs niveaux élevés de diversité et d'endémisme en espèces végétales (Linder *et al.*, 2012; Droissart *et al.*, 2018) et animales (Jenkins *et al.*, 2013). Il n'en demeure pas moins que l'estimation de cette diversité végétale en vue de sa conservation pose encore beaucoup de problèmes (Sosef *et al.*, 2017). Une meilleure prise en compte de celle-ci passe nécessairement par l'identification précise des entités à conserver, la connaissance de leur écologie et de leurs modalités de reproduction. Afin de conserver efficacement la biodiversité et de définir les zones prioritaires pour la conservation, il faut tout d'abord connaître ce qui existe (Sosef *et al.*, 2017; Raven *et al.*, 2020), d'où la nécessité de mener des études taxonomiques afin de mieux circonscrire les taxons et de les intégrer dans l'élaboration de stratégies raisonnées et pérennes de conservation.

La systématique et la biologie de la reproduction ont été étroitement liées tout au long de l'histoire de la botanique car elles reposent sur des caractères reproductifs (Anderson *et al.*, 2002). Ces caractères aident à délimiter les frontières entre les espèces, tout en permettant de mieux comprendre l'évolution de leurs systèmes de reproduction (**Figure I-1**). Malgré cette proximité, peu d'études ont mis en évidence l'intérêt des données de biologie de la reproduction pour interpréter la valeur fonctionnelle de la morphologie. Pourtant, les études combinant les deux approches ont montré l'importance de cette synergie pour d'autres domaines fondamentaux tels que les études sur l'adaptation, la spéciation, la nature des espèces et l'hybridation (Anderson *et al.*, 2002; Neal et Anderson, 2005). Selon Ornduff (1969), une telle connaissance peut aider à faire des investigations taxonomiques poussées et à comprendre une grande partie des variations florales qui fournissent la matière première pour la classification taxonomique. En effet, les données de la biologie de la reproduction permettent de mieux comprendre la fonction des caractères structurels utilisés en taxonomie, puisqu'ils révèlent les homologues appropriés des états de caractère (Pandey *et al.*, 2016). Par ailleurs, les informations précises sur la biologie de la reproduction des plantes sont indispensables pour développer des moyens efficaces pour leur conservation et leur utilisation durable (Sreekala, 2017). La maîtrise préalable de ces aspects de systématique et de biologie de la reproduction devrait donc constituer un outil clé à mettre en place, pour proposer des stratégies de conservation efficaces de population d'espèces menacées.

Face aux difficultés de la préservation à long terme de populations d'espèces menacées dans leur habitat naturel, des approches complémentaires à la conservation *in situ* sont indispensables. La

conservation *ex situ* à travers des banques de graines qui permettraient une réintroduction éventuelle des espèces dans les habitats dégradés, constitue une approche assez connue et efficace de conservation, mais est encore très peu répandue en Afrique (Merritt et Dixon, 2011). Afin d'implémenter cette approche de conservation *ex situ* en Afrique tropicale, il faudrait sans doute prioriser les groupes ou familles de plantes les plus sensibles à ces facteurs de dégradation des milieux naturels comme les Orchidaceae.

A l'image des hotspots de biodiversité, les Orchidaceae constituent en quelque sorte des « hotspots taxonomiques » du fait de leur haute diversité en espèces et des menaces à plus ou moins court terme qui pèsent sur cette famille, ce qui en fait un groupe clé pour toute stratégie de conservation en milieu tropical (Pillon et Chase, 2007). Cependant, plusieurs genres nécessitent encore une révision taxonomique. En dépit de l'intégration récente des données moléculaires aux données morphologiques pour l'établissement d'une classification robuste au sein des Orchidaceae (Pridgeon *et al.*, 1999, 2001; Chase *et al.*, 2003; Pridgeon *et al.*, 2003, 2005, 2009, 2014; Chase *et al.*, 2015), leur taxonomie demeure incomplète du fait de leur grande variabilité morphologique et de leur non résolution phylogénétique. Ceci est particulièrement accentuée dans la sous-famille des Epidendroideae (Freudenstein et Chase, 2015; Li *et al.*, 2019). Au sein de cette sous-famille, la sous-tribu des Angraecinae au sens large, aussi appelée orchidées « angraecoides » (Epidendroideae, Vandae, Angraecinae), n'a cessé de fasciner les naturalistes et les biologistes évolutionnistes depuis l'époque de Darwin (Micheneau *et al.*, 2009). Des études moléculaires récentes ont examiné les relations phylogénétiques de différents genres au sein des angraecoides à Madagascar, dans les îles Mascareignes (Andriananjamanantsoa *et al.*, 2016; Carlsward *et al.*, 2006a, b; Micheneau *et al.*, 2008a) et dans les néotropiques (Carlsward *et al.*, 2003; Pessoa *et al.*, 2018). Simo-Droissart *et al.*, (2018a), en fournissant un cadre phylogénétique moléculaire pour 43 genres et 316 espèces, ont permis de faire des progrès dans notre compréhension de la systématique des orchidées angraecoides d'Afrique continentale, avec la révision taxonomique de nombreux genres (Verlynde *et al.*, 2013; Descourvières *et al.*, 2018; D'hajjère *et al.*, 2019; Farminhão *et al.*, 2018, 2020; Simo-Droissart *et al.*, 2018a; b).

Comme la plupart des espèces de plantes tropicales, l'évaluation du statut de conservation des espèces d'orchidées reste limitée, ce qui réduit considérablement notre capacité à pouvoir définir des priorités pour la conservation (Stévant *et al.*, 2019). En effet, seulement 5,6 % des espèces d'orchidées recensées (Govaerts *et al.*, 2020) font partie de la liste rouge de l'UICN et un peu plus de la moitié de ces espèces (729 espèces) évaluées font parties des catégories de menaces (IUCN, 2020). En Afrique continentale, le nombre d'espèces évaluées suivant les critères et catégories UICN représentent environ 18 % des espèces d'orchidées recensées, ce qui constitue un progrès non négligeable dans l'effort de

documentation du statut de conservation de ces orchidées africaines. Cependant, des efforts restent encore à fournir de ce point de vue pour s'assurer du niveau de menace de ces espèces.

La biologie de la reproduction des orchidées devient un sujet d'intérêt en raison du nombre croissant d'espèces menacées. Cet intérêt pour la biologie de la reproduction est également lié à l'importance des interactions entre les orchidées et leurs pollinisateurs pour leur pérennité, interactions qui seraient à l'origine de la complexité de leur morphologie et de la grande diversité observée au sein de cette famille (Schatz *et al.*, 2013). Cette complexité de la morphologie florale est étroitement liée aux pressions de sélection effectuées par les pollinisateurs sur les traits floraux, et inversement, d'où la notion de syndrome de pollinisation contestée (Fenster *et al.*, 2004). Très peu d'informations existent sur la biologie de la reproduction des orchidées africaines en général et des épiphytes en particulier. C'est le cas du genre africain *Cyrtorchis* Schltr. qui fait l'objet de cette thèse.

Décrit par Rudolf Schlechter (1914) comme distinct du genre *Angraecum* Bory et caractérisé par ses fleurs blanches en étoile, le genre *Cyrtorchis* fait partie des Orchidaceae épiphytes dont les espèces sont distribuées sur tout le continent et certaines espèces comme *Cyrtorchis arcuata* (Lindl.) Schltr. sont présentes dans presque tous les écosystèmes d'Afrique tropicale (La Croix, 2003). Cependant, il est réputé pour être complexe sur le plan taxonomique, à cause de fortes ressemblances entre les fleurs, ce qui les rend difficiles à identifier au niveau de l'espèce (Baker, 1994; Cribb, 1989; la Croix et Cribb, 1998; Stewart *et al.*, 2006; Summerhayes, 1960). Selon Cribb (1989), cette grande similitude florale serait, probablement due à un syndrome de pollinisation commun, la sphingophilie, défini, par un ensemble de caractères adaptés à la pollinisation par les papillons de nuit, les sphinx. La sphingophilie est très répandue dans le groupe des orchidées angraecoides. L'examen des spécimens récemment collectés lors des missions de terrain réalisées en Afrique centrale dans le cadre d'un projet sur les orchidées angraecoïdes (http://nsf.gov/awardsearch/showAward?AWD_ID=1051547) a révélé une grande variabilité de la morphologie végétative et florale. Cette variabilité rend difficile la délimitation précise des espèces de *Cyrtorchis* d'où les nombreux complexes (groupe d'espèces très proches morphologiquement de sorte que les frontières entre elles sont difficiles à établir) observés (par exemple *Cyrtorchis arcuata* (Lindl.) Schltr., *Cyrtorchis ringens* (Rchb.f.) Summerh., *Cyrtorchis brownii* (Rolfe) Schltr.). Par ailleurs, des analyses préliminaires basées sur des données morphologiques (Carlsward *et al.*, 2006a) et moléculaires ADN (Carlsward *et al.*, 2006b; Simo-Droissart *et al.*, 2018a) ont révélé que le genre *Cyrtorchis* est monophylétique, mais qu'il existe encore des lacunes taxonomiques au sein du genre. En effet, la classification infragénérique du genre *Cyrtorchis* est encore questionnée. En révisant le genre, Summerhayes (1936, 1948, 1960) a trouvé d'importantes caractéristiques du gynostème qu'il a utilisées pour proposer une classification infragénérique du genre, avec deux sections distinctes : *Cyrtorchis* sect. *Homocolleticon* Summerh. et *Cyrtorchis* sect.

Cyrtorchis Summerh. Cependant, ces deux sections ne semblent pas être monophylétiques, sur la base des phylogénies moléculaires récentes (Simo-Droissart *et al.*, 2018a). Par conséquent, la monophylie de ces deux sections définies morphologiquement doit encore être confirmée à travers des analyses moléculaires et un échantillonnage plus exhaustif.

Bien connu pour ses grandes fleurs parfumées prolongées par un long éperon, le genre *Cyrtorchis* constitue un groupe facilement accessible pour des études sur la biologie de la reproduction. Pourtant, à l'exception des travaux de Cribb (1989) sur l'hypothèse de la sphingophilie dans le genre, aucune autre information n'est à ce jour disponible sur la biologie de la reproduction des espèces de *Cyrtorchis*. L'évaluation de leur statut de conservation reste à effectuer pour la quasi-totalité du groupe vu qu'une seule espèce *Cyrtorchis glaucifolia* Summerh. a été évaluée par Rokni *et al.* (2018) comme *en danger* sur le site de l'UICN. Afin de pouvoir prétendre à la conservation des espèces de *Cyrtorchis*, il serait primordial de clarifier la délimitation des espèces à travers l'intégration des connaissances en systématique et en biologie de la reproduction.

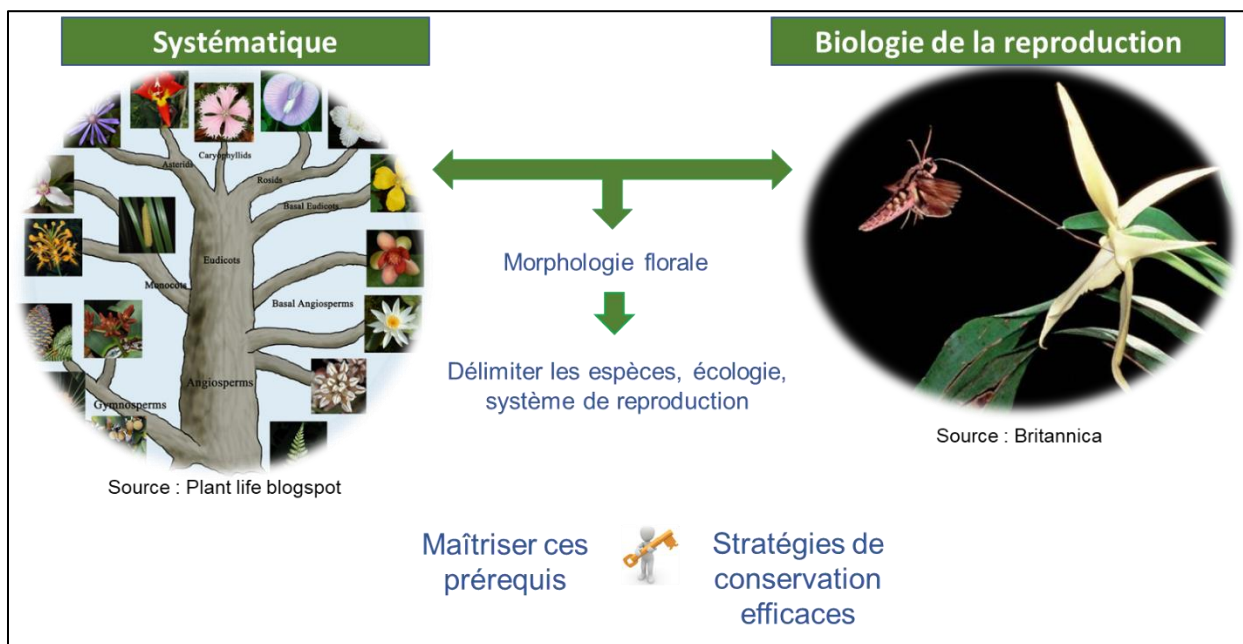


Figure I-1. Approche intégrative de la systématique et la biologie de la reproduction dans le développement des stratégies de conservation des espèces.

I.2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.2.1 NOTION D'ESPÈCE ET IMPLICATION POUR LA CONSERVATION

L'espèce est l'unité fondamentale en biologie (Hey, 2006). Le terme espèce reste cependant difficile à définir, tant en théorie qu'en pratique. Cette controverse est connue comme étant le « problème de l'espèce » qui résulterait de la manière dont les biologistes ont essayé de traiter la variation des caractères qui est l'un des aspects fondamentaux de ce problème (Pavlinov, 2013; Sosef *et al.*, 2020). De nombreux critères ont été utilisés pour délimiter les espèces, tels que la discontinuité morphologique, la capacité de fécondation, l'isolement reproducteur, la parenté entre ancêtres et descendants, l'adaptation écologique ainsi que la cohésion génétique, ce qui a conduit à une multiplication de concepts d'espèces. L'espèce est donc considérée différemment en fonction des domaines d'étude (Lee, 2003). A ce jour, 24 concepts ont été identifiés (Mayden, 1997) pour la délimitation des espèces. Cependant, plusieurs de ces concepts ont des orientations communes dans leurs définitions, conduisant ainsi certains auteurs à réduire considérablement le nombre de concepts d'espèces. A titre d'exemple, Le Guyader (2002) et Reydon (2004) ont simplifié cette notion en trois et douze concepts, respectivement. Dans le cadre de cette étude, la notion d'espèce sera abordée sous quatre différents concepts. (i) **L'espèce morphologique**, qui définit l'espèce par ses particularités morphologiques et s'applique tant aux organismes asexués que sexués et consiste à réunir sous une espèce, tous les individus possédants des caractères morphologiques semblables (Bray, 2009). (ii) **L'espèce biologique**, se définit comme « des groupes de populations naturelles interfertiles et isolées des autres groupes sur le plan de la reproduction » (Mayr, 1982). (iii) **L'espèce phylogénétique** qui a été largement documenté avec l'avènement des données moléculaires, définit une espèce comme un groupe d'individus partageant au moins un caractère dérivé unique, auquel appartiennent les ancêtres et les descendants d'une lignée évolutive (Cracraft, 1983). Suivant cette définition, l'espèce serait visualisée comme le plus petit groupe monophylétique ayant un ancêtre commun ou une unité monophylétique (Sosef *et al.*, 2020). (iv) **L'espèce évolutive**, définit une espèce comme « une lignée d'organismes interfertiles, isolée des autres lignées sur le plan de la reproduction, et qui a un début, une fin, une trajectoire évolutive et une histoire distinctes » (Wiley, 1978). Parmi ces concepts, c'est le concept biologique qui semble le plus communément admis. Compte tenu de ces divergences d'opinions sur la notion d'espèce, une approche intégrative est nécessaire pour s'assurer d'une meilleure délimitation des espèces dans un contexte de conservation.

I.2.2 DÉLIMITATION DES ESPÈCES : UNE APPROCHE INTÉGRATIVE INDISPENSABLE POUR LA CONSERVATION

Depuis longtemps, l'espèce est considérée comme l'unité fondamentale dans plusieurs disciplines de la biologie, y compris en taxonomie, biogéographie, écologie, génétique des populations, macroévolution, systématique phylogénétique. Par conséquent, la bonne délimitation des espèces en tant qu'unité de base pour ces études est primordiale et doit constituer l'étape préliminaire indispensable pour l'implémentation de ces disciplines connexes. Cette délimitation des espèces est essentielle pour les biologistes de la conservation (Agapow *et al.*, 2004), car ces derniers dépendent fortement des listes établies, les traitant comme des mesures précises et stables de la biodiversité (Isaac *et al.*, 2004). L'étape de délimitation des espèces permet donc d'identifier, de décrire, d'estimer, d'évaluer la biodiversité, particulièrement pour une meilleure gestion de celle-ci. Malgré cette importance marquée de la délimitation des espèces, il n'y a pas d'accord préétabli sur les critères de délimitation d'espèces, en raison de divergences sur le point de vue adopté par les différentes disciplines biologiques (Duminil et Di Michele, 2009).

La procédure de délimitation des espèces en particulier les espèces végétales, a longtemps reposé sur les caractères morphologiques. Cependant, ce concept morphologique de l'espèce présente une ambiguïté perceptible étant donné qu'elle peut regrouper aléatoirement des individus sur l'unique base de la ressemblance comme le soulignait Darwin (1859). En effet, les individus de la même espèce peuvent présenter des variations morphologiques ou certaines espèces de même morphologie peuvent être regroupées, à tort, en une seule espèce (Pratt et Clark, 2001; Whittall *et al.*, 2004). Sur le terrain, la reconnaissance et l'échantillonnage des espèces sont généralement basées sur des caractères morphologiques, mais elles peuvent soit ne pas discriminer les espèces et masquer la présence d'espèces cryptiques ou discriminer différentes espèces alors qu'en réalité il n'y en a qu'une espèce polymorphe (Duminil et Di Michele, 2009). Plusieurs études récentes ont déjà démontré les limites de l'utilisation des traits morphologiques à travers l'utilisation des marqueurs génétiques pour la délimitation des espèces d'arbres (Ikabanga *et al.*, 2017; Lissambou *et al.*, 2019) et des espèces d'orchidées (Simo-Droissart *et al.*, 2018; Simo, 2014; Verlynde *et al.*, 2018; D'hajjère *et al.*, 2019). Ces études ont démontré que la délimitation de certaines espèces n'est pas évidente à la seule inspection visuelle des caractères morphologiques. Aujourd'hui, les études de taxonomie bénéficient donc amplement de l'essor des études basées sur l'utilisation des marqueurs moléculaires (phylogénie, génétique des populations etc.) pour résoudre la problématique des complexes d'espèces.

L'utilisation de marqueurs moléculaires comme outils pour la délimitation des espèces a considérablement augmenté au cours des dernières décennies en Afrique (Duminil *et al.*, 2011, 2012).

La combinaison des marqueurs génétiques et morphologiques est une approche puissante pour la délimitation des espèces, notamment pour les complexes d'espèces tropicales (Duminil et Di Michele, 2009). Cette complémentarité des approches utilisées pour délimiter les espèces devient utile pour aboutir à un jugement plus intégratif. Elle permet d'une part l'identification des espèces taxonomiques sur la base des clés d'identifications élaborées à partir des caractères morphologiques discriminants mais aussi d'identifier les barrières reproductives (phénologie, pollinisateurs).

Cependant, les nombreuses exceptions, et incongruences entre marqueurs génétiques et caractères morphologiques résulteraient soit de lacunes dans la révision taxonomique, soit d'un manque de différenciation morphologique claire malgré la divergence génétique entre les espèces, conduisant ainsi aux « espèces cryptiques » (Heinrichs *et al.*, 2009). Déterminer les rôles de l'isolement reproducteur, de l'hybridation et de la clonalité dans les taxons morphologiquement indiscernables est tout aussi essentiel pour déterminer les classements taxonomiques appropriés au niveau de l'espèce à des fins de conservation (Whittall *et al.*, 2004). Pour une meilleure conservation, il est nécessaire que la délimitation de l'espèce qui est l'une des notions de base pour l'évaluation de la biodiversité soit sans équivoque pour tous les acteurs de la conservation de la biodiversité. Par conséquent, un travail en synergie des taxonomistes et des biologistes de la conservation est nécessaire pour indiquer des principes explicites dans la délimitation des unités à considérer comme des espèces afin d'évaluer leur statut de conservation et de mieux planifier leur conservation.

1.2.2.1 FAMILLE DES ORCHIDACEAE

1.2.2.1.1 CARACTERES GENERAUX DES ORCHIDACEAE

La famille des Orchidaceae Juss. sont l'une des très rares lignées de plantes à fleurs à avoir colonisé avec succès des niches écologiques épiphytiques, terrestres ou lithophytiques, par leur croissance dans des conditions sèches en utilisant le métabolisme de l'acide crassulacéen (Cai *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016) même si le mécanisme prédominant de la photosynthèse chez la plupart des espèces se fait via la voie C3 (Heyduk *et al.*, 2019). Ainsi, les membres de cette famille végétale sont connus pour occuper des habitats variés ; la majorité des espèces sont épiphytes (environ 35 % des épiphytes vasculaires des canopées en forêts tropicales), alors que d'autres sont lithophytes, ou encore terrestres, et rarement saprophytes (Gentry et Dodson, 1987; Dressler, 1993). Deux modes de croissance sont décrits pour cette famille : la croissance monopodiale (une seule tige principale) généralement caractérisée par une floraison axillaire et la croissance sympodiale (plusieurs tiges ou pseudobulbes rattachés à une racine principale et horizontale) caractérisée par une floraison généralement terminale. Comme la majorité des plantes vasculaires, les orchidées ont des feuilles, très peu en sont dépourvues. Ces feuilles sont parfois réduites en écailles ressemblant à des bractées mais sont en

général simples et entières, à apex aigu ou obtus, bilobé ou denté à nervation parallèle. La forme et la taille des feuilles sont très variables au sein de la famille. Les racines des orchidées dépendent de leur mode de vie. Chez les épiphytes, elles sont aériennes, adventices et photosynthétiques pouvant atteindre quelques mètres de long. Communément appelé « velamen », l'épiderme spongieux gris-argentée, blanc ou brun constitué de plusieurs couches de cellules mortes qui recouvrent les racines joue un rôle important dans l'absorption de l'eau et des sels minéraux issus des précipitations, du ruissellement ou de l'humidité de l'air. Cette structure est présente chez pratiquement toutes les orchidées épiphytes ainsi que chez de nombreux genres terrestres (Zotz *et al.*, 2017) et aurait constitué une préadaptation à l'évolution de l'épiphytisme qui est si répandu dans la famille aujourd'hui (Dressler, 1981; Gravendeel *et al.*, 2004). Chez les orchidées aphylls comme *Microcoelia* spp., *Dendrophylax* spp., la partie supérieure des racines est riche en chlorophylle ce qui leur permet d'effectuer activement la photosynthèse. Les orchidées ont des racines, des tiges et des feuilles souvent assez charnues qui leur permettent de stocker de l'eau et des éléments nutritifs et afin d'être mis à disposition de la plante pendant les longues périodes de stress environnemental comme le manque d'eau.

Les inflorescences chez les orchidées peuvent être simples ou composées. Les fleurs d'orchidées sont en général zygomorphes et hermaphrodite, parfois actinomorphes et rarement unisexuées. La structure florale des orchidées est formée d'un périanthe trimère, composé de six tépales répartis en deux verticilles semblables ou non. Le verticille externe comprend trois tépales distincts ou souvent très semblables, appelés sépales. Le verticille interne est constitué de pétales. Deux des trois pétales sont très souvent semblables. Généralement fortement modifié en forme et/ou en coloration, le labelle constitue le troisième pétale et peut être simple ou constitué de deux parties : l'hypochile et l'épichile (**Figure I-2**). Le pistil composé de trois carpelles uniques constitue l'organe femelle, le gynécée. Le gynécée est presque toujours fusionné à l'androcée et forme une structure unique chez les orchidées appelée colonne ou gynostème. Une autre caractéristique principale retrouvée chez la grande majorité des orchidées est la présence de masses plus ou moins compactes et cohérentes de grains de pollen encore appelées pollinies (Dressler, 1993). Chez la plupart des orchidées, ces pollinies sont reliées à un viscidium adhésif formant une structure appelée pollinarium. Ce dernier a certainement joué un rôle majeur dans l'évolution des Orchidaceae grâce au transfert efficace du pollen même en cas de faible taux de visite (Dressler, 1993; Johnson et Edwards, 2000). Le pollinarium s'effile dans la caudicule ou stipite qui est attachée au viscidium dont la forme varie d'une espèce à l'autre. Le stigmathe est généralement divisé en deux ou trois lobes similaires. Le rostellum qui est une cloison qui sépare l'androcée du gynécée, permettrait d'éviter l'autofécondation. L'ovaire est infère et est uni- à triloculaire avec plusieurs minuscules ovules pariétaux.

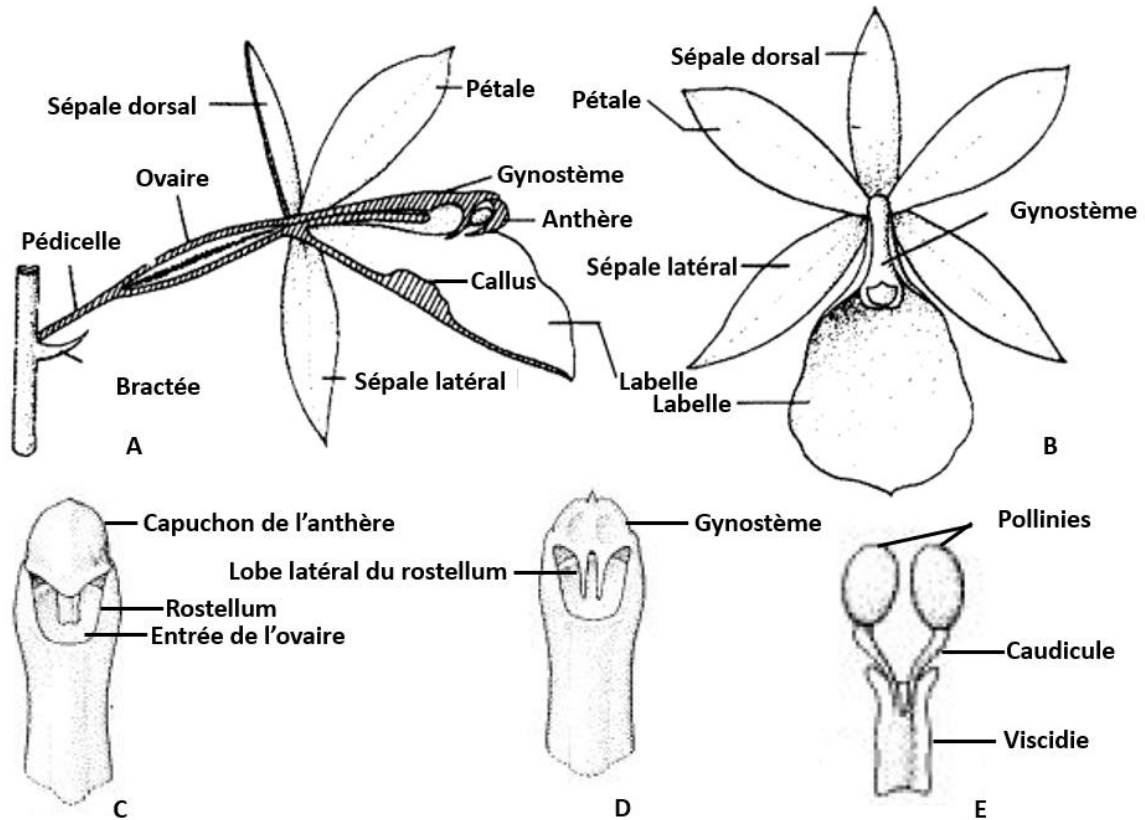


Figure I-2. Structure de la fleur des Orchidaceae. (a) Vue latérale ; (b) vue frontale ; (c) détails du gynostème ; (d) détail du pollinarium. (a), (b) (c) et (d) modifiés d'après Dressler (1981).

Chez les orchidées, le fruit est une capsule déhiscente à trois ou six fissures, qui peut libérer plusieurs milliers à plusieurs millions de graines à maturité ((Barthlott *et al.*, 2014), **Figure I-3 A-B**). Les orchidées ont en majorité des graines minuscules ressemblant à de la poussière. Leur longueur allant de 0,1 à 6 mm et leur poids de 0.31 μg à 24 μg (Arditti et Ghani, 2000a; Barthlott *et al.*, 2014) font de ces graines les plus petites en taille et en poids de toutes les Angiospermes. Grâce à ces propriétés et à leur forme plus ou moins fusiforme et leur flottabilité, les graines peuvent être transportées sur de longues distances dans l'air (Aybeke, 2013). Contrairement à d'autres orchidées, la vanille a des fruits parfumés et de grosses graines collantes qui suggèrent qu'elles pourraient être dispersées par les animaux (Roberts et Dixon, 2008). Une étude plus récente réalisée sur une espèce mycohétérotrophe, *Cyrtosia septentrionalis* (Rchb.f.) Garay, a également révélée une dispersion des graines par des oiseaux (Suetsugu *et al.*, 2015a). Les graines d'Orchidaceae sont caractérisées par un petit embryon rudimentaire enveloppé d'une fine couche de tégument (Roberts et Dixon, 2008) entouré d'un grand espace d'air intérieur qui les rend très flottants à la fois dans l'air et dans l'eau (**Figure I-3 C**) (Arditti et Ghani, 2000a). Cette réduction du volume et du contenu des graines au minimum est un aspect essentiel de l'évolution des Orchidaceae (Zhang *et al.*, 2017). Elles sont dépourvues de réserves et nécessitent donc obligatoirement une association symbiotique avec un champignon, en début de leur

développement au stade de protocorme, pour une éventuelle germination. L'embryon, très réduit, est constitué de quelques cellules seulement, même si on rencontre aussi des espèces polyembryonnaires, comme *Thecostele alata* C.S.P.Parish & Rchb.f. (Barthlott *et al.*, 2014).

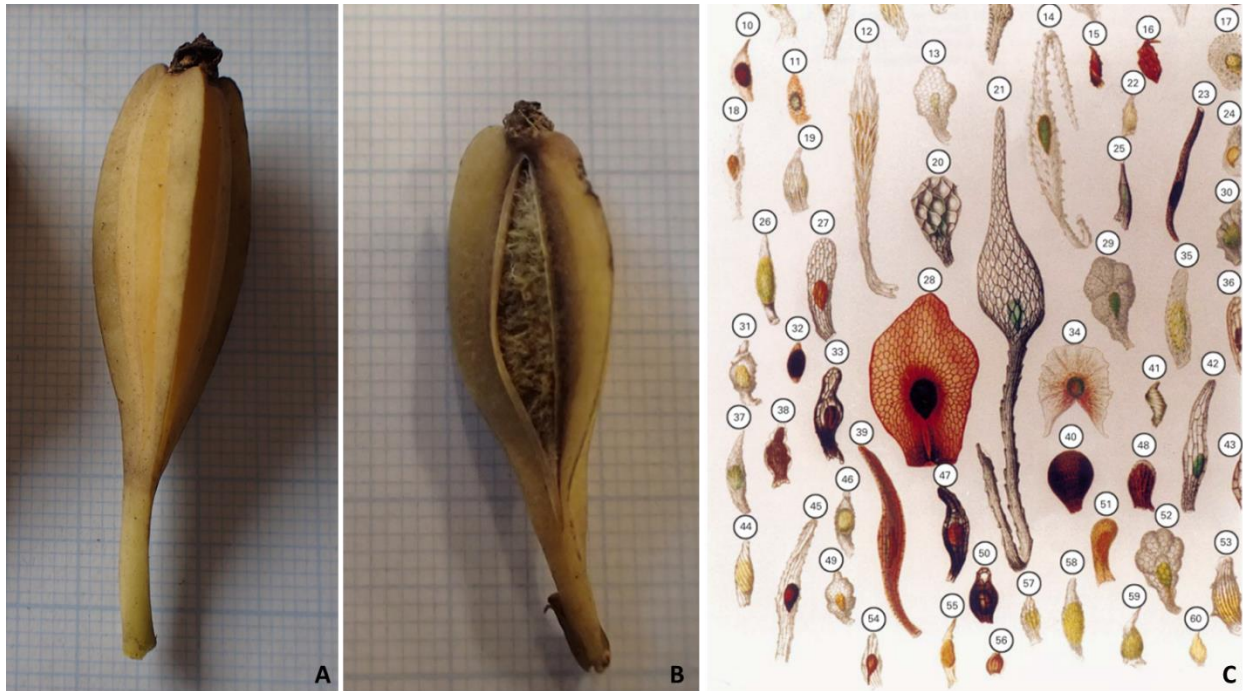


Figure I-3. Structure d'un fruit et des graines d'orchidées. A. Fruit mûr de *Cyrtorchis aschersonii* (*Epidendroideae*). B. Fruit ouvert de *C. aschersonii* laissant entrevoir les petites graines mûres en forme de poudre de couleur marron à l'intérieur. C. Peintures et photographies montrant la grande diversité des graines d'orchidées (adapté d'après Arditti et Ghani, 2000).

1.2.2.1.2 CONSERVATION DES ORCHIDACEAE

Les orchidées représentent près de 8 % des espèces de plantes à fleurs, ce qui induit des défis pour la conservation en raison de leur biologie complexe et souvent méconnue, notamment leurs interactions avec les champignons mycorhiziens, les pollinisateurs et les arbres hôtes dans le cas des épiphytes (Fay, 2018). En raison de ces interactions multiples, les orchidées sont particulièrement complexes à protéger vu qu'elles dépendent d'autres organismes qui sont aussi affectés par la dégradation des habitats ou les changements climatiques (Fay et Chase, 2009; Fay *et al.*, 2015; Gale *et al.*, 2018). Les menaces qui pèsent sur les orchidées sont principalement regroupées sous la dégradation de l'habitat, la surcollecte, l'exploitation non durable et illégale d'espèces prisées pour l'horticulture (Hinsley *et al.*, 2018), les usages médicaux (Pant et Rinchen, 2012; Rankou et Kumar, 2015; Leon et Lin, 2017) et à des fins alimentaires (Menzepoh, 2011; Veldman *et al.*, 2014; Hinsley *et al.*, 2017). En Afrique centrale, les principales menaces pour les orchidées sont l'agriculture itinérante, l'exploitation forestière sélective et l'urbanisation (Simo-Droissart *et al.*, 2020; Simo-Droissart *et al.*, 2020).

Compte tenu de leur valeur commerciale horticole élevée, les orchidées sont sujettes à l'exploitation illégale dans leurs habitats naturels. Par exemple, la collecte illégale de *Paphiopedilum vietnamense* décrit en 1999 a conduit à son extinction dans la nature en 2003. De même, en Afrique Zambézienne, on estime que 2,2 à 4 millions de tubercules de certaines espèces d'orchidées utilisées pour la production du gâteau appelé « *chikanda* » sont commercialisés illégalement entre la Tanzanie et la Zambie chaque année (Roberts et Dixon, 2008). A cause de ces différentes menaces, les orchidées sont aujourd'hui toutes inscrites à la Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) dans les annexes I et II, où elles représentent environ 70 % des espèces listées (Hinsley *et al.*, 2018).

La mise en place de stratégies efficaces de conservation des espèces requiert une évaluation mais aussi un suivi des espèces rares et menacées. A ce jour, seulement 5,6 % des 28484 espèces d'Orchidaceae recensées par Govaerts *et al.*, (2020) ont été évaluées selon les catégories et critères de la liste rouge mondiale de l'UICN (IUCN, 2020). Un peu plus de la moitié (56,5 %) des espèces qui ont été évaluées font partie de l'une des catégories de menace, c'est-à-dire *en danger critique d'extinction* (CR), *en danger* (EN) et *vulnérable* (VU). Bien qu'un des objectifs principaux de la GSPC (Global Strategy for Plant Conservation) adopté à Nagoya au Japon en 2010 lors de la 10^{ème} Conférence des Parties de la CDB (Convention pour la diversité biologique) était de parvenir d'ici l'an 2020 à une évaluation préliminaire pour la Liste Rouge de l'UICN du statut de conservation de toutes les espèces végétales connues, le statut de la quasi-totalité des espèces d'Orchidaceae reste encore à évaluer.

Toutes les espèces de la sous-famille des Cyripedioideae (les orchidées sabot) ont été évaluées pour la Liste rouge mondiale depuis 2015 ; parmi celles-ci environ 90 % ont été évaluées comme menacées par la dégradation des habitats et/ou la surcollecte sur le terrain (Fay et Rankou, 2016). En Afrique continentale, le nombre d'espèces répertoriées dans la liste rouge ne représente que 18 % (513 espèces) des 2633 espèces d'Orchidaceae qui y sont recensées (Govaerts *et al.*, 2020). Malgré ce progrès non négligeable dans l'évaluation du statut de conservation des espèces d'Orchidaceae africaines, il reste tout de même important que ces évaluations pour la majorité des espèces restantes soient plus actives compte tenu des menaces sans cesse croissantes.

Protéger les orchidées implique une gamme variable de stratégies de conservation à mettre en place en fonction de l'espèce, de son mode de vie et de ses interactions biotiques et abiotiques. Parmi les outils de conservation actuellement développés pour les orchidées, la conservation *in situ* est considérée comme la plus efficace car la perte d'habitat est la menace la plus répandue pour la conservation en général (Brooks *et al.*, 2002) et cette préservation de l'habitat permettrait de maintenir les interactions biotiques indispensables. En effet, la préservation de l'habitat naturel des orchidées selon la Orchid Conservation Alliance préserve à la fois les orchidées, leurs pollinisateurs,

leur diversité génétique et d'autres espèces animales (OCA, 2017). Les orchidées jouent donc le rôle d'espèces «parapluies» en terme de conservation des écosystèmes. Cependant, La CDB a souligné l'importance de la conservation *ex situ*, en tant qu'approche complémentaire de la conservation *in situ* des espèces menacées.

I.2.2.1.3 CADRE TAXONOMIQUE ET PHYLOGENETIQUE

La famille des Orchidaceae constitue l'une des familles d'Angiospermes les plus diversifiées au monde avec 28484 espèces acceptées (Govaerts *et al.*, 2020) réparties dans environ 880 genres (Givnish *et al.*, 2016). Cette famille est probablement la seconde plus grande famille de plantes à fleurs après les Asteraceae (Chase *et al.*, 2015; Willis, 2017). Les orchidées poussent dans presque tous les habitats terrestres à l'exception des déserts les plus arides et de l'Antarctique (Givnish *et al.*, 2016). Elles sont majoritairement retrouvées dans les zones intertropicales où elles sont néanmoins les moins bien connues. Par exemple, environ 500 (Chase *et al.*, 2015) nouvelles espèces de cette famille sont encore décrites chaque année. Les orchidées sont apparues il y a environ 112 millions d'années en Australie (Givnish *et al.*, 2016), soit quelques dizaines de millions d'années après les premières angiospermes (Fu *et al.*, 2018). Plusieurs caractéristiques semblent avoir favorisé le taux élevé de spéciation observé au sein des orchidées : leurs graines minuscules, une germination dépendante de symbiotes mycorhiziens, le développement du gynostème, l'évolution des pollinies, l'épiphytisme, la distribution tropicale, la pollinisation via les lépidoptères et les abeilles, etc. (Givnish *et al.*, 2015). Si la famille a fait l'objet de nombreuses classifications depuis l'arrivée de la systématique linnéenne, celles-ci se sont révélées particulièrement difficiles.

Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, la grande diversité des orchidées et surtout le manque d'informations détaillées sur les relations au sein des Orchidaceae ont longtemps complexifié leur classification systématique et rendu difficile la formulation d'hypothèses évolutives explicites (Fay et Chase, 2009). Compte tenu de sa grande variabilité morphologique, le gynostème a été étudié et utilisé par plusieurs systématiciens pour être à la base de la classification des Orchidaceae (Brown, 1810; Lindley, 1840; Pfitzer, 1887; Schlechter, 1926; Szlachetko et Rutkowski, 2000; Szlachetko, 2003). Au début des années 1960, certains auteurs ont contesté la pertinence de tels caractères en systématique (Dodson, 1962; Pijl et Dodson, 1969) car la morphologie florale des Orchidaceae semble particulièrement plastique et étroitement liée à celle de leurs pollinisateurs (Dodson, 1962). Cela remet en question l'utilisation des caractères floraux en systématique, puisqu'on peut observer des phénomènes de convergence entre deux taxons très éloignés ou de divergence entre deux taxons proches (Bateman *et al.*, 1997).

La taxonomie des Orchidaceae a donné lieu à de nombreuses controverses (Garay, 1960; Vermeulen, 1966; Dressler, 1974, 1981; Rasmussen, 1985) et critiques. A ce jour de nombreuses classifications ont été proposées par différents auteurs pour la délimitation des sous-familles, tribus, sous-tribus, genres ou espèces (Schlechter, 1926; Garay, 1960; Dressler, 1974, 1993; Freudenstein et Rasmussen, 1999; Szlachetko et Rutkowski, 2000; Szlachetko, 2003). Parmi toutes ces classifications morphologiques, la classification morpho-anatomique qui semble la plus aboutie et qui sert généralement de référence est celle de Dressler (1993). Elle est basée sur la position et le nombre des étamines fertiles et stipule une progression évolutive au sein de la famille au travers de ce nombre d'étamines. Cette classification reconnaît donc cinq sous familles au sein des Orchidaceae : les Apostasioideae Rchb.f., les Cypripedioideae Lindl., les Orchidoideae Dress., les Spiranthoideae Dress. et les Epidendroideae Lindl. Les nombreux travaux de classification des Orchidaceae basés sur leur morphologie montrent des limites, nécessitant d'inclure d'autres sources de données pour établir une classification naturelle (Chase *et al.*, 2003) en l'occurrence les données moléculaires.

Avec l'essor de la systématique moléculaire, les orchidologues ont trouvé de nouveaux outils pour s'attaquer à la reconstruction de la phylogénie dans ce groupe diversifié et spécialisé de plantes (Cameron, 2004). La première étude réalisée par Chase *et al.* (1994), basée sur le séquençage du gène *rbcl* a permis de retrouver les groupes qui avaient déjà été établis avec les données morphologiques. L'utilisation de ce gène s'est cependant avérée limitée du fait de son faible polymorphisme, empêchant son utilisation à des rangs taxonomiques inférieurs (sous-tribus ou genres). Le déploiement de différentes méthodes de séquençage rapide et de moins en moins coûteux a ainsi permis d'augmenter le nombre de marqueurs disponibles pour les études moléculaires. En plus du gène *rbcl*, plusieurs autres marqueurs ou gènes neutres, moins sujets à la sélection et plus polymorphes ont été développés. Chez les orchidées, il faut citer les marqueurs suivants : les gènes *matK* (Jarrell et Clegg, 1995) et *ndhF* (Neyland et Urbatsch, 1996), l'espaceur intergénique *trnL-F* (Carlsward *et al.*, 2006b), des introns comme *rps16* (Micheneau *et al.*, 2008a), ou du gène nucléaire nrITS-1 (Simo-Droissart *et al.*, 2018a). Au sein des Orchidaceae, de nombreuses études phylogénétiques ont été publiées, permettant ainsi d'élucider les relations au sein de la famille entière (e.g. Chase *et al.*, 1994; Neyland et Urbatsch, 1995; Cameron *et al.*, 1999; Freudenstein *et al.*, 2000a; b; Molvray *et al.*, 2000; Cameron, 2004; Freudenstein *et al.*, 2004; Górnaiak *et al.*, 2010; Chase *et al.*, 2015), des sous familles (e.g. Neyland et Urbatsch, 1996; Cox *et al.*, 1997; Kores *et al.*, 1997; van den Berg *et al.*, 2005; Freudenstein et Chase, 2015), des tribus (e.g. Cameron et Chase, 1999; Douzery *et al.*, 1999; Kores *et al.*, 2000; Whitten *et al.*, 2000; Goldman *et al.*, 2001; Carlsward *et al.*, 2006b; Micheneau *et al.*, 2008a), des sous tribus (e.g. Chase et Palmer, 1989; Chase et Hills, 1992; Chase et Palmer, 1992; Yukawa *et al.*, 1996; Chase et Palmer, 1997; Pridgeon et Chase, 1998; van den Berg *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001; Carlsward *et*

al., 2003) et des genres (e.g. Freudenstein et Doyle, 1994; Ryan *et al.*, 2000; Yukawa *et al.*, 2000; Devos *et al.*, 2003; Russell, 2010; Russell *et al.*, 2010, 2011; Rakotoarivelo *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2012; Verlynde *et al.*, 2018).

Grâce à ces études moléculaires, la compréhension des relations de parenté entre les orchidées s'est considérablement améliorée au cours des deux dernières décennies (Givnish *et al.*, 2015). Cette famille est devenue, au sein des Angiospermes, la famille la mieux représentée dans les études de phylogénie moléculaire (Chase *et al.*, 2003). Les Orchidaceae sont actuellement placées dans l'ordre des Asparagales suivant le système APG IV (Chase *et al.*, 2016). Une classification actualisée, intégrant toutes les données morphologiques et moléculaires disponibles, et exhaustive jusqu'au niveau du genre a été publiée dans le cadre du projet *Genera Orchidacearum* (Pridgeon *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2005, 2009, 2014). Cette nouvelle classification scinde les Orchidaceae en cinq sous-familles : Apostasioideae, Vanilloideae, Cyripedioideae, Orchidoideae, et Epidendroideae (**Figure I-4**).

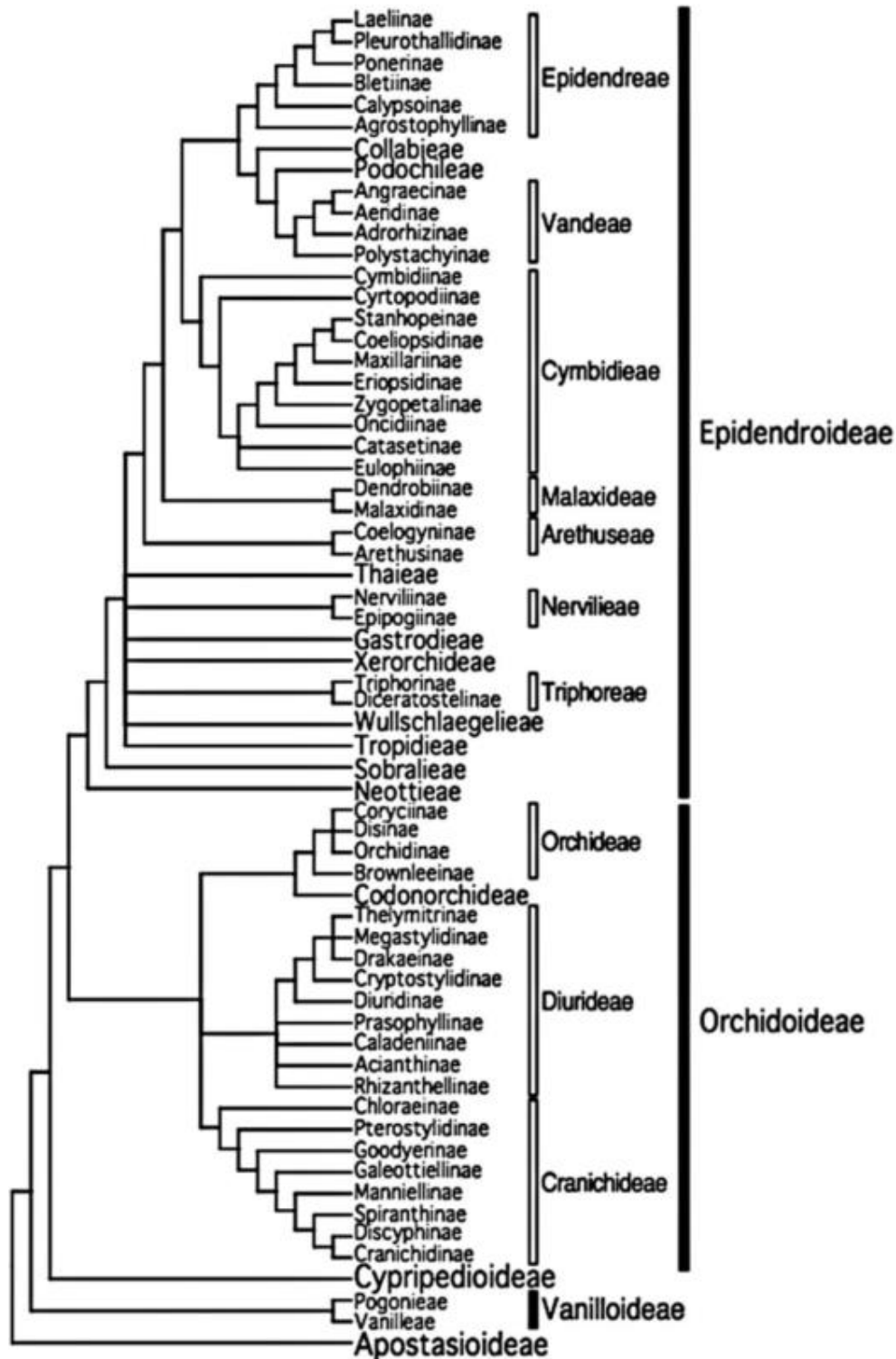


Figure I-4. Arbre résumant la classification des sous-familles, tribus et sous-tribus chez les Orchidaceae reproduit d'après Chase *et al.* (2015).

La sous-famille des Epidendroideae, la plus diversifiée (650 genres pour 18000 espèces), reste encore problématique du fait des faibles niveaux de divergence moléculaire et de sa richesse en espèces représentant près de 80 % de la diversité de la famille (Chase *et al.*, 2003; Pridgeon *et al.*, 2014). Ces lacunes limitent notre capacité à tester des hypothèses sur l'histoire évolutive des espèces et

maintiennent des incertitudes dans la classification. Les récentes phylogénies basées sur des données moléculaires ont permis de clarifier les relations au sein de cette sous-famille et de tester les associations de caractères clés associés à la diversification de ses taxons (Chase *et al.*, 2015; Freudenstein et Chase, 2015). Ces études ont permis de délimiter 16 tribus et 28 sous-tribus au sein de cette sous-famille. Parmi la tribu des Vandae se démarque deux sous-tribus à croissance monopodiale (Angraecinae, Aeridinae). La sous-tribu des Aeridinae Summerh. se compose de plus de 100 genres (environ 1250 espèces) rencontrés principalement en Asie et en Australie. La sous-tribu des Angraecinae qui inclut désormais l'ex sous-tribu des Aerangidinae (Carlswald *et al.*, 2006b) comprend quant à elle plus de 760 espèces réparties en 49 genres et présente une distribution plus large en Afrique continentale, à Madagascar et dans les îles de l'océan indien et du Golfe de Guinée (Pridgeon *et al.*, 2014). Les espèces de cette sous-tribu des Angraecinae Summerh. sont encore désignées sous l'appellation d'orchidées «Angraecoides».

1.2.2.2 ANGRAECOIDES

Les orchidées angraecoides, sont des épiphytes à croissance monopodiale. La majorité de ces orchidées sont le produit d'une diversification extensive à l'ouest de l'Océan Indien (les Mascareignes et les Comores) y compris en Afrique, Madagascar et les îles voisines. Deux genres, *Campylocentrum* Benth. et *Dendrophylax* Rchb.f., ont par contre dérivé d'un processus de diversification en Amérique Centrale et du Sud ainsi que dans les Caraïbes (Micheneau *et al.*, 2009) d'après un évènement de dispersion à longue distance grâce à leurs graines minuscules au Miocène à partir de l'Afrique (Pessoa *et al.*, 2018). Les angraecoides sont apparues beaucoup plus récemment, il y a un peu plus de 20 millions d'années (Givnish *et al.*, 2016). Ces orchidées sont également connues pour leurs problèmes de délimitation taxonomiques (Chase *et al.*, 2015). Plusieurs études de phylogénie moléculaire ont permis d'évaluer les relations phylogénétiques inter et intragénérique au sein de ce groupe dans les îles de l'océan indien (Andriananjamanantsoa *et al.*, 2016; Carlswald *et al.*, 2006a; b; Micheneau *et al.*, 2008a), dans les néotropiques (Carlswald *et al.*, 2003; Pessoa *et al.*, 2018) et en Afrique tropicale (Simo-Droissart *et al.*, 2018a; D'hajjère *et al.*, 2019; Farminhão *et al.*, 2021). Elles ont récemment démontré la présence de deux principaux clades au sein des angraecoides dont l'un est malgache et l'autre afro-néotropical, qui ne correspondent toutefois pas aux deux sous-tribus précédemment décrites (Simo-Droissart *et al.*, 2018a). Les angraecoides sont connus pour avoir une diversité exceptionnelle de nombre de chromosomes ce qui en fait un groupe intéressant pour les études sur la cladogénèse, la diversification et la divergence morphologiques. En effet, les études de Farminhão *et al.* (2021) ont démontré que la majorité des lignées se sont diversifiées vers la moitié du Miocène et la plupart des genres et des espèces ont apparu vers la fin du Miocène-Pliocène et le Pleistocène. Cette

même étude a montré qu'environ 90 % des espèces sont apparues grâce à une augmentation du nombre de chromosomes par transition de $n=17-18$ à $n=25$.

1.2.2.3 CARACTERES GENERAUX DES ANGRAECOIDES

Les angraecoides sont principalement identifiés sur la base de caractères ici présentés en suivant les travaux de Stewart *et al.* (2006). Ce sont des herbacées pérennes, majoritairement épiphytes, occasionnellement lithophytes et rarement terrestres. Les tiges à croissance monopodiale, peuvent pousser verticalement, horizontalement ou encore vers le bas. Elles sont parfois ramifiées, courtes ou variablement allongées et peuvent être couvertes par des petites feuilles écailles brunes chez des orchidées aphylls comme *Microcoelia*. Ce type de tige d'orchidées aphylls porte d'autres organes dont les racines, les inflorescences, etc. Les racines sont aériennes, couvertes de velamen et regroupées à la base des plantes à tiges courtes ou disposées aux nœuds à l'opposé des feuilles chez les plantes à tiges longues. Les feuilles des angraecoides sont disposées en deux rangées, et sont généralement plus longues que larges, souvent charnues. L'apex des feuilles est généralement bilobé ou pointu puisqu'un lobe peut être réduit ou absent. Dans le genre *Microcoelia*, toutes les espèces sont aphylls tandis que chez *Solenangis*, il existe une seule espèce sans feuilles et des espèces aphylls saisonnières qu'on retrouve dans le genre *Mystacidium* (Stewart *et al.*, 2006). Généralement de couleur verte ou brunâtre, les inflorescences peuvent être simples ou ramifiées, en étant disposées latéralement dans l'axe des feuilles ou à l'aisselle des feuilles en portant une ou plusieurs fleurs disposées en spirales, distiques ou souvent en capitules. La forme, la taille et la couleur des fleurs chez les angraecoides varient selon le genre et même au sein des genres (exemple dans le genre *Angraecum*). Cependant, la majorité des fleurs sont de couleur blanche ou verte, et peuvent parfois virer à l'orange avec le temps (comme chez *Cyrtorchis*, *Neobathiea* et *Rangaeris*). Les sépales et pétales sont souvent similaires avec un labelle prolongé en un éperon nectarifère généralement assez marqué qui est à la base de la différenciation des espèces. Le sépale dorsal est souvent de forme et de tailles différentes tandis que le labelle est parfois très similaire aux autres pétales donnant à la fleur une forme d'étoile. La colonne abrite toutes les structures reproductrices de la fleur. Le rostellum est souvent allongé en forme de bec et parfois divisé en deux ou trois lobes réduits. Il est également modifié en un viscidium qui est de nature collante. L'ovaire infère est porté par un pédicelle court. Après la pollinisation, il s'agrandit et se développe en un fruit capsulaire.

I.2.2.4 LE GENRE *CYRTOCHIS* SCHLECHTER

I.2.2.4.1 LE GENRE ET SES SECTIONS : HISTORIQUE ET DISTRIBUTION

Cyrtorchis Schltr. est un genre d'orchidées angraecoides africaines regroupant 20 taxons valides (18 espèces et 2 sous-espèces) (Govaerts *et al.*, 2020). Etymologiquement, *Cyrtorchis* provient de la combinaison de deux mots grecs à savoir *Kyrtos* qui signifie courbe et *Orchis* qui signifie Orchidée, en référence à l'éperon courbé des fleurs. Il a été décrit par Rudolf Schlechter en 1914 pour circonscrire un petit groupe d'espèces distinctes du genre *Angraecum* Bory associées à l'ancienne espèce *Angraecum arcuatum* initialement décrite par Lindley et actuellement connue sous le nom de *Cyrtorchis arcuata* (Lindl.) Schltr. Depuis cette première description, le genre a connu de nombreuses révisions taxonomiques en partant de celle de Schlechter (1918) jusqu'à Chiron (2001) (voir **Tableau I-1**). Caractérisé par ses fleurs blanches en forme d'étoile, le genre *Cyrtorchis* est restreint à l'Afrique tropicale, incluant les îles du Golfe de Guinée (Bioko, Príncipe, São Tomé et Annobón), et à l'Afrique australe (Pridgeon *et al.*, 2014) (**Figure I-5**). Le genre appartient à la tribu des Vandeeae, et plus spécifiquement à la sous-tribu des Angraecinae.

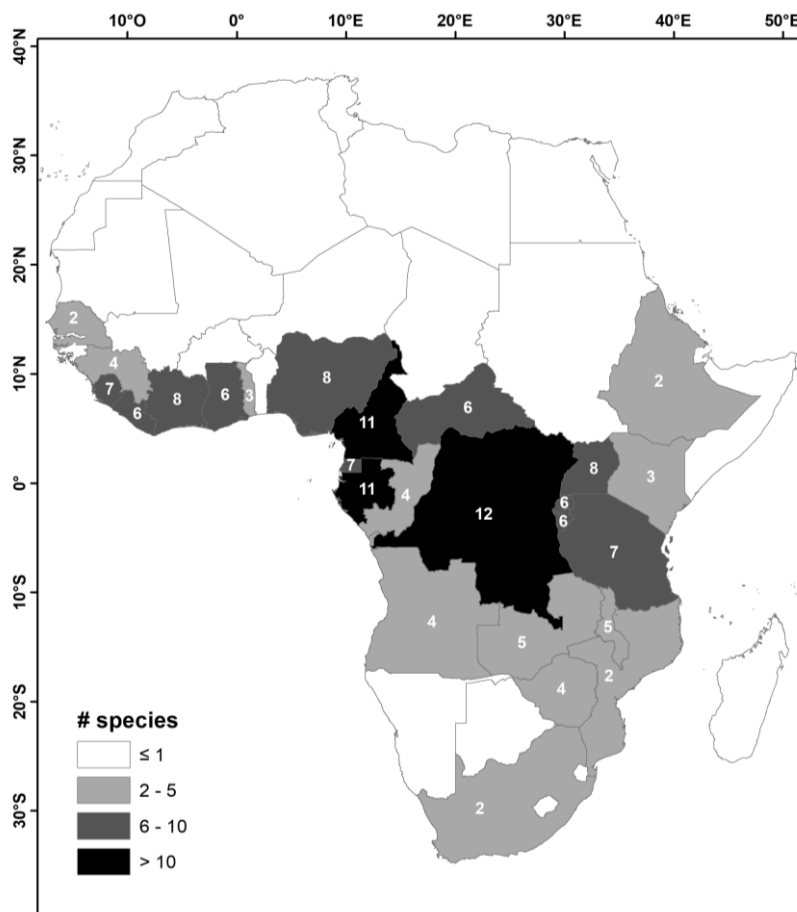


Figure I-5. Distribution de la richesse spécifique du genre *Cyrtorchis* en Afrique (reproduite d'après Pridgeon *et al.*, 2014).

Tableau I-1. Résumé des différents traitements taxonomiques du genre depuis sa description à ce jour

Auteurs et dates	Genre (s) et/ou sections	Taxons inclus
Schlechter 1914	<i>Cyrtorchis</i> Schltr	<i>C. arcuata</i> Schltr., <i>C. chailluana</i> Schltr <i>C. hamata</i> Schltr, <i>C. monteiroae</i> Schltr
Schlechter 1918	<i>Cyrtorchis</i> Schltr	<i>C. acuminata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. angustifolia</i> (De Wild.), <i>C. arcuata</i> (Lindl) Schltr., <i>C. aschersonii</i> (kraenzl.) Schltr., <i>C. bistorta</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. brownii</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. buchholziana</i> (kraenzl.) Schltr., <i>C. chailluana</i> (Hook.f.) Schltr., <i>C. droogmansiana</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. ealaensis</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. erythraeae</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. hamata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. henriquesiana</i> (Ridl.) Schltr., <i>C. hookeri</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. injoloensis</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. latibracteata</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. monteiroae</i> (Rchb.f.) Schltr., <i>C. refracta</i> (kraenzl.) Schltr., <i>C. sedeni</i> (Rchb.f.) Schltr., <i>C. sereti</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. subcylindrifolia</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. whytei</i> (Rolfe) Schltr.
Summerhayes 1936	<i>Cyrtorchis</i> Schltr	<i>C. ringens</i> (Rchb.f.) Summerh., <i>C. monteiroae</i> (Rchb.f.) Schltr., <i>C. chailluana</i> (Hook.f.) Schltr., <i>C. arcuata</i> subsp. <i>whytei</i> (Rolfe) Summerh., <i>C. arcuata</i> subsp. <i>leonensis</i> Summerh., <i>C. arcuata</i> subsp. <i>variabilis</i> Summerh. <i>C. hamata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. aschersonii</i> (kraenzl.) Schltr., <i>C. brownii</i> (Rolfe) Schltr.
Summerhayes 1948	<i>C. sect. Heterocolleticon</i> Summerh. et <i>C. sect. Homocolleticon</i> Summerh.	<i>Sect. Homocolleticon</i> : environ 10 espèces incluant <i>C. monteiroae</i> (Rchb.f.) Schltr., <i>C. bistorta</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. brownii</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. buchholziana</i> (kraenzl.) Schltr., <i>C. crassifolia</i> Schltr., <i>C. praetermissa</i> Summerh. et d'autres espèces du Congo Belge. <i>Sect. Heterocolleticon</i> : environ 12 espèces incluant entre autres <i>C. arcuata</i> (Lindl) Schltr., <i>C. aschersonii</i> (kraenzl.) Schltr., <i>C. acuminata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. chailluana</i> (Hook.f.) Schltr., <i>C. hamata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. sedeni</i> (Rchb.f.) Schltr., <i>C. whytei</i> (Rolfe) Schltr.
Summerhayes 1960	<i>C. sect. Cyrtorchis</i> Summerh. et <i>C. sect.</i>	<i>C. sect. Cyrtorchis</i> : <i>C. chailluana</i> (Hook.f.) Schltr., <i>C. arcuata</i> (Lindl) Schltr., <i>C. arcuata</i> subsp. <i>whytei</i> (Rolfe) Summerh., <i>C. arcuata</i> subsp. <i>variabilis</i> Summerh., <i>C. arcuata</i> subsp. <i>leonensis</i> Summerh., <i>C. neglecta</i> Summerh., <i>C.</i>

	<i>Homocolleticon</i> Summerh.	<i>hamata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. acuminata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. sereti</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. erythraeae</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. aschersonii</i> (kraenzl.) Schltr. <i>C. sect. Homocolleticon</i> : <i>C. monteiroae</i> (Rchb.f.) Schltr., <i>C. injoloensis</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. ringens</i> (Rchb.f.) Summerh., <i>C. brownii</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. praetermissa</i> Summerh., <i>C. henriquesiana</i> (Ridl.) Schltr., <i>C. crassifolia</i> Schltr.
Szlachetko & Olszewski 2001	<i>Cyrtorchis</i> Summerh. et <i>Homocolleticon</i> (Summerh.) Szlach. & Olsz.	<i>Cyrtorchis</i> : <i>C. chailluana</i> (Hook.f.) Schltr., <i>C. arcuata</i> (Lindl) Schltr., <i>C. arcuata subsp. whytei</i> (Rolfe) Summerh., <i>C. arcuata subsp. variabilis</i> Summerh., <i>C. arcuata subsp. leonensis</i> Summerh., <i>C. neglecta</i> Summerh., <i>C. hamata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. acuminata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. sereti</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. erythraeae</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. aschersonii</i> (kraenzl.) Schltr., <i>C. letouzeyi</i> Szlach. & Olsz. <i>Homocolleticon</i> : <i>Homocolleticon monteiroae</i> (Rchb.f.) Szlach. & Olsz., <i>Homocolleticon injoloensis</i> (De Wild.) Szlach. & Olsz., <i>Homocolleticon ringens</i> (Rchb.f.) Szlach. & Olsz., <i>H. brownii</i> (Rolfe) Szlach. & Olsz., <i>C. praetermissa</i> Summerh., <i>H. praetermissa var. zuluensis</i> (E.R.Harrison) Szlach. & Olsz. <i>H. henriquesiana</i> (Ridl.) Schltr., <i>H. crassifolia</i> (Schltr.) Szlach. & Olsz.
Chiron 2001	<i>C. sect. Cyrtorchis</i> Summerh. et <i>C.</i> <i>sect.</i> <i>Homocolleticon</i> Summerh.	<i>C. sect. Cyrtorchis</i> : <i>C. chailluana</i> (Hook.f.) Schltr., <i>C. arcuata subsp. arcuata</i> (Lindl) Schltr., <i>C. arcuata subsp. whytei</i> (Rolfe) Summerh., <i>C. arcuata subsp. variabilis</i> Summerh., <i>C. arcuata subsp. leonensis</i> Summerh., <i>C. neglecta</i> Summerh., <i>C. hamata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. acuminata</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. sereti</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. erythraeae</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. aschersonii</i> (kraenzl.) Schltr., <i>C. glaucifolia</i> Summerh. <i>C. sect. Homocolleticon</i> : <i>C. monteiroae</i> (Rchb.f.) Schltr., <i>C. injoloensis</i> (De Wild.) Schltr., <i>C. ringens</i> (Rchb.f.) Summerh., <i>C. brownii</i> (Rolfe) Schltr., <i>C. praetermissa</i> Summerh., <i>C. henriquesiana</i> (Ridl.) Schltr., <i>C. crassifolia</i> Schltr.

1.2.2.4.2 IMPORTANCE DES ESPECES DE *CYRTOCHIS*

Les espèces de *Cyrtorchis* ont des fleurs à corolles blanches qui deviennent orange avec le temps, généralement de grande taille, et au parfum semblable à celui du jasmin. Les informations sur la composition en substances volatiles de ces fragrances n'existent pas encore. Les espèces de *Cyrtorchis*

sont utilisées comme plantes ornementales. Dans certaines communautés locales du Cameroun (en particulier à Oku), les feuilles de *C. aschersonii* sont utilisées dans la préparation des traitements contre l'infertilité chez les femmes (L. Azandi, observation personnelle). Dans une étude ethnobotanique sur les Orchidaceae, Lawler (1984) a indiqué qu'un extrait d'une espèce non spécifiée de *Cyrtorchis* serait utilisé comme agent antipaludéen. Une étude récente réalisée en vue d'évaluer les propriétés pharmacologiques et phytochimiques des orchidées médicinales utilisées dans la pharmacopée en Afrique du Sud incluant une espèce de *Cyrtorchis* (*C. arcuata*) a montré que cette espèce était utilisée par le peuple Zoulou pour le traitement du diabète et des infections de la peau (Chinsamy, 2012). Cette même étude a également démontré que les extraits de feuilles et de racines de cette espèce avaient des propriétés anthelminthiques très efficaces.

Malgré les précédentes révisions taxonomiques réalisées jusqu'à ce jour dans le genre, des lacunes taxonomiques demeurent. Par conséquent, une clarification de la délimitation des espèces de *Cyrtorchis* (**Figure I-6**) à travers la mise en place d'une approche intégrative est nécessaire pour résoudre les problèmes de taxonomie restants.



Figure I-6. Illustrations de la diversité des espèces du genre *Cyrtorchis*. A. Inflorescences de *C. arcuata* subsp. *arcuata*. B. Fleur de *C. aschersonii*. C. Inflorescence de *C. ringens*. D. Feuilles et inflorescence de *C. monteiroae*. E. Fleurs de *C. hamata*. F. Plantes de *C. chailluana* avec plusieurs inflorescences. G. feuilles et inflorescence de *C. letouzeyi*. H. Fleurs et feuilles de *C. submontana*. I. Plante de *C. okuensis*. J. Inflorescence de *C. arcuata* subsp. *whytei*.

1.2.3 BIOLOGIE DE LA POLLINISATION CHEZ LES ORCHIDÉES

Bien que nos connaissances restent encore très fragmentaires, la plupart des orchidées étudiées jusqu'à aujourd'hui ont besoin d'un agent pollinisateur pour accomplir leur reproduction. Il existe cependant des exceptions à cette dépendance pour les pollinisateurs qui a été révélé chez huit espèces malgaches du genre *Bulbophyllum* Thouars capables de s'autopolliniser grâce à l'absence de certaines barrières reproductives liées à la morphologie du gynostème (Gamisch *et al.*, 2014, 2015). Les orchidées présentent donc divers mécanismes de pollinisation qui fascinent les scientifiques (Darwin, 1862; Pijl et Dodson, 1969; Micheneau *et al.*, 2009; van der Niet *et al.*, 2015). Darwin fut le premier à décrire les mécanismes de pollinisation des orchidées dans son célèbre ouvrage « *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects and the good effects of intercrossing* » (Darwin, 1862). Darwin a ainsi souligné que les orchidées fournissent des preuves indirectes évidentes de la sélection naturelle et des adaptations qui favoriseraient la pollinisation croisée par les insectes. Ces observations ont trouvé un fort soutien parmi les naturalistes et ont fortement influencé les recherches ultérieures sur la biologie de la pollinisation des orchidées (Micheneau *et al.*, 2009). Les systèmes de pollinisation chez les orchidées sont parmi les plus spécialisés du règne végétal (Tremblay, 1992; Johnson et Steiner, 2000; Tremblay *et al.*, 2005) même si seulement 60 % des espèces ont un pollinisateur spécifique identifié (Tremblay, 1992). Cette spécialisation a l'avantage de maximiser l'efficacité de la pollinisation, cependant, elle rend les orchidées bien plus dépendantes de leurs pollinisateurs (Nilsson, 1992; Roberts, 2003) et des menaces qui peuvent également peser sur ces derniers.

Selon Fay *et al.* (2015), les pollinisateurs d'orchidées comprennent les oiseaux (Micheneau *et al.*, 2006; van der Niet *et al.*, 2015), les abeilles (Davies *et al.*, 2013; Peter et Johnson, 2013; Sugiura, 2013; Vale *et al.*, 2013; Pellegrino et Bellusci, 2014), les guêpes (Peakall et Whitehead, 2014; Menz *et al.*, 2015), les papillons (Sun *et al.*, 2014), les papillons de nuit (Brzosko et Wróblewska, 2013; Boberg *et al.*, 2014), les mouches (Van Der Niet *et al.*, 2011), les coléoptères (Peter et Johnson, 2014), les criquets (Micheneau *et al.*, 2010) et même les moucheron fongiques (Phillips *et al.*, 2014) et piqueurs (Bogarín *et al.*, 2018). Les hyménoptères représenteraient à eux seuls la pollinisation d'environ 60 % de la famille des orchidées (Pijl et Dodson, 1969). Cette grande diversité de pollinisateurs d'orchidées suffit donc pour comprendre pourquoi ils présentent autant de stratégies de pollinisation car différents organismes sont attirés par différentes couleurs, des composés volatils ou des parties de plantes. La famille des orchidées est réputée pour sa grande diversité de mécanismes de pollinisation et la forte occurrence de fleurs n'offrant pas de « récompense » au pollinisateur (nectar ou pollen) par rapport aux autres familles de plantes (Jersáková *et al.*, 2006). En effet, plusieurs orchidées attirent les pollinisateurs par des mécanismes de duperie, comprenant le leurre pour la nourriture, le mimétisme

floral, mimétisme de sites de reproduction, mimétisme d'abri, le pseudoantagonisme et les leurres sexuels (Jersáková *et al.*, 2006). Le leurre sexuel demeure le mécanisme de duperie par mimétisme florale le plus spectaculaire, impliqué dans la pollinisation pratiquement exclusive des Orchidaceae (Ackerman, 1986; Dafni, 1987; Nilsson, 1992; Micheneau *et al.*, 2009). Un résumé des mécanismes et de l'évolution de la pollinisation trompeuse chez les orchidées a montré que le leurre pour la nourriture est le mécanisme le plus courant (rapporté dans 38 genres) suivie du leurre sexuel (rapporté dans 18 genres) (Jersáková *et al.*, 2006). Des découvertes récentes de triple duperie par la production de pseudo-pollen sans valeur nutritionnelle (Davies *et al.*, 2013), de mimétisme de la charogne (Van Der Niet *et al.*, 2011) et de production de phéromones d'agrégation des drosophiles (Karremans *et al.*, 2015) démontrent que nous sommes loin de comprendre la complexité de la pollinisation des orchidées dans son intégralité.

Les orchidées angraecoides sont connues pour leurs fleurs blanches à longs éperons saillants particulièrement spécialisés dans la pollinisation par les sphinx (Martins et Johnson, 2007). L'étude de la biologie de la pollinisation de ces orchidées s'est développée à partir de la fameuse prédiction de Darwin sur l'espèce malgache *Angraecum sesquipedale* Thouars (Nilsson, 1992; Wasserthal, 1997; Nilsson, 1998). Après des observations méticuleuses des fleurs à long éperon de cette espèce (environ 30 cm de long) et différentes expériences de pollinisation manuelle, il conclut que seul un sphinx géant avec une trompe suffisamment longue pour atteindre le nectar situé au fond de l'éperon serait capable de polliniser cette orchidée spectaculaire. Étonnamment, ce pollinisateur ne fut découvert que 41 ans plus tard dans les forêts primaires de Madagascar et décrit comme *Xanthopan morganii var. praedicta* (Rothchild et Jordan, 1903). Ensuite, la pollinisation effective de l'orchidée par cette espèce de papillon nocturne n'a été démontrée que 135 ans après la prédiction de Darwin (Wasserthal, 1997). Depuis lors, les diverses études conduites sur la pollinisation des orchidées angraecoides malgaches à long éperon et particulièrement sur le genre *Angraecum* Bory (Nilsson *et al.*, 1985; Nilsson *et al.*, 1987; Nilsson et Rabakonandrianina, 1988; Wasserthal, 1997) ont mis en évidence des systèmes de pollinisation très variés. Seules la pollinisation abiotique et celle par les mammifères n'ont pas encore été décrites. Les espèces d'orchidées épiphytes ont des systèmes de pollinisation spécialisés impliquant fréquemment des vecteurs animaux, résultant en un mélange d'autopollinisation et de pollinisation croisée qui assure une production abondante de semences (Mondragon *et al.*, 2015).

1.2.3.1 PHENOLOGIE ET PATRONS DE FLORAISON CHEZ LES ORCHIDEES

La phénologie étant un point central de nombreuses interactions entre les espèces (Butt *et al.* 2015), son étude devient de plus en plus importante pour la conservation et la gestion de la biodiversité (Zhang *et al.*, 2014), d'autant plus dans le contexte actuel de changement climatique et de

perte de la biodiversité (Chapman *et al.*, 2005; Bertin, 2008). Bien que les orchidées soient l'une des familles d'angiospermes les plus riches en espèces et qu'elles soient largement connues pour leurs interactions plantes-pollinisateurs remarquablement spécialisées (Schatz *et al.*, 2013), on sait très peu de choses sur la phénologie de la floraison, en particulier sous les tropiques (Texier *et al.*, 2018), où on trouve la plus grande diversité des espèces de cette famille. Pourtant la maîtrise de la phénologie permettrait de montrer l'impact du changement environnemental sur leurs distributions, leurs abondances et les interactions avec d'autres espèces (Hegland *et al.*, 2009).

Les données de terrain sur le long terme et les analyses de spécimens d'herbiers indiquent un déclin potentiel de la pollinisation de plusieurs orchidées sud-africaines (Pauw et Hawkins, 2011) et européennes (Robbirt *et al.*, 2011) attribuées à la perte d'habitat et au changement climatique, entraînant ainsi des décalages phénologiques entre les pollinisateurs et les périodes de floraison. En effet, pendant la période de floraison, le décalage temporel de la floraison entre espèces (isolement floral) peut jouer un rôle important en tant que barrière d'isolement reproducteur entre populations conduisant à la différenciation de nouvelles espèces en particulier chez les orchidées (Xu *et al.*, 2011). Ce rôle clé de l'isolement floral dans la spéciation des orchidées a été démontré par Sun *et al.* (2015), indiquant qu'il n'est pas seulement limité aux systèmes de pollinisation hautement spécialisés, mais peut également se produire entre des espèces dont la pollinisation est plus généraliste. Pourtant l'étape primordiale permettant l'identification de ces barrières reproductives entre espèces passe par l'étude de leur mode de floraison et de reproduction qui à ce jour demeure encore limitée pour la grande majorité des espèces. En Afrique tropicale, très peu d'études ont été consacrées à des investigations sur la phénologie des plantes à l'échelle interspécifique sur des périodes de 10 ans ou plus, principalement en raison des difficultés liées à la collecte des données phénologiques (Texier *et al.*, 2018). En Afrique centrale, seulement trois études (Mbale *et al.*, 2014; Essomo *et al.*, 2016; Texier *et al.*, 2018) ont été réalisées sur la phénologie de la floraison chez les orchidées épiphytes. Parmi ces trois études, seule celle de Mbale *et al.* (2015) a été réalisée *ex situ* en condition d'ombrière tandis que celle d'Essomo *et al.* (2016) a été réalisée *in situ*. Texier *et al.* (2018) ont réalisé des études sur des données collectées *in situ* et *ex situ*. Il est donc important de maîtriser ces différents aspects de la phénologie, surtout de connaître les périodes de floraison des espèces, afin de pouvoir définir les limites entre les espèces, mais aussi en vue d'étudier les interactions entre ces orchidées et leurs pollinisateurs.

1.2.3.2 INTERACTION PLANTES-POLLINISATEURS CHEZ LES ORCHIDÉES

Dans l'histoire du vivant, les processus d'évolution conjoints entre les plantes et leurs pollinisateurs s'expriment à travers la diversité des formes, des couleurs et des parfums des fleurs

(Schatz *et al.*, 2013). L'interaction mutualiste avec les insectes pour la pollinisation est souvent considérée comme l'un des principaux facteurs à l'origine du succès évolutif des plantes à fleurs (McKey et Hossaert-McKey, 2008). En effet, plus de 80 % des plantes sont entomogames, c'est-à-dire qu'elles dépendent d'insectes pour leur reproduction sexuée (Potts *et al.*, 2010). Cette relation est ancienne, vu que les reconstructions morphologiques et phylogénétiques montrent que les premières angiospermes étaient pollinisées par des insectes, et plus précisément par des Diptères et des Coléoptères (Hu *et al.*, 2008; Thien *et al.*, 2009). Cette pollinisation entomogame est bien représentée dans le sous-bois des forêts tropicales car la pollinisation par le vent y est difficile, mais aussi parmi les arbres émergents des forêts tropicales humides (Schatz *et al.*, 2013). Il en découle donc l'idée que l'impressionnante diversité des espèces de plantes est étroitement liée à la pollinisation entomogame, qui permettrait un transport efficace du pollen. La diversification des angiospermes et des insectes pollinisateurs semble donc résulter d'un processus de diversification conjointe basée sur une coévolution diffuse (Schatz *et al.*, 2013). Il est donc important de connaître le(s) pollinisateur(s) d'une espèce végétale afin de prévoir des stratégies adaptées pour sa conservation.

Les interactions entre les orchidées et leurs pollinisateurs sont très diversifiées selon les espèces. Plusieurs espèces d'orchidées terrestres et épiphytes sont généralement retrouvées en petites populations isolées à cause des préférences pour des habitats particuliers qui pourraient limiter considérablement leur pollinisation (Tremblay *et al.*, 2005). En effet, les faibles densités des populations observées chez les orchidées favorisent la pollinisation par tricherie ou duperie qui est le mécanisme de pollinisation rencontré chez environ 40 % des espèces d'orchidées (Renner, 2006; Jersáková *et al.*, 2006) représentant ainsi environ 87 % des plantes à fleurs pollinisées via ce mécanisme (Schatz *et al.*, 2013). Cette pollinisation par tricherie résulte du fait que, le succès de la pollinisation est plus élevé chez les espèces produisant des récompenses que chez ceux qui n'en produisent pas (Tremblay *et al.*, 2005). Ce mécanisme de duperie consiste au développement par les plantes d'un ensemble de caractères floraux suggérant qu'elles produisent une récompense qui peut être par exemple la production du nectar alors qu'elle n'en produit pas.

I.2.3.3 SYNDROMES DE POLLINISATION

Les fleurs de plantes adaptées à la pollinisation sélective par un groupe fonctionnel d'insectes présentent généralement un ensemble de caractères morphologiques identifiables par un botaniste. On parle ainsi de syndromes de pollinisation chez les plantes. Depuis plusieurs décennies, la notion de syndromes de pollinisation, a joué un rôle central dans le domaine de la biologie de la pollinisation (Waser *et al.*, 2011; Vogel, 2012; Ollerton *et al.*, 2015). Selon Ashworth *et al.* (2015), les syndromes de pollinisation désignent des combinaisons spécifiques de traits floraux (morphologie, couleur, odeur et

le type de récompense) qui ont évolué indépendamment pour attirer des groupes spécifiques de pollinisateurs, résultant en des processus de coévolution diffus entre communautés d'insectes pollinisateurs et communautés de plantes. Les plantes pollinisées par des animaux ont ainsi au cours de leur évolution développées des mécanismes ou caractéristiques florales variés (notamment des récompenses telles que le nectar et l'excès de pollen, une apparence voyante et la production de parfum) afin de renforcer leur attractivité pour les pollinisateurs (Willmer, 2011). Cependant, l'existence de tels processus d'adaptation en réponse à la communauté locale de pollinisateurs est très souvent difficile à démontrer sur des espèces particulières de plantes généralistes (Schatz *et al.*, 2013). Ces syndromes ont stimulé le développement d'une hypothèse centrale en écologie de la pollinisation, à savoir que la sélection des caractères floraux par les pollinisateurs a été un des moteurs majeurs de la diversification des plantes à fleurs (Ollerton *et al.*, 2015). Des syndromes distincts ont été proposés pour la pollinisation abiotique par le vent ou l'eau, ainsi que pour la pollinisation par de grands groupes d'animaux tels que les papillons, les abeilles ou les oiseaux (Ollerton *et al.*, 2009). A ce jour, divers types de syndromes de pollinisation ont été proposés, en partant de ceux proposés par Delpino (1874) qui catégorisait les fleurs selon des traits tels que leurs formes, couleurs, odeurs et tailles à ceux proposés par Fenster *et al.* (2004) qui ont complété ce concept en classant les pollinisateurs en groupes fonctionnels en fonction de leur comportement et de la pression de sélection exercée sur les fleurs.

La sélection et l'évolution des signaux floraux induits par les pollinisateurs fournissent un cadre pour la compréhension des mécanismes d'évolution des traits floraux par convergence et émergence respectivement à travers les syndromes de pollinisation et le mimétisme floral (Schiestl et Johnson, 2013). En effet, les syndromes floraux convergents peuvent aider à émettre des hypothèses sur les traits dans le cadre de la sélection induite par les pollinisateurs car les espèces de plantes non apparentées mais pollinisées par un même pollinisateur présentent généralement une convergence de leurs traits floraux (**Figure I-7A**) (Fenster *et al.*, 2004). Pour ce qui est du mimétisme, c'est un modèle d'évolution où le trait évolue pour ressembler à un modèle. Dans le cas du mimétisme floral, l'acteur est le pollinisateur et les modèles peuvent être très variés à savoir les fleurs de plantes gratifiantes, les sites de pontes ou même les insectes femelles (voir **Figure I-7B**) (Schiestl et Johnson, 2013). Cependant, ce concept de syndromes de pollinisation connaît autant de partisans que de contradicteurs. En effet, certains considèrent que les fleurs attirent un plus large spectre de visiteurs que ce que leur syndrome prédit et que dans deux tiers des cas le pollinisateur le plus fréquent ne peut pas être prédit grâce au syndrome présenté par la plante, notamment chez les espèces généralistes (Ollerton *et al.*, 2009).

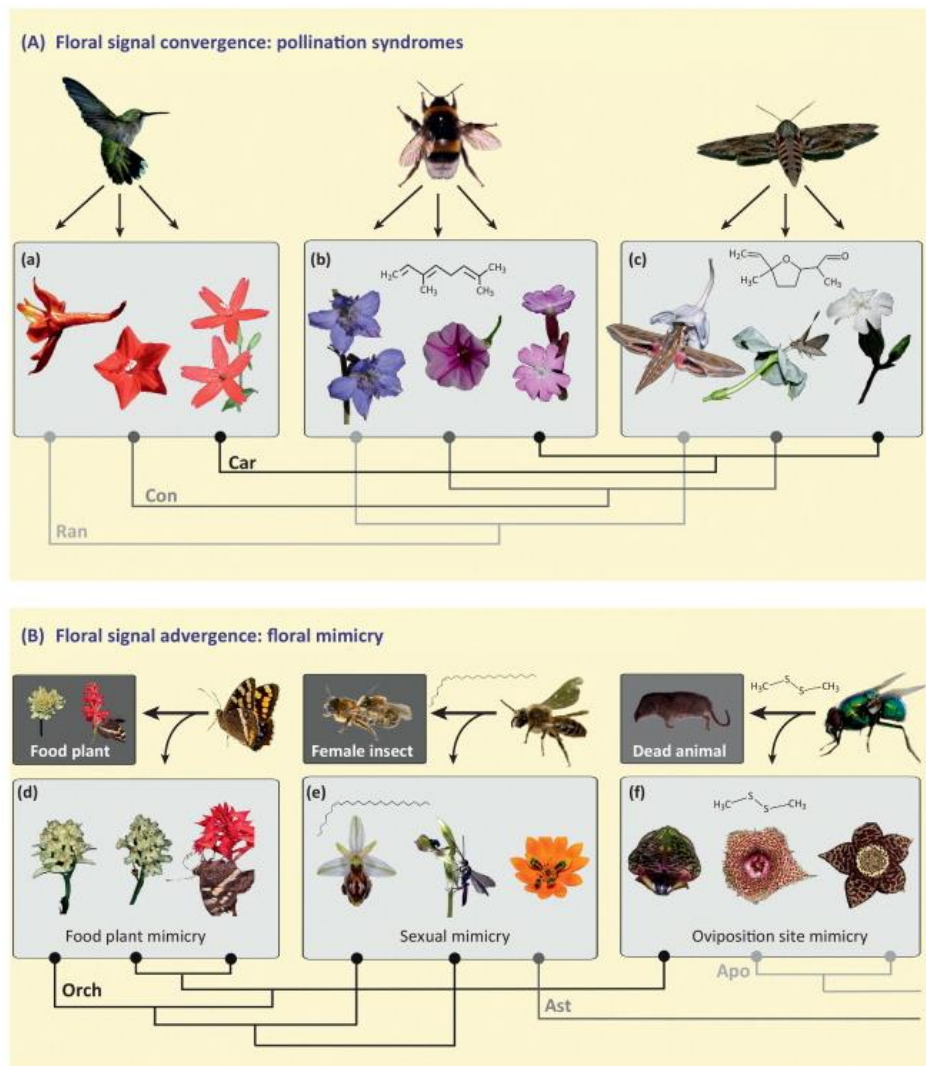


Figure I-7. Patrons évolutifs de convergence et d'émergence des traits floraux en réponse aux préférences du pollinisateur. A. Trois exemples de syndromes de pollinisation où des espèces de plantes non apparentées montrent une convergence de leur signaux floraux. B. Différents systèmes de mimétisme floral orientés vers différents modèles (cases ombrées) sous l'influence de la sélection des pollinisateurs. (reproduite d'après Schiestl et Johnson, 2013)

1.2.3.4 SPHINGOPHILIE ET HYPOTHESES D'ÉVOLUTION

Le syndrome de sphingophilie désigne l'ensemble des traits floraux associés à la pollinisation par des lépidoptères nocturnes de la famille des Sphingidae. Ces papillons de nuit sont généralement de grande taille, à vol stationnaire, et présentent un proboscis relativement long (Peter et Venter, 2017). Les caractéristiques typiques associées à ce syndrome sont des fleurs de grande taille de couleur blanche, crème, parfois vert clair avec un éperon long ou une corolle en tube allongé, nectarifère contenant d'importantes quantités de nectar (Vogel, 1954; Peter, 2009). Un autre trait caractéristique associé à la sphingophilie est l'émission de différentes substances volatiles telles que des terpènes, des alcools aromatiques, des esters ainsi que des composés azotés diffusés entre le crépuscule et l'aube, dont le parfum suave rappelle le jasmin ou les agrumes (Raguso *et al.*, 2003; Martins et Johnson, 2007;

Micheneau *et al.*, 2008b; Peter et Venter, 2017). Des illustrations d'espèces pollinisées par des sphinx sont présentées à la **Figure I-8** ci-dessous.

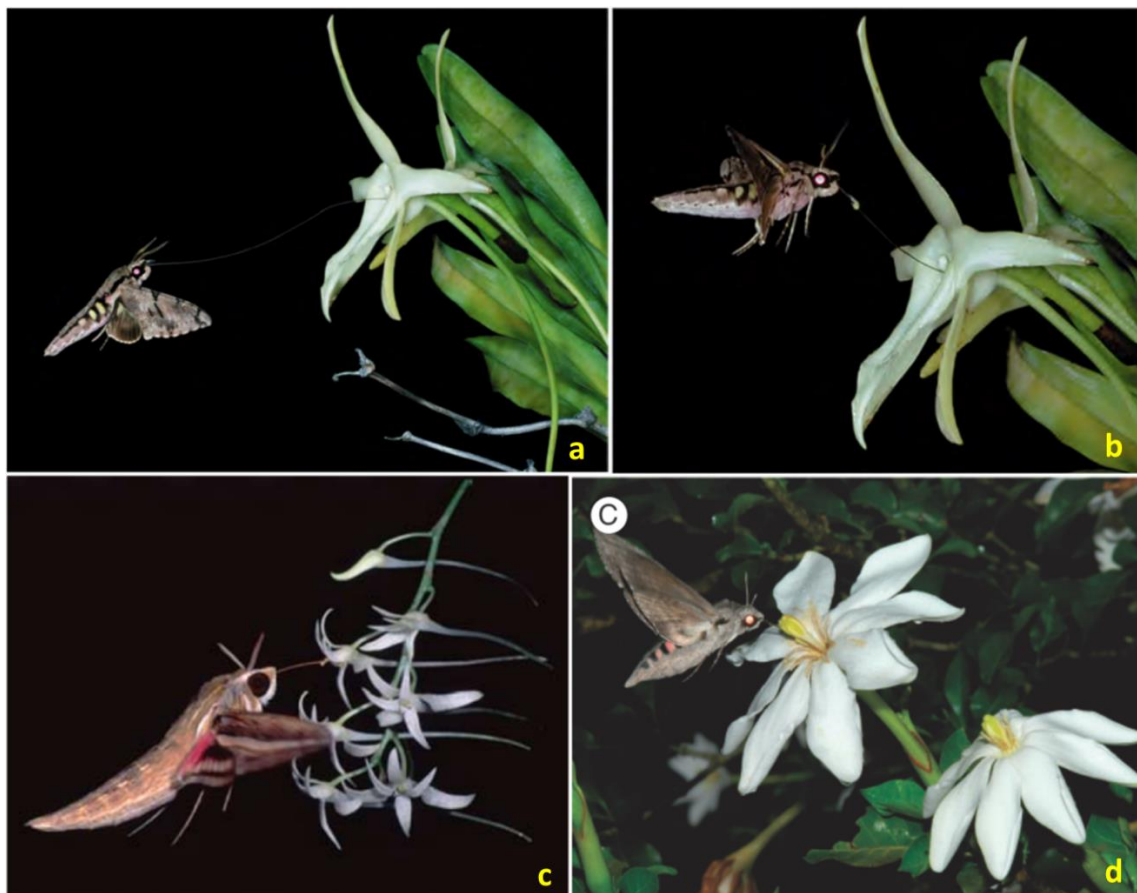


Figure I-8. Illustration de la sphingophilie chez trois espèces de plante. Première preuve de la pollinisation de l'espèce emblématique de Darwin *Angraecum sesquipedale* (Orchidaceae) par *Xanthopan morgani praedicta* à Madagascar (a et b reproduites d'après Wasserthal (1997)) ; Pollinisation de *Mystacidium capense* (Orchidaceae) en Afrique du sud par *Hippotion celerio* (c reproduite d'après Micheneau *et al.* (2009)) ; Pollinisation de *Crinum bulbispermum* (Amaryllidaceae) par *Agrius convolvuli* (d reproduite d'après Johnson et Raguso (2016)).

L'adéquation contemporaine des éperons nectarifères et des longueurs de proboscis des pollinisateurs a été démontrée à plusieurs reprises, suggérant ainsi que ces caractéristiques ont évolué en raison de leur interaction (Johnson et Steiner, 1997; Nilsson, 1998; Fulton et Hodges, 1999). Le mécanisme d'évolution de cette relation reste un sujet à controverse (Wasserthal, 1997; Nilsson, 1998) même si le plus adopté reste celui de Darwin (1862) qui l'a démontré avec l'espèce *Angraecum sesquipedale*. L'hypothèse proposée par Darwin (1862) et plus tard élaborée par Wallace (1867) stipule que les éperons et les proboscis des pollinisateurs sont engagés dans une « course » coévolutive individuelle (*Coevolutionary race*). Ils ont suggéré à cet effet qu'au sein d'une population, les plantes ayant les plus longs éperons ont un avantage sélectif parce que leurs organes reproducteurs sont en contact optimal avec les pollinisateurs qui leur confèrent un meilleur succès reproducteur, tandis que les pollinisateurs

ayant les plus longs proboscis ont un avantage sélectif parce qu'ils peuvent recueillir plus de nectar (**Figure I-9a,b**). Cette théorie fut par la suite démontrée expérimentalement par les travaux de Nilsson et Rabakonandrianina (1988) sur le genre *Platanthera*, dont les individus avec les plus longs éperons présentent un meilleur succès reproducteur. Une deuxième hypothèse célèbre concernant la sphingophilie, est celle de l'adaptation de la fleur à la morphologie de l'insecte ou *pollinator shift* (Wasserthal, 1997; Whittall et Hodges, 2007). Elle postule que la longueur du proboscis est relativement fixe et que les éperons évoluent selon un processus unilatéral pour s'y adapter (Wasserthal, 1997) (**Figure I-9c**). Ainsi, ce modèle prévoit également que les éperons s'allongent généralement au fil du temps, à mesure que les éperons évoluent pour correspondre à une série de pics adaptatifs, relativement stables définis par la longueur du proboscis (**Figure I-9d**).

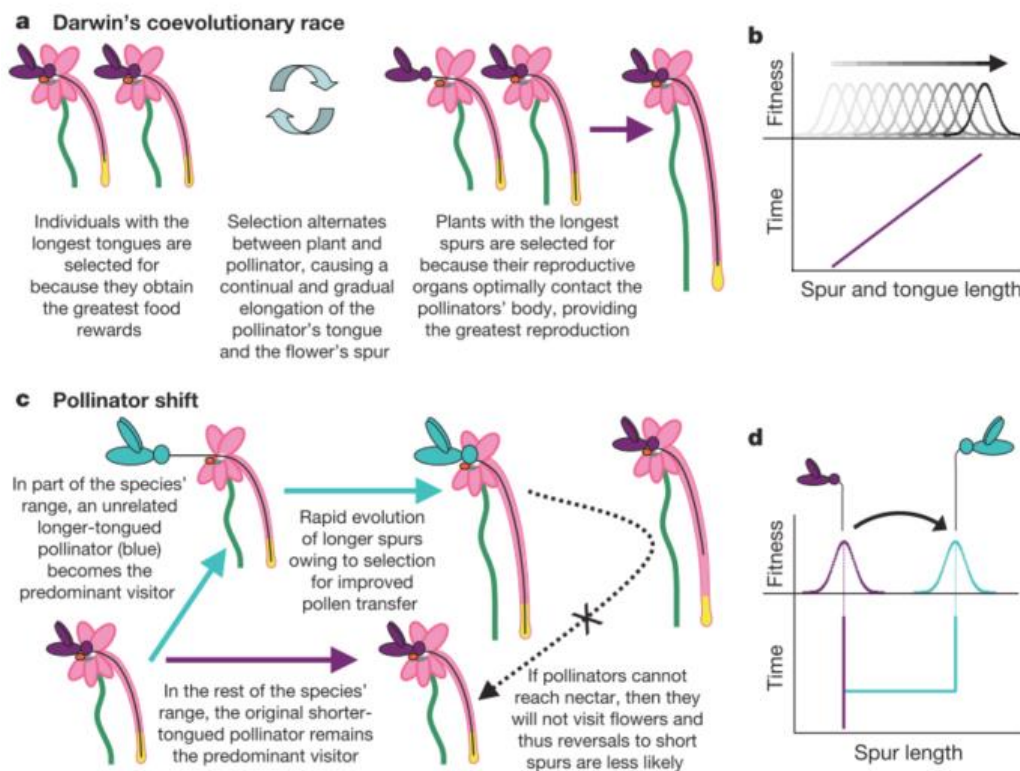


Figure I-9. Deux hypothèses contrastées sur l'évolution des éperons exceptionnellement longs. Le modèle Coevolutionary race (course évolutive) de Darwin (a, b), qui postule une augmentation progressive des longueurs du proboscis et de l'éperon de la plante, et le modèle *Pollinator shift* (changement de pollinisateur)(c, d), où la longueur de l'éperon évolue en raison du passage à un nouveau pollinisateur avec un proboscis plus long. Ces modèles diffèrent selon que les pics d'adaptation sont en constante augmentation (b), ou s'il s'agit d'optima relativement fixes basés sur les longueurs de proboscis des pollinisateurs préexistants (d). Ils diffèrent également selon que l'évolution de la longueur de l'éperon se fait progressivement (b) ou de manière ponctuelle (reproduite d'après Whittall et Hodges, 2007).

Un troisième modèle d'évolution des syndromes de pollinisation, plus récent, serait celui de l'*optimal foraging model* (Rodríguez-Gironés et Santamaría, 2006, 2007; Rodríguez-Gironés et Llandres, 2008). Ce modèle stipule que les insectes à longs proboscis deviennent plus fidèles aux fleurs à longs éperons

et ceux à proboscis courts aux fleurs à éperons courts dès lors qu'une compétition pour les ressources se présente. Pour certains auteurs, le développement du long proboscis des sphinx se serait produit bien avant l'arrivée des orchidées ainsi que leur aptitude à faire du vol stationnaire, ces deux caractéristiques leur permettant d'échapper plus efficacement à leurs prédateurs (Wasserthal, 2009, 2011). Cette théorie n'est cependant pas acceptée par certains auteurs (Nilsson, 1998; Johnson et Anderson, 2010) qui pensent qu'aucune des araignées observées en embuscade sur des fleurs n'est suffisamment corpulente pour s'attaquer à un sphinx. De plus, les phylogénies effectuées par Netz et Renner (2017) ne soutiennent pas non plus cette hypothèse.

Toutes les espèces du genre *Cyrtorchis* présentent également un syndrome de pollinisation correspondant à la sphingophilie. Ce syndrome avait été évoqué par Cribb (1989) qui a suggéré que les espèces de *Cyrtorchis* seraient toutes sphingophiles compte tenu des caractéristiques des fleurs et de leur ressemblance considérable au niveau floral. Cependant, compte tenu de la grande variabilité dans la taille des fleurs et des longueurs d'éperon au sein du genre, il pourrait également y avoir une grande variation dans les espèces de papillons sphinx pollinisateurs.

1.2.4 SYSTÈME DE REPRODUCTION ET LIMITATION DES RESSOURCES POUR LE SUCCÈS

REPRODUCTEUR : BANQUE DE GRAINE

1.2.4.1 BANQUE DE GRAINES

La conservation des orchidées a fait l'objet de nombreuses publications (Koopowitz, 2001; Cribb *et al.*, 2003; Koopowitz *et al.*, 2003; Dixon et Phillips, 2007; Swarts et Dixon, 2009) en lien avec des programmes de conservation *ex situ* principalement par le biais de banques de semences d'espèces d'Orchidaceae. Cette approche de conservation *ex situ* a été implémenté par le jardin botanique de Kew à travers un important programme du Millenium Seed Bank Partnership (MSBP) qui a pour objectif de conserver à long terme les graines de toutes les espèces végétales connues. A ce jour, ce programme compte plus de 95 000 collections de graines représentant plus de 39 000 espèces issues de 190 pays (MSBP, 2020). Toutefois, ce programme ne peut à court terme assurer la préservation adéquate de toutes les graines d'espèces végétales, d'où la nécessité de développer d'autres banques de graines locales ou régionales, particulièrement en zone tropicale. Dans ce contexte, Seaton *et al.*, (2018) ont examiné l'état actuel du stockage des graines d'orchidées et du pollen par cryoconservation et ont souligné les avantages de la mise en place de collections vivantes établies à l'échelle mondiale. Cette démarche implique du temps et des ressources pour obtenir des fruits des populations sauvages. Pour la conservation, les graines doivent de préférence être récoltées avant la déhiscence des capsules, ce qui nécessite la présence de collecteurs sur place pour obtenir un

optimum de fruits. Plusieurs études réalisées sur la reproduction des orchidées en milieu naturel ont mis en évidence la faible production de fruits et de la qualité des graines en lien avec divers facteurs, notamment la limitation des pollinisateurs et des ressources (Tremblay *et al.*, 2005; Jersáková *et al.*, 2006; Metsare *et al.*, 2015; Buyun *et al.*, 2015). Pourtant, cette production de fruit et de graines viables pourrait être améliorée via des moyens artificiels impliquant les collections *ex situ*. Grâce à la mise en place des ombrières comme le réseau d'ombrières créées en Afrique tropicale (Stévar *et al.*, 2020), qui permettent la culture et le suivi des plantes vivantes collectées dans leur habitat naturel, des programmes de mise en place de banques de graines peuvent suivre afin de préserver sur le long terme les graines de ces plantes. Dans cette optique, une banque de graines associée à la collection d'orchidées vivantes de l'ombrière de Yaoundé a été créée depuis 2015. Cependant, pour alimenter cette banque de graines de manière constante et efficace avec des graines de haute qualité, il est important de maîtriser et de contrôler les facteurs garantissant la production optimale des fruits et des graines viables. Ceci passe par la maîtrise du système de pollinisation adéquat et des facteurs de limitation des ressources chez ces plantes.

1.2.4.2 SYSTEME DE REPRODUCTION

Chez les orchidées, la pollinisation peut être autogame (autopollinisation) ou allogame (pollinisation croisée). Ces deux systèmes de reproduction ont ainsi été testés par plusieurs auteurs afin d'évaluer leur importance et leur impact sur le succès de la reproduction des orchidées (Micheneau *et al.*, 2006; Martins et Johnson, 2007; Micheneau *et al.*, 2009; Pansarin et Ferreira, 2015; Suetsugu *et al.*, 2015b; Buyun *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2016).

L'autopollinisation ou autogamie est un mode de reproduction dans lequel les grains de pollen et les ovules qui fusionnent sont produits par la même fleur. Une autre variante de cette autogamie est la geitonogamie qui est une fécondation dans laquelle les grains de pollen fécondent les ovules d'autres fleurs d'un même individu. Cependant, ces deux types d'autopollinisation ont génétiquement le même effet sur la progéniture (dépression de consanguinité) de sorte que l'autogamie est utilisée au sens large. L'autogamie est rencontrée chez 10–15 % des orchidées (Dressler, 1993). Selon Dressler (1993), les cas d'auto-incompatibilité représentent au moins 10 % de toutes les espèces d'Orchidaceae même si Micheneau *et al.* (2009) ont affirmé que la véritable auto-incompatibilité est connue juste de quelques orchidées. Même si l'autogamie est largement répandue chez les angraecoides, le nombre de fruits formés n'est pas significativement différent entre l'autopollinisation et la pollinisation croisée dans la plupart des cas (Micheneau *et al.*, 2009). Plusieurs études impliquant des espèces tropicales montrent que l'autopollinisation chez les orchidées a des conséquences néfastes sur la pérennité des plantes étant donné qu'elle réduit l'exportation de pollen et le succès de la fécondation des ovules

(Holsinger et Thomson, 1994; Herlihy et Eckert, 2002). Elle réduit également les niveaux de diversité génétique (Charlesworth et Charlesworth, 1995) et peut conduire à la dépression de consanguinité caractérisée par une faible fertilité et/ou une faible viabilité de la progéniture (Andersson et Waldmann, 2002; Tremblay *et al.*, 2005). D'après Jersáková *et al.* (2006), lorsque les pollinisateurs sont rares, il peut y avoir un passage de la pollinisation croisée à l'autopollinisation et par conséquent, une diminution de la qualité des graines. Étant donné ces coûts apparents de l'autopollinisation chez la plupart des orchidées, des mécanismes favorisant la pollinisation croisée sont donc à prévoir (Tremblay *et al.*, 2005).

Contrairement à la précédente, pollinisation croisée ou allogamie chez les plantes consiste à la fécondation d'un individu par un pollen issu d'un autre individu de la même espèce. On distingue aussi la xénogamie qui est un mode de pollinisation croisée dans lequel le pollen qui féconde est issu d'un autre individu d'une espèce différente. Des études récentes ont démontré un effet positif de l'allogamie sur la proportion de graines ayant des embryons viables chez certaines espèces d'orchidées (Jersáková *et al.*, 2006; Buyun *et al.*, 2015). Dans le cadre de cette étude, l'autopollinisation et la pollinisation croisée dans leur sens strict ont été appliqués.

1.2.4.3 LIMITATION DES RESSOURCES

En plus des contraintes associées au type de pollinisation, la reproduction sexuée (production de fleurs et de fruits) chez les orchidées est limitée à la base par la disponibilité en ressources (Mattila et Kuitunen, 2000). En effet, il est largement admis que le faible rapport entre le nombre de fruits et de fleurs chez de nombreuses plantes est le résultat de la rareté en ressources disponibles pour le développement des fruits (Tremblay *et al.*, 2005). Chez les orchidées épiphytes en particulier, le taux de croissance des individus est lent et limité par la faible disponibilité en eau et en nutriments caractéristiques de leur habitat (Mondragon *et al.*, 2015). La grande partie des ressources impliquées dans la production de fruits proviennent des feuilles, des bractées et des parois des fruits (Primack et Hall, 1990). Ceci permet de déduire que la feuille à travers l'estimation de la surface foliaire est essentielle pour la production d'énergie et le processus d'accumulation des matières sèches chez les plantes (Tanko et Hassan, 2016). Il a été, en effet, démontré qu'une réduction des ressources disponibles suite à la défoliation réduit la production de fruits et de graines chez de nombreuses espèces (Stephenson, 1981). Par ailleurs, les plantes ayant des longues fleurs ont une plus grande surface photosynthétique leur donnant la capacité de stocker les photosynthétats et d'allouer ces ressources pour la reproduction (Stephenson, 1981; Meléndez-Ackerman *et al.*, 2000). Ceci montre que les paramètres des feuilles (nombre de feuilles, surface foliaire) seraient importants à évaluer pour tester la limitation des ressources chez les orchidées. Des études expérimentales s'étendant au-delà

d'une saison de floraison ont également montré que certaines orchidées changent l'allocation de leurs ressources suite à la production des fruits, car les individus présentent souvent une croissance moins vigoureuse ou un investissement réduit dans la floraison à la saison suivante (Ackerman et Montalvo, 1990; Primack et Stacy, 1998; Sletvold et Ågren, 2015).

1.2.4.4 SUCCES REPRODUCTEUR

L'étude du succès de la reproduction est pertinente pour toute approche de biologie de la conservation des orchidées (Vojtkó *et al.*, 2015). Pour plusieurs espèces d'orchidées, le succès reproducteur dans une population donnée dépend seulement d'une ou de quelques espèces de pollinisateurs, selon que l'espèce d'orchidée soit généraliste ou pas (Phillips *et al.*, 2020). Le nombre de pollinisateurs peut varier en fonction des stratégies de pollinisation (i.e. plus grande diversité de pollinisateurs dans les systèmes de récompense en nectar que dans ceux de duperie; Joffard *et al.*, 2019) et aussi en fonction de la région géographique (i.e. plus d'espèces pollinisatrices généralistes en Europe qu'en Afrique du Sud ; Johnson et Steiner, 2000). La production en fruits pour les espèces non-autogames au cours d'une saison de floraison semble être principalement limitée par le nombre de fleurs recevant du pollen, une tendance qui est observée à la fois chez les espèces terrestres et épiphytes (Tremblay *et al.*, 2005). En effet, la limitation du pollen chez les orchidées est généralement considérable en condition naturelle car on signale très souvent des augmentations de la production en fruits de 2 à 20 fois à la suite de pollinisations manuelles expérimentales (Tremblay *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2020). Ceci met en évidence que plusieurs facteurs, autres que la géographie et la stratégie de pollinisation, peuvent expliquer la limitation du pollen et par conséquent la limitation du succès de la reproduction observée chez les orchidées.

1.3 HYPOTHESES DE RECHERCHE ET OBJECTIFS

1.3.1 HYPOTHÈSES GLOBALE ET SPÉCIFIQUES

Ce travail donc repose sur l'hypothèse générale suivante : une étude intégrative de la morphométrie, de la phylogénie et de la biologie de la reproduction est nécessaire pour fournir une taxonomie cohérente et naturelle du genre *Cyrtorchis*, et pour développer des approches efficaces et durables pour la conservation de ses espèces.

Trois hypothèses spécifiques sont également formulées :

1- Le genre *Cyrtorchis* compte des entités taxonomiques morphologiquement et/ou phylogénétiquement cohérentes qui sont actuellement non décrites.

2- Les taxons du genre *Cyrtorchis* avec la même distribution géographique sont isolés d'un point de vue reproducteur car ils présentent une phénologie et/ou des pollinisateurs différents.

3- Le succès reproducteur chez *Cyrtorchis* varie entre les espèces et est influencé par le type de pollinisation (autogamie versus allogamie) et par la limitation en ressources.

1.3.2 OBJECTIFS GÉNÉRAL ET SPÉCIFIQUES

L'objectif général de la présente étude est de proposer une délimitation inter- et intraspécifique du genre *Cyrtorchis* en exploitant des outils modernes de délimitation taxonomique et de documenter la biologie de la reproduction de ses espèces.

Trois objectifs spécifiques sont formulés :

1- Clarifier la taxonomie au sein du genre *Cyrtorchis* en utilisant une approche combinant des analyses de morphométrie et de phylogénie moléculaire.

Cette approche de systématique intégrative vise plus spécifiquement à : (i) clarifier la position taxonomique des deux sections décrites par Summerhayes (1948) ; (ii) tester la monophylie des taxons subordonnés aux sections afin de produire une délimitation cohérente aux niveaux spécifique et infraspécifique au sein du genre ; et (iii) examiner l'évolution de traits floraux clés pour évaluer leur importance dans la reconstruction des relations entre les sections et les taxons.

La position taxonomique des deux sections ainsi que les taxons de rang spécifique et infraspécifique seront circonscrits au moyen des analyses morphométriques basées sur les caractères végétatifs et floraux. L'évaluation des relations de parenté entre ces sections et les taxons de rang spécifique et infraspécifique quant à elle, se fera au moyen de la phylogénie moléculaire et de la reconstruction des états ancestraux de quelques traits floraux.

2- Caractériser les patrons de floraison, les syndromes de pollinisation et les pollinisateurs de deux espèces cibles présentant des caractéristiques morphologiques, des distributions géographiques et des habitats contrastés (*Cyrtorchis okuensis*, *C. letouzeyi*).

Cet objectif consistera à l'identification des patrons de floraison de chacune des espèces cibles taxonomiquement valides en culture à l'ombrière de Yaoundé (étude *ex situ*) et à l'observation des syndromes de pollinisation et des pollinisateurs des espèces cibles dans leurs habitats naturels (étude *in situ*).

3- Identifier et évaluer les facteurs qui influencent la production des fruits et des graines viables chez le genre *Cyrtorchis* en étudiant deux espèces modèles (*Cyrtorchis ringens* et *C. aschersonii*) au Cameroun.

Cet objectif sera atteint grâce à l'évaluation de l'effet de deux modes de pollinisation (autopollinisation et pollinisation croisée) et de la limitation des ressources sur la production des fruits et des graines viables pour deux espèces du genre *Cyrtorchis* taxonomiquement valides, à phénologie décalée et disposant d'assez d'individus vivants à l'ombrière pour la réalisation des tests de pollinisation.

A terme, cette thèse permettra de contribuer à : (1) la clarification du statut taxonomique de chacune des sections et des espèces au sein du genre *Cyrtorchis*, (2) la connaissance de la biologie de la reproduction des orchidées épiphytes d'Afrique centrale et (3) la conservation (*in situ* et *ex situ*) des taxons menacés dans leurs habitats naturels.

Chapitre II Matériel et Méthodes



Réserve de faune du Dja, Sud Cameroun, Juin 2018

Pour cette thèse, nous avons dans un premier temps, clarifié la position taxonomique des sections au sein du genre *Cyrtorchis* de même que les relations entre les taxons de celles-ci. Pour ce faire, nous avons appliqué une approche de taxonomie intégrative impliquant de la morphométrie et de la phylogénie moléculaire. Sur la base de cette délimitation, nous avons dans un second temps, étudié la biologie de la reproduction et identifié les facteurs limitant le succès reproducteur de deux espèces cibles à travers la caractérisation (i) des patrons de floraison, (ii) des syndromes de pollinisation et (iii) l'identification des pollinisateurs. Ces espèces ont été choisies sur la base de leur délimitation taxonomique, leurs caractéristiques morphologiques, leurs distributions géographiques et leurs habitats contrastés. Enfin, nous avons testé l'effet du mode de pollinisation et de la limitation des ressources sur la production des graines et des fruits viables chez deux autres espèces modèles du genre pour lesquelles la taxonomie a été clarifiée et dont suffisamment de spécimens vivants étaient disponibles dans les collections vivantes sur lesquelles nous avons travaillé. Nous allons tour à tour présenter un résumé des principales méthodes utilisées. Les compléments I-8 détaillent les approches moléculaires.

II.1 METHODOLOGIE POUR L'ETUDE TAXONOMIQUE

Cette étude repose sur quatre étapes :

- (i) **Collecte des données sur le terrain et dans le réseau d'ombrières** en Afrique centrale pour l'obtention des herbiers et du matériel silica gel pour les analyses morphologiques et phylogénétiques ;
- (ii) **Examens visuels et délimitations des espèces connues et des morphogroupes** en utilisant les pratiques standards des herbiers (de Vogel, 1987), impliquant l'**inspection morphologique des collections disponibles**, y compris les types nomenclaturaux, afin de définir des groupes morphologiques cohérents. Un nom d'espèce publié, donc relié à un type nomenclatural, a été appliquée à chaque groupe défini. Les groupes qui n'ont pas pu être rattachés à un taxon existant sont traités comme potentiellement nouveau ;
- (iii) **Construction de la matrice de caractères morphologiques** pour les **analyses morphométriques** réalisées à travers des analyses statistiques multivariées permettant d'identifier des **traits morphologiques informatifs et discriminants** différenciant ces taxons ;
- (iv) **Test de la validité taxonomique des sections et espèces décrites dans la littérature grâce aux analyses phylogénétiques** sur les séquences d'ADN de six marqueurs (une région nucléaire et cinq régions plastidiques) ;

- (v) **Reconstruction des états ancestraux de certains caractères taxonomiques clés**, pour la délimitation des espèces.

II.1.1 STRATÉGIE DE COLLECTE DES DONNÉES SUR LE TERRAIN ET DANS LE RÉSEAU D'OMBRIÈRES

Sur le terrain, les spécimens d'orchidées collectés sont généralement stériles. Comme les caractères floraux sont déterminants voire indispensables pour l'identification efficiente des orchidées, les spécimens collectés ont été mis en culture dans des ombrières installées en Afrique centrale afin d'obtenir du matériel d'herbier en fleurs et/ou en fruits (**Figure II-1**). Les plantes collectées sur le terrain ont été rassemblées par relevé de terrain et par ressemblance morphologique. Pour la mise en culture, des étiquettes numérotées portant une abréviation de la localité de collecte sont rattachées à chaque plante (voir **Figure II-2**). Les plantes sont cultivées sur différents supports en fonction de leur mode de vie et type de port : planches ou caisses pour les orchidées épiphytes, à terre pour les orchidées terrestres. Ces plantes sont entretenues et suivies quotidiennement afin de caractériser leur phénologie. Une base de données relationnelle relie les relevés de terrain effectués lors des inventaires, les herbiers de terrain, les plantes cultivées dans les ombrières, les herbiers qui y sont récoltés et le matériel en silica gel qui est associé. La plupart des spécimens conservés en alcool ont été collectés au cours des 15 dernières années par Stévant *et al.* (2020) en Afrique centrale (Guinée, Cameroun, Bioko, Rio Muni, São Tomé, Príncipe et Gabon).

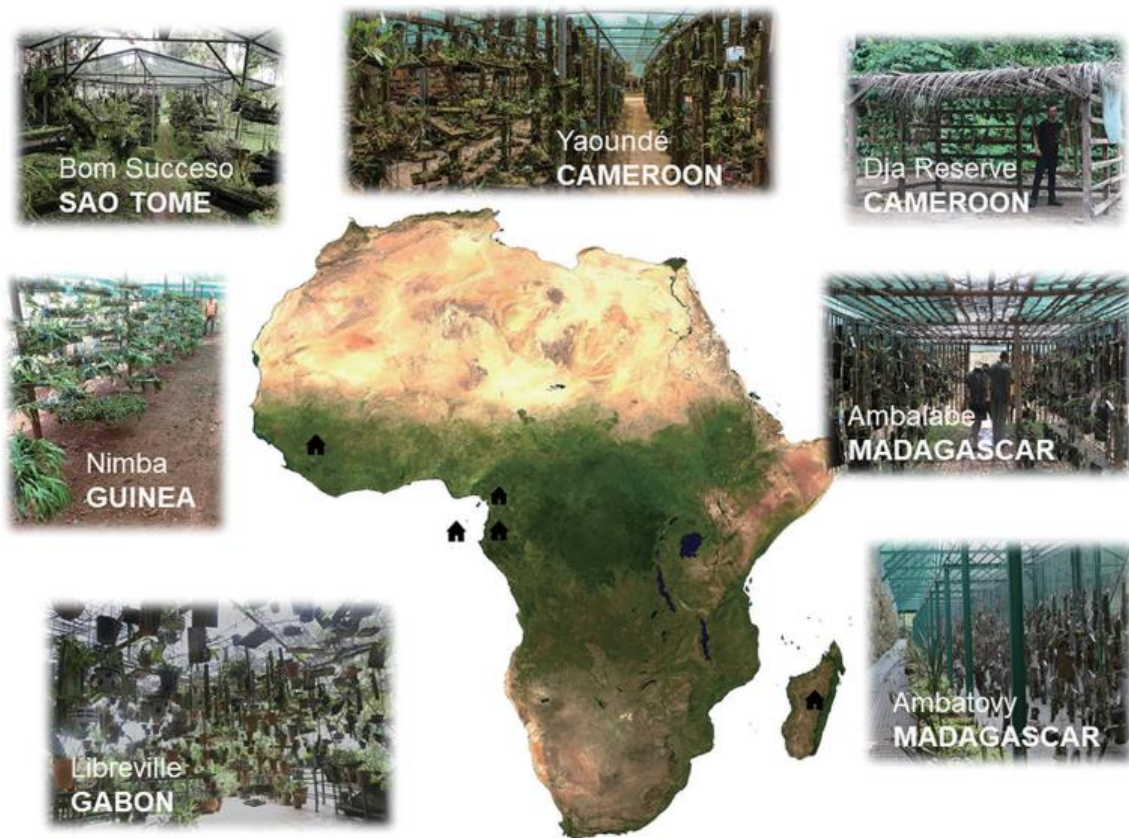


Figure II-1. Localisation des ombrières à orchidées en activité en Afrique tropicale et à Madagascar (reproduite de Stévant *et al.*, 2020). Ce réseau compte actuellement neuf ombrières dans cinq pays, totalisant, 32 013 orchidées vivantes de plus de 500 espèces (Stévant *et al.*, 2020). Parmi ces ombrières, celle de Yaoundé créée en 2004 au Laboratoire de Botanique systématique et d'Ecologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé abrite la plus grande collection *ex situ* d'orchidées vivantes africaines. Couvrant plus de 200 m², cette ombrière a accueilli plus de 7500 spécimens vivants d'environ 250 espèces et a produit plus de 8500 spécimens d'herbier pour l'identification et les différentes études scientifiques.

A la floraison, les spécimens fertiles (feuille et inflorescence) sont récoltés et conservés dans une solution diluée à environ 50 % d'alcool pour les analyses morphologiques. Du matériel foliaire associé est également récolté et conservé dans du gel de silice déshydratant pour les analyses moléculaires. Les spécimens fertiles et de matériel foliaire en silica gel utilisé dans le cadre de cette étude ont pour la plupart été récoltés à partir de la collection de plantes vivantes du réseau d'ombrières. Parmi ces spécimens vivants suivis à l'ombrière de Yaoundé, 206 d'entre eux ont été collectés en 2017 grâce à des missions de terrain réalisées au Cameroun dans le cadre de cette thèse dans le parc national de Oku dans la région du Nord-Ouest, à Nguti, Mamfé et Ebondji dans la région du Sud-Ouest, à Mindourou dans la région de l'Est et dans la réserve de faune du Dja dans la région du Sud.



Figure II-2. Spécimen vivant de *Cyrtorchis brownii* en culture à l'ombrière de Yaoundé montrant une étiquette bleue associée portant les références (numéro de culture et initiales du lieu de collecte)

II.1.2 EXAMENS VISUELS ET DÉLIMITATIONS DES ESPÈCES CONNUES ET DES MORPHOGROUPES

Les observations morphologiques nécessaires à la délimitation des taxons ont été réalisées sur 1752 spécimens séchés, conservés en alcool ou des scans provenant de 18 herbaria (voir le **point II.1.2.1**), incluant les 26 types nomenclaturaux décrits dans le genre et rattachés à 18 espèces « valides » dans le genre *Cyrtorchis* (Govaerts *et al.*, 2020; IPNI, 2020). La majeure partie des échantillons était issue de nos collectes sur le terrain et surtout du réseau d'ombrières. Suite à l'inspection visuelle minutieuse, des groupes de spécimens morphologiquement cohérents ont été constitués, et lorsque cela était possible, rattachés à l'une des espèces actuellement acceptées. Les échantillons ou groupe d'échantillons qui ne correspondent à aucun type nomenclatural ou à aucune diagnose fournie dans les protologues sont traités comme de nouvelles entités (de Vogel, 1987).

Deux fleurs par inflorescence ont été mesurées puis disséquées pour examen sous une loupe binoculaire de marque Zeiss STEMI SV 11 : la plus petite proche de l'apex de l'inflorescence et la plus grande proche de sa base. La plus petite et la plus grande feuille ont aussi été mesurées quand cela était possible. Pour les échantillons sous forme de planche d'herbier, une ou deux fleurs ont été prélevées et réhydratées dans de l'eau bouillante pour faciliter la dissection florale, puis transférées après dissection dans un mélange de 50 % d'eau distillée, 45 % d'éthanol et 5 % de glycérine pour une conservation à long terme.

II.1.2.1 VISITE ET COLLECTE DE DONNEES DANS LES DIFFERENTS HERBARIA

Pendant cette thèse, cinq principaux herbaria européens abritant des collections africaines et un herbarium africain ont été visités. Il s'agit du Jardin Botanique de Meise en Belgique (BR, acronymes des herbaria selon Thiers, (2020)), de l'Herbarium et Bibliothèque de Botanique africaine de l'ULB en Belgique (BRLU) ; le Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris en France (P), Herbier de l'Université de Montpellier II (MPU), l'herbarium de l'Université de Wageningen en Hollande (WAG ; maintenant déplacé à Leiden, L) et l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé (YA). Pour le Botanical Garden of the University of Basel (BAS) en Suisse, le Natural History Museum of London en Angleterre (BM), le Royal Botanic Gardens of Kew en Angleterre (K), le Real Jardín Botánico de Madrid en Espagne (MA), le Missouri Botanical Garden à Saint Louis aux États-Unis (MO) et Les Herbiers de l'Université Claude Bernard de Lyon (LY), les spécimens ont été obtenus en prêt et mis à disposition à l'herbarium de BRLU pour examen. Des scans (échantillons numérisés) ou des photos des collections d'herbiers pour lesquels les visites et l'obtention de prêts n'étaient pas possibles ont également été obtenus. Ce sont entre autres Le Bolus Herbarium of the University of Cape Town en Afrique du Sud (BOL), le Forest Herbarium of Ibadan au Nigéria (FHI), le El Herbario de la Universidad de Granada (GDA) en Espagne, l'herbarium de l'Instituto de Investigação Científica Tropical (LISC), et le Museu Nacional de História Natural e da Ciência au Portugal (LISU) et l'herbarium de l'Université d'Abidjan en Côte d'Ivoire (UCJ).

II.1.3 CONSTRUCTION DE LA MATRICE DE CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES POUR LES ANALYSES MORPHOMÉTRIQUES

L'étude morphométrique s'est basée sur la mesure de caractères de l'appareil végétatif et reproducteur choisis classiquement utilisés dans les monographies et les traitements taxonomiques pour l'étude morphologique du genre (Lindley, 1839; Schlechter, 1914; Summerhayes, 1948; la Croix *et al.*, 1983, 1991; Geerinck, 1992; Chiron, 2001; Szlachetko et Olszewski, 2001) ou des Orchidaceae en général, ainsi que sur la base de notre propre inspection visuelle (**Figure II-3**). Au total de 255 échantillons ont ainsi été mesurés, représentant 27 morphogroupes définis, y compris les 21 taxons publiés dans le genre dont 18 espèces acceptées, 1 espèce non acceptée et 2 sous-espèces (*C. arcuata* subsp. *arcuata*, *C. arcuata* subsp. *whytei*, *C. acuminata*, *C. aschersonii*, *C. brownii*, *C. chailluana*, *C. crassifolia*, *C. erythrae*, *C. glaucifolia*, *C. guillaumetii*, *C. hamata*, *C. henriquesiana*, *C. injoloensis*, *C. letouzeyi*, *C. monteiroae*, *C. neglecta*, *C. praetermissa* subsp. *praetermissa*, *C. praetermissa* subsp. *zuluensis*, *C. ringens*, *C. seretii*, *C. submontana*). La plupart étaient conservés en alcool (179 spécimens), d'autres aussi sous forme de planche d'herbier (68 spécimens) ou des scan d'échantillons (8 spécimens) (voir **Appendix III-1**). Au total, 59 caractères ont été initialement mesurés, parmi lesquels 31 étaient quantitatifs et 28 qualitatifs (**Appendix III-2**). La terminologie décrivant la structure et les

formes suit le *Systematics Association Committee for Descriptive Biological Terminology* (1962a; b) et le glossaire de Kew (Beentje, 2010).

La matrice de données pour les analyses morphométriques comprend 171 spécimens représentant 20 morphogroupes sur lesquels 43 caractères ont été mesurés (26 quantitatifs et 17 qualitatifs) (voir **Appendix III-2**) puisque la plupart des analyses multivariées réalisées n'admettent pas de valeurs manquantes. La majeure partie des spécimens retenus pour les analyses morphométriques y compris les spécimens obtenus en prêt des autres herbaria (BAS, BR, K et WAG) a été regroupée et mesurée dans les locaux de BRLU. Les spécimens examinés, mais non mesurés sont cités dans le traitement taxonomique de chacun des taxons (voir article 2).

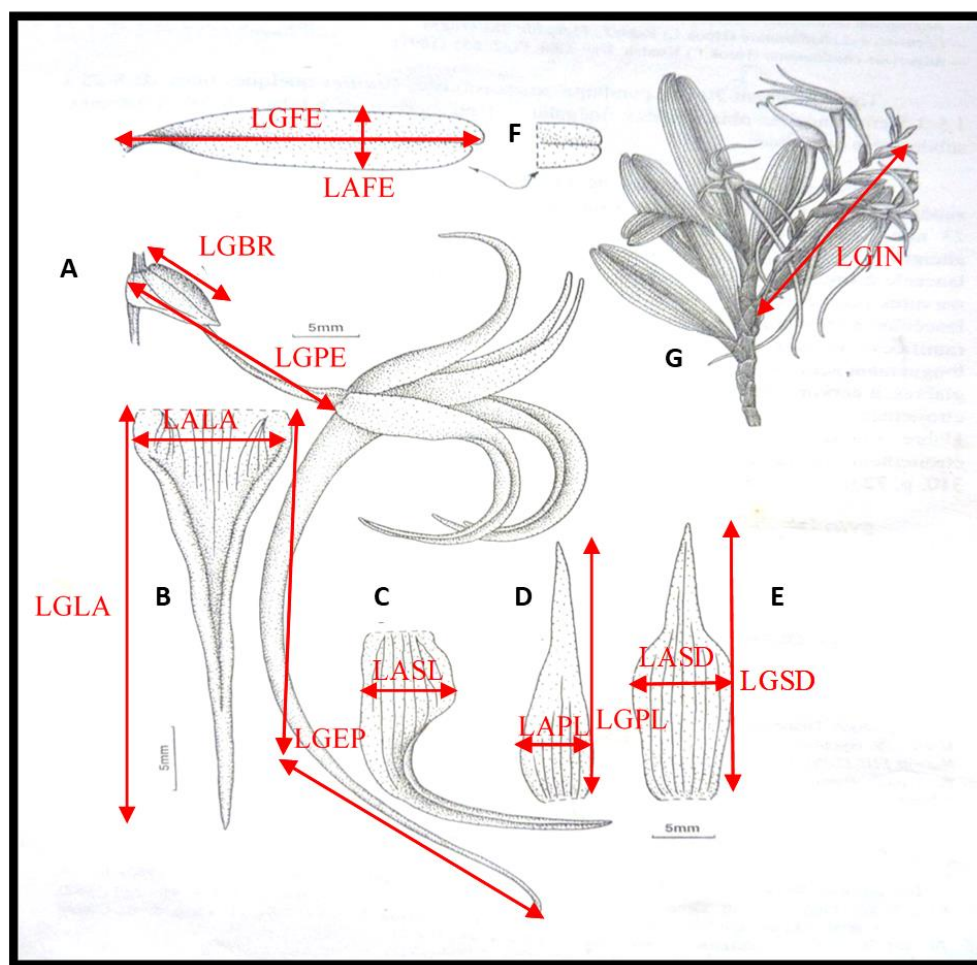


Figure II-3. Illustration de *Cyrtorchis chailluana* (Szlachetko et Olszewski, 2001) illustrant les principaux caractères morphologiques considérés pour cette étude. A. Fleur (LGBR = Longueur de la bractée ; LGPE= Longueur de l'éperon), B. Labelle (LALA= Largeur du labelle ; LGLA= Longueur du labelle), C. Sépale latéral (LASL= Largeur du sépale latéral), D. Pétale latéral (LAPL= Largeur du pétale latéral ; LGPL= Longueur du pétale latéral), E. Sépale dorsal (LASD= Largeur du sépale dorsal ; LGSD= Longueur du sépale dorsal), F. Feuille (LGFE= Longueur de la feuille ; LAFE= Largeur de la feuille), G. Tige et inflorescence (LGIN= Longueur de l'inflorescence).

II.1.4 ANALYSES MORPHOMÉTRIQUES

Des analyses multivariées de la matrice de caractères permettent de vérifier si les taxons ou morpho-espèces identifiés par l'inspection visuelle préalable sont statistiquement distincts les uns des autres. La matrice a été soumise à une analyse de Hill et Smith (Hill et Smith, 1976), aussi appelé analyse factorielle des données mixtes (AFDM), recommandée pour les matrices de données mixtes (variables quantitatives et variables qualitatives ou facteurs). Une analyse en composante principale (ACP) a également été réalisée sur la matrice des données composée par les 26 variables quantitatives uniquement. Nous avons également réalisé des tests de comparaison multiples dont le test de Student (T test) pour les variables suivant une distribution normale et le Least Significant Difference de Fisher (LSD) (Fisher, 1935) pour les variables ne suivant pas une distribution normale. Le test de normalité de Shapiro-Wilk (Royston, 1982) a été exécuté préalablement à ces tests de comparaisons pour évaluer si chaque variable quantitative suivait un modèle de distribution normal afin de définir le type de test paramétrique ou non paramétrique à appliquer. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel R (<https://www.r-project.org/>), version 3.4.4 (R CoreTeam, 2019).

II.1.5 ECHANTILLONNAGE ET ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES

Le matériel génétique a été obtenu à partir de tissus foliaires frais ou séchés dans du silica gel, associé un voucher physique qui permet de (re)vérifier l'identification. Les spécimens inclus dans les analyses phylogénétiques ont également été inclus dans les analyses morphologiques. Dans la mesure du possible, au moins deux spécimens de chacun des morphogroupes inclus dans l'analyse morphométrique ont été choisis pour l'étude phylogénétique. Soixante-neuf accessions de *Cyrtorchis* représentant 21 morphogroupes ont été échantillonnées pour le séquençage de l'ADN en utilisant un marqueur nucléaire (nrITS-1) et cinq marqueurs plastidiques (*matK*, *rps16*, *trnL-trnF* intergenic spacer, *trnC-petN* intergenic spacer, et *ycf1*) (voir Complément 4, pour plus de détails). Les 21 morphogroupes incluait 15 taxons décrits (sept taxons sur les neuf de la section *Homocolleticon* et huit taxons sur les dix de la section *Cyrtorchis*) et six présumés nouveaux taxons définis sur la base de l'analyse visuelle. Quatre spécimens issus de genres les plus apparentés à *Cyrtorchis* (outgroupes) ont été inclus afin de tester la monophylie du genre. Ces outgroupes ont été choisis sur la base de preuves moléculaires établies par des études récentes (Simo-Droissart *et al.*, 2018a; D'hajjère *et al.*, 2019) à savoir *Podangis dactyloceras* (Rchb.f.) Schltr., *Rhipidoglossum rutilum* (Rchb.f.) Schltr., *Ypsilopus longifolius* (Kraenzl.) Summerh. et *Rangaeris longicaudata* (Rolfe) Summerh.

Toutes les séquences ADN utilisées proviennent soit des spécimens sélectionnés, extraits et amplifiés au laboratoire d'Evolution Biologique et Ecologie de l'ULB en Belgique dans le cadre de la présente

étude, soit de séquences publiées (Simo-Droissart *et al.*, 2013b, 2016, 2018a; D'hajjère *et al.*, 2019; Farminhão *et al.* 2020) et accessibles via Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Le protocole d'extraction, d'amplification et de séquençage adopté dans ce travail a été adapté des travaux de Simo-Droissart *et al.* (2013, 2016, 2018a), D'hajjère *et al.* (2019) et Farminhão *et al.* (2020) (voir **Compléments 2, 5**, pour plus de détails). Pour les analyses des données moléculaires, nous avons appliqué trois principales méthodes, (i) le maximum de vraisemblance et (ii) l'analyse bayésienne pour l'estimation de l'arbre phylogénétique et (iii) la reconstruction des états ancestraux pour examiner l'évolution et l'importance de certains caractères floraux clés dans la reconstruction des relations de parenté entre les taxons (voir **Compléments 6-8**, pour plus de détails).

II.2 METHODOLOGIE POUR L'ÉTUDE DE LA BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Cette étude repose sur cinq étapes à savoir:

- (i) La **caractérisation des patrons de floraison** de 15 taxons *in situ* et *ex situ* en utilisant un protocole de suivi hebdomadaire en ombrière (*ex situ*) pour identifier la période de floraison des espèces et un protocole de suivi journalier en milieu naturel (*in situ*) pour suivre la floraison et caractériser les événements de pollinisation et de fructification pour l'évaluation du succès reproducteur ;
- (ii) **L'observation des visiteurs des fleurs et du (des) pollinisateur(s)** chez deux espèces cibles à l'aide d'un dispositif de caméras autonomes et la capture des papillons pollinisateurs à l'aide de pièges lumineux. Les proboscis des papillons capturés ont été ensuite mesurés pour les comparer à la longueur des éperons des fleurs ;
- (iii) Tests de pollinisation manuels (autopollinisation vs. pollinisation croisée) sur deux espèces cibles en ombrière en vue **d'identifier le système de pollinisation le plus efficace pour la production des fruits et des graines viables** ;
- (iv) **L'évaluation de l'effet de la limitation des ressources** (surface foliaire et nombre de fleurs pollinisées) et son **impact sur la production des fruits et des graines viables** chez deux espèces cibles en ombrière.

II.2.1 CARACTÉRISATION DES PATRONS DE FLORAISON : COLLECTE ET ANALYSES DES DONNÉES

Un suivi phénologique des spécimens vivants en ombrière (*ex situ*) et sur le terrain (*in situ*) a été effectué pour 15 taxons accessibles, en particulier le suivi hebdomadaire de 495 spécimens vivants de l'ombrière de Yaoundé en 2017, 2018 et 2019.

La période de floraison du genre *Cyrtorchis* et le nombre de taxons en fleurs par mois ont été déterminés en cumulant le nombre d'individus par espèce en fleurs ainsi que le nombre d'espèces en fleurs par mois durant les trois années. En revanche, la période de floraison de chacun des 15 taxons a été produite en calculant le pourcentage d'individus en fleurs par espèce chaque mois.

II.2.2 OBSERVATION DES VISITEURS, POLLINISATEURS ET DES SYNDROME DE POLLINISATION : ÉCHANTILLONNAGE ET ANALYSES DES DONNÉES

Les pollinisateurs ont été étudiés sur deux espèces, *Cyrtorchis okuensis* (une nouvelle espèce décrite dans ce travail) et *C. letouzeyi* (chez six individus par espèce), choisies sur la base de leurs caractéristiques morphologiques, leur distribution géographique et les habitats contrastés qu'elles présentent (**Tableau II-1**). Le suivi *in situ* de *C. okuensis* s'est fait dans une population dense et facilement accessible d'une savane boisée du parc national de Oku (région du Nord-ouest Cameroun), tandis que celui de *C. letouzeyi* a été réalisé en bordure d'un affleurement rocheux (Rocher David) dans la réserve de faune du Dja (région de l'Est Cameroun) où les individus sont accessibles sur des petits arbustes de 1 à 3 m de hauteur. L'observation des visiteurs et des pollinisateurs de ces espèces a nécessité l'observation via des caméras numériques (pendant 25 jours pour *C. okuensis* en 2017 et pendant 30 jours en 2018 et 2019 pour *C. letouzeyi*) et la capture d'insectes à l'aide de pièges lumineux (**Figure II-4 BC**). Pour compléter nos observations, nous avons réalisé un suivi manuel journalier 1) de la floraison dès l'ouverture de la première fleur (anthèse), 2) de la proportion des fleurs visitées par les insectes et 3) du taux de fructification dans l'optique d'évaluer le succès de la reproduction (**Figure II-4 A**).

Deux types de caméras autonomes ont été utilisées pour surveiller les pollinisateurs: 1) quatre caméras Bushnell Natureview HD MAX ont été programmées pour prendre des photos des individus en fleurs toutes les minutes pour le suivi de *Cyrtorchis okuensis* dans le parc National d'Oku ; 2) sept caméras prototypes « Raspberry Pi » développées dans le cadre de cette étude (Droissart *et al.*, 2021), qui combinent à la fois une excellente résolution d'image, la possibilité de filmer des fleurs et pollinisateurs minuscules (< 1 cm) de jour comme de nuit et une bonne autonomie (au moins 50 heures de film en continu) ont été utilisées pour le suivi de *C. letouzeyi* dans la réserve de faune du Dja durant deux saisons de floraison (2018 et 2019).

Des mesures de la longueur des éperons des fleurs et l'évaluation de la période d'émission de parfum et en la quantification du volume de nectar des fleurs à l'aide des tubes micro capillaires et sa concentration en sucre à l'aide d'un réfractomètre ont été réalisés afin de mieux comprendre la relation entre ces paramètres et les visiteurs des fleurs et de mieux caractériser le syndrome de pollinisation (**Figure II-4 D**). Ces paramètres du nectar n'ont été mesurés que chez *C. letouzeyi*.

Tableau II-1. Caractéristiques distinctives des deux espèces pour l'étude de la biologie de la pollinisation.

Taxons	Éperon (Longueur en cm)	Section	Distribution	Habitats
<i>C. letouzeyi</i>	Long (5,7-9,5)	<i>Cyrtorchis</i>	Sub-endémique Cameroun et (une collecte au Gabon)	Transition forêt- savane ou inselberg et affleurements rocheux en forêt dense humide
<i>C. okuensis</i>	Court (1,9-4)	<i>Homocolleticon</i>	Endémique de la LVC* (Nigeria, Cameroun et Guinée Equatoriale)	Végétation montagnarde : forêt humide ou savane boisée

* Ligne Volcanique du Cameroun

Des pièges lumineux ont permis de capturer les papillons de nuit et de les comparer aux images ou vidéos des pollinisateurs obtenus avec les caméras autonomes. Les proboscis des papillons capturés ont été mesurés à l'aide d'une règle graduée à partir de la base de la tête jusqu'à leur extrémité (Peter et Venter 2017; Martins et Johnson 2007). Les insectes capturés ont été conservés dans du silicagel et envoyés pour identification à Dr. Rodolphe Rougerie, spécialiste des lépidoptères et de la famille des Sphingidae en particulier au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.



Figure II-4. Dispositif expérimental utilisé pour étudier la biologie de la pollinisation de *Cyrtorchis letouzeyi* dans la réserve de faune du Dja (Est Cameroun). A. Suivi journalier de la phénologie et de la pollinisation; B. Collecte de papillons de nuit au moyen d'un piège lumineux ; C. Dispositif de caméra piège utilisé pour l'observation des visiteurs; D. Mesure de l'éperon et quantification du nectar et sa concentration en sucre. A et C de Vincent Droissart.

Les images enregistrées avec les caméras Bushnell ont été analysées manuellement et les identifications et activités des différents visiteurs ont été encodés dans une feuille Excel. Les vidéos enregistrées avec les caméras Raspberry Pi ont été analysées automatiquement à l'aide du programme MATLAB © r2019a et d'un script développé par Vincent Deblauwe (UCLA-Congo Bassin Institute, voir Droissart *et al.*, en révision). La procédure permet d'introduire plusieurs vidéos obtenues des caméras et de produire à la fin une séquence résumée unique combinant toutes les séquences avec des mouvements. En visionnant ces séquences résumées, tous les visiteurs des fleurs ainsi que leurs activités ont été enregistrées dans une base de donnée pour des analyses ultérieures. Afin de confirmer l'identité du pollinisateur, les proboscis des sphinx capturés ont été comparés aux longueurs des éperons en effectuant le test non paramétrique de rang de Wilcoxon-Mann-Whitney (McDonald, 2014).

II.2.3 EVALUATION DES FACTEURS INFLUENÇANT LA PRODUCTION DES FRUITS ET DES GRAINES VIABLES

II.2.3.1 COLLECTE DE DONNEES

En vue d'identifier et d'évaluer les facteurs influençant la production des fruits et des graines viables dans le genre *Cyrtorchis*, des tests de pollinisation manuelle ont été réalisés en utilisant deux espèces, *Cyrtorchis aschersonii* (164 individus) et *C. ringens* (78 individus), choisies parce qu'elles sont bien représentées à l'ombrière de Yaoundé (min 100 individus par espèce) et sont représentatives des deux sections du genre définies selon Summerhayes (1948). Les expérimentations ont été réalisées durant trois années consécutives (2017, 2018 et 2019). Les principaux paramètres évalués sont le système de pollinisation et la limitation des ressources.

L'effet du système de pollinisation a été réalisé à travers deux tests de pollinisation manuelle, à savoir l'autopollinisation et la pollinisation croisée, afin de comparer la production des fruits et des graines viables. En outre, ces deux traitements ont été appliqués sur une fleur ou trois fleurs par individu afin d'agir sur la quantité de ressources à allouer à la reproduction, constituant au total quatre traitements.

L'impact de la limitation des ressources sur la production de fruits et de graines viables a été testé à travers quatre paramètres : le nombre de feuilles, la surface foliaire, le nombre de fleurs pollinisées (1 ou 3) et le taux d'avortement des fruits. Avant les tests de pollinisation, le nombre de feuilles et leurs dimensions (longueur et largeur) ont été mesurées afin d'évaluer la surface foliaire.

Après les pollinisations manuelles, les fruits formés ont été suivis jusqu'à leur maturation. Après leur récolte, les fruits ont été mesurés (poids, longueur, largeur, couleur) et ont suivi une série de traitements de séchage (séchage des fruits et des graines dans du riz déshydraté et ensuite des graines dans un dessiccateur contenant du chlorure de lithium) et de conditionnement (transfert dans des tubes hermétiques en verre pour cryoconservation) (**Figure II-5 C, D**) avant la réalisation des tests de viabilité. Ces derniers ont été réalisés par la méthode au tétrazolium suivant le protocole du réseau mondial « Orchid Seed Science and Sustainable Use » (OSSSU) (Seaton et Pritchard, 2003; Seaton *et al.*, 2010; Hosomi *et al.*, 2011), validé et recommandé pour la conservation des graines d'orchidées. Les graines issues de ce test ont ensuite été montées entre lame et lamelle et les proportions de graines viables et non viables ont été quantifiées pour chaque fruit. La **Figure II-5** récapitule les différentes étapes des tests de pollinisation manuelle, du traitement jusqu'aux tests de viabilité des graines.



Figure II-5. Pollinisation et banque de graines. A) Pollinisation manuelle de *Cyrtorchis aschersonii* B) Fruits issus de la fécondation manuelle de *C. ringens*. C) Séchage de graines dans un dessiccateur. D) Graines sèches conservées dans des petits tubes. E) Graines issue de test de viabilité dans des Eppendorf D) Observation de graines viables (embryon colorée, flèche rouge) au microscope. C, D et E de Vincent Droissart.

II.2.3.2 METHODES D'ANALYSES DES DONNEES

Avant les analyses statistiques, un test de normalité de Shapiro a permis de vérifier si les résidus de l'ANOVA suivaient une distribution normale. Lorsque ce n'était pas le cas, le test non-paramétrique de rang de Wilcoxon a permis de vérifier s'il existe une différence entre les médianes des traitements pour chaque variable explicative. Par la suite, un test de Fisher LSD (Least Significant Difference) a été réalisé pour trouver les moyennes et les médianes significativement différentes. Les différences significatives ont été évaluées à l'aide d'un test de Student avec une correction de Hochberg appliquée

pour l'ajustement du risque alpha. Afin d'évaluer l'influence de la limitation des ressources sur la production en fruits et graines viables, les corrélations entre la surface foliaire, le nombre de feuilles, le nombre d'inflorescences, le nombre de fruits formés, le taux d'avortement des fruits, et la proportion de graines viables ont été testées à travers le test de corrélation de Spearman en utilisant le package *corrplot* (Wei et Simko, 2017) du logiciel R.

Chapitre III Résultats



Hippotion celerio collecté au mont Oku Nord-Ouest Cameroun, Mai 2017

III.1 CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DU GENRE *CYRTOCHIS* ET DELIMITATION TAXONOMIQUE ET PHYLOGENETIQUE

La première étape de notre travail a été de clarifier la délimitation des sections et des espèces au sein du genre en explorant le matériel d'herbier dans les différents herbaria et du matériel vivant dans les ombrières d'Afrique centrale.

Ce travail de délimitation taxonomique a permis de résoudre de nombreux problèmes taxonomiques au travers de diverses contributions relatives au point III.1.1. Plus précisément, nous avons tout d'abord entrepris de mieux décrire le genre *Cyrtorchis* en mettant en lumière les sections et les espèces associées présentes en Afrique centrale, qui représentent la quasi-totalité des espèces du genre (15 des 18 taxons valides du genre) et pour lesquelles les connaissances taxonomiques et les exigences écologiques (types de supports, mise en culture et entretien) étaient mal connues. Nous avons par la suite produit un synopsis de ces espèces d'Afrique centrale (voir point III.1.2) grâce à l'inspection visuelle des spécimens d'herbiers disponibles, la revue de la littérature associée et la collecte de nouveaux matériels dans les ombrières. Ce synopsis a permis de résoudre certains problèmes taxonomiques incluant neuf nouvelles signalisations, trois mises en synonymie et deux lectotypifications. Elle a également permis de mettre en évidence et de décrire une nouveauté taxonomique (*Cyrtorchis submontana* Stévar, Droissart & Azandi). Enfin, nous avons proposé une clé d'identification pour ces espèces d'Afrique centrale.

La suite du travail d'étude taxonomique a été de clarifier la délimitation des sections et des espèces subordonnées en combinant des analyses morphométriques multivariées et phylogénétiques en incluant la majorité des espèces du genre. Cette dernière étape nous a permis de confirmer la monophylie du genre, de l'une des sections et de huit taxons y compris trois nouveautés taxonomiques. L'une de celles-ci est décrite au point III.1.3.

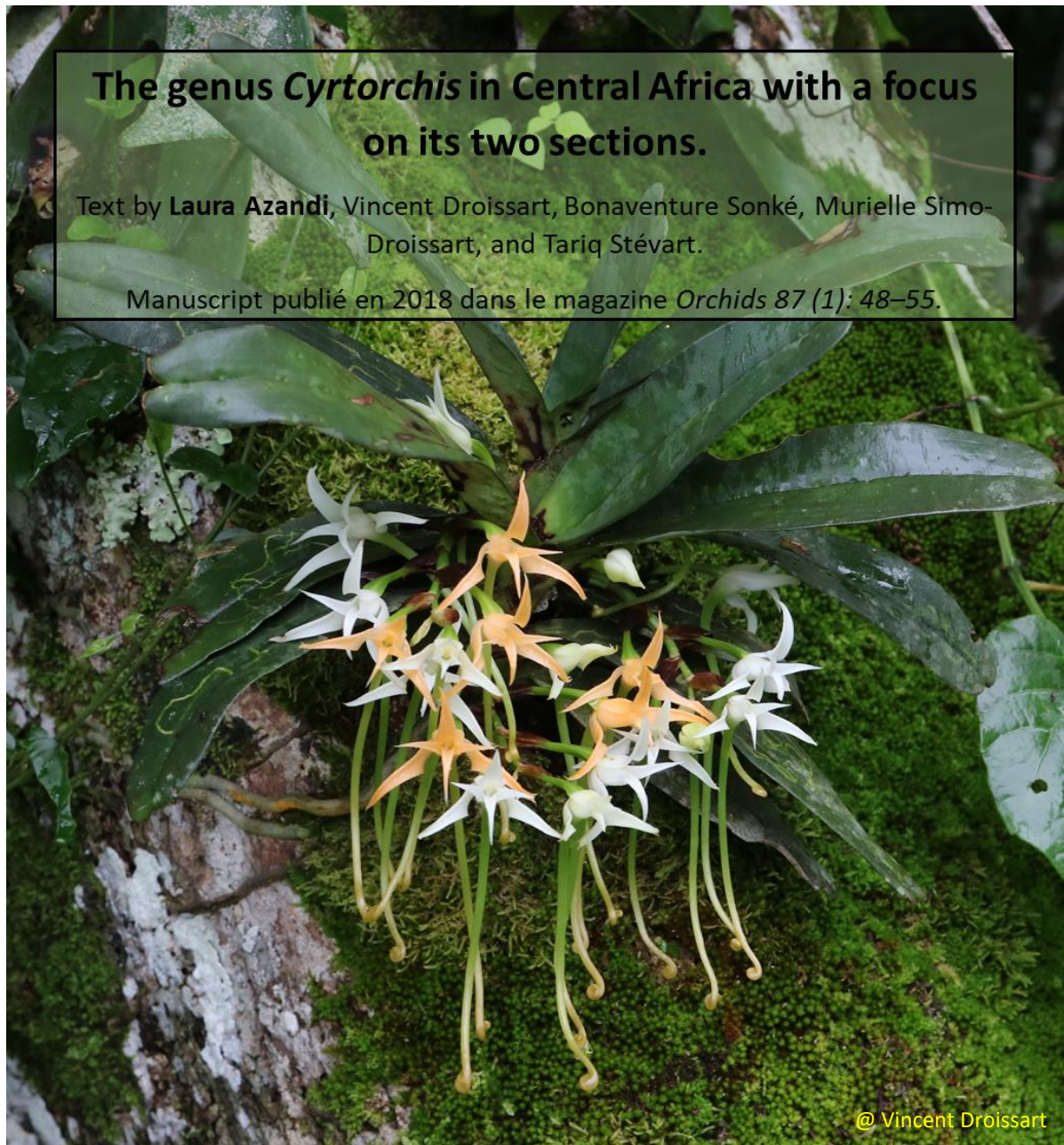
III.1.1 CONTRIBUTION À LA CONNAISSANCE DU GENRE *CYRTOCHIS* ET RÉVISION SYNOPTIQUE DES ESPÈCES D'AFRIQUE CENTRALE

Dans cet article, nous présentons le genre *Cyrtorchis* en Afrique centrale en se focalisant sur les deux sections du genre et les 15 espèces associées. Cet article de vulgarisation présente une brève description du genre ainsi que ses exigences écologiques et les techniques de mise en culture des spécimens en Afrique tropicale à savoir dans les ombrières. Les caractéristiques discriminantes des deux sections sont présentées. Une brève description des espèces connues en Afrique centrale, leur écologie, leur phénologie et leur distribution y sont également détaillées.

The genus *Cyrtorchis* in Central Africa with a focus on its two sections

Adpaté de Azandi L., Droissart V., Sonké B., Simo-Droissart M., & Stévert T.

Manuscript publié en 2018 dans le magazine *Orchids* 87 (1): 48–55.



III.1.1.1 THE GENUS *CYRTOCHIS*

Since its description by Rudolf Schlechter in 1914, *Cyrtorchis* has always been prized for its long spurred and fragrant flowers. *Cyrtorchis* was described to accommodate a small group of species related to the former *Angraecum arcuatum*, which is currently named *Cyrtorchis arcuata*. The genus belongs to the Vandaeae tribe, and more specifically to the subtribe Angraecinae. This group of approximately 760 species, known as the “angraecoid orchids”, is one of the most taxonomically problematic clade of the large subfamily Epidendroideae (Chase *et al.*, 2015; Freudenstein & Chase, 2015). According to the Plant List 2016, *Cyrtorchis* has 18 accepted species distributed in Continental Africa and the Gulf of Guinea Islands (Bioko, São Tomé and Príncipe). *Cyrtorchis* species are easily recognizable, even though their accurate identification remains difficult (Stewart *et al.*, 2006). When describing *Cyrtorchis*, Schlechter only named four species but stated that the genus might contain about 15 species altogether. Twenty-two years later after its publication, Summerhayes (1936) revised the genus for the *Flora of West Tropical Africa*, and recognized seven species, including three additional species one of which he divided into three subspecies. Twelve years later, this author split the genus into two distinct sections according to the nature of viscidium, section *Heterocolleticon* and section *Homocolleticon*. Then, Summerhayes (1960) revised the genus again and replaced the sectional name *Heterocolleticon* by *Cyrtorchis*, recognizing a total of 15 species for the whole genus. More recently, Chiron (2001) described a new species from Cameroon and produced an identification key for 12 species among the 15 revised by Summerhayes in 1960. At the same time, while preparing the treatment of Orchidaceae for the *Flore du Cameroun*, Szlachetko et Olszewski (2001) raised the two sections at the generic level, based on different features of the viscidium, recognizing two genera *Cyrtorchis* and *Homocolleticon*. Recent molecular studies have proved the monophyly of the genus (Carlsward *et al.*, 2006; Simo, 2014). In addition, morphometric study was used to produce a synoptic revision of the Central African species (Azandi, 2014; Azandi *et al.*, 2016), resolving some taxonomic ambiguities and providing an identification key for the 15 Central African taxa, along with the description of a new typical species from submontane vegetation, *C. submontana*. However, this preliminary taxonomic works needed to be completed by taking into account all specimens of the genus. Indeed, solving the remaining species complexes (*C. ringens*, *C. brownii* and *C. guillaumetii*) is still needed before we can produce a revision of the whole genus.

In the present contribution, we aim to highlight some of the little-known *Cyrtorchis* species with emphasis on the sections and their allied species occurring in Central Africa. This genus is the subject of the first author’s PhD research, funded by the American Orchid Society, which aims to elucidate the taxonomy, the reproductive biology, and the conservation of the *Cyrtorchis* species.

III.1.1.2 MORPHOLOGICAL DESCRIPTION AND ECOLOGICAL REQUIREMENT OF THE GENUS

Cyrtorchis species are epiphytic or rarely lithophytic orchids, found in open, shade or in partial shade in semi-deciduous and evergreen forest and riverine forests, in *Brachystegia* and savanna woodlands, ranging from sea level to 8530 feet (2,600 m). They represent relatively large African orchids with roots emerging all along the erect or branching stem. Leaves are distichous, fleshy, or coriaceous, flat or conduplicate, unequally and obtusely bilobed at the apex (**Figure III-1**). The one or several axillary inflorescences have few-many-flowered and are usually shorter than the leaves. Bracts are generally large pale green, loosely enclose the flowers in bud and turn black or dark brown. Flowers are easily recognized by their ivory white or cream-colored resupinated and star-shape that fade to yellow or orange when old, with rather similar recurved sepals and petals. Lip passes gradually into a long curving and tapering spur. Most *Cyrtorchis* species flowers are sweetly scented, particularly in the evening and during the night; and are thought to be pollinated by hawkmoths.



Figure III-1. A. First author pointing out a plant of *Cyrtorchis letouzeyi* (by Vincent Droissart). B. *Cyrtorchis arcuata* subsp *arcuata* taken *in situ* (by Tariq Stévert).

III.1.1.3 TWO SECTIONS BASED ON REPRODUCTIVE FLORAL PARTS

Summerhayes was the first to notice fundamental reproductive features on the structure of the viscidium that induced him to divide the genus into two sections: the *Homocolleticon* section and the *Cyrtorchis* section. These differences are not easy to observe except with a hand lens or a binocular. In absence of a global taxonomic study of the angraecoid orchids that demonstrates the monophyly of

these two groups as genera, we follow the segregation of species into these two sections as widely followed in the literature.

SECTION HOMOCOLLETICON: Species here are characterized by the uniformly linear viscidium, gradually tapering from the apex to the base with equal hyaline texture throughout its length, thin apex of the stipite (<0.5 mm). The flowers of species allied to this section are on the average smaller than those in the other section. Seven species have been described in Central Africa, including one restricted to submontane vegetation.

SECTION CYRTORCHIS (originally called **HETEROCOLLETICON**): Species of this section are recognized by their composed viscidium texture with a broad rather stiff hardened upper portion with recurved edges and a linear hyaline and very thin lower portion, wider apex of the stipite (≥ 0.5 mm). Seven species have been recognized in Central Africa, one of which is divided into two subspecies (**Figure III-2**).

After characterizing the two sections of the genus, we present now the Central African taxa of each section.

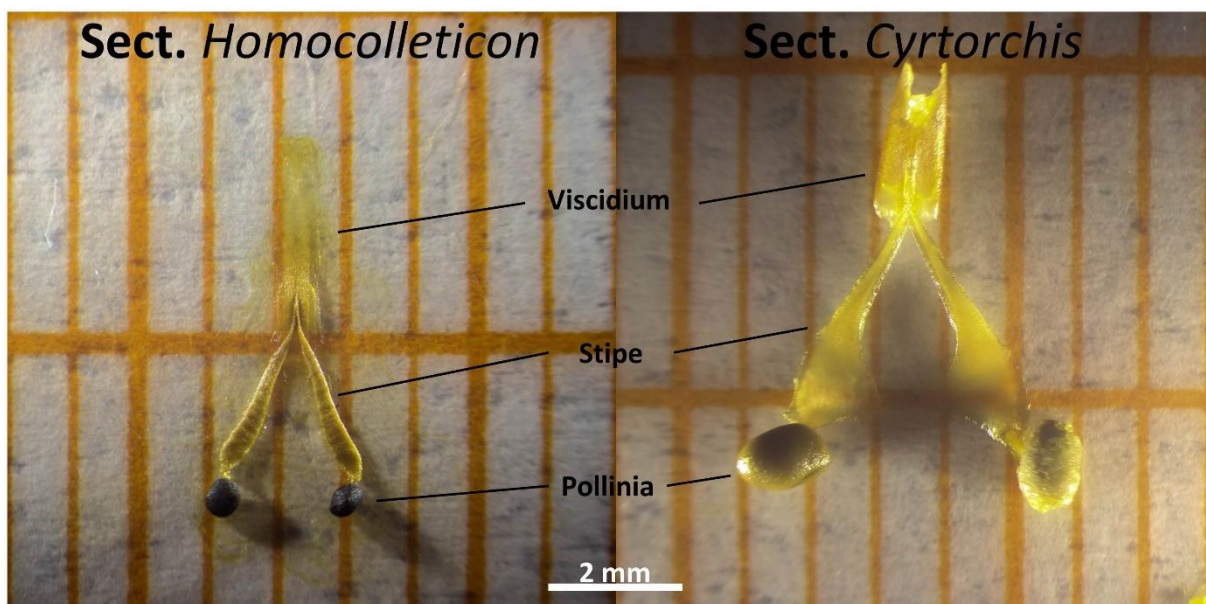


Figure III-2. Comparison of the pollinarium structure in *Cyrtorchis*. By Laura Azandi.

III.1.1.3.1 SPECIES OF *CYRTORCHIS* SECTION HOMOCOLLETICON

Cyrtorchis brownii is characterized by the relatively short ligulate but flat and fleshy leaves and the very dense inflorescences of 2.7–3.1 inches (7–8 cm) long, up to 14 flowered. The characteristic floral bract is imbricate and longer than the pedicel and ovary. Flowers are small with a slightly curved spur. *Cyrtorchis brownii* is an epiphytic plant in lowland to submontane evergreen forest; riverine forest, saxicolous forest around inselberg; on mossy branches of tall trees between 1640–3999 feet (500–

1,219 m) elevation. Flowering peaks are observed in November and December. *Cyrtorchis brownii* occurs in 15 countries extending from Sierra Leone to Malawi and is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa (**Figure III-3**).

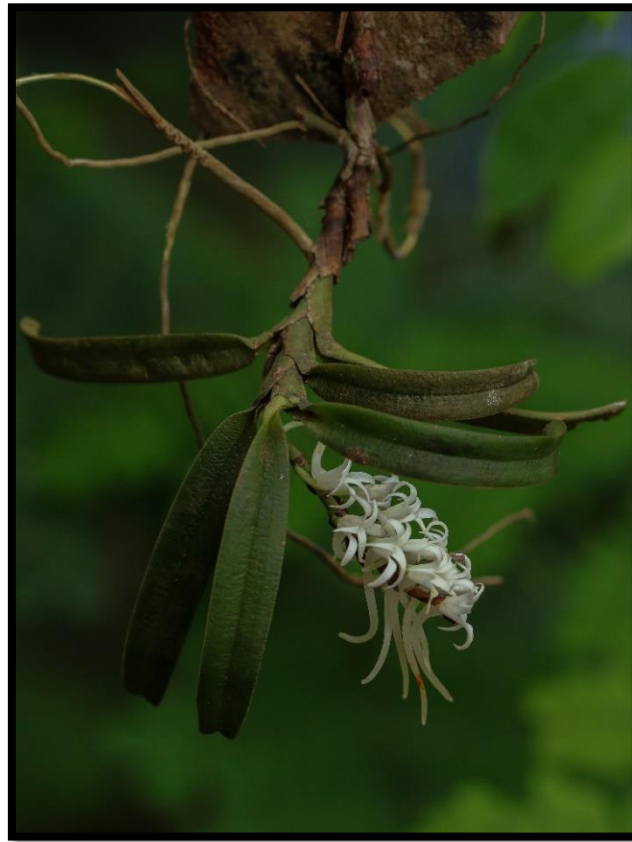


Figure III-3. *Cyrtorchis brownii* taken in shadehouse. By Vincent Droissart.

Cyrtorchis guillaumetii is closer to *C. brownii* but is characterized by its subimbricated bract, shorter than the pedicel and ovary; anther cap noticeably extended forward, covering the base of the rostellum (**Figure III-4**). It is an epiphyte in high rainforest on upper branches. Flowering peaks are observed in November and December. *Cyrtorchis guillaumetii* is only recorded from two countries, Sierra Leone and Ivory Coast and is thus endemic to West Africa.



Figure III-4. A cultivated plant of *Cyrtorchis guillaumetii*. By Perez-vera (paratype Kew orchid iconography).

Cyrtorchis henriquesiana is easily recognized by its imbricate linear shaped and acicular leaves. Inflorescences are short with less than 0.8 inch (2.5 cm) long, usually 2-8 flowered (Figure III-5). The species closely resembles *C. aschersonii* vegetatively but the latter has wider V-shaped leaves and a quite different viscidium belonging to sect. *Cyrtorchis*. It occurs in rainforest, secondary forest and in cocoa plantations at 220–1935 feet (67–590 m) elevation, in sunny to medium-shade location. The flowering peak is observed in August. *Cyrtorchis henriquesiana* occurs in six countries extending from Ghana to Democratic Republic of the Congo and is thus endemic to West Central Africa.



Figure III-5. *Cyrtorchis henriquesiana* taken in shadehouse cultivation. By Vincent Droissart.

Cyrtorchis injoloensis is characterized by its inflorescence loose at the base but dense towards the apex and the spaced longer bract covering the pedicel and ovary. Flowers are of about $\frac{3}{8}$ – $\frac{1}{2}$ inch (1–1.4 cm) apart, 14–20 flowered (Figure III-6). This taxon is widely spread in primary forest and forest remnants, ranging between 98 and 3937 feet (30 and 1,200 m) elevation. Flowering peaks are observed in July and September. *Cyrtorchis injoloensis* occurs in four countries extending from Gabon to Tanzania and is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.



Figure III-6. *Cyrtorchis injoloensis* photographed in cultivation. The inset is a close-up of a single inflorescence. By Lourens Grobler.

Cyrtorchis monteiroae with its long pendent stems and broad dark green oblanceolate and spaced leaves, with characteristic undulated margins, is the largest species of section *Homocolleticon*. Inflorescences are loose, long and pendent up to about 14 ½ inches (37 cm) long, with 5–32 spaced flowers (Figure III-7). This species can be vegetatively confused with *C. chailluana* which has rather the larger flower with the longest spur of the whole genus. *Cyrtorchis monteiroae* is an epiphytic species in evergreen forests, near rivers or lakes ranging between 164–3999 feet (50–1,219 m) elevation. Flowering peaks are observed in September and October. *Cyrtorchis monteiroae* occurs in 14 countries extending from Sierra Leone to Angola. Its distribution thus extends from Western to Eastern Africa.



Figure III-7. *Cyrtorchis monteiroae* photographed in cultivation. The insert photograph of a mature plant was taken *in situ*. By Vincent Droissart.

Cyrtorchis ringens is characterized by imbricated non-fleshy but coriaceous slender leaves with equally bilobed apex, up to 3 ½ inches (9 cm) long, dense inflorescences and small depressed bracts (Figure III-8). Given the great morphological variations observed on herbarium and living specimens associated to *C. ringens*, additional morphometric and molecular studies are needed to accurately clarify the delimitation of this taxon. It can be found in evergreen forest, high river forest, submontane or riverside, between 23 and 8530 feet (7 and 2,600 m) elevation. Flowering peaks are observed in September and December. *Cyrtorchis ringens* occurs in 20 countries extending from Senegal to Zimbabwe and is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.



Figure III-8. *Cyrtorchis ringens* photographed in cultivation. The insert is close-up of a single inflorescence. By Vincent Droissart.

Cyrtorchis submontana was described in 2016. This taxon resembles *C. guillaumetii* and *C. brownii* but differs by having thinner leaves, fewer flowers, less curved and shorter inflorescences (Figure III-9). Plants of *C. submontana* are restricted to submontane vegetation in evergreen moist forest on mossy branches, and in saxicolous forests around inselbergs ranging from 1804 to 3937 feet (550 to 1,200 m). Flowering peak is observed in June. *Cyrtorchis submontana* occurs in three countries from Cameroon, Equatorial Guinea (Rio Muni) to Republic of the Congo and is thus endemic to Central Africa.



Figure III-9. *Cyrtorchis submontana* taken *in situ*. Note the diminutive stature of the plant (inset). By Vincent Droissart.

III.1.1.3.2 SPECIES OF *CYRTOCHIS* SECTION *CYRTOCHIS*

Cyrtorchis arcuata is a very variable species initially divided into four subspecies (subsp. *arcuata*, subsp. *whytei*, subsp. *variabilis* and subsp. *leonensis*) by Summerhayes (1960). This complex was later revised and reduced into two subspecies (*Cyrtorchis arcuata* subsp. *arcuata* and *Cyrtorchis arcuata* subsp. *whytei*) that shows clear discriminant characteristics. These two subspecies have in common fleshy non-imbricate, oblong shaped leaves and spaced, ovate to broadly ovate bract with acuminate apex. *Cyrtorchis arcuata* subsp. *arcuata* is characterized by the straight or incurved spur of 1.2–2 inches (3–5.5cm) long, 5-15 flowered. Members of this taxon are commonly found on the trunks and large branches of large trees (Perez-Vera, 2003) in various vegetation types (forest, savanna) (**Figure III-10 B**). The second subspecies, *Cyrtorchis arcuata* subsp. *whytei*, has a sigmoid spur of 2–3 inches (5.8–8.5 cm) long and are 6–8 flowered. The length of spur is likely approaching that of *C. chailluana*, but the latter has the longest spur of the genus up to 6 inches (16 cm) long and spaced leaves with undulated margin rather than imbricate leaves with flat margins of *C. arcuata*) (**Figure III-10A**). They are usually found as epiphyte in more open vegetation such as forest galleries, swampy area and sclerophyllous scrub on lava (Geerinck, 1992). Flowering peak is observed in September. *Cyrtorchis arcuata* occurs in

27 countries extending from Senegal to South Africa and is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

Cyrtorchis aschersonii is easily identifiable among the species of the section by its linear V-shaped leaves of 0.8–1.4 cm wide. The inflorescences are erect; 5–11 flowered with sigmoid or curved spur, with slender acute apex (**Figure III-10 C**). This species is epiphytic in mature, high forest, on trunks and branches of large trees, between 459 and 5594 feet (140 and 1,705 m elevation). Flowering peak is observed in August. *Cyrtorchis aschersonii* occurs in nine countries extending from Sierra Leone to Democratic Republic of the Congo and is thus widespread from Western to Central Africa.



Figure III-10. A. *Cyrtorchis arcuata* subsp. *whytei* taken shadehouse cultivation. B. *Cyrtorchis arcuata* subsp. *arcuata* taken shadehouse cultivation. C. *Cyrtorchis aschersonii* in cultivation note the relative flower size (inset). By Vincent Droissart.

Cyrtorchis chailluana is a pendulous epiphyte with a long stem. The peculiarity of this showy species is the large attractive white sweetly scented flowers that have the longest spur of all *Cyrtorchis* species, up to 6 inches (16 cm) long (**Figure III-11**). The species is found in rainforest between 98–4363 feet (30 and 1,330 m) elevation. Flowering peak are observed in August and September. *Cyrtorchis chailluana* occurs in 15 countries extending from Guinea to Uganda and is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.



Figure III-11. A colony of *Cyrtorchis chailluana* in Libreville, Gabon (West Central Africa). By Vincent Droissart.

Cyrtorchis hamata is characterized by the straight or slightly S-shaped spur of $\frac{3}{4}$ – $1\frac{1}{2}$ inches (2.7–4.3 cm) long with a hooked-up apex (**Figure III-12**). The taxon is an epiphyte in high semi-deciduous forest and in secondary vegetation between 656 and 2132 feet (200 and 650 m elevation). Flowering peak is observed in August. *Cyrtorchis hamata* occurs in six countries extending from Ivory Coast to Gabon and is thus distributed from Western to Central Africa.



Figure III-12. A cultivated plant of *Cyrtorchis hamata*. By Vincent Droissart.

Cyrtorchis letouzeyi was described in 2001. It is characterized by fleshy dark-green colored leaves and particularly by the pendulous spur of 1.9– $3\frac{1}{2}$ inches (5.7–9 cm) long with rolled up or twisted apex. This attractive species is usually found from forest-savanna transition to dense humid rain forest, between 722 and 2401 feet (220 and 732 m elevation). Flowering peaks are observed in June and July. *Cyrtorchis letouzeyi* is only recorded from three countries: Cameroon, Central African Republic and Gabon. It is thus endemic to Central Africa.

Cyrtorchis neglecta is characterized by dense inflorescences, 4–12 flowered, as long as or slightly shorter than the subtending leaves unlike *C. seretii*. Bract are usually spaced, $\frac{1}{2}$ – $1\frac{1}{2}$ inches (0.6–1.5

cm) apart. Member of this species are found in gallery forests, open forests or shrublands between 2001 and 5498 feet (610 and 1,676 m) elevation. Flowering peak is observed in March. *Cyrtorchis neglecta* occurs in five countries extending from Democratic Republic of the Congo to Zambia and is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

Cyrtorchis seretii is characterized by fleshy and imbricate leaves, with flattened margins. Inflorescences are shorter than the sub-tending leaves, 7–9 flowered. Bracts are sub-imbricate, 1/3–½ inch (1.2–1.6 cm). Individuals of this species are found in woodlands between 1443–4921 feet (440–1,500 m) elevation. Flowering peaks are observed in March and August. *Cyrtorchis seretii* occurs in five countries extending from Ethiopia to Zambia and is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

III.1.1.4 GROWING *CYRTOCHIS* SPECIES IN TROPICAL AFRICA

Since *Cyrtorchis* are mostly epiphytic species, they are usually cultivated on woody substrate from tropical rainforest trees. Medium to deep shade and high humidity are essential for their cultivation. They are very sensitive to dry atmosphere, and the leaves soon start to look wilted. Watering must thus be frequent throughout the year, although somewhat less just after flowering. Flowering mostly occurs during the large rainy season (June to October in Cameroon). An effective way to grow most species of *Cyrtorchis* is by mounting them on vertical sticks, branches or woody bark that provides a good substrate for species with a pendent habit and thick numerous long roots on which the stem can be tied until it attaches itself by the roots. Plaque of wood or wooden raft, mounted piece of bark or a basket or pot of free-draining compost offers yet other surfaces on which other erect stemmed plants species grow (**Figure III-13**).



Figure III-13. A. *Cyrtorchis chailluana* in cultivation. B. *Cyrtorchis ringens* grown in cultivation. By Laura Azandi.

Now, we aim to continue our exploration of this fascinating Angraecoid orchids genus by elucidating the pollination ecology of some Central African *Cyrtorchis* species. The genus is composed of species with complex floral structure that may involve interesting sphingophilous syndromes. These results from pollination studies will be presented in a future paper.

Acknowledgements

The senior author thanks the American Orchid Society and the National Science foundation supports in the form of a research fellowship for Laura Azandi.

III.1.2 RÉVISION SYNOPTIQUE DU GENRE *CYRTOCHIS* SCHLTR. (ANGRAECINAE, ORCHIDACEAE) EN AFRIQUE CENTRALE ET DESCRIPTION D'UNE NOUVELLE ESPÈCE RESTREINTE À LA VÉGÉTATION SUBMONTAGNARDE

En prélude à la révision taxonomique du genre *Cyrtorchis*, une révision synoptique des espèces d'Afrique centrale a été réalisée. Un examen détaillé de 1039 spécimens d'herbiers incluant les types nomenclaturaux a permis de reconnaître 14 espèces en Afrique centrale (dont une subdivisée en deux sous-espèces), dont une nouvelle espèce décrite comme *Cyrtorchis submontana*. Cette nouvelle espèce ressemble morphologiquement à *C. guillaumetii* et *C. brownii*, mais en diffère par ses petites feuilles minces et elliptiques, et ses courtes inflorescences pauciflores présentant de courtes bractées et des fleurs plus espacées. L'espèce est restreinte à la végétation submontagnarde d'Afrique centrale et est évaluée comme En Danger selon les critères et catégories de la liste rouge de l'UICN. *Cyrtorchis latibracteata* et *C. subcylindrifolia* sont lectotypifiés; la deuxième espèce est placée en synonymie de *C. henriquesiana*. Neuf nouvelles signalisations sont découvertes. Pour chaque taxon reconnu, la distribution, l'habitat et l'écologie sont précisés. Une clé d'identification pour les taxons d'Afrique centrale est également fournie.

Synoptic revision of the genus *Cyrtorchis* Schltr. (Angraecinae, Orchidaceae) in Central Africa, with the description of a new species restricted to submontane vegetation

Adapté de Azandi L., Stévant T., Sonké B., Simo-Droissart M., Avana M.L. & Droissart V.

Manuscript publié en 2016 dans la revue *Phytotaxa* 267 (3): 165–186.

Abstract

As a preliminary step to the taxonomic revision of the genus *Cyrtorchis*, a synoptic revision of the species occurring in Central Africa was undertaken. Based on a detailed examination of 1,039 herbarium specimens, including nomenclatural types, we have recognized 14 species in Central Africa (one of which is divided into two subspecies), including one new species that the study brought to light, described here as *Cyrtorchis submontana*. The new species closely resembles *C. guillaumetii* and *C. brownii* in general aspect, but differs from them in having thinner, small elliptic leaves and shorter, fewer-flowered, more lax inflorescences with shorter bracts. The species is restricted to submontane vegetation of Central Africa and is assessed as Endangered following the IUCN Red List Categories and Criteria. *Cyrtorchis latibracteata* and *C. subcylindrifolia* are lectotypified, and the latter is placed as a synonym under *C. henriquesiana*. Many new records are reported, and for each taxon the distribution, habitat and ecology are given. An identification key for the Central African taxa is also provided.

Key words: Angraecoid orchids, Central African rainforest, *Homocolleticon*, new records, shadehouses network, taxonomy.

III.1.2.1 INTRODUCTION

Cyrtorchis Schlechter (1914: 595) is a small African angraecoid orchid genus with 17 species (Govaerts *et al.* 2016), largely distributed in Continental Africa and in the Gulf of Guinea Islands (Annobón, Bioko, São Tomé and Príncipe). Members of the genus are epiphytic plants; with ivory white, lanceolate, generally recurved perianth parts and a lip that passes gradually into a long, curving and tapering spur (Stewart *et al.* 2006).

The genus *Cyrtorchis* belongs to tribe Vandeeae, subtribe Angraecinae (ca. 760 spp.) — known as the “angraecoid orchids”, one of the most taxonomically problematic groups within the large subfamily Epidendroideae (Chase *et al.* 2015). Rudolf Schlechter described the genus to accommodate a small group of species allied to *Angraecum arcuatum* Lindley (1837: 204). Summerhayes (1936) revised *Cyrtorchis* for *Flora of West Tropical Africa*, recognizing eight species and, 12 years later, split the genus into two distinct sections according to the nature of viscidium: section *Heterocolleticon* Summerhayes (1948: 278) and section *Homocolleticon* Summerhayes (1948: 278). Summerhayes (1960) revised the genus again and replaced the sectional name *Heterocolleticon* by *Cyrtorchis* (Summerhayes 1960:144), recognizing a total of 15 species. More recently, Chiron (2001) revised the genus, produced an identification key for 12 species, and described a new species from Cameroon. At the same time, while preparing the treatment for the *Flore du Cameroun*, Szlachetko & Olszewski (2001) raised the two sections to the rank of genus, based on the different features of the viscidium, recognizing *Cyrtorchis sensu stricto*, and *Homocolleticon* (Summerh.) Szlachetko & Olszewski (2001: 727). However, in absence of a global taxonomic study of the angraecoid orchids that demonstrates the monophyly of these two genera and supports their separation, we follow Chiron’s and Summerhayes’s treatments and maintain *Cyrtorchis* as a genus divided in two sections.

Examination of specimens recently collected since 1997 during fieldwork in West Central Africa has shown that species delimitation of *Cyrtorchis* was not adequately resolved in earlier taxonomic treatments (e.g. *Cyrtorchis arcuata* (Lindl.) Schlechter (1914: 595)) and that a robust identification key was not available. Moreover, preliminary molecular studies on angraecoid orchids (Carlsward *et al.* 2006, Simo 2014) suggested the monophyly of the genus, and we foresaw the need for a taxonomic revision of the genus as a whole. As a preliminary step toward this revision, we undertook a review of the Central African species. During this work, we found a group of specimens from submontane vegetation near the Atlantic coastline of Central Africa that clearly differs from all other recognized *Cyrtorchis* taxa. Comparison with specimens of other species showed that material of this group possesses a unique combination of vegetative and floral characters not previously reported for the genus. These specimens, formerly identified as belonging to *C. brownii* var. *guillaumetii* Perez-Vera (2003: 250) by Droissart *et al.* (2009), represent a new *Cyrtorchis* species. In addition to the description

of this new species, the present synopsis of the genus *Cyrtorchis* provides new records for Central African countries and an analytical key for the 15 recognized Central African taxa, and new synonymy.

III.1.2.2 MATERIAL AND METHODS

The synopsis presented here is based on examination of 1,039 dried and spirit-preserved *Cyrtorchis* specimens collected in Africa and deposited at BRLU, BR, K, P, WAG and YA (herbarium acronyms according to Thiers 2016). About 250 specimens were collected during the last 15 years in West and Central Africa, most of them from living plants cultivated in shadehouses located in Central Africa (Cameroon, São Tomé and Príncipe, Equatorial Guinea and Gabon). Flowers from dried material were initially boiled in water to facilitate stereomicroscopic observation. Morphological investigation used a Zeiss stereomicroscope Stemi SV11 for both spirit-preserved material and herbarium sheets. We investigated species delimitations in *Cyrtorchis* by visual inspection to define coherent morphological groups. The appropriate species name for all examined specimens was derived from the attribution of nomenclatural types to each distinct group, or otherwise treating it as a potentially new entity. The general distribution of taxa treated in the present synopsis is mainly based on data given on herbarium sheets and on the World Checklist of Orchidaceae (Govaerts *et al.* 2016). New country records were identified by comparing the resulting species distributions based on examined specimens with those of Govaerts *et al.* (2016). The chorological types follow White (1979, 1983) although we simplify his “subcentres of endemism” into Domains. Information on the habitat and ecology of each taxon is derived from labels on herbarium specimens and available literature. The phenology for each species (flowering peaks) is compiled from examined fertile herbarium specimens.

A preliminary risk of extinction assessment was made only for the new species by applying the IUCN Red List Categories and Criteria (IUCN 2001, 2014). Georeferenced specimen data were imported into GIS to calculate area of occupancy (AOO) and extent of occurrence (EOO). The cell size for AOO was set 2 × 2 km as recommended by IUCN (2014). Each locality was regarded as a separate subpopulation. The number of ‘locations’ (as defined by IUCN 2014) was calculated with regard to each particular threat, such that a single ‘location’ may encompass more than one adjacent population.

III.1.2.3 TAXONOMIC TREATMENT

III.1.2.3.1 IDENTIFICATION KEY FOR *CYRTOCHIS* TAXA PRESENT IN CENTRAL AFRICA

1. Uniformly hyalin viscidium with the apex of the stipites < 0.5 mm wide
.....2. Section ***Homocolleticon***
- Viscidium hardened in the upper part and hyalin in the lower part, apex of the stipites ≥ 0.5 mm wide
..... 8. Section ***Cyrtorchis***

2. Leaves fleshy 3.
 - Leaves not fleshy 6.
3. Leaves linear and acicular **Cyrtorchis henriquesiana** Ridley (1887: 231) Schlechter (1918: 131)
 - Leaves narrowly elliptic and flattened 4.
4. Inflorescence 1–4 cm long, 1–5 flowered **Cyrtorchis submontana**
 - Inflorescence more than 6.4 cm long, 7–14 flowered 5.
5. Bract imbricate, longer than the pedicel and ovary; anther cap slightly extended forward
 **Cyrtorchis brownii** Rolfe (1906: 378) Schlechter (1918: 129)
 - Bract subimbricate, shorter than the pedicel and ovary; anther cap noticeably extended forward,
 covering the base of the rostellum **Cyrtorchis guillaumetii** Perez-Vera (2003: 250) Rice (2005: 27)
6. Leaves not imbricated with undulate margins
Cyrtorchis monteiroae Reichenbach (1877: 76) Schlechter (1914: 596)
 - Leaves subimbricate or imbricate, with flat margins 7.
7. Inflorescence loose, bract covering the pedicel
Cyrtorchis injoloensis De Wildeman (1916: 187) Schlechter (1918: 131)
 - Inflorescence dense, bract not covering the pedicel
Cyrtorchis ringens Reichenbach (1878b: 266) Summerhayes (1958: 87)
8. Leaves linear, 0.8–1.4 cm wide ... **Cyrtorchis aschersonii** Kränzlin (1889: 160) Schlechter (1918: 129)
 - Leaves oblong or narrowly elliptic, more than 2 cm wide 9
9. Spur hooked or twisted at the apex 10.
 - Spur straight at the apex 11.
10. Spur 2.7–4.3 cm long with a hooked like apex
Cyrtorchis hamata Rolfe (1906: 132 t.8074) Schlechter (1914: 596)
 - Spur 5.7–9 cm long twisted at the apex **Cyrtorchis letouzeyi** Szlachetko & Olszewski (2001: 722)
11. Leaves spaced, undulate margins, spur hanging to 16 cm long
Cyrtorchis chailluana Hooker (1866: t.5589) Schlechter (1914: 596)
 - Leaves imbricate, flat margins, spur bow-shaped to 10 cm long 12
12. Lower bract more than 1.6 cm long 13

- Lower bract to 1.6 cm long 14
13. Spur straight or incurved, 3–5.5 cm long ***Cyrtorchis arcuata* subsp. *arcuata***
- Spur sigmoid, 5.8–8.5 cm long
- Cyrtorchis arcuata* subsp. *whytei*** Rolfe (1898: 155) Summerhayes (1960: 147)
14. Inflorescence significantly shorter than the sub-tending leaves
- Cyrtorchis seretii*** De Wildeman (1916: 191) Schlechter (1918: 132)
- Inflorescence long as or slightly shorter than the sub-tending leaves
- Cyrtorchis neglecta*** Summerhayes (1960: 149)

III.1.2.3.2 SYNOPSIS OF *CYRTOCHIS* TAXA FROM CENTRAL AFRICA

1. ***Cyrtorchis arcuata*** (Lindl.) Schltr. Basionym: *Angraecum arcuatum* Lindl. Type:—SOUTH AFRICA. Albany: plantes du cap, Kopje, 14 December 1829, *J.F.Drège 4580 d* (holotype K!, isotype P!).

1.1. ***Cyrtorchis arcuata* subsp. *arcuata*.**

Heterotypic synonyms: *Listrostachys sedeni* Reichenbach (1878a: 138). *Angraecum sedenii* (Rchb.f.) Nicholson (1884: 79). *Angorchis sedenii* (Rchb.f.) Kuntze (1891: 652). *Cyrtorchis sedenii* (Rchb.f.) Schlechter (1918: 132). Type:—SIERRA LEONE. Mateboi, Sanda Tenraran Chieftdom, 7 June 1951, *P Adames 229* (holotype K!).

Listrostachys obrieniana (Hort.Sand.) Rolfe (1912: 284). *Angraecum obrienianum* Sander (1892: 816), *nomen nudum*.

Cyrtorchis bracteata Schlechter (1915: 600). Type:—TANZANIA. Nyassa Hochland, Station Kyimbila, 10 May 1911, *A.F. Stolz 715*. (holotype B†, isotypes C, WAG, K!, M).

Listrostachys acuminata Rolfe (1897: 154). *Cyrtorchis acuminata* (Rolfe) Schlechter (1918: 128). Type:—PRÍNCIPE. 31 January 1891, *A.Henriques s. n.* (holotype K!).

Cyrtorchis arcuata subsp. *leonensis* Summerhayes (1960: 147). Type:—SIERRA LEONE. Mateboi, Sanda Tenraran Chieftdom, 7 June 1951, *P Adames. 229* (holotype K!).

Cyrtorchis arcuata subsp. *variabilis* Summerhayes (1960: 148). *Cyrtorchis arcuata* var. *variabilis* (Summerh.) Geerinck (1988: 548). Type:—TANZANIA. Kiwanda road Muhesa, 24 January 1942, *W.M.Moreau 20* (holotype K!).

Additional specimens examined:—SENEGAL. Kagnout, 5 m, 8 July 1982, *Vanden Berghen 5387* (BR); *ibid.*, 4 m, 6 June 1983, *Vanden Berghen 5669* (BR); Pointe Saint-georges, 4 m, 8 June 1983, *Vanden Berghen 5692* (BR). GUINEA. Pita Near Santali, Futa Djallou, 500 m, 11 September 1962, *Adames 352*

(WAG). SIERRA LEONE. Batkanu-pendembu area of the north, 27 May 1946, *Deighton 4312* (K); Njala, 3 June 1946, *Deighton 4313* (K); Karina, 30 May 1949, *Deighton 5058* (K); Masingbe (Kuinke Sanda), 30 May 1949, *Deighton 5059* (K); Musaia, 11 April 1951, *Deighton 5543* (K). LIBERIA. Ganta, 23 November 1951, *Harley 1842* (K); Nimba Mts, 800 m, 21 September 1969, *Johansson 627* (K). GHANA. Kumasi, July 1947, *Andoh 5049* (P); Atacora Mts, Somba country, from Natitingou to Bocorona, 500 m, 21 June 1910, *Chevalier 24215* (K); *Sine loc.*, 15 September 1906, *Farmar 5282* (K); Kumasi to Tamale, Mile 69 on roadside tree, 12 November 1953, *Westwood 96* (K); Acara, 27 September 1954, *Westwood 536* (K). NIGERIA. Ribako forest reserve, May 1948, *Keay FHI 22899* (K); B. Gwari district, R.Tukuruwa on path between Kurmaza Kasa and Kalangai, 20 June 1950, *Keay FHI 25886* (K); Upper Ogun cattle estate, edge of river near rut house, May 1965, *Sanford 863165* (K); Zaria Province, Mile 7 on Kaciya to Zonkwa road, 945 m, 21 June 1957, *Summerhayes 115* (K). CAMEROON. Ngaoundéré, sur la route de Meiganga (N1), lac Tison, 30 April 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 3524* (WAG); *ibid.*, 25 April 2013, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 4300* (BRLU); *ibid.*, 2 May 2009, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1539* (BRLU); *ibid.*, 8 April 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2110* (P, K); *ibid.*, 3 May 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2761* (YA, MBG). CENTRAL AFRICAN REPUBLIC. Yalinga, 18 September 1922, *Le Testu 4176* (P); Région de la Waka, riv. Ngudjara 15 Km S.E. Moroubas, 11 September 1924, *Tisserant 1620* (P); plateau à l'ouest du vill. Gérélenji 50 Km N. Bambari, 2 September 1925, *Tisserant 2022* (BR, P); Région de la Ouaka, galerie riv. Balogu près vill. Blaougu, 20 Km N.E. Bambari, 31 August 1925, *Tisserant 2023* (BR, P); *ibid.*, près de Ippy, Gbwapala, 8 September 1925, *Tisserant 2024* (P); riv. Gbaoro 5 Km S. Bozoum, 28 August 1932, *Tisserant 3152* (P); *Sine loc.*, 23 May 1905, *Collection Serres du Muséum de Paris 2* (P). ETHIOPIA. About 10 km. N. of Awasa, 1,750 m, 19 May 1966, *de Wilde 11027* (K); Gamu-Gofa region: c. 6 km W. of Jinka along the track to Mago National Park, 1,400 m a.s.l., 8 January 1998, *Friis et al. 8623* (K); Mezan Tefari, Kaffa, 1,350 m, 2 August 1962, *Mooney 9214* (K). SÃO TOME AND PRINCIPE. Terreiro Velho, environ 213 m, 8 December 1932, *Exell 511* (BR); Bombaim, 400 m, 1 November 1998, *Stévert 452* (BRLU); Entre Focinho de Cao et Cisco Mantero, 70 m, February 2002, *Stévert 1213* (BRLU). DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Komatimbu, Bilakislaki, 13 April 1934, *De Witte 1511* (BR); Tanganjika, 3 May 1935, *Schlieben 6474* (BR); Keyberg, près de Lubumbashi, 1,200 m, 13 April 1967, *s coll. 12785* (K). UGANDA. Kinangop Aberdare, 2,713 m, April 1938, *Glander 2397* (K). KENYA. Kijabe, Rift valley, N. W. of Nairobi, 2,073 m, July 1950, *Archer 11* (K); Chepalungu forest, Sotik district, 1,920 m, February 1931, *Gardner 2554* (K); 12 km N. of Maralal on road to Baragoi, 2,100 m, 2 June 1979, *Gilbert et al. 5436* (K); Uasin Gishu District, 2,316 m, 1 May 1932, *Harvey 149* (K); Mt Elgon, 19 May 1931, *Major & Lugard 565* (K); Trans-Nzoia district, 1,800 m, 12 September 1984, *Mungai 82/84* (K); Meru district, 1,432 m, 1950, *Schelppe E.A. 11* (K); Valley, N. E. Mt Elgon, August 1933, *Suam 3181* (K). RWANDA. Mayaga, colline Byogi, au NE de Gakoma, 1,400 m, 14 December 1971, *Bamps 3268* (BR). TANZANIA. *Sine loc.*, 4 August 1982, *van*

der Laan 515 (WAG). ZAMBIA. Mwinilunga, Zambezi Rapids, 6 km N of Kalene hill Mission, 20 February 1975, *Williamson & Gassner 2446* (K). MOZAMBIQUE. Maputo, Matutuina, Entre Zitundo o Ponta do oure ao lado pequeno riacho, 28 January 1983, *Groenendijk & de Koning 192* (BR); Inhambane, Pomene, ca 6 km from hotel, ca 1 km past aeroport, 24 September 1980, *Jansen 7500* (BR). SWAZILAND. Lubombo district, Lebombo riefs, Muti-Muti, 700 m, 11 February 1994, *la Croix 1176* (K). SOUTH AFRICA. plantes du Cap, Glenfilling, 29 December 1831, *Drège 4580 C* (P); District d'Uitenhage, on the hills by the Coega River, s. d., s. coll. *1117* (P); Cap de Bonne Espérance, s. d., *Drège s. n.* (P); Natal, Mapunda district, Tugela Valley below Magumbi, 305 m, 4 March 1962, *Edwards 2740* (K); *Sine loc.*, 600 m, 25 February 1910, *Friedman 857* (K); Pondoland, April 1890, Gillett s. n. (K); Between Seymoun and Alice, 28 November 1928, *Hutchinson 1692* (K); Natal, Wlapumalo, 10 miles of Things post, Bushveld new Tugela river, 1,219 m, 8 March 1961, *Lodd 10185* (K); *ibid.*, Ubombo, False Bay Park, 3 February 1970, *Ross 2337* (K); Letaba district, by side of Ramadiepa river, 853 m, 8 February 1960, *Scheepers 900* (K); Mpumalanga, Klipkoppie farm, Luneberg area, 27 February 2003, *Van Wyk & Nkuna 630* (K); Mtunzini, Ngoya, 18 February 1961, *Wells & Edwards 53* (K); Addo, Uitenhage district, 609 m; s. d., *Zeyher 1117* (K); *ibid.*, January 1940, s. coll. s. n. (K); Somerset East, s. d., s. coll. s. n. (K).J.

Additional specimens examined with unspecified country:—*Sine loc.*, November 1886, *Herbert Veitch s. n.* (K).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis arcuata* subsp. *arcuata* occurs in twenty seven countries (Senegal, Guinea-Bissau, Guinea, Sierra Leone, Liberia, Ivory Coast, Ghana, Togo, Benin, Nigeria, São Tomé and Príncipe, Equatorial Guinea, Cameroon, Central African Republic, Ethiopia, Democratic Republic of the Congo, Rwanda, Burundi, Uganda, Kenya, Tanzania, Zambia, Malawi, Mozambique, Zimbabwe, Swaziland and South Africa), although we have not examined any material from Guinea-Bissau, Ivory Coast, Togo, Benin, Equatorial Guinea, Burundi, Malawi and Zimbabwe. *Cyrtorchis arcuata* subsp. *arcuata* is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa see (Figure III-14).

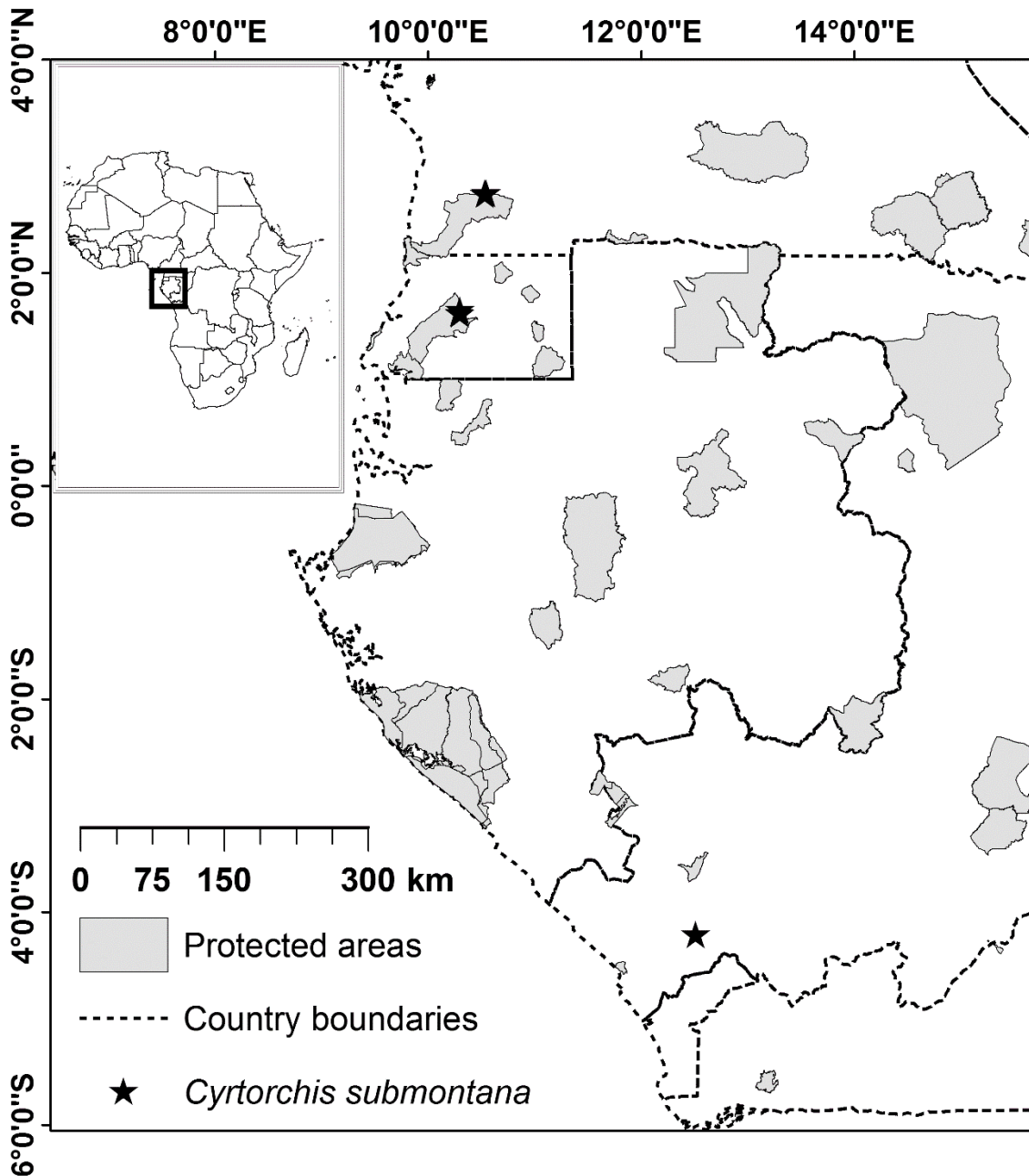


Figure III-14. Distribution of *Cyrtorchis submontana* in Atlantic central Africa.

Habitat and ecology:—Epiphyte commonly found on the trunks and large branches of large trees (Perez-Vera 2003) in various vegetation types (forest, savanna) between 4 and 2,713 m elevation. Flowering peak in September.

Notes:—Initially subdivided into five subspecies by Summerhayes (1960), the *C. arcuata* complex shows many characters of poor taxonomical value. This complex was later revised by Baker (1994) and reduced into two subspecies, viz. *C. arcuata* subsp *arcuata* and *C. arcuata* subsp *whytei*. Following la Croix & la Croix (1997) and Cribb & la Croix (1998), we adopted the same concept because the two

taxa show clear discriminant features (see Tableau III-1). At this stage, morphometric and molecular studies are required to better discriminate other potential distinct taxa among the *C. arcuata* complex.

Tableau III-1. Diagnostic characters (in bold) distinguishing the 15 recognized taxa of the genus *Cyrtorchis* present in central Africa.

Sections	Taxa	Leaf	Inflorescence	Floral bract	Spur	Habitat
<i>Cyrtorchis</i>	<i>Cyrtorchis arcuata</i> subsp. <i>arcuata</i>	Fleshy non-imbricate, oblong shaped	5–15 flowered, of about 1 cm apart	Sub-imbricate or spaced, ovate to broadly ovate, apex acuminate	Straight or incurved, 3–5.5 cm long	Various vegetation types (forest, savannas,...) between 4 and 2713 m elevation
	<i>Cyrtorchis arcuata</i> subsp. <i>whytei</i>	Fleshy non-imbricate, oblong shaped	Stout, erect, 20–23 cm long, 6–8 flowered	Sub-imbricate or spaced, broadly ovate, apex acuminate	Sigmoid, 5.8–8.5 cm long	Forest galleries, swampy area and sclerophyllous scrub on lava between 100 and 1189 m elevation
	<i>Cyrtorchis aschersonii</i>	Fleshy non-imbricate, linear shaped	Erect, 3.7–12.5 cm long; 5–11 flowered	Sub-imbricate rarely imbricate	Sigmoid or curved, with slender acute apex	Mature, high forest, between 140 and 1705 m elevation
	<i>Cyrtorchis chailluana</i>	Fleshy, spaced, oblong or narrowly elliptic shaped, with undulated margins	7.5–13.8 cm long, 6–11 flowered	Spaced, broadly ovate to very broadly ovate, acuminate apex	Pendulous, hanging up to 16 cm long, slender apex	Dense forest between 30 and 1330 m elevation
	<i>Cyrtorchis hamata</i>	Fleshy non-imbricate, oblong or narrowly elliptic shaped	Dense, up to 15.2 cm long, shorter than the leaves, many flowered	Spaced, broadly ovate, obtuse apex	Straight or slightly S-shaped, 2.7–4.3 cm long with a hooked like apex	High semi-deciduous forest and in secondary vegetation between 200 and 650 m elevation
<i>Cyrtorchis letouzeyi</i>	Fleshy non-imbricate, oblong or narrowly elliptic shaped, dark-green coloured	Loose, 4–6 (–13) cm long, 3–5 (10) flowered	Sub-imbricate, broadly ovate to very broadly ovate	Pendulous, 5.7–9 cm long twisted at the apex	Forest-savanna transition to dense humid rain forest, between 220 and 732 m elevation	

	<i>Cyrtorchis neglecta</i>	Fleshy, imbricate, flattened margins	Dense, 4–12 flowered, long as or slightly shorter than the sub-tending leaves	Spaced, 0.6– 1.5 cm long	Curved or S-shaped, 3–6 cm long	Gallery forests, open forests, shrublands between 610 and 1676 m elevation
	<i>Cyrtorchis seretii</i>	Fleshy, imbricate, flattened margins	Shorter than the sub-tending leaves, 7–9 flowered	Sub-imbricate, 1.2– 1.6 cm long	Straight or S-shaped, 6–6.5 cm long	Woodland, between 440 and 1500 m elevation
<i>Homocolleticon</i>	<i>Cyrtorchis submontana</i>	Fleshy, narrowly elliptic and flattened	Short, 1–4 cm long, 1–5 flowered	Broadly ovate, 4–7 mm long and 5–8 mm apart	Straight or sigmoid, 1.6–2.2 cm long	Submontane vegetation in evergreen moist forest on mossy branches, and in saxicolous forests around inselbergs between 550 to 1200 m
	<i>Cyrtorchis brownii</i>	Fleshy non imbricate, oblong shaped	Dense, 7–8 cm long, up to 14 flowered	Imbricate, longer than the pedicel and ovary	Straight, rarely sigmoid, short	Rainforest between 500 and 1219 m elevation
	<i>Cyrtorchis guillaumetii</i>	Fleshy, non imbricate, oblong shaped and flattened	Loose at the base, densely flowered near the apex	Sub-imbricate, shorter than the pedicel and ovary	Straight, rarely sigmoid, short	High rainforest on upper branches of tall trees
	<i>Cyrtorchis henriquesiana</i>	Fleshy imbricate, linear shaped and acircular	Short, about 2.5 cm long, 2– 6 flowered	Imbricate, very broadly ovate to depressed ovate	Straight, rarely curved, 2.6–4.6 cm	Rainforest, secondary forest and in plantations between 67 and 590 m elevation.
	<i>Cyrtorchis injoloensis</i>	Sub-imbricated or imbricated with flattened margins	Loose at the base but dense towards the apex, flowers of 1–1.4 cm apart, 14–20 flowered	Spaced, very broadly ovate, longer than the pedicel and ovary,	Straight or curved, 2–2.2 cm long	Primary forest and remnants forest ranging between 30 and 1189 m elevation

<i>Cyrtorchis monteiroae</i>	Fleshy, spaced , oblanceolate or narrowly elliptic shaped, with undulated margins	Loose, up to about 37cm long, spaced flowers	Spaced,very broadly ovate, 5–32	Curved, 2-4.4 cm long with slender apex	Evergreen forests, near rivers or lakes between 50 and 1219 m elevation
<i>Cyrtorchis ringens</i>	Non fleshy but coriaceous, imbricated , more or less equally bilobed	Dense, flowers 0.5–1.2 cm apart, few flowered	Spaced, usually depressed ovate, shorter than the pedicel and ovary	Straight or curved, up to 3.8 cm long with obtuse apex	High river forest, submontane or riverside, between 7 and 1600 m elevation

Angraecum obrienianum is a *nomen* made by Sander (1892) in *The Gardeners' Chronicle & Agricultural Gazette*. The species was described as “a thick leaved species of the Chailluanum class” and no specimens were mentioned. This taxon received an award of Merit by the RHS in 1912 (Rolfe 1912) and a painting of the exhibited plant was done. It was then placed in the genus *Listrostachys* (Rolfe 1912), again without citing any specimen. Rolfe commented that it has some affinity with *Listrostachys sedenii*, now considered as a synonym of *Cyrtorchis arcuata*. As a consequence, the only known record of *Angraecum obrienianum* is the painting which clearly represents *Cyrtorchis arcuata*. We therefore consider it as a synonym of the latter.

1.2. *Cyrtorchis arcuata* subsp. *whytei* (Rolfe) Summerhayes (1960: 147). (**Figure III-15F**) Basionym: *Listrostachys whytei* Rolfe (1898: 155). *Angraecum whytei* (Rolfe) De Wildeman (1916: 191). *Cyrtorchis whytei* (Rolfe) Schlechter (1918: 133). *Cyrtorchis arcuata* var. *whytei* (Rolfe) Geerinck (1992: 484). Type:—MALAWI. Mlanje Plateau, November 1895, A. Whyte 102 (holotype K!).

Additional specimens examined:—LIBERIA. Montserredo, Boy Scout's Camp, 5 November 1970, *Stoop - Kastele* 253 (BR). CAMEROON. Parc National du Mbam et Djérem, Myéré, vers le service de la conservation, 761 m, 28 May 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 3569 (YA); *ibid.*, Près de la petite chute, 762 m, 5 June 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 3592 (BRLU); *ibid.*, A 8,7 km SE de Myéré, forêt ripicole à 500 m NW du campement, 775 m, 6 June 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 3599 (P, WAG); *ibid.*, 12 June 2013, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 4357 (BRLU); *ibid.*, 10 June 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 2853 (BRLU) *ibid.*, 13 June 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 2863 (BRLU); *ibid.*, 17 June 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 2883 (YA); *ibid.*, 21 June 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 2891 (BRLU, YA); *ibid.*, A 9,14 km de Myéré, savane, 847 m, 13 June 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 2862 (BRLU). SÃO TOME AND

PRINCIPE. Roça Fortunato, 950 m, 14 December 1997, *de Oliveira 340* (BRLU); Monte Café, 600 m, 2 December 2002, *Primo & Stévert 110* (BRLU); Porto Alegre, 100 m, 1 December 1998, *Stévert 535* (BRLU); Príncipe, Pico Papagaio, 110 m, *s. d.*, *Stévert 702* (BRLU). DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Gandajika, 17 December 1956, *Liben 2125* (BRLU); Haut-Zaire, 60 km au Nord de Bengamisa, îles Gotsubo sur le Lindi, 7 March 1973, *Lisowski 16921* (BRLU). UGANDA. Entebbe, 3,900 m, 6 September 1905, *Brown 241* (K); Fort portal, golf course, May 1995, *Spurrier U47* (K); Bwaan, 3,900 m, 1905, *s. coll. 279* (K). BURUNDI. Mbuye, *s. d.*, *Delepierre & Lebel 167* (BR). Without data, *cult.* in Netherlands, Wageningen, 24 February 1989, *Arends 918* (WAG).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis arcuata* subsp. *whytei* occurs in twelve countries (Sierra Leone, Liberia, Ivory Coast, Ghana, Togo, Democratic Republic of the Congo, Rwanda, Burundi, Tanzania, Malawi, Mozambique), although we have not examined any material from Sierra Leone, Ivory Coast, Ghana, Togo, Rwanda, Tanzania, Zambia and Mozambique. We have, however, seen specimens clearly assignable to this species from three other countries, noticeably extending its distribution both in Central Africa (São Tomé & Príncipe and Cameroon) and in East Africa (Uganda). *Cyrtorchis arcuata* subsp. *whytei* is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

Habitat and ecology:—Epiphyte in forest galleries, swampy area and sclerophyllous scrub on lava (Geerinck 1992) with the altitude range between 100 and 1,189 m elevation. Flowering peaks in May and June.

Notes:—This taxon differs from the type subspecies by its larger flower and its long sigmoid spur approaching that of *C. chailluana* (Summerhayes 1960).

2. *Cyrtorchis aschersonii* (Kraenzl.) Schlechter (1918: 129). (**Figure III-15E**) Basionym: *Angraecum aschersonii* Kränzlin (1889: 160). *Listrostachys aschersonii* (Kraenzl.) Durand & Schinz (1894: 48). Type:—CAMEROON. Malimbe, *J. Braun 83* (holotype B⁺; iconotype K!).

Additional specimens examined:—SIERRA LEONE. Yagoi, in cultivation at Njala, July 1949, *Deighton 4831* (K). LIBERIA. Nimba Mts, 700 m, 15 September 1969, *Johansson 613* (K). NIGERIA. Tora Creek (tributary of Santa Barbara River), Rivers state, 22 January 1983, *Baker 45* (K); Acriassa, February 1902, *Glasnevin s. n.* (K); Sapoba, *s. d.*, *Kennedy 234* (K); *ibid.*, *s. d.*, *Sanford 336* (K); Ukogugu forest, Obinze, Owerri, Imo state, 27 May 1976, *Segeberäck 1230* (K); *Sine loc.*, 7 January 1987, *Smith 557* (K). CAMEROON. Bambui Experimental Station: Escarpment Rest house garden, 1,524 m, 15 June 1962, *Brunt 494* (K); Bambui E.S. Bamenda, 28 July 1961, *E.B.C. & SCA 2097* (YA); *ibid.*, 4 July 1961, *E.B.C. & SCA 2112* (YA); *ibid.*, *s. d.*, *SCA 2216* (YA); Baleveng, 1,400 m, 29 June 1967, *Muerillon 892* (K); Nguti, Exploitation forestière, Village d'Edjuigang, 155 m, *ibid.*, 9 August 2004, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 71* (BRLU); *ibid.*, 1 August 2005, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 311* (BRLU); 20 June

2006, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 375 (BRLU); Sanctuaire de Banyang Mbo Chemin vers le campement 552 dans le Sanctuaire de Banyang Mbo, 245 m, 15 July 2006, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 393 (BRLU); Bipindi, Village de Memel II au N de Bipindi, 140 m, 5 October 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 782 (BRLU); Mont Oku, village d'Oku, 1,695 m, 5 July 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 3646 (BRLU, P, YA); *ibid.* 5 July 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 5342 (BRLU); village de Kumbo, près du Maryland hotel, 18 August 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 3762 (BRLU); entre les villages de Mintom et Lélé, 15 km au SO de la "maison de Gentil", près de la rivière Kumu, arbre 1 escaladé dans le plot3, 613 m, 18 July 2013, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 4419 (BRLU); environs de Djoum, UFA gérée par la SFID, 626 m, 14 August 2013, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 4492 (BRLU); réserve de faune d'Ebo, village de Ndokbagueue, Campement de Djouma, sur le transect "Gachaka", 446 m, 14 August 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 5390 (BRLU); Nkoltsia, colline de, à 5 km au S-SO du village de Gouap et à 18 km au NO de Bipindi, sommet de la colline, expo SW 240, 430 m, 22 October 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 3962 (BRLU); *ibid.*, 23 October 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)* 3963 (YA); *ibid.*, 5 October 2009, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 1853 (WAG); *ibid.*, 5 October 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 2434 (BRLU, K, MBG); *ibid.*, 17 September 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 3145 (P); Ngoyla. Campement à 13 km à l'E du village. Entre le Dja et le plot 1, 499 m, 31 August 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 2333 (BRLU); Entre Kumbo et Ndop, 13 July 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 2933 (BRLU); Belo, Mont Oku, entre 1600 et 1800 m, 1,705 m, 7 July 2014, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)* 5237 (YA); Douala, Edea forest, 27 June 1978, *Thomas* 151 (K). EQUATORIAL GUINEA (RIO MUNI). Alum, s. d., *Ndong Bokung & Stévert* 286 (BRLU). GABON. Ogooué-Maritime, Rabi, 4 August 1992, *Arends* 982 (WAG); Estuaire, adjacent Moka creek, E. of Mondah river, 28 February 1986, *van der Laan* 1014 (WAG); Tchimbélé, chemin vers la carrière le long du bras mort, 570 m, 8 December 2002, *Stévert* 1662 (BRLU); *ibid.*, près du bras mort du lac, 570 m, 1 December 2002, *Stévert* 1728 (BRLU); *ibid.*, 540 m, 17 November 2002, *Stévert* 1803 (BRLU); Woleu-Ntem, near hydroelectric compound at Tchimbele, 575 m, 21 November 2002, *Strijk* 497 (WAG).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis aschersonii* occurs in eight countries (Sierra Leone, Liberia, Ivory Coast, Ghana, Nigeria, Cameroon, Gabon, and Democratic Republic of the Congo), although we have not examined any material from Ivory Coast, Ghana, and Democratic Republic of the Congo. We have, however, seen specimens clearly assignable to this species from Equatorial Guinea (Rio Muni). *Cyrtorchis aschersonii* is thus distributed in Upper and Lower Guinea Domains.

Habitat and ecology:—Mature, high forest, on trunks and branches of large trees, between 140 and 1,705 m elevation. Flowering peaks in July and August.

Notes:—The type specimen of *Cyrtorchis subcylindrifolia* De Wildeman (1916: 192) Schlechter (1918: 132), previously attributed to *C. aschersonii*, is more closely related to *C. henriquesiana* (see notes for this species).

3. ***Cyrtorchis brownii*** (Rolfe) Schlechter (1918: 129). Basionym: *Listrostachys brownii* Rolfe (1906: 378). *Homocolleticon brownii* (Rolfe) Szlachetko & Olszewski (2001: 728). Type:—UGANDA. Entebbe, 1,189 m, June 1905, *R. Brown 248* (holotype K!).

Heterotypic synonym: *Angraecum latibracteatum* De Wildeman (1916: 188). *Cyrtorchis latibracteata* (De Wild.) Schlechter (1918: 131). Lectotype:—DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Eala, Indjolo, September 1905, *M. Laurent 1773* (lectotype BR!, isolectotype P!) (Azandi et al. 2016). Paralectotypes:—Kiravunga, Ango Buta, quelque part sur l'Uele entre Bima et Amadi, probablement entre Bambili et Amadi, 1 November 1905, *F. Seret 194* (Paralectotype BR!); Yambuya, Banalia sur l'Azuwimi, March 1906, *M. Laurent 1758* (Paralectotype BR!).

Additional specimens examined:—IVORY COAST. Forêt de Tai, 22 October 1961, *Aké Assi 6031* (K); forest near D'Hivé, 14 November 1966, *Aké Assi 9225* (K); Tiapleu, 16 November 1967, *Aké Assi 9768* (K); *Sine loc.*, 3 November 1975, *de Koning 6098* (WAG). CAMEROON. 50 km W of Baléa (along Sangha R., near C.A.R. border, about 82 km E. of Lokomo, Km 120 road Yokadouma-Moloundou), 500 m, 2 December 1982, *de Kruif 809* (YA). CENTRAL AFRICAN REPUBLIC. 15 Km S de Mbaïki, 12 November 1968, *Badré 245* (P); Boukoko, 22 October 1947, *Tisserant 382* (P). GABON. Basse Djouah, 4 December 1964, *Hallé 3401* (P). DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Yambuya, Banalia sur l'Azuwimi, 5 December 1906, *Pynaert 699* (BRLU). UGANDA. Mabira forest, 1,219 m, 15 November 1938, *Loveridge 76* (K). TANZANIA. Sigi Segoma, Tanga district, 914 m, 25 May 1944, *Moreau 737* (K); *ibid.*, 14 May 1946, *Moreau 737B* (K).

Distribution:—According to Govaerts et al. (2016), *Cyrtorchis brownii* occurs in fifteen countries (Sierra Leone, Liberia, Ivory Coast, Nigeria, Equatorial Guinea, São Tomé & Príncipe, Cameroon, Central African Republic, Gabon, Republic of the Congo, Democratic Republic of the Congo, Uganda, Kenya, Tanzania, and Malawi), although we have not examined any material from Sierra Leone, Liberia, Nigeria, Equatorial Guinea, São Tomé & Príncipe, Republic of the Congo, Kenya and Malawi. *Cyrtorchis brownii* is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

Habitat and ecology:—Rainforest between 500 and 1,219 m elevation. Flowering peaks in November and December.

Notes:—In the protologue of *Angraecum latibracteatum*, three syntypes were cited by De Wildeman (1916), *Laurent 1773* from Injolo, *Laurent 1758* from Yambuya and *Seret 194* from Kiravunga, all from

Democratic Republic of the Congo. We designated *Laurent 1773* as the lectotype of this taxon because the specimen is more complete and representative of the protologue.

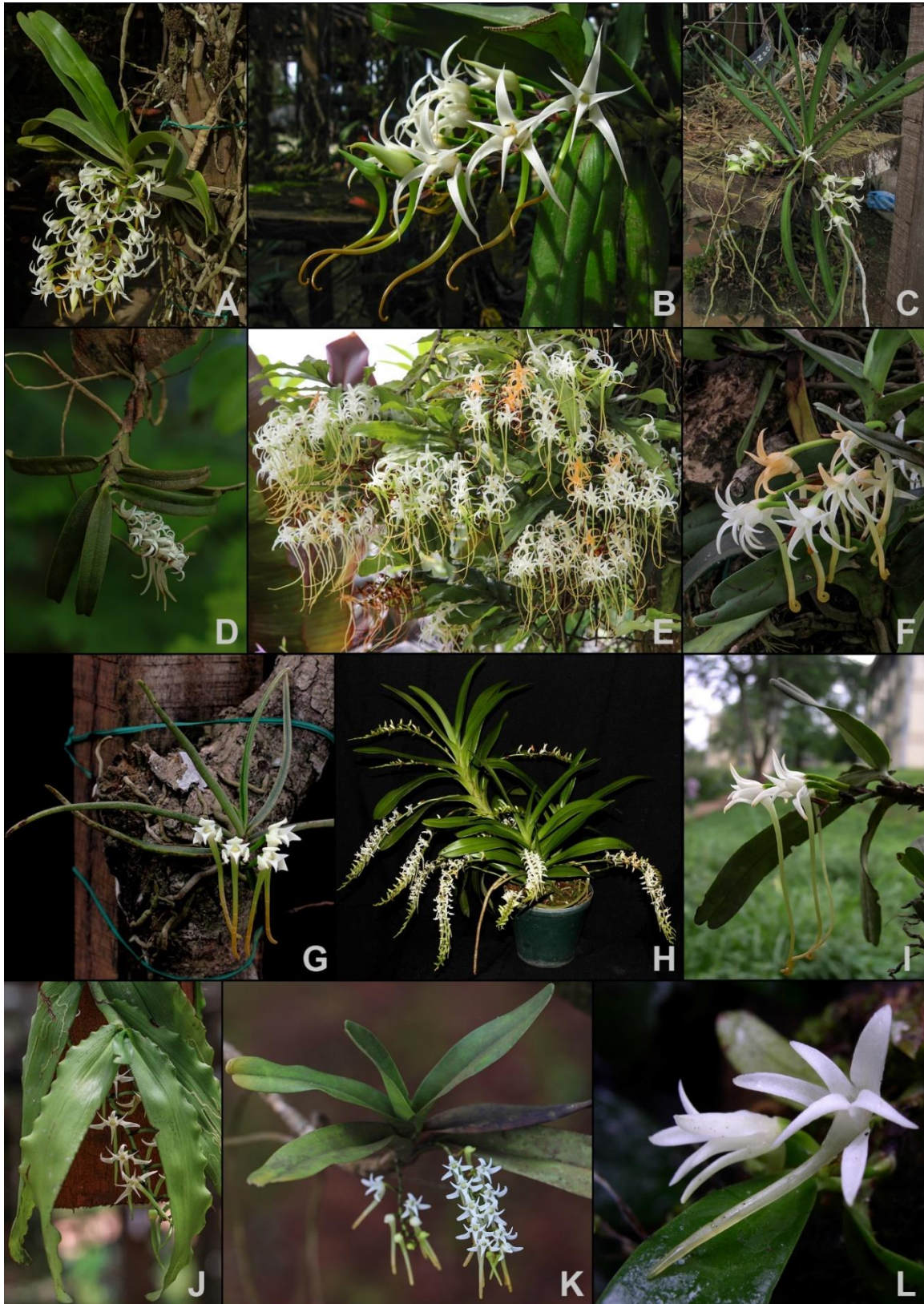


Figure III-15. Illustrative pictures of some central African taxa of the genus *Cyrtorchis*. A. *C. arcuata*. B. *C. arcuata* subsp. *whytei*. C. *C. aschersonii*. D. *C. brownii*. E. *C. chailluana*. F. *C. hamata*. G. *C. henriquesiana*. H. *C. injoloensis*. I. *C. letouzeyi*. J. *C. monteiroae*. K. *C. ringens*. L. *C. submontana*. Photographs 'A-G' & 'I-L' by Droissart Vincent and 'H' by Lourens Grobler.

4. ***Cyrtorchis chailluana*** (Hook.f.) Schlechter (1914: 596). (**Figure III-15B**) Basionym: *Angraecum chailluanum* Hooker (1866: t.5589). *Listrostachys chailluana* (Hook.f.) Reichenbach (1885: 381). *Angorchis chailluana* (Hook.f.) Kuntze (1891: 651). Types:—NIGERIA. Banks of the Nun River, September 1860, *G.Mann 521* (syntype K!). GABON. *Sine loc., du Chaillu s. n.* (syntype K).

Additional specimens examined:—SIERRA LEONE. Nyadehun, Kenema district, 5 September 1982, *Segeberäck 1549* (K). NIGERIA. Calabar government Station, September 1948, *Kaey 13348* (K); Benin, Okomu F. R., December 1947, *Brenau & Kaey 25438* (K); Bonny, 15 December 1957, *Stubbings 49* (K); Lagos, January 1896, *Millen 193* (K); Old Calabar, 20 August 1898, *Holland 135* (K); Sapoba, s. d., Kennedy 1913 (K). CAMEROON. Douala, Edea forest, 27 June 1978, *D.W.Thomas 204* (K); Lobéké river close to confluence with the sangha, 350 m, 15 September 1988, *Harris & Fay 1120* (K); Akoakas rock, about 24 km, on the old road from N'Koemvone to Ambam, 660 m, 19 November 1975, *de Wilde 80* (YA); Ngoyla, campement à 13 km à l'Est du village, cacaoyère, 484 m, 25 July 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 3688* (BRLU, YA); *ibid.*, 24 September 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2415* (BRLU, YA); Nguti, Exploitation forestière, Village d'Edjuigang, 155 m, 13 August 2006, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 408* (BRLU); *ibid.*, 23 August 2006, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 414* (BRLU); *ibid.*, 8 August 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 637* (BRLU, YA); 12 September 2005, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 316* (BRLU); Mbouma, plantation de cacao, 662 m, 7 September 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 706* (BRLU); *ibid.*, 20 September 2004, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 120* (BRLU); *ibid.*, 647 m, 15 September 2001, *Stévert & Pial 223* (BRLU); Akom II (route Kribi-Ebolowa), campement à 3 h de marche au S du village, le long de la rivière à environ 60 m du campement, 710 m, 27 September 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 757* (BRLU); *ibid.*, 12 October 2008, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1386* (BRLU); *ibid.*, relevé permanent (1 ha) sur plateau situé au N-NE du campement., 785 m, 19 October 2008, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1399* (BRLU); *ibid.*, 20 October 2009, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1890* (YA); Mbam-Minkom (région au Nord-Ouest de Yaoundé), relevé effectué au sud-ouest du village de Kolaki, 500 m, 18 July 2005, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 309* (BRLU); *ibid.*, village de Nye-Meyong, le long de la route entre Nyemeyong et Ekekam, 815 m, 19 October 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2488* (BRLU, YA); Victoria Botanic Garden, 3 September 1946, *Forest-guard Ngongi 15082* (K); Mont Kupé, Nyasoso, 850 m, 3 August 1992, *Cable 33* (K); S.N. Ekema E3, 14 October 1971, *SCA 2365* (YA); Site en cours d'exploitation dans l'UFA 09-003 à 55 km au Sud-Est de Djoum, 611 m, 27 July 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2966* (K, YA); *ibid.*, 15 February 2012, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé)*

3424 (BRLU, P); Mont Cameroun, route entre Debunscha et Idenau, 5 m, 2 February 2012, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 3414* (BRLU); Mindourou site d'exploitation de la Palisco près de Lomié (AC 5), 770 m, 1 September 2001, *Stévant & Pial 202* (BRLU); *ibid.*, 1 October 2001, *Stévant & Pial 230* (BRLU); AC UFA 09006 Fanga -Mbouma, 684 m, 18 August 2003, *Stévant & Pial 871* (BRLU); Colline de Nkoltsia, 22 March 1974, *Villiers 808* (P, YA); Monastère de Koutaba, entre Bafoussam et Foumban, 1,164 m, 9 June 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 5130* (BRLU); village de Ma'an, UFA 09-022 (Wijma), 549 m, 4 November 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 5733* (BRLU); Nyombi, 1953, *Merle s. n.* (P); Djaposten, 30 km NNW Lomié, 23 August 1972, *Letouzey 11666* (P, YA). CENTRAL AFRICAN REPUBLIC. Dzanga Sangha reserve, Ndakan gorilla study area from Ndakan camp to Nyangouté on the East bank of the Sangha river, 350 m, 9 August 1988, *Harris & Fay 951* (K). EQUATORIAL GUINEA (RIO MUNI). Mongum (inselberg), 17 September 1999, *Ndong Bokung & Stévant 66* (BRLU); Akonangui (route de Monte Alén à Niefang, avant entre Ayene et Bikaba), 550 m, 15 November 1999, *Ndong Bokung & Stévant 119* (BRLU); Piedra Nzas (inselberg de), à 6h de marche du village d'Acoaseng, à 9 km d'Aconibe, ou de celui de Afaanam, 630 à 745 m, 31 August 2002, *Ndong Bokung & Stévant 504* (BRLU). GABON. Haute-Ngounyé, Sindora, 24 March 1926, *Le Testu 5870* (BR, P); Numbo Yogoulou, 22 November 1925, *Le Testu 5780* (BR, P); *Sine loc.*, 70 m, May 1896, *Bates 462* (K); bords de la Ngounyé Sandara, 28 January 1918, *Le Testu 2258* (P); Cap Lopez, 1913, *Pobéguin s. n.* (P); *ibid.*, 20 February 1894, *Dybowski 138* (P); Rivière Maliba, 11 June 1969, *Villiers 131* (P); About 17 km along the road Libreville to Cape Estérias, 30 m, 25 November 1983, *de Wilde et al. 761* (BR, P); About 8 km N of Mayumba, 5 m, 6 December 1986, *de Wilde et al. 9186* (K); Kembouya, 18 September 1932, *Le Testu 8904* (BR); C. E. F. A. Ayem, 10 Km SW de Ndjole, 16 April 1963, *Hallé 1684* (P); Cap Esterias, s. d., *Hallé & Villiers 5457* (P); Tchimbélé, près du bras mort du lac, 570 m, 24 February 2002, *Stévant 1687* (BRLU); *ibid.*, 24 February 2002, *Stévant et al. 1636* (BRLU); Environs de Libreville, 6 December 1899, *Klaine 1648* (P); *ibid.*, 28 February 1901, *Klaine 437* (P); *Sine loc.*, February 1896, *Klaine 12* (P); Ad flumen Ndreme, May 1899, *Trilles 2* (P); Ste Anne du Fernan-Vaz (Odimba), s. d., *Walker 34* (P); Libange farm, 8 March 1881, *s. coll. 281* (K). REPUBLIC OF THE CONGO. *Sine loc.*, s. d., *Mocquerys s. n.* (P); Région de Pointe-noire, Pointe-Indienne, 1 June 1966, *Sita 1234* (P). DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Aruwimi, 3 April 1905, *Lacomblez 50* (K); Sabuka, 18 February 1909, *Laurent 536* (BR, BRLU); Yangambi, île Yalututcha en face du poste, 470 m, 20 August 1938, *Louis 10948* (BR); *ibid.*, île Esali en face du poste, 470 m, 20 August 1938, *Louis 10950* (BR); Kisangani, 20 August 1981, *Ndjele 539* (BR); Monsole, 17 August 1908, *Seret 913* (BR); s. d., *Solheid 118* (BR). UGANDA. Bushenyi district, S. Kasyoha- Kitomi forest, Nzozi, 1,330 m, June 1998, *Hafashaimana 623* (K); N.W. side of lake Nabugabo, 1,140 m, 9 October 1953, *Drummond & Hemsley 4724* (BR, K); Lele Kabugabo, 1,181 m, July 1937, *Glhandler 1982* (K); Bale, lake Nabugabo, 1,140 m, 5 May 1969, *Lye 2782* (K); Bugala Island, 1,137 m, 24 February 1945, *Greenway & Thomas 7163* (K); Bushenyi, Karinzy, May 1995, *Spurrier U46* (K); Lake Nabugabo, 1,067

m, May 1934, *Geak 6014* (K); Kampala Entebbe Road, 1187 m, December 1902, *s. coll. s. n.* (K); Bwaan, 6 March 1891, *Glasnevin, Co. Dublin s. n.* (K); Burford lodge, October 1889, *Lawrence s. n.* (K).

Additional specimens examined with unspecified country:—*sine loc.*, July 1858, *s. coll. s. n.* (K).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis chailluana* occurs in fifteen countries (Guinea, Sierra Leone, Liberia, Ivory Coast, Togo, Nigeria, Cameroon, Central African Republic, Republic of the Congo, Equatorial Guinea, Gabon, Democratic Republic of the Congo, Burundi, Rwanda, and Uganda), although we have not examined any material from Guinea, Liberia, Ivory Coast, Togo, Burundi and Rwanda. *Cyrtorchis chailluana* is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

Habitat and ecology:—Epiphyte in dense forest between 30 and 1,330 m elevation. Flowering peaks in August and September.

Notes:—This species has the longest spur of all *Cyrtorchis* species, up to 16 cm long. We didn't choose a lectotype among the two syntypes cited above since we were not able to find the syntype *du Chaillu s. n.* in the Kew herbarium.

5. *Cyrtorchis guillaumetii* (Perez-Vera) Rice (2005: 27). Basionym: *Cyrtorchis brownii* var. *guillaumetii* Perez-Vera (2003: 250). Type:—IVORY COAST. Entre Buyo et Soubré, rive droite du Sassandra, 16 December 1963, *J.L. Guillaumet 1767* (holotype UCJ (scan seen), isotype ABI).

Additional specimens examined:—SIERRA LEONE. Peiewa: Kailahun, 25 November 1983, *Segeberäck 1555* (K). IVORY COAST. Mt Toukouï, s. d., *Perez-Vera 238* (K); *ibid.*, November 1972, *Perez-Vera 271* (K).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis guillaumetii* is endemic to Ivory Coast, but we presently record it for the first time from Sierra Leone. *Cyrtorchis guillaumetii* is thus endemic to Upper Guinea Domain.

Habitat and ecology:—Epiphyte in high rainforest on upper branches of tall trees building up important colony (Perez-Vera 2003). No information on the altitude was given for the cited specimens. In addition, we were not able to examine the holotype deposited at UCJ and ABI. Flowering period in November and December.

Notes:—*Cyrtorchis guillaumetii* was formally described as a subspecies of *C. brownii* (Perez-Vera 2003) based on specimens collected in Ivory Coast. The taxon was then reported from Nigeria, Cameroon and Equatorial Guinea by Droissart *et al.* (2009). However, after examining the scans of the type specimen preserved in Abidjan, as well as additional specimens collected in Ivory Coast and housed at K, we found that most of these specimens cited in Atlantic Central Africa represent instead a new species that we describe in the present contribution as *C. submontana*.

We chose to follow the taxonomic rank given by Rice (2005) and Govaerts (2016) for *Cyrtorchis guillaumetii* because *C. guillaumetii* and *C. brownii* shows discriminant vegetative and floral features (see Tableau III-1), which for us justified a specific rank.

6. ***Cyrtorchis hamata*** (Rolfe) Schlechter (1914: 596). Basionym: *Listrostachys hamata* Rolfe (1906: 132 t.8074). Type:—NIGERIA. Lagos, *W.T.Martin s. n.* (holotype K!).

Additional specimens examined:—IVORY COAST. Ht Sassandra, Pays des Dyolas, entre Disandougou et Niangouépleu, 12 May 1909, *Chevalier 21527* (P); Mafa, 1970, *Bonardi s. n.* (P); Daloa, May 1972, *Perez-Vera 244* (K, P); De Daloa versus Guiglo, 20 km circiter N.N.E., 7 March 1962, *Bernardi 8498* (P); San Pedro, 19 May 1901, *Thoiré 257* (P); 64 Km. N. of Sassandra, c. 5 Km. W. of Niapidou, 14 June 1963, *de Wilde 206* (P). TOGO. Kpave on Ficus, 11 January 1953, *Westwood 80* (K). NIGERIA. 23 miles from Akui, on Akui-ondo road, 24 August 1961, *Kigbo s. n.* (K); Olokemeji Forest reserve, 1 August 1962, *Gillett 15338* (K); Akure forest reserve, 19 August 1946, *Jones 19539* (K); *ibid.*, Ekiti district, 26 July 1947, *Onochie 23420* (K); Ibadan south forest reserve, 22 August 1949, *Keay 25373* (K); Idanre hills, 3 September 1948, *Keay 22439* (K); Owo F. R. southern Block, 18 July 1953, *Onochie 33245* (K); Lagos, 13 March 1905, *Martin s.n.* (K); Kabba, August 1962, *Westwood 210* (K). CAMEROON. Mbouma plantation de cacao, 650 m, 2 July 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 578* (BRLU); Village de Ma'an, UFA 09-022 (Wijma), 571 m, 6 October 2013, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 4671* (BRLU); Réserve du Dja (collection J.P. Vautherin), 5 August 2001, *Stévert et al. 144* (BRLU). GABON. Région près du Cameroun, Odingoto, nord d'Oyem, 200 à 300 m, 1 October 1997, *Biteau & Stévert 30* (BRLU); Aburi gardens, 20 May 1938, *Irvine 3034* (K); *ibid.*, May 1899, *Johnson 227* (K); Kumasi, 10 June 1958, *Kmatou 3411* (K); Blayrey, Awaso, 13 September 1948, *s. coll. 23* (K).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis hamata* occurs in four countries (Ivory Coast, Ghana, Nigeria, and Gabon), although we have not examined any material from Ghana and Gabon. We have, however, seen specimens clearly assignable to this species from two other countries: Togo and Cameroon. *Cyrtorchis hamata* is thus distributed in Upper and Lower Guinea Domains.

Habitat and ecology:—Epiphyte in high semi-deciduous forest and in secondary vegetation between 200 and 650 m elevation. Flowering peak in August.

7. ***Cyrtorchis henriquesiana*** (Ridl.) Schlechter (1918: 131). (Figure III-15G) Basionym: *Angraecum henriquesianum* Ridley (1887: 231). *Listrostachys henriquesiana* (Ridl.) Rolfe (1897: 157). *Aerangis henriquesiana* (Ridl.) Schlechter (1918: 117). *Homocolleticon henriquesiana* (Ridl.) Szlachetko & Olszewski (2001: 727). Type:—PRINCIPE. Princes islands, Sundi, 107 m, *F.Newtown 15* (holotype BM!).

Heterotypic synonyms: *Angraecum subcylindrifolium* De Wildeman (1916: 192). *Cyrtorchis subcylindrifolia* (De Wild.) Schlechter (1918: 132). Lectotype:—DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE

CONGO. Nala, territoire Paulis, 1 July 1911, *Boone A. 113* (lectotype BR!, designated here). Paralectotype: —DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Nala, territoire Paulis, 1 July 1911, *A. Boone 115* (paralectotype BR). *syn. nov.*

Additional specimens examined:—GHANA. Nkawkaw, 152 m, 30 March 1967, *Bowling GC 36564* (K); Ashanti, Goaso, February 1954, *Westwood 119* (K). CAMEROON. Village de Ma'an, UFA 09-022 (Wijma), 557 m, 17 September 2013, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 4597* (BRLU, YA). EQUATORIAL GUINEA. Akoak Benguan (inselberg) à 5 km au sud d'Akuom, 580 m, 23 August 2002, *Deman et al. 9* (BRLU); *ibid.*, 500 m, 24 August 2002, *Deman et al. 17* (BRLU); *ibid.*, 28 August 2002, *Deman et al. 34* (BRLU); Bikaba, route de Monte Alén à Niefang, 28 August 1999, *Ndong Bokung & Stévert 33* (BRLU); Mongola, près de Anisok, 550 m, 31 August 1999, *Ndong Bokung & Stévert 39* (BRLU); Inselberg Akuom, 6 km à l'Est de Nsuameyong, 31 August 2000, *Ndong Bokung & Stévert 225* (BRLU). SÃO TOME AND PRINCIPE. Porto Real, 1956, *Rose 145* (P); *ibid.*, 67 m, 1956, *Rose 51012* (K); Principe, entre Focinho de Cao et Cisco Mantero, 70 m, 1 November 1998, *Stévert 477* (BRLU, K); Oque Pipi, 300 m, 26 August 2002, *Primo & Stévert 81* (BRLU); Principe Morro Fundao, 370 m, 18 September 2002, *Primo & Stévert 86* (BRLU); *ibid.*, 260 m, 1 September 1999, *Stévert 664* (BRLU). GABON. Mbé Akélayong, 570 m, 22 August 2001, *Ngok Banak 148* (BRLU); Tchimbélé, près du bras mort du lac, 570 m, 15 August 2002, *Stévert 1809* (BRLU). DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Eala, Coquilhatville, 2 September 1907, *Seret 1001* (BR).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis henriquesiana* occurs in three countries (São Tomé and Príncipe, Equatorial Guinea (Rio Muni) and Gabon). We have, however, seen specimens clearly assignable to this species from three other countries: Ghana, Cameroon and Democratic Republic of the Congo. *Cyrtorchis henriquesiana* is thus distributed in Upper Guinea, Lower Guinea and Congolian Domains.

Habitat and ecology:—Epiphyte or lithophyte found in rainforest, secondary forest and in plantations between 67 and 590 m elevation. Flowering peak in August.

Notes:—*Cyrtorchis subcylindrifolia*, which was formally synonymized with *C. aschersonii* by Summerhayes (1960), is considered here as a synonym of *C. henriquesiana*. The linear and acicular leaves are more related to *C. henriquesiana* rather than to *C. aschersonii* which has larger (7.5–17 mm large) and V-shaped leaves. Another discriminant feature is the length of the inflorescence which is shorter in *C. subcylindrifolia* and in *C. henriquesiana* (up to 2.3 cm) compared to *C. aschersonii* (more than 12.5 cm).

In the protologue of *Angraecum subcylindrifolium*, two syntypes were cited by De Wildeman (1918), *Boone 113* and *Boone 115* both from Nala, territoire Paulis, Democratic Republic of the Congo. We

designated *Boone 113* as the lectotype since the specimen is more complete and representative of the protologue.

8. *Cyrtorchis injoloensis* (De Wild.) Schlechter (1918: 131). Basionym: *Angraecum injoloense* De Wildeman (1916: 187). *Homocolleticon injoloensis* (De Wild.) Szlachetko & Olszewski (2001: 727). Type:—DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Injolo, August 1906, *M.Laurent 1756* (holotype BR!, isotype K!).

Heterotypic synonyms: *Angraecum ealaense* De Wildeman (1916: 185). *Cyrtorchis ealaensis* (De Wild.) Schlechter (1918: 130). Type:—DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Eala, 9 September 1905, *M.Laurent 1784* (holotype BR!, isotype K!).

Additional specimens examined:—GABON. Nyanga, Doussala, 20 July 1992, *Arends 877* (WAG); *ibid.*, 25 June 1992, *Arends 960* (WAG); *ibid.*, 22 km along the road Mayumba - Tchibanga, and then 12 km along a forest exploitation track leading in an eastern direction, near the River Doussa, July 1992, *Arends 972* without information on the locality, 1992, *Arends 964* (WAG). DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Equateur, Basankusu, Ndeke, 23 September 1958, *Evrard 4887* (K). UGANDA. Entebbe, 1,189 m, 9 August 1906, *Brown 383* (K); Old Entebbe road, Nkosanyi, 1,189 m, April 1962, *s. coll. s. n.* (K). TANZANIA. Mwembeni, Nadanga, Pangani, 30 m, 29 September 1956, *Tannes 3129* (K).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis injoloensis* occurs in four countries (Gabon, Democratic Republic of the Congo, Uganda and Tanzania), although we have not seemed any material from Uganda. *Cyrtorchis injoloensis* is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

Habitat and ecology:—Primary forest and forest remnants, ranging between 30 and 1,189 m elevation. Flowering peaks in July and September.

9. *Cyrtorchis letouzeyi* Szlachetko & Olszewski (2001: 722). (**Figure III-15C**) Type:—CAMEROON. Près Bitsokmam-eyen, à 12 km de Ngoulemakong (route Mbalmayo-Ebolowa), 30 June 1972, *R.Letouzey 11422* (holotype P!, isotype YA!).

Heterotypic synonym: *Cyrtorchis helicocalcar* Bellone (2001: 119). Type:—CENTRAL AFRICAN REPUBLIC. Savane arborée aux alentours de Zimba, sur l'Oubangui, 500-600 m, February 1996, *R.Bellone 775* (holotype LY!).

Additional specimens examined:—CAMEROON. Haut Nyong, along Lomié-Bertoua road, 26 October 1968, *Sanford 5244* (K); Environs du village de Mindourou I, UFA gérée par Pallisco, 732 m, 25 June 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 5190* (BRLU); Recolté sur la route à komba tida sur un arbre tombé, 700 m, 19 June 2001, *Stévant et al. 91* (BRLU); *ibid.*, 15 July 2001, *Stévant et al. 112* (BRLU); *ibid.*, 18 June 2002, *Stévant & Pial 375* (BRLU); *ibid.*, 12 July 2004, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé)*

46 (BRLU); *ibid.*, 8 June 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 543* (BRLU); *ibid.*, 25 June 2008, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1107* (BRLU, WAG); Akomssili (inselberg), zone de Bouamir, à 6 km au Sud-Ouest du grand rocher de Bouamir, Réserve du Dja, 660 m, 19 July 2004, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 48* (BRLU); *ibid.*, 30 May 2005, *Droissart et al., (Ombrière de Yaoundé) 246* (BRLU); *ibid.*, 8 June 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 544* (BRLU); *ibid.*, 655 m, 12 July 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 594* (BRLU); Bifos à Nkolbembe (plantation de café), 585 m, 18 June 2002, *Stévant & Pial 380* (BRLU); *ibid.*, 28 June 2002, *Stévant & Pial 414* (BRLU); *ibid.*, 23 June 2003, *Stévant & Pial 816* (BRLU); *ibid.*, 13 July 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 598* (BRLU); Nguti, sanctuaire de Banyang Mbo au sud du campement 552 (jusqu'à 2 km au sud du campement), 220 m, 12 July 2004, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 45* (BRLU); Mama, campement et plantation près de Etou, axe Somalomo-Ekom, 595 m, 9 August 2004, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 66* (BRLU); *ibid.*, s. d., *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 253* (BRLU); *ibid.*, 12 June 2002, *Stévant & Pial 346* (BRLU); *ibid.*, 28 June 2002, *Stévant & Pial 415* (BRLU); *ibid.*, 16 June 2003, *Stévant & Pial 804* (BRLU); Inselberg de Bouamir, à 6h de marche du village de Somalomo, Réserve du Dja, 700 m, 19 June 2001, *Stévant et al. 89* (BRLU); *ibid.*, 19 June 2001, *Stévant et al. 90* (BRLU); *ibid.*, 2 July 2001, *Stévant et al. 98* (BRLU); *ibid.*, 15 July 2001, *Stévant et al. 109* (BRLU); *ibid.*, 690 m, 16 June 2002, *Parmentier 3931* (BRLU); *ibid.*, 680 m, 18 June 2002, *Stévant & Pial 373* (BRLU); *ibid.*, 24 June 2002, *Stévant & Pial 409* (BRLU); *ibid.*, 720 m, 28 June 2002, *Stévant & Pial 413* (BRLU); *ibid.*, 16 June 2003, *Stévant & Pial 796* (BRLU); *ibid.*, 7 July 2003, *Stévant & Pial 821* (BRLU); *ibid.*, 29 June 2004, *Stévant & Pial 1034* (BRLU); *ibid.*, 25 June 2008, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1108* (BRLU); Inselberg Palme d'Or, près du village de Somalomo, Réserve du Dja, 650 m, 24 June 2002, *Parmentier 4072* (BRLU); Mbouma plantation de cacao, 659 m, 18 June 2002, *Stévant & Pial 376* (BRLU); *ibid.*, 650 m, 18 June 2002, *Stévant & Pial 378* (BRLU); *ibid.*, 18 June 2002, *Stévant & Pial 379* (BRLU); *ibid.*, 28 June 2002, *Stévant & Pial 416* (BRLU); *ibid.*, 7 June 2003, *Stévant & Pial 795* (BRLU); *ibid.*, 23 June 2003, *Stévant & Pial 814* (BRLU); *ibid.*, 29 June 2004, *Stévant & Pial 1037* (BRLU); *ibid.*, 29 June 2004, *Stévant & Pial 1039* (BRLU); *ibid.*, 30 June 2008, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1113* (BRLU); Petit Rocher de Bouamir, 714 m, 28 June 2002, *Stévant & Pial 412* (BRLU); Près Bitsoumam-Eyen, 12 km E Ngoulémakong, 30 June 1972, *Letouzey 11422* (BRLU); Route entre Yokadouma et Mouloundou, 30 km au N de Yokadouma, 480 m, 5 May 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2139* (BRLU); Somalomo vers Komba Tida (route de), 570 m, 17 June 2001, *Stévant & Pial 356* (BRLU); AC UFA 09006 Fanga -Mbouma, 703 m, 17 June 2001, *Stévant & Pial 357* (BRLU); *ibid.*, 675 m, 18 June 2002, *Stévant & Pial 374* (BRLU); Etou, sur le *Nauclea diderrichii*, 665 m, 18 June 2002, *Stévant & Pial 377* (BRLU); 15 July 2001, *Stévant et al. 113* (BRLU); Secteur Ekom, par Bodjouo, 18 June 2002, *Stévant & Pial 381* (BRLU); *ibid.*, 23 June 2003, *Stévant & Pial 808* (BRLU); Rocher Palm d'Or 2 petite partie (entre rocher Philippe et rocher de Schouam), Réserve du Dja, 615 m, 21 June 2002, *Stévant & Pial 396* (BRLU); Chutes

Mbolo, sud de la Réserve du Dja (nord de Djoum), entre la voiture et les chutes, 595 m, 4 July 2002, *Stévant & Pial 419* (BRLU); Bali, sud de la Réserve du Dja, à plus de 12 km au NE des chutes Mbolo (nord de Djoum), 545 m, 6 July 2002, *Stévant & Pial 428* (BRLU); Somalomo, Centre du programme ECOFAC et Conservation, nord de la Réserve du Dja, 650 m, 29 June 2004, *Stévant & Pial 1033* (BRLU); Réserve du Dja (collection J.P. Vautherin), 21 July 2000, *Stévant et al. 57* (BRLU); *ibid.*, 25 June 2002, *Stévant & Pial 410*. GABON. Oyem, dans la ville, 16 June 1999, *Biteau & Stévant 29* (BRLU).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis letouzeyi* occurs in three countries (Cameroon, Central African Republic and Gabon), although we have not examined any material from Central African Republic. *Cyrtorchis letouzeyi* is thus endemic to the Lower Guinea Domain.

Habitat and ecology:—Collected in forest-savanna transition as well as in dense humid forest, between 220 and 732 m elevation. Flowering peaks in June and July.

10. *Cyrtorchis monteiroae* (Rchb.f.) Schlechter (1914: 596). (**Figure III-15A**) Basionym: *Listrostachys monteiroae* Reichenbach (1877: 76). *Homocolleticon monteiroae* (Rchb.f.) Szlachetko & Olszewski (2001: 728). Type:—ANGOLA. Bembi, 1873, H.C.Monteiro *s. n.* (holotype W, isotype K!).

Heterotypic synonyms: *Angraecum antennatum* Kräenzlin (1893: 61). Type:—CAMEROON. Barombi-Station, *P.R.Preuss 418* (holotype K!).

Cyrtorchis droogmansiana (De Wild.) Schlechter (1918: 130). *Listrostachys droogmansiana* De Wildeman (1902: 426). Type:—DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Chutes du Lubi, 7 April 1902, *L.Gentil s. n.* (holotype BR!).

Additional specimens examined:—SIERRA LEONE. Gegbwema (Tunkia), August 1951, *Deighton 5717* (K); Ex Fairo (Soro), 12 December 1953, *Deighton 5977* (K). LIBERIA. Gbarnga district, Belefanaï, 6 December 1947, *Baldwin 10543* (K). IVORY COAST. Lapako à Okromodou, 9 June 1974, *Perez-Vera 644* (P). CAMEROON. Bertoua, near catholic mission, 16 November 1960, *Breteler 695* (K, P, YA); Akom II (route Kribi-Ebolowa), campement à 3 h de marche au Sud du village, le long de la rivière à environ 60 m du campement, 710 m, 3 October 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 768* (BRLU); Nguti, exploitation forestière, village d'Edjuigang, 155 m, 4 October 2004, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 149* (BRLU); Cameroon Mont, Buea; 975 m, 27 August 1946, *Dundas FHI 15302* (K); *ibid.*, 914 m, 4 September 1947, *Gregory 181* (K); Forest around Kupe mountain, Tombel, Etam reserve forest, 600 m, 20 August 1986, *Etuge & Thomas 216* (K); Pl. de Bipinde, près Lokunzo, September 1918, *Zenker 45* (P); 19 km Loum-Yabassi, 3 km N of Solé, 30 December 1971, *Leeuwenberg 9033* (K); Benyandon (35 km N Bafia), 14 September 1966, *Letouzey 7882* (K, P, YA); Barombi-station, *s. d.*, *Preuss 418* (K); Mt Kupe, 850 m, 6 September 1992, *Cable 101* (K); *Sine loc.*, March 1892, *Sander & CO s. n.* (K); Batouri district, Bertoua to Dimako, along river Zo, 28 October 1968, *Sanford 5894* (P); Nkoubar, prairie

marécageuse, 7 October 2002, *Stévant & Pial 679* (BRLU); Petit Mbasakok, zone de Bouamir, Réserve du Dja, 635 m, 18 September 2003, *Stévant & Pial 922* (BRLU); Meme Division. 10 kms west of Banga, near Mukete plantation, 50 m, 30 October 1985, *Thomas 4900* (YA); sur la route entre Ma'an et Meyo-centre, cacaoyère, 556 m, 6 October 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 5585* (BRLU); environs du village de Ma'an, cacaoyère, 518 m, 7 October 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 5601* (BRLU); *ibid.*, 547 m, 10 October 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 5640* (BRLU). CENTRAL AFRICAN REPUBLIC. Boukoko, 10 October 1947, *Tisserant 343* (P); *ibid.*, 22 October 1948, *Tisserant 1219* (P); *ibid.*, 9 September 1953, *Tisserant 2587* (P); Ngoto, bord de la Lobaye, 4 October 1951, *Tisserant s. n.* (P); *ibid.*, 22 September 1968, *Badré 169* (P). SÃO TOME ET PRINCIPE. Porto Real, 1956, *Rose 139* (P); Bom Sucesso, parc National d'Obo, 400 m, 3 October 1997, *Stévant & De Oliveira 205* (K); Nova Ceilão, 450 m, 26 August 1997, *Stévant 78* (BRLU); Piedade, 400 m, 3 October 1997, *Stévant 205* (BRLU); Principe, Morro Fundao, 370 m, 1 August 1998, *Stévant 496* (BRLU). GABON. Haute-Ogooué, Migoungangui, 6 May 1930, *Le Testu 8073* (P); *ibid.*, Tomisimba, 10 May 1931, *Le Testu 8802* (P); Koum (Mont) à 1 km du village de Kumassi, à 32 km d'Oyem vers Bitam, 625 m, 13 April 2002, *Stévant 1310* (BRLU). REPUBLIC OF THE CONGO. Galerie à 8 km de Boko-Songho, vers Madingou, 21 July 1963, *de Néré 1667* (P). DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Yangambi, île Esali (fleuve Congo), 8 km sur la route de Ngazi, 3 November 1935, *Louis 568* (P); *ibid.*, falaises de l'Isalowe, 28 July 1937, *Louis 5662* (P); *ibid.*, 17 August 1938, *Louis 10889* (P); Mugungura, October 1938, *Gille 158* (P). UGANDA. North West side of lake Nabugabo, 1,140 m, 9 October 1953, *Drummond & Hemsley 4730* (K); Entebbe, 1,067 m, May 1902, *s. coll. 6* (K); *ibid.*, 1,097 m, June 1902, *s. coll. s. n.* (K); *ibid.*, 6 September 1905, *Brown 239* (K); *ibid.*, 1,173 m, October 1938, *Glhandler 2489* (K); Sissa-Kisubi road, 1,189 m, September 1937, *Glhandler 1996* (K); *Sine loc.*, 14 November 1963, *Leakey 215* (K); Mabira forest, 1,219 m, 8 November 1938, *Loveridge 22* (K); Lake Nabugabo, Masaka, 1,219 m, November 1934, *Synge 1165* (K); Kipays, 1,219 m, 1 August 1914, *Dummer s. n.* (K); 13 miles Kampala-Entebbe road, 1,173 m, October 1932, *Eggeling 567* (K); *ibid.*, October 1932, *Eggeling 942* (K). ANGOLA. Bembi, April 1873, *Monteiro s. n.* (K).

Additional specimens examined with unspecified country:—*sine loc.*, s. d. *Boss 7332* (K).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis monteiroae* occurs in fourteen countries (Sierra Leone, Liberia, Ivory Coast, Ghana, Nigeria, São Tomé and Príncipe, Equatorial Guinea, Cameroon, Central African Republic, Gabon, Republic of the Congo, Democratic Republic of the Congo, Uganda and Angola), although we have not examined any material from Ghana, Nigeria and Equatorial Guinea. *Cyrtorchis monteiroae* is thus distributed in Upper Guinea, Lower Guinea and Congolian Domains.

Habitat and ecology:—Evergreen forests. Usually found near rivers or lakes, between 50 and 1,219 m elevation. Flowering peaks in September and October.

11. *Cyrtorchis neglecta* Summerhayes (1960: 149). Type:—TANZANIA. East Usambara Mts. Kwamkoro, near. Amani, 914 m, 18 August 1940, *W.M. Moreau 27* (holotype K!, isotypes B!, EA).

Additional specimens examined:—TANZANIA. Bumbuli, west Usambaras Jang. Jerr., 1676 m, 17 March 1941, *Moreau 874* (K); Kwamkoro, near Amani Jang. Jerr., 1,067 m, 20 March 1941, *Moreau 27A* (K); Handeni, 610 m, 12 May 1943, *Moreau 416* (K). In cultivation in Netherlands, Gelderland, Wageningen, flowered on the 6 October 2006, *Damen 209* (WAG).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis neglecta* occurs in five countries (Democratic Republic of the Congo, Rwanda, Burundi, Tanzania, Zambia), although we have not examined any material from Democratic Republic of the Congo, Rwanda, Burundi, and Zambia. *Cyrtorchis neglecta* is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

Habitat and ecology:—Gallery forests, open forests, shrublands between 610 and 1,676 m elevation. Flowering peak in March.

12. *Cyrtorchis ringens* (Rchb.f.) Summerhayes (1958: 87). (**Figure III-15D**) Basionym: *Listrostachys ringens* Reichenbach (1878b: 266). *Angraecum ringens* (Rchb.f.) Brown (1882: 873). *Homocolleticon ringens* (Rchb.f.) Szlachetko & Olszewski (2001: 730). Type:—CAMEROON. *Sine loc.*, Hildebrandt in *Bouché s. n.* (holotype W!).

Heterotypic synonyms: *Angraecum buchholzianum* Kränzlin (1886: 334). *Listrostachys buchholziana* (Kraenzl.) Durand & Schinz (1895: 48). *Cyrtorchis buchholziana* (Kraenzl.) Schlechter (1918: 129). Type:—CAMEROON. Mungo, *Buchholz 974* (holotype B†).

Angraecum bistortum Rolfe (1893: 75). *Listrostachys bistorta* (Rolfe) Rolfe (1897: 155). *Cyrtorchis bistorta* (Rolfe) Schlechter (1918: 129). Type:—NIGERIA. Interior of colony of Lagos, *A. Moloney s. n.* (holotype K!).

Listrostachys hookeri Rolfe (1897: 154). *Cyrtorchis hookeri* (Rolfe) Schlechter (1918: 131). Type:—CAMEROON. Cameroon Mountains, 1,200 – 1,500 m, *Mann 2114* (holotype K!).

Listrostachys ignoti Kränzlin (1914: 395). Type:—CAMEROON. Mount Cameroon, *s. coll. 18* (holotype B†).

Cyrtorchis belloneorum Chiron (2001: 77). Type:—CAMEROON. Rives du lac Awing, vers 1200 m d'altitude, April 1999, *R. Bellone 1050 ex G. Chiron X1050* (holotype LY !).

Additional specimens examined:—SIERRA LEONE. Semnehun, Kailahun district, 17 October 1981, *Segeberäck 1509* (K); *ibid.*, 7 September 1982, *Segeberäck 1509a* (K); *Sine loc.*, 11 November 1924, *Regius Keeper 4* (K). LIBERIA. Kitoma, 28 October 1951, *Harley 1834* (K). IVORY COAST. 61 km N of Sassandra, W of Niapidou, 19 January 1959, *Leeuwenberg 2497* (K); Forêt de Daniefla, October 1971, *Perez-Vera 129* (K); Forêt de Buyo, 11 October 1975, *Perez-Vera 787* (K); Mt Tonkoui, 3 October 1961, *Aké Assi 6025* (K); forêt de Tiapleu, 7 October 1960, *Aké Assi 5673* (K); forêt de Taï, 22 October 1961, *Aké Assi 6032* (K). CAMEROON. Mindourou site d'exploitation de la Palisco pres de Lomié (AC 5), 770 m, 12 September 2001, *Stévert & Pial 210* (BRLU); *ibid.*, 12 September 2001, *Stévert & Pial 218* (BRLU); *ibid.*, 4 October 2001, *Stévert & Pial 232* (BRLU); *ibid.*, 5 September 2003, *Stévert & Pial 898* (BRLU); *ibid.*, 12 September 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 716* (BRLU); *ibid.*, 27 August 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 672* (BRLU, YA); *ibid.*, 3 September 2008, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1275* (BRLU); *ibid.*, 14 September 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2356* (BRLU); *ibid.*, 15 September 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 3144* (MBG); *ibid.*, 27 August 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 3769* (BRLU); Environs du village de Mindourou II, UFA gérée par Alpicam, 648 m, 14 August 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 5388* (BRLU); Bipindi, village de Memel II au Nord de Bipindi, Transect dans les collines (entre 250 et 275), 250 m, 24 September 2008, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1341* (BRLU); *ibid.*, 14 October 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2469* (BRLU); *ibid.*, 8 October 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 3185* (YA); *ibid.*, 1 October 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 3884* (P); Bipinde, 1913, *Zenker 4693* (K); Bindem (route allant vers Messama, perpendiculaire à la route Kribi-Ebolowa), arbre coupé pour servir de pont au-dessus de la rivière, à 1 heure de marche au SO du village, 570 m, 21 September 2007, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 747* (BRLU); *ibid.*, 19 October 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2484* (YA); *ibid.*, 2 October 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 3894* (P, WAG); Nguti, sanctuaire de Banyang Mbo, village de Bejange, à environ 500 m du village de Babubok, situé à l'extrême S. de la réserve, 245 m, 25 October 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2501* (BRLU); *ibid.*, 510 m, 12 November 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 3287* (YA); *ibid.*, 19 October 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 3934* (BRLU); Au sud du campement 552 (jusqu'à 2 km au sud du campement), 220 m, 1 November 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 4005* (BRLU); *ibid.*, exploitation forestière, village de Tayov, 250 m, 1 November 2004, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 173* (BRLU); *ibid.*, 15 October 2008, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1395* (BRLU); Parc National de Korup, dans le plot1 "structure" à proximité du Chimpanzee Camp, 299 m, 29 November 2012, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 4083* (BRLU, YA); *ibid.*, 6 October 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 5586* (BRLU); *ibid.*, 300 m, 9 October 2014, *Droissart et al. (Ombrière de Yaoundé) 5629* (BRLU); Buea, Etinde, 1,600 m, 24 October 1992, *Mbatchou 419* (K); Akom II (route Kribi-Ebolowa), campement à 3 h de marche au S. du village, aux alentours du campement, à 10 de part et d'autre de la rivière, 705 m,

19 September 2008, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1306* (BRLU, YA); *ibid.*, chemin le long d'une rivière, jusqu'au pied du sommet 2 (1005 m), 660 m, 30 August 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2328* (WAG); Réserve Edéa-Douala, Lac Tissongo, 7 m, 20 October 2009, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 1891* (BRLU, P); *ibid.*, 15 September 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2364* (P); *ibid.*, 29 October 2010, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 2519* (YA); Mt Cameroon, 1,524 m, s. d., *Johnston s. n.* (K); *Sine loc.*, 21 October 2011, *Simo et al. (Ombrière de Yaoundé) 3227* (BRLU); Nyasoso, Mt Kupe, shrike Trail, 1,275 m, 7 July 1992, *Wheatley 399* (K); *Sine loc.*, s. d., *Hildebrandt s. n.* (K); *Sine loc.*, s. d., *Mann 2114* (K). EQUATORIAL GUINEA (BIOKO, RIO MUNI). Bioco, 1989, *Carvalho 3508* (K); Cataratas, chemin de Musumu au Rio Uele, 300 m, 6 October 1999, *Ndong Bokung & Stévant 88* (BRLU); village de Moca, PNMA, 650 m, 8 August 2001, *Ndong Bokung & Stévant 386* (BRLU); Bong, 20 September 2002, *Ndong Bokung & Stévant 509* (BRLU). GABON. Western flank of Monts Doudou, 6 December 1984, *Arends et al. 653* (K); Song, Monts de Cristal, 8 November 2001, *Biteau & Stévant 71* (BRLU); Andocka-Foula, 21 September 2001, *Ngok Banak 185* (BRLU); *ibid.*, 12 October 2001, *Stévant et al. 1144* (BRLU); *ibid.*, 25 October 2001, *Stévant et al. 1147* (BRLU); *ibid.*, 22 November 2001, *Stévant & Ngok Banak 1145* (BRLU); *ibid.*, 1 December 2002, *Stévant 1670* (BRLU); *ibid.*, 1 December 2002, *Stévant 1734* (BRLU); Medouneu, Kinguélé, 7 December 2001, *Stévant et al. 1700* (BRLU); *ibid.*, 27 October 2002, *Stévant 1790* (BRLU). BURUNDI. Bugesera, 17 December 1953, *Liben 1050* (K). RWANDA. Nyungwe, 24 February 2002, *Delepierre & Lebel 101* (K).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis ringens* occurs in twenty countries (Sénégal, Guinea, Sierra Leone, Liberia, Ivory Coast, Ghana, Nigeria, Equatorial Guinea, São Tomé and Príncipe, Cameroon, Gabon, Democratic Republic of the Congo, Uganda, Rwanda, Burundi, Angola, Tanzania, Zambia, Malawi, Zimbabwe), although we have not examined any material from Senegal, Guinea, Ghana, São Tomé and Príncipe, Democratic Republic of the Congo, Uganda, Angola, Tanzania, Zambia, Malawi, Zimbabwe. *Cyrtorchis ringens* is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

Habitat and ecology:—Widely distributed in tropical forests, between 7 and 1,600 m elevation. Flowering peaks in September and December.

Notes:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis ringens* encompass five heterotypic synonyms: *C. bistorta*, *C. hookeri*, *C. buchholziana*, *Listrostachys ignoti* and *C. belloneorum*. The holotypes of *C. buchholziana* and *L. ignoti* were destroyed during the fire of Berlin herbarium in 1943 (Summerhayes 1960). Additionally, we were not able to examine the holotype of *C. belloneorum*, which is housed in the herbarium of Lyon (LY). Examination of the two type's specimens (*Moloney s. n.* and *Mann 2114*, respectively), deposited at Kew herbarium, allows us to confirm the synonymy with *C. ringens*.

The holotype of *Cyrtorchis ringens*, conserved at W, is poor and represents by one inflorescence and two flowers. We therefore used main distinctive features given in the protologue of *Cyrtorchis ringens* (Reichenbach, 1878), coriaceous slender leaves with equally bilobed apex, up to 9 cm long, the dense inflorescence, the imbricated leaves and the small depressed bracts, to identify the specimens cited in this paper. However, due to great morphological variations observed in specimens associated to *C. ringens*, we think that additional morphometric and molecular studies are needed to accurately clarify the delimitation of this taxon.

13. *Cyrtorchis seretii* (De Wild.) Schlechter (1918: 132). Basionym: *Angraecum seretii* De Wildeman (1916: 191). Type:—DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Suronga, territoire Poko sur l'Uele, 27 September 1906, *F.Seret 666* (holotype BR!).

Additional specimens examined:—CENTRAL AFRICAN REPUBLIC. Ippy, 1928, *Chevalier 37751* (P); Keyoredé, 20 km, sud Ippy, 3 August 1928, *Tisserant 1576bis* (K); Près vill. Batibala, 40 Km N.E. Bambari, 22 July 1924, *Tisserant 1576* (P). GABON. Tchimbélé, ancien lit de la rivière qui descend du barrage, 440 m, 1 December 2002, *Stévert 1669* (BRLU). DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Gandajika, 17 December 1956, *Liben 2125* (K); Mbunga, August 1936, *De Saaer 679* (K). ETHIOPIA. Colonia Eritrea, Grande vallée au-dessus de Ghinda, 1,000-1,500 m, 13 May 1892, *Schweinfurth 2143* (P). UGANDA. Masindi district, Budongo forest, Kaniyo-Pabidi beat, 1,010 m, February 1996, *Hafashaimana 62* (K); Bunyoro, Budongo, June 1935, *Eggeling 2074* (K); *ibid.*, August 1935, *Eggeling 2155* (K); *ibid.*, June 1936, *Eggeling 3031* (K); *ibid.*, December 1942, *Eggeling 5201* (K); *ibid.*, 20 June 1944, *Eggeling 440* (K).

Distribution:—According to Govaerts *et al.* (2016), *Cyrtorchis seretii* occurs in four countries (Democratic Republic of the Congo, Rwanda, Burundi, Tanzania, Zambia). We have, however, seen specimens clearly assignable to this species from Ethiopia. *Cyrtorchis seretii* is thus widely distributed in Sub-Saharan Africa.

Habitat and ecology:—Woodland, between 440 and 1,500 m elevation. Flowering peaks in June and August.

14. *Cyrtorchis submontana* Stévert, Droissart & Azandi, (2016: 183). (**Figure III-16**)

Diagnosis: *Cyrtorchis submontana* Stévert, Droissart & Azandi is close to *Cyrtorchis guillaumetii* but differs by having thinner leaves, fewer flowers, less curved and shorter inflorescences. *Cyrtorchis submontana* is also close to *C. brownii* but differs by having small elliptic leaves and shorter inflorescences with spaced bracts and flowers (**Figure III-16H**).

Type:—EQUATORIAL GUINEA (BIOKO). Engong, Parc National de Monté Alén, 5 km au NO de Engong, inselberg, 14 June 2001, *Ndong Bokung & Stévert 273* (holotype BRLU!).

Epiphytic herb, suberect, non-branched with generally short stems, 1.5–18 cm long, internodes 2–5 mm long. Leaves elliptic to closely elliptic distichous, spaced closed together, fleshy, olive green, margins linear, unequally bilobed at the apex, with rounded lobes, 2.4–5.6 × 0.7–1.4 cm. Inflorescences axillary or below the leaves, 1–5 flowered, 1–4.4 cm long. Bracts broadly ovate, 4–7 mm long and 5–8 mm apart. Flowers white, fading to orange; sepals ligulate to lanceolate, acute to acuminate at the apex, 9–15 × 2–4 mm; petals similar but shorter and usually acuminate at the apex, 8–12 × 2–3 mm; lip sometimes closely triangular with acuminate fleshy apex, up to 10.5 mm long; spur straight sometimes sigmoid, 1.6–2.2 cm long; pedicel with ovary of 3.5–19.5 mm long; ovary triangular with two lobes on the two sides and one lobe on the "belly", with a broad flat rib on each of the three sides; two ovoid pollinia, column stout and short of 1–1.5 mm long, viscidium with a uniformly hyalin texture.

Additional specimens examined:—CAMEROON. Akom II (route Kribi- Ebolowa), 1015 m, 905 m, 31 May 2006, *Droissart 135* (BRLU); *ibid.*, 3 June 2006, *Droissart 112* (BRLU); *ibid.*, 1,075 m, 4 June 2006, *Droissart 129* (BRLU). EQUATORIAL GUINEA (RIO MUNI). Engong, Parc National de Monté Alén, dalle rocheuse (inselberg) d'Engong, à 5 km du Nord Ouest du village d'Engong, 1,095 m, 29 May 2002, *Stévert 1593* (BRLU); *ibid.*, 1,200 m, 25 June 2000, *Ndong Bokung et Stévert 185* (BRLU); Montée de Monte Alén à Mirador, 1 August 1999, *Ndong Bokung et Stévert 5* (BRLU). REPUBLIC OF THE CONGO, col de Bamba, 550 m, 2 October 1992, *la Croix 1172* (K).

Distribution:—*Cyrtorchis submontana* occurs in three countries (Cameroon, Equatorial Guinea (Rio Muni) and Republic of the Congo). This species is thus endemic to the Lower Guinea Domain.

Habitat and ecology:—Epiphyte, restricted to submontane vegetation in evergreen moist forest on mossy branches, and in saxicolous forests around inselbergs. Altitudinal range from 550 to 1,200 m.

Preliminary IUCN Red List category:—Endangered [EN]. The extent of occurrence (EOO) of *Cyrtorchis submontana* is estimated to be over 24,536 km², exceeding the 20,000 km² upper limit for Vulnerable status under the criterion B1), whereas its area of occupancy (AOO) is estimated to be 12 km² (which falls within the limits for Endangered status under the criterion B2). The species is now known from three subpopulations in Cameroon, Equatorial Guinea (Rio Muni), and Republic of the Congo. These three subpopulations represent three different locations (*sensu* IUCN 2014), less than five locations, which is the upper limit for Endangered status under the subcriterion 'a' of criterion B2. *Cyrtorchis submontana* has been collected in protected areas in Equatorial Guinea (Monte Alén National Park) and Cameroon (Campo Ma'an National Park). None of these protected areas is under threat and they appear well managed, however the subpopulation in Republic of the Congo might be threatened. The available information suggests that the number of subpopulations and mature individuals, as well as

its EOO and AOO, could decrease in the future. *Cyrtorchis submontana* is therefore assigned a preliminary status of EN B2ab(i,ii,iii,iv,v).

Notes:—This novelty is one of the smallest species of the genus. It belongs to the section *Homocolleticon*, within which, it is close to *C. crassifolia* (stem 1.5–18 cm long; leaf 2.4–5.6 × 0.7–1.4 cm and flowers 2.2–3 cm long). Indeed, some specimens of the new taxa share some morphological similarities (stem length, flower size) with *C. crassifolia* but their leaves are not as succulent and not v-shaped. The new species resembles *C. brownii* (section *Homocolleticon*) but it differs from it by its more spaced bracts, smaller leaves, short inflorescence (1–4 cm) and fewer flowers (1–5 flowers) (Tableau III-1). *Cyrtorchis submontana* is also close to *C. guillaumetii* (section *Homocolleticon*). The two species share elliptic leaf form and stem length but should be distinguished by bract arrangement (imbricate vs. spaced), inflorescences length (6.4–8 cm vs. 1–4 cm), and number of flowers per inflorescence (6–12 flowers vs. 1–5 flowers).

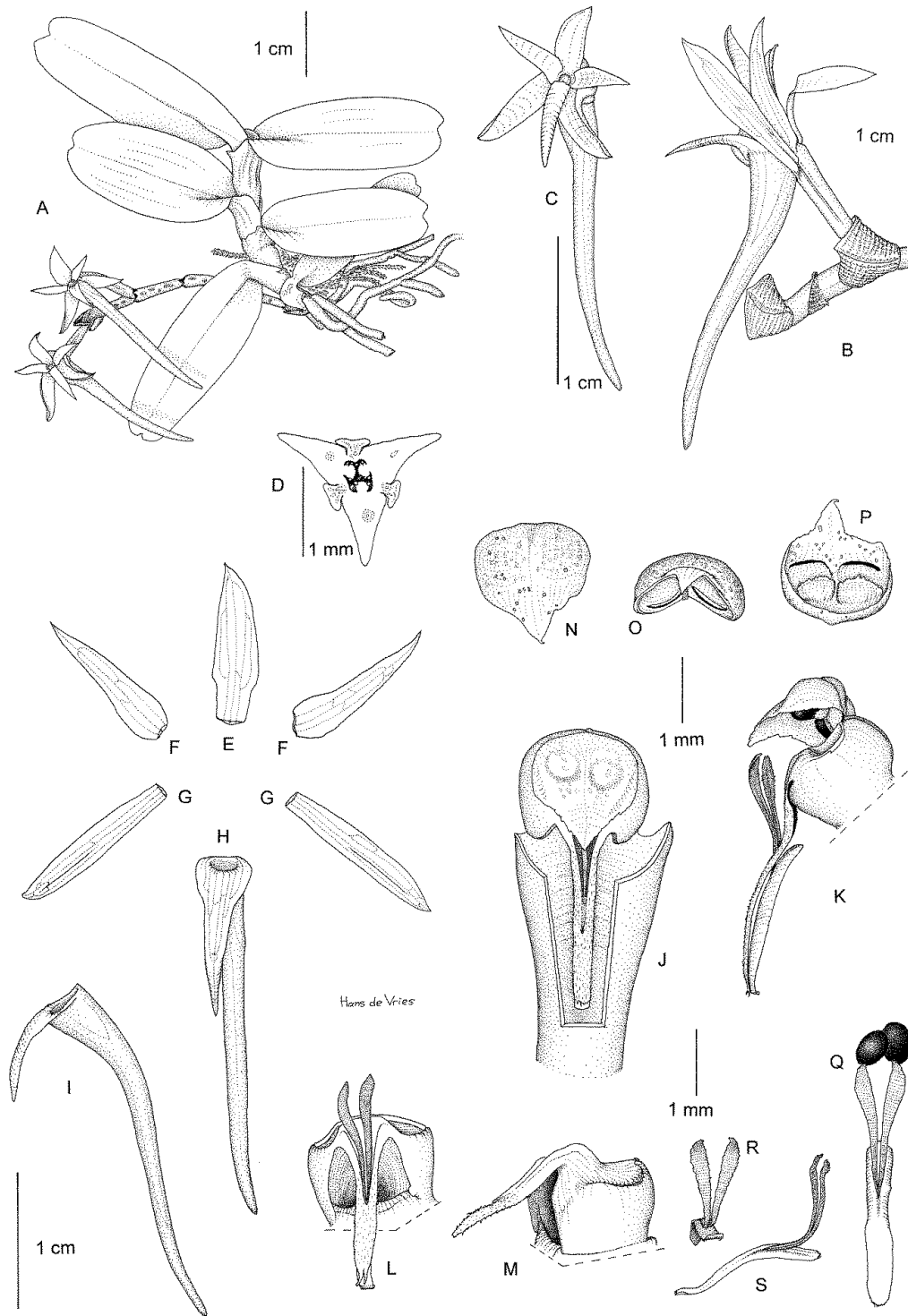


Figure III-16. *Cyrtorchis submontana* Stévert, Droissart & Azandi. A. Habit. B. Inflorescence. C. Flower. D. Ovary, section. E. Dorsal sepal. F. Lateral petal. G. Lateral sepal. H. Labellum with spur, frontal. I. Labellum with spur, side view. J. Column with part of opened spur. K. Column, side view. L. Column, frontal. M. Column, side view. N. Anther cap, above. O. Anther cap, frontal. P. Anther cap, from below. Q. Stipe with pollinia. R. Stipe, frontal. S. Stipe, side view. Stévert & Ndong Bokung 273 (A, B, D, K, M, Q, R, S) Droissart 112 (C, E, F, G, H, I, N, O, P) Stévert 1593 (J, L) (Drawing by Hans de Vries, 6 November 2015).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to curators and staff of BR, BRLU, K, LBV, P, WAG, WU and YA for making their collections available and for allowing the authors access to the facilities of their institutions. We thank the staffs of the herbarium of Abidjan in Ivory Coast and of the National Museum of Natural History, Vienna in Austria for making scans of their type specimens available. We are grateful to our friend and colleague Daniel Geerinck who recently passed away and whose enthusiasm and knowledge of orchids will be greatly missed. We express our sincere gratitude to Hans de Vries for the new species drawings, to Pete Phillipson for the improvement of English in an earlier version of this manuscript, to M Lourens Grobler who provided the pictures of *Cyrtorchis injoloensis* and to people who collected the *Cyrtorchis* specimens both in the field and in the shadehouses. We are also grateful to the American Orchid Society that supports the Ph.D. research of Laura Azandi and the post-doc of Murielle Simo-Droissart. Laboratory activities and herbarium visits were supported by the U.S. National Science Foundation (1051547, T. Stévant as PI, G. M. Plunkett as Co-PI.).

III.1.3 DÉLIMITATION TAXONOMIQUE ET PHYLOGÉNÉTIQUE

Dans l'article précédent, nous avons réalisé une révision synoptique du genre *Cyrtorchis* en Afrique centrale qui a permis d'évaluer la position taxonomique de 14 taxons (12 espèces et deux sous-espèces) sur les 18 décrits grâce à l'examen visuel d'échantillons d'herbier y compris les types nomenclaturaux. Cette révision a également permis d'identifier et de décrire une nouvelle espèce *Cyrtorchis submonanta*, de produire une clé d'identification pour tous les taxons d'Afrique centrale, de faire neuf nouvelles signalisations, et deux lectotypifications et trois mises en synonymie et surtout de résoudre certaines ambiguïtés taxonomiques. Cependant, des complexes d'espèces ont été signalés à l'issue de cette étude et méritent d'être résolus avant de pouvoir produire une révision taxonomique du genre. Par ailleurs, aucune étude n'a jusqu'ici testé la monophylie des sections y compris les relations phylogénétiques entre les taxons du genre dans son ensemble. Afin d'essayer de résoudre ces problèmes taxonomiques restants, la suite de ce chapitre vise à proposer de nouvelles perspectives sur une taxonomie plus robuste et naturelle du genre *Cyrtorchis* en clarifiant la délimitation des sections, des taxons de rang spécifiques et infraspécifiques par une approche de systématique intégrative impliquant à la fois les analyses de morphométrie et de phylogénie moléculaire. La combinaison d'investigations morphologiques, de morphométrie, d'analyses phylogénétiques et de l'évolution des caractères ancestraux à l'aide de données sur les séquences d'ADN produites à partir de six marqueurs (5 marqueurs plastidiques et un marqueur nucléaire) nous a permis de clarifier les limites et les relations entre les espèces au sein du genre *Cyrtorchis*, une exigence cruciale pour entreprendre une révision taxonomique. Les résultats morphologiques confirment l'existence des deux sections basées sur la caractéristique du viscidium, ainsi que de 27 morphogroupes distincts. La phylogénie produite incluant 15 espèces publiées et six potentiels nouveaux taxons a permis de confirmer la monophylie du genre *Cyrtorchis* et de révéler celle d'une des sections (*C. sect. Cyrtorchis*) de huit taxons (cinq taxons décrits et trois nouvelles espèces). Grâce à la reconstitution des états ancestraux réalisée sur la base de ce cadre phylogénétique, certains caractères reproductifs notamment le point d'insertion des stipites au tiers inférieur de la longueur du viscidium s'est révélé être l'un des principaux caractères soutenant la monophylie du genre. Par ailleurs, la structure du viscidium, la forme des stipites et des lobes latéraux du rostelle se sont révélés être d'importants critères permettant d'inférer des relations phylogénétiques au sein du genre.

A near comprehensive phylogenetic framework gives new insights toward a natural classification of the African genus *Cyrtorchis* (Angraecineae, Orchidaceae)

Azandi N.L., Droissart V., Sonké B., Simo-Droissart M., D'hajjère T.,
Farminhão J.N.M., Verlynde S., Kaymak E., Stévant T.

Manuscript accepté dans la revue *Taxon*. DOI: 10.1002/tax.12511

ABSTRACT

The genus *Cyrtorchis* is renowned for its conspicuous white, long-spurred flowers, but also for its challenging problems of species delimitation due to the great morphological resemblance of their flowers. Based on a preliminary visual inspection of 1752 specimens, 27 morphogroups were defined including 6 unpublished taxa. Moreover, we used a representative sampling of 171 dried and alcohol-preserved specimens representing 20 morphogroups to perform linear morphometrics through multivariate analyses on 43 morphological characters in order to confirm morphogroups delineation and identify their discriminant characters. Moreover, the monophyly of the two sections and of 21 morphological entities was tested through molecular analyses in order to produce a natural classification of the genus. DNA sequences from 69 *Cyrtorchis* specimens belonging to 15 published taxa (7 from *C. sect. Homocolleticon*, 8 from *C. sect. Cyrtorchis*), 6 putative new *Cyrtorchis* taxa, as well as 4 taxa used as outgroups, were produced using one nuclear (nrITS-1) and five plastid regions (matK, rps16, trnC-petN intergenic spacer, trnL-trnF intergenic spacer, ycf1), and were analyzed using maximum likelihood and Bayesian approaches. We used this phylogenetic framework to infer the morphological character-state evolution of six floral traits and assess their taxonomic value. Morphological analysis revealed two groups corresponding to the published sections. However, while molecular results recovered the monophyly of *C. sect. Cyrtorchis*, the *C. sect. Homocolleticon* appears paraphyletic. Of the 21 morphologically defined taxa that were included in the molecular analyses, eight, namely *C. aschersonii*, *C. ringens*, *C. henriquesiana*, *C. monteiroae*, *C. praetermissa*, *C. ringens*,

C. monteiroae, *C. aschersonii* and three new taxa were proven monophyletic. The delimitation of the 19 remaining morphologically identified taxa was assessed using morphological approach only. The ancestral state reconstruction provided new insights into character-state evolution in the genus by inferring the insertion point of the stipites at the rear third of the length of the viscidium as one of the main synapomorphic characters supporting the monophyly of the genus. Furthermore, viscidium structure, stipites shape, and the lateral lobes of the rostellum were found to be important to infer phylogenetic relationships within the genus.

KEYWORDS: character-state evolution; integrative systematics; molecular analyzes; morphometry; *Homocolleticon*; Vandeae.

III.1.3.1 INTRODUCTION

Since Darwin's time, angraecoid orchids (Angraecinae, Epidendroideae, Vandae) have never ceased to fascinate naturalists and evolutionary biologists (Micheneau & al., 2009). In Madagascar, continental Africa, and their neighboring islands, this group comprises 49 genera with about 760 species (Pridgeon & al., 2014). Chase & al. (2015) mentioned the need for providing a natural generic delimitation within Angraecinae as one of the remaining tasks in orchids taxonomy. Indeed, many recent molecular studies investigated the phylogenetic relationships of different genera within the angraecoids in Madagascar and Mascarene Islands (Andriananjamanantsoa & al., 2016; Carlswald & al., 2006a,b; Micheneau & al., 2008; Szlachetko & al., 2013) and in the neotropics (Carlswald & al., 2003; Pessoa & al., 2018). In tropical Africa, Simo-Droissart & al., (2018a), by providing a new molecular phylogenetic framework, have furthered our understanding of the taxonomy of continental African angraecoid orchids, and thus has enabled the taxonomic revision of many genera (Descourvières & al., 2018; D'hajjère & al., 2019; Farminhão & al., 2018; 2020; Simo-Droissart & al., 2018b,c). However, some genera are still in need of a taxonomic revision, as in the case of *Cyrtorchis*.

Described by Rudolf Schlechter (1914) as a segregate of the genus *Angraecum* Bory and characterized by its white stellate flowers, *Cyrtorchis* is confined to tropical Africa, including the Gulf of Guinea islands (Bioko, Príncipe, São Tomé and Annobón), and southern Africa (Pridgeon & al., 2014). Eighteen species and two subspecies are currently accepted in the genus to date (Govaerts & al., 2019).

Etymologically, the name *Cyrtorchis* comes from the combination of two Greek words: *Kyrtos* meaning curved and *Orchis* meaning orchid, in reference to the curved spur and perianth parts. Species of this genus are easily recognizable by their recurved lanceolate sepals and petals, and a lip that is similar in shape to the remaining tepals, bearing a long curved and tapering spur. Overall, floral morphology does not vary greatly in *Cyrtorchis*, but flowers differ significantly in size (la Croix, 2003).

The genus is renowned for being taxonomically difficult since the flowers bear a great resemblance to each other making identification at the species level difficult (Baker, 1994; Cribb, 1989; la Croix & Cribb, 1998; Stewart & al., 2006; Summerhayes, 1960). This great floral similarity is probably due to a common pollination syndrome, notably sphingophyly (Cribb, 1989).

Preliminary phylogenetic analyses based on anatomic and morphological data of leaf and roots (Carlswald & al., 2006a) and molecular data (Carlswald & al., 2006b; Simo-Droissart & al., 2018a) have revealed that the genus *Cyrtorchis* is monophyletic. However, *Cyrtorchis* was poorly sampled with only four (Carlswald & al., 2006b), six (Carlswald & al., 2006a), or ten taxa (Simo-Droissart & al., 2018a) in these molecular phylogenetic studies and sequence data from only three markers.

The infrageneric classification of *Cyrtorchis* is still subject to debate. While revising the genus, Summerhayes (1936, 1948, 1960) found important reproductive gynostemial features that he used to propose an infrageneric classification. He proposed two sections: *C. sect. Cyrtorchis* and *C. sect. Homocolleticon* Summerh. (Figure III-17). The latter is characterized by a uniformly narrow viscidium with a hyaline texture throughout its length and a thin apex of the stipites, whereas the former is characterized by a composed viscidium texture consisting of a broad and hardened upper part, recurved edges, a thin linear hyaline lower part, and a wider apex of the stipites (Summerhayes, 1960). Chiron (2001) also recognized these two sections and 17 species but 14 of them were treated in his key as “continental species”. The same year, in the Flore du Cameroun (Szlachetko & Olszewski, 2001), these two sections were raised to generic rank, based on the same two features of the viscidium. This treatment was later adopted in the Gynostemia Orchidarium (Szlachetko, 2003). Nevertheless, these two sections appear non-monophyletic based on molecular phylogenetic evidences but using only three markers for ten taxa (Simo-Droissart & al., 2018a). The monophyly of these two morphological groups still needed to be confirmed using more taxa, genetic markers and taxonomical approaches in order to test the infrageneric taxonomic limits within *Cyrtorchis*.

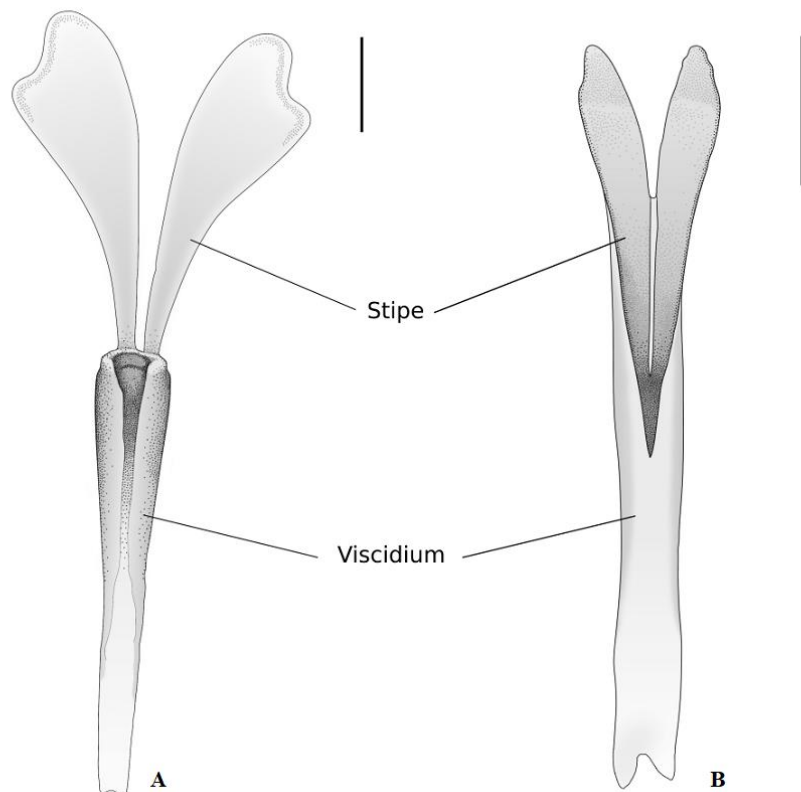


Figure III-17. Comparison of the viscidium or pollinarium structure in *Cyrtorchis*. A. *Cyrtorchis* sect. *Cyrtorchis* (from a specimen of *C. chailluana*) and B. *Cyrtorchis* sect. *Homocolleticon* (from a specimen of *C. ringens*). By Marie Savignac.

In order to prepare the taxonomic revision of the genus, a preliminary assessment of the genus based on a morphological study of the Central African taxa of *Cyrtorchis* (15 out of the 20 accepted taxa) was published (Azandi & al., 2016). This study clarified the importance of the viscidium structure to distinguish the two sections, provided a preliminary identification key, together with the description of a new species and raised some taxonomic uncertainties. Indeed, this synopsis (Azandi & al., 2016) and a recent study focused on *Cyrtorchis* in Central Africa and its two sections (Azandi & al., 2018), identified four species complexes, namely *Cyrtorchis arcuata* (Lindl.) Schltr., *C. brownii* (Rolfe) Schltr., *C. guillaumetii* (Pérez-Vera) R.Rice, and *C. ringens* (Rchb.f.) Summerh. In order to produce a robust taxonomic revision of the whole genus, these species complexes and their relationships with the four taxa excluded from the synopsis mostly confined to East Africa (*C. crassifolia* Schltr., *C. erythraeae* (Rolfe) Schltr., *C. glaucifolia* Summerh., *C. praetermissa* Summerh.) still need to be resolved. Therefore, a comprehensive molecular analysis is required to clearly understand the phylogenetic relationships between the species of each section.

Finally, all previous authors (Azandi & al. 2016; 2018; Chiron, 2001; Summerhayes, 1960; Szlachetko & Olszewski, 2001; Szlachetko 2003) proposed floral reproductive characters to support the sectional circumscriptions but these important floral characters have never been assessed in a phylogenetic context. A well-supported phylogenetic framework is thus needed to provide a robust background for studying the evolution of important floral traits within the genus.

The main objective of this study was thus to provide insights into a more robust and natural taxonomy of the genus *Cyrtorchis* by clarifying sectional, specific and infraspecific delimitation using an integrative systematic approach. Specifically, we aimed (1) to clarify the phylogenetic position of the two sections within the genus by using newly generated DNA sequences to complement the dataset previously published in the studies of Simo-Droissart & al. (2018a), D'hajjère & al., (2019) and Farminhão & al., (2020); (2) to test the monophyly of the subordinate taxa within the sections and thus clarify the species complexes in order to provide a clear differentiation of species within the genus; (3) to examine the evolution of key floral traits and assess their value in reconstructing relationships among sections and taxa.

III.1.3.2 MATERIAL AND METHODS

This study is based on a four-step approach. Firstly, we examined the delimitation of the two sections, species and morphospecies using standard herbarium practices (De Vogel, 1987). This involved morphological inspection of the available collections, including nomenclatural types, to define coherent morphological groups. Afterward, an appropriate published species name was applied to each defined group or otherwise treated as a potentially new taxon. Secondly, we used morphometric analyses to identify informative morphological traits for differentiating these taxa. Thirdly, we tested the sections and taxa limits using DNA sequences of six markers (one nuclear and five plastid regions). Finally, we performed an ancestral character reconstruction analysis on some key characters that have been found important to the taxonomy of *Cyrtorchis*.

III.1.3.3 MORPHOLOGICAL ANALYSIS

III.1.3.3.1 TAXON SAMPLING

We combined observations and measurements of 1752 dried and spirit-preserved specimens including 26 nomenclatural types described in the genus and representing the 18 published species of the genus *Cyrtorchis* recognized by Govaerts & al. (2019). These specimens were examined from the following herbaria: BM, BR, BRLU, GDA, K, LY, MA, MO, P, WAG, and YA (Thiers, 2019). Most of the spirit-preserved specimens were collected during the last 15 years by the authors team from Central Africa (Guinea, Cameroon, Bioko, Rio Muni, São Tomé, Príncipe, Gabon).

Morphologically coherent groups of specimens were first constituted and assigned, when possible, to one of the currently accepted species or qualified as a new entity after comparison with all nomenclatural types and with the diagnoses provided in the protologue (De Vogel, 1987). Morphological measurements were taken from a total of 255 samples chosen to represent the 27 defined morphogroups (21 already published taxa (18 accepted species, 1 non-accepted species, 2 subspecies) and 6 potentially new taxa) (**Appendix III-1**). These morphogroups were split into two groups corresponding to the sections initially defined by Summerhayes (1960). These sections were defined based on the structure of the viscidium, apex of the stipites and structure of the lateral lobes of the rostellum. *Cyrtorchis aberrans* was excluded from our taxonomic investigations because it is an unplaced name and has no affinity with the *Cyrtorchis* but rather with *Rhipidoglossum* Schltr. Flowers from dried specimens were initially boiled in water to facilitate stereomicroscopic observations. A total of 59 characters were initially measured, of which 31 were quantitative and were 28 qualitative (**Appendix III-2**). Quantitative characters were measured and recorded as numeric (continuous or discrete) values (Cupido, 2003; Poulsen & Nordal, 2005) whereas qualitative characters were recorded as factors (Sneath & Sokal, 1973). The terminology used to describe the characters on shape followed

the Systematics Association Committee for Descriptive Biological Terminology (1962a,b) while the characters on structure followed the Kew Glossary (Beentje, 2010). Continuous variables were measured in millimeter. Out of the 255 specimens representing 27 morphogroups and the 59 characters initially measured, only 171 specimens representing 20 morphogroups with 43 measured characters, 26 quantitative and 17 qualitative, were used in the morphometric matrix, since most of the multivariate analyses do not admit missing values (see **Appendix III-1 & Appendix III-2**).

III.1.3.3.2 MORPHOMETRIC ANALYSES

Multivariate analyses were performed using the software R 3.4.4 (R Core Team, 2019). To confirm the visually defined morphogroups and determine variables that discriminate among them, a Hill and Smith analysis (Hill & Smith, 1976) was performed with the function “*dudi.hillsmith*” using the package *ade4* version 1.7-15 (Chessel & al., 2004; Dray & al., 2007; Dray & Dufour, 2007). This analysis allows for mixed quantitative and qualitative variables. A PCA analysis was also conducted on the matrix including only quantitative variables. Data of both multivariate analyses were ordinated on a biplot using a principal component analysis (PCA).

Prior to the statistical difference testing, the Shapiro-Wilk Normality test (Royston, 1982) was executed to evaluate if each quantitative variable followed a normal distribution pattern. When the variable distribution followed a normal pattern, a one-way ANOVA (Chambers & Hastie, 1992; Sokal & Rohlf, 1995) was performed to verify if there were any significant differences between the identified morphogroups. Otherwise, when the variable did not follow a normal distribution pattern, the non-parametric Kruskal-Wallis test (Hollander & Wolfe, 1973) was performed to test if there were any differences between morphogroups. Afterward, when a character differed significantly among the groups, we performed multiple pairwise comparisons by means of the Fisher’s Least Significant Difference (LSD) (Fisher, 1935), available in the R package “*agricolae*” v.1-2 (F. de Mendiburu & M.F. de Mendiburu, 2019), to access means or medians that are significantly different. Significant variation was evaluated using the Student’s test with a Hochberg correction applied for alpha value adjustment. In order to show the variation of quantitative variables among the morphogroups, graphical representations of the six most discriminant quantitative variables were provided using boxplots.

III.1.3.4 PHYLOGENETIC ANALYSIS

III.1.3.4.1 TAXON SAMPLING

DNA material was obtained from fresh or silica-gel dried leaf tissues samples collected from plants grown and monitored by the authors in a shadehouse network established in Central Africa (see Stévant & al., 2010) and/or during field trips in Cameroon, Gabon, Guinea, Príncipe, Rwanda and São

Tomé. Where possible, at least two specimens from each of the morphogroups included in the morphometric analysis were chosen for the phylogenetic study. Additional sequences produced during previous studies and available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) were also used (Carlsward & al., 2006a,b; Simo-Droissart & al., 2018a; D'hajjere & al., 2019, Farminhão & al., 2020). Sixty-nine *Cyrtorchis* accessions representing 21 morphogroups including 15 described taxa (seven out of nine from the section *Homocolleticon* and eight out of ten from the section *Cyrtorchis*) and six potentially new taxa were sampled for DNA sequencing using one nuclear marker (nrITS-1) and five plastid markers (*matK*, *rps16*, *trnL-trnF intergenic spacer*, *trnC-petN intergenic spacer*, and *ycf1*) (**Appendix III-3**). Based on recent studies (Simo-Droissart & al., 2018a), four additional taxa namely: *Podangis dactyloceras* (Rchb.f.) Schltr., *Rangaeris longicaudata* (Rolfe) Summerh, *Rhipidoglossum rutilum* (Rchb.f.) Schltr and *Ypsilopus longifolius* (Kraenzl.) Summerh. were included as outgroup to test the monophyly of *Cyrtorchis* because they are sister to the genus. Vouchers of six of the samples collected in Rwanda and Cameroon are photographs (see **Appendix III-3**).

III.1.3.4.2 DNA PURIFICATION, PCR AMPLIFICATION, AND DNA SEQUENCING

The protocol adopted followed Simo-Droissart & al. (2013, 2016, 2018a), Verlynde & al. (2018), D'hajjère & al., (2019) and Farminhão & al., (2020). Overall, DNA was extracted from fresh or silica-gel dried samples using different methods for each type of leaf sample. For fresh material, 1 g of fresh leaves in a modified 2 × CTAB protocol (J.J. Doyle & J.L. Doyle, 1987) was used. Proteins were then removed with SEVAG (chloroform/isoamyl alcohol 24:1) and DNA was precipitated with ethanol (-20°C). Turbid or colored DNA extracts were purified on Macherey-Nagel columns at the end of extraction. For dried leaf material, an alternative method using 0.3 g of dried leaves was used with the NucleoSpin plant kit from Macherey–Nagel (Düren, Germany), following the manufacturer's protocol. The following primers were used for PCR amplification and DNA sequencing of six DNA region: (i) primers *trnL(UAA) 3' exon* and *trnF(GAA) gene* for the *trnL-trnF* intergenic spacer (Taberlet & al., 1991), (ii) primers *rps16-1F* and *rps16-2R* for the *rps16* intron (Oxelman & al., 1997), (iii) primers 19F (Molvray & al., 2000), 1326R (Cuénoud & al., 2002), 390F (Cuénoud & al., 2002) and *trnK-2R* (Johnson & Soltis, 1994) for *matK*, (iv) primers *trnC* and *petN-1R* for the *trnC-petN* intergenic spacer (Lee & Wen, 2003), (v) primers 3720F, *IntR*, *IntF*, and 5500R for *ycf1* (Neubig & al., 2009) and (vi) primers ITS-A and ITS-C for the nuclear marker nrITS-1 (Blattner, 1999). Only a short portion of the intergenic spacer namely the *trnL (UAA)3' exon* and the *trnF (GAA) gene* were amplified because the other portions especially the *trnL(UAA)5' exon* and *trnL (UAA) intron* have been difficult to amplify for several species of angraecoids including *Cyrtorchis* species.

PCR amplifications were performed in one of three thermocyclers (Eppendorf Mastercycler x 50s) using total volume of 25 µL comprising of the following, 1–2 µL of template genomic DNA extract (of

unquantified concentration), 0.025 U of Taq polymerase (Qiagen, Valencia, California, U.S.A.), 2.5 µL PCR buffer, 1mM MgCl₂, 0.2 µM dNTPs, 0.1 µM of each primer (10), and 18.375–19.375 µL of H₂O. The PCR amplification protocols used for the six DNA regions are detailed in Simo-Droissart & al. (2013). The amplified PCR products were then purified by enzymatic digestion using Exosap (Qiagen). The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., ABI, Lennik, Netherlands) was used to carry out the cycle sequencing in both directions with the same primer used for PCR amplification. The reaction mixture contained 1.5 µL of sequencing buffer, 1 µL of BigDye terminator with 0.2 µL of 10 µM primer, 1–3 µL of amplified product (of unquantified concentration), and 4.3–6.3 µL of H₂O for a total reaction volume of 10 µL. Cycle sequencing conditions were as follows: a premelt of 3 min (94°C), 30 cycles each with 30 s of denaturation (94°C), 30 s of annealing (52°C), and 1 min of elongation (72°C). Cycle sequencing products were cleaned by ethanol precipitation and sequences were then generated on an ABI 3100 following the manufacturer's protocols. Both strands were sequenced to assure accurate base calling. Complementary and overlapping sequence chromatograms were then imported into the software Geneious 9.1.7 (Drummond & al., 2012), automatically trimmed at both ends using a 5% chance error per base and assembled using the same software. These sequence chromatograms were manually inspected, examined and adjusted in Geneious for all incongruities and ambiguities. Multiple sequence alignments were performed automatically using MUSCLE 3.2 (Edgar, 2004) as implemented in Geneious, and then were visually checked and adjusted where necessary in the same software. The indels (insertion/deletion markers) were treated as missing data. The produced sequences were added to the 71 sequences previously published in earlier studies (Carlsward & al., 2006a,b; Simo-Droissart & al., 2018a, D'haijère & al., 2019; Farminhão & al., 2020) and available in GenBank with their species names updated in line with current taxonomic concepts

III.1.3.4.3 ANALYSES: MAXIMUM-LIKELIHOOD AND BAYESIAN ANALYSES

Phylogenetic analyses were performed using both the maximum-likelihood (ML) and the Bayesian inference (BI) frameworks to evaluate the phylogenetic relationships among sections and species. These analyses were conducted separately on a nuclear dataset based on the nrITS-1 marker, on a plastid dataset based on the combination of the five plastid loci (*matK*, *rps16*, *trnC-petN intergenic spacer*, *trnL-trnF intergenic spacer*, and *ycf1*) and on a combined dataset of nuclear and plastid concatenated datasets. The plastid and combined datasets were created using the software SequenceMatrix 1.8 (Vaidya & al., 2011) that assembles each individual plastid and/or nucleic region end to end. For taxa that had missing sequence regions, those partitions were coded as missing data in the concatenated matrices.

To select the best evolutionary model for each marker, we used PartitionFinder 2 on XSEDE (v2.1.1) (Lanfear & al., 2016) and a gamma distribution was used to model site heterogeneity. The closest

model recommended by PartitionFinder 2 available in CIPRES was the general time-reversible model of substitution with a gamma distribution (GTR+ Γ) used in subsequent analyses for both combined and plastid matrices in the phylogenetic software packages. For the nrITS-1 matrix, the closest recommended substitution model used was K80+ Γ . ML analyses were conducted in RAxML-HPC2 XSEDE version 8.2.10 (Stamatakis, 2014) implemented in the Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) Portal 2.0 (Miller & al., 2010). Phylogenetic trees were edited with the software FigTree version 1.4.3 (Rambaut, 2016). To assess support for clades, the bootstrap support (BS) values were calculated under the same model, applying the rapid bootstrap algorithm with 1000 pseudoreplicates (Felsenstein, 1985). BS values were considered poor (<50%), weak (50%–70%), moderate (>70%–85%), or strong (>85%) (Kress & al., 2002).

The BI analyses were performed using the software MrBayes v3.2.6 x86 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & al., 2012). Parallel analyses, with four independent Markov-chain Monte Carlo (MCMC) runs each, were conducted for 10 million generations, sampling trees every 1000 generations. The models available in MrBayes that were closest to those suggested by PartitionFinder 2 were K80+ Γ for nrITS-1, GTR+ Γ for both plastid dataset and the combined nuclear and plastid matrix. Then, a 50% majority-rule consensus tree was built from the 10000 sampled trees to estimate clade posterior probabilities using the function sumt in MrBayes. The first 25% of the sampled trees were discarded as burn-in fraction. The posterior probabilities (PP) were considered poor (<0.90), weak (0.90 to <0.95), moderate (0.95 to <0.98), and strong (≥ 0.98) (Erixon & al., 2003) and were generated from the post-burn-in sample.

III.1.3.4.4 MORPHOLOGICAL CHARACTER EVOLUTION

Six discrete characters from our morphological investigations were retained for the analysis of character evolution: (1) the viscidium structure; (2) the stipites shape; (3) the stipites apex shape; (4) lateral lobes of the rostellum shape; (5) insertion point of the stipites; and (6) ovary and fruit shape (suppl. **Appendix III-6**. Percentage of variance and cumulative percentage of variance explained by the two first axes and loading of variables on these two-principal components of PCA analysis with discrete characters on the 171 specimens of the genus *Cyrtorchis*. Values in bolds are the highest loadings of the principal component and those followed by the symbol * are the highest loadings of the principal component included in the scatter plots.

Variables	Principal component 1	Principal component 2	Principal component 3
Percentage of variance	61.884	9.968	4.801
Cumulative percentage of variance	61.88	71.85	76.65
LFL	-0.46	-0.58	0.45
LFW	-0.51	-0.58	-0.12
INL	-0.25	-0.91	-0.03

DTFL	-0.72	-0.44	-0.09
NFL	0.18	-0.84	0.02
BRL	-0.82	-0.01	-0.04
BRW	-0.80	0.03	0.12
FLL	-0.83	0.11	-0.41
DSL	-0.92	-0.02	-0.17
DSW	-0.91	0.13	0.22
LSL	-0.93	-0.03	-0.16
LSW	-0.83	0.04	0.29
LPL	-0.91	-0.05	-0.15
LPW	-0.88	0.09	0.23
LIL	-0.92	-0.02	-0.15
LIW	-0.84	0.16	0.20
SPL	-0.81	0.12	-0.42
SPW	-0.84	0.14	0.09
RSL	-0.79	-0.003	-0.19
POL	-0.91	0.16	0.01
ACL	-0.93	-0.01	-0.06
ACW	-0.65	0.13	0.32
GYL	-0.78	0.09	0.33
GYW	-0.82	0.15	0.20
VIL	-0.69	-0.07	-0.13
SIL	-0.85	0.03	-0.14

Appendix III-77). Ancestral state estimation was performed over the majority consensus tree derived from BI analyses using the maximum-likelihood character-state reconstruction to build the evolution of these characters in Mesquite version 3.51 (W. Maddison & D. Maddison, 2018) under the one parameter Markov k-state (MK1) model (Lewis, 2001). Reconstructions were made on supported nodes over an *a posteriori* distribution of 1000 post-burn-in trees randomly selected from the BI analysis and summarized on the majority consensus tree derived from BI analyses with one sample per species. *Rangaeris longicaudata* was used as the outgroup for the character reconstruction because it is the most closely related to the genus *Cyrtorchis* (Farminhão & al. 2020).

III.1.3.5 RESULTS

III.1.3.5.1 MORPHOGROUPS AND DISCRIMINANT CHARACTERS

A PCA Hill and Smith multivariate analysis (see example in Figure III-18) was used to assess 43 diagnostic characters to differentiate the morphological groups (**Appendix III-4**). The first four axes of the PCA ordination explained 53.96% of the total variance (see **Appendix III-5**) among the 171 specimens and 20 morphogroups included in the multivariate analysis. The variation along the first axis (32.01% of the total variance) greatly correlates with the highest positive and negative loadings for 12 qualitative (SPS.pendent, BRS.ovate, LSA.longacuminate, SPA.hooked, SPA.twisted, LFS.elliptic, LFCO.glaucous, LFCO.greygreen, LFTH.succulent, LFM.undulate, VITX.hyalinindurated, LLR.wide) and 4 quantitative characters (LSL, ACL, DSL and LIL) (see **Appendix III-5**). The second axis (8.70% of the total variance) has highest positive and negative loadings for 11 qualitative characters (LFA.notlobed, LFB.acicular, LFS.filiform, LFLS.acute, LSA.apiculate, LFS.broadlyelliptic, LIS.triangularovate, BRA.imbricate, SPA.curved, BRCP.yes, LFTH.notfleshy) and three quantitative characters (LFW, INL, and NFL) (see **Appendix III-5**). The third and fourth axes (7.37% and 5.88% of the total variance respectively) have the highest positive and negative loadings for 12 and 11 qualitative characters respectively (see **Appendix III-5**). The projection of the first two axes (explaining 40.71% of the total variation) shows five distinct groups of specimens (**Figure III-18**) including three that correspond respectively to the specimens assigned to the taxa *Cyrtorchis aschersonii* (Kraenzl.) Schltr., *C. henriquesiana* (Ridl.) Schltr. and *C. monteiroae* (Rchb.f.) Schltr. and two mixed groups corresponding to the taxa *C. crassifolia*, *C. guillaumetii*, *C. aff. guillaumetii* "Oku", *C. injoloensis* (De Wild.) Schltr., *C. praetermissa*, *C. aff. praetermissa*, *C. ringens*, *C. aff. ringens* sp1 and *C. submontana* Stévant & al. for the first mixed group and *C. acuminata* (Rolfe) Schltr., *C. arcuata*, *C. arcuata* subsp. *whytei* (Rolfe) Summerh., *C. chailluana* (Hook.f.) Schltr., *C. hamata* (Rolfe) Schltr., *C. letouzeyi* Szlach. & Olszewski and *C. neglecta* Summerh. for the second mixed group. The projection of the first and the third axes (39.38%, **suppl. Figure S2**) shows six groups including four distinct groups that correspond respectively to the specimens assigned to the taxa *C. aschersonii*, *C. crassifolia*, *C. henriquesiana*, and *C. monteiroae* and the other two mixed groups correspond to those previously revealed by the first two axes. The projection of the first and the fourth axis (37.89%, **suppl. Figure S2**) shows three defined groups of specimens corresponding to *C. crassifolia*, *C. letouzeyi* Szlach. & Olszewski and the remainings taxa forming a mixed group. The main discriminant variables for each of these species are the not lobed leaf apex (LFA.notlobed), the acicular leaf blade (LFB.acicular), and the imbricate bract arrangement (BRA.imbricate) for *C. henriquesiana*; the triangular lip ovate at the base (LIS.triangularovate), the apiculate lateral sepal apex (LSA.apiculate), and the subimbricate bract arrangement (BRA.subimbricate) for *C. aschersonii*; the grey-green leaf color (LFCO.greygreen) and elliptic leaf shape

projection of the first two axes (explaining 71.85% of the total variation) shows two distinct groups of specimens (**Figure III-19**) including one that corresponds to the specimens assigned to the species *C. injoloensis* and a mixed group of specimens corresponding to the remaining 19 morphogroups

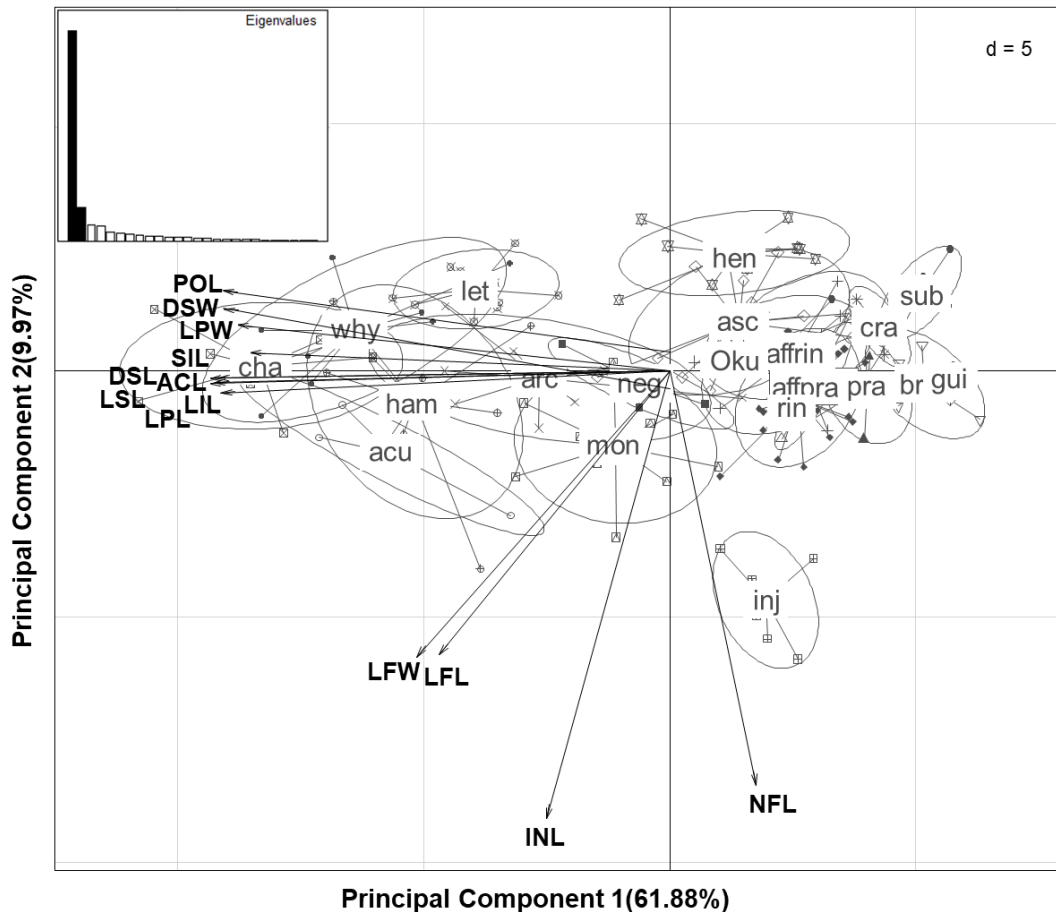


Figure III-19. Scatter plot of the first two axes of the extended principal component analysis using the Principal Component Analysis method based on 26 characters scored from 171 specimens representing 20 morphogroups of the genus *Cyrtorchis*: arc, *C. arcuata* subsp. *arcuata*; acu, *C. acuminata*; affpra, *C. aff. praetermissa*; affrin, *C. aff. ringens* sp1; asc, *C. aschersonii*; bro, *C. brownii*; cha, *C. chailluana*; cra, *C. crassifolia*; gui, *C. guillaumetii*; ham, *C. hamata*; hen, *C. henriquesiana*; inj, *C. injoloensis*; let, *C. letouzeyi*; mon, *C. monteiroae*; neg, *C. neglecta*; oku, *C. aff. guillaumetii* “Oku”; pra, *C. praetermissa*; rin, *C. ringens*; sub, *C. submontana*; why, *C. arcuata* subsp. *whytei*. Only the 13 variables showing the highest contribution to these two axes are represented. See Appendix III-2 for codes used for variables.

The pairwise multiple comparisons of mean and median obtained using the LSD tests showed that all the 26 quantitative variables studied differed significantly among the 12 groups of the *C.* sect. *Homocolleticon* and eight groups of *C.* sect. *Cyrtorchis*. The six most discriminant quantitative variables were used to represent these morphological variations among the morphogroups (**Figure III-20** & **Figure III-21**). In the section *Homocolleticon* (see **Figure III-21**), *C. monteiroae* differs from the other

species by its wider leaves (37 mm), longer rostellum (5 mm) and anther cap (4 mm) (**Figure III-21 a,c,e**) though there is a small overlap in the distribution of the leaf width and anther cap length with *C. injoloensis* and rostellum length with *C. henriquesiana*. However, *C. monteiroae* can be differentiated from these two species by the broadly elliptic spaced leaves with undulated margins. Unlike *C. monteiroae*, *C. henriquesiana* is characterized by its narrower leaves (3.7 mm) and shorter inflorescences (19 mm) (**Figure III-21 a,b**) though there is some overlap in this inflorescence distribution with *C. submontana*, it however discriminated from the latter by the acicular leaf blade and the imbricate bract arrangement. *C. injoloensis* presents the longest inflorescences (245 mm) and leaves (219 mm) whereas *C. crassifolia* the shortest leaves (34 mm) of the genus. These results also present clear separation between the two closely related morphogroup *C. praetermissa* and *C. aff. praetermissa* based on one of the most discriminant variables namely the bract length (3.5 vs 7.7 mm) (**Figure III-21 d**). Moreover, *C. guillaumetii* is also shown to be significantly differentiated from *C. aff. guillaumetii* "Oku" based on bract length (4.5 vs 9.4 mm) and anther cap length (1.5 vs 2.8 mm) (**Figure III-21 d,e**). Concerning the eight species of the *C. sect. Cyrtorchis*, *C. chailluana* is differentiated from the other species by its longer floral parts namely flower length (226 mm) and spur length (114 mm), (see **Figure III 21 a,b**). Unlike the later taxa, *C. aschersonii* and *C. neglecta* rather have the shortest floral parts for two out of the six most discriminant variables (lip length, and lateral sepal length (**Figure III 21 d, e**). *Cyrtorchis acuminata* is here differentiated from *C. arcuata* subsp. *arcuata* by lip length (25.6 vs 17.8) and the lateral sepal length (34.5 vs 24 mm) (**Figure III 21 d,e**) despite there is some overlap in the distribution of these features for both species and from *C. arcuata* subsp. *whytei* by the flower length (56 vs 81 mm) and spur length (47 vs 38 mm) (**Figure III 21 a,b**). The two subspecies of *C. arcuata* are differentiated by all the six most discriminant characters namely flower length (44 vs 81 mm), spur length (38 vs 68 mm), anther cap length (5 vs 6.7 mm), lip length (17.8 vs 27.5), lateral sepal length (24 vs 36.6 mm) and rostellum length (3.7 vs 9.2 mm). However, *C. neglecta* is not significantly different from *C. arcuata* subsp. *arcuata* based on this multiple comparison tests (**Figure III 21**).

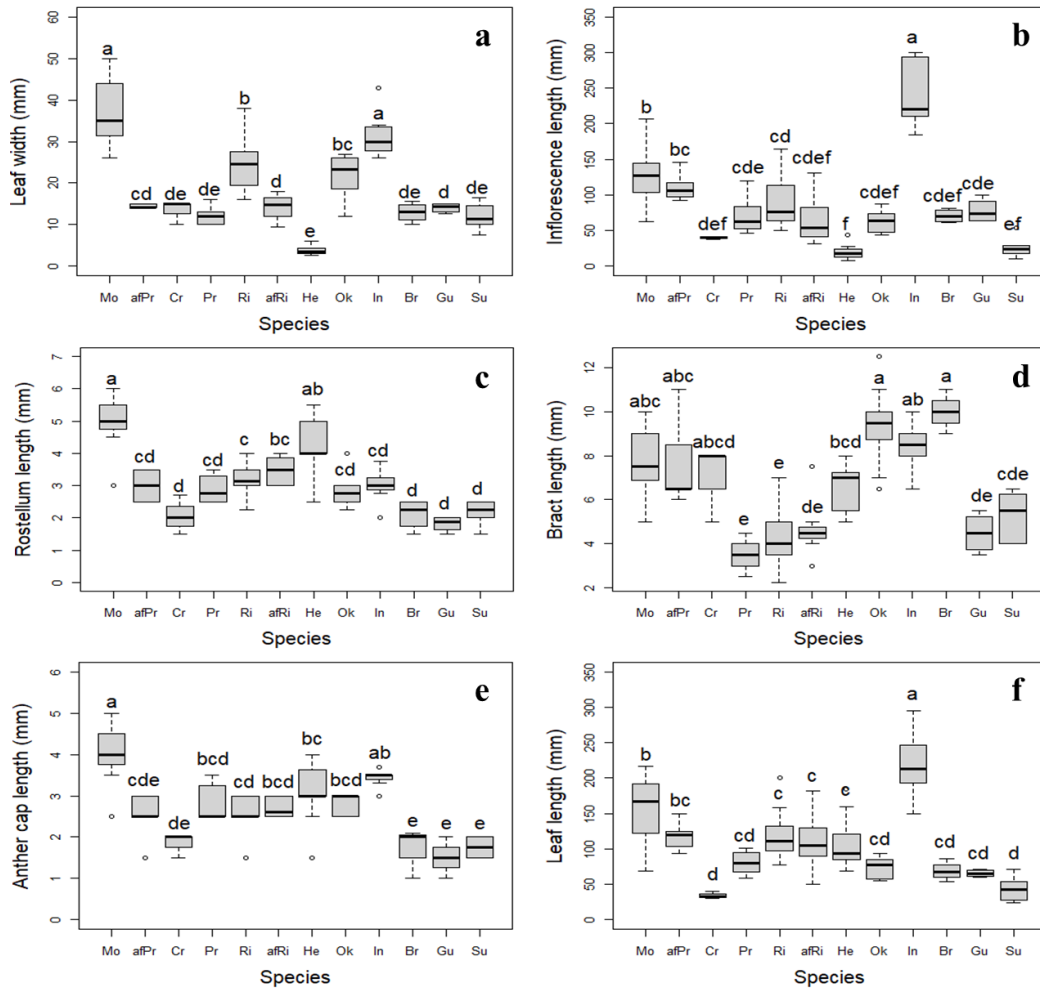


Figure III-20. Boxplot representing the variation ranges of the six most discriminant morphological characters among the 12 studied species of *Cyrtorchis* sect. *Homocolleticon*. **a**, Leaf width; **b**, Inflorescence length; **c**, Rostellum length; **d**, Bract length; **e**, Anther cap length; **f**, Leaf length; x axis: Mo, *C. monteiroae*; afPr, *C. aff. praetermissa*; Cr, *C. crassifolia*; Ri, *C. ringens*; afRi, *C. aff. ringens* sp1; He, *C. henriquesiana*; Pr, *C. praetermissa*; Ok, *C. aff. guillaumetii* "Oku"; In, *C. injoloensis*; Br, *C. brownii*; Gu, *C. guillaumetii*; Su, *C. submontana*. Boxes sharing at least one same letter means that species are not significantly different from each other.

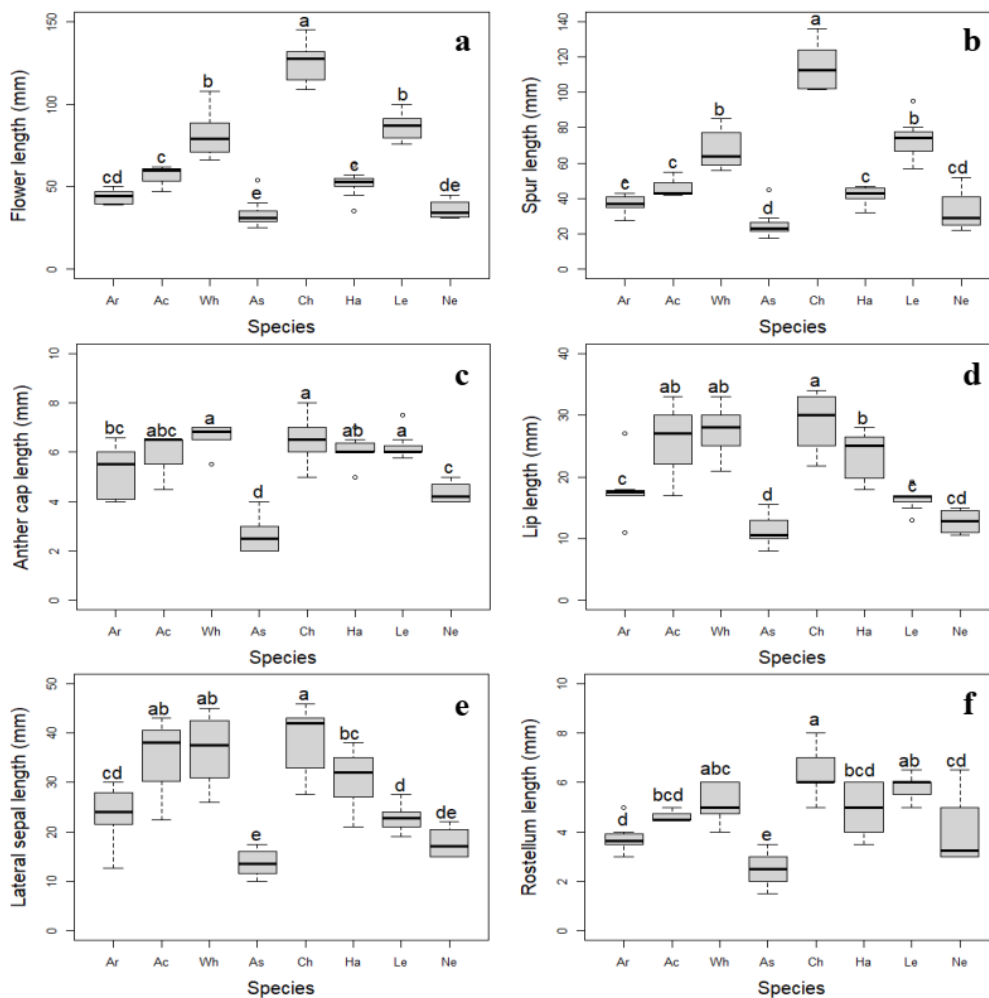


Figure III-21. Boxplot representing the variation ranges of the six most discriminant features among the eight studied species of *Cyrtorchis* sect. *Cyrtorchis*. a Flower length. b Spur length. c Anther cap length. d Lip length. e Lateral sepal length. f Rostellum length. Ar *C. arcuata* subsp. *arcuata*. Ac *C. acuminata*. Wh *C. arcuata* subsp. *whytei*. As *C. aschersonii*. Ch *C. chailluana*. Ha *C. hamata*. Le *C. letouzeyi*. Ne *C. neglecta*. Boxes sharing at least one same letter means that species are not significantly different from each other.

III.1.3.5.2 SECTIONS AND SPECIES DELIMITATION USING DNA SEQUENCES

For this study, a total of 339 sequences (279 new sequences and at least 60 sequences were downloaded from Genbank) from 73 accessions representing 25 taxa (15 described taxa and six potentially new taxa of the genus *Cyrtorchis* as well as the four species used as outgroups) were generated for the six markers examined (67 for nrITS-1, 45 for *matK*, 57 for *rps16*, 45 for *trnC-petN*, 63 for *trnL-trnF*, and 62 for *ycf1*). Only individuals with at least three out of the six markers were included in the combined dataset. The number of aligned characters in each of the six matrices with the number and percentage of identical sites for each of these markers is detailed in **Appendix III-8**. The plastid dataset included 72 accessions (representing 21 taxa) with 6178 aligned characters of which 1533 (24.8%) are identical sites. The combined dataset included 73 accessions (representing 21 taxa) with

an aligned length of 6558 characters for which 1205 (18.4%) are identical sites. Trees resulting from the combined and the plastid matrices (**Figure III-22**, suppl. Figure S3) were far better resolved and have more supported clades than the individual one inferred from nrITS-1 data matrix alone (suppl. **Figure S4**).

Trees resulting from the ML and BI analyses (for the nuclear, plastid and combined datasets; suppl. Figures S3, S4, **Figure III-22**, respectively) yielded congruent topologies and showed that by including the several additional species, the monophyly of the genus was still recovered with strong support values of PP 1 and BS 83 in plastid PP 1 and BS 100 and in combined analyses (suppl. Figure S3, **Figure III-22**) and of PP 0.99 and BS 91 in the nuclear analyses with nrITS-1 alone (suppl. Figure S4). However, these analyses did not recover the two sections as distinct but instead a single clade that contains all species belonging to *C. sect. Cyrtorchis* (8 taxa) with relatively strong support of PP 1/BS 85 (plastid) and strong/moderate support of PP 0.99/BS 80 (combined) , and several independent lineages belonging to *C. sect. Homocolleticon*. This *C. sect. Cyrtorchis* clade is found in a polytomy with *C. monteiroae* and *C. crassifolia* (because it is only weakly supported by the BI and not resolved by the ML analyses) as well as with all the other species of *C. sect. Homocolleticon*. Moreover, there is no clear phylogenetic relationship between the seven species of *C. sect. Cyrtorchis* since they do not form well-resolved clades. Concerning *C. sect. Homocolleticon*, six clades with strong support resulting from the combined and plastid analyses were recovered: clade A, including *C. injoloensis*, *C. aff. aschersonii* and *C. aff. ringens* sp2 with support values of PP 1/BS 72 (plastid) and PP 1/BS 85 (combined); clade B, containing specimens of *C. aff. ringens* sp3, with support values of PP 1/BS 99 (plastid) and PP 1/BS 100 (combined); clade C, including *C. ringens*, *C. aff. ringens* sp1 and *C. aff. guillaumetii* "Oku", with support values of BS 0.8 (plastid; no support from BI) and PP 1/BS 90 (combined); clade D, including *C. henriquesiana*, is well resolved with support values of PP 1/BS 99 (plastid and combined); clade E, including *C. praetermissa* and *C. aff. praetermissa*, with support values of PP 0.91/BS - (plastid) and PP 1/BS 88 (combined); and clade F, including *C. monteiroae*, which is only moderately/weakly supported with PP 0.95/BS 63 in the plastid analyses but strongly/moderately supported with PP 1/BS 73 in the combined analyses. *Cyrtorchis monteiroae* is found associated with *C. crassifolia* but the clade is not supported in the plastid analyses with PP 0.7/BS 27 and moderately supported/unsupported with PP 0.97 and BS 45 in the combined analyses. Additionally, *C. brownii* was found in a clade with *C. henriquesiana* specimens; that clade received strong support from BI (PP 0.99) and moderate support from ML (BS 66) in the plastid analyses but was not found in the combined analyses. Under clade C, three strongly supported clades C1, C2, and C3 were recognized, including specimens of *C. aff. ringens* sp1 (plastid: PP 1/BS 95; combined: PP 1/BS 96), *C. ringens* (plastid: PP 1/BS 89; combined: PP 1/BS 94) and *C. aff. guillaumetii* "Oku" (plastid: PP 1/BS 88; combined: PP 1/BS 100), respectively.

Within *C. sect. Cyrtorchis*, only clade G, containing all specimens of *C. aschersonii*, is well supported with PP 1/ BS 96 (plastid) and PP 1/ BS 98 (combined). Otherwise, the monophyly of the other seven taxa (*C. acuminata*, *C. arcuata* subsp. *arcuata*, *C. arcuata* subsp. *whytei*, *C. chailluana*, *C. hamata*, *C. letouzeyi*, and *C. neglecta*) and relationships between them were not recovered. Most relationships among the clades were similar in both plastid and combined analyses, although the trees from the individual markers were less resolved. Analyses performed with the nuclear dataset yielded only two clades (B, D) and two subclades (C1+C2, C3) corresponding to identified species. Clade C received only weak support from BI (PP 0.69) and moderate support from ML (BS 74). This clade contains two well-supported subclades: clade C1+C2 representing specimens of *C. ringens* and *C. aff. ringens* sp1 with strong support of PP 0.82/BS 91 and clade C3 representing *C. aff. guillaumetii* "Oku" with strong support from ML (BS 91) and weak support from BI (PP 0.94). Clade B represents *C. aff. ringens* sp3 with strong support of PP 1/BS 99, and clade D represents *C. henriquesiana* with strong support of PP 0.97/BS 98 (all of them belonging to *C. sect. Homocolleticon*). Clades A, E, and F were not recovered with the nuclear dataset alone.

Overall, this study recognizes 8 taxa as monophyletic (5 published species and three new taxa) (**Tableau III-2**).

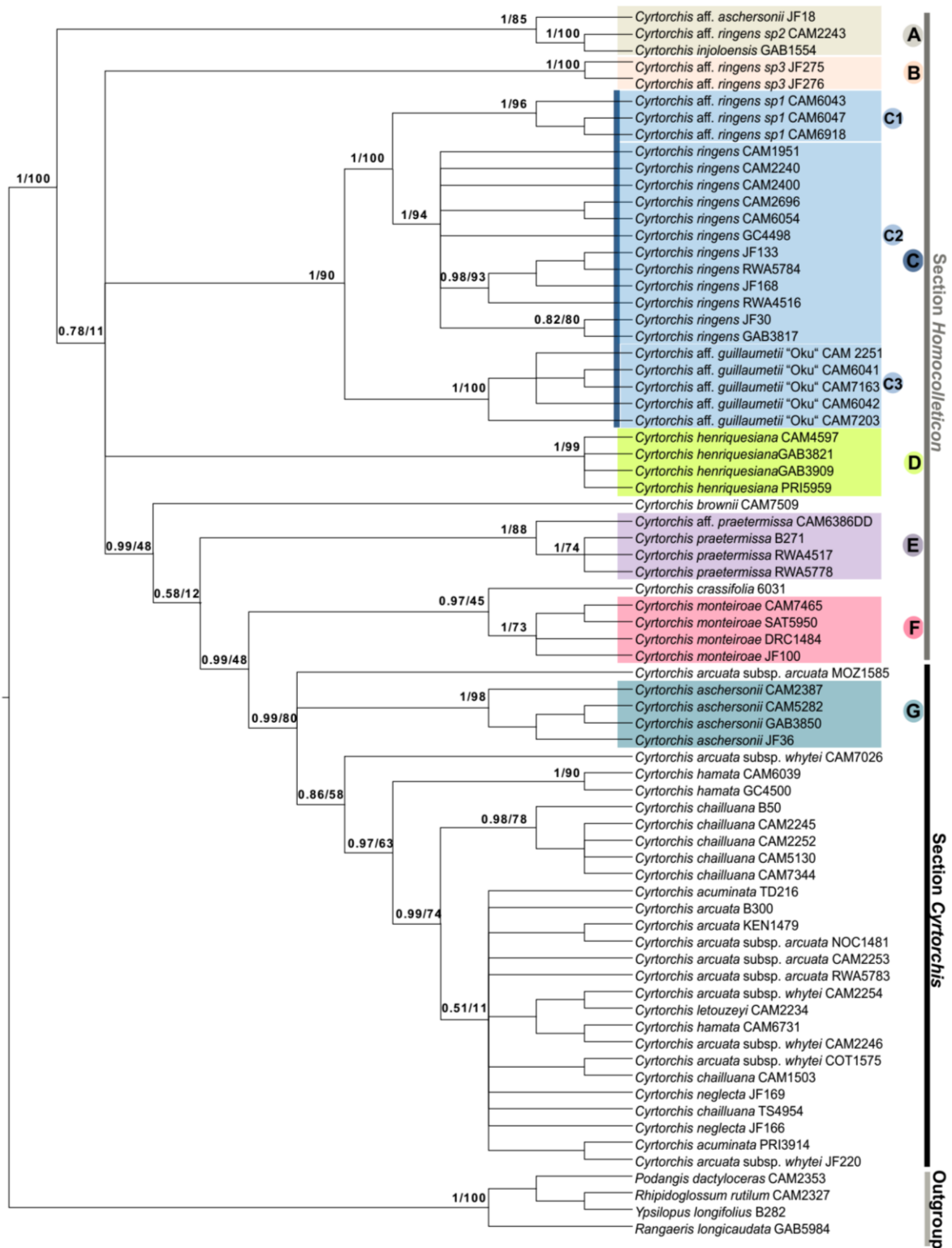


Figure III-22. Phylogenetic relationships of the genus *Cyrtorchis* produced by the Bayesian inference of the combined nuclear (*nrITS-1*) and plastid (*matK*, *rps16*, *trnC-petN*, *trnL-trnF*, *ycf1*) regions (73 accessions, 21 taxa, 6558 characters). Posterior probabilities (PP) and bootstrap values (BS) from maximum likelihood analyses are indicated above the branches. The well-resolved clades from trees resulting from both analyses are here renamed with letters

III.1.3.5.3 MORPHOLOGICAL CHARACTER EVOLUTION

Plesiomorphic and apomorphic features support the phylogenetic relationships observed in the genus (**Figure III-23**). The insertion points of the stipites at the rear third of the length of the viscidium was reconstructed as the ancestral character state of the genus *Cyrtorchis* and may constitute a synapomorphy supporting the monophyly of the genus distinguishing it from *Rangaeris longicaudata* which rather has stipites inserted halfway along the length of the viscidium (**Figure III-24A, Figure III-25B-D**). The triquetrous ovary with three ribbed side can be inferred as an ancestral state for the genus *Cyrtorchis* based on the results observed in our analyses (**Figure III-24 B, Figure III-25 F**). The uniformly linear viscidium with hyaline texture was inferred as the ancestral character state for the genus *Cyrtorchis* and symplesiomorphic for *Rangaeris longicaudata*, where it is symplesiomorphic; it is shared by all the members of the paraphyletic section *Homocolleticon* (**Figure III-24E, 24 D**). Three character states were reconstructed as ancestral states supporting the monophyly of the section *Cyrtorchis*: (a) the triquetrous ovary and fruit with three smooth sides, (b) the broad indurated upper part with thin hyaline lower part of the viscidium and (c) the lateral lobes of the rostellum widened just above the narrow base (**Figures III-23 B,E,F, 24 B, 25 B,E**). Stipites enlarged towards the apex and the bilobed stipites apices are inferred to be derived character states (synapomorphies) of the section *Cyrtorchis*. (**Figures III-23 C,D, 24 B**). This character state was similarly found to be an autapomorphy in *C. monteiroae* (of the section *Homocolleticon*). However, stipites thinner towards the apex and the not widened almost parallel lateral lobes of the rostellum were reconstructed as ancestral character states for all the other species of section *Homocolleticon*. Moreover, the entire asymmetric acute apex of stipites is inferred to be ancestral state in the clade containing *C. aff. ringens* sp1, *C. ringens*, and *C. aff. guillaumetii* "Oku" (**Figure III-23D, Figure III-24D**). Other morphological character states seem to have evolved independently in some taxa namely the entire asymmetric acute apex of stipites inferred as ancestral state, representing homoplasies in *C. aff. aschersonii*, *C. aff. ringens* sp2, *C. aff. ringens* sp3, *C. brownii* and *C. henriquesiana* (**Figure III-23D, Figure III-24E**); and the entire symmetric obtuse apex of stipites reconstructed as ancestral character state in *C. crassifolia* and in the clade formed by *C. aff. praetermissa* and *C. praetermissa* (**Figure III-23D, Figure III-24F**). Besides, the triquetrous ovary and fruit shape with three ribbed sides are homoplastic in *C. aff. ringens* sp2, *C. injoloensis*, *C. henriquesiana*, *C. praetermissa*, *C. aff. praetermissa*, *C. crassifolia* and *C. monteiroae* (**Figure III-23B, Figure III-25F**).

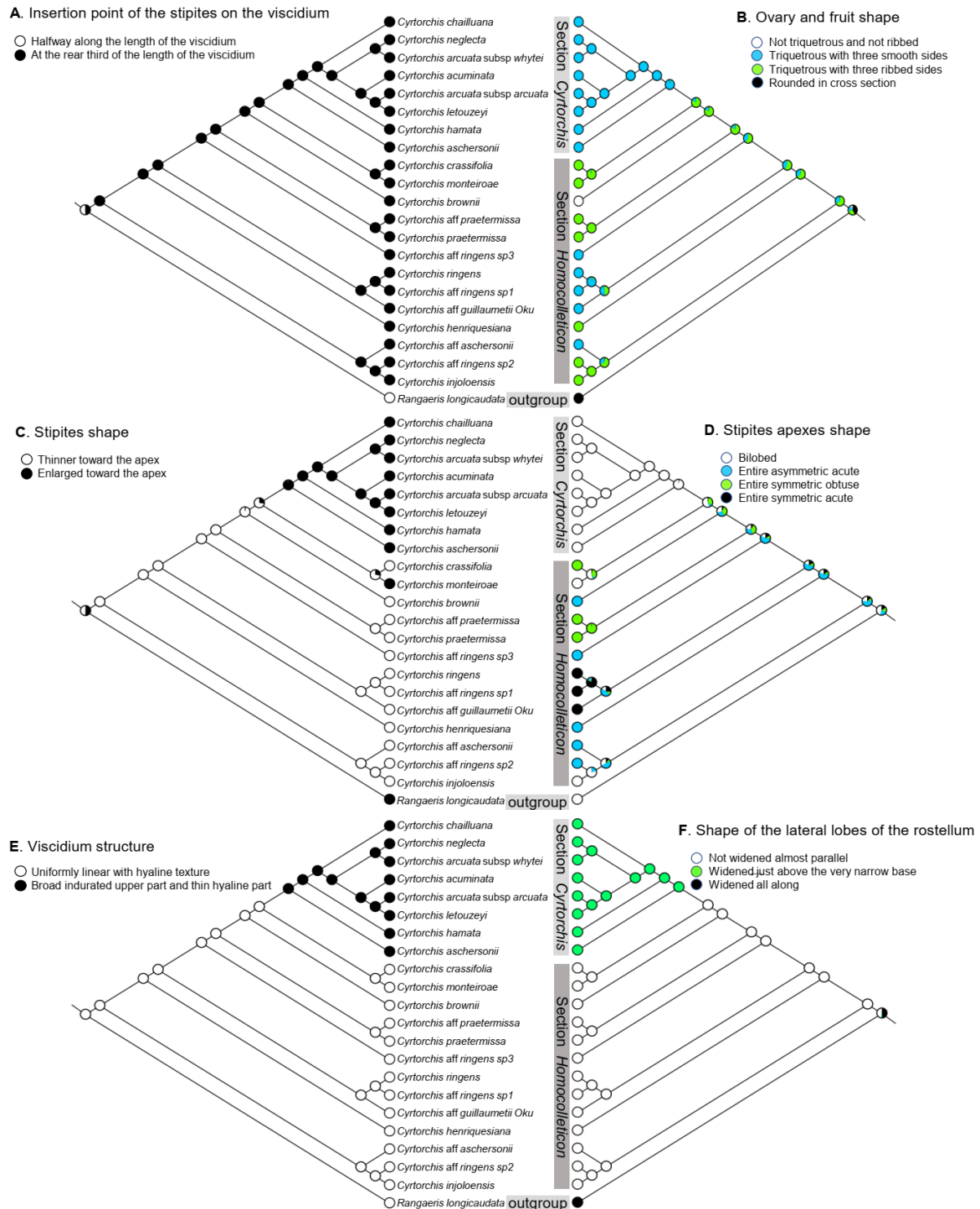


Figure III-23. Ancestral character evolution in the genus *Cyrtorchis* based on the Bayesian consensus tree inferred by maximum likelihood ancestral-state reconstruction. Node and tip colors are explained on the associated legends. A, Insertion point of the stipites on the viscidium; B, Ovary and fruit shape; C, Stipites shape; D, Stipites apex shape; E, Viscidium structure; F, Shape of the lateral lobes of the rostellum.

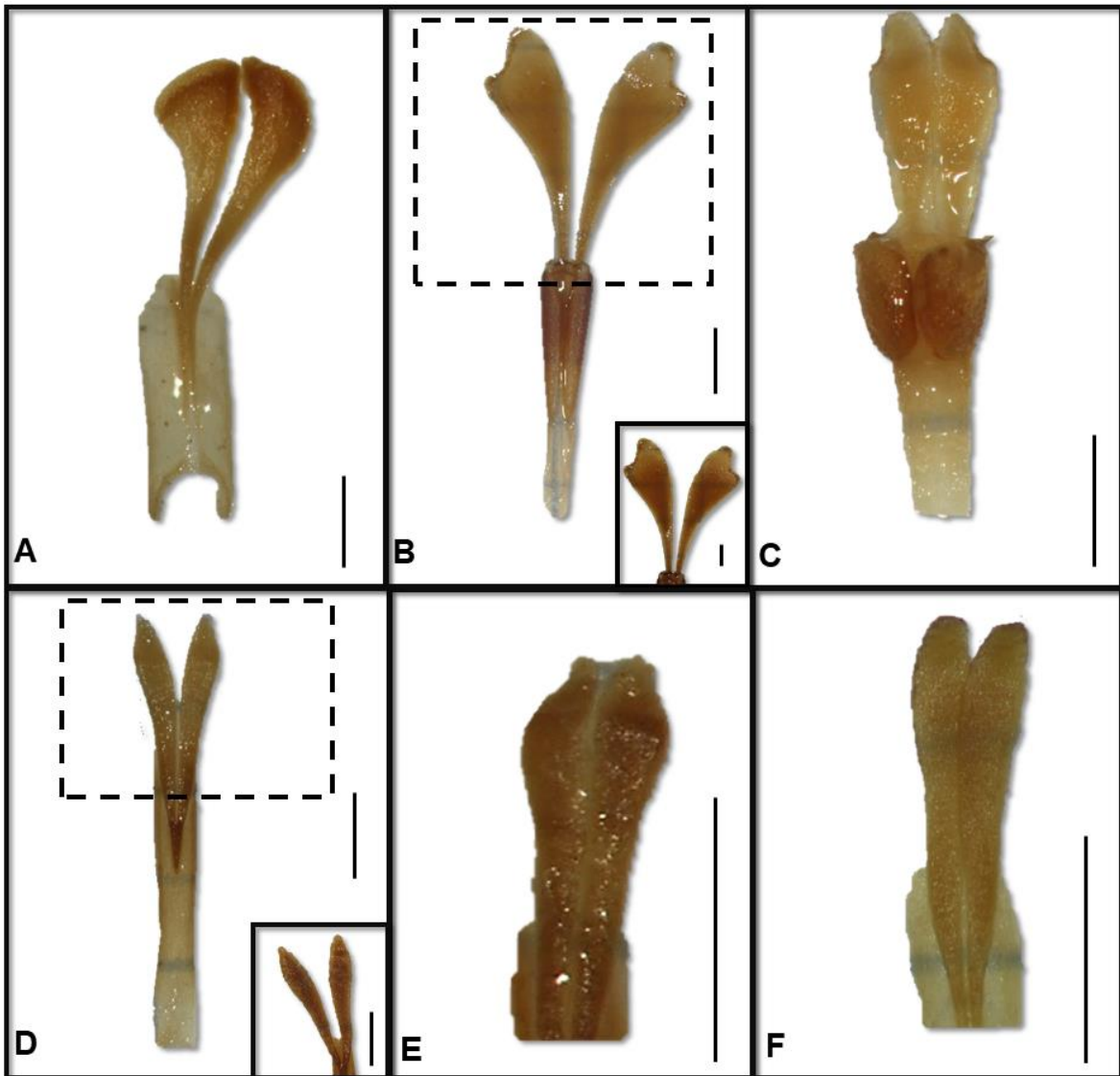


Figure III-24. Variability of the viscidium structure in the genus *Cyrtorchis* and *Rangaeris longicaudata*. A, Viscidium structure in *Rangaeris longicaudata* showing the enlarged apices of the stipites and the uniformly hyaline texture of the viscidium; B, Viscidium structure in *C.* sect. *Cyrtorchis*; C, Viscidium structure in *C. aschersonii*; D, Viscidium structure in *C.* sect. *Homocolleticon*; E, Narrow stipites apices of *C. henriquesiana* with entire asymmetric acute apices; F, Narrow stipites apices of *C. praetermissa* with entire symmetric obtuse apices. — Scale bars: A–F = 1 mm.

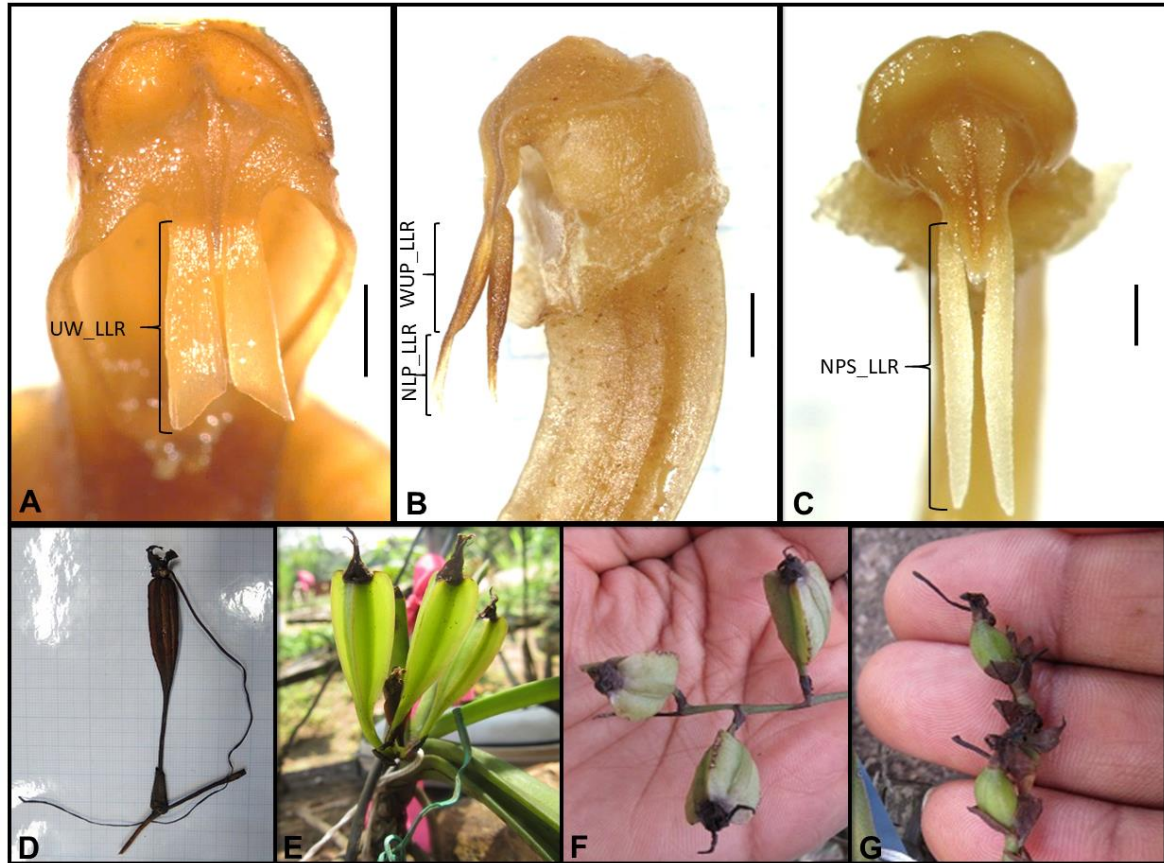


Figure III-25. Variability of the rostellum structure and ovary and fruit shape in the genus *Cyrtorchis* and *Rangaeris longicaudata*. A, Face view of *R. longicaudata*, a column showing the uniformly widened lateral lobes of the rostellum (UW_LLRL); B, Side view of the *C. hamata* column showing the lateral lobes of the rostellum widened just above a narrow base (WUP_LLRL = widened upper part of the lateral lobes of the rostellum; NLP_LLRL = narrow lower part of the lateral lobes of the rostellum) characterizing *C. sect. Cyrtorchis*; C, Face view of the column of *C. henriquesiana* showing the narrowed almost parallel-sided lateral lobes of the rostellum (NPS_LLRL) characterizing the *C. sect. Homocolleticon*; D, Ovary and fruits of *Rangaeris longicaudata* in side view; E, Triquetrous fruits of *C. aschersonii* with three smooth sides; F, Triquetrous fruits of *C. monteiroae* with three ribbed sides; G, The not-ribbed and not-triquetrous ovary and fruits of *C. brownii*. — Scale bars: A–C = 1 mm. A by João Farminhão, D by Tariq Stévant and the others by Laura Azandi.

III.1.3.6 DISCUSSION

III.1.3.6.1 MONOPHYLY AND STATUS OF THE SECTIONS WITHIN THE GENUS *CYRTOCHIS*

A much more comprehensive phylogenetic study including more *Cyrtorchis* species (21 morphospecies) was conducted to test the monophyly of the two sections *C. sect. Cyrtorchis* and *C. sect. Homocolleticon* and their related taxa. By including a much more comprehensive sampling, including 15 described species, the monophyly of the genus was here recovered. Morphological analyses support the delimitation of the two sections, based on features of reproductive floral parts (specifically the structure of the viscidium and the rostellum) as originally proposed by Summerhayes (1960). However, molecular phylogenetic analyses (**Figure III-22**) placed all members of the section *Cyrtorchis* in a well-supported clade whereas the *C. sect. Homocolleticon* was found to be paraphyletic. Since the section *Homocolleticon* is not monophyletic, the generic rank of this section published by Szlachetko & Olszewski (2001) and Szlachetko (2003) cannot be accepted. Indeed, species of both sections are morphologically very close in their floral features (ivory white, generally stellate recurved perianth parts and a lip passing gradually into a long curving and tapering spur). Yet, the section *Homocolleticon* as currently define deserves an accurate attention that may allow new sections to be proposed in order to clarify the taxonomy within the genus. The sectional delimitation proposed by Summerhayes (1960) could not be accepted but we need to reassess it by including all the species of the genus. As a consequence, we cannot conclude at this stage and we can't propose a new sectional delimitation. Also, features considered as mandatory for recognizing a genus are monophyly s.str. (e.g. Chase, 1999; Potter & Freudenstein, 2005), monophyly/paraphyly (e.g. Sosef, 1997; Hörandl & Stuessy, 2010) or monophyly combined with low post-zygotic isolation between species (Scopece & al., 2010), thus a more robust generic/infrageneric classification system with more resolved clade is required. Therefore, studies using new techniques such as Next Generation Sequencing (NGS) that samples the whole plastid genome rather than a small number of loci are necessary to clearly assess these sections (Scarcelli & al., 2016).

III.1.3.6.2 SPECIES DELIMITATION AND TAXONOMIC RANK

Both ML and BI analyses based on the combined dataset favor the recognition of six clades within the section *Homocolleticon* (**Figure III-22**; clade A-F) and one within the section *Cyrtorchis* (**Figure III-22**, suppl. **Figure S3**; clade G). Eight morphologically defined species hypotheses, namely *C. aff. ringens* sp1, *C. aff. ringens* sp3, *C. aff. guillaumetii* "Oku", *C. ringens*, *C. henriquesiana*, *C. monteiroae*, *C. praetermissa* for *C. sect. Homocolleticon* and *C. aschersonii* for *C. sect. Cyrtorchis*, were well supported in the molecular analyses, and discriminant features were identified with the morphometric analyses (**Appendix III-4**).

Within species traditionally placed in section *Homocolleticon*, the relatively short pedicel-ovary with dorso-ventrally flattened pollinia and the acute apex of perianth parts can be recognised as synapomorphies of clade A (**Tableau III-2**). *C. aff. aschersonii* (clade A) is vegetatively closer to *C. aschersonii* (clade G) than to *C. injoloensis* (clade A) by having an erect stem and fleshy linear leaves although the flowers are almost similar to the latter. *C. aff. aschersonii* could, therefore, be seen a possible product of hybridization between these two species, both occurring in Gabon. However, *C. aff. aschersonii* is only known from one collection from Gabon and was not included in our morphometric analyses, therefore, new gatherings will be needed to clarify the taxonomic status of this entity. Both *C. injoloensis* and *Cyrtorchis aff. ringens* sp2 belong to clade A, but this latter is characterized by its relatively shorter elliptic and coriaceous leaves with relatively shorter inflorescences. (see **Appendix III-4**).

C. aff. ringens sp3 (Clade B), represents a potential new species and was initially identified as *C. ringens* by Fischer & al. (2010). However, based on our visual inspection and the Fischer & al. (2010) treatment, this species is morphologically different from the former by having spaced linear leaves with wrinkled surface and dense inflorescence of 4–7 cm long with 5–8 flowers although the aspect of the flowers is quite similar in the two species. Besides, *C. aff. ringens* sp3 occurs in montane rainforest at about 1,800–2,100 m elevation in Rwanda unlike *C. ringens* which is widespread in tropical African forest between sea level–1,600 m elevation. This taxon will be described elsewhere.

Some specimens belonging to *C. aff. ringens* sp1 (clade C1) were found to be similar to *C. ringens* in general appearance but have leaves that clearly differ in shape (linear leaves of 0.9–1.8 cm wide) and short few-flowered inflorescences. This reduced size of leaves could be an adaptation to the more humid, mountainous habitat. This entity forms a well-supported clade sister to the specimens of *C. ringens* (**Figure III-22**, suppl. Figure S3, clade C1) and thus appears to represent a new entity best recognized at the subspecies level that will soon be described. Within clade C, another set of distinct specimens identified during the morphological investigation was confirmed by the molecular results as representing a new entity here referred to as *C. aff. guillaumetii* “Oku”. *Cyrtorchis aff. guillaumetii* “Oku” is very close to *Cyrtorchis guillaumetii* (Perez-Vera) R. Rice but the inflorescence is not loose at its base but has rather flowers distributed all along the inflorescence with broadly-ovate bracts and spur rounded at the apex. It is also close to *Cyrtorchis submontana* but differs by having longer and larger leaves (4.6–9.4 × 1.4–2.7 cm vs 2.7–5.3 × 0.7–1.6 cm), longer inflorescences up to 10 cm long (vs 5.3) usually densely flowered (vs fewer flowered). This taxon thus appears to represent a new entity best recognized at the species level (**Tableau III-2**) which is being described in a separate paper.

Within section *Cyrtorchis*, a group of seven taxa form an unresolved complex. However, the morphometric results confirm that some species are morphologically distinct with clear discriminant

characters (**Tableau III-2**), particularly within the *C. arcuata* complex despite the fact that we noticed overlap in some characters (**Figure III-21**). Within this section, species are mostly distinguished by one or two characters, and species between them can only be distinguished by very few features. *Cyrtorchis arcuata* subsp. *arcuata* can be differentiated from the *C. arcuata* subsp. *whytei* by the shorter straight or incurved spur versus the longer sigmoid spur in *C. arcuata* subsp. *whytei*. *Cyrtorchis acuminata* which was formerly synonymised under *C. arcuata* subsp. *arcuata* due to their morphological resemblance (Azandi & al. 2016) is here differentiated. The morphometric results revealed that this taxon is morphologically delineated from *C. arcuata* subsp. *arcuata* by its longer lip and lateral sepals and from *C. subsp. whytei* by its smaller flowers with shorter spur (**Tableau III-2**). Based on these new results, the taxonomic status of *C. acuminata* needs to be revised. *Cyrtorchis hamata* is also morphologically different by its short spur with hooked apex and the leaves that narrow towards the apex. *Cyrtorchis neglecta* is vegetatively very close to *C. aschersonii* but it is most similar to *C. arcuata* subsp. *arcuata* based on the morphology of the gynostemium (*viz.* viscidium structure, stipites apex). Compared to the later, *C. neglecta* exhibits triangular lip and more-acuminate perianth parts (see **Tableau III-2, Appendix III-4**).

This incongruence between the morphological and molecular results may be partly explained by the lack of phylogenetic resolution of the genetic markers used in the analyses especially within the section *Cyrtorchis*. Moreover, the phylogenetic results are mainly based on plastid markers (five markers) deriving from a single non-recombining genome, that is known to evolve more slowly than the nuclear genome (Wolfe & al., 1987; Rousseau-Gueutin & al., 2018). Another plausible explanation is that the potential hybridization could have driven to plastid genome exchange as many of them share the same habitats and distributional range (Azandi & al., 2016).

Tableau III-2. Comparison of key morphological characters distinguishing the 27 species and morphogroups of *Cyrtorchis*. Character states in bold are the most discriminant one. Clade column: indicates clade in the phylogenetic trees (**Figure III-22**, Figures S3 & S4,); M column: X indicates taxa that were resolved with morphometric analyses; taxa names followed by a * are new taxa to be described.

Taxa	Clade	M	Clade characteristic features	Leaves (1); Inflorescence (2); Flower (3); Bract (4); Pedicel-ovary (5); Lip (6); Lateral sepal (7); Spur (8); Rostellum (9); Anther cap (10)
<i>Cyrtorchis</i> sect. <i>Homocolleticon</i>				
<i>Cyrtorchis</i> sp. B* (aff. <i>aschersonii</i>)	A			1- Fleshy linear 4- Broadly ovate, longer than the pedicel 5- Shorter than the bract, 9 mm long
<i>Cyrtorchis</i> sp. D* (aff. <i>ringens</i> sp2)	A		- Short pedicel-ovary, pollinia dorso-ventrally flattened - Acute apex of perianth parts	1- Elliptic to narrowly elliptic 2- Loose at the base 4- Spaced, depressed ovate bract longer than the pedicel
<i>Cyrtorchis injoloensis</i> (De Wild.) Schltr.	A	X		1- Not fleshy (15–40 cm long), obtuse lobe apex 2- Longest (18.5–30 cm), densely flowered (15–20-flowered) 4- Imbricate, longer than the pedicel 5- Similar length or shorter than the bract (7–9.5 mm long)
<i>Cyrtorchis</i> sp. E* (aff. <i>ringens</i> sp3)	B		- Linear leaves with wrinkled surface - Triquetrous ovary and fruit with three smooth sides	1- Spaced, linear with wrinkled surface
<i>Cyrtorchis</i> sp. C* (aff. <i>ringens</i> sp1)	C (C1)			1- Linear, 0.9–1.8 cm wide 2- Short (3–13 cm long), few-flowered
<i>Cyrtorchis ringens</i> (Rchb.f.) Summerh.	C (C2)		- Triquetrous ovary and fruit with three smooth sides - Acute stipites apices pointing toward the middle side	1- Ligulate or narrowly elliptic, coriaceous equally bilobed at apex 2- Dense, up to 21-flowered 4- Depressed ovate, shorter than the pedicel
<i>Cyrtorchis</i> sp. A* (aff. <i>guillaumetii</i> "Oku")	C (C3)	X		1- Narrowly elliptic 4.6–9.4 × 1.4–2.7 cm 4- Broadly ovate (6.5–12.5 mm long) 9- 2.5–4 mm long 10- 2.5–3 mm long, obovate, extended forwards
<i>Cyrtorchis henriquesiana</i> (Ridl.) Schltr.	D	X	- Triquetrous ovary and fruit with three ribbed sides	1- Filiform and acicular, not lobed at the apex 2- Short, 0.8–4.3 cm long 3- Imbricate

Taxa	Clade	M	Clade characteristic features	Leaves (1); Inflorescence (2); Flower (3); Bract (4); Pedicel-ovary (5); Lip (6); Lateral sepal (7); Spur (8); Rostellum (9); Anther cap (10)
				6- Triangular with acute apex 7- Triangular with acute apex
<i>Cyrtorchis brownii</i> (Rolfe) Schltr.			- Ovary and fruit rounded in cross section with smooth surface	2- Very dense with up to 14-flowered 3- Imbricate or overlapping, broadly ovate, almost covering half of the flower 7- Linearly shaped sepals
<i>Cyrtorchis</i> sp. F* (aff. <i>praetermissa</i>)	E		- Linear fleshy conduplicate leaves - Ovary and fruit triquetrous with three ribbed sides	2- Up to 14.6 cm long 4- Very broadly ovate (4–11 mm long) 8- Globulous apex rarely rounded
<i>Cyrtorchis praetermissa</i> Summerh. subsp. <i>praetermissa</i>	E		- Obtuse apexes of stipites pointing towards the middle side	1- Linear fleshy, conduplicate and stiff in texture 2- Shorter, 5.2–12 cm long 3- Small, depressed ovate (2.5–5 mm long) 8- Slender to rounded apex
<i>Cyrtorchis crassifolia</i> Schltr.		X	- Stipites thinner towards the apex - Obtuse apexes pointing towards the middle side	1- Grey-green, conduplicate, short (30–40 mm) and succulent 4- Small white bracts
<i>Cyrtorchis monteiroae</i> (Rchb.f.) Schltr.	F	X	- Stipites enlarged toward the apex - Obtuse apexes pointing toward the inner side - Triquetrous ovary and fruit with three ribbed sides	1- Spaced, non-fleshy, broadly elliptic or oblanceolate of 2.6–5 cm wide, undulate margins 2- Long, spaced inflorescences (6.2–5 cm) 9- Long, 3–6 mm 10- Long, 2.5–5 mm
<i>Cyrtorchis praetermissa</i> subsp. <i>zuluensis</i> (E.R.Harrison) H.P.Linder				1- Flattened, narrowly elliptic
<i>Cyrtorchis submontana</i> Stévant & al.				1- Elliptic 2- Shorter, 1–5.3 cm long 3- Few-flowered (1–5)
<i>Cyrtorchis guillaumetii</i> (Pérez-Vera) R.Rice				1- 1.2–1.8 cm wide 2- Loose at the base and densely flowered near the apex 4- Depressed ovate (3.5–5.5 mm long) 9- 1.5–2 mm long 10- Up to 1.5 mm long, often orbicular, little or not extended forwards

Taxa	Clade	M	Clade characteristic features	Leaves (1); Inflorescence (2); Flower (3); Bract (4); Pedicel-ovary (5); Lip (6); Lateral sepal (7); Spur (8); Rostellum (9); Anther cap (10)
<i>Cyrtorchis</i> sect. <i>Cyrtorchis</i>				
<i>Cyrtorchis aschersonii</i> (Kraenzl.) Schltr.	G	X	<ul style="list-style-type: none"> - Viscidium with a broad indurated upper part and a thin hyaline lower part (the indurated part is shorter and broader) - Triquetrous ovary and fruit with three smooth sides - Obtuse stipites apices pointing toward the inner side - Lateral lobes of the rostellum widened just above the very narrow base 	<ul style="list-style-type: none"> 1- Fleshy, imbricate, linear and conduplicate 3- 2.6–5.4 cm 4- Subimbricate and large (5.5–17 × 8–17 mm) 6- Triangular ovate at the base, 0.8–1.5 cm long 7- 1–1.7 cm long, apiculate at the apex 8- Short, 1.7–4.5 cm long
<i>Cyrtorchis arcuata</i> (Lindl.) Schltr. subsp. <i>arcuata</i>				<ul style="list-style-type: none"> 1- Oblong, 2.1–3 cm wide 3- Ranging from 3.3 to 5.3 cm long 7- 1.7–3.7 cm long 8- Straight or incurved, 2.8–5.7 cm long 9- 3–5 mm long 10- 3.5–6.6 mm long
<i>Cyrtorchis arcuata</i> subsp. <i>whytei</i> (Rolfe) Summerh.				<ul style="list-style-type: none"> 1- Thinner, almost linear-shaped (1.6–3.3 cm wide) 3- Ranging from 6.6 to 10.8 cm long 7- 2.7–5 cm long 8- Sigmoid, 5.6–8.5 cm long 9- 4–6 mm long 10- 5.5–7 mm long
<i>Cyrtorchis acuminata</i> (Rolfe) Schltr.				<ul style="list-style-type: none"> 1- Oblong, 3–4.2 cm wide 3- 4.7–6.2 cm long 4- Large (1.7–2.5 × 1.3–1.8 cm) 6- 1.7–3.3 cm 7- 2.2–4.3 cm 8- Sigmoid, 3.4–5.5 cm long
<i>Cyrtorchis chailluana</i> (Hook.f.) Schltr.		X		<ul style="list-style-type: none"> 1- Undulated margins 3- The longest, 10–18 cm 6- Narrowly triangular (2.2–4.4 cm long) 7- 2.7–5.8 cm long

Taxa	Clade	M	Clade characteristic features	Leaves (1); Inflorescence (2); Flower (3); Bract (4); Pedicel-ovary (5); Lip (6); Lateral sepal (7); Spur (8); Rostellum (9); Anther cap (10)
				8- Longest pendulous of the genus, up to 16 cm long
<i>Cyrtorchis erythraeae</i> (Rolfe) Schltr.				
<i>Cyrtorchis glaucifolia</i> Summerh.				1- Narrow (up to 1 cm wide), glaucous 8- Sigmoid shaped
<i>Cyrtorchis hamata</i> (Rolfe) Schltr.				1- Narrowed towards the apex 8- Short, incurved (2.7–4.7 cm long) with hooked apex
<i>Cyrtorchis letouzeyi</i> Szlach. & Olszewski		X		1- Narrowly elliptic, glaucous or dark green 8- Sigmoid, rolled up or twisted at the apex
<i>Cyrtorchis neglecta</i> Summerh.				3- 3.1–7.3 cm long 6- Triangular, 1–2 cm long 7- 1.5–2.4 cm long 8- Incurved, 2.2–5.5 cm long 10- 4–5 mm long
<i>Cyrtorchis seretii</i> (De Wild.) Schltr.				1- Fleshy linear leaves with flattened margins 2- Shorter than the subtending leaves 3- 7–9-flowered

III.1.3.6.3 CHARACTER EVOLUTION WITHIN THE GENUS *CYRTOCHIS*

The present study, through the ancestral state reconstruction, provided new insights into character-state evolution in the genus that can be of taxonomic utility in a phylogenetic context. Most of the characters used in this study especially details of the viscidium and stipites have never been identified to infer character-state evolution in orchids. However, the rostellum structure and the pollinarium given by the number of stipites and viscidia were identified by Martos & al. (2018) to infer the character-state evolution in the *Sphyrarhynchus*, *Angraecopsis* *Mystacidium* (SAM) alliance. The broad indurated upper part and thin hyaline part of the viscidium structure, identified as a synapomorphy of the sect. *Cyrtorchis*, showed some little variation in the subordinate taxa *C. aschersonii* (**Figure III-24 C**). In the latter, the indurated part of the viscidium is shorter (Summerhayes, 1960) and broader than the hyaline part compared to that of the other members of the section. The ancestral character reconstruction inferred the insertion point of the stipites at the rear third of the length of the viscidium (**Figure III-24 A, Figure III-25 B-D**) as one of the identified autapomorphies of the genus *Cyrtorchis*. In the sister species, *Rangaeris longicaudata*, the stipites are inserted halfway along the viscidium length (**Figure III-25 A**), which agrees with the view of Farminhão & al. (2020) who proposed this character to delineate the clade including *Cyrtorchis* and *Rangaeris longicaudata*. This contrasts with other species in the *Cyrtorchis-Tridactyle* clade (clade 1C *sensu* Simo-Droissart & al. (2018a) including *Podangis* and *Ypsilopus*), wherein the stipites are inserted at the front margin of the viscidium. The ovary and fruits shape constitutes another diagnostic character identified as important to infer a phylogenetic relationship between taxa in the genus *Cyrtorchis* given that the triquetrous ovary and fruit with three smooth side was confirmed as a synapomorphy of the sect. *Cyrtorchis*. This character state was also found to be homoplastic as it is also inferred to be ancestral in clade C (*C. aff. ringens* sp1, *C. ringens*, and *C. aff. guillaumetii* "Oku"), *C. aff. ringens* sp3 and *C. aff. aschersonii* (**Figure III-24 B**). These ovary and fruit traits were used to clarify the phylogenetic relationship in other angraecoids genera like *Kylicanthe* Descourvières et al. (Descourvières & al., 2018) and *Campylocentrum* Benth. (Pessoa & al., 2018). The ventricose fruits observed in *Kylicanthe* easily allow to discriminate fruiting specimens of this genus from short-stemmed *Diaphananthe* Schltr., *Rhipidoglossum* Schltr. and *Aerangis* Rchb.f. species (Descourvières & al., 2018). Additionally, these fruit traits were also found to be informative in resolving the infrageneric taxonomy of *Campylocentrum*. Recently, Farminhão & al. (2020) reported the *Cyrtorchis* fruits to be triquetrous. However, this study overlooked some details of fruits traits like the presence or absence of ribs and also the existence of non triquetrous fruits probably because of the lack of fruiting specimens representing all the taxa within the genus to have an overview of fruit shape. Moreover, this triquetrous fruit shape is also an important diagnostic characteristic observed in *Angraecum* sect. *Perriangraecum* (Garay, 1973; Cribb & al., 2009; Stewart & al., 2006). This study

thus suggests that ovary and fruit morphology is a phylogenetically important feature that should be more often examined despite it seems to be generally overlooked by orchid taxonomists.

The ancestral character reconstruction showed that the sectional characters of Summerhayes (**Figure III-23 C,E,F, Figure III-24 B,D, Figure III-25 B,C**) are important to establish phylogenetic relationships between taxa. The ancestral state of the viscidium (uniformly linear with hyaline texture; **Figure III-23 E**), evolved to a more complex viscidium structure composed of two parts (broad indurated upper part, thin hyaline lower part) thus constituting a synapomorphy of the section *Cyrtorchis*. On the other hand, the enlarged stipites apices and the widened rostellum just above the very narrow base which constitute synapomorphies of the section *Cyrtorchis* although the former is also shared with the type of *C. sect. Homocolleticon*, *C. monteirae*. The observation of the enlarged stipites towards the apex in *C. monteirae* is still ambiguous because the clade including *C. monteirae* and *C. crassifolia* is not resolved. Also, the phylogenetic origin of stipites shape enlarged towards the apex in *C. monteirae* and *Rangaeris longicaudata* needs to be clarified with a more improved phylogenetic approach. Stipites shape and apices shape are for the first time reported to be informative to establish phylogenetic relationships. The entire symmetric acute stipites apices as well as the entire, symmetric, obtuse, stipites apices were respectively identified as synapomorphies of clade C and clade E. These stipites traits in addition to fruits and ovary shape were the only identified characters that enable to support the phylogenetic relationship between *C. ringens*, *C. aff. ringens sp1* and *C. aff. guillaumetii "Oku"*, which were so far not identified with the morphological analyses. For the other morphogroups, these features of the stipites remain unresolved because the taxa are not well supported.

The present study thus demonstrates that (i) the section *Cyrtorchis* is monophyletic while the section *Homocolleticon* is not, (ii) three new taxa in the section *Homocolleticon* are well supported by morphological and molecular analyses and deserve proper description.

III.1.3.6.4 CONCLUSION

This study provides a first broad phylogenetic framework on the evolutionary history of the genus *Cyrtorchis*, the 7th-largest genus of the Angraecoid orchids of tropical Africa. The combination of morphological investigations, morphometrics, phylogenetic analyses with ancestral character evolution using DNA sequence data helped us to clarify species boundaries and relationships within *Cyrtorchis*, a crucial requirement for undertaking a taxonomic revision. The morphological results support the existence of the two sections based on the feature of the viscidium, along with 27 distinct morphogroups. Phylogenetic results confirm the monophyly of *C. sect. Cyrtorchis*, but *C. sect. Homocolleticon* is not monophyletic. Both molecular and morphometric analyses confirmed eight morphologically defined taxa: *C. henriquesiana*, *C. monteiroae*, *C. praetermissa* and *C. ringens*, for *C. sect. Homocolleticon*, *C. aschersonii* for the *C. sect. Cyrtorchis* and three new taxa, provisionally referred to as *C. aff. guillaumetii* "Oku", *C. aff. ringens* sp1 and *C. aff. ringens* sp3. These three new taxa are in the process of being described and will soon be submitted for publication in separate companion papers. The ancestral character state reconstruction inferred the insertion point of the stipites at the rear third of the viscidium length as one of the main autapomorphic characters supporting the monophyly of the genus. Furthermore, the viscidium structure, the stipites with their apex shape and the lateral lobes of the rostellum are recognized as the main characters that evolved in the genus and differentiate the two morphological sections. However, further molecular studies with additional nuclear markers and approaches are needed in order to propose a complete and more resolved taxonomy of this ambiguous group of angraecoid orchids.

ACKNOWLEDGEMENTS

We express our gratitude to the U.S. National Science Foundation (Grant 1051547, T. Stévant as PI), which supported most of laboratory studies and DNA sequencing. We are grateful to the American Orchid Society for funding the Ph.D. activities of the first author in Cameroon and her stay in the herbarium of the Université Libre de Bruxelles, and The Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS-FRIA) for the grant of Tania D'hajère. We are very grateful to the curators of the various herbaria (BM, BR, BRLU, GDA, K, LY, MA, MO, P, WAG, YA) for making their collections available. The authors are grateful to all people working in the Yaoundé (Cameroon), in the Sibang (Gabon) and in the Nimba shadehouses (Republic of Guinea) for collecting flowering orchid specimens and leaf samples. We thank Sven Batke for sending us the dry leaf specimen of *Cyrtorchis crassifolia*. We also thank the curators of the Botanical Garden of the University of Basel, M. Inayat Olmedo and Bruno Erny, for making available the spirit and dry leaf sample of *Cyrtorchis praetermissa* collected in Sierra Leone. We would also like to express our gratitude to Eberhard Fischer and Jean-Paul Lebel for collecting leaf samples and taking pictures of living samples from Rwanda and Kenya, and to the curator of BR and to Jean-Philippe Biteau (Jardi-Gab, Libreville, Gabon) for the pictures from their living collections and for the dry leaf sampled for DNA analyses. We are also grateful to Drs. Momo Stéphane and Libalah Moses for their constructive comments and suggestions on multivariate statistical analyses. We also express our sincere gratitude to Marie Savignac for the viscidium structure drawings. We finally wish to express our sincere gratitude to the editor Prof. Dr. Dirk Carl Albach and the production editor Franz Stadler and the two anonymous reviewers who provided a thoughtful and helpful review of the manuscript.

SUPPLEMENTARY INFORMATIONS .

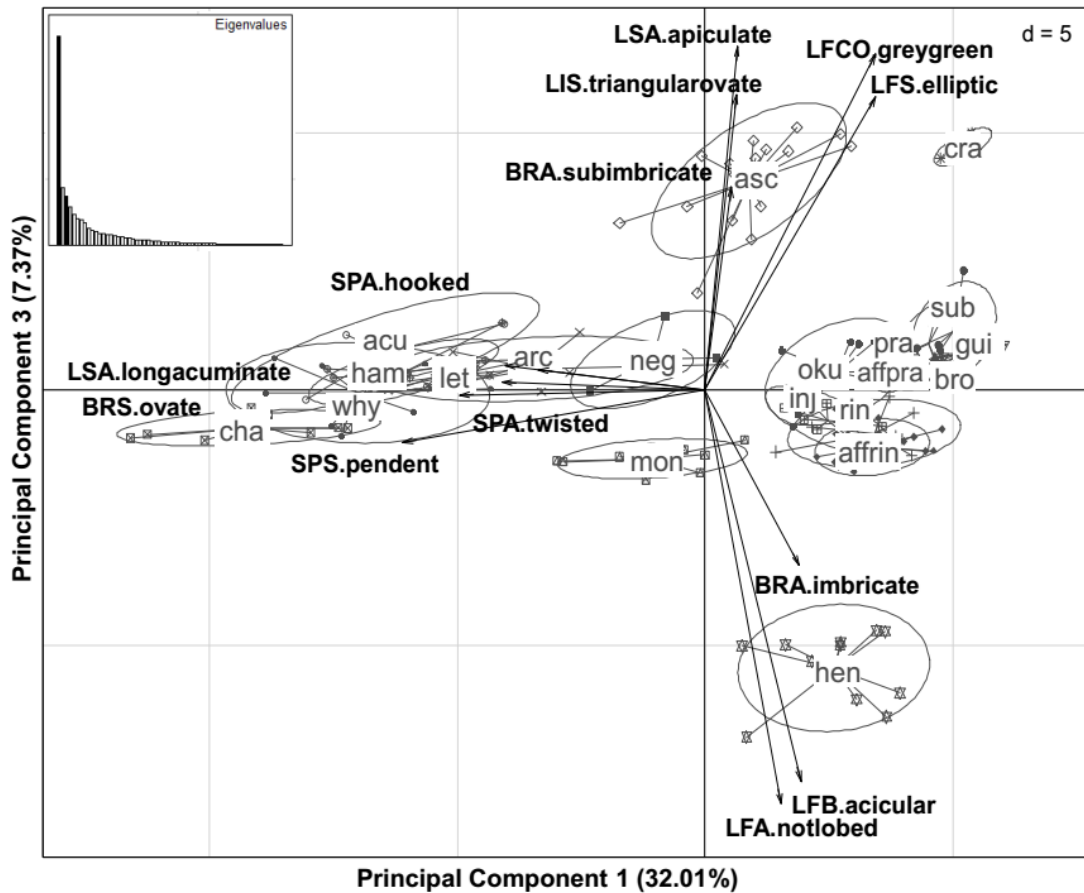


Figure S1. Scatter plots of the first and third axes of the extended principal component analysis using the Hill-Smith method based on 43 characters scored from 171 representing 20 morphogroups of the genus *Cyrtorchis*: arc, *C. arcuata* subsp. *arcuata*; acu, *C. acuminata*; affpra, *C. aff. praetermissa*; affrin, *C. aff. ringens* sp1; asc, *C. aschersonii*; bro, *C. brownii*; cha, *C. chailluana*; cra, *C. crassifolia*; gui, *C. guillaumetii*; ham, *C. hamata*; hen, *C. henriquesiana*; inj, *C. injoloensis*; let, *C. letouzeyi*; mon, *C. monteiroae*; neg, *C. neglecta*; oku, *C. aff. guillaumetii* "Oku"; pra, *C. praetermissa*; rin, *C. ringens*; sub, *C. submontana*; why, *C. arcuata* subsp. *whytei*. Only the variables showing the highest contribution on these two axes are represented. See Appendix III-2 for codes used for variables.

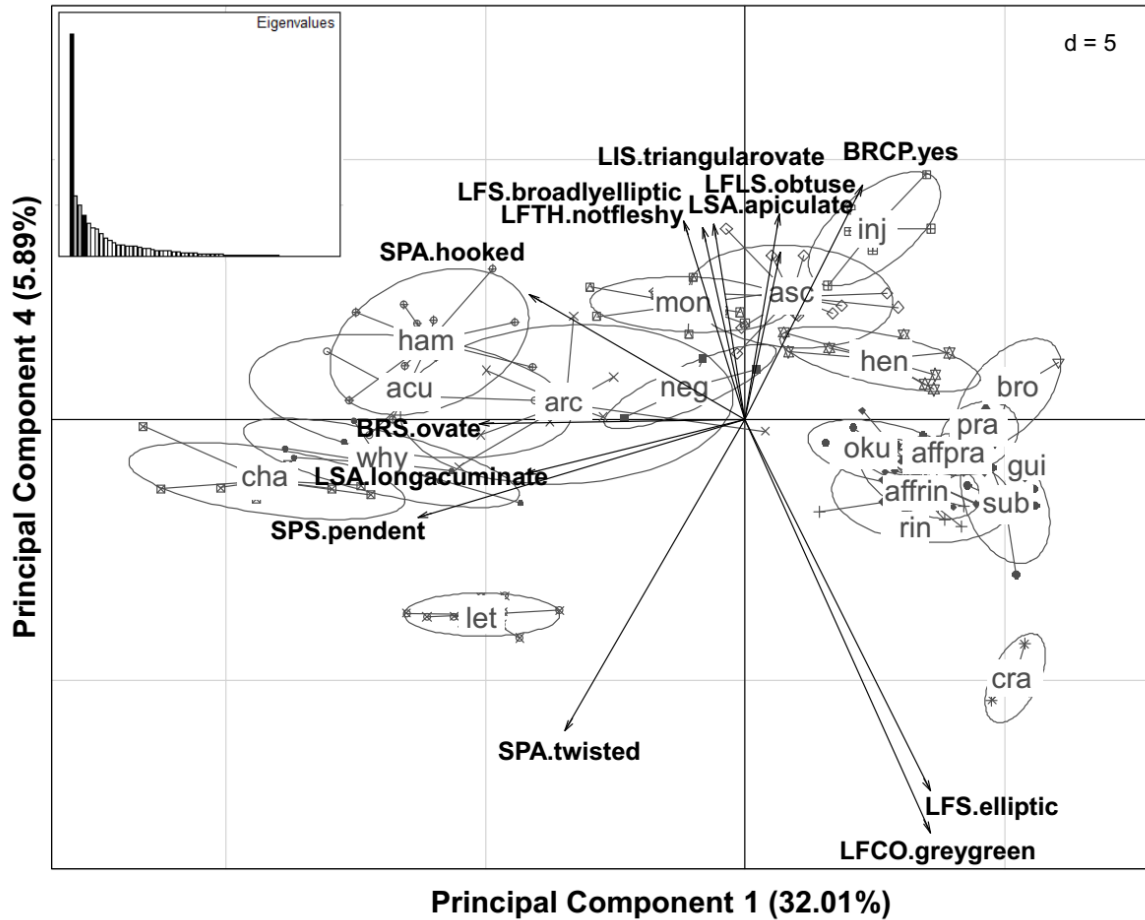


Figure S2. Scatter plots of the first and fourth axes of the extended principal component analysis using the Hill-Smith method based on 43 characters scored from 171 representing 20 morphogroups of the genus *Cyrtorchis*: arc, *C. arcuata* subsp. *arcuata*; acu, *C. acuminata*; affpra, *C. aff. praetermissa*; affrin, *C. aff. ringens* sp1; asc, *C. aschersonii*; bro, *C. brownii*; cha, *C. chailluana*; cra, *C. crassifolia*; gui, *C. guillaumetii*; ham, *C. hamata*; hen, *C. henriquesiana*; inj, *C. injoloensis*; let, *C. letouzeyi*; mon, *C. monteiroae*; neg, *C. neglecta*; oku, *C. aff. guillaumetii* "Oku"; pra, *C. praetermissa*; rin, *C. ringens*; sub, *C. submontana*; why, *C. arcuata* subsp. *whytei*. Only the variables showing the highest contribution on these two axes are represented. See Appendix III-2 for codes used for variables.

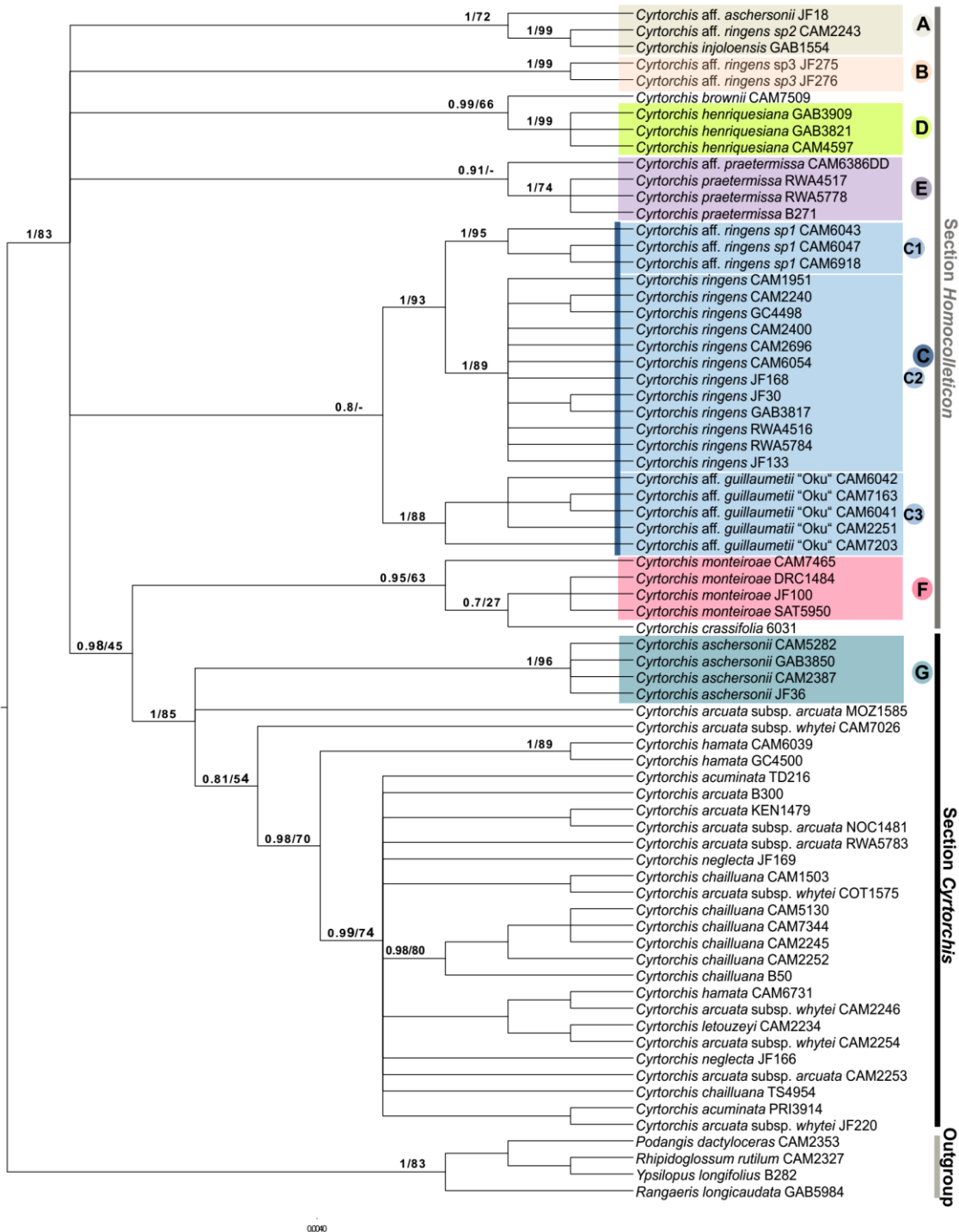


Figure S3. Phylogenetic relationships of the genus *Cyrtorchis* produced by the Bayesian inference of the plastid (*matK*, *rps16*, *trnC-petN*, *trnL-trnF*, *ycf1*) regions (72 accessions, 21 taxa, 6178 characters). Posterior probabilities (PP) and bootstrap values (BS) from maximum likelihood analyses are indicated above the branches. The well-resolved clades from trees resulting from both analyses are here renamed with letters.

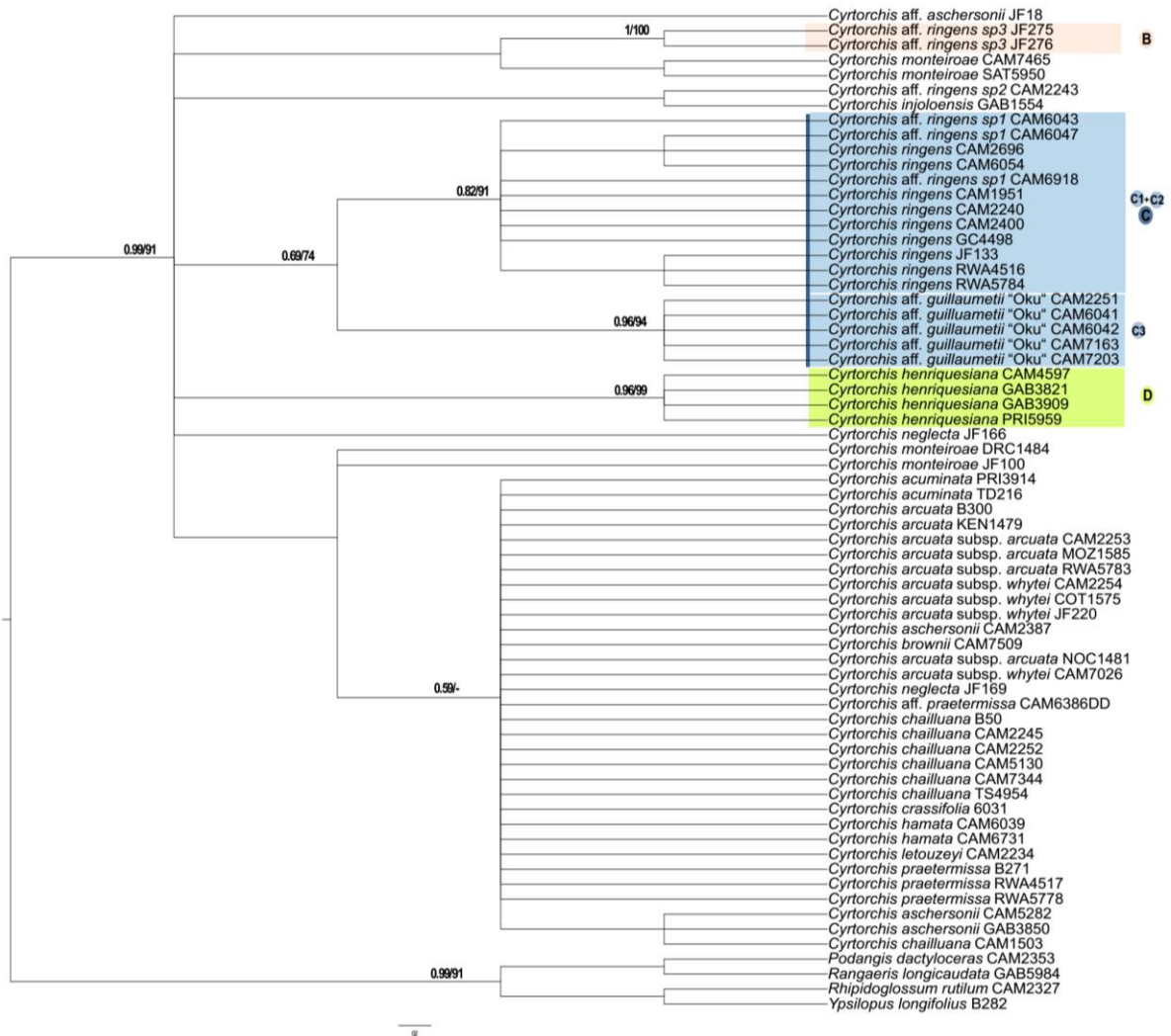


Figure S4. Phylogenetic relationships of the genus *Cyrtorchis* produced by the Bayesian inference of the nuclear (*nrITS-1*) marker (67 accessions, 21 taxa, 380 characters). Posterior probabilities (PP) and Bootstrap values (BS) from Maximum likelihood analyses are indicated above the branches. The well-resolved clades from trees resulting from both analyses are here renamed with letters.

Appendix III-1. Taxon list of the 255 specimens representing 27 morphospecies used for morphological study including the 171 used for morphometric analysis of the genus *Cyrtorchis*. Species; country; locality and additional information; voucher (+ herbarium code). Numbers followed by "*" identify specimens used for morphometric analyses and "x" indicates specimens used for both the molecular and morphological analyses.

C. acuminata (Rolfe.) Schltr. **Equatorial Guinea.** Annobón Island, 270 m, 10 Jan 1999, *Elad 1212* (WAG)*. **Príncipe.** Principe Island, 31 Jan 1891, *Henriques s.n.* (K); 27 May 1981, *van der Laan 337* (WAG)*; 13 Feb 2010, *Stévant & al. (Ombrière de Bom Successo) 245* (BRLU); Près de Bela Vista, 01°36'45"N, 07°25'00"E, 100 m, 1 Nov 1998, 100 m, *Stévant 405* (BRLU)*; chemin de la cascade Iola, 103 m, 18 Jun 2018, *D'hajjère & Balou Ostelino Rocha 216* (BRLU). **C. arcuata** (Lindl.) Schltr. subsp. **arcuata.** **Sierra Leone.** Mateboi, Sanda Tenraran Chiefdom, 7 Jun 1951, *Adames P. 229* (K)*. **Ghana.** Brong-Ahafo region, sandstone rock outcrops between Techiman and Kintampo, 07°44'N, 01°50'W, 200 m, 15 May 1996, *Jongkind 2773* (WAG)*. **Togo.** s.loc., 14 Sep 1982, *van der Laan 537* (WAG)*. **Cameroon.** Ngaoundéré, sur la route de Meiganga (N1), lac Tison, 07°15.147'N, 13°34.653'E, 3 May 2011, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2761* (BRLU)*. **Central African Republic.** Région de la Ouaka, près Ippy, Gbwapala, 8 Sep 1925, *Tisserant 2024* (P); riv. Gbaoro 5 Km S. Bozoum, *Tisserant 3152* (P). **Gabon.** Kinguélé (route entre Tchimbélé et Kinguélé), 1 Nov 2000, *Biteau & Stévant 51* (BRLU). **Príncipe.** Entre Focinho de Cao et Cisco Mantero, 01°36'00"N, 07°21'00"E, 70 m, 1 Feb 2002, *Stévant 1213* (BRLU)*. **Kenya.** 25 km NW of Kaloleni, 25 km NW of Mombassa in Kinarini Coast, 18 Dec 2006, *Damen 232* (WAG). **Tanzania.** Africae orientalis, Nyassa Hochland, Station Kymbila, 1355 m 10 May 1911, *Stolz 715* (K)*; s.loc., 4 Aug 1982, *van der Laan 515* (WAG)*; Mtai, East Usambaras, 23 miles NE of Amani, 14 Dec 1942, *Moreau 444* (K). **Mozambique.** Namaacha, 14 Oct 1996, *Arends 926* (WAG)*. **South Africa.** Plantes du Cap, Glenfilling, 29 Dec 1831, *Drège J.F. 4580c* (P). **C. arcuata** subsp. **whytei** (Rolfe) Summerh. **Sierra Leone.** Bonthe, 14 Oct 1946, *Adames 89* (K)*; Kambaia, 9 Oct 1951, *Small 492* (K). **Ivory Coast.** s.loc., 19 Mar 1984, *van der Laan 769* (WAG). **Togo.** s.loc., 21 Oct 1981, *van der Laan 422* (WAG)*. **Cameroon.** Parc National du Mbam et Djérem, Myéré, A 9.14 km de Myéré, savane, 06°9'853"N, 12°49'428"E, 847 m, 13 Jun 2011, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 2862* (BRLU)*; vers le service de la conservation, 06°12'37"N, 12°45'19"E, 761 m, 28 May 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3569* (BRLU)*; Près de la petite chute, 06°12'35"N, 12°45'18"E, 762 m, 5 Jun 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3592* (BRLU)*; A 8.7 km SE de Myéré, Forêt ripicole à 500 m NW du campement, 06°10'19"N, 12°49'26"E, 775 m, 5 Jun 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3599* (BRLU)*; 13 Jun 2011, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2863* (BRLU)*; Ebo, 9 Nov 2016, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 7026* (YA)*; Nguti. Exploitation forestière, village d'Edjuigang, 5° 35' 43"N, 9° 44' 60"E, 155 m, 14 Mar 2004, *Stévant & al. 2138* (BRLU)*. **São Tomé.** Porto Alegre, 00°02'30"N, 06°33'00"E, 100 m, 1 Dec 1998, *Stévant 535* (BRLU); Monte Café, 00°18'15"N, 06°38'30"E, 600 m, 2 Dec 2002, *Primo & Stévant 110* (BRLU); Roça Fortunato, 950 m, 14 Dec 1997, *de Oliveira 340* (BRLU). **Príncipe.** Pico papagaio, 01°36'45"N, 07°23'30"E, 110 m, s.d., *Stévant 702* (BRLU). **Rwanda.** Nyungwe, Uwinka, 27 Jan 2018, *Farminhão in Jean-Paul Lebel's shadehouse series 220* (BRLU). **Malawi.** Mlanje plateau, Nov 1895, *Whyte 102* (K). Unknown country, without data on locality. Cult. in the Netherlands, Gelderland, Wageningen, 24 Feb 1989, *Arends 918* (WAG). **C. aschersonii** (Kraenzl.) Schltr. **Ivory Coast.** Abidjan, Anguédédou forest, 12 Nov 1984, *van der Laan 825* (WAG)*; 24 Aug 1975, *van der Burg 754* (WAG); Forêt de Yapo, 3 Nov 1974, *Perez-Vera 730* (P). **Cameroon.** Malimba, Aug 1889, *Braun 83* (K); Entre les villages de Mintom et Lélé, 15 km au SO de la "maison de Gentil", près de la rivière Kumu, Arbre1 escaladé dans le plot3, 02°22'38"N, 13°14'49"E, 613 m, 18 Jul 2013, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4419* (BRLU)*; Province du Nord-Ouest, village de Kumbo, Près du Maryland hotel, 06°12'14"N, 10°40'58", 18 Aug 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3762* (BRLU)*; Mont Oku, Village d'Oku, 06°15'47"N, 10°31'19"E, 1695 m, 5 Jul 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3646* (BRLU)*; Belo, Mont Oku, entre 1600 et 1800 m, 06°11.4792'N, 10°23.6496'E, 1705 m, 7 Jul 2014, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 6137* (BRLU)*; Bambui E.S, Bamenda, 28 Jul 1961, *E.B.C. & J.A. SCA 2097* (YA); *SCA 2216* (YA); Nkoltsia (colline de, à 5 km au S-SO du village de Gouap et à 18 km au NO de Bipindi). Sommet de la colline, expo SW 240°, 03°10'21"N,

10°16'03"E, 430 m, 5 Oct 2009, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 1853 (BRLU)**; 22 Oct 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3962 (BRLU)**; Province du Sud, environs de Djoum, UFA gérée par la SFID, 02°15'41"N, 12°50'25"E, 588 m, 6 Fev 2013, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4163 (BRLU)**; 02°16'15"N, 12°58'37"E, 626 m, 14 Aug 2013, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4492 (BRLU)**; Nguti, Sanctuaire de Banyang Mbo, Chemin aller-retour vers le campement 552 dans le Sanctuaire de Banyang Mbo, 05°20'14"N, 09°28'25"E, 245 m, 20 Sep 2004, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 123 (BRLU)**; Province du Littoral, Melong, chute d'Ekoum Nkam, 05°36'55"N, 09°59'16"E, 681 m, 16 Jul 2014, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5282 (BRLU)**. **Gabon**. Tchimbélé (barrage de), 00°37'18"N, 10°24'24"E, 540 m, 17 Nov 2002, *Stévant 1803 (BRLU)**; Tchimbélé carrière près du bras mort du lac, 0°37'54"N, 10°24'25"E, 570 m, 1 Dec 2002, *Stévant 1728 (BRLU)**; Ogooué-Maritime, Rabi, 4 Aug 1992, *Arends 982 (WAG)**; Woleu-Ntem, near hydroelectric compound at Tchimbélé 575 m, 21 Nov 2002, *Strijk 497 (WAG)**; Ca. 10 km along the track Lake Cachimba (Lac Mandjé) towards Igotchi, Nyanga, 5 Jan 1987, *van der Laan 1329 (WAG)**; Monts de Cristal, Upper Komo Valley, dam construction site on SEEF concession area, 00°23'13"N, 010°33'38"E, 550 m, 1 Nov 2017, *Farminhão & al. 36 (BRLU)**. **Democratic Republic of the Congo**. Eala, Coquilhatville, vanilleraie, 2 Sep 1907, *Seret 1001 (BR)*. **C. brownii** (Rolfe) Schltr. **Cameroon**. 50 km W of Baléa (along Sangha R., near C.A.R. border, about 82 km E of Lokomo, Km 120 road Yokadouma–Moloundou), 02°40'N, 15°42'E, 500 m, 2 Dec 1982, *de Kruif 809 (YA)*; 4 Nov 2015, *Droissart, Azandi & Mayogo 2161 (BRLU)**. **Central African Republic**. Boukoko, 22 Oct 1947, *Tisserant 382 (P)*. **Democratic Republic of the Congo**. Injolo, Sep 1905, *Laurent 1773 (P)**; Eala, 5 Dec 1906, *Pynaert 699 (BR)**. **Uganda**. Entebbe, 3900 m, Jun 1905, *Brown 248 (K)**. **C. chailluana** (Hook.f.) Schltr. **Nigeria**. Sep 1860, *Mann 521 (K)**. **Equatorial Guinea**. Piedra Nzas (inselberg de), à 6 h de marche du village d'Acoaseng, à 9 km d'Aconibe, ou de celui de Afaanam, à 5 km d'Aconibe, 01°27'27"N, 11°20'52"E, 745 m, 31 Aug 2002, *Ndong Bokung & Stévant 504 (BRLU)*; Mongum (Inselberg), 17 Sep 1999, *Ndong Bokung & Stévant 66 (BRLU)*. **Cameroon**. S.N. Ekema E3, 14 Oct 1971, *SCA 2365 (YA)*; Djaposten, 30 Km NNW Lomié, 23 Aug 1972, *Letouzey 11666 (YA)*; Akoakas rock, about 24 km on the old road from N'Koemvone to Ambam (counted from the crossing at N'Koemvone), 02°43'N, 11°17'E, 660 m, 19 Nov 1975, *de Wilde 7980 (YA)*; Nguti, Exploitation forestière, village d'Edjuigang, 05°34'49"N, 09°45'14"E, 155 m, 8 Aug 2007, *Droissart, Stévant & Simo (Ombrière de Yaoundé) 637 (BRLU)*; Akom II (route Kribi–Ebolowa), Campement à 3 h de marche au S du village, le long de la rivière à environ 60 mètres du campement, 02°45'00"N, 10°32'26"E, 710 m, 12 Oct 2008, *Simo, Stévant & Droissart (Ombrière de Yaoundé) 1386 (BRLU)*; relevé permanent (1 ha) sur plateau situé au N-NE du campement, 02°45'19"N, 10°32'49"E, 785 m, 20 Oct 2009, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 1890 (BRLU)**; Ngoyla, campement à 13 km à l'est du village, cacaoyère, 02°38'20"N, 14°07'24"E, 484 m, 24 Sep 2010, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2415 (BRLU)**; Mbam-Minkom (région de, au NO de Yaoundé), Village de Nye-Meyong, le long de la route entre Nyemeyong et Ekekam, 03°54'29"N, 11°22'17"E, 815 m, 19 Oct 2010, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2488 (BRLU)*; Site en cours d'exploitation dans l'UFA 09-003 à 55 km au SE de Djoum, 02°19'30"N, 12°03'57"E, 611 m, 27 Jul 2011, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2966 (BRLU)**; Mont Cameroun, route entre Debunscha et Idenau, 04°10'01"N, 08°59'43"E, 5 m, 2 Feb 2012, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 3414 (BRLU)**; Province de l'Ouest, Monastère de Koutaba, entre Bafoussam et Foumban, 1164 m, 9 Jun 2014, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5130 (BRLU)**; Province du Sud, village de Ma'an, UFA 09-022 (Wijma), 02°23'48"N, 10°47'47"E, 549 m 23 Oct 2015, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 6487 (BRLU)*; Manfé, arbre abattu dans une plantation, 28 Aug 2017, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 7344 (BRLU)**. **Gabon**. C.E.F.A. Ayem, 10 Km SW de Ndjolé, 16 Apr 1963, *Hallé 1684 (P)*; Cap Estérias, Estuaire, 22 Feb 1968, *Hallé & Villiers 5457 (WAG)*; Tchimbélé (carrière de) près du bras mort du lac, 00°37'54"N, 10°24'25"E, 570 m, 24 Feb 2002, *Stévant 1687 (BRLU)**; Ndjolé area, Concession Bordamur, SE of Ndjolé, between Waka NP and La Lopé NP, 26 Feb 2009, *Stévant & al. 3085 (MO)*; Lambaréne area AB 345, Savannah near the entrance of river Pelican, 00°51'24"S, 10°09'30"E, 18 m, 18 Mar 2017, *Stévant & al. 4925 (BRLU)**; Evaro Lake, AB 359, 00°52'17"S, 10°08'07"E, 14 m, 18 Mar 2017, *Stévant & al. 4954 (BRLU)*. **C. crassifolia** Schltr. **Tanzania**. Pungaluma Hills above Mshewe Village, Brachystegia, Uapaca, Syzygium, Faurea, Protea woodland, 08°50'S, 33°20'E, 1400 m, 11 Jun 1905, *Lovett & Kayombo 3316A (MO)**. **Zambia**. Abercorn, 20 Nov

1911, *Fries 1274* (K)*; 3 Nov 1949, *Bullock 1396* (K)*. **C. erythraeae** (Rolfe) Schltr. **Eritrea**. Grande vallée au-dessus de Ghindam, 1500 m 13 May 1892, *Schweinfurth & Riva 2143* (K). **C. glaucifolia** Summerh. **Mozambique**. 28 mls, E of Ribavé, 518.16 m, 23 Jul 1962, *Schelpé & Leach 6980* (K). **C. guillaumetii** (Pérez-Vera) R.Rice. **Guinea**. Mont Nimba, 07°42'38"N, 08°21'13"W, 551 m, 21 Sep 2013, *Nimba Spirit Collection 1466* (BRLU)*. **Sierra Leone**. Peiewa, Kailahun, 08°16'44.04"N, 10°34'22.8"W, *Segeberäck 1555* (K)*. **Ivory Coast**. Rives droite du Sassandra sur *Klainedoxa gabonensis*, entre Buyo et Soubré, 16 Dec 1963, *Guillaumet 1767* (UCJ); Mont Tonkoui, Oct 1971, *Perez-Vera 238* (K); s.loc., 3 Nov 1975, *de Koning 6098* (WAG)*; from Centre v.d. Burg collection, 24 Feb 1982, *van der Laan 475* (WAG)*. **C. hamata** (Rolfe) Schltr. **Guinea**. Mont Nimba, savannah near Gbié, near the savannah, 07°38'48"N, 08°21'20"W, 728 m, 26 Jun 2012, *Stévant & Serein 4559* (MO)*; In the mine concession, 07°41'55"N, 08°23'51"W, 743 m, 5 Jul 2013, *Stévant & Serein 4602* (BRLU)*; 07°42'20"N, 08°20'27"W, 485 m, 13 Jul 2013, *Nimba Spirit Collection 1438* (BRLU)*. **Ivory Coast**. Niablé, Abengourou, 31 Jul 1969, *Thijssen 158* (WAG)*; Mafa, 1970, *Bonardi s.n.* (P); 14 km from Lakota, on the road to Sassandra, Lakota, 6 Oct 1980, *van der Laan 196* (WAG)*. **Nigeria**. Lagos, 13 Mar 1905, *Martin s.n.* (K)*. **Togo**. Kpave on ficus, 11 Jan 1953, *Westwood 80* (K)*. **Cameroon**. Province du Centre, ville de Mbalmayo, derrière l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts, 03°29'21"N, 11°30'03"E, 672 m, 2 Oct 2015, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 6442* (BRLU)*; Réserve du Dja (collection J.P. Vautherin), 5 Aug 2001, *Stévant, Chamba & Pial 144* (BRLU)*; Province de l'Est, environs du village de Mindourou II, UFA gérée par Alpicam, 04°16'20"N, 15°07'06"E, 20 Jun 2016, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 6731* (BRLU)*; Province du Sud, village de Ma'an, UFA 09-022 (Wijma), 571 m 6 Oct 2013, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4671* (BRLU)*. **Gabon**. Région près du Cameroun, Odingoto, nord d'Oyem, 200–300 m, 1 Oct 1997, *Biteau & Stévant 30* (BRLU)*. **C. henriquesiana** (Ridl.) Schltr. **Ivory Coast**. Forêt de Yapou, 3 Nov 1974, *Perez-Vera 730* (P). **Cameroon**. Province du Sud, village de Ma'an, UFA 09-022 (Wijma), 02°23'46"N, 10°47'49"E, 557 m, 17 Sep 2013, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4597* (BRLU)*. **Equatorial Guinea**. Bikaba (route de Monte Alén à Niefang), 01°48'00"N, 10°16'60"E, 28 Aug 999, *Ndong Bokung & Stévant 33* (BRLU)*; Mongola (près de Anisok), 550 m, 31 Aug 1999, *Ndong Bokung & Stévant 39* (BRLU)*; Inselberg Akuom, 6 km à l'Est de Nsuameyong, 01°49'00"N, 10°54'60"E, 31 Aug 2000, *Ndong Bokung & Stévant 225* (BRLU); Avelemang, 01°50'N, 10°54'E, 520 m, 7 Aug 2002, *Demam, Ndong Bokung & Nguema 1* (BRLU)*; Akoak Benguan (inselberg) à 5 km au sud d'Akuom, 01°47'N, 10°56'E, 580 m, 23 Aug 2002, *Demam, Ndong Bokung & Nguema 9* (BRLU)*. **Principe**. Princes islands, Sundi, 107 m, *Newton 15* (BM); Porto Real, 01°37'28.56"N, 07°24'21.96"E 9 May 1905, *Rose 145* (P); Entre Focinho de Cao et Cisco Mantero, 01°36'00"N, 07°21'00"E, 70 m, 1 Nov 1998, *Stévant 477* (BRLU)*; Oque Pipi, 01°36'15"N, 07°25'00"E, 300 m, 26 Aug 2002, *Primo & Stévant 81* (BRLU)*; Principe Morro Fundao, 01°37'00"N, 07°23'00"E, 370 m, 18 Sep 2002, *Primo & Stévant 86* (BRLU)*. **Gabon**. Mbé Akélayong, 00°56'05"N, 10°30'19"E, 570 m, 22 Aug 2001, *Ngok Banak 148* (BRLU)*; Tchimbélé (carrière de) près du bras mort du lac, 00°37'893"N, 10°24'421"E, 570 m, 15 Aug 2002, *Stévant 1809* (BRLU)*; Assep-Bengong (inselberg d'), à 30 minutes de marche du village d'Akok ou d'Adzzabikat, à 8 km d'Oyem en direction de Bitam. Entre la route et l'inselberg, 01°38'41"N, 11°37'19"E, 590 m, 17 Sep 2002, *Stévant 1847* (BRLU)*. **C. injoloensis** (De Wild.) Schltr. **Gabon**. Nyanga, Doussala, 25 Jun 1992, *Arends 960* (WAG)*; 20 Jul 1992, *Arends 877* (WAG)*; 22 km along the road Mayumba–Tchibanga, and then 12 km along a forest exploitation track leading in an eastern direction, near the river Doussa, Nyanga, Jul 1992, *Arends 972* (WAG)*; without information on the locality, 1992, *Arends 964* (WAG)*. **Democratic Republic of the Congo**. Indjolo, Mokoto, Aug 1905, *Laurent 1756* (BR)*; Eala, 9 Sep 1905, *Laurent 1784* (BR)*. **Uganda**. Entebbe, 3900 m, 9 Aug 1906, *Brown 383* (K)*. **C. letouzeyi** Szlach. & Olszewski. **Cameroon**. Près Bitsoumam-Eyen, 12 km E Ngoulémakong, 30 Jun 1972, *Letouzey 11422* (P); Mama (campement et plantation près de Etou), axe Somalomo-Ekom, 03°21'39"N, 12°44'27"E, 595 m, s.d., *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 253* (BRLU)*; MBOUMA plantation de cacao, 02°44'5"N, 13°04'30"E, 650 m, 29 Jun 2004, *Stévant & Pial 1037* (BRLU)*; 2 Jul 2007, *Droissart, Stévant & Simo (Ombrière de Yaoundé) 578* (BRLU)*; Recolté sur la route à komba tida sur un arbre tombé, 03°24'13"N, 12°42'11"E, 700 m, 25 Jun 2008, *Simo, Stévant & Droissart (Ombrière de Yaoundé) 1107* (BRLU)*; Province de l'Ouest, Monastère de Koutaba, entre Bafoussam et Foumban, 05°38'52"N, 10°48'22"E, 1164 m, 25 Jun 2014, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5213* (BRLU)*; **Cameroon**. Province de

l'Est, environs du village de Mindourou I, UFA gérée par Pallisco, 03°25'30"N, 13°36'03"E, 741 m, 8 Jul 2013, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4400* (BRLU)*; **Cameroon**. Province de l'Est, environs du village de Mindourou I, UFA gérée par Pallisco, 03°25'51"N, 13°36'09"E, 732 m, 29 Jun 2015, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 6148* (YA)*; Réserve de Faune de Dja, Inselberg Lekinga, 722 m, s.d., *in cultivation in Bouamir shadehouse 54* (YA); Route entre Yokadouma et Mouloundou, 30 km au N de Yokadouma, 03°13'10"N, 15°00'38"E, 480 m, 5 May 2010, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2139* (BRLU)*; Site en cours d'exploitation dans l'UFA 09-003 à 55 km au SE de Djoum, 02°19'30"N, 12°03'57"E, 611 m, 3 May 2011, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2762* (BRLU)*; Province du Sud, environs de Djoum, UFA gérée par la SFID, 705 m, s.d., *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5842* (BRLU)*. **Gabon**. Oyem, ville, 16 Jun 1999, *Biteau & Stévant 29* (BRLU). **C. monteiroae** (Rchb.f.) Schltr. **Cameroon**. Bertoua, near catholic mission, 16 Nov 1960, *Breteler 695* (YA); Benyandon (35 km N Bafia), 14 Sep 1966, *Letouzey 7882* (YA); Ngoro, village Yangba, 05°06'19"N, 11°24'03"E, 616 m, 10 Oct 2009, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 1871* (BRLU)*; village Ndjamtchourou, 04°58'10"N, 11°20'52"E, 497 m, 10 Oct 2009, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 1872* (BRLU)*; Barombi-station, *Preuss 418* (K); Nguti, Exploitation forestière, Village d'Edjuigang, 155 m, 05°34'49"N, 09°45'14"E, 4 Oct 2004, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 149* (BRLU)*; Nkoubar (zone de), prairie marécageuse, 7 Oct 2002, *Stévant & Pial 679* (BRLU)*; Petit Mbassakok (inselberg de), zone de Bouamir, Réserve du Dja, 03°10'14"N, 12°48'33"E, 635 m, 18 Oct 2003, *Stévant & Pial 922* (BRLU)*; Site en cours d'exploitation dans l'UFA 09-003 à 55 km au SE de Djoum, 02°19'30"N, 12°03'57"E, 611 m, 22 Oct 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3956* (BRLU)*; Province du Sud, environs du village de Ma'an, cacaoyère, 02°20'42"N, 10°36'07"E, 547 m, 1 Oct 2013, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4634* (BRLU)*; 02°22'52" N, 10°37'12", 524 m, 14 Oct 2013, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4725* (BRLU)*; 02°22'46"N, 10°37'37"E, 518 m, 6 Oct 2014, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5601* (BRLU)*; sur la route entre Ma'an et Meyo-centre, Cacaoyère, 02°25'23" N, 10°41'51"E, 556 m, 6 Oct 2014, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5585* (BRLU)*; Réserve du Dja, Bouamir Mbassakok, 03°10'29.867"N, 12°49'08.274"E, 696 m, 20 Oct 2017, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 7465* (BRLU)*. **São Tomé**. Nova Ceilão, 450 m, 26 Aug 1997, *Stévant 78* (K)*. **Gabon**. Koum (Mont) à 1 km du village de Kumassi, à 32 km d'Oyem vers Bitam, 01°49'34"N, 11°37'41"E, 625 m, 13 Apr 2002, *Stévant 1310* (BRLU)*. **Democratic Republic of the Congo**. Yangambi, falaises de l'Isalowe, 470 m, 28 Jul 1937, *Louis 5662* (P); Chutes du Lubi, près de Kazadi Fambwe, 7 Apr 1902, *Gentil 23* (BR); Yangambi, île Esali (fleuve Congo), 470 m, 17 Aug 1938, *Louis 10889* (P). **Angola**. Bembi, Apr 1873, *Monteiro s.n.* (K). **C. neglecta** Summerh. **Democratic Republic of the Congo**. Kindana Bugesera, 4 Jan 1954, *Liben 1074* (K)*. **Rwanda**. Mbuye (Kibungo), *Delepierre & Lebel 166* (BR); Bugesera, 20 Jan 2018, *Farminhão in Gilbert Delepierre's shadehouse series 166* (BRLU)*. **Burundi**. Gitwe, Bururi, 1000 m, 27 Jan 1981, *Reekmans 9573* (WAG)*. **Tanzania**. Kwamkoro, near Amani Jang. Jerr., 914.4 m, 18 Aug 1940, *Moreau 27* (K)*. Unknown country, without data on locality, cult. in the Netherlands, 6 Oct 2006, *Damen 209* (WAG). **C. praetermissa** Summerh. subsp. *praetermissa*. **Rwanda**. 31 May 1988, *Arends 872* (WAG)*. **Tanzania**. Hardeni District, Mgua, 30 miles E of Hardeni, 6 Mar 1944, *Page Jones 682* (K)*. **Zambia**. Mwinilunga District, just S of Matonshi farm, 8 Nov 1937, *Milne-Rehead 3146* (K)*. **Mozambique**. 10 Jun 1988, *Arends 875* (WAG)*. **South Africa**. Unknown country, wWithout information on the locality, 7 Jun 1905, *van der Laan s.n.* (WAG)*. **C. praetermissa** subsp. *zuluensis* (E.R.Harrison) H.P.Linder. **South Africa**. Natal, Hlabisa Division near Inyelazi River Bridge, 2 Feb 1955, *Schelppe 5216* (BOL); Kwazulu-Natal, 22 Aug 1983, *van der Laan 681* (WAG). **C. ringens** (Rchb.f.) Summerh. **Guinea**. Nzérékoré, Lola, Guinée Forestière, Nimba Mountains, SMFG iron mining concession, Zié river, Gallery forest, 07°40'20"N, 08°22'26"W, 1274 m, 24 Aug 2013, *Nimba Spirit Collection 733* (BRLU)*. **Cameroon**. s.loc., Hildebrandt in *Bouché s.n.* (K); Cameroon Mountain, *Mann 2114* (YA)*, Bipindi, 27 Mar 1905, *Zenker 4693* (P); Douala, Edéa forest, 27 Jun 1978, *Thomas 203* (K); Parc National de Korup, à proximité du Chimpanzee Camp, 05°42'29"N, 08°52'7"E, 299 m, 29 Nov 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4083* (BRLU)*; 05°42'45"N, 08°52'10"E, 300 m, 9 Oct 2014, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5629* (BRLU)*; Mindourou site d'exploitation de la Pallisco près de Lomié (AC 5), 03°23'07"N, 13°54'25"E, 770 m, 3 Sep 2002, *Stévant & Pial 601* (BRLU)*; 27 Aug 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3769* (BRLU)*; Réserve Edéa-Douala, Lac Tissongo, 03°35'22"N, 09°54'24"E, 20 m, 29 Oct 2009, *Simo &*

*al. (Ombrière de Yaoundé) 1898 (BRLU)**; Bindem (route allant vers Messama, perpendiculaire à la route Kribi-Ebolowa), Arbre coupé pour servir de pont au-dessus de la rivière, à 1 heure de marche au SO du village, 02°42'11"N, 10°48'06"E, 570 m, 19 Oct 2010, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2484 (BRLU)**; Nguti, Sanctuaire de Banyang Mbo, Chemin aller-retour vers le campement 552 dans le Sanctuaire de Banyang Mbo, 05°20'14"N, 09°28'25"E, 245 m, 25 Oct 2010, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2501 (BRLU)**; 05°21'07"N, 09°33'26"E, 220 m, 1 Nov 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4005 (BRLU)**; Village de Bejange, à environ 500 mètres du village de Babubok, situé à l'extrême sud de la réserve, 05°09'43"N, 09°39'54"E, 510 m, 12 Nov 2011, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 3287 (BRLU)**; Réserve Edéa-Douala, Lac Tissongo, 03°34'17"N, 09°53'14"E, 7 m, 29 Oct 2010, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2519 (BRLU)**; Bibondi, 03°19'31"N, 10°38'51"E, 740 m, 24 Sep 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3842 (BRLU)**; Bipindi, Village de Memel II au N de Bipindi, Transect dans les collines (entre 250 & 275), 03°10'32"N, 10°25'58"E, 250 m, 1 Oct 2012, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3884 (BRLU)**; s.loc., 21 Oct 2011, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 3227 (BRLU)**. **Equatorial Guinea**. Rio Muni, Cataratas, chemin de Musumu au Rio Uele, 300 m, 6 Oct 1999, *Ndong Bokung & Stévert 88 (BRLU)**; Cataratas, grande chute, 01°37'00"N, 10°01'60"E, 250 m, 29 Oct 1999, *Ndong Bokung & Stévert 104 (BRLU)**; Bong, 20 Sep 2002, *Ndong Bokung & Stévert 509 (BRLU)*; Bisun, 21 Sep 2002, *Ndong Maye & Stévert 21 (BRLU)*. **Príncipe**. Príncipe Island, 16 Dec 1983, *van der Laan 723 (WAG)*. **Gabon**. Mvoum, Estuaire, 1 Mar 1985, *van der Laan 847 (WAG)**; near Gamba, Ogooué-Maritime, 6 Nov 1985, *van der Laan 956 (WAG)*; Andocka-Foula, 21 Sep 2001, *Ngok Banak 185 (BRLU)**; 12 Oct 2001, *Stévert Ngok Banak & Nguema 1144 (BRLU)**; 25 Oct 2001, *Stévert, Ngok Banak & Nguema 1147 (BRLU)*; 12 Aug 2002, *Stévert 1778 (BRLU)**; old road from Kinguélé to Kougouleu-Médouneu road, not too far from Kinguélé, 15 Nov 2002, *Stévert 1726 (BRLU)**; Monts de Cristal, Lower Mbé Valley, north-northwest from Kinguélé, foothills of Mount Mbilan, 00°27'47"N, 10°16'12"E, 312 m, 26 Oct 2017, *Farminhão, Dewynter & Stévert 13 (BRLU)**; Monts de Cristal, Upper Komo Valley, dam construction site on SEEF concession area, 00°22'14"N, 10°34'49"E, 438 m, 1 Nov 2017, *Farminhão & al. 30 (BRLU)**. **Rwanda**. Gisakura, 02°26'37"S 029°06'18"E, 1910 m, 17 Jan 2018, *Farminhão, Stévert & Fischer 133 (BRLU)*. **Mozambique**. Cheringoma. Serraçao de Durunde, 110 Km da Beira, estrada de Inhaminga, 25 May 1942, *Torre 4186 (P)*. **C. seretii** (De Wild.) Schltr. **Central African Republic**. Region de Sud Ippy, 11 Apr 1905, *Chevalier 37751 (P)*; Près vill. Batibala, 40 Km NE Bambari, 22 Jul 1924, *Tisserant 1576 (P)*. **Gabon**. Tchimbélé, ancien lit de la rivière qui descend du barrage, 00°36'50"N, 10°23'60"E, 440 m, 1 Dec 2002, *Stévert 1669 (BRLU)*. **Democratic Republic of the Congo**. Suronga, on river Uele, 27 Sep 1906, *Seret 666 (BR)*. **C. submontana** Stévert, Droissart & Azandi. Montée de Monte Alén à Mirador, 1 Aug 1999, *Ndong Bokung & Stévert 5 (BRLU)**; Engong, Parc Nat. de Monte Alén, 5 km au NO de Engong, inselberg, 1200 m, 25 Jun 2000, *Ndong Bokung & Stévert 185 (BRLU)*; Engong, Parc Nat. de Monte Alén, 5 km au NO de Engong, inselberg, 14 Jun 2001, *Ndong Bokung & Stévert 273 (BRLU)**; dalle rocheuse (inselberg) d'Engong, à 5 km au NO du Village d'Engong, Reccee 6, 1095 m, 29 May 2002, *Stévert 1593 (BRLU)**. **Cameroon**. Akom II (route Kribi-Ebolowa), Campement à 3 h de marche au S du village, Très gros chablis tout près du véritable sommet de la colline située à l'E du campement, 1015 m, 3 Jun 2006, *Droissart 112 (BRLU)**; Sommet à 3 heures de marche au N du campement, 1075 m, 4 Jun 2006, *Droissart 129 (BRLU)**; Montée vers le sommet de la colline située à l'O du Campement, 905 m, 31 May 2006, *Droissart 135 (BRLU)**. **Potentially new taxa. C. aff. guillaumetii "Oku"**. **Cameroon**. Près du point trigonométrique de Mbem (40 Km E-SE de Nkambe), 1800 m, 11 Jul 1967, *Letouzey 8860 (YA)*; Crête NW Muetan Aku, 9 Km SW Bangem, 2 Jun 1982, *Villiers 1397 (P)*; Province du Nord-Ouest, entre Kumbo et Ndop, 06°11'01"N, 10°39'33"E, 9 Jun 2011, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2848 (BRLU)**; Belo, Mont Oku, autour du lac entre 2200 et 2500 m, 06°11'08"N, 10°25'20"E, 2300 m, 5 May 2014, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5046 (BRLU)**; 21 Apr 2014, *Droissart & Simo 1693 (BRLU)**; Savane boisée autour du lac, 28 May 2017, *Azandi 26 (BRLU)**; 06°20'00"N, 10°45'00"E, 2313 m, 28 Apr 2017, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 7163 (BRLU)**; Province du Littoral, Melong, Mont Manengouba, entre 1800 et 2200 m, 05°22'20"N, 09°51'18"E, 2048 m, 2 Jun 2014, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5109 (BRLU)**; Province de l'Ouest, Bayangam, 05°17'55"N, 10°25'51"E, 1650 m, 2 Jun 2014, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5117 (BRLU)**; Baham, 05°17'12.47"N, 10°22'32.98"E, 1920 m, 28 Apr 2017, *Droissart &*

al. (Ombrière de Yaoundé) 7164 (BRLU). Equatorial Guinea. Malabo-Pico Basilé, estrada km 17–18, Bioko Norte, 2 Jul 1989, Carvalho 4004 (WAG)*. C. aff. *aschersonii*. Gabon. Monts de Cristal, Lower Mbé Valley, southeast from Kinguéle and southwest from Edouam, on the bank of a stream, 102 m, 28 Oct 2017, Farminhão & al. 18 (BRLU). C. aff. *praetermissa*. Equatorial Guinea. Moca (Village de), PNMA, 01°38'48"N, 10°19'17"E, 650 m, 4 Aug 2001, Ndong Bokung & Stévant 384 (BRLU)*; Bikurga (inselberg de), face sud, 25 Jul 2001, Ndong Bokung & Stévant 326 (BRLU)*; Rio Muni (partie continentale de la Guinée), 20 Jul 2002, Ndong Bokung & Stévant 470 (BRLU)*; Bikurga, dalle rocheuse, 01°35'00"N, 10°28'00"E, 800 m, 5 Aug 2002, Deman, Ndong Bokung & Nguema 40 (BRLU)*. Cameroon. Bindem (route allant vers Messama, perpendiculaire à la route Kribi-Ebolowa), le long de la piste entre le plot 1 et le plot 2, 02°41'42"N, 10°46'37"E, 553 m, 24 Jul 2008, Simo. & Sonké 85 (BRLU)*. South Africa. Zululand, 28 May 2018, Olmedo 16322 (RENZ)*. C. aff. *ringens* sp1. Guinea. Guinée Forestière, Nimba Mountains, SMFG iron mining concession, 07°40'37"N, 08°23'39"W, 900 m, 24 Aug 2013, Nimba Spirit Collection 1182 (BRLU)*; Zié river, 07°40'20"N, 08°22'26"W, 1274 m, 5 Jul 1905, Nimba Spirit Collection 734 (BRLU)*. Liberia. Kitoma, 28 Oct 1951, Harley 1834 (K)*; Akom II (route Kribi-Ebolowa), Campement à 3 h de marche au S du village, Montée vers le sommet de la colline située à environ 2 heures de marche au N du campement, sur versant exposé S près du sommet, 02°44'11"N, 10°32'08"E, 940 m, 8 Oct 2014, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5618 (BRLU)*; Mt Etindé (petit Mt Cameroun), Entrée via le village d'Ekondjo, entre l'entrée du Parc National (953 m) et 1400 m, 04°43'21"N, 09°07'32"E, 1208 m, 18 Aug 2012, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3758 (BRLU)*; Province du Sud Ouest, Mt Cameroun, Départ au village d'Ekondjo, entre 800 m et 1000 m, 04°45'03"N, 09°09'04"E, 900 m, 11 Nov 2014, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5738 (BRLU)*; village de Dikome Balue, montée vers le sommet du Mont Ratta, crête a dessus de 1700 m, 04°53'17"N, 09°14'31"E, 1749 m, 17 Sep 2016, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 6918 (BRLU)*. Equatorial Guinea. Estrada do pico km 10–11, Bosque primario denso e sombrio com algumas arvores de grand, 2 Jul 1988, Carvalho 3508 (MA)*. C. aff. *ringens* sp2. Cameroon. Nguti, Exploitation forestière, Village de Tayov, 05°37'14"N, 09°46'40"E, 250 m, 15 Oct 2008, Simo, Stévant & Droissart (Ombrière de Yaoundé) 1395 (BRLU); Akom II (route Kribi-Ebolowa), Campement à 3 h de marche au S du village, Aux alentours du campement, à 10 mètres de part et d'autre de la rivière, 02°44'58"N, 10°32'26"E, 705 m, 26 Sep 2012, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3859 (BRLU). C. aff. *ringens* sp3. Rwanda. Nyungwe, Umugote trail, 02°29'24"S, 29°12'04"E, 2288 m, Farminhão & Dumbo 275 (BRLU); 02°29'27"S, 29°12'01"E, 2348 m, Farminhão & Dumbo 276 (BRLU).*

Appendix III-2. List of variables assessed for the study of species of the genus *Cyrtorchis*. The characters used in morphometric analyses are indicated with the symbol "X" in the 5th column and those used in the morphological character evolution are indicated with the symbol "*" in the 6th column.

N°	Variables	Codes	States	Morphometrics	Character evolution
1	Length of the stem	STL	Continuous		
2	Length between nodes	BNL	Continuous		
3	Leaf length	LFL	Continuous	X	
4	Leaf width	LFW	Continuous	X	
5	Length of the big lobe	LBLO	Continuous		

N°	Variables	Codes	States	Morphometrics	Character evolution
6	Length of the small lobe	LSLO	Continuous		
7	Space between the lobes	SBLO	Continuous		
8	Inflorescence length	INL	Continuous	X	
9	Distance between flowers	DTFL	Continuous	X	
10	Number of flowers	NFL	Discrete	X	
11	Bract length	BRL	Continuous	X	
12	Bract width	BRW	Continuous	X	
13	Flower length	FLL	Continuous	X	
14	Dorsal sepal length	DSL	Continuous	X	
15	Dorsal sepal width	DSW	Continuous	X	
16	Lateral sepal length	LSL	Continuous	X	
17	Lateral sepal width	LSW	Continuous	X	
18	Lateral petal length	LPL	Continuous	X	
19	Lateral petal width	LPW	Continuous	X	
20	Lip length	LIL	Continuous	X	
21	Lip width	LIW	Continuous	X	
22	Spur length	SPL	Continuous	X	
23	Spur width	SPW	Continuous	X	
24	Rostellum length	RSL	Continuous	X	
25	Pedicel-ovary length	POL	Continuous	X	
26	Anther cap length	ACL	Continuous	X	

N°	Variables	Codes	States	Morphometrics	Character evolution
27	Anther cap width	ACW	Continuous	X	
28	Gynostemium length	GYL	Continuous	X	
29	Gynostemium width	GYW	Continuous	X	
30	Viscidium length	VIL	Continuous	X	
31	Stipites length	SIL	Continuous	X	
32	Leaf arrangement	LFAR	LFAR.imbricate; LFAR.subimbricate; LFAR.spaced		
33	Leaf shape	LFS	LFS.filiform; LFS.linear; LFS.narrowlyelliptic; LFS.elliptic; LFS.broadlyelliptic	X	
34	Leaf apex	LFA	LFA.notlobed; LFA.equallybilobed; LFA.notequallybilobed	X	
35	Leaf lobes shape	LFLS	LFLS.acute; LFLS.obtuse; LFLS.rounded	X	
36	Leaf color	LFCO	LFCO.green; LFCO.greygreen; LFCO.glaucous	X	
37	Leaf thickness	LFTH	LFTH.coriaceous; LFTH.notfleshy; LFTH.fleshy; LFTH.succulent	X	
38	Leaf margins	LFM	LFM.entire; LFM.undulate	X	
39	Leaf blade	LFB	LFB.flat; LFB.acicular; LFB.conduplicate	X	
40	Bract arrangement	BRA	BRA.imbricate; BRA.subimbricate; BRA.spaced	X	
41	Bract longer than pedicel	BRCP	BRCP.yes; BRCP.no	X	
42	Bract shape	BRS	BRS.ovate; BRS.broadlyovate; BRS.verybroadlyovate; BRS.depressedovate	X	
43	Bract apex shape	BRAP	BRAP.acuminate; BRAP.acute; BRAP.rounded; BRAP.apiculate; BRAP.mucronate; BRAP.obtuse		
44	Dorsal sepal shape	DSS	DSS.linear; DSS.narrowlytriangular; DSS.triangular		

N°	Variables	Codes	States	Morphometrics	Character evolution
45	Dorsal sepal apex shape	DSA	DSA.acuminate; DSA.acute; DSA.apiculate; DSA.longacuminate		
46	Lateral sepal shape	LSS	LSS.linear; LSS.narrowlyelliptic; LSS.triangular; LSS.narrowlytriangular		
47	Lateral sepal apex shape	LSA	LSA.acuminate; LSA.acute; LSA.apiculate; LSA.longacuminate		
48	Lateral petal shape	LPS	LPS.narrowlytriangular; LPS.triangular	X	
49	Lateral petal apex shape	LPA	LPA.acuminate; LSA.acute; LPA.longacuminate		
50	Lip shape	LIS	LIS.narrowlytriangular; LIS.triangular LIS.triangularovate;	X	
51	Lip apex shape	LIA	LIA.acuminate; LIA.acute; LIA.longacuminate		
52	Spur shape	SPS	SPS.pendent; SPS.straight; SPS.incurved; SPS.sigmoid	X	
53	Spur apex	SPA	SPA.curved; SPA.globulous; SPA.hooked; SPA.rounded; SPA.slender; SPA.twisted	X	
54	Viscidium structure	VITX	VITX.hyalin (0); VITX.hyalinindurated (1)	X	*
55	Stipites shape	SIA	SIA.thin (0); SIA.wide (1)	X	*
56	Stipites apex shape		Bilobed (0); Entire asymmetric acute (1); Entire symmetric obtuse (2); Entire symmetric acute (3)		*
57	Lateral lobes of rostellum shape	LLR	LLR.notwidened (0); LLR.widened above the narrow base (1); LLR.widened all along (2)	X	*
58	Insertion point of stipites		Halfway along the length of the viscidium (0); At the rear third of the length of the viscidium (1)		*
59	Ovary and fruit shape		Not triquetrous (0); Triquetrous with three smooth sides (1); Triquetrous with three ribbed sides (2); Rounded in cross section (3)		*

Appendix III-3. Taxon list of the 73 individuals sampled for the molecular analysis in the current study including the four outgroups species. Species are listed in alphabetical order. Specimens identifier is in front of species name. The herbarium cited in brackets indicates where the silica gel sample is currently housed. GenBank accession numbers are included for each of the six genic regions used in the current study (ITS, *trnL-trnF* intergenic spacer, *matK*, *rps16*, *trnC-petN* intergenic spacer and *ycf1*). An asterisk (*) indicates sequences newly generated in this study; an en-dash (-) indicates unsequenced regions. GenBank accession numbers for sequences of unpublished taxa are not provided and are indicated with an en-dash followed by an asterisk (-*).

INGROUPS: 216, *C. acuminata* (Rolfe.) Schltr., Príncipe, *D'hajjère & Balou Ostelino Rocha 216* (BRLU), MW549339*, MW549404*, MW549497*, MW549368*, MW549470*, MW549431*; **3914, *C. acuminata*** (Rolfe.) Schltr., Príncipe, *Stévant 245* (BRLU), MH237499, MH237115, MK685591, MW549367*, MW549469*, MW549430*; **300, *C. arcuata*** (Lindl.) Schltr. subsp. *arcuata*, origin unknown, *Bytebier 676* (EA), DQ091624, DQ091505, DQ091380, -, -, -; **1479, *C. arcuata*** subsp. *arcuata*, Kenya, cult. at Botanical Garden Meise BR 20090398-49 (BRLU), MH236958, MH237326, MK685430, MW423994*, MW424001*, MW424011*; **1481, *C. arcuata*** subsp. *arcuata*, origin unknown, cult. at Botanical Garden Meise BR 20090399-50 (BRLU), MH236959, MH237327, MK685431, MW549371*, MW549472*, MW549434*; **1585, *C. arcuata*** subsp. *arcuata*, Mozambique, *Arends 926* (BRLU), MW549341*, MW549405*, -, MW549370*, -, MW549433*; **2253, *C. arcuata*** subsp. *arcuata*, Cameroon, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2761* (BRLU), MW549340*, -, -, MW549369*, MW549471*, MW549432*; **5783, *C. arcuata*** subsp. *arcuata*, Rwanda, see Fischer & al. (2010: 162–163) (BRLU), MH237136, MH237520, MK685612, MW549372*, MW549473*, MW549435*; **220, *C. arcuata*** subsp. *whytei*, Rwanda, Farminhão in Jean-Paul Lebel's shadehouse series 220, plant in cultivation RWA139 (BRLU), MW549344*, MW549409*, -, MW549376*, -, -; **1575, *C. arcuata*** subsp. *whytei*, Ivory Coast, *van der Laan 769* (WAG), MW549343*, MW549408*, -, MW549375*, -, MW549438*; **2246, *C. arcuata*** subsp. *whytei* (Rolfe) Summerh., *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2862* (BRLU), -, MW549406*, -, MW549373*, MW549474*, MW549436*; **2254, *C. arcuata*** subsp. *whytei*, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 3599* (BRLU), MW423992*, -, MW424009*, MW423995*, MW424002*, MW424012*; **7026, *C. arcuata*** subsp. *whytei*, Cameroon, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 7026* (YA), MW549342*, MW549407*, -, MW549374*, -, MW549437*; **36, *C. aschersonii*** (Kraenzl.) Schltr., Gabon, *Farminhão & al. 36* (BRLU), -, -, -, MW549379*, -, MW549441*; **2387, *C. aschersonii***, Cameroon, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 1853* (BRLU), MH237100, MH237481, MK685574, MW423996*, MW424003*, MW424013*; **3850, *C. aschersonii***, Gabon, cult. at Tchimbélé shadehouse GB 220 Tchim (BRLU), MH237108, MH237492, MK685584, MW549378*, MW549476*, MW549440*; **5282, *C. aschersonii***, Cameroon, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5282* (BRLU), MW549345*, MW549410*, MW549498*, MW549377*, MW549475*, MW549439*; **18, *Cyrtorchis* aff. *aschersonii***, Gabon, *Farminhão & al. 18* (BRLU), -*, -*, -*, -*, -, -*; **7509, *C. brownii*** (Rolfe) Schltr., Cameroon, *Droissart 2161* (BRLU), MW549346*, MW549411*, *, MW549380*, MW549477*, *; **50, *C. chailluana*** (Hook.f.) Schltr., origin unknown, SEL hort. (1996-0294), *Carlswald 156* (SEL), DQ091625.1, DQ091506.1, -, MW549381*, -, MW549442*; **1503, *C. chailluana***, Cameroon, cult. at Botanical Garden Meise BR 19750114 (BRLU), MH236968.1, MH237337.1, MK685441, MK721986, MK697535, MK722018; **2245, *C. chailluana***, Cameroon, cult. at Yaoundé shadehouse Y1664 NT, MW549347*, MW549412*, *, MW549382*, MW549478*, MW549443*; **2252, *C. chailluana***, Cameroon, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 2488* (BRLU), MW549348*, -, -, MW549383*, -, MW549444*; **4954, *C. chailluana***, Gabon, *Stévant 4954* (BRLU), MW549351*, MW549415*, *, MW549386*, MW549481*, MW549447*; **5130, *C. chailluana***, Cameroon, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5130* (BRLU), MW549349*, MW549413*, *, MW549384*, MW549479*, MW549445*; **7344, *C. chailluana***, Cameroon, *Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 7344* (BRLU), MW549350*, MW549414*, MW549499*, MW549385*, MW549480*, MW549446*; **6031, *C. crassifolia*** Schltr., origin unknown, *Bakte s.n.* (BRLU), MW549352*, MW549416*, -, -, -, -; **4500, *C. hamata*** (Rolfe) Schltr., Guinea, cult. at Nimba shadehouse Nimba 222 (BRLU), -, -, -, MW549388*, MW424004*, MW549449*; **2251, *C. aff. guillaumetii* "Oku"**, Cameroon, *Simo & al. (Ombrière de*

Yaoundé) 2848 (BRLU), -*, -, -, -*, -*, -*; **6041, C. aff. *guillaumetii* "Oku"**, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5046 (BRLU), -*, -, -, -*, -*, -*; **6042, C. aff. *guillaumetii* "Oku"**, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5109 (BRLU), -*, -*, -*, -*, -*, -*; **7203, C. aff. *guillaumetii* "Oku"**, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 7164 (BRLU), -*, -*, -*, -, -, -*; **7163, C. aff. *guillaumetii* "Oku"**, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 7163 (BRLU), -*, -*, -*, -*, -*, -*; **6039, C. *hamata***, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4671 (BRLU), MW423993*, MW424008*, MW424010*, MW423997*, -, MW424014*; **6731, C. *hamata***, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 6731 (BRLU), MW549353*, MW549417*, MW549500*, MW549387*, MW549482*, MW549448*; **3821, C. *henriquesiana*** (Ridl.) Schltr., Gabon, cult. at Jardigab BTO 99 (BRLU), MH237104, MH237488, MK685580, MW549389*, MW549483*, MW549450*; **3909, C. *henriquesiana***, Gabon, MBG 1466 (BRLU), MH237114, MH237498, MK685590, MW549390*, -, MW549451*; **4597, C. *henriquesiana***, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 4597 (BRLU), MW549354*, MW549418*, -, -, -, *; **5959, C. *henriquesiana***, Príncipe, Droissart 5326-30 (BRLU), MW549355*, -, -, -, -, -; **1554, C. *injoloensis*** (De Wild.) Schltr., Gabon, Arends 972 (BRLU), MW549356*, MW549419*, -, MW549391*, -, MW549452; **2234, C. *letouzeyi*** Szlach. & Olszewski, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 253 (BRLU), MH237050, MH237425, MK685519, MW549392*, MW549484*, MW549453*; **100, C. *monteiroae*** (Rchb.f.) Schltr., Gabon, Farminhão & al. 100 (BRLU), MW549358*, MW549421*, MW549502*, -, -, MW549456*; **1484, C. *monteiroae***, Democratic Republic of the Congo, cult. at Botanical Garden Meise BR 19780623 (BRLU), MH236961, MH237330, MK685434, MW549393*, MW549486*, MW549455*; **5950, C. *monteiroae***, São Tomé, cult. at Bom Sucesso shadehouse 2142,1 (BRLU), MH237155, MH237539, MK685625, MW423998*, MW424005*, MW424015*; **7465, C. *monteiroae***, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 7465 (BRLU), MW549357*, MW549420*, MW549501*, -, MW549485*, MW549454*; **166, C. *neglecta*** Summerh., Rwanda, Farminhão in Gilbert Delepierre's shadehouse series 166 (BRLU), MW549359*, MW549422*, MW549503*, -, -, MW549457*; **169, C. *neglecta***, Rwanda, Farminhão in Gilbert Delepierre's shadehouse series 169 (BRLU), MW549360*, MW549423*, MW549504*, MW549394*, MW549487*, MW549458*; **271, C. *praetermissa*** Summerh. subsp. *praetermissa*, origin unknown, growing in Florida Museum of Natural History (FLMNH) greenhouse, Country Side Orchids 1559 (FLMNH), DQ091627, DQ091507, -, MW549395*, MW549488*, MW424016*; **4517, C. *praetermissa*** subsp. *praetermissa*, Rwanda, see Fischer & al. (2010: 168–169) (BRLU), MH237128, MH237512, MK685605, MW549396*, MW549489*, -; **5778, C. *praetermissa*** subsp. *praetermissa*, Rwanda, see Fischer & al. (2010: 168–169) (BRLU), MH237135, MH237519, MK685611, MW423999*, MW424006*, MW549459*; **6386, C. aff. *praetermissa***, Cameroon, cult. at Yaoundé shadehouse Y 6386DD, -*, -*, -*, -*, -, -; **30, C. *ringens*** (Rchb.f.) Summerh., Gabon, Farminhão & al. 30 (BRLU), -, -, *, MW549400*, MW549493*, MW549463*; **133, C. *ringens*** (Rchb.f.) Summerh., Rwanda, Farminhão, Stévant & Fischer 133 (BRLU), MW549366*, MW549428*, -, -, -, MW549464*; **168, C. *ringens***, Rwanda, Farminhão in Gilbert Delepierre's shadehouse series 168 (BRLU), -, MW549429*, *, -, -, MW549465*; **1951, C. *ringens***, Cameroon, Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 601 (BRLU), MW549361*, MW549424*, MW549505*, -, -, -; **2240, C. *ringens***, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3769 (BRLU), MH237051, MH237426, MK685520, MW549397*, MW549490*, MW549460*; **2400, C. *ringens***, Cameroon, Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 1898 (BRLU), MW549362*, MW549425*, MW549506*, -, -, -; **2696, C. *ringens***, Cameroon, Simo & al. (Ombrière de Yaoundé) 3287 (BRLU), MW549363*, MW549426*, MW549507*, -, -, -; **3817, C. *ringens***, Gabon, Stévant, Ngok Banak & Nguema 1147 (BRLU), -, -, -, MW549398*, MW549491*, MW549461*; **4498, C. *ringens***, Guinea, Spirit collection Nimba 733 (BRLU), MW549365*, -, -, MW549399*, MW549492*, MW549462*; **4516, C. *ringens***, Rwanda, see Fischer & al. (2010: 166–167) (BRLU), MH237127, MH237511, MK685604, MW549401*, MW549494*, MW424017*; **5784, C. *ringens***, Rwanda, see Fischer & al. (2010: 166–167) (BRLU), MH237137, MH237521, MK685613, MW424000*, MW424007*, MW549466*; **6054, C. *ringens***, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3842 (BRLU), MW549364*, MW549427*, *, -, -, -; **6043, C. aff. *ringens* sp1**, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5618 (BRLU), -*, -*, -*, -*, -, -; **6047, C. aff. *ringens* sp1**, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 3758 (BRLU), -*, -*, -*, -*, -*, -*; **6918, C. aff. *ringens* sp1**, Cameroon, Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 6918

(BRLU), —*, —*, —*, —*, —*, —*; **2243**, *C. aff. ringens sp2*, Cameroon, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé)* 3859 (BRLU), MH237053, MH237428, MK685522, —*, —, —*; **275**, *C. aff. ringens sp3*, Rwanda, cult. at Rwanda shadehouse series and pictures from *Farminhão 275* (BRLU), —*, —*, —*, —*, —*, —*; **276**, *C. aff. ringens sp3*, Rwanda, cult. at Rwanda shadehouse series and pictures from *Farminhão 276* (BRLU), —*, —*, —, —*, —*, —*. — **OUTGROUPS**: **5984**, *Rangaeris longicaudata* (Rolfe) Summerh., Gabon, Gabon shadehouse series 668, cultivated at Jardi-Gab BTO 181 (BRLU), MH237161, MH237546, —, MW549402*, —, MW549467; **2353**, *Podangis dactyloceras* (Rchb.f.) Schltr., Cameroon, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé)* 2353 (BRLU), MH237089, MH237469, MK685562, *, MW436176, MW436347; **2327**, *Rhipidoglossum rutilum* (Rchb.f.) Schltr., Cameroon, *Simo & al. (Ombrière de Yaoundé)* 2327 (BRLU), MH237079, MH237459, MK685552, MW549403*, MW549495*, MW549468*; **282**, *Ypsilopus longifolius* (Kraenzl.) Summerh., origin unknown, MO4274452 (NY), MH237190, MH237578, —, MK722000, MK697532, MK722032.

Appendix III-4. Diagnostic characters for the 27 identified morphospecies of the genus *Cyrtorchis*. The most discriminant features are represented in bold.

Sections	Species hypothesis	Diagnosis
Homocollet icon	<i>Cyrtorchis injoloensis</i> (De Wild.) Schltr.	Long narrowly elliptic and not fleshy leaves ranging from 15–40 cm long with obtuse lobes apex , inflorescence 18.5–30 cm long, loose at the base and dense towards the apex, densely flowered (15–20 flowered) with imbricate bract longer than the pedicel , pollinia flattened
	<i>Cyrtorchis ringens</i> (Rchb.f.) Summerh.	Imbricated ligulate or narrowly elliptic leaves, 1.2–3.8 cm wide, coriaceous , more or less equally bilobed at apex , lobes broadly rounded at the apex, dense inflorescences, 5.3–22.5 cm long, up to 21 flowered . It differs from <i>C. injoloensis</i> by having spaced bracts usually depressed ovate and shorter than the pedicel .
	<i>Cyrtorchis henriquesiana</i> (Ridl.) Schltr.	Filiform and acicular leaves not lobed, short inflorescences (0.8–4.3 cm long), about 2–6 flowered, acute apex of floral parts
	<i>Cyrtorchis brownii</i> (Rolfe) Schltr.	Fleshy non-imbricate ligulate leaves, very dense inflorescences (7–9 cm long), up to 14- flowered, broadly ovate and imbricated or overlapping bracts almost covering half of the flower. Linearly shaped sepals
	<i>Cyrtorchis praetermissa</i> Summerh.	Linear, fleshy leaves, V shaped in cross section, but rather narrow and stiff in texture . Inflorescences less dense. Flowers in this species are similar to that of <i>C. brownii</i> but have relatively small, depressed ovate bracts (2.5–5 mm long). Slender to round apex of spur.
	<i>Cyrtorchis praetermissa</i> subsp. <i>zuluensis</i> (E.R.Harrison) H.P.Linder	Close to type species but differing by flattened broader leaves rather than conduplicate.
	<i>Cyrtorchis crassifolia</i> Schltr.	Short stem, grey-green conduplicate leaves. Close to <i>C. submontana</i> with smaller leaves but differing by imbricate grey-green and succulent leaves . Inflorescences and flowers resemble those of <i>C. brownii</i> but differ in having smaller, white bracts shorter than the pedicel.

Sections	Species hypothesis	Diagnosis
	<i>Cyrtorchis monteiroae</i> (Rchb.f.) Schltr.	Spaced non fleshy broadly elliptic or oblanceolate leaves 2.6–5 cm wide with undulate margins . It is very close to <i>C. chailluana</i> (which is of the other section <i>Cyrtorchis</i>) in vegetative features but has rather longer spaced inflorescences (6.2–5 cm long) with small spaced bracts and small flowers with short (2–42.5 cm long) incurved spur. Longer rostellum (up to 6 mm) and anther cap (up to 5 mm) .
	<i>Cyrtorchis submontana</i> Stévant, Droissart & Azandi	Elliptic to narrowly elliptic leaves close to <i>C. guillaumetii</i> but differs by having thinner leaves, fewer flowers (1–5) , less curved and shorter inflorescences (1–5.3 cm long). <i>C. submontana</i> is also close to <i>C. brownii</i> but differs by having small elliptic leaves and shorter inflorescences with spaced bracts and flowers.
	<i>Cyrtorchis guillaumetii</i> (Pérez-Vera) R.Rice	Inflorescence loose-flowered at the base and densely flowered near the apex, spur slender at the apex and anther cap up to 1.5 mm long often orbicular little or not extended forwards, rostellum 1.5–2 mm long.
Cyrtorchis	<i>Cyrtorchis arcuata</i> subsp. <i>arcuata</i> (Lindl.) Schltr.	Oblong or narrowly elliptic leaves with inflorescences ranging from 4.2–19 cm long with 5–13 spaced flowers and straight or incurved spur 2.7–5.7 cm long .
	<i>Cyrtorchis acuminata</i> (Rolfe) Schltr.	Very close to <i>C. arcuata</i> but seems to have broader leaves (3–4.2 cm wide) and fairly large bracts (1.7–2.5 × 1.3–1.8 cm) , longer spur (3.4–5.5 cm long) and a broader part of the viscidium.
	<i>Cyrtorchis arcuata</i> subsp. <i>whytei</i> (Rolfe) Summerh.	Close to the type species in general vegetative aspects but longer sigmoid sometimes incurved spur (5.6–8.5 cm long) approaching that of <i>C. chailluana</i> .
	<i>Cyrtorchis aschersonii</i> (Kraenzl.) Schltr.	Close to <i>C. praetermissa</i> by its erect stem with imbricate linear and conduplicate leaves or V-shaped in cross section but differing in the fleshy leaf texture , erect inflorescences 1.3–12.5 cm long, large, subimbricate bracts (5.5–17 × 8–17 mm) , short, sigmoid or curved spur (1.7–4.5 cm long) with slender acute apex, triangular shape and acute apex of floral parts with lip ovate at the base. The

Sections	Species hypothesis	Diagnosis
		hardened upper part of the viscidium in this species is the shortest and broader of the genus.
	<i>Cyrtorchis chailluana</i> (Hook.f.) Schltr.	Vegetatively close to <i>C. monteiroae</i> with long stem and generally undulated leaves margins but differs in the relatively large flowers with the longest pendulous spur of the genus hanging up to 16 cm long . It also differs from <i>C. arcuata</i> by having an indurated upper part longer than the hyaline part which is the reversed case in the former.
	<i>Cyrtorchis hamata</i> (Rolfe) Schltr.	Vegetatively close to <i>C.</i> subsp. <i>whytei</i> but leaves narrowed towards the apex . It also differs by having short spurs with hooked apex .
	<i>Cyrtorchis letouzeyi</i> Szlach. & Olszewski	Oblong or narrowly elliptic glaucous or dark-green leaves. It closely resembles <i>C. chailluana</i> in all floral parts but differs by the shorter sigmoid , rarely pendulous spur (5.7–9.5 cm long) rolled up or twisted at the apex.
	<i>Cyrtorchis neglecta</i> Summerh.	Very close to <i>C. arcuata</i> but differs in its thinner leaves resembling those of <i>C. aschersonii</i> but not conduplicate, small flowers with acuminate sepals and petals, triangular lip and relatively long spur (2.2–5.5 cm)
	<i>Cyrtorchis seretii</i> (De Wild.) Schltr.	Imbricate and fleshy linear leaves with flattened margins, inflorescences shorter than the subtending leaves, 7–9 flowered , bract 1.2–1.8 cm long and straight or S-shaped spur, 4–6.5 cm long.
	<i>Cyrtorchis glaucifolia</i> Summerh.	Very close to <i>C. neglecta</i> regarding the pollinarium structure This species is characterised by its narrower (up to 1 cm wide), glaucous leaves and its noticeably S-shaped spurs.
	<i>Cyrtorchis erythrae</i> (Rolfe) Schltr.	Close to <i>C. seretii</i> in general aspects but since we only have fruiting material, we cannot clearly differentiate it from the other species.
Potentially new taxa (sect.	<i>Cyrtorchis</i> spec. A (aff. <i>guillaumetii</i> "Oku")	Close to <i>Cyrtorchis submontana</i> but differs by having longer and larger (4.6–9.4 × 1.4–2.7 cm) leaves, longer inflorescences up to 10 cm long usually densely flowered. It is also close to <i>Cyrtorchis guillaumetii</i> (Perez-Vera) R.Rice but the

Sections	Species hypothesis	Diagnosis
<i>Homocolletia</i> (con)		inflorescence is not loose at its base but has rather flowers distributed all along, longer flowers (3–4.7 cm long), broadly-ovate (6.5–12.5 mm long) bracts and spurs rounded at the apex.
	<i>Cyrtorchis</i> spec. B (aff. <i>aschersonii</i>)	Erect stem and fleshy linear leaves like in <i>C. aschersonii</i> but differs by having a uniformly hyaline viscidium with thin apex of stipites, broadly ovate bracts longer than the short pedicel (9 mm long) , sepals and petals acuminate recurved at the apex, curved to straight spur, pollinia dorso-ventrally flattened
	<i>Cyrtorchis</i> spec. C (aff. <i>ringens</i> sp1)	Close to <i>C. ringens</i> by imbricate coriaceous more or less equally bilobed leaves but differs by having linear leaves (0.9–1.8 cm wide) and short, few flowered inflorescences .
	<i>Cyrtorchis</i> spec. D (aff. <i>ringens</i> sp2)	Elliptic to narrowly elliptic leaves with equally bilobed apex, loose inflorescences with spaced, depressed ovate bract longer than the pedicel and acute apex of sepals and petals like in <i>C. injoloensis</i> . Pollinia dorso-ventrally flattened
	<i>Cyrtorchis</i> spec. E (aff. <i>ringens</i> sp3)	Ascending stem, spaced linear leaves with wrinkled surface , dense inflorescence, 4–7 cm long with 5–8 flowers
	<i>Cyrtorchis</i> spec. F (aff. <i>praetermissa</i>)	Close to <i>C. praetermissa</i> in all aspects but differs by having longer inflorescences up to 14.6 cm , larger flowers with broadly ovate bracts (4–11 x 7–12 mm long) with globular , rarely rounded apex of the spur.

Appendix III-5. Percentage of variance and cumulative percentage of variance explained by the four first axes and loading of variables on these four-principal components of the Hill and Smith analysis with discrete characters on the 171 specimens of the genus *Cyrtorchis*. Values in bolds are the highest loadings of the principal component and those followed by the symbol * are the highest loadings of the principal component included in the scatter plots.

Variables	Principal component 1	Principal component 2	Principal component 3	Principal component 4
Percentage of variance	32.01	8.70	7.37	5.89
Cumulative percentage of variance	32.01	40.71	48.08	53.96
SPS.pendent	-2.03*	-0.37	-0.34	0.60
BRS.ovate	-1.65*	-0.08	-0.03	0.02
LSA.longacuminate	-1.36*	0.03	0.04	0.33
SPA.hooked	-1.34*	-0.13	0.15	-0.77
SPA.twisted	-1.12*	0.63	0.12	1.92*
LFS.elliptic	1.14	0.52	1.90*	2.30*
LFCO.glaucous	-1.12	0.63	0.12	1.92
LFCO.greygreen	1.14*	0.52	2.18*	2.55*
LFTH.succulent	1.14	0.52	2.18	2.55
LFM.undulate	-0.99	-0.89	-0.49	-0.45
LFA.notlobed	0.50	2.74*	-2.69*	-0.69
LFB.acicular	0.64	2.55*	-2.54	-0.56
LFS.filiform	0.57	2.51	-2.50	-0.60
LFLS.acute	0.52	2.38	-2.22	-0.60
LSA.apiculate	0.21	1.28	2.23*	-1.03*
LFS.broadlyelliptic	-0.38	-1.45*	-0.60	-1.23*
LIS.triangularovate	0.20	1.28*	1.91*	-1.27*
BRA.imbricate	0.63	1.24*	-1.14*	-0.83
SPA.curved	-0.51	1.13	-0.73	0.08
BRCP.yes	0.72	-1.12*	-0.10	-1.45*
LFTH.notfleshy	-0.19	-1.07	-0.31	-1.20*
BRA.subimbricate	0.17	0.75	1.31*	-0.55
LFLS.obtuse	-0.26	-0.15	0.49	-1.19*
LFB.conduplicate	0.54	0.75	1.12	-0.35
SPA.globulous	0.88	-0.63	0.06	0.47
SPA.rounded	0.39	-0.38	-0.48	-0.12
SPA.slender	-0.04	0.31	0.81	-0.06
VITX.hyalin	0.66	-0.23	-0.35	0.05
VITX.hyalinindurate	-0.93	0.33	0.49	-0.07
SIA.thin	0.79	-0.09	-0.32	0.21
SIA.wide	-0.83	0.10	0.33	-0.22
LLR.notwide	0.66	-0.23	-0.35	0.05
LLR.wide	-0.93	0.33	0.49	-0.07
LFS.linear	0.37	0.36	0.83	-0.42
LFS.narrowlyelliptic	-0.19	-0.33	0.06	0.10
LFCO.green	0.04	-0.05	-0.04	-0.17
LFLS.rounded	0.05	-0.19	0.02	0.58
LFTH.coriaceous	0.75	-0.74	-0.39	0.59
LFTH.fleshy	-0.24	0.43	0.12	-0.03

LFA.equallybilob	0.76	-0.73	-0.40	0.59
LFA.notequallybilob	-0.23	0.07	0.24	-0.13
LFM.entire	0.14	0.12	0.07	0.06
LFB.flat	-0.18	-0.36	-0.10	0.12
BRA.space	-0.14	-0.36	-0.07	0.25
BRS.broadlyovate	-0.65	0.05	0.40	-0.16
BRCP.no	-0.04	0.07	0.006	0.09
BRS.depressedovate	0.68	0.34	-0.49	-0.09
BRS.verybroadlyovate	-0.06	-0.23	0.12	0.13
LSA.acuminate	0.57	-0.35	-0.02	0.008
LSA.acute	0.57	0.70	-0.06	-0.44
LIS.narrowlytriangular	-0.56	-0.34	-0.05	0.01
LIS.triangular	0.24	-0.01	-0.25	0.17
SPS.incurved	0.13	-0.27	-0.38	-0.26
SPS.sigmoid	-0.18	0.41	0.66	0.36
SPS.straight	0.72	0.11	-0.08	-0.14
DSL	-0.91	-0.09	0.001	0.08
LSL	-0.93	-0.10	0.007	0.07
LPL	-0.90	-0.13	-0.01	0.09
LIL	-0.91	-0.10	-0.02	0.06
LFW	-0.51	-0.64	-0.04	-0.09
LFL	-0.44	-0.27	-0.07	-0.59
INL	-0.23	-0.67	-0.05	-0.40
DTFL	-0.71	-0.38	-0.003	-0.17
NFL	0.19	-0.60	0.02	-0.33
BRL	-0.84	0.07	0.16	-0.02
BRW	-0.81	0.19	0.12	-0.13
FLL	-0.83	-0.008	-0.12	0.27
DSW	-0.89	0.16	-0.09	-0.07
LSW	-0.81	0.12	-0.08	-0.12
LPW	-0.86	0.11	-0.01	-0.05
LIW	-0.84	0.19	0.01	-0.03
SPL	-0.80	-0.01	-0.13	0.29
SPW	-0.82	0.08	-0.10	0.05
RSL	-0.76	-0.05	-0.38	0.11
POL	-0.90	0.18	-0.01	0.01
ACL	-0.93	-0.02	-0.11	0.06
ACW	-0.62	0.15	-0.23	-0.08
GYL	-0.77	0.11	-0.10	0.16
GYW	-0.81	0.10	-0.07	-0.07
VIL	-0.65	-0.11	-0.34	0.03
SIL	-0.83	0.002	-0.21	0.13

Appendix III-6. Percentage of variance and cumulative percentage of variance explained by the two first axes and loading of variables on these two-principal components of PCA analysis with discrete characters on the 171 specimens of the genus *Cyrtorchis*. Values in bolds are the highest loadings of the principal component and those followed by the symbol * are the highest loadings of the principal component included in the scatter plots.

Variables	Principal component 1	Principal component 2	Principal component 3
Percentage of variance	61.884	9.968	4.801
Cumulative percentage of variance	61.88	71.85	76.65
LFL	-0.46	-0.58	0.45
LFW	-0.51	-0.58	-0.12
INL	-0.25	-0.91	-0.03
DFTL	-0.72	-0.44	-0.09
NFL	0.18	-0.84	0.02
BRL	-0.82	-0.01	-0.04
BRW	-0.80	0.03	0.12
FLL	-0.83	0.11	-0.41
DSL	-0.92	-0.02	-0.17
DSW	-0.91	0.13	0.22
LSL	-0.93	-0.03	-0.16
LSW	-0.83	0.04	0.29
LPL	-0.91	-0.05	-0.15
LPW	-0.88	0.09	0.23
LIL	-0.92	-0.02	-0.15
LIW	-0.84	0.16	0.20
SPL	-0.81	0.12	-0.42
SPW	-0.84	0.14	0.09
RSL	-0.79	-0.003	-0.19
POL	-0.91	0.16	0.01
ACL	-0.93	-0.01	-0.06
ACW	-0.65	0.13	0.32
GYL	-0.78	0.09	0.33
GYW	-0.82	0.15	0.20
VIL	-0.69	-0.07	-0.13
SIL	-0.85	0.03	-0.14

Appendix III-7. Morphological character matrix used for the ancestral character-state reconstructions of the genus *Cyrtorchis*. Full character names are as follow: Viscidium structure: uniformly linear with hyaline texture (0), broad indurated upper part and thin hyaline part (1); Stipites shape: enlarged toward the apex (0), thinner toward the apex (1); Stipites apex shape: bilobed (0), entire asymmetric acute (1), entire symmetric obtuse (2), entire symmetric acute (3); Lateral lobes of rostellum shape: not widened, almost parallel-sided (0), widened just above the very narrow base (1), widened all along (2); Insertion point of stipites: halfway along the length of the viscidium (0), at the rear third of the length of the viscidium (1); Ovary and fruit shape: not triquetrous not ribbed (0), triquetrous with three smooth sides (1), triquetrous with three ribbed sides (2), rounded in cross section (3).

Specimens	Viscidium structure	Stipites shape	Shape of the lateral lobes of rostellum	Insertion point of the stipites	Ovary and Fruit	Stipites apex shape

<i>Cyrtorchis acuminata</i> _TD216	1	1	1	1	1	0
<i>Cyrtorchis aff aschersonii</i> _JF18	0	0	0	1	1	1
<i>Cyrtorchis aff ringens</i> _sp2_CAM2243	0	0	0	1	1	1
<i>Cyrtorchis aff ringens</i> _sp3_JF275	0	0	0	1	2	1
<i>Cyrtorchis arcuata</i> _subsp_arcuata_R WA5783	1	1	1	1	1	0
<i>Cyrtorchis arcuata</i> _subsp_whytei_CO T1575	1	1	1	1	1	0
<i>Cyrtorchis aschersonii</i> _CAM2387	1	1	1	1	1	0
<i>Cyrtorchis brownii</i> _CAM7509	0	0	0	1	0	1
<i>Cyrtorchis aff ringens</i> _sp1_CAM6047	0	0	0	1	1	3
<i>Cyrtorchis chailluana</i> _B50	1	1	1	1	1	0
<i>Cyrtorchis crassifolia</i> _6031	0	0	0	1	2	2
<i>Cyrtorchis hamata</i> _CAM6039	1	1	1	1	1	0
<i>Cyrtorchis henriquesiana</i> _GAB3821	0	0	0	1	2	1
<i>Cyrtorchis injoloensis</i> _GAB1554	0	0	0	1	2	1
<i>Cyrtorchis letouzeyi</i> _CAM2234	1	1	1	1	2	0
<i>Cyrtorchis monteiroae</i> _SAT5950	0	1	0	1	2	0
<i>Cyrtorchis neglecta</i> _JF166	1	1	1	1	1	0
<i>Cyrtorchis aff praetermissa</i> _CAM638 6DD	0	0	0	1	2	2
<i>Cyrtorchis praetermissa</i> _RWA5778	0	0	0	1	2	2
<i>Cyrtorchis ringens</i> _CAM2240	0	0	0	1	1	3
<i>Cyrtorchis aff guillaumetii</i> _sp_Oku_CAM6042	0	0	0	1	1	3
<i>Rangaeris longicaudata</i> _GAB5984	0	1	2	0	3	0

Appendix III-8. Feature and statistics of DNA datasets used in this study for each marker

Datasets statistics	<i>nrITS</i>	<i>matK</i>	<i>rps16</i>	<i>trnC-petN</i>	<i>trnL_trnF</i>	<i>ycf1</i>	Plastid	Combined
Number of taxa	21	18	20	16	21	19	21	21
Number of accessions	67	45	57	45	63	62	72	73
Aligned characters	380	1868	1005	932	532	1841	6178	6558
Identical sites	273	1612	805	324	357	1477	1533	1205
% of identical site	78.7%	86.8%	81.2%	34.9%	73.2%	80.6%	24.8%	18.4%
Outgroups	4	3	4	3	4	4	4	4

III.2 CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA BIOLOGIE DE REPRODUCTION DU GENRE *CYRTOCHIS*

Après avoir établi les limites entre les espèces grâce à l'approche intégrative abordée aux points précédents (III.1.2 et III.1.3), nous avons entrepris d'investiguer la biologie de la reproduction du genre à travers l'étude phénologique de 15 taxons en ombrière et l'observation des pollinisateurs de deux espèces cibles dans leurs habitats naturels. Nous avons ciblé une nouvelle espèce délimitée grâce aux études taxonomiques et phylogénétiques précédentes pour étudier les pollinisateurs du genre *Cyrtorchis* afin de confirmer le syndrome sphingophile suggéré pour ce genre il y a plusieurs années par Cribb (1989). Le suivi phénologique en ombrière réalisé sur trois années consécutives révèle que les espèces du genre *Cyrtorchis* fleurissent entre février et décembre et qu'un décalage de la floraison est observé chez certains taxons distribués en sympatrie et un asynchronisme de la floraison entre populations de la même espèce. Les résultats sur les patrons de floraison des espèces sont présentés dans la section III.2.1. Les résultats sur le syndrome de pollinisation de l'autre espèce cible à savoir *Cyrtorchis letouzeyi* sont présentés à la suite de l'article sur la nouvelle espèce III.2.2.

III.2.1 CARACTÉRISATION DES PATRONS DE FLORAISON DES ESPÈCES À L'OMBRIÈRE DE YAOUNDÉ

Le suivi de la floraison de 15 taxons de *Cyrtorchis* réalisé pendant trois années (2017, 2018 et 2019) à l'ombrière de Yaoundé a permis d'enregistrer les évènements de floraison chez 494 spécimens vivants représentant 15 taxons. En 2017, 432 spécimens représentant 14 taxons ont été monitorés et 151 évènements de floraison ont été enregistrés chez 11 taxons. En revanche, en 2018, 131 évènements de floraison chez 12 taxons ont été enregistrés à l'issue du suivi de 471 spécimens représentant les 15 taxons. En 2019, 485 spécimens représentant 15 taxons ont été monitorés et 114 évènements de floraison ont été enregistrés chez 10 taxons (voir **Tableau I-1** & **Tableau III-3**). Les résultats du suivi phénologique montrent que la floraison a démarré plus tôt en 2017 et en 2019 entre février et octobre en 2017 et jusqu'en novembre 2019 ; alors qu'en 2018, la floraison s'est étalée de mai à décembre (**Figure III-26**). Le pic de floraison s'est produit en juin et en août, ce qui correspond à la grande saison des pluies dans la zone de Yaoundé. Six espèces ont fleuri de manière synchrone durant cette période.

Tableau III-3. Phénologie de la floraison par taxon suivi à l'ombrière de Yaoundé durant les trois années. Le symbole (-) indique que l'espèce n'était pas encore en culture à l'ombrière.

Taxon	Nbre d'individus en culture	Nbre d'individus fleuris		
		Année	2017	2018
	-			
<i>Cyrtorchis arcuata</i>	6	3	4	4
<i>Cyrtorchis arcuata</i> subsp <i>whytei</i>	5	0	1	0
<i>Cyrtorchis aschersonii</i>	121	55	66	54
<i>Cyrtorchis brownii</i>	5	1	1	1
<i>Cyrtorchis aff praetermissa</i>	1	-	0	0
<i>Cyrtorchis chailluana</i>	70	14	8	12
<i>Cyrtorchis hamata</i>	19	2	1	4
<i>Cyrtorchis henriquesiana</i>	4	0	1	0
<i>Cyrtorchis letouzeyi</i>	43	8	8	5
<i>Cyrtorchis monteiroae</i>	41	9	8	11
<i>Cyrtorchis ringens</i>	105	31	25	20
<i>Cyrtorchis aff ringens sp1</i>	40	17	5	2
<i>Cyrtorchis aff ringens sp2</i>	1	1	0	0
<i>Cyrtorchis okuensis</i>	32	10	3	1
<i>Cyrtorchis submontana</i>	1	0	0	0
Total	494	151	131	135

A l'échelle de l'espèce, le pourcentage mensuel cumulé de spécimens en fleurs entre 2017 et 2019 (**Figure III-27**) montre que chaque taxon a son propre pic de floraison qui peut varier d'un taxon à un autre. Certaines espèces ont une période de floraison courte qui s'étale sur trois mois (*C. letouzeyi* entre mai et juillet et *C. okuensis* entre avril et juin et *C. monteiroae* entre août et octobre) qui s'étalent sur trois mois (**Figure III-27**). D'autres espèces ont cependant une période de floraison plus longue comme *C. chailluana* et *C. aschersonii* qui s'étale de mai à novembre. En effet, nous pouvons prendre comme exemple les variables suivantes de pic de floraison des espèces. Chez *C. okuensis*, le pic de floraison se situe en mai et celui de *C. letouzeyi* en juin, suivi de celui de *C. aschersonii* en juillet ; puis *C. monteiroae* et *C. chailluana* en août et celui de *C. ringens* et de *C. aff ringens sp1* en octobre.

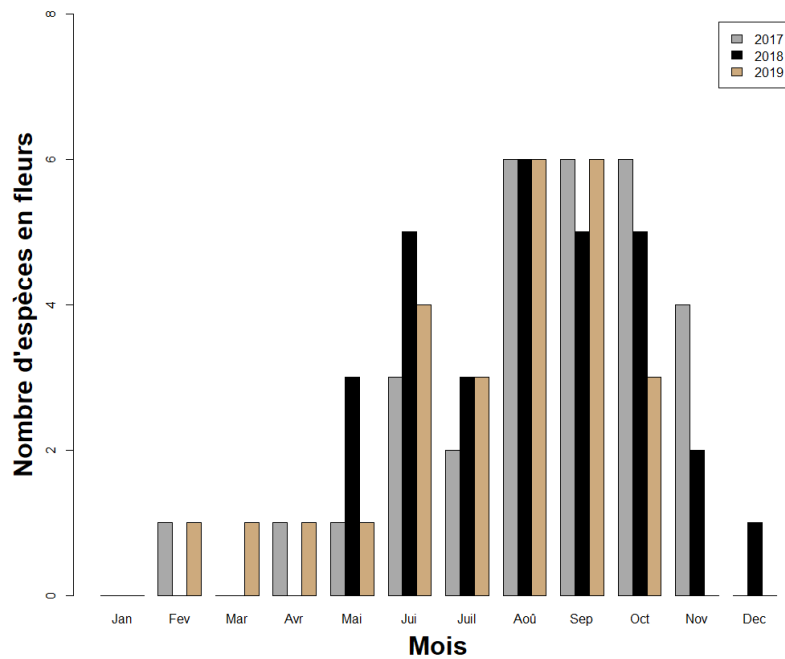


Figure III-26. Floraison cumulée des 15 taxons en culture à l’ombrière de Yaoundé entre 2017 et 2019.

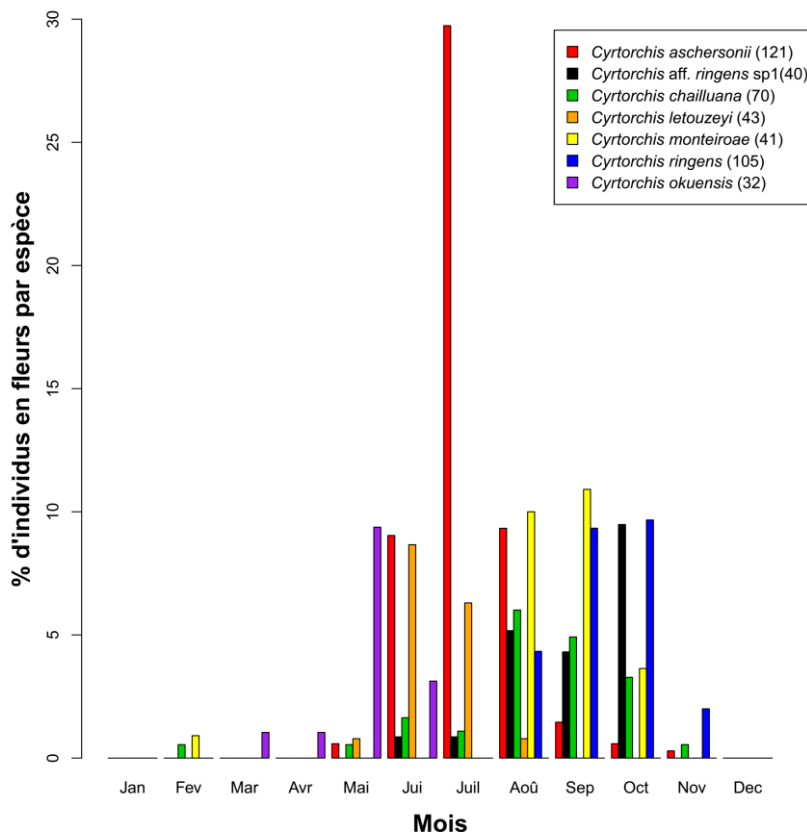


Figure III-27. Pourcentages mensuels observés de la floraison de chaque espèce dans l’ombrière de Yaoundé sur la période de trois ans, de 2017 à 2019 inclus. Le nombre total d’individus par espèce étudiée est indiqué entre parenthèses. Seules sept espèces ayant au moins 30 individus cultivés dans l’ombrière ont été prises en compte.

III.2.2 CARACTÉRISATION DE L'ÉCOLOGIE ET DE LA BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DE DEUX ESPÈCES DE *CYRTORCHIS*

III.2.2.1 PHENOLOGIE, SYNDROME DE POLLINISATION ET POLLINISATEUR CHEZ *CYRTORCHIS OKUENSIS*

Description and pollination ecology of *Cyrtorchis okuensis* (Orchidaceae, Angraecinae), a new orchid species endemic to the Cameroon Volcanic Line

Azandi N.L., Stévant T., Sonké B., Simo-Droissart M., D'haijère T., Droissart V.

Manuscript en révision dans la revue *Plant Ecology and Evolution*.

ABSTRACT

Background and aims – Recent taxonomic and molecular studies recovered the monophyly of the genus *Cyrtorchis* along with three new taxa. One of these new taxa is endemic to the Cameroon Volcanic Line (CVL), and has been frequently confused with *C. guillaumetii*, *C. brownii*, and *C. submontana* because of their similarity in several vegetative and floral traits. The description of the new species and its conservation status are provided along with information on its ecology and reproductive biology.

Material and methods – Twenty one herbarium preserved specimens were carefully examined using standard practices of herbarium taxonomy under the light of morphometric and phylogenetic evidence from a previous study. The conservation status of the new species was assessed based on the IUCN Red List Categories and Criteria. Furthermore, we investigated the reproductive biology of *C. okuensis* in an easily accessible subpopulation in Cameroon and tested the hypothesis of hawkmoth pollination in the genus *Cyrtorchis*.

Key results – The newly discovered species, here named *C. okuensis*, is restricted to the montane forest zone (1600 to 2500 m elevation) of the CVL and is currently assessed as Near Threatened (NT) following the IUCN Red List Categories and Criteria. Among angraecoid orchids (~800 species), *C. okuensis* has the shortest nectar spurs among all species in which hawkmoth pollination is recorded. *In situ* observations revealed short-proboscid hawkmoths of the genus *Hippotion*. (*H. celerio*, *H. eson*, and *H. osiris*) as the main pollinators. The reproductive success under natural conditions was low and among the 448 surveyed flowers only 39% had their pollinia removed and 16% set mature fruits.

Conclusion – Improved *in situ* and *ex situ* conservation strategies should be implemented to reduce threats on host tree species of *C. okuensis*, and, more broadly on montane forest of the CVL.

Keywords – Angraecoids; epiphyte; hawkmoth; IUCN Red List Categories and Criteria; pollination; systematics

III.2.2.1.1 INTRODUCTION

Cyrtorchis Schltr. is an angraecoid genus comprising about 18 species (Govaerts et al. 2020) distributed throughout tropical and southern Africa and in the Gulf of Guinea islands (Pridgeon et al. 2014; Stewart et al. 2006). Recently, a near-comprehensive generic phylogenetic study of African angraecoid orchids confirmed the monophyly of the genus (Simo-Droissart et al. 2018). Species delimitation remains a challenging task within *Cyrtorchis* and the increase of available specimens blurring boundaries between taxa call for a taxonomic revision of this genus. To this purpose, recent morphological investigations were conducted to produce a short revision of the Central African species of *Cyrtorchis* (Azandi et al. 2016). This synopsis enabled the clarification of some taxonomic uncertainties, but highlighted two remaining species complexes (i.e. *C. arcuata* complex, and *Cyrtorchis ringens* complex (including *C. ringens* (Rchb.f.) Summerh. and all its heterotypic synonyms)) that needed to be addressed before undertaking a global revision of the genus.

A more comprehensive study was then conducted including species of these complexes, using morphological and molecular data, to test the monophyly of the sections and most of the currently published taxa (Azandi et al. sous presse). This study confirmed the monophyly of *Cyrtorchis* sect. *Cyrtorchis* and that of eight morphologically well defined taxa, including three novelties. Among these, one is endemic to the Cameroon Volcanic Line (CVL). Some of the specimens ascribable to this taxon have been wrongly identified as *C. guillaumetii* ((Perez-Vera R.Rice, *C. brownii* Rolfe Schltr., or *C. submontana* Stévant, Droissart & Azandi because of the similarities in some of their floral and vegetative features. Thanks to the phylogenetic analyses, including DNA accessions from *C. brownii* and the new species previously named *C. aff guillaumetii* "Oku", confirmed its monophyly and unique position within the genus clearly differentiated from the above related species. This novelty is represented by several herbarium specimens, most of which resulting from recent collections in Cameroon.

Continental African angraecoids orchids include a high proportion of species characterised by white, long-spurred, nectariferous, and night-fragrant flowers, which are typical of hawkmoth pollination or sphingophily (Martins & Johnson 2007, Micheneau et al. 2009). To date, a few studies have been conducted on this pollination syndrome in Eastern Africa (Martins & Johnson 2007, 2013), in South Africa (Luyt & Johnson 2001; Johnson & Raguso 2016; Johnson et al. 2017), and Madagascar (Nilsson et al. 1985, 1987, 1992; Nilsson 1992, 1998; Wasserthal 1997). However, in Central Africa, no detailed study on angraecoid orchid pollination has been published so far. Ultimately, to improve our ability to develop integrated conservation approaches, information on the reproductive biology of these orchids is crucially needed. Indeed, informations on the pollination of endangered species would enable the identification and description of interactions between these plants and their pollinator as

well as factors limiting their reproduction in order to propose adequate conservation measures for the preservation of pollinator's diversity as well as that of plants dependent on their ecosystem services (Senapathi et al., 2015).

During our field trips in Cameroon in May 2017, we discovered a large subpopulation of the new species in Oku National Park (North West Region) with abundant and easily accessible specimens (i.e. epiphytic on small trees, at shoulder height), suitable for pollination studies and ecological surveys. This species provided us the opportunity to test the hypothesis of Cribb (1989) suggesting that the considerable resemblance of flowers in the genus *Cyrtorchis* derives from a common pollination syndrome related to hawkmoths (sphingophily). This hypothesis remains unverified to date.

The present contribution intends to describe the new *Cyrtorchis* species based on the latest phylogenetic and morphological investigations of the genus *Cyrtorchis* (Azandi et al. sous presse) and to describe aspects of its pollination ecology. Here, we provide the first evidence and description of the reproductive biology of an angraecoid orchid species from Central Africa, which was hypothesized to include only sphingophilous species 30 years ago.

III.2.2.1.2 MATERIAL AND METHODS

III.2.2.1.2.1 TAXONOMY

Material – Taxonomic work is based on a detailed examination of 21 specimens of *Cyrtorchis okuensis*, which have been collected in different locations in Cameroon, Equatorial Guinea and Nigeria along the CVL. Specimens include both pressed and spirit-preserved samples and are deposited in the following herbaria: BRLU, FHI, K, MA, P, WAG and YA (acronyms according to Thiers 2020). About 70% of the flowering, spirit-preserved, specimens were collected by our team in Central Africa (Cameroon, Equatorial Guinea) within the last 15 years (Stévant et al. 2020). For stereomicroscopic observations, flowers from dried materials were initially boiled in water. Morphological investigations were performed using a Zeiss stereomicroscope Stemi SV11, both for spirit-preserved material and herbarium sheets. Seeds from mature fruits were treated using the standard tetrazolium method (Hosomi et al. 2012; Seaton et al. 2018) that coloured living embryos of viable seeds in red, distinguishing them from non-viable ones that have dead, uncoloured, embryos. Morphology of these viable seeds was observed under a light microscope Olympus BX51 and quantitative parameters (viable seeds and embryos' length, width, shape and number of testa cells) were measured in μm with the image acquisition and processing software ArchiMed microvision version 6.1.3. Measurements, colours, and other details given in the description below are based on living material, spirit-preserved and herbarium specimens, and data derived from field notes.

Description, distribution, and conservation statut assessment – Terminology used to describe structure and shapes follows the Systematics Association Committee for Descriptive Biological Terminology (1962a, 1962b) and the Kew Plant Glossary (Beentje 2010).

The geographical distribution was determined from data given on herbarium sheets. The distribution map was prepared using the software ArcGIS version 10.5.1 (ESRI 2017).

The risk of extinction of *Cyrtorchis okuensis* was preliminary assessed by applying the IUCN Red List Categories and Criteria (IUCN 2012, 2019) and using the *ConR* package (Dauby et al. 2017) to calculate the area of occupancy (AOO) and extent of occurrence (EEO). The cell size for AOO was set 2 × 2 km as recommended by IUCN (2012). The number of ‘locations’ (as defined by IUCN 2019) was calculated by considering the most serious plausible threat so that a single ‘location’ may encompass more than one adjacent population.

III.2.2.1.2.2 POLLINATION ECOLOGY

Study site – Flowering phenology and floral visitors of *Cyrtorchis okuensis* were investigated in the Mount Oku National Park in May 2017. Mount Oku, the second highest mountain in the West African mainland, with an altitude of about 3,011 meters a.s.l. (Asanga 2002), is part of the Bamenda Highlands, in the North West Region of Cameroon (6°12’N and 10°32’E). Mount Oku is located within the Kilum-Ijim forest massif, which is the largest remnant of West African upper montane forests (Maisels et al., 2000). The vegetation includes a mosaic of montane forest, montane grassland and sub-alpine habitats (Cheek et al. 2000; Asanga 2002).

Our ecological survey was conducted in an area of wooded savannah, at the upper montane forest-grassland edge, located on the north-western part of Mount Oku crater lake, which rises to about 2,400 m elevation (**Figure III-28**). This site was chosen because of the high abundance of easily accessible individuals of the novelty (see Introduction) to explore their ecology and reproductive biology.



Figure III-28. *Cyrtorchis okuensis* in its natural habitat, the shrubby savannah around the volcanic lake Oku. A. Panoramic view of *C. okuensis* habitat in the survey area. B. Individuals of *C. okuensis* growing on a 2 meter long branch of *Gnidia glauca*. C. A flowering individual of *C. okuensis* growing with mosses and the ferns *Lepisorus excavatus* and *Asplenium theciferum*. Photographs by Vincent Droissart (A) and Laura Azandi (B, C).

Species community, habitat and phenology – To study ecology and reproductive biology of the new *Cyrtorchis* species, we identified and labeled 33 mature individuals bearing one to four inflorescences, along with their host trees distributed in about one hectare of natural vegetation. Daily monitoring of flowering from anthesis (opening of the first flower) was conducted for 25 days (05–29 May 2017). The reproductive phenology was assessed by recording each day the (a) proportion of individuals with open flowers, (b) number of open flowers, and (c) proportion of flowers visited by insects (pollinia removal from the gynostema and pollen load on the stigma). Thirty-three phytosociological surveys of 2 m length (see Stévant 2003) were made on branches of the labeled host trees to study the species community growing with the new species. Herbarium vouchers were collected for the host trees and the epiphytes growing with the new *Cyrtorchis* taxa for a subsequent identification.

Pollinator observation and syndromes – To identify the visitors and the pollinators of this new species, we used the interval-programming function of a waterproof digital camera (Camera Bushnell Natureview HD MAX), using the settings to take pictures at 1-minute intervals and also by motion detection in the field of vision on six individuals located at least 10 m apart from each other.

Furthermore, during two nights (6-7 May, from 06 pm to midnight and on 8 May from 7 pm to 2 am), light traps with mercury vapor lamps (Sylvania HQL bulb, 250 W) were used to investigate and collect potential pollinators (i.e. hawkmoths and settling moths). Captured moths' specimens were examined for the presence of pollinia on their body. A subsequent analysis of the pictures recorded with the cameras and the captured moths' specimens were used to determine whether a specific species is a passive visitor or an effective pollinator of *Cyrtorchis okuensis*. To further confirm the potential pollinator identity, the relationship between the proboscis and spur length was assessed for hawkmoths seen on the camera footage foraging the flowers. The proboscis's length of individual hawkmoths was measured to the nearest millimeter (from the base near the head to the tip) with a ruler (see Peter & Venter 2017; Martins & Johnson 2007). The spur length of fully developed flowers was measured from BRLU herbarium specimens (N = 9). The captured hawkmoths's specimens were sent to a sphingid specialist at the Muséum National d'Histoire Naturelle in Paris for identification.

Pollination and reproductive success – We used the 33 surveyed living specimens to describe the reproductive success of the new species. These observations were conducted daily and started just before the opening of the first flower. For three individuals, the anthesis has already passed at the beginning of the survey. Still, we verified and confirmed that the opened flowers were not visited (no pollen load or removal). For each individual, we recorded the number of inflorescences as well as the number of flowers on each inflorescence. Inflorescence parameters were collected every day, including the opening date of each flower, the number of visited flowers, and fruit set.

To evaluate the pollination success and fruit set, we registered the number of visited flowers with pollinia removed for male fitness, and with pollinia deposited on stigmas or fruit set for female fitness.

Breeding system assessment – To determine whether the species was able to set fruit in absence of pollinator visits, we bagged with fine nets five inflorescences with closed flower buds. We also performed 114 hand-pollinations (58 cross-pollination and 56 self-pollination) on 39 cultivated specimens to assess the main breeding system.

The Shapiro-Wilk Normality test (Royston, 1982) was executed prior to statistical difference testing to evaluate if fruit set followed a normal distribution pattern. To statistically evaluate the difference between the fruit set according to the pollination treatment (self- or cross-pollination) a Wilcoxon rank-sum test was performed, which is recommended for the comparison of two groups of non parametric datasets, as observed here (e.g. McDonald 2014).

These analyses were performed using the package 'agricolae' (de Mendiburu & de Mendiburu 2019) within the statistical software environment R 3.4.4 (R Core Team 2019).

III.2.2.1.3 RESULTS

III.2.2.1.3.1 TAXONOMY

Identification key to *Cyrtorchis okuensis* and related species – (amended from Azandi et al. (2016))

1. Leaves thin and flexible, equally bilobed at the apex.....
.....*Cyrtorchis ringens*
- 1'. Leaves fleshy and rigid, unequally bilobed at the apex 2.
2. Floral bract imbricate, longer than the pedicel and ovary*Cyrtorchis brownii*
- 2'. Floral bract subimbricate or well-space, shorter than the pedicel and ovary 3.
3. Anther cap 2.5–3 mm long, dorsal sepal triangular, 4–5 mm wide
..... *Cyrtorchis okuensis*
- 3'. Anther cap 1–2 mm long, dorsal sepal narrowly triangular, 2–3 mm wide
..... 4.
4. Inflorescence 1–5.3 cm long, 1–5-flowered *Cyrtorchis submontana*
- 4'. Inflorescence 6–10 cm long, 10–12-flowered *Cyrtorchis guillaumetii*

III.2.2.1.3.2 DESCRIPTION OF THE NEW SPECIES

Cyrtorchis okuensis Droissart, Azandi & M.Simo, **sp. nov.** Figure III-29

Cyrtorchis aff. *guillaumetii* “Oku” (Azandi et al. sous presse)

Diagnosis – *Cyrtorchis okuensis* is similar to *C. submontana* but differs in having longer (4.4–9 cm vs 1–5.3 cm) densely-flowered inflorescences (up to 5 vs 3–12 flowered) longer and wider floral bracts (7–12.5 × 8–14 mm vs 4–6.5 × 5–7 mm), longer anther caps (2.5–3 vs 1–2 mm) and wider triangular dorsal sepal (4–5 mm vs 2–3 mm).

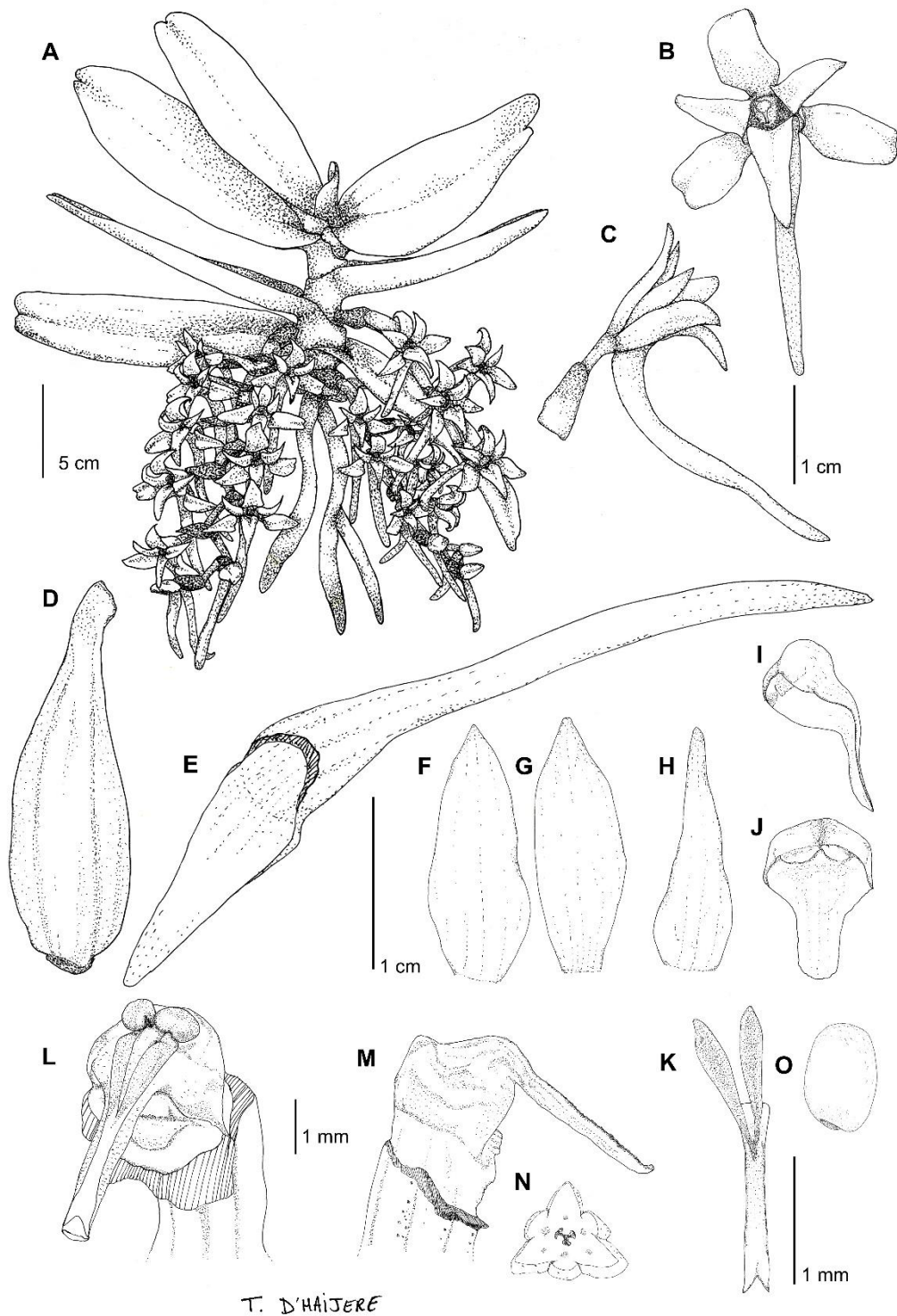


Figure III-29. *Cyrtorchis okuensis* Droissart, Azandi & M.Simo. A. Habit and inflorescence. B. Flower, frontal. C. Flower, side view. D. Fruit. E. Labellum with spur frontal. F. Dorsal sepal. G. Lateral sepal. H. Lateral petal. I. Anther cap, side view. J. Anther cap, frontal. K. Viscidium with stipites frontal. L. Column, frontal. M. Column, side view. N. Ovary section. O. Pollinia. K. Column, side view. N. Anther cap, above. O. Anther cap, frontal. P. Anther cap, from below. Q. Stipe with pollinia. R. Stipe, frontal. S. Stipe, side view. Azandi 26 (B, C, E, F, G, H, I, J, L, M, N, O). Plant cultivated in Yaoundé shadehouse Y 6377 BA, fruit ID 499 (D) Droissart & al. (Ombrière de Yaoundé) 5109 (K) (Drawing by Tania D’Haijère).

Type – Cameroon : Région du Nord-ouest, arrondissement d'Oku. Savane boisée sur le flanc Est du lac Oku, 6° 12' 18.072 "N, 10°27'1.306"E, 28 May 2017, *Azandi L. 26* (holotype BRLU, iso YA).

Description – Epiphytic herb, erect, monopodial, with short to long unbranched stems, 3–18.5 cm long bearing 3–13 alternate leaves with a 16–21.5 cm leafspan. Roots 15.5–20.8 cm long and 0.3–0.4 cm diameter, pale green and covered by mosses. Leaves closely elliptic, distichous, subimbricate, fleshy, olive green, margins entire, 4.6–11.3 × 1.2–3 cm, unequally bilobed at the apex, with rounded lobes. Inflorescences up to 4, axillary or below the leaves, 4.4–9 cm long, 3–12-flowered, flowers 3.3–4.6 cm long with floral node ranging from 0.5–0.9 cm long. Bracts broadly ovate, 7–12.5 mm long and 8–13.7 mm apart, dark brown apiculate at the apex. Flowers white, fading to orange, 3–4.7 cm long and 1–1.8 cm of diameter. Dorsal sepal triangular, 8–13 × 4–5.5 mm. Lateral sepals lanceolate, acute at the apex, 8–15.5 × 3–5.2 mm. Petals similar to lateral sepal but shorter and usually acuminate at the apex, 8–13 × 3–4 mm. Lip triangular with acuminate fleshy apex, 8.5–12 × 5–6 mm; spur incurved sometime sigmoid, 1.9–4 cm long. Anther cap whitish, turning brown with senescence, obovate in the upper part and with narrowed lower part, slightly toothed in the margins and covering the base of the rostellum 2.5–3 × 1.5–2 mm. Pollinia 2, oblate from side rarely ovoid. Column stout and short, 1–2 mm long. Viscidium, saddle-shaped, with a uniformly hyaline texture, bifid at the basal apex, 2–4 mm. Stipites spatulate or slightly clavate with acute apices pointing towards the middle side, insertion point at the rear third of the length of the viscidium, 1.5–2.5 mm long. Pedicel with ovary 10.5–19.5 mm long; ovary triquetrous. Rostellum trifid, 2.5–4 mm long, midlobe straight, acute, lateral lobes linear, about three times as long as the midlobe, pendulous and parallel to each other with rounded apices. Fruits, narrowly ellipsoid capsules, triquetrous with three smooth sides, narrowly ellipsoid, turning yellowish-green at maturity, 12.9–24.5 × 4.5–10.8 mm. Seeds fusiform, 149–194 × 70–93 µm, rarely ellipsoid with ovoid to ellipsoid embryo, 117–141 × 56–76 µm, with two testa cells in an individual seed coat along the longitudinal axis of seed.

Additional specimens examined – **Nigeria**: Boshi Extension Forest Reserve, 1600 m, 6°18' 3816" N, 9°12'46.8"E, 23 May 1971, *van Meer P.P.C. 1765* (FHI web.). **Cameroon**: Province du Nord-Ouest, Lac à proximité du village d'Oku, 2239 m, 6°11'48.77"N, 10°27'3874"E, 03 Sep. 2011, *Droissart V. et al. 894*, (BRLU); Belo, Mont Oku, autour du lac, 2300 m, 6°11'8.02"N, 10°25'19.88"E, 21 Apr. 2014, *Droissart V. et Simo M., 1693* (BRLU, YA); *ibid.*, 05 May 2014, *Droissart V. et al. (Ombrière de Yaoundé) 5046*, (BRLU); *ibid.*, 16 May 2014, *Droissart V. et al. (Ombrière de Yaoundé) 5074* (P YA); *ibid.*, savane boisée autour du lac, 2313 m, 6°12'14.4"N, 10°26'60"E, 28 Apr. 2017, *Droissart V. et al. (Ombrière de Yaoundé) 7163* (BRLU); forêt du mont Oku, 6°13'516"N, 10°31'33.6"E, 15 May 2017, *Droissart V. et al. (Ombrière de Yaoundé) 7174* (BRLU); Entre Kumbo et Ndop, 6°11'1.32"N, 10°39'32.94"E, 09 Jun. 2011, *Simo M. et al. (Ombrière de Yaoundé) 2848* (BRLU); Près du point trigonométrique de Mbem (40 km ESE de Nkambe), 1800 m, 6°26'59.75"N, 11°2' 40.92"E, 11 Jul. 1904, *Letouzey R. 8860* (P, YA); Bamenda

district, along the footpath from the rest house to number 6 plot in Bafut ngemba reserve, 5°55'0" N, 10° 12'60"E, 19 May 1959, *Daramola B.O. FHI 41182* (K, FHI). Région du Sud-Ouest, crête NW Muetan Aku, 9 km SW Bangem, 5°5'4.04"N, 9°45'59.93"E, 02 Jun. 1982, *Villiers J.F. 1397* (BRLU, P n.v.). Province de l'Ouest, Bayangam, 1650 m, 5°17'55.07"N, 10°25'50.52"E, 02 Jun. 2014, *Droissart V. et al. (Ombrière de Yaoundé), 5117* (BRLU); Bambuto, 2500 m, 5°43'60"N, 10°3'60"E, 21 Nov 1972, *Jacques-Felix H. 5441* (K n.v., P n.v.); *ibid.*, 2300 m, May 1940, *Jacques-Felix H. 5483* (P n.v.); Baham, 1920 m, 5°17'12.47"N, 10°22'32.98"E, 28 Apr. 2017, *Droissart V. et al. (Ombrière de Yaoundé), 7164* (BRLU); *ibid.*, 15 Jun. 2017, *Droissart V. et al. (Ombrière de Yaoundé) 7203* (YA); Dschang district, Massif Manengouba, near kongsamba, village of Bouroakou to crater lakes, 2133 m, 5°0' 0"N, 9°49'48"E, 18 Nov. 1968, *Sanford W.W. 5553* (K n.v.); Province du Littoral, Melong, Mont Manengouba, entre 1800 et 2200 m, 5°2'14.03"N, 9°51'17.75"E, 02 Jun. 2014, *Droissart V. et al (Ombrière de Yaoundé) 5109* (BRLU). **Equatorial Guinea (Bioko)**: Malabo-Pico Basilé, estrada km 17-18, Bioko Norte, 3°37'7.5"N, 8°48'22.5"E, 02 Jul. 1989, *Carvalho M.F. 4004* (BRLU, K n.v., MA n.v., P n.v., WAG n.v.); *ibid.*, Pico Basilé, bosquete ralo, 2310 m, 3°36'25.49"N, 8°46'55.49"E, 03 Jul. 1986, *Fernández Casas et al. 10166* (MA web.); Bioko Sur, Lago Moka, 3°21'22.5"N, 8°37'43.5"E, 30 Jan. 1947, *Guinea E. 2236* (BRLU!, MA web.).

Phenology – The flowering period occurs between April and June with a flowering peak in May. Fruit maturation lasts about 230 days on average (from June to January).

Distribution – Endemic to the Cameroon Volcanic Line: Nigeria, Cameroon and Bioko (Equatorial Guinea) (**Figure III-30**).

Habitat and ecology – *Cyrtorchis okuensis* is an epiphytic species, restricted to montane vegetation (moist forest, forest-grassland edge and wooded savannah). It was collected on mossy branches of several tree species (mostly found growing on *Gnidia glauca* (Fresen.) Gilg (Thymelaeaceae), but also on *Albizia gummifera* (J.F.Gmel.) C.A.Sm. (Fabaceae) and *Prunus africana* (Hook.f.) Kalkman (Rosaceae)). On those phorophytes, *C. okuensis* is usually found growing with lichens, ferns and other orchid species (see details below in "Ecology and reproductive biology"), Altitudinal range from 1,600 to 2,500 m.

IUCN Red List category – The species is given a Red List status of Near Threatened [NT]. The extent of occurrence (EOO) of *Cyrtorchis okuensis* is estimated to be 38,319.1 km², far exceeding the upper limit of the Vulnerable category (20,000 km²) under the criterion B1, while its area of occupancy (AOO) is estimated to be 68 km², which falls within the limits of the Endangered category under the criterion B2. The species is known from 21 specimens in Nigeria, Cameroon and Bioko (Equatorial Guinea).

Cyrtorchis okuensis has been collected in the montane evergreen forest, grassland edge and wooded savannah from 1,600 to 2,500 m elevation. In Nigeria, *C. okuensis* has been collected in a protected

area, the Boshi Extension Forest Reserve. In Bioko, the species is known from two protected areas: the Pico Basilé National Park and the Reserva Científica de la Caldeira de San Carlos (at Lago Moka). In Cameroon, several specimens of the species have been collected from both protected and unprotected areas. Indeed, the species is recorded from the Mount Oku National Park, the Bafut Nguemba Reserve and the Mount Manengouba National Park. In unprotected sites, the species habitat is subject to small-scale shifting agriculture, urbanization, *Prunus africana* exploitation and collecting of fuelwood for small-scale subsistence. The protected areas appear not well managed and under threat in Cameroon, one occurrence in Mount Manengouba and other around Mount Oku are under threat from shifting agriculture.

Based on the most important threat which is shifting agriculture, the 21 occurrences represent 16 different locations (*sensu* IUCN 2019) which is more than the upper limit of the Vulnerable category under the subcriterion 'a' of criterion B1. The projected ongoing loss of its habitat lead us to predict a continuing decline in the number of subpopulations in West and North West Regions in Cameroon (in the Bangem near the Banyang-Mbo Wildlife Sanctuary in the South West region, in Bambuto in the West region, in Mount Manengouba near Nkongsamba in the Littoral region, in Nkambe and the Bafut Nguemba Reserve), in mature individuals, in the AOO and EOO. Since the conditions for applying subcriterion (a) under criterion B2 are thus not met, *C. okuensis* cannot be regarded as threatened under the IUCN red list criteria (2019). Considering that occurrences representing four locations would probably disappear in the near future due to increasing human pressure observed in these areas since 19th century (Harvey et al. 2004; Cheek et al. 2000, 2004), *Cyrtorchis okuensis* is assigned the IUCN Red List Category of Near Threatened (NT).

Etymology – The epithet *okuensis* refers to *Oku* a subdivision in the Nord-West Region of Cameroon where the large surveyed subpopulation was discovered around the Lake Oku. The term *Oku* also refers to the people who live in this area and their home language.

Notes – *Cyrtorchis okuensis* belongs to section *Homocolleticon* Summerh. based on the structure of its viscidium, uniformly hyaline in texture and thin apexes of stipites. Besides the species mentioned in the diagnosis, *Cyrtorchis okuensis* is within this section, also close to *Cyrtorchis brownii* with which it shares the fleshy leaves, similar bract length and width (7–12.5 × 6–14 mm), and an anther cap that considerably extends forward but differs by having a subimbricate bract, wider triangular dorsal sepal (4–5.25 mm vs 2–2.6 mm) with acute apex, longer pedicel and ovary (10.5–19.5 vs 5–5.5 mm), and longer anther cap (2.5–3 mm vs 1–2.1 mm). The new species also seems close to *Cyrtorchis guillaumetii* by its wider leaves (1.2–2.7 cm), longer distance between flowers (5–8 mm), triangular lip shape, and mucronate bract apex but differs by its dense inflorescences with flowers distributed along the inflorescence (vs inflorescence loose at the base and densely flowered towards the apex), wider

triangular dorsal sepal (vs thinner narrowly triangular to linear (2.5–3 mm)) longer anther cap noticeably extended forward and covering the base of the rostellum (vs shorter anther cap not extended forward), large subimbricate bracts with acute apex and spur rounded at the apex. *Cyrtorchis submontana* and *C. okuensis* also differ by their habitat; *C. submontana* is found in submontane and evergreen moist forest (between 550 and 1,200 m) whereas *C. okuensis* is restricted to the upper montane vegetation (between 1,600 and 2,500 m) along the CVL. Phylogenetically, *C. okuensis* seems to be more related to *C. ringens* based on molecular evidence from Azandi et al. (sous presse) but it is clearly differentiated from the later by its fleshy and rigid leaves, unequally bilobed at the apex (vs thin and flexible leaves, equally bilobed at the apex). Two specimens, *Fernández Casas et al. 10166* (MA-492372) and *Guinea 2236* (MA784996), were cited (Gamarra et al. 2019) as new records for *C. submontana* on Bioko Island (Equatorial Guinea). However, based on careful examination and comparison with the material of the new species, we found that these specimens from Bioko belong to *C. okuensis*.

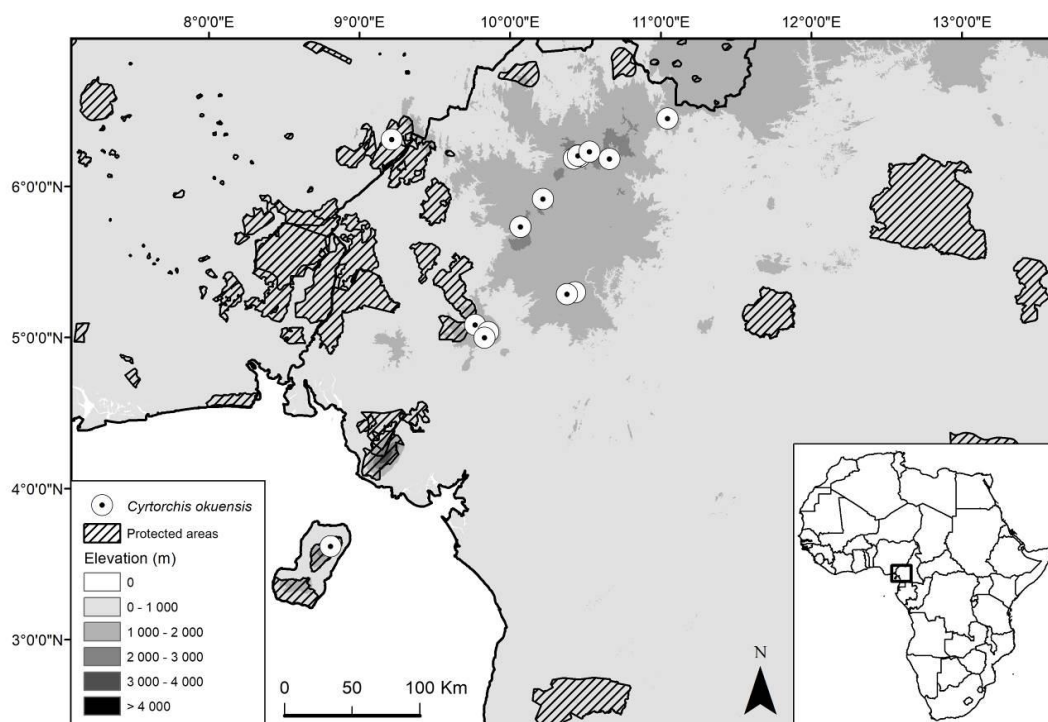


Figure III-30. Distribution of *Cyrtorchis okuensis* in Central Africa, along the Cameroon Volcanic Line.

III.2.2.1.3.3 ECOLOGY AND REPRODUCTIVE BIOLOGY

Species community, habitat and phenology – The time between the opening of the first and the last flower on a given individual varied from two to 10 days for the 15 individuals bearing 1 to 2 inflorescences (with up to 19 flowers in all) and from 5 to 28 days for the 14 individuals bearing 3 to 4

inflorescences (with up to 31 flowers in all). In the shrubby savannah surveyed around Lake Oku, the main host trees were *Gnidia glauca* with 32 host tree samples and *Prunus africana* with only one tree sample. *Gnidia glauca*, a small bushy tree growing in a large, monodominant subpopulation in the study area, was always associated with a high number of individuals of *C. okuensis*, bearing up to 13 individuals in the 2 m phytosociological branch survey (**Figure III-28**). *Cyrtorchis okuensis* specimens were found growing on branches of 4 to 30 cm in diameter, under the canopy of these two host tree species at 1 to 4 meters from the ground. On the 33 phytosociological branch surveys, the species was found growing in association with mosses and lichens, such as *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg. (Parmeliaceae), ferns (*Lepisorus excavatus* (Bory ex Willd.) Ching, *Asplenium theciferum* (Kunth) Mett., *Pleopeltis macrocarpa* (Bory ex Willd.) Kaulf., *Asplenium aethiopicum* (Burm.f.) Becherer), crassulescent epiphytic species, namely *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haw., and other orchid species, namely *Polystachya alpina* Lindl. and *Kylicanthe bueae* (Schltr.) Farminhão, Stévant & Droissart.

Pollinator observation and syndromes – A total of 88,529 pictures (more than 1475 hours of observation) were recorded with four camera traps. The images recorded show that flowers of *C. okuensis* were visited by at least seven different insects, one spider and two bird species (viz. Northern Double-collared Sunbird (*Cinnyris reichenowi* Sharpe, 1891) and the oriole finch (*Linurgus olivaceus* (Fraser, 1843)). During daytime, flowers were mostly visited by birds and flies while hawkmoths, settling moths, and grasshoppers were the main visitors at night. Our observations show that apart from birds and hawkmoths, other insects were passive visitors. Birds activity consisted of consumption of perianth parts possibly associated with nectar robbery, while hawkmoths foraged on flowers for nectar without any associated floral damage.

Flower opening occurred only at night. A slight floral scent was detected during daytime when approaching flowers closely. At dusk from about 06:00 pm, a jasmine-like scent began to emanate from the flowers and is detectable a few meters away. Scent release began from about 07:30 pm and remained strong throughout the night. Hawkmoth visits mostly occurred at dusk between 06:00 pm to 01:00 am with a peak of visits between 10:00 pm to 01:00 am (**Figure III-31**). The combined camera survey and light trap design enabled us to capture 10 individuals of potential effective pollinators of *C. okuensis*, representing three species of the genus *Hippotion* Hübner, 1819 (**Figure III-32A**), namely *Hippotion celerio* (Linnaeus, 1758), *H. eson* (Cramer, 1779) and *H. osiris* (Dalman, 1823) (**Figure III-32B–D**). Unfortunately, none of the recorded nor captured hawkmoth specimens were caught with the pollinia attached on any part of their bodies. Nevertheless, based on pollen removal and/or deposit, as well as fruit set after their visits, we confirm that one or more of these hawkmoth species is the effective pollinator of *C. okuensis* in the Mount Oku area.

Morphologically, the mean spur length of *Cyrtorchis okuensis* was 2.82 cm (sd = 0.64, n = 9). This value matches the length of the proboscis across all the nine captured specimens of *Hippotion* species (*Hippotion celerio* (5 individuals), *H. eson* (3), and *H. osiris* (1)) ranged between 20–42 mm, with a mean of 3.1 cm (sd = 0.86, n = 9). Based on these spur and tongue lengths, the majority of these species of hawkmoths are likely to forage on the flowers in this subpopulation. There was no significant difference in the spur and proboscis length.

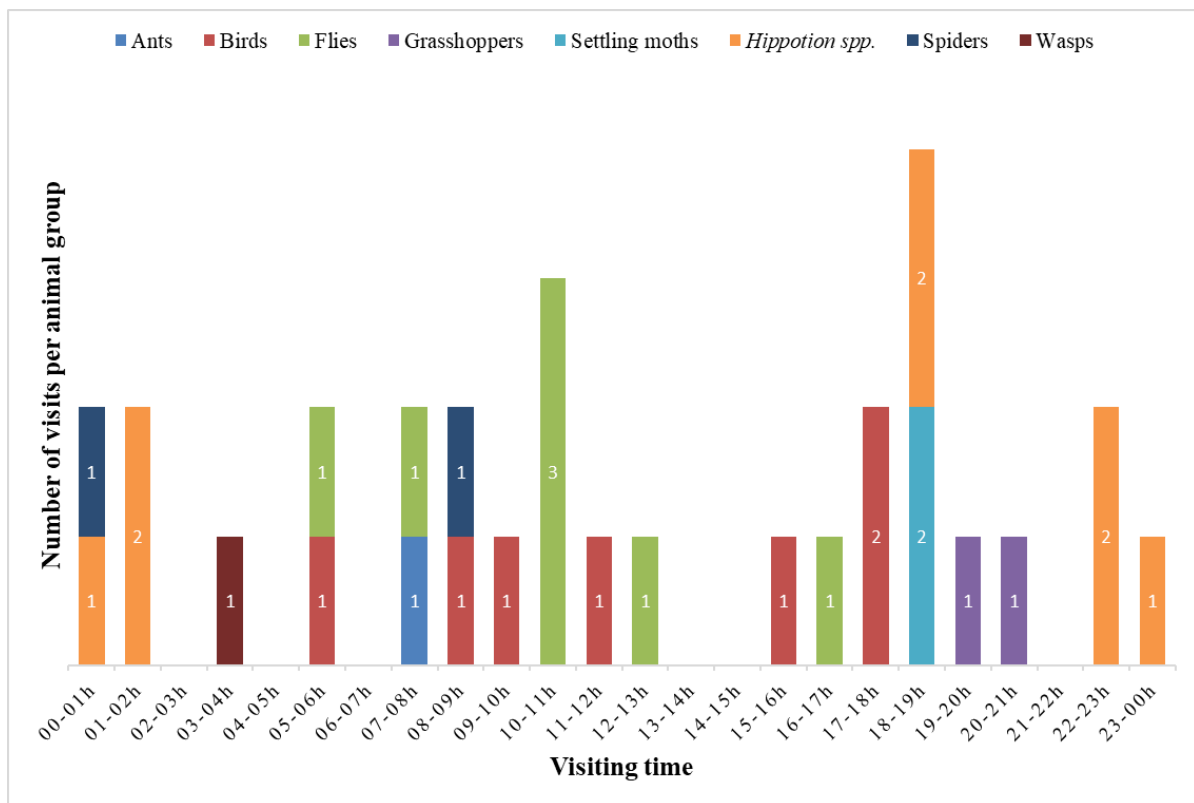


Figure III-31. Visitor's activities on *Cyrtorchis okuensis* flowers. Results are based on a 25-days monitoring session with four camera traps (May 2017).



Figure III-32. Three pollinators of *Cyrtorchis okuensis* observed around the Lake Oku (North West Cameroon). A. Pictures recorded with camera trap showing a *Hippotion* sp. foraging on *C. okuensis* flowers. B-D. Sphinx moths captured during light trap sessions: *Hippotion celerio* (B), *H. eson* (C), *H. osiris* (D). Photographs by Laura Azandi.

Pollination and reproductive success – The daily monitoring of each individual conducted during 25 days enabled us to measure the frequency of flowering and visiting events. Flower opening events increased all along the survey period (see **Figure III-33A**). Flowering peaks (i.e. the maximum number of flowers opened the same day) in the *C. okuensis* subpopulation surveyed were registered on the 16th, 17th and 21st days (**Figure III-33A**). More than 50% of all the surveyed individuals were already flowering on the 13th day and by the end of the survey all the 33 individuals had already flowered. Concerning the visitation rate, flower visits started on the 5th day till the end of the monitoring session with a maximum observed on the 6th, 11th and 19th day (see **Figure III-33D**). Eight hawkmoth visits recorded with cameras on the 9th, 12nd, 16th, 17th and 23rd days matched daily observations of the number of visited flowers (**Figure III-33C**).

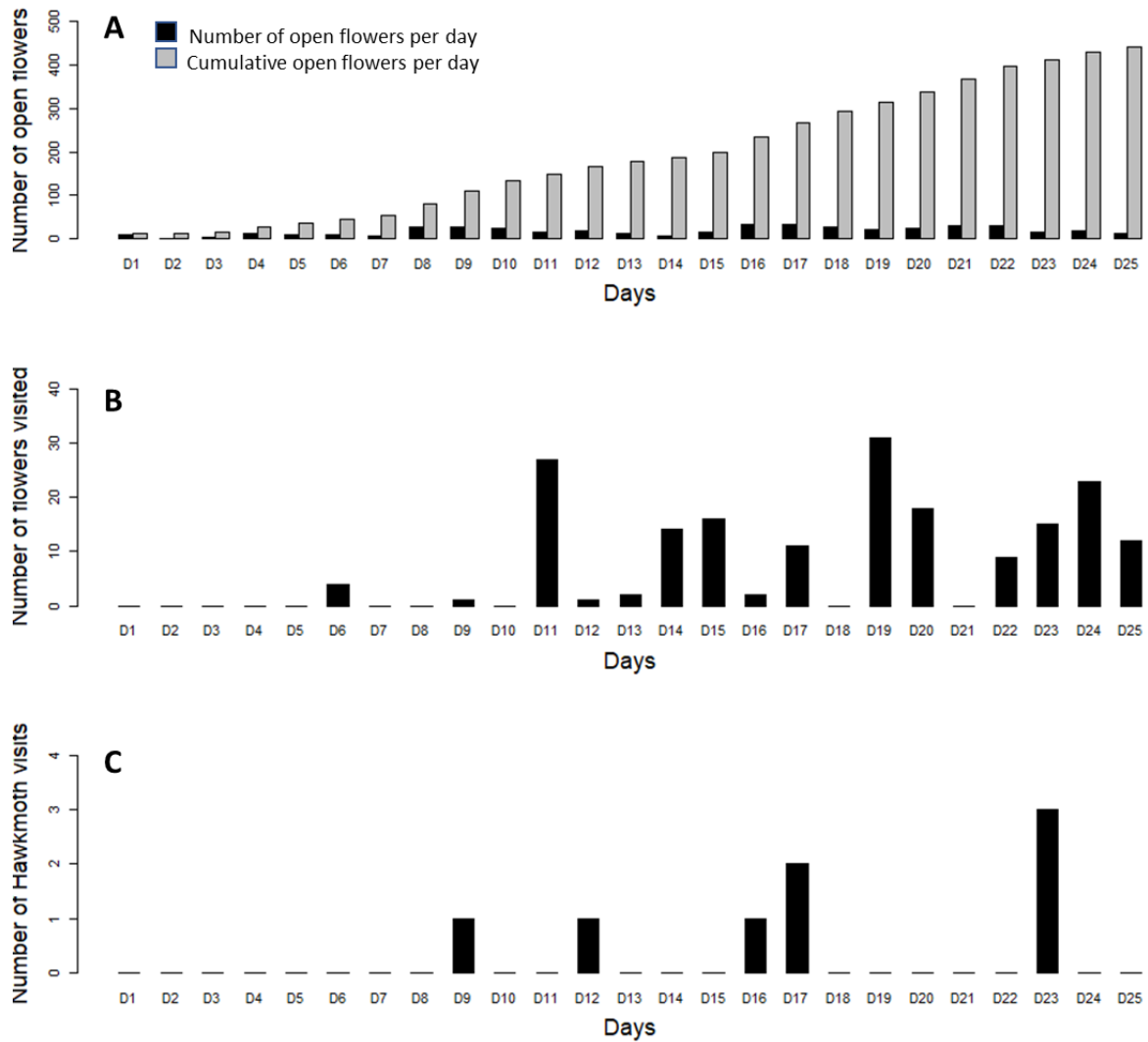


Figure III-33. Reproductive phenology of *Cyrtorchis okuensis* per day in the studied population (total of 33 individuals) between 05 to 29 April 2017. A. Daily number of open flowers B. Daily number of flowers visited. C. Daily number of hawkmoth visits recorded with camera traps.

In natural conditions, the rate of observed flowers with pollinarium removed averaged 39% (178 flowers out of 448 flowers) for the 33 individuals. Successful pollen deposit on the stigma, indirectly measured by fruit set rate was 19% (87 fruits set/448 flowers) and 16% reached maturity (70 matured fruits/448 flowers) after an average of 230 days (see **Tableau III-4**).

Tableau III-4. Breeding system and reproductive success assessments of *Cyrtorchis okuensis* under natural and manual, controlled pollination experiments. Values in brackets represent the percentage of sample size (total number of flowers used or fruits produced) per treatment.

Treatments	Number of individuals	Number of flowers	Number of flowers pollinia removed (%)	Number of flowers with fruits set (%)	Number of mature fruits (%)
Pollinators excluded (bagged flowers)	3	20	0	0	0
Natural pollination	33	448	174 (38.8)	87 (19.4)	70 (15.6)
Manual self-pollination	19	56	–	36 (64.2)	21 (37.5)
Manual cross-pollination	20	58	–	51 (88)	27 (46.5)

Breeding system assessment – No fruit set was observed for individuals for which pollination was excluded (bagged inflorescence) (Tableau III-4). The studied species is self-compatible as it was able to set fruits from self-pollination treatments that resulted in 64.2% fruit set. However, cross-pollination shows higher rate with a fruit set of 88%. Yet, these two controlled pollination treatments did not differ significantly for fruit set success ($W= 138, P>0.05$).

III.2.2.1.4 DISCUSSION

III.2.2.1.4.1 CYRTOCHIS OKUENSIS, THE SMALLEST SPURRED ANGRAECOID ORCHID POLLINATED BY HAWKMOTH

The formal description of *Cyrtorchis okuensis* constitutes an additional step towards a global revision of the genus *Cyrtorchis*. The current study not only confirms pollination by hawkmoths in the genus *Cyrtorchis*, as predicted by Cribb (1989), but also pushes down the range of spur lengths associated with hawkmoth pollination within the angraecoid group (~ 800 species; see Simo-Droissart et al. 2018; Farminhão et al. 2021). *Cyrtorchis okuensis* exhibits clear floral adaptations to hawkmoth pollination, such as the white night-scented flowers with a “relatively” long nectar-rewarding spur (Vogel 2012; Martins & Johnson 2007, 2013; Johnson & Raguso 2016; Johnson et al. 2017). These white long-spurred orchids night-scented flowers are common in Africa (Dressler 1981), with data supporting that about 50% of the African orchids are pollinated by hawkmoths based on the high frequency of this floral syndrome (Martins & Johnson 2007, 2013; Johnson & Raguso 2016; Johnson et al. 2017). However, C.

okuensis spur length appears to be relatively short (1.9–4 cm long) compared to most of the other known African continental angraecoids in which hawkmoth pollination syndromes are documented. Luyt & Johnson (2001) previously reported this pollination syndrome for *Mystacidium venosum* Harv. ex Rolfe, whose spur length ranges from 2.5–5.5 cm and Martins & Johnson (2007) later described it for *Aerangis confusa* J.Stewart with an average spur length of 4.5 cm. As observed for other short-spurred angraecoids fellow species (i.e. *M. venosum* and *A. confusa*), there is a correspondence between the spur length in *C. okuensis* and the proboscis length of pollinators. This might suggest that a strong selective pressure of proboscis on spur length might have played a role.

Three different species of *Hippotion* (*Hippotion celerio*, *H. eson* and *H. osiris*) were identified as effective pollinators of *C. okuensis*. These results are in line with previous studies, as *H. eson* was also observed feeding on flowers of *Mystacidium venosum* (Luyt & Johnson 2001) and *H. celerio* was reported to be one of the pollinators of *Aerangis confusa* in Kenya (Martins & Johnson 2007). Although it was difficult to identify pollinators at the species level, the confirmed presence and the quite similar proboscis length of the three captured *Hippotion* spp. supports that all might be effective pollinators of *C. okuensis*. This was previously supported in a study of Alexandersson & Johnson (2002) on *Gladiolus longicollis* Baker, in which moths with matching proboscis lengths were effective agents of pollen removal and deposition. Additionally, more recent studies suggested that hawkmoths are highly polyphagous and readily feed on flowers which have tubes much shorter than their proboscis lengths while plants adapted to hawkmoths are more specialized, particularly when they are long tubed (Amorim et al. 2014, Martins & Johnson 2013). Given the slight difference in size between the average lengths of the proboscis of pollinators and spur of *C. okuensis* and the fact that pollinia are generally placed along the proboscis in this group (Azandi, pers. obs.), we can assume that there is a selection pattern for short spurs as described by Ellis & Johnson (2010) in their gender-specific selection model. This model states that if selection is made through the male function, this would favour an evolution towards shorter spurs than proboscis because pollinia export is potentially highest in short-spurred species as pollinia are placed far from the base of the proboscis and could reach both the stigmas of long and short-spurred flowers. Our pollinator exclusion experiment provides strong evidence that *C. okuensis* fruit and seed production depends on external pollinators. Under natural conditions, hawkmoth visitation events on *C. okuensis* flowers seems relatively rare (see figs. 4 & 6) and resulted in low reproductive success (pollen removal and fruit set) as only 16% of the 448 flowers we surveyed in May 2017 produced mature fruits. Amorim et al. (2014) and Micheneau et al. (2009) also reported low visitation and fruit set rates of orchid flowers when pollination is effected by hawkmoths.

III.2.2.1.4.2 IMPORTANCE AND CONSERVATION OF THE CAMEROON VOLCANIC LINE

The CVL includes a chain of isolated volcanic or plutonic mountain peaks that covers ~40,877 km², stretching from Annobón Island in the Gulf of Guinea to the Mandara Mountains in the Far North Region in Cameroon. It includes a broader continental part and a smaller oceanic portion in the form of four major islands (Ayonghe et al. 1999; Frodin, 2001; Sainge et al. 2017). The CVL is worldwide known for its rich and diverse flora with high levels of endemism combined with high degrees of threat (Droissart et al. 2018; Sosef et al. 2017), which led to classify it as a biodiversity hotspot (Cheek et al. 2000, 2004; Barthlott et al. 2007; Myers et al. 2000). Plant diversity comprises about 4000 species (Droissart et al. 2018) out of the ~9000 species so far known to occur in Cameroon (Cable & Cheek, 1998; Cheek et al. 2000, 2004; Onana et al. 2011). The orchid family represents one of the most diverse plant groups of the CVL (Cable & Cheek 1998; Cheek et al. 2000, 2004; Onana & Cheek 2011; Harvey et al. 2004) including 33 taxa that are strictly endemic to the CVL, distributed in the submontane (17 taxa), montane (12 taxa) and both submontane and montane strata (4 taxa) (Droissart 2009). The new orchid described here further stresses the need for additional fieldwork in these mountains, specifically for sites that have so far been little or not explored. This seems particularly the case for the forests of the Cross River National Park, the Boshi Extension Forest Reserves and the Gashaka Gumti National Park in Nigeria, and for the Rumpi Hills area in Cameroon. Additional material from African herbaria (e.g. Forest Herbarium Ibadan (FHI)) should be carefully curated to identify putative unidentified or misidentified orchid material.

With more than 200 plant species considered as threatened (Cheek et al. 2004; Onana et al. 2011) and with more than 80 endemic species (Cheek et al. 2004; Franke 2004; Sainge et al. 2005; Sainge S N et al. 2010; Sainge 2012, 2016) the CVL is endangered by increasing threats due to human activities. Land use change and deforestation have resulted in degraded forest areas, fragmented populations, and hence impoverishment of all three stages of biodiversity. It has been estimated that over 96% of the original forest cover of the Bamenda highlands above 1,500 m altitude have been lost (Cheek et al. 2000). Hence, a regional synthesis, including recent species diversity checklists coupled with Important Plant Area assessments (Darbyshire et al. 2017), is urgently needed to better manage and conserve the remaining biodiversity of the CVL.

III.2.2.1.4.3 THREATS ON THE HOST TREES OF *CYRTOCHIS OKUENSIS*

Our results identified *Gnidia glauca* and *Prunus africana* as main host trees for *Cyrtorchis okuensis*. This disparity in the number of host trees identified in this region could be closely related to the fact that our study was conducted at a grassland edge of a natural and monospecific *Gnidia glauca* forest (Momo et al., 2017), but also to the strong threat to *P. africana* over the past several years. *Prunus*

africana is a widespread tree in the mountain forests of continental Africa and Madagascar, however, it is threatened by unsustainable harvesting in many countries where it occurs. Indeed, this species is used by pharmaceutical companies to manufacture a drug used in treating benign prostatic hyperplasia and prostate gland hypertrophy (Stewart 2003). Cunningham (2005) reported that over the last 40 years, *P. africana* bark harvest for its medicinal properties has shifted from subsistence use to large-scale commercial use for international trade. Cameroon comprises large parts of the current species distribution, and in the Kilum-Ijim area, it is traditionally used to treat malaria and stomach ache (Nsom & Dick 1992). This species is now threatened by extinction and listed as Vulnerable by the International Union for Conservation of Nature (IUCN 2020). It is also included in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Flora and Fauna (CITES) (Betti 2011). Therefore, overexploitation of the tree could have led to a drastic reduction in the population of this host species for *Cyrtorchis okuensis*.

Although *Gnidia glauca* seems less threatened, it is not exempt of risks from future overexploitation as it is also widely used in traditional pharmacopoeia, in nanomedicine, in domestic service in the form of rope or yarn made from bark fibres and as an insecticide or piscicide (Ghosh et al. 2012; Avana-Tientcheu et al. 2018). A recent study (Avana-Tientcheu et al. 2018) conducted in the Oku area revealed that *G. glauca* was more vulnerable in forests than in savanna, because of the proximity of forest stands to the neighbouring villages making them more easily accessible than savanna stands. Conservation status following IUCN categories and criteria is not yet available for *G. glauca*, but should help to define and propose effective conservation measures. As with *P. africana* (Avana 2006), domestication should be also considered for *G. glauca* to be able to meet potential high future demands (Avana-Tientcheu et al. 2018).

To reduce the loss in plant diversity in the CVL, conservation strategies should be improved by more integrative studies. Our study combining morphometric and phylogenetic analyses first helped to delineate *C. okuensis* in relation to the other species of the genus. After that, it was possible to describe the distribution range and the ecology of the species, including the interactions with pollinators. Integration of all these research aspects is important to propose appropriate measures for both *in situ* and *ex situ* conservation, as previous studies demonstrated the link between the decline of insects and plant populations that rely on them for effective reproduction (Biesmeijer et al. 2006; Pauw & Hawkins 2011). Plant-pollinator networks and interactions represent further essential aspects to be integrated in management and conservation of plant biodiversity.

ACKNOWLEDGMENTS

We first express our gratitude to the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) for financial support provided for field activities in Oku. We are also grateful to the American Orchid Society (AOS) for funding the Ph.D. activities of the first author in Cameroon and her stay at the herbarium of the Université Libre de Bruxelles and The Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS-FRIA) for the grant of Tania D'hajjère. We express our gratitude to the National Geographic Society (Grant C303-15, V. Droissart as PI) who supported *ex situ* conservation activities (orchid living collection and seedbank) in Cameroon. We thank all the conservation staff of the Mount Oku National Park and the traditional authorities for allowing us to work in the reserve and access to their facilities. We are grateful to M. Samuel Bilack for his support during the field trip and Roger Kamgang who initiated us to insect light trapping. We gratefully acknowledge the curators of various herbaria (BR, BRLU, K, P, WAG, and YA) for making their collections available for direct examination and loan. We express our sincere gratitude to the curator of the Lepidoptera at the Muséum National d'Histoire Naturelle in Paris, Dr. Rodolphe Rougerie, for his helpful comments on moths collection and, management, and for the identifications of the hawkmoths we collected in the field. We also acknowledge Dr. Vincent Deblauwe for reporting and providing pictures of herbarium sheets of *Cyrtorchis okuensis* from Forest Herbarium of Ibadan in Nigeria. We are grateful to Nicolas Texier for his help in providing the distribution map. We also thank João N. M. Farminhão for his constructive comments on the description of the species and for reviewing an earlier version of the manuscript. We finally wish to express our gratitude to Drs. Elmar Robbrecht, Thierry Pailler and an anonymous reviewer who provided a thoughtful and helpful review of the manuscript.

III.2.2.2 PHENOLOGIE, SYNDROME DE POLLINISATION ET POLLINISATEUR CHEZ *CYRTOCHIS LETOUZEYI*

III.2.2.2.1 PHENOLOGIE ET HABITAT

Le suivi de la floraison de la population de 31 individus de *C. letouzeyi* dans la réserve de faune du Dja entre le 25 juin et le 09 juillet 2018 et 2019 nous a permis d'enregistrer la durée de temps entre l'ouverture de la première et la dernière fleur chez chaque individu qui varie entre un et cinq jours chez les individus ayant une seule inflorescence (portant un total de un et six fleurs), de quatre à neuf jours chez ceux ayant deux inflorescences (portant un total de sept et 13 fleurs) et de quatre à 10 jours chez ceux ayant trois inflorescences (portant un total de 13 et 16 fleurs). Les fleurs restent ouvertes pendant 3 à 14 jours. Sur les bordures de l'inselbeg, cette population suivie avait comme principaux arbres et arbustes hôtes *Alchornea laxiflora* (Benth.) Pax & K Hoffm (Euphorbiaceae), *Psydrax parviflora* (Afzel.) Bridson subsp. *parviflora* (Rubiaceae), *Vitex* sp. (Lamiacées) et *Sterculia tragacantha* Lindl. (Malvaceae). Cependant, *A. laxiflora* était l'espèce d'arbuste hôte où on a observé le plus grand nombre d'individus de *C. letouzeyi* (28 individus).

III.2.2.2.2 POLLINISATION ET SUCCES REPRODUCTEUR

Le suivi journalier des plantes réalisé pendant 15 jours nous a permis d'évaluer la fréquence de floraison et d'enregistrer les événements de visites des fleurs. En 2018, 61 % (131 fleurs ouvertes) des fleurs étaient déjà ouvertes au début de la session de suivi phénologique même si on note une légère augmentation des événements de floraison tout au long de la période d'investigation avec un nombre maximum d'ouverture synchrone des fleurs les 4^{ième} et 8^{ième} jour (**Figure III-34 a**). En 2019, 25 % des fleurs (30 fleurs ouvertes) étaient déjà ouvertes en début de session de suivi et une augmentation des événements de floraison le long de la période de suivi avec un nombre maximum d'ouverture synchrone des fleurs entre les 5^{ième} et le 8^{ième} jour mais aussi le 10^{ième} jour (**Figure III-34 a**). A la fin de ces sessions de floraison, tous les spécimens monitorés présentant des inflorescences étaient déjà en fleurs. En ce qui concerne la fréquence des visites, les fleurs visitées ont été enregistrées à partir du 3^{ième} jour de suivi jusqu'à la fin des deux sessions de monitoring avec le maximum de visites enregistrés les 5^{ième}, 7^{ième} et 8^{ième} jours pour la session 2018 et les 6^{ième}, 14^{ième} et 15^{ième} jours pour la session (2019) (**Figure III-34 b**). Par ailleurs, les caméras installées sur 6 individus ont permis d'enregistrer les visites de sphinx entre le 4^{ième} et le 8^{ième} jour en 2018 et seulement les 5^{ième} et 10^{ième} jours en 2019 (**Figure III-34 c**).

À la fin de la session de suivi phénologique en 2018, 28 des 31 spécimens vivants suivis avaient fleuri et produit au total 215 fleurs ; trois spécimens vivants n'ont pas fleuri. Le taux de fleurs avec les pollinies emportées étaient de 31,6 % (64 fleurs sur les 215 totales). Les résultats montrent que seules 16 fleurs (7 % des fleurs produites) portées par sept individus se sont développées en fruits (Tableau

III-5). En 2019, car seulement 17 des 31 individus étudiés ont fleuri et produit un total de 117 fleurs, 10 individus n'ont pas fleuri et quatre sont morts (Tableau III-5). Le taux de fleurs avec les pollinies emportées est plus faible ici avec une valeur de 15,4 % représentant 18 fleurs sur les 117 fleurs totales produites. Par ailleurs, seulement cinq fleurs (4 % des fleurs produites) de trois individus se sont développées en fruits (Tableau III-5).

Tableau III-5. Phénologie de la floraison et évaluation du succès reproducteur dans la population de *Cyrtorchis letouzeyi* au cours de deux années consécutives (2018 et 2019) dans la réserve de faune du Dja.

Paramètres	2018	2019
Nombre d'individus en fleur	28	17
Nombre d'individus sans fleur	3	10
Taux de mortalité (%)	-	4 (13)
Nombre de fleurs produites	215	117
Nombre de fleurs avec les pollinies emportées (%)	68 (31,6)	18 (15,4)
Nombre de fruits développés (%)	16 (7,4)	5 (4,3)

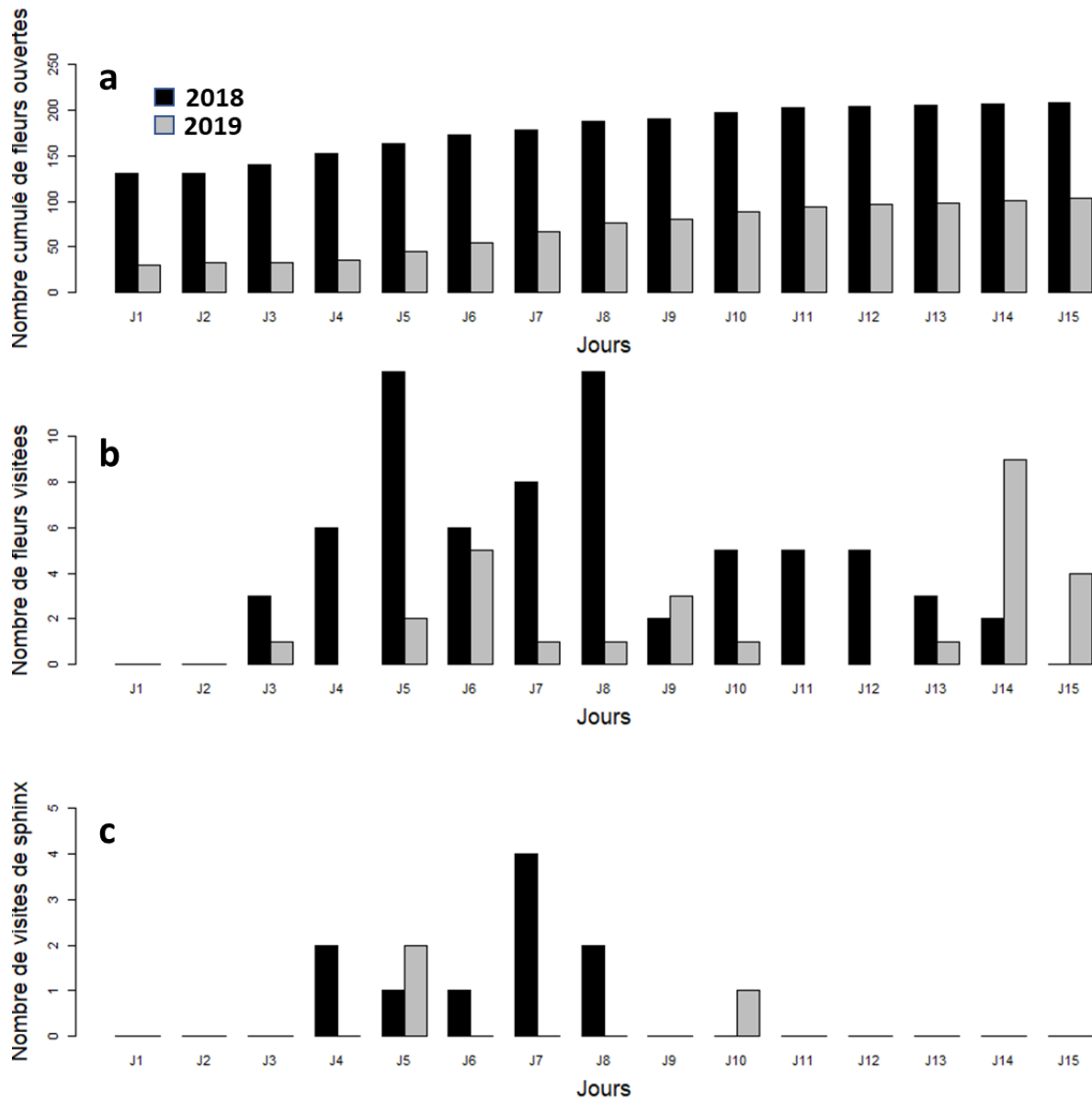


Figure III-34. Phénologie journalière de la reproduction de *Cyrtorchis letouzeyi* dans la population étudiée (31 individus) entre le 25 juin et le 09 juillet en 2018 et 2019. a. Nombre cumulé de fleurs ouvertes par jour. b. Nombre de fleurs visitées par jour (fleurs avec les pollinies emportées et/ou déposées sur le stigmate). c. Nombre de visites de sphinx enregistré par jour avec les caméras.

III.2.2.2.3 OBSERVATION DES POLLINISATEUR ET SYNDROMES

Un total de 1812 heures de vidéo ont été obtenues à l'issus du suivi avec les caméras les six individus en 2018 (1177 heures) et 2019 (635 heures). Le traitement de ces vidéos a permis de détecter des séquences de mouvement qui ont produit 261 heures 46 minutes et 13 secondes. On y observe 166 interactions plante-animaux (**Tableau III-6**). L'interaction la plus importante ici est la prédation des pollinisateurs qui enregistre 29 évènements de visites pour une durée totale de 1237 minutes (environ 21 heures et 37min d'interaction) caractérisées par la présence fréquente (17.79 % des visites) sur les fleurs des araignées (Araneae) et des mantes religieuses (Mantodea) (**Tableau III-6**). La deuxième interaction la plus importante est l'herbivorie caractérisée par la présence des orthoptères (criquets, sauterelles et chenilles) qui se nourrissent des feuilles, de la corolle, de l'éperon et parfois de toute la fleur (**Figure III-35 & Figure III-36**).

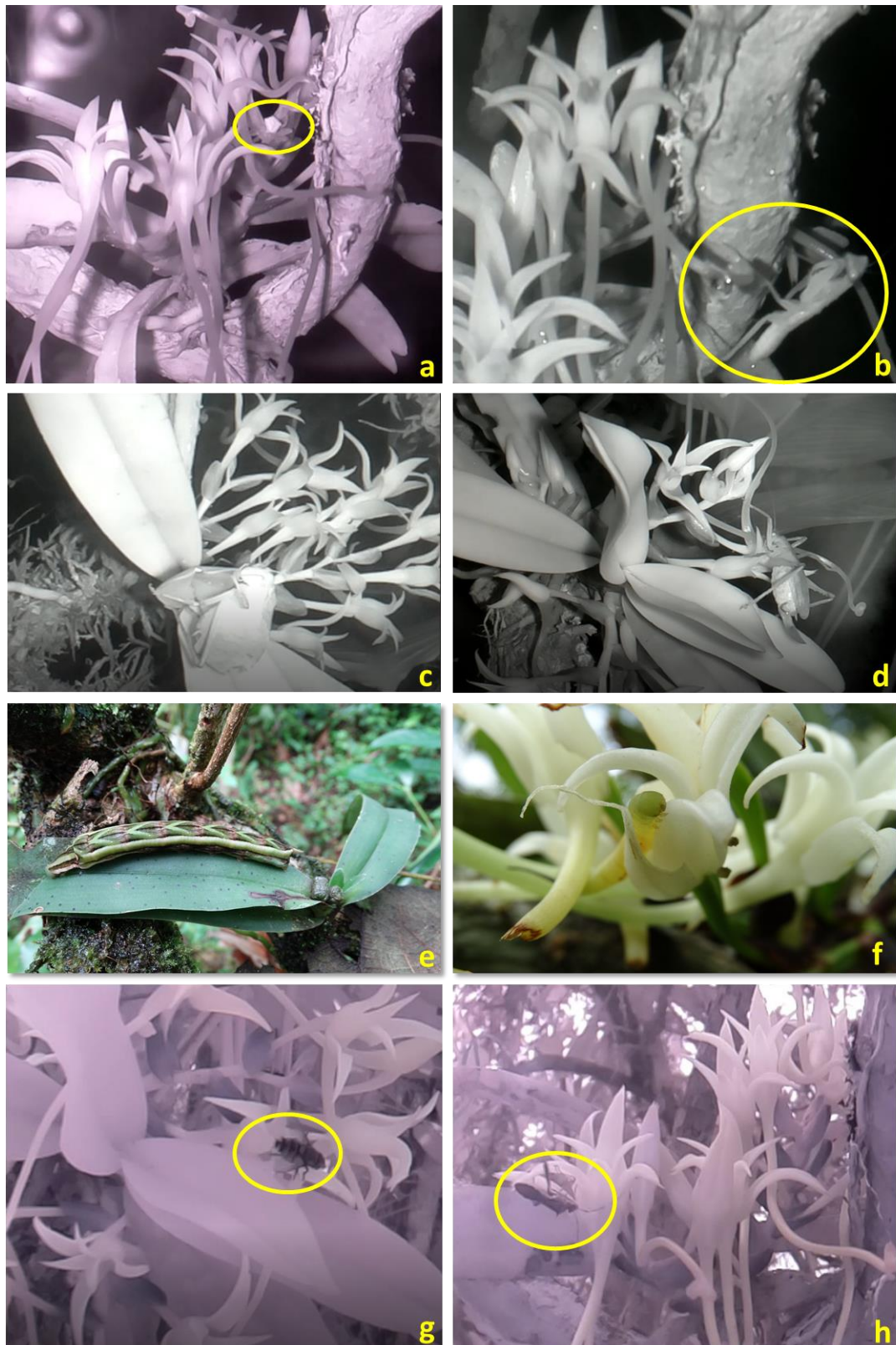


Figure III-35. Image illustrant la diversité des insectes visiteurs de *Cyrtorchis letouzeyi* dans la réserve de faune du Dja. Principaux insectes prédateurs représentés par une araignée (a) et une mante religieuse (b) ; les principaux insectes réalisant de l'herbivorie sur les fleurs et les feuilles (c, criquet; d, sauterelle; e-f, chenilles). Les autres visiteurs passifs (g, mouche; h, punaise).

Plusieurs groupes taxonomiques ont été observés visitant les fleurs et représentant 12 ordres d'insectes (**Figure III-36**). Cependant on note une faible activité de notre groupe d'intérêt, la famille des Sphingidae (**Figure III-36**). Les interactions impliquant les espèces *Xanthopan morgani* (Walker, 1856) (9 événements de visites enregistrés) et *Coelonia fulvinitata* Butler (4 événements de visites enregistrés) ne représentent que 13 événements de visite pour une durée totale plus faible de 4,5 minutes (environ 4 minutes et 30 secondes) et la durée moyenne de la visite du pollinisateur est de $20,5 \pm 18,68$ secondes (**Tableau III-6 & Figure III-36**). Les transferts de pollinies et les pollinisations qui en ont résulté ont été confirmés par des vidéos montrant les pollinies de *C. letouzeyi* attachées sur les proboscis des sphinx visiteurs (voir **Figure III-37**) et par des observations manuelles du développement des fleurs et des fruits.

Les Formicidae étant quasi présentes en permanence sur les fleurs, elles n'ont pas été prises en compte dans nos analyses.

Tableau III-6. Fréquence et durée des différents types d'interactions observés chez *Cyrtorchis letouzeyi*

Type d'interaction	Nombre de visites	Fréquence (%)	Durée des visites (en min)	Taxons impliqués
Anti_pollinisateur/Predation	29	17,79	1237	Araneae & Mantodea
Butinage	11	6,75	396,4	Blattodea, Hymenoptera & autres Lepidoptères
Herbivorie	15	9,20	140,6	Orthoptera
Passage	98	58,28	13872,2	Aphidoidea, Araneae, Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Heteroptera, Hymenoptera, Neotaenioglossa, Non identifié, Orthoptera, Autres Lepidoptera, Scorpionida, Sphingidae
Pollinisateur	13	7,97	4,5	Sphingidae

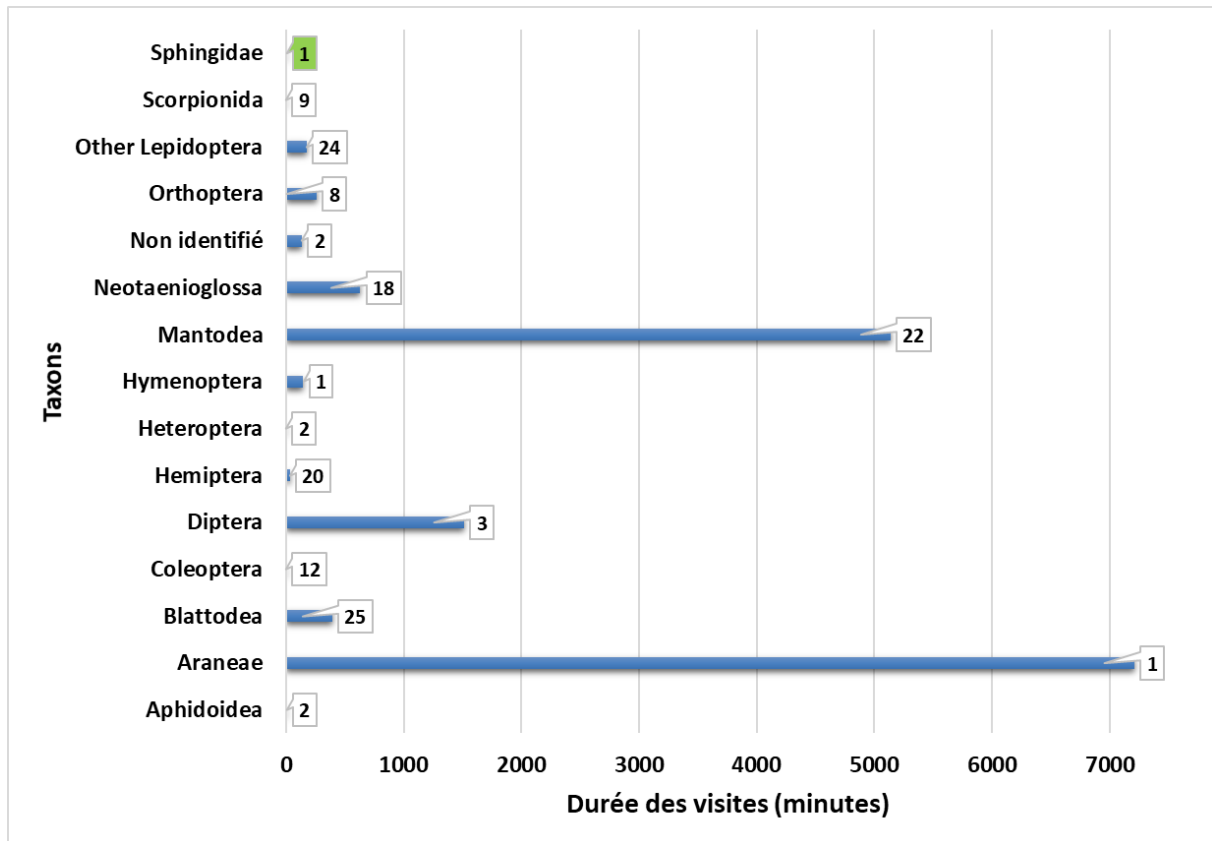


Figure III-36. Caractérisation des visites des différents taxons animaux sur les fleurs de *Cyrtorchis letouzeyi* observés sur les enregistrements vidéo. Les barres représentent les durées totales des interactions enregistrées par taxons et les chiffres dans les étiquettes représentent le nombre de visites enregistrées par taxon.

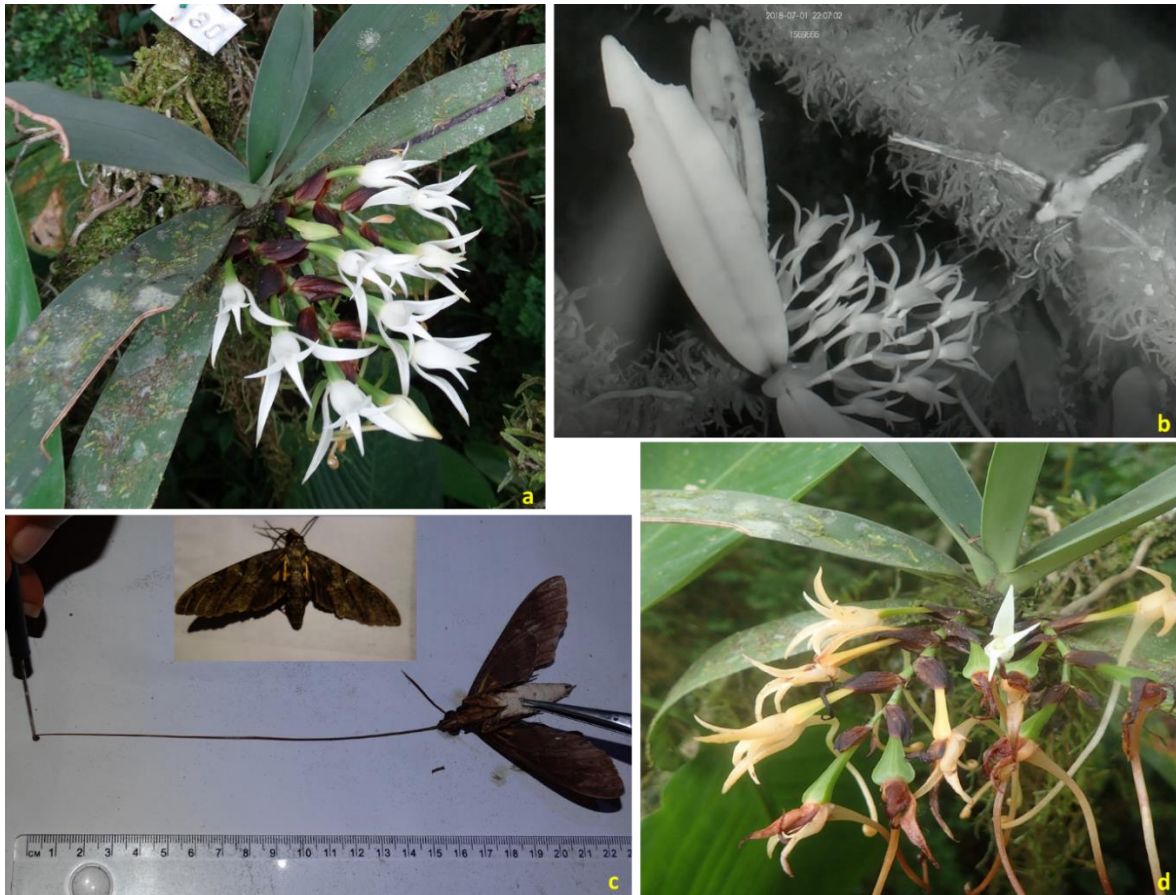


Figure III-37. Observation et capture des pollinisateurs. Spécimen en fleur de *C. letouzeyi* avant la pollinisation par le sphinx (a). Capture d'une vidéo enregistrée avec la caméra montrant un individu de *Xanthopan morganii* butinant sur les fleurs (b). Individu de *Xanthopan morganii* capturé à l'aide d'un piège lumineux (c). Plante de *C. letouzeyi* développant des fruits après la visite du pollinisateur (c).

Le suivi journalier des activités des visiteurs présenté par la **Figure III-38** ci-dessous montre qu'il y a des visites presque tout au long de la durée du jour et de la nuit mais on note également moins de taxons visiteurs entre 00h et 09 h du matin. Cependant, les individus de trois ordres (Araneae, Sphingidae et Blattodea) visitent les fleurs à la tombée de la nuit à partir de 18h jusqu'à 06h du matin. Les diptères et des hyménoptères ne visitent les fleurs que pendant la journée entre 08h et 18h. Les mantes religieuses (Mantodea) étaient aussi bien actives pendant la journée que durant la nuit sauf entre minuit et 5h du matin. La visite des pollinisateurs (Sphingidae) se produit uniquement pendant la nuit entre 18h et 6h du matin avec un maximum de visites enregistrées entre 22h et 23h (voir **Figure III-38**).

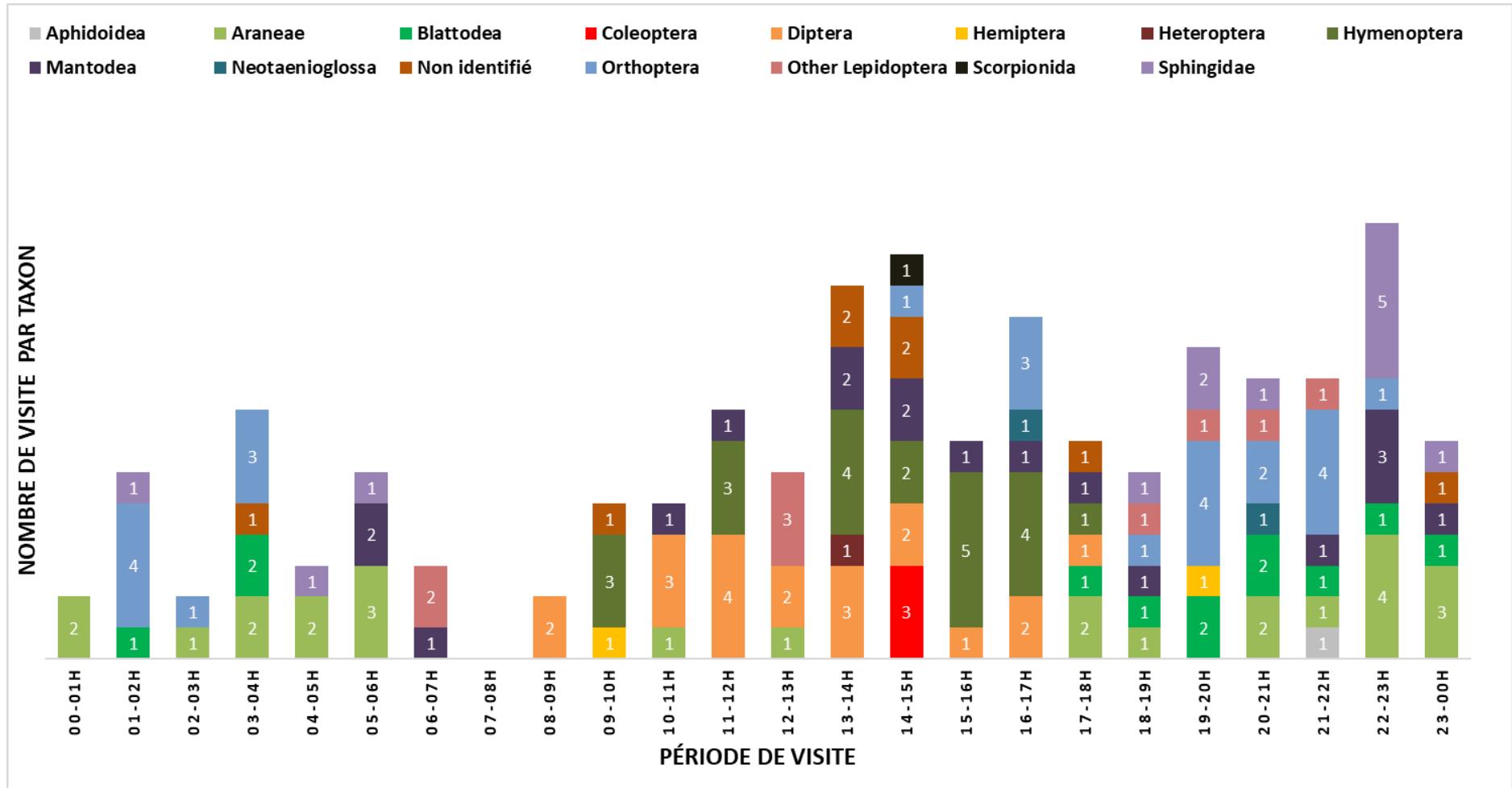


Figure III-38. Diversité des principaux visiteurs de *Cyrtorchis letouzeyi* enregistré dans la réserve du Dja pendant la période de suivi avec les caméras sur six individus. Les barres en couleur représentent le nombre total d'interactions enregistré pour chaque taxon visiteurs par heure.

Les 12 sessions de pièges lumineux réalisées durant les deux campagnes de floraisons ont permis de capturer 51 individus de Sphingidae parmi lesquels 32 ont été identifiés à l'échelle du genre ou de l'espèce (**Tableau III-7**). Parmi ces spécimens, 3 individus de *Xanthopan morganii morganii* (Walker, 1856) (**Figure III-37 C**) et 6 individus de *Coelonia fulvinitata* (Butler 1875) ont été collectés. La longueur des proboscis des trois spécimens capturés de *Xanthopan morganii* varie de 13 à 18 cm avec une moyenne de 15,67 cm ($\pm 2,5$, n=3) et celle des six individus de *Coelonia fulvinitata* varie de 10 à 12 cm avec une moyenne de 10,83 cm ($\pm 0,75$, n=6). La longueur moyenne des éperons des fleurs des individus de *C. letouzeyi* mesurées dans la population suivie est de 7,7 cm ($\pm 0,87$, n=261) et varient de 4-9,6 cm. La profondeur du nectar à partir de l'entrée de l'éperon des individus suivis varie de 3,3 à 9,2 cm avec une moyenne de 7,2 cm ($\pm 0,9$, n=191). On observe une différence significative entre dans la longueur de l'éperon, la profondeur du nectar et des proboscis (voir **Figure III-39**).

Tableau III-7. Liste des Sphingidae capturés à l'aide du piège lumineux et identifiés (nombre d'individus capturés et longueur moyenne du proboscis).

Espèces de sphinx	Nombre d'individus collectés	Longueur moyenne du proboscis en cm (\pm écart type)	Pollinisateurs confirmés sur les vidéos
<i>Coelonia fulvinitata</i>	6	10,83 ($\pm 0,75$)	Oui
<i>Euchloron megaera</i>	4	3,625 ($\pm 0,25$)	Non
<i>Nephele aequivalens</i>	5	6,3 ($\pm 1,44$)	Non
<i>Nephele comma</i>	7	4,85 ($\pm 0,61$)	Non
<i>Nephele rosae</i>	3	6,07 ($\pm 0,60$)	Non
<i>Nephele sp.</i>	4	4,5 (± 0)	Non
<i>Xanthopan morganii</i>	3	15,67 ($\pm 2,51$)	Oui

Les paramètres du nectar étaient mesurés deux jours après leurs ouvertures. Quatorze fleurs ont été échantillonnées et le volume de nectar mesuré était compris entre 0,54 et 2,23 μ l avec un volume moyen de 1,38 μ l ($\pm 0,4$, n=14). La concentration en sucre du nectar quant à elle varie de 17-22 % avec une moyenne de 18,8 % ($\pm 1,8$, n=11).

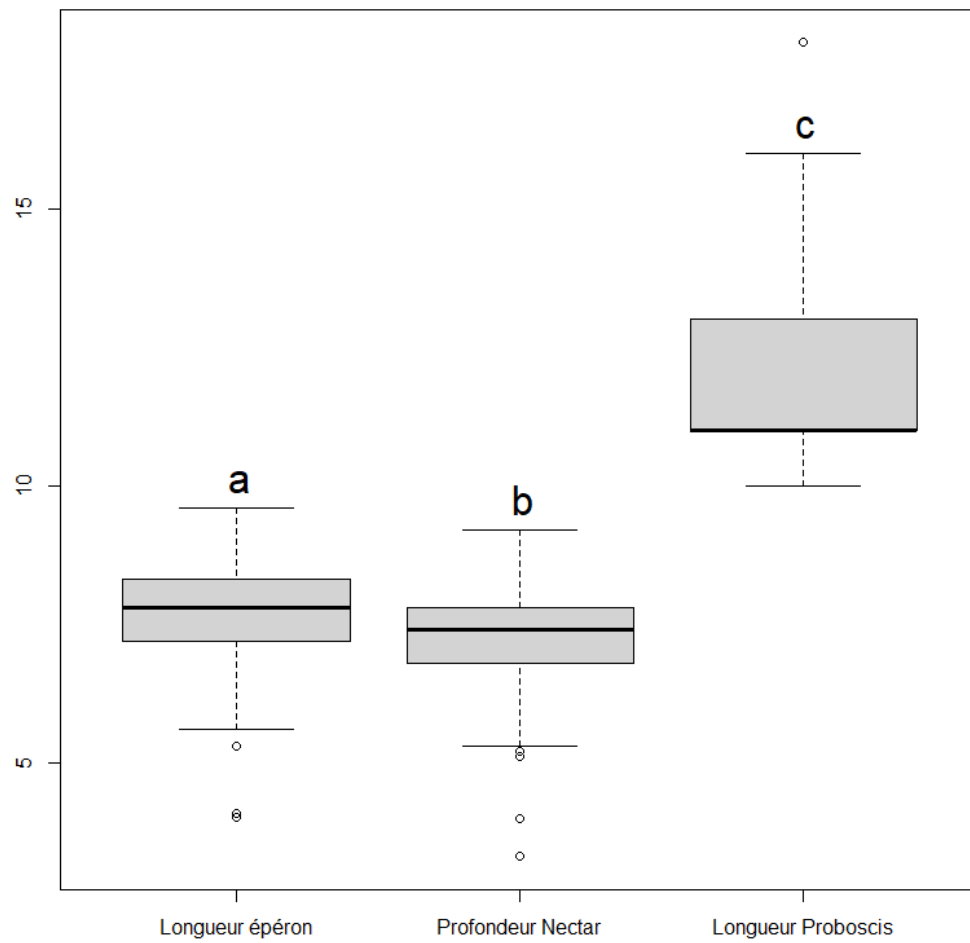


Figure III-39. Boîtes à moustaches montrant la distribution des longueurs d'épéron, de colonne de nectar et de longueur de proboscis mesurées sur les fleurs suivies et les papillons pollinisateurs capturés. Les différentes lettres au-dessus des boîtes indiquent une différence significative entre les paramètres ($p < 0.05$)

III.3 FACTEURS INFLUENÇANT LA PRODUCTION DES FRUITS ET DE GRAINES VIABLES

Dans le précédent chapitre, les patrons de floraison de quelques espèces ont été caractérisés et les pollinisateurs de deux espèces observés. Globalement, le taux de fructification en milieu naturel s'est avéré très faible chez les espèces étudiées et dépend fortement de la visite des sphinx, principaux pollinisateurs. Le présent chapitre a visé à tester l'apport de divers facteurs notamment le système de pollinisation et la limitation des ressources dans la maximisation de la production en fruits et graines viables. Pour ce faire, les spécimens vivants de deux espèces cibles (*C. aschersonii* et *C. ringens*) ont été choisis à l'ombrière de Yaoundé pour réaliser les tests de pollinisation manuels suivant quatre traitements. Il en ressort que les deux espèces réagissent de manière différente au système de pollinisation appliqué (autogamie et allogamie) pour la production de fruits. Cependant, la pollinisation croisée semble optimiser la production de fruits et de graines viables contrairement à l'autopollinisation. Cependant davantage d'espèces devront être testées pour confirmer ce modèle. Pour ce qui est de la limitation des ressources, elle pourrait dépendre d'autres facteurs que de ceux testés dans cette étude et mériterait donc d'être étudiée plus en détail. Le temps de maturation semble positivement corrélé à la production en fruit et en graine viables. Les détails de cette étude sont présentés dans l'article ci-après.

Maximizing viable seed production in tropical orchids: comparing the influence of breeding systems and resource-limitation in two cultivated *Cyrtorchis* species (Orchidaceae)

Azandi L.*, Messado K. L*., Savignac M., Simo-Droissart M., Hardy O., Sonké B., Nguetsop V.F. & Droissart V.

* Contributed equally

Manuscript à soumettre dans la revue *Seed Science Research*

ABSTRACT

Orchids are an extremely diverse and increasingly threatened plant family, and their conservation is a subject of primary interest. Research programs for their *ex situ* conservation are being adopted in addition to in-situ conservation efforts to ensure eventual reintroduction and their continuous survival in natural habitats. Here, we identify and test factors that may affect fruit and seed production under controlled *ex situ* conditions in two epiphytic angraecoid orchids. Explicitly, we seek to identify the most efficient manual breeding system (self- or cross-pollination) and verify the effect of resource limitation on fruit set and viable seed production per species. 164 individuals of *Cyrtorchis aschersonii* and 78 individuals of *Cyrtorchis ringens* were surveyed from 2017-2019. To test for the more efficient breeding system, we applied 4 manual pollination treatments per individuals at anthesis: self-pollination of 1 flower, self-pollination of 3 flowers, cross-pollination of 1 flower and cross-pollination of 3 flowers. We evaluated the leaf area per individual to verify the effect of resource limitation on fruit set and viable seed production. We used the Welch two-sample t-test and the Wilcoxon rank-sum test to evaluate the influence of breeding systems on fruit set and viable seed production. We also tested the correlation between leaf area, number of leaves, number of inflorescences, fruit set, fruit abortion and viable seeds. Both species proved to be self-compatible. Cross-pollination was more efficient than self-pollination in both species for the production of viable seeds even though a non-significant difference was observed in *C. ringens*. Resource limitation showed no significant difference in *C. aschersonii* but revealed a moderate positive correlation between evaluated parameters in *C. ringens*. However longer maturation periods proved to enhance the proportion of viable seeds in mature fruits of both species.

Keywords: Breeding system, epiphytic Angraecoids, *ex situ* conservation, seed viability, fruit set, manual pollination, resource limitation.

III.3.1 Introduction

Orchids represent flagship species for conservation due to their huge diversity and increasing number of rare and endangered species threatened by non-sustainable or illegal collection and global change (Fay *et al.*, 2015; Gale *et al.*, 2018). They are facing threats that are mainly grouped under habitat degradation, unsustainable harvesting and illegal smuggling of desirable species for horticulture (Hinsley *et al.*, 2018), medicinal (Pant et Rinchen, 2012; Rankou et Kumar, 2015; Leon et Lin, 2017) and comestible purposes (Menzepoh, 2011; Veldman *et al.*, 2014; Hinsley *et al.*, 2017). In situ conservation strategies are still not enough to compensate for the orchid population decrease in natural habitats, given the threats they face (Seaton *et al.*, 2013; Fay, 2018). For these reasons, and in addition to in situ conservation efforts, research programs for *ex situ* conservation of orchid species and their eventual reintroduction into natural habitats are deemed necessary (Seaton *et al.*, 2018) to ensure their continuous survival around the world.

Orchid conservation through seed banking is of great interest (IUCN, 1996; Neto & Custódio, 2005) since they are tolerant to dry storage at cryogenic temperatures for decades (Seaton *et al.*, 2018). Their small size and enormous capsule hosting hundreds to millions of seeds include added advantages. Seeds are preferred compared to tissue-cultured and mass-produced orchid seedlings, because they conserve genetic diversity that ensures the success and sustainability of reintroduced populations (Seaton *et al.*, 2013). Also, seed set with low viability or without embryos is common in orchids (Hosomi *et al.*, 2011). Several studies conducted on natural reproduction of orchids have documented low fruit set and seed quality owing to various factors including pollinator and resource limitation (Tremblay *et al.*, 2005; Jersáková *et al.*, 2006; Metsare *et al.*, 2015; Buyun *et al.*, 2015). Fruit set and seed viability may be improved by artificial means using *ex situ* living collections. In Africa for instance, *ex situ* conservation strategies, and particularly the creation of orchid shade houses have been adopted to study and conserve species in the Central African region and Madagascar (Stévant *et al.* 2020). Hence, developing new techniques to maximize viable seed production from existing *ex situ* collections represents a major priority in orchid conservation.

In most orchids, low fruit set values are observed as a result of pollination constraints and/or limited resources (Tremblay *et al.*, 2005; Jersáková *et al.*, 2006; Vale *et al.*, 2011). To compensate for the low reproductive success rates in orchids cultivated outside their natural habitat, hand pollinations have been considered in recent studies to ensure fertilization and increase fruit set values (Micheneau *et al.*, 2006; Phillips *et al.* 2015; Vale *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2014). Studies on breeding systems in orchids have proven that self-pollination has more negative consequences for plant fitness than cross-pollination (Jersáková *et al.*, 2006; Buyun *et al.*, 2015). Self-pollination reduces pollen export and fertilization of ovules by intra-specific outcross pollen (Holsinger & Thomson, 1994; Herlihy & Eckert,

2002). Also, the percentage of viable seeds was found to be significantly lower in capsules resulting from self- than cross-pollination for both nectar rewarding and non-rewarding orchid species (Jersáková *et al.*, 2006). Cross-pollination thus seems to increase viable seeds in orchids (Jersáková *et al.*, 2006), although only a few detailed experimentations have been carried out to date on tropical epiphytic species.

In addition to constraints associated with pollination, it has been proven repeatedly that sexual reproduction (flower production and fruit set) is limited primarily by resource availability (Mattila & Kuitunen, 2000). Low fruit-to-flower ratios in many plants are believed to be the result of scarcity in available resources for fruit development (Tremblay *et al.*, 2005). Individual growth rates of epiphytic orchids are slow and limited by the low water and nutrient availability characteristic of their habitat (Mondragon *et al.*, 2015). A decrease in resource availability following defoliation has been found to reduce fruit set and seed production in many perennial plant species (Stephenson, 1981; Niesenbaum, 1996). Most resources for fruit production originate from upper leaves, green bracts and fruit walls (Lubbers & Lechowicz, 1989; Primack & Hall, 1990) meaning that leaf area is essential for energy production and dry matter accumulation process in crops (Tanko & Hassan, 2016). From these parameters, we hypothesize that orchids with lower leaf count and leaf area will exhibit lower fruit and viable seed production.

To date, few studies have been carried out on viable seed production in African epiphytic orchids and were limited to Madagascar and South Africa (Nilsson *et al.*, 1987; Nilsson & Rabakonandrianina, 1988; Luyt & Johnson, 2001). A recent, multi-disciplinary study on the model genus *Cyrtorchis* (Azandi *et al.*, sous presse) now allows studying its reproductive biology, thanks to large living collections accessible for experimentation. The main goal of this paper is to identify and assess factors that impact fruit set and viable seed production under controlled, *ex situ* conditions in two central African orchids species of the epiphytic genus *Cyrtorchis*. More specifically, we aim to identify the more efficient manual pollination system (self- or cross-pollination) and verify the effect of the resource-limitation hypothesis and its impact on fruit set and viable seed production.

III.3.2 MATERIAL AND METHODS

III.3.2.1 THE STUDY SITE

This study was carried out at the Yaoundé Orchidaceae shadehouse located at the Higher Teachers Training College (HTTC) of the University of Yaounde I, Centre region, Cameroon (3°52'0"N, 11°30'30"E) at ca. 750 m. Environmental conditions of this *ex situ* orchid living collection created since 2004 are described in Texier *et al.* (2018).

The angraecoid orchid genus *Cyrtorchis* Schltr. currently comprises two sections (Section *Homocolleticon* and Section *Heterocolleticon*) and 18 species (Azandi *et al.*, 2018; sous presse). One species per section of *Cyrtorchis* was chosen for this study: *Cyrtorchis aschersonii* (Kraenzl.) Schltr. (sect. *Heterocolleticon*) and *Cyrtorchis ringens* (Rchb.f.) Summerh. (sect. *Homocolleticon*). Both sections of *Cyrtorchis* are distinguished based on their viscidium structure, which might result from different evolution of their reproductive systems (Azandi *et al.*, sous presse). Both species are well represented in the living *Cyrtorchis* collection of the Yaoundé Orchidaceae shadehouse. A total of 164 individuals of *Cyrtorchis aschersonii* and 78 individuals of *Cyrtorchis ringens* were surveyed throughout this study.

To test for the effect of self-compatibility and cross-pollination on viable seed production, four hand-pollination treatments were applied to both species: self-pollination of one flower (self-one flower), self-pollination of three flowers (self-three flowers), cross-pollination of one flower (cross-one flower) and cross-pollination of three flowers (cross-three flowers). All pollinaria used for self-pollination treatments were taken from the same pollinated individuals while those used for cross-pollination treatments were taken from different individuals of the same species. The two pollinaria per flower donor were used per pollinated flower. Hand-pollination treatments were carried out using a needle to transport the pollinia from the anther cap to the ovary, within three days following the anthesis of flowers to avoid uncontrolled pollinations and ensure effective fertilization.

Before each pollination treatment, we recorded the number of leaves, the total leaf area and the number of inflorescences produced by each surveyed individual. Given the linear shape of leaves margins common to both species, the formula applied for leaf area estimation was that of the rectangle. The leaf area for every leaf per individual was then summed to obtain its overall leaf area using the formula below:

$$LA = \sum_{i=1}^n (Li \times Wi)$$

Where: **L** = leaf length, **n** = number of leaves and **W** = leaf width

Flowers in the lower part of the inflorescence and the inflorescence with first opened flowers were prioritized for pollination treatments since they tend to produce greater fruit sets and viable seed percentages (Buyun *et al.*, 2015). All other inflorescences, flowers or flower buds were cut-off to avoid a bias in the allocation of plant resources to other parts and to avoid uncontrolled pollination.

Fruit set assessment was carried out after hand pollinations to quantify part of the reproductive success of both species (Proctor & Harder, 1994; Neiland & Wilcock, 1998). In this study, the approach used by Singer and Sazima (2001) was followed:

$$\text{Fruit set rate} = \frac{\text{Number of fruits formed}}{\text{Number of pollinated flowers}} \times 100$$

The fruits initially formed were surveyed till maturity when capsule color changed from green to yellow or brown. Fruit abortion rate (see formulas below) was calculated by dividing the number of fruits aborted (number of fruits formed minus the number of fruits that reach maturity) by the total number of fruits produced (Walsh & Michaels, 2017).

Fruit abortion rate

$$= \frac{\text{Number of fruit formed} - \text{Number of mature fruits collected}}{\text{Number of fruit formed}} \times 100$$

At harvest, the number of mature fruits were recorded. To avoid seed loss, capsules were collected just before dehiscence and stored in hermetic boxes filled with dried rice to reduce their moisture content until opening. Seeds were then extracted from open fruits and placed in a desiccator at a pressure of 300 mmHg with a saturated lithium chloride solution for seven days to reduce their moisture content to <5% w/w (Seaton *et al.*, 2018). At this stage, the seeds are ready for viability tests.

To test for seed viability, the standard tetrazolium method (Moore, 1985; França-Neto, 1999; Seaton *et al.*, 2010; Seaton & Pritchard, 2003) was implemented. This coloration test has proven to be highly reliable and efficient for testing seed viability in orchids (Hosomi *et al.*, 2011, 2012). Living cells reduce tetrazolium into a colored insoluble salt, formazan, distinguishing living embryos by a red coloration from dead embryos that retain their original color (Deswal & Chand, 1997; Piña-Rodrigues *et al.*, 2004). Here, 10 mg of seeds were pre-conditioned by placing them in microtubes filled with 1.5 ml of a 10% sucrose solution. After 24 hours of incubation at room temperature (about 25°C), the solution was removed and replaced by 1 ml of a 1% tetrazolium solution to obtain coloration of the viable embryos. These seeds were then incubated in the dark at 40°C for 24 h after which the 1 ml tetrazolium solution was discarded, and seeds were rinsed twice with distilled water (Hosomi *et al.*, 2011). A drop of the resulting solution containing seed tissue was mounted onto a glass slide for scanning and observation. The slides were captured using an Epson Perfection V550 Photo table scanner at a resolution of 3600 dpi. A blue background was used on the inner side of the scanner cover for a better contrast between seed categories (see **Appendix III-9**). Counting of viable seeds was done by importing the digital photographs into GIMP software that defines counting surfaces by inserting grids. The number of seeds per grid was counted and finally expressed as percentages of viable seeds. Only rose-red seeds were considered viable while white seeds were encoded as non-viable (Hosomi *et al.*, 2011). To determine the weight of viable seed set in a fruit, the total seed from each fruit was

previously weighed and the viable seed weight deduce from the fraction used for the viability testing. (see formula below)

$$\text{Viable seed weight} = \frac{\text{Total seed weight} \times \text{viable seed percentage}}{100}$$

III.3.2.2 DATA ANALYSIS

The R statistical environment (R Core Team, 2020) was used for all statistical analyses. Before statistical analysis, the normality of all the variables were tested using the Shapiro-Wilk Normality Test. The Welch two-sample t-test and the Wilcoxon rank-sum test for paired differences were used to test whether there is a significant difference between fruit sets and the percentage of viable seeds to evaluate the influence of breeding systems. To evaluate the influence of resource limitation on fruit set, seed viability and fruit abortion, the correlation between leaf area (LA), number of leaves, number of inflorescences, fruit set, fruit abortion and viable seeds was tested. This correlation was evaluated using Spearman's rank correlation between pairs of variables (leaf area and fruit set; leaf area and viable seeds). The R package *corrplot* (Wei & Simko, 2017) was used to display a chart of the correlation matrix. All these statistical tests were conducted at a 5% level of confidence.

III.3.3 RESULTS

III.3.3.1 BREEDING SYSTEM EVALUATION IN *C. ASCHERSONII*

From June 2017 to October 2019, 310 flowers were pollinated from 164 individuals of *Cyrtorchis aschersonii* (**Tableau III-8**). *C. aschersonii* proved to be self-compatible as it set fruits from self-pollination treatments that resulted in fruit set values of 91.3% (self-pollination of one flower) and 71.57% (self-pollination of three flowers). The cross-pollination treatments showed almost the same fruit set values with as the self-pollination treatments of 95.34% for cross-pollination of one flower and 79.48% for cross-pollination of three flowers. By contrast, pairwise comparison tests show that fruit sets of both pollination treatments (autogamy and allogamy) for one-flower ($W= 1029$, $N= 89$, $p\text{-value} = 0.45$) and three-flowers ($W= 710.5$, $N= 73$, $p\text{-value} = 0.56$) did not differ significantly (see **Tableau III-8**). Pairwise comparison on fruit abortion rate also showed no significant differences between the two pollination treatments for both one-flower ($W= 891$, $N= 89$, $p\text{-value} = 0.75$) and three-flower ($W= 687$, $N= 73$, $p\text{-value} = 0.16$). Pairwise comparison results showed significant differences in the proportion of viable seeds produced between cross- and self-pollination for both one ($W= 455.5$, $N= 54$, $p\text{-value} = 0.00012$) and three ($W= 721$, $N= 52$, $p\text{-value} = 1.081\text{e-}05$) pollinated flowers (**Tableau III-8**). Cross-pollination treatments produced significantly higher percentages of viable seeds than self-pollination (69.98% vs 8.9% for the one-flower pollinated individuals, and 81.46% vs 28.34% for the

three-flower pollinated individuals). Significant differences were also observed in total viable seeds weight produced for each treatment between cross- and self-pollination of one pollinated flower only ($W= 721$, $N= 18$, $p\text{-value} = 1.081e-05$). Also a higher proportion of viable seed was observed from outcrossed fruit resulting from longer maturation periods (227 ± 43.83 days for the cross-one flower and 229 ± 65.17 days for the cross-three flower) (**Tableau III-8**).

Tableau III-8. Mean parameters of the reproductive success for pollinated individuals of *C. aschersonii*. Viable seed weight in milligrams and Maturation time in days.

Pollination Treatment (Pollinated individuals)	Fruit Set (%FS)	Mature Fruit collected (%MFC \pm SD)	Fruits abortion (%FA \pm SD)	Percentage of viable seeds (%VS \pm SD)	Viable seed weight (VSW \pm SD)	Maturation time (MT \pm SD)
Self-one flower (46)	91.3 ^a \pm 28.5	52.2 ^a \pm 50.5	42.8 ^a \pm 50.1	8.9 ^a \pm 18.9	0.25 ^a \pm 0.35	203 \pm 40.5
Self-three flowers (34)	71.6 ^a \pm 36.8	57.8 ^a \pm 39.6	17.2 ^a \pm 34.3	28.3 ^a \pm 40.02	19 ^a \pm 0.04	208 \pm 52.5
Cross-one flower (45)	95.3 ^a \pm 21.3	51.2 ^a \pm 50.6	46.3 ^a \pm 50.5	69.9 ^b \pm 44.01	40 ^b \pm 0.03	227 \pm 43.8
Cross-three flowers (39)	79.5 ^a \pm 27.6	58.1 ^a \pm 35.6	28.5 ^a \pm 38.5	81.4 ^b \pm 34.6	37 ^a \pm 0.04	229 \pm 65.2

III.3.3.2 BREEDING SYSTEM EVALUATION IN *CYRTOCHIS RINGENS*

In *Cyrtorchis ringens*, 142 flowers were pollinated from 78 individuals between August 2017 and November 2019 (**Tableau III-9**). *C. ringens* is also self-compatible as it was able to set fruits from self-pollination treatments that resulted in 70% and 87.5% fruit set for self-pollination of one flower and self-pollination of three flower respectively. Cross-pollination treatments generally set more fruits with 100% and 71.79% for cross-pollination of one and three flowers, respectively. Yet, pairwise comparison tests show that cross-pollination led to significantly higher fruit sets for one flower ($W= 403$, $N= 51$, $p\text{-value} = 0.001$) but not for three-flower pollination treatments (**Tableau III-9**). No significant difference between pollination treatments was observed for the percentage of fruit abortion, seed weight and viable seeds in both one-flower and three-flower treatments.

Pairwise comparison tests show that percentages of viable seeds of the two pollination treatments for both one-flower ($W= 118.5$, $N= 28$, $p\text{-value} = 0.1094$) and three-flower ($W= 107.5$, $N= 28$, $p\text{-value} = 0.6601$) pollinations did not differ significantly (**Tableau III-9**). Longer maturation periods are observed in fruit resulting from self-and cross-pollination of one flower (130 ± 17.75 and 128.79 ± 18.34 days respectively) in *C. ringens* (**Tableau III-9**).

Tableau III-9. Mean parameters of reproductive success for pollinated individuals of *C. ringens*. Viable Seed weight in milligrams and Maturation time in days.

Pollination Treatment (Pollinated individuals)	Fruit set (%FS±SD)	Mature fruit collected (%MFC±SD)	Fruits abortion (%FA±SD)	Percentage of viable seeds (%VS±SD)	Weight of viable seeds (VSW±SD)	Maturation period (MT±SD)
Self-one flower (15)	70 ^a ±47.01	64.28 ^a ±49.72	35.71 ^a ±49.72	31.51 ^a ±41.43	3 ^a ±0.005	130±17.75
Self-three flowers (19)	87.5 ^a ±20.63	75 ^a ±25.82	15.62 ^a ±25.43	39.05 ^a ±45.32	8 ^a ±0.01	120.8±24.02
Cross-one flower (31)	100 ^b ±0	83.9 ^a ±37.39	22.58 ^a ±42.5	57.35 ^a ±39.59	5.7 ^a ±0.005	128.79±18.34
Cross-three flowers (13)	71.79 ^a ±29.95	64.10 ^a ±28.74	5.13 ^a ±18.49	37.50 ^a ±43.28	11 ^a ±0.01	116.08±12.96

III.3.3.3 RESOURCE LIMITATION ASSESSMENT IN *CYRTOCHIS ASCHERSONII*

In *Cyrtorchis aschersonii*, there was a weak negative correlation between leaf area and fruit abortion rate for cross-pollination of one-flower (**Figure III-40, Appendix III-10**). However, there was no correlation between the fruit set, fruit abortion and number of leaves, leaf area and number of inflorescences for the other pollination treatments.

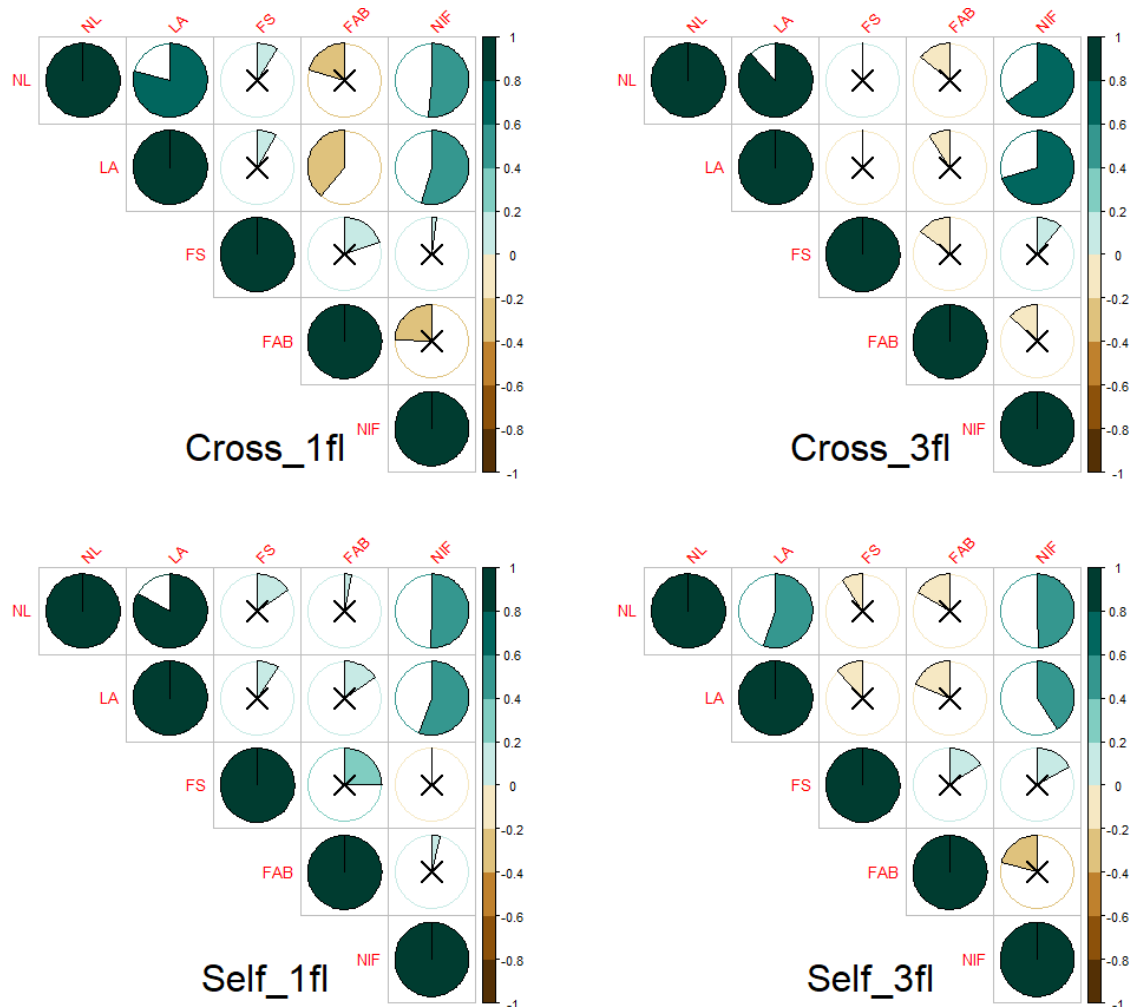


Figure III-40. Correlation matrix chart displaying correlations between the number of leaves (NL), leaf area (LA), fruit set (FS) fruit abortion (FAB) and number of inflorescences (NIF) per pollination treatment in *C. aschersonii*. The filled colour intensity of the pie chart per pollination treatment is proportional to the correlation coefficient (-1 to 1). The cross (X) indicates variables with non-significant coefficients per significant level considered (p -value >0.05). Positive correlations are displayed in green and negative ones in brown.

There was also a moderate positive correlation between maturation time and the proportion of viable seeds in the cross-pollination of one flower while a weak correlation was for the cross-pollination of three flowers. No correlation was found between the other variables in all pollination treatments. There was also a weak positive correlation between mature fruits collected and maturation time (**Figure III-41, Appendix III-1010**).

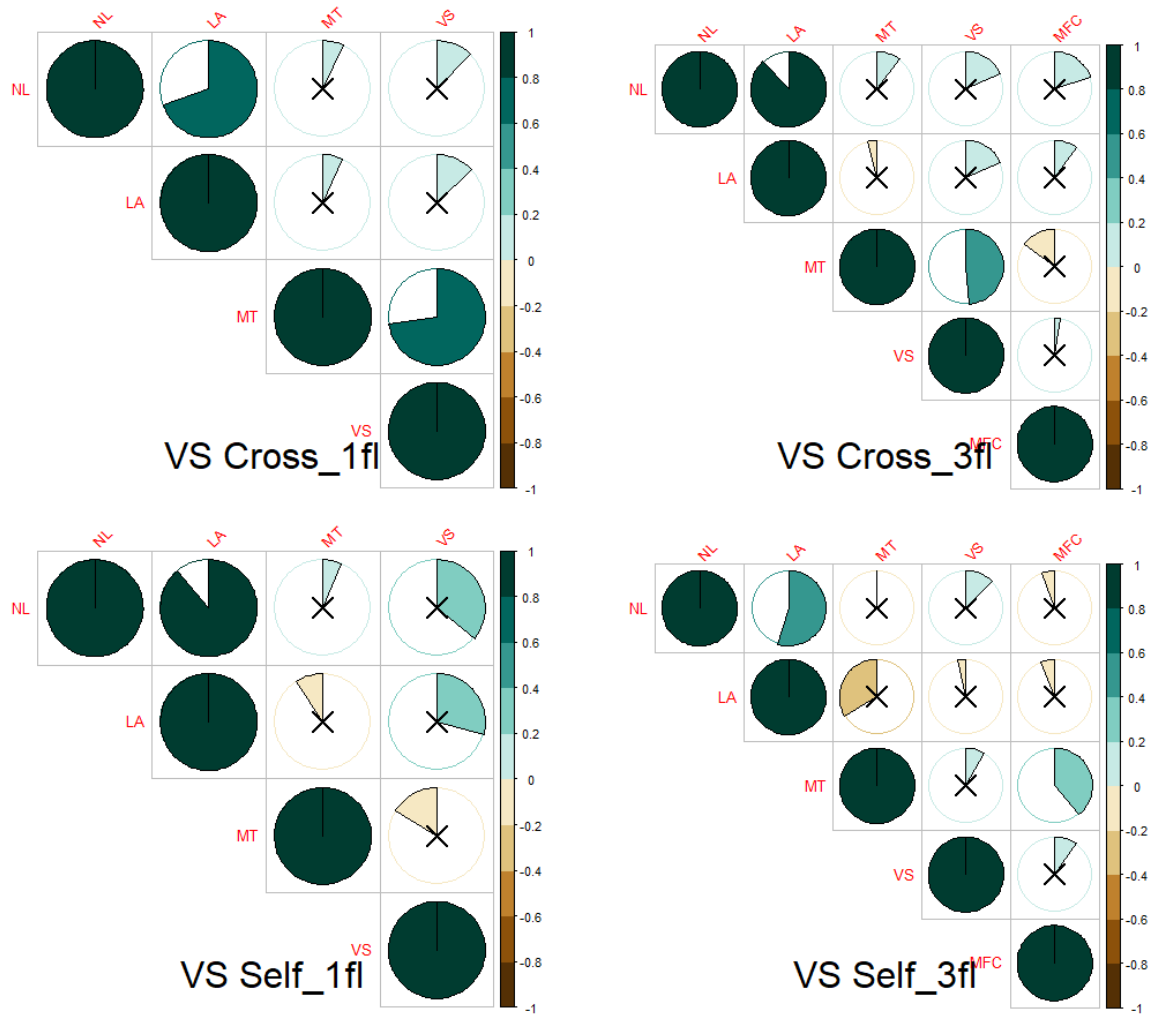


Figure III-41. Correlation matrix chart displaying correlations between viable seeds (VS), the number of leaves (NL), leaf area (LA), maturation time (MT), viable seed (VS) and mature fruit collected (MFC) per treatment in *C. aschersonii*. For each pollination treatment, the filled colour intensity of the pie chart is proportional to the correlation coefficient (-1 to 1). The cross (X) indicates variables with non-significant coefficients per significant level considered (p -value > 0.05). Positive correlations are displayed in green and negative ones in brown.

III.3.3.4 RESOURCE LIMITATION ASSESSMENT IN *CYRTOCHIS RINGENS*

In *Cyrtorchis ringens*, there were weak negative correlations between leaf area, the number of inflorescences and fruit abortion for cross-pollination of one-flower. There were moderate positive correlations between the number of leaves, inflorescences, leaf area and fruit abortion rate. These positive correlations show that fruit abortion rate increases with an increasing number of leaves, leaf area and the number of inflorescences for the cross-pollination and self-pollination of one flower (**Figure III-42, Appendix III-11**). There was no correlation between these variables in all the other treatments.

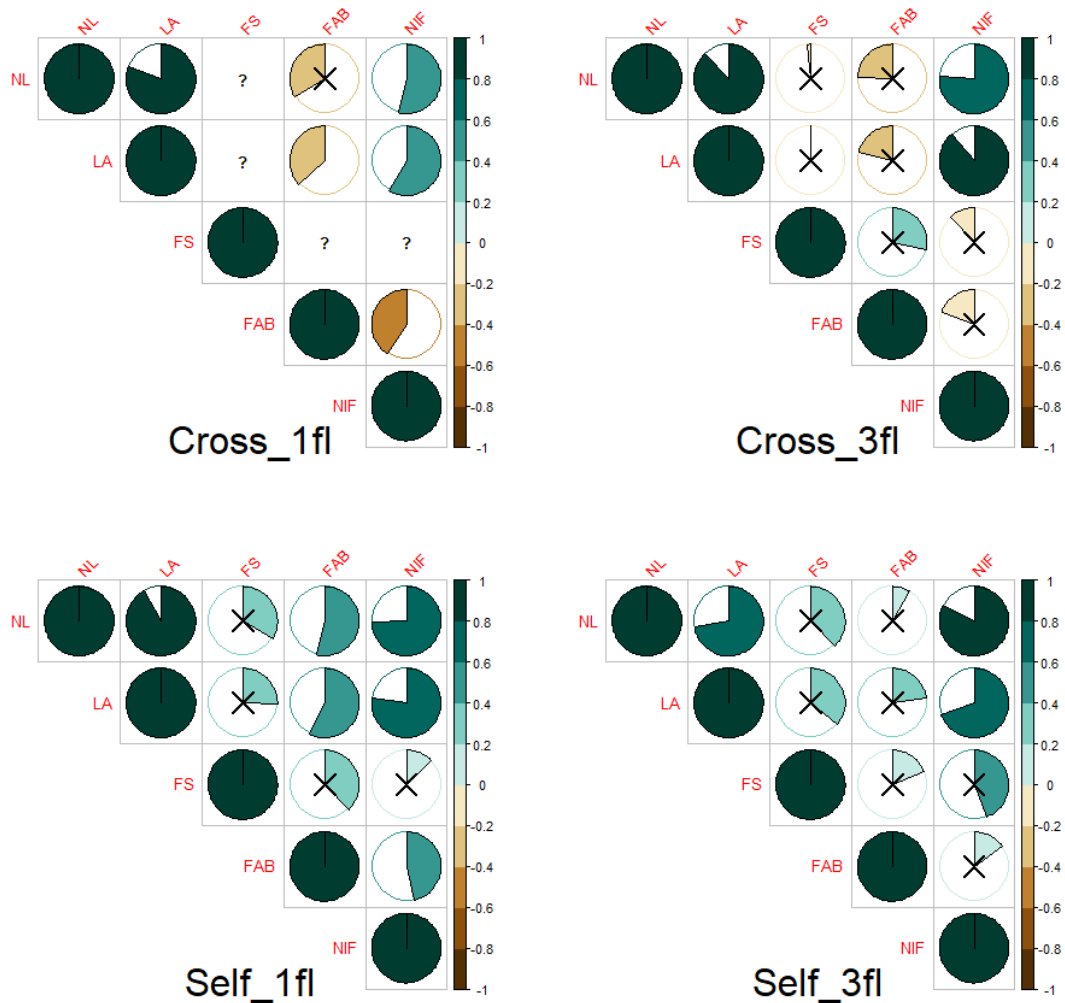


Figure III-42. Correlation matrix chart displaying correlations between the number of leaves (NL), leaf area (LA), fruit set (FS) fruit abortion (FAB) and number of inflorescences (NIF) per pollination treatment in *C. ringens*. The filled colour intensity of the pie chart per pollination treatment is proportional to the correlation coefficient (-1 to 1). The cross (X) indicates variables with non-significant coefficients per significant level considered (p -value >0.05). Positive correlations are displayed in green and negative ones in brown. The question mark indicates that the correlation coefficient was not calculated due to the absence of variability in fruit set value.

For the cross-pollination of one flower, fruit maturation time showed a moderate negative correlation with the number of leaves and the leaf area meaning that maturation time decreases with an increasing number of leaves and leaf area. Maturation time showed a moderate positive correlation with the proportion of viable seeds and a weak positive correlation with the leaf area for self-pollination for one flower and self-pollination of three flowers respectively. No correlation was found between the other variables in all pollination treatments (**Figure III-43, Appendix III-111**).

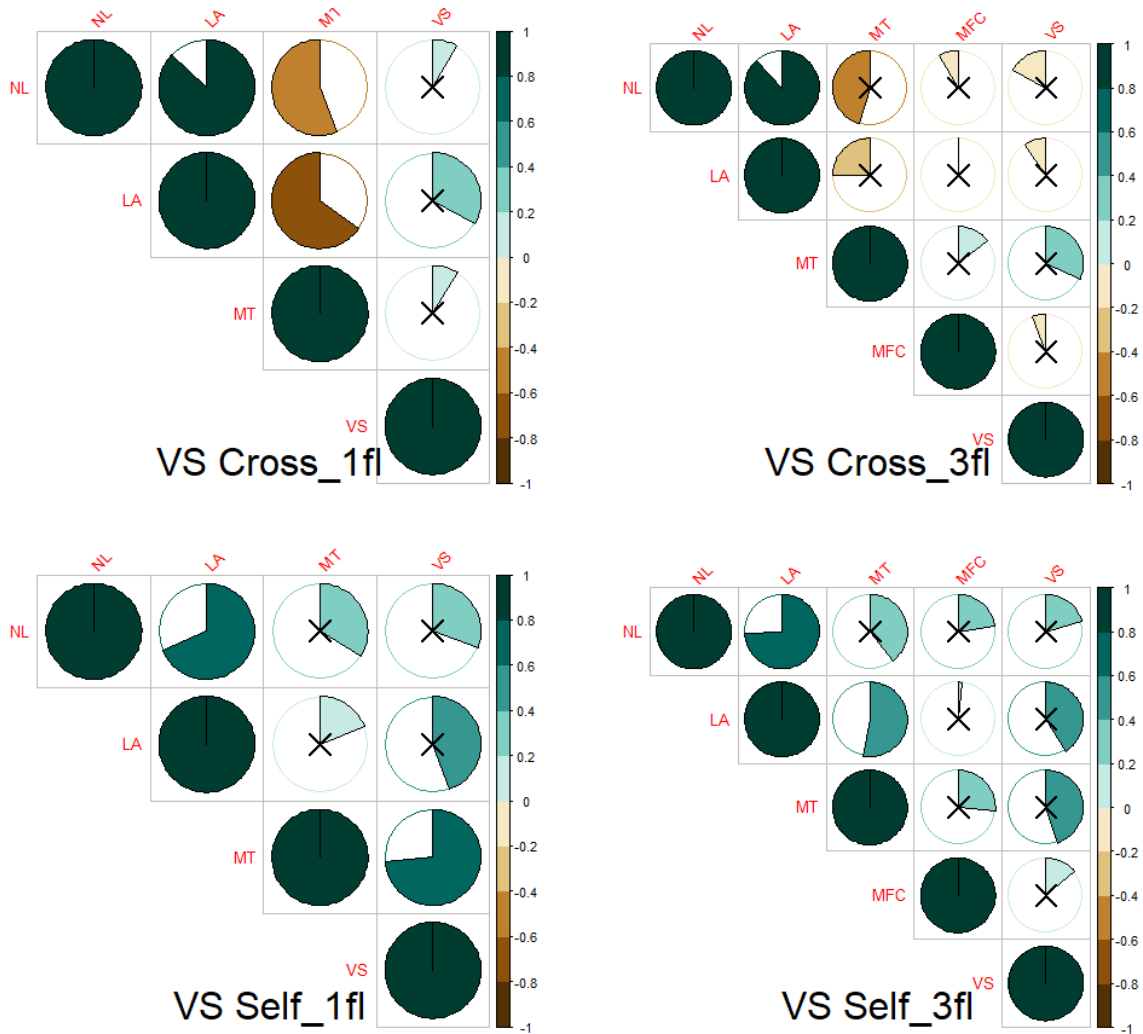


Figure III-43. Correlation matrix chart displaying correlations between the number of leaves (NL), leaf area (LA), maturation time (MA), mature fruit collected (MFC) and viable seed (VS) per treatment in *C. ringens*. The filled color intensity of the pie charts is proportional to the correlation coefficients and the non-significant coefficient according to the significant level considered (p -value >0.05) are crossed. Positive correlations are displayed in green and negative one in brown.

III.3.4 DISCUSSION

III.3.4.1 BREEDING SYSTEM EFFICIENCY

III.3.4.1.1 FRUIT SET

Fruit and viable seed production from self-pollination treatments showed that both *Cyrtorchis aschersonii* and *Cyrtorchis ringens* are self-compatible. This self-compatibility was also observed in the tropical epiphytic orchids *Angraecum eburneum* subsp. *superbum*, under glasshouse conditions (Buyun *et al.*, 2015) and *Angraecum striatum* both *in-* and *ex situ* (Micheneau *et al.*, 2006). Our results tend to confirm that self-compatibility is a usual phenomenon in angraecoid orchids (Tremblay *et al.*, 2005; Jersáková *et al.*, 2006). Our pollination experiment revealed that the two studied species react

differently to self- and cross-pollination in terms of fruit set (see **Tableau III-8 & Tableau III-9**). In *C. aschersonii* we observed no difference regardless of the pollination intensity while in *C. ringens*, the percentage of fruit was significantly higher in the cross-pollination versus self-pollination in the lower pollination intensity (one flower treatments). The similarity observed for the fruit set percentage of cross-and self-pollination in almost all the treatments in both species is consistent with the results of Micheneau *et al.*, (2006) and Suetsugu *et al.*, (2015) who failed to detect a significant difference between self- and cross-pollination on fruit set of *A. striatum* and *Cephalanthera falcate* respectively. Also, our findings imply that fruit set rate is not the only parameter to be considered when evaluating reproductive success in these orchids as fruits may develop following pollination, but then abort before reaching maturity and/or fail to produce viable seeds.

III.3.4.1.2 SEED VIABILITY

A higher proportion of viable seeds was observed for cross-pollination treatments in both species, except for higher pollination intensity (three flowers) for *C. aschersonii*. These high values indicate that viable seed proportion is positively influenced by out-crossing. This agrees with several studies conducted on nectar rewarding species which have proven that cross-pollination leads to the production of high proportions of seeds with viable embryos in the fruit, in contrast to self-pollination (Micheneau *et al.*, 2006; Metsare *et al.*, 2015; Buyun *et al.*, 2015; Jersáková *et al.*, 2006). Additionally, the total weight of viable seeds produced was significantly higher (at least for one flower treatment) using cross-pollination treatments (see **Tableau III-8 & Tableau III-9**). These results support those previously obtained by Walsh *et al.*, (2014) and Walsh & Michaels (2017) who observed that fruits resulting from cross-pollination averaged 50% higher viable seed weight than fruit resulting from self-pollination.

III.3.4.2 RESOURCE LIMITATION PARAMETER

III.3.4.2.1 FRUIT ABORTION RATE

Resource limitations are well known to be important drivers of orchid reproductive success (Tremblay *et al.*, 2005; Jersáková *et al.*, 2006; Vale *et al.*, 2011). Our results tend to show a low impact of resource limitation on fruit and viable seed production in the two studied species. However, we noticed a weak negative correlation between fruit abortion rate and the leaf area for the cross-pollination of one flower in both species meaning that fruit abortion rate decreases with the increasing leaf area. Moreover, resource regulation is done through the abortion of flowers and/or immature fruits when numerous flowers are pollinated indicating that resources are insufficient to support them. This is in accordance with Stephenson (1981) and Tremblay *et al.* (2005). This pattern of fruit abortion rate is yet not observed in the other three pollination treatments mainly the two self-pollination treatments for

C. aschersonii because no correlation was found between these two parameters. This can be explained by the fact that self-pollination treatment already had a negative influence on reproductive success beyond the fruit abortion rate.

A different pattern of correlation between fruit abortion and number of leaves, leaf area and number of inflorescences was observed in *C. ringens* for the self-one pollinated flower. The results show that fruit abortion rate increases with the increasing values of number of leaves, leaf area and number of inflorescences (see **Tableau III-8** & **Tableau III-9**). Furthermore, fruit abortion rate in *C. aschersonii* and *C. ringens* was higher in the self-and cross-pollination of one flower compares to the self-and cross-pollination treatment of three flowers. This may suggest that fruit abortion may be stirred by other factors than those studied here like water and/or nutrients resources.

III.3.4.2.2 EFFECT OF FRUIT MATURATION TIME

Unlike other parameters, maturation time proved to be an important parameter to be considered for optimal fruit and seed production. Globally, a moderate to weak positive correlation between maturation period and viable seed production is observed for several pollination treatments in *C. aschersonii* and *C. ringens* (**Figure III-41** & **Figure III-43**). The maturation period also shows a weak positive correlation with the proportion of mature fruits collected in both species for the self-pollination of three flowers. Our result thus suggests that longer maturation periods may be an important that enhance high mature fruits with high proportion of viable seeds in outcrossing. However, one must notice that the fruit maturation period varies between species and with the pollination system. Buyun *et al.*, (2015) showed that the fruit maturation period of *A. eburneum* subsp. *superbum* was about 5 to 5.5 months (about 150 to 165 days) which is different from those of our studied species.

III.3.5 CONCLUSION

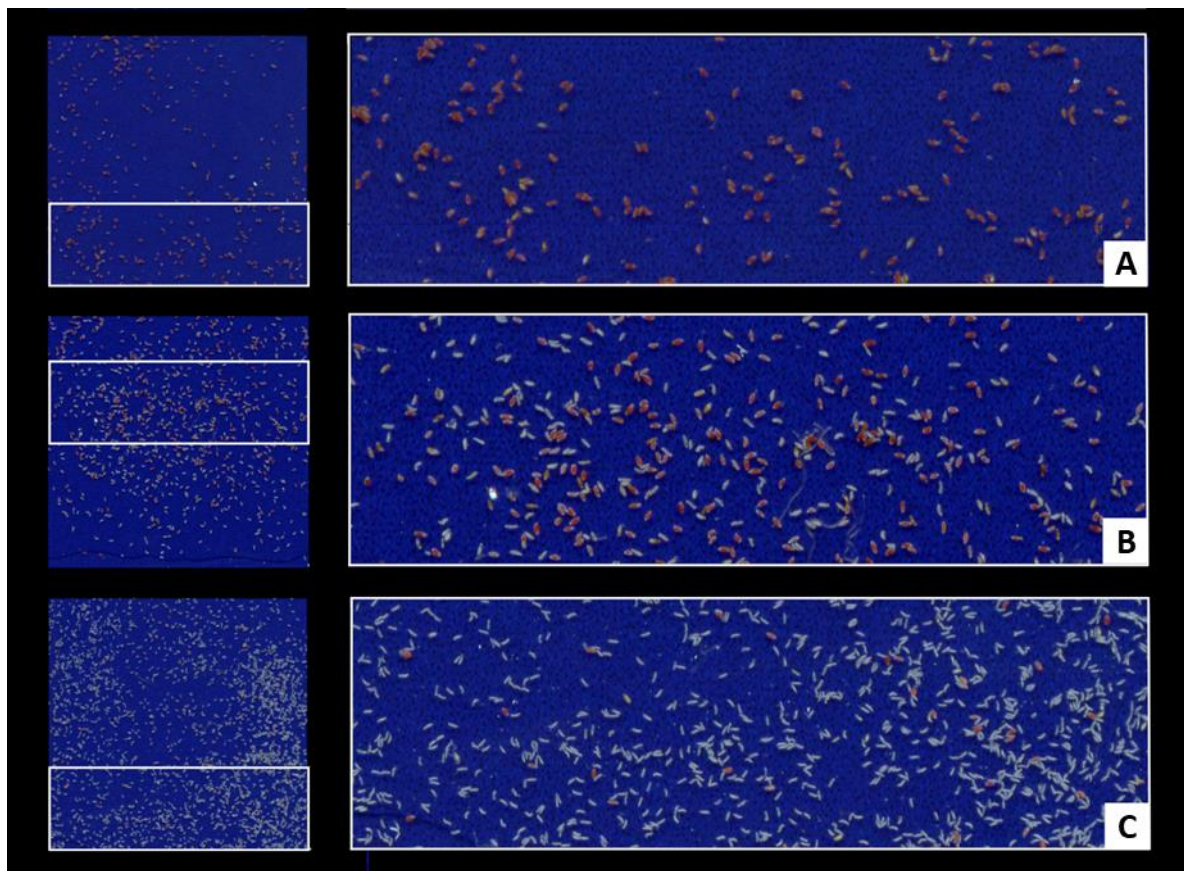
The present study provides a first attempt on factors affecting viable seeds production in African angraecoid orchids. Breeding systems responded differently in both species. In this study, the proportion of viable seeds produced was positively influenced by outcrossing in *Cyrtorchis aschersonii* but in *Cyrtorchis ringens*, breeding systems did not show any influence on viable seed production. Few correlations were observed between the tested parameters in both species. Resource limitation in these species may be dependent on other factors than those tested in the present study given the fact that most of the treatments did not show any correlation between the tested parameters. Nevertheless, maturation period proved to be an important factor to enhance higher fruit set and viable seeds production in *C. aschersonii*. Other factors involved in resource limitation in tropical

epiphytic orchids like water and nutrients resource needs to be tested in other to improve the current knowledge on the topic.

ACKNOWLEDGMENT

We express our gratitude to the National Geographic Society (Grant C303-15, V. Droissart as PI) who supported seed bank development in Yaoundé. We extend our gratitude to the American Orchid Society for funding the Ph.D. activities of one of the first authors (Azandi L.) in Cameroon and to the French Government for funding her stays in Europe. We are also thankful to Stéphane Momo for his comments on the data analysis and to those who have participated in the maintenance of the Yaoundé Orchidaceae shade house: Gyslène Kamdem, Narcisse Kamdem and Sandrine Polla.

APPENDIXES



Appendix III-9. Image of scanned slide of *C. aschersonii* (A-B) and *C. ringens* (C). (Red seeds= viable seeds, white seeds=non-viable seeds). Scanned slides with 100% viable seeds, with 50% viable seeds (B), scanned slide with 5% of viable seeds (C).

Appendix III-10. Correlation of the variables with the treatments (Spearman's rank correlation) in *Cyrtorchis aschersonii*. p = P-value, ρ = rho.

Treatment	Variables	Fruit set	Fruit aborted	Viable seeds	Mature fruit collected
Cross-one flower	Number of leaves	$p = 0.57$	$p = 0.18$	$p = 0.59$	-
		$\rho = 0.09$	$\rho = -0.21$	$\rho = 0.12$	
	Leaf area	$p = 0.61$	$p = 0.01$	$p = 0.57$	-
		$\rho = 0.08$	$\rho = -0.39$	$\rho = 0.13$	
Number of inflorescences	$p = 0.91$	$p = 0.12$	-	-	
	$\rho = 0.02$	$\rho = -0.24$			
Maturation time	-	-	$p = 0.0001$	-	
			$\rho = 0.73$		
Cross-three flower	Number of leaves	$p = 0.95$	$p = 0.39$	$p = 0.32$	$p = 0.27$
		$\rho = 0.01$	$\rho = -0.14$	$\rho = 0.18$	$\rho = 0.2$

	Leaf area	$\rho = 0.99$ $\rho = 0$	$\rho = 0.57$ $\rho = -0.09$	$\rho = 0.32$ $\rho = 0.18$	$\rho = 0.6$ $\rho = 0.1$
	Number of inflorescences	$\rho = 0.52$ $\rho = 0.11$	$\rho = 0.42$ $\rho = -0.13$	-	-
	Maturation time	-	-	$\rho = 0.004$ $\rho = 0.49$	$\rho = 0.41$ $\rho = -0.15$
Self-one flower	Number of leaves	$\rho = 0.31$ $\rho = 0.15$	$\rho = 0.83$ $\rho = 0.03$	$\rho = 0.08$ $\rho = 0.36$	-
	Leaf area	$\rho = 0.54$ $\rho = 0.09$	$\rho = 0.3$ $\rho = 0.16$	$\rho = 0.16$ $\rho = 0.29$	-
	Number of inflorescences	$\rho = 0.98$ $\rho = 0$	$\rho = 0.83$ $\rho = 0.03$	-	-
	Maturation time	-	-	$\rho = 0.43$ $\rho = -0.16$	-
Self-three flower	Number of leaves	$\rho = 0.62$ $\rho = -0.09$	$\rho = 0.36$ $\rho = -0.17$	$\rho = 0.54$ $\rho = 0.12$	$\rho = 0.78$ $\rho = -0.06$
	Leaf area	$\rho = 0.52$ $\rho = -0.12$	$\rho = 0.31$ $\rho = -0.19$	$\rho = 0.86$ $\rho = -0.03$	$\rho = 0.77$ $\rho = -0.06$
	Number of inflorescences	$\rho = 0.38$ $\rho = 0.17$	$\rho = 0.26$ $\rho = -0.21$	-	-
	Maturation time	-	-	$\rho = 0.69$ $\rho = 0.08$	$\rho = 0.04$ $\rho = 0.39$

Appendix III-11. Correlation of variables with the treatments (Spearman's rank correlation) in *C. ringens*.
 $p = P\text{-value}$, $\rho = rho$.

Treatment	Variables	Fruit set	Fruit aborted	Viable seeds	Mature fruit collected
Cross-one flower	Number of leaves	-	$p = 0.06$ $\rho = 0.01$	$p = 0.74$ $\rho = 0.08$	-
	Leaf area	-	$p = 0.04$ $\rho = -0.37$	$p = 0.17$ $\rho = 0.33$	-
	Number of inflorescences	-	$p = 0.02$ $\rho = -0.41$	-	-
	Maturation time	-	-	$p = 0.73$ $\rho = 0.09$	-
Cross-three flower	Number of leaves	$p = 0.96$ $\rho = -0.02$	$p = 0.42$ $\rho = -0.24$	$p = 0.57$ $\rho = -0.17$	$p = 0.79$ $\rho = -0.08$
	Leaf area	$p = 0.98$ $\rho = -0.01$	$p = 0.49$ $\rho = -0.21$	$p = 0.75$ $\rho = -0.1$	$p = 0.99$ $\rho = 0$
	Number of inflorescences	$p = 0.7$ $\rho = -0.12$	$p = 0.53$ $\rho = -0.19$	-	-
	Maturation time	-	-	$p = 0.29$ $\rho = 0.32$	$p = 0.64$ $\rho = 0.14$
Self-one flower	Number of leaves	$p = 0.15$ $\rho = 0.33$	$p = 0.01$ $\rho = 0.54$	$p = 0.42$ $\rho = 0.31$	
	Leaf area	$p = 0.28$ $\rho = 0.25$	$p = 0.007$ $\rho = 0.58$	$p = 0.23$ $\rho = 0.45$	
	Number of inflorescences	$p = 0.6$ $\rho = 0.13$	$p = 0.03$ $\rho = 0.47$	-	-
	Maturation time	-	-	$p = 0.02$ $\rho = 0.73$	-
Self-three flower	Number of leaves	$p = 0.15$ $\rho = 0.38$	$p = 0.75$ $\rho = 0.09$	$p = 0.46$ $\rho = 0.21$	$p = 0.42$ $\rho = 0.23$
	Leaf area	$p = 0.17$ $\rho = 0.36$	$p = 0.4$ $\rho = 0.23$	$p = 0.13$ $\rho = 0.41$	$p = 0.96$ $\rho = 0.02$
	Number of inflorescences	$p = 0.09$ $\rho = 0.44$	$p = 0.58$ $\rho = 0.15$	-	-
	Maturation time	-	-	$p = 0.34$ $\rho = 0.26$	$p = 0.09$ $\rho = 0.45$

Chapitre IV Discussion Générale



Cyrtorchis ringens cultivé à l'ombrière de Yaoundé, Cameroun, Septembre 2017

La présente thèse avait pour objectif principal de tester la délimitation inter et intraspécifique au sein du genre en explorant des outils modernes de délimitation taxonomique afin de proposer une nouvelle taxonomie du genre *Cyrtorchis*, et de documenter sa biologie de la reproduction. Ceci a été réalisé à travers (i) une approche intégrative combinant des analyses morphométriques et phylogénétiques, (ii) la caractérisation des patrons de floraison et des pollinisateurs de quelques espèces cibles *in* et *ex situ*, et (iii) l'identification des facteurs influençant la production des fruits et des graines viables en conditions contrôlées chez deux espèces *C. aschersonii* et *C. ringens*. Ce travail a permis de clarifier le statut taxonomique des sections et de 20 taxons du genre *Cyrtorchis*, y compris l'identification de quatre nouvelles espèces, bien que certaines lacunes taxonomiques demeurent encore. Nos résultats soulignent le caractère robuste des approches intégratives en systématique pour l'amélioration de la révision taxonomique. Par ailleurs, nos travaux sur la biologie de reproduction ont révélé que les espèces du genre dépendent des pollinisateurs pour leur reproduction car leur morphologie florale ne favorise pas l'autofécondation, engendrant un faible succès reproducteur lorsque la fréquence de visite des pollinisateurs est faible. Ce travail met également en évidence l'impact positif de la pollinisation croisée sur la production des fruits et des graines viables malgré les importantes variations observées au sein du genre.

IV.1 UN PREMIER CADRE PHYLOGENETIQUE POUR LA REVISION DU GENRE *CYRTOCHIS*

Depuis sa description par Schlechter (1914), le genre *Cyrtorchis* n'a connu que deux révisions taxonomiques majeures, celles de Summerhayes (1948, 1960). Ces révisions ont mis en évidence les deux sections connues dans le genre, validées et largement suivies par de nombreux taxonomistes (Geerinck, 1992; Chiron, 2001; Stewart *et al.*, 2006). Les travaux de Szlachetko et Olszewski (2001) et de Szlachetko (2003) ont même été jusqu'à élever les deux taxons au rang générique sur la base de la structure du gynostème, mais aucune étude n'avait, jusqu'à notre travail, testée la validité taxonomique de ces sections sur le plan phylogénétique. En effet, les caractères morphologiques seuls ne suffisent plus pour trancher sur le statut taxonomique d'un taxon (Duminil et Di Michele, 2009). Si les études ultérieures sur l'ensemble des Angraecoïdes ont démontré la monophylie du genre basée sur l'anatomie et la morphologie des feuilles et des racines (Carlsward *et al.*, 2006a), aussi bien que sur des données moléculaires (Carlsward *et al.*, 2006b; Simo, 2014; Simo-Droissart *et al.*, 2018; Farminhão *et al.*, 2021), le faible échantillonnage des taxons pour ces études et le nombre de marqueurs moléculaires utilisés ne suffisaient pas pour évaluer la monophylie des sections ainsi que les relations de parenté entre les espèces. La présente thèse met en évidence un nouveau cadre phylogénétique plus approfondi et détaillé basé sur un échantillonnage bienveillant et exhaustif de 21 morphogroupes, incluant 15 des 20 taxons décrits dans le genre, pour lesquels des séquences d'ADN de six marqueurs moléculaires ont permis de tester la monophylie des sections et des taxons subordonnés. Les analyses

de phylogénie moléculaire confirment la monophylie d'une des sections et de huit taxons dans le genre, ce qui représente un résultat indispensable à sa révision globale. Par ailleurs, la reconstruction des états ancestraux confirme l'importance de six caractères pour la taxonomie du genre, notamment ceux proposés par Summerhayes (1948, 1960) pour séparer les deux sections. En effet, la structure du viscidium, la forme des stipites et la forme des lobes latéraux du rostelle qui n'avaient jamais été testées dans l'évolution des caractères chez les orchidées, se sont révélées importantes dans l'établissement des relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Cyrtorchis*. Comme l'avait remarqué Summerhayes (1948, 1960), le viscidium induré dans sa partie supérieure et hyaline dans sa partie inférieure ainsi que l'apex des stipites élargis permettent de distinguer la section *Cyrtorchis* (monophylétique) de l'autre section *Homocolleticon* (paraphylétique dans nos analyses). Cette structure plus complexe du viscidium observée dans la section *Cyrtorchis* semble être un caractère dérivé (synapomorphie) résultant d'une évolution à partir d'un viscidium linéaire et uniformément hyalin à l'état ancestral, état présenté par l'ensemble des espèces de la section sœur (**Figure III-23 E**). Le même cas de figure est observé avec les lobes latéraux du rostelle élargis au-dessus de la base très étroite et l'apex des stipites élargi qui constituent aussi des synapomorphies de la section *Cyrtorchis* contrairement à la section *Homocolleticon*. Cependant, l'apex des stipites élargi est également caractéristique de l'espèce type de la section *Homocolleticon*, *C. monteiroae* dont l'origine reste ambiguë compte tenu de la non-résolution du clade. Sur la base de ces éléments, la présente étude met également en évidence l'importance de la morphologie de l'ovaire et des fruits comme caractères diagnostiques importants pour la compréhension des relations phylogénétiques entre les taxons. En effet, l'ovaire et fruits tricoques ont permis notamment de comprendre la relation phylogénétique étroite existante entre les taxons de la sect. *Cyrtorchis* d'une part et ceux du clade C (**Figure III-22, suppl. Figure S3**) d'autre part (**Figure III-23 B**). Ces caractères méritent une attention particulière dans la taxonomie des orchidées angraecoides (Descourvières *et al.*, 2018; Pessoa *et al.*, 2018; Farminhão *et al.*, 2020).

IV.2 IMPORTANCE D'UNE APPROCHE INTEGREE DE MORPHOMETRIE ET DE PHYLOGENIE POUR LA DELIMITATION TAXONOMIQUE AU SEIN DU GENRE *CYRTORCHIS*

Le premier objectif de cette thèse était de clarifier la délimitation des sections et des espèces au sein du genre *Cyrtorchis* en utilisant une approche intégrative à partir de données morphométriques et moléculaires, compte tenu des limites observées avec une utilisation non intégrée de chacune de ces approches (ex. des limites de la morphologie (Carlsward *et al.*, 2006a), la morphométrie (Azandi, 2014), la phylogénie moléculaire (Carlsward *et al.*, 2006b; Simo-Droissart *et al.*, 2018a)). Si l'approche intégrative utilisée a permis de délimiter les frontières entre les sections et les taxons subordonnés du

genre *Cyrtorchis*, les relations phylogénétiques entre certains taxons restent encore à clarifier (les sept taxons de la sect. *Cyrtorchis*). De plus, de nombreuses erreurs d'identification sont observées lorsque la délimitation des espèces de plantes est basée exclusivement sur des données morphologiques (Duminil et Di Michele, 2009). Dès lors, d'autres approches complémentaires, en l'occurrence la morphométrie et la phylogénie, sont nécessaires pour résoudre les erreurs d'identification et améliorer la délimitation des espèces (voir **Figure IV-1**).

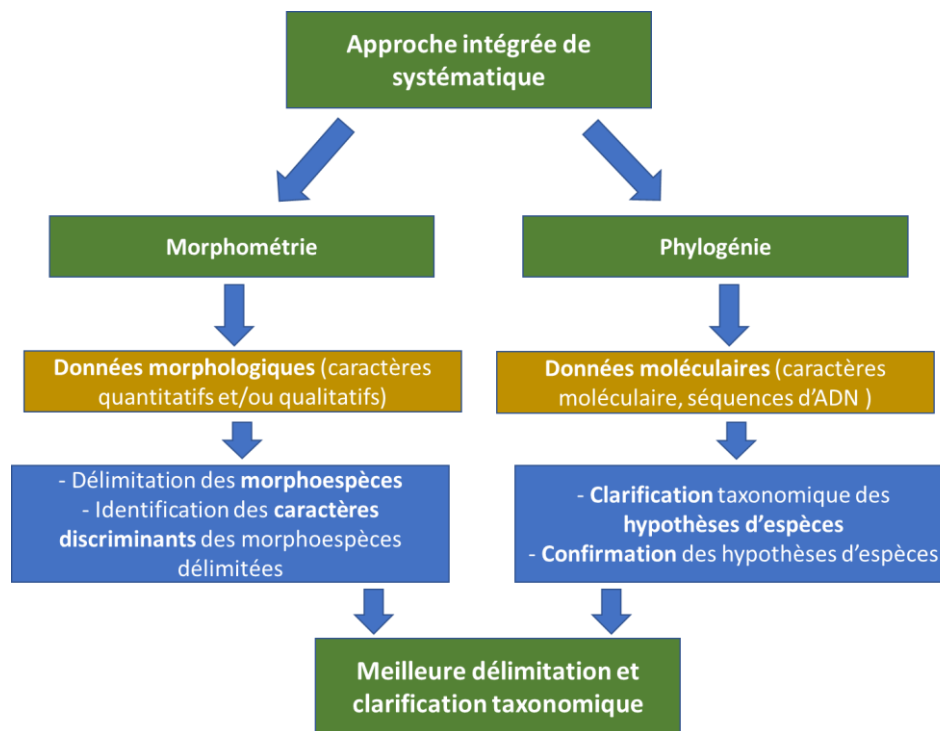


Figure IV-1. Démarche de l'approche intégrative de systématique (morphométrie et phylogénie) pour la résolution taxonomique des espèces.

L'approche intégrative s'est révélée robuste chez d'autres orchidées, notamment pour circonscrire les espèces au sein de deux genres d'orchidées angraecoides (*Dolabrifolia* (Pfitzer) Garay et *Afropectinariella* M.Simo & Stévant ; Simo-Droissart *et al.* 2013, 2016 ; Simo-Droissart et Stevart, 2019) incluant une nouvelle espèce endémique du Gabon, *Dolabrifolia biteau* (M.Simo & Stévant) M.Simo et un genre de la tribu des Orchideae (*Stenoglottis* (Hook.f.) Garay ; Phillips et Bytebier, 2020) pour évaluer les relations entre les membres de chaque groupe. Cette approche a également montré son efficacité pour la délimitation de nombreux complexes d'espèces d'arbres en Afrique tropicale, notamment des genres *Santiria* Blume (Ikabanga *et al.*, 2017), *Entandrophragma* C.DC. (Monthe *et al.*, 2018), *Greenwayodendron* Verdc. (Lissambou *et al.*, 2019), Les palmiers du genre *Raphia* P.Beauv. (Helmstetter *et al.*, 2020), les arbustes des genres *Bertiera* Aubl. et *Campylospermum* Tiegh. (Nguembou Kamgang, 2008; Bissiengou, 2014) et les lianes du genre *Sabicea* Aubl. (Zemagho *et al.*, 2016).

L'approche intégrative présente également des limites et peut s'avérer problématique dans la mesure où les outils utilisés présentent des résultats parfois contradictoires, ce qui peut rendre la prise de décision complexe. En effet, les groupes morphologiques identifiés lors de l'inspection visuelle ou des analyses morphologiques ne reflètent pas souvent les clades ou l'histoire évolutive des espèces obtenues avec l'outil moléculaire ce qui amène à s'interroger sur la pertinence de l'une ou de l'autre approche en essayant de redéfinir les bases de la classification. Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence et confirmer la délimitation des deux sections du genre *Cyrtorchis* sur la base de certaines caractéristiques des parties florales, proposées à l'origine par Summerhayes (1960). Cependant, nos analyses moléculaires ont révélé la monophylie d'une seule des sections (*C. sect. Cyrtorchis*) montré la paraphylie de l'autre section. Ceci nous conduit à s'interroger sur la validité du statut taxonomique des sections selon Summerhayes, et plus encore, de se demander s'il ne faudrait pas recirconscrire les sections au sein du genre en recherchant d'autres caractères pouvant soutenir les différents clades. Ce même cas de figure a été observé dans le genre *Afzelia* où les groupes définis au sein du genre par les critères morphologiques ne reflètent pas l'histoire évolutive des espèces (Donkpegan *et al.*, 2017). Cette incongruence entre la morphologie et la phylogénie a également été mise en évidence dans cette thèse au niveau de l'espèce, et en l'occurrence chez les taxons de la section *Cyrtorchis* où l'on enregistre une seule espèce monophylétique (*C. aschersonii*) sur huit inclus, les autres formant un groupe non résolu. Le faible polymorphisme des marqueurs utilisés est souvent évoqué pour traduire cette faible délimitation des groupes. En effet, les relations phylogénétiques entre les espèces ayant récemment divergées sont souvent difficiles à résoudre en raison d'un conflit entre les arbres phylogénétiques générés (So et Lee, 2020; Donkpegan *et al.*, 2017). Il peut être intéressant dès lors de tester des techniques de séquençage à haut débit (NGS) permettant d'obtenir un polymorphisme plus important et permettant ainsi une meilleure caractérisation des taxons actuellement non résolus.

Les approches phylogénétiques proposent généralement d'étudier le plus grand nombre de régions génomiques, en espérant que l'histoire des gènes ciblés reflète fidèlement l'histoire des espèces (Brandrud *et al.*, 2020). Pourtant, on est souvent limité en termes de sites polymorphes lorsqu'on utilise des marqueurs chloroplastiques individuels ou concaténés (6511 bp pour la matrice de cinq marqueurs chloroplastique dans le cas de notre thèse) au lieu du plastome entier (entre 120000 et 160 000 bp), représentant plus de 20 fois plus de caractères (Scarcelli *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'usage unique des gènes du plastome individuellement peut engendrer une phylogénie qui ne reflète pas celles des gènes nucléaires à cause de la facilité de captures chloroplastiques suite à des phénomènes d'hybridations (Boom *et al.*, 2021). Ce phénomène est attendu surtout chez les espèces où le chloroplaste est faiblement dispersé par comparaison au génome nucléaire (Petit et Excoffier, 2009).

Cette capture chloroplastique est observée chez de nombreuses angiospermes où les chloroplastes sont transmis uniquement par voie maternelle et où la dispersion des graines est bien plus limitée que celle du pollen. Toutefois, chez les orchidées c'est la situation inverse qui est observée car, les graines anémochores dispersent très souvent à plus grande distance que le pollen qui est agrégé sous forme de pollinie (Arditti et Ghani, 2000b). Ceci pourrait limiter les risques qu'une généalogie des plastomes soit complètement incohérente avec la phylogénie des espèces.

En effet, des études récentes utilisant ces nouvelles techniques de génomique ont permis d'obtenir des dizaines de milliers de régions plastidiales variables et par conséquent de mieux délimiter les espèces et d'améliorer considérablement la résolution phylogénétique, comme dans le cas des genres *Dactylorhiza* (Brandrud *et al.*, 2020) et *Polystachya* (de Abreu *et al.*, 2018).

IV.3 VALEUR TAXONOMIQUE DES CARACTERES VEGETATIFS VS CARACTERES FLORAUX

Depuis l'époque linnéenne, les espèces ont toujours été catégorisées ou classifiées au regard des caractères floraux qu'elles présentaient vu que ceux-ci sont impliqués dans la reproduction des espèces. Contrairement aux caractères floraux, les caractères végétatifs sont très souvent considérés comme moins fiables pour les études de délimitation du fait de leur plasticité phénotypique, elle-même liée à l'environnement (Das *et al.*, 2007) et des risques de convergence évolutive. Chez les orchidées, les caractères floraux largement utilisés en taxonomie sont ceux du gynostème (structure, morphologie). Cependant, dans la présente étude, les caractères du gynostème notamment ceux du viscidium et des lobes latéraux du rostelle permettent surtout de différencier les deux sections sur le plan morphologique sans pour autant permettre de différencier les taxons aux niveaux spécifique et infraspécifique. Par ailleurs, les caractères qui se sont révélés parmi les plus discriminants pour six (*C. henriquesiana*, *C. aschersonii*, *C. crassifolia*, *C. monteiroae*, *C. letouzeyi* et *C. injoloensis*) des huit espèces différenciées sur la base des analyses morphométriques étaient essentiellement les caractères végétatifs associés aux feuilles (forme, couleur, marge, épaisseur), à la bractée (longueur, arrangement des bractées, forme des bractées) et à l'inflorescence (longueur) (voir **Appendix III-5, Figure III-18**). Ce résultat montre l'importance de considérer les caractères végétatifs en plus des caractères floraux dans la délimitation spécifique. En l'occurrence, chez les Malaxideae, un autre groupe d'orchidées Epidendroïdes, l'importance des caractères végétatifs notamment les caractères des feuilles dans la délimitation et la classification de certains taxons au sein de cette tribu (Cameron, 2005). Ce même cas de figure avait été observé chez les arbres d'Afrique tropicale du genre *Afzelia*, où les traits végétatifs (taille et forme des folioles principalement) se sont révélés être les plus discriminants pour délimiter les espèces (Donkpegan *et al.* 2017). En effet, l'usage de ces caractères floraux avait déjà été contesté à l'époque par certains auteurs qui doutaient de leur importance dans la classification. Cette remise

en question de l'usage des caractères floraux en systématique était attribuée leur variation due à l'adaptation de la morphologie florale à des conditions du milieu différentes dont l'évolution est étroitement liée à celle de leurs pollinisateurs qui y exercent des pressions de sélection (Dodson, 1962; Pijl et Dodson, 1969). Cependant, d'autres caractères comme ceux des fruits et des graines, encore peu utilisés et documentés, pourraient aussi être pris en compte dans l'établissement des classifications. Les caractères des graines à travers la micromorphométrie des graines ont été utilisés pour caractériser la diversité des graines d'orchidées (Barthlott *et al.*, 2014) et montrer leur importance dans la délimitation taxonomique au niveau intrafamilial (Gamarra *et al.*, 2018) et générique (Akbulut et Şenel, 2016). Cette thèse a en effet mis en lumière l'importance des caractères de fruits et/ou de l'ovaire à travers la reconstruction des états ancestraux dans l'histoire évolutive et la taxonomie du genre *Cyrtorchis*. On note également un effet contrasté de l'usage de deux approches d'analyses multivariées. En réalisant une analyse avec l'ensemble des données mixtes (ACP de Hill et Smith) on a observé plus d'espèces (cinq espèces) délimitées qu'avec l'analyse (ACP) incluant les données quantitatives seules espèce (une espèce) délimitée avec cette dernière approche. Il faudra par conséquent faire plus attention au type d'analyse statistique utilisé pour les études de délimitations taxonomiques.

IV.4 PHENOLOGIE DE LA FLORAISON : OUTIL SUPPLEMENTAIRE DE DELIMITATION TAXONOMIQUE

Le suivi de la floraison en ombrière a montré que la grande majorité des espèces de *Cyrtorchis* fleurissent pendant la grande saison pluvieuse, comme cela semble être le cas pour la majorité des orchidées épiphytes du Cameroun (Texier *et al.*, 2018). En effet, un peu plus de la moitié des espèces (6 espèces parmi les 11, 12 et 10 ayant fleuri respectivement en 2017, 2018 et 2019) ont toujours fleuri entre août et octobre (**Figure III-26**). Ce synchronisme de la floraison associé à la période de fortes précipitations corroborent les observations de Mbale *et al.* (2014) et Texier *et al.* (2018) réalisées sous ombrière qui montrent que la floraison des orchidées est liée à l'augmentation de la température accompagnée par de fortes précipitations. Par ailleurs, d'autres facteurs climatiques tels que la durée du jour, l'humidité ou la disponibilité en eau sont également considérées comme des déclencheurs importants de la floraison chez les orchidées dans les régions tropicales et particulièrement pour les orchidées épiphytes africaines (Stévant *et al.*, 2010; Texier *et al.*, 2018; Mbale *et al.*, 2014). Le suivi de la floraison *in* et *ex situ* particulièrement pour les espèces *C. okuensis* et *C. letouzeyi* ont montré un synchronisme dans la période de floraison à la fois en ombrière et en milieu naturel, suggérant que les différences de conditions climatiques, de disponibilité de nutriments ou d'autres facteurs biotiques n'influenceraient pas le calendrier de floraison des populations de ces espèces, comme précédemment observé par Texier *et al.* (2018).

La phénologie n'est pas couramment utilisée dans la délimitation des espèces, bien qu'elle puisse constituer un mécanisme d'isolement pré-reproducteur. Il est largement connu que chez plusieurs espèces de plantes, l'isolement reproducteur serait issu de multiples barrières reproductives qui empêchent les croisements entre les populations limitant ainsi les flux de gènes entre elles, ce qui conduit ainsi à la spéciation au sein des complexes d'espèces (Sosef *et al.*, 2020). Ce processus de spéciation est ainsi étroitement lié aux mécanismes d'isolement reproductif qui peuvent être prézygotique (c'est-à-dire avant la pollinisation chez les plantes) ou postzygotique (c'est-à-dire après la pollinisation). Un isolement prézygotique est mis en évidence dans le cadre de cette étude dans le cas de deux espèces (*C. ringens* et *C. okuensis*), proches sur le plan morphologique (voir **Figure III-20**) et phylogénétique (voir clade C **Figure III-22**), présentent des périodes de floraison assez distinctes. *Cyrtorchis ringens* fleurit entre août et novembre, contrairement à *C. okuensis* qui fleurit entre mars et juin (**Figure IV-2**). Pour les populations de ces espèces distribuées en sympatrie dans les forêts de la ligne volcanique du Cameroun, ce décalage de la période de floraison semble être le mécanisme le plus probable d'isolement reproducteur. Le rôle de la ligne volcanique du Cameroun comme barrière évolutive entraînant des phénomènes de spéciation a déjà été confirmé chez plusieurs taxons (Missoup *et al.*, 2016; Demenou *et al.*, 2020; Couvreur *et al.*, 2021). Ce mécanisme a également été observé par Pace *et al.* (2017, 2019) sur deux complexes d'espèces du genre *Spiranthes* (les complexes *S. cernua* et *S. sinensis*) où la phénologie s'est révélée être un important paramètre de délimitation des espèces. Cette étude a permis de différencier deux espèces cryptiques des savanes subtropicales de Floride : *S. longilabris* qui fleurit en saison sèche et *S. igniorchis* qui fleurit en saison des pluies d'une part, et d'autre part deux espèces asiatiques à savoir *S. australis* et *S. flexuosa* retrouvées en sympatrie, mais dont la floraison de la première se produit environ six mois après celle de la dernière.

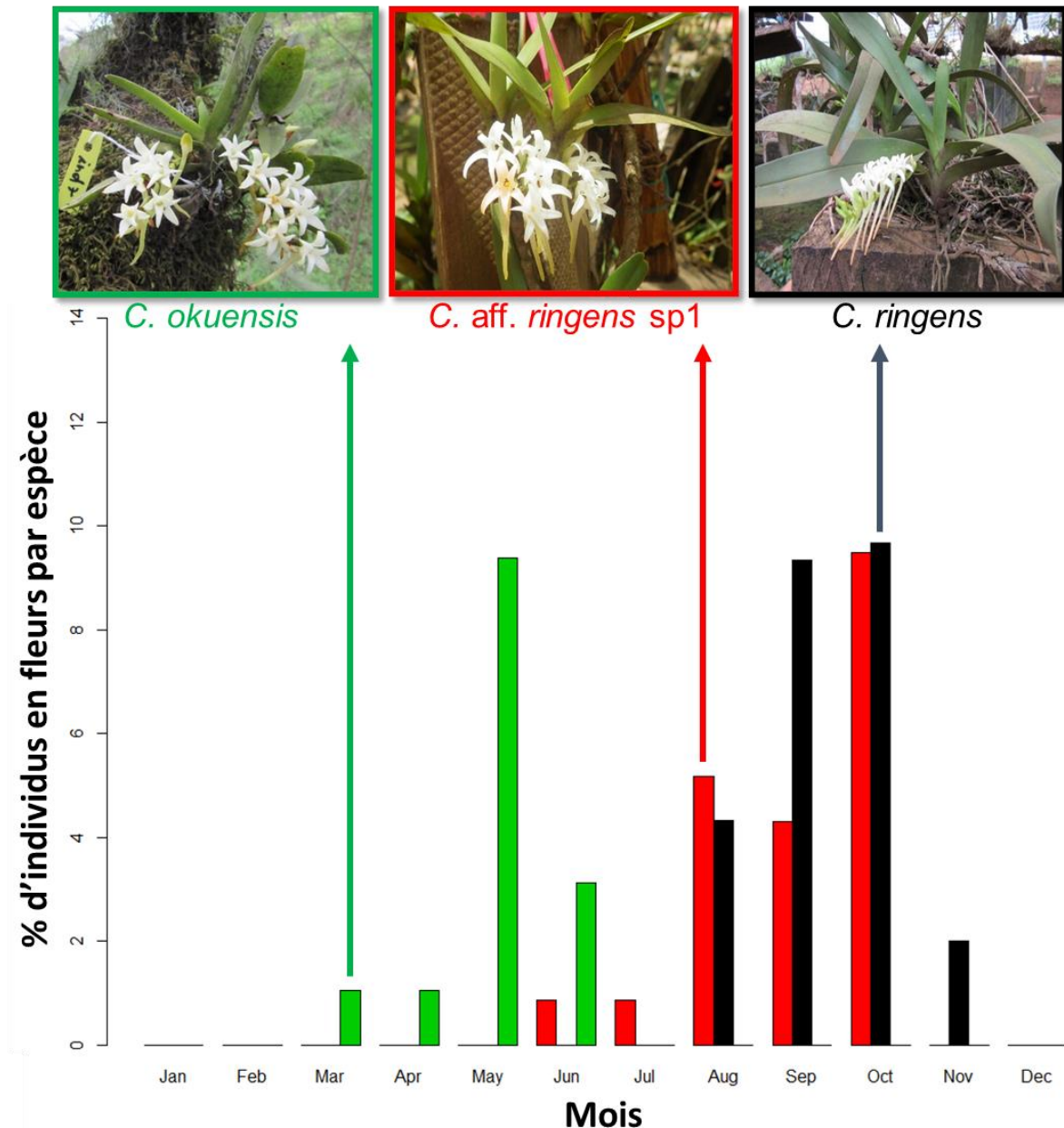


Figure IV-2. Variation de la floraison des trois espèces du clade C (*C. rinngens*, *C. aff. ringens* sp1 et *C. okuensis*) dans l'ombrière de Yaoundé sur la période de trois ans.

Deux autres espèces de *Cyrtorchis* très proches sur le plan de la morphologie florale et également en sympatrie ont des périodes de floraison plus ou moins distinctes, *C. letouzeyi* (en fleur de mai à juillet) et *C. chailluana* (en fleur de février à novembre avec des interruptions en mars, avril et juillet et des pics de floraison en août et septembre), ce qui semble empêcher ou limiter fortement les croisements entre les individus des deux espèces étant donné que *C. letouzeyi* présente une courte floraison (trois mois) contrairement à *C. chailluana* (10 mois).

On peut également constater sur la base des résultats de phénologie que la plupart des espèces à large distribution telles que *C. aschersonii* et *C. chailluana* ont des durées de floraison plus longues dans le

temps (entre 7-10 mois) contrairement aux espèces à distribution restreinte comme *C. okuensis* et *C. letouzeyi* qui fleurissent pendant des périodes assez courtes (3 mois).

Ceci suggère que la longue période de floraison observée chez certaines espèces aurait un avantage dans la reproduction de l'espèce vu qu'elle augmenterait les chances de pollinisation et par conséquent de production de fruits contrairement à celles ayant de courtes périodes de floraison. Par ailleurs, chez les espèces à distribution restreintes, la courte période de floraison augmenterait le nombre de partenaires potentiels de sorte à avoir au moins une fois un dépôt de pollinies. En outre l'étalement de la floraison pour certaines espèces (à large distribution), s'explique essentiellement par le fait que leurs individus sont répartis dans des climats différents (ce qui induit donc la floraison à différents moments). Ces floraisons asynchrones pourraient par ailleurs être un mécanisme d'isolement entre population et pourraient amener à l'apparition de nouvelles espèces si une population se retrouvait isolée pendant suffisamment longtemps (Texier *et al.*, 2018).

Tableau IV-1. Récapitulatif des différences de distribution et des paramètres de reproduction de quelques espèces basée sur les données de littérature (distribution) et de suivi phénologique à l'ombrière de Yaoundé et sur le terrain (Floraison, éperon et pollinisateur).

Taxons	Période de floraison	de	Distribution	Eperon (moyenne en cm)	Pollinisateur
<i>Cyrtorchis aschersonii</i>	Longue (7 mois)	(7)	Large distribution (Afrique de l'ouest à centrale)	Court (2,5)	-
<i>Cyrtorchis okuensis</i>	Courte (4 mois)	(4)	Endémique de la CVL	Court (2,8)	<i>Hippotion</i> spp.
<i>Cyrtorchis letouzeyi</i>	Courte (3 mois)	(3)	Sub-endémique (Gabon et Cameroun)	Long (7,7)	<i>Xanthopan morganii</i> et <i>Coelonia fulvinotata</i>
<i>Cyrtorchis chailluana</i>	Longue (10 mois)	(10)	Large distribution (Afrique sub-saharienne)	Long (12,1)	<i>Coelonia fulvinotata</i>
<i>Cyrtorchis ringens</i>	Courte (4 mois)	(4)	Large distribution (Afrique sub-saharienne)	Court (2,7)	-

IV.5 CONFIRMATION DE LA SPHINGOPHILIE CHEZ LE GENRE *CYRTOCHIS*

L'hypothèse de la pollinisation des espèces du genre *Cyrtorchis* par les sphinx telle que prédit par Cribb (1989) a été testée et confirmée pour la première fois à travers cette thèse, grâce aux observations des pollinisateurs chez deux espèces du genre. La sphingophilie (pollinisation des espèces par les sphinx) a pu être mise en évidence chez une nouvelle espèce à court éperon, *C. okuensis*, et une autre à long éperon, *C. letouzeyi*, qui sont respectivement pollinisées par des sphinx à court

proboscis (*Hippotion* spp.) et à long proboscis (*Xanthopan morganii* et *Coelonia fulvinitata*). Ces espèces présentent des caractéristiques florales ou syndromes clairement adaptées à la pollinisation par les sphinx à savoir les fleurs blanches à éperon, nectarifères, qui émettent des parfums semblables à ceux du jasmin pendant la nuit et une anthèse au crépuscule (Vogel, 2012; Martins et Johnson, 2007; Johnson et Ragusto, 2016; Johnson *et al.*, 2017), et qui sont des syndromes largement répandus dans le groupe des orchidées angraecoïdes. Grâce à des preuves indirectes, à savoir l'enregistrement des images de visite des fleurs, l'observation des pollinies déposées sur le stigmate des fleurs et le développement des fruits après les événements de visite des sphinx, la pollinisation des fleurs de *C. okuensis* par les trois espèces de sphinx du genre *Hippotion* a pu être confirmée. Deux de ces pollinisateurs ont déjà été observés chez deux autres espèces à court éperon notamment *Hippotion eson* chez *Mystacidium venosum* en Afrique du sud (Luyt et Johnson, 2001) et *H. celerion* chez *Aerangis confusa* au Kenya (Martins et Johnson, 2007). Cette pollinisation par des sphinx à court proboscis suggère qu'il existe une sorte de spécialisation des fleurs pour ces papillons à court proboscis (Martins et Johnson, 2013) ou plus probablement un modèle de sélection « *gender-specific selection model* » pour les fleurs à court éperon (Ellis et Johnson, 2010). Ce modèle est étroitement lié à la légère différence de taille entre les longueurs moyennes de proboscis des pollinisateurs et d'éperons des fleurs de *C. okuensis* et au fait que les pollinies chez les *Cyrtorchis* étudiés sont transportées le long du proboscis. Pour le cas de *C. okuensis*, les pollinies pourraient être transportées à la base du proboscis (proche de la tête) compte tenu de cette similarité entre les tailles des proboscis et d'éperon comme chez *A. confusa* (Martins et Johnson, 2007).

Contrairement à *C. okuensis*, *C. letouzeyi* est pollinisée par deux papillons sphinx à long proboscis parmi lesquels le célèbre sphinx à très long proboscis prédit par Darwin comme pollinisateur de l'espèce malgache *A. sesquipedale* : *Xanthopan morganii*. Les résultats de cette thèse ont également fourni des preuves directes de la pollinisation par ce papillon grâce à l'observation sur les enregistrements vidéo des caméras, du transport des pollinies sur le proboscis des sphinx pollinisateurs. Cette pollinisation par *X. morganii* représente une preuve supplémentaire de la présence sur le continent Africain de cette espèce pollinisatrice à long proboscis (Pinhey, 1962), différente de la sous-espèce observée à Madagascar (*Xanthopan morganii praedicta* Rothschild & Jordan, 1903). Le *Xanthopan morganii* d'Afrique continentale et le *Coelonia fulvinotata* joueraient donc un rôle important dans la pollinisation des espèces sphingophiles à longs tubes/éperons nectarifères en Afrique tropicale (Johnson et Ragusto, 2016). La pollinisation par ces espèces a également été observée chez plusieurs espèces d'orchidées épiphytes à long éperon en Afrique continentale particulièrement chez *Rangaeris amaniensis* (Kraenzl.) Summerh., *Aerangis kotschyana* Schltr (Martins

et Johnson, 2007) et *Bonatea steudneri* T.Durant & Schinz (Balducci *et al.*, 2019) en Afrique du sud et au Kenya.

Plusieurs auteurs ont suggéré qu'en Afrique, les plantes pollinisées par les sphinx relèveraient de deux principaux groupes suivant la longueur de leur tube de corolle, à savoir les plantes avec des tubes de corolle compris entre 20 et 50 mm de long et celles avec des tubes de corolle entre 90 et 120 mm de long (Johnson *et al.* 2017 ; Johnson et Raguso 2016 ; Martins et Johnson 2013). Selon Balducci *et al.* (2019), il existerait un troisième petit groupe en Afrique orientale composé par les plantes à très long tube de corolle adaptées à la pollinisation par *X. morganii* qui inclurait au moins les espèces d'orchidées dont les éperons dépassent 15 cm. Les espèces de *Cyrtorchis* étudiées au cours de cette thèse seraient donc catégorisées dans les deux premières guildes compte tenu de la taille de leurs éperons respectifs (1.9-4 cm pour *C. okuensis* et 4-9,6 cm pour *C. letouzeyi*) et traduiraient par conséquent que ces guildes seraient étroitement associées à la communauté de sphinx présente dans le milieu (Alexandersson et Johnson, 2002; Johnson *et al.*, 2017). Par ailleurs, cette présence des communautés de sphinx et de plantes associées à ces insectes pollinisateurs observés, le serait autant en Afrique centrale qu'en Afrique de l'Est. Une étude approfondie des réseaux d'interaction plantes-pollinisateurs (et plus particulièrement des sphinx) permettrait de mieux comprendre la répartition de la sphingophilie en Afrique centrale en lien avec la flore.

IV.6 LIMITATION DE LA POLLINISATION NATURELLE ET DU SUCCES REPRODUCTEUR

La période et la durée de l'anthèse ou la longévité des fleurs sont des paramètres fondamentaux dans la stratégie de pollinisation par les sphinx. En effet, l'ouverture essentiellement nocturne des fleurs des plantes pollinisées par les sphingidae représente un facteur important pour l'attraction de ces insectes pollinisateurs qui sont connus pour être actifs essentiellement la nuit. Par ailleurs, les orchidées sont connues pour avoir des fleurs longévives, disponibles plus longtemps ce qui augmenterait les chances de reproduction, en particulier la fréquence de visite des pollinisateurs, la quantité et la qualité du pollen exporté et déposé (Primack, 1985; Ashman, 2004). Dans ce travail, l'évaluation de la période entre l'ouverture de la première et de la dernière fleur, ainsi que la durée de vie des fleurs chez *C. okuensis* et *C. letouzeyi* nous ont permis de confirmer que les fleurs s'ouvriraient exclusivement pendant la nuit, pour une durée de 3-14 jours avant la fanaison complète suivant qu'elles aient été visitées ou pas. En effet, les fleurs à durée de vie plus courte (3-4 jours) sont généralement celles qui ont été visitées (pollinies emportées ou déposées) ou prédatées (herbivorie), alors que celles qui restent ouvertes plus longtemps sont celles qui n'ont pas été visitées ou endommagées. Ces résultats sont en accord avec ceux de Luyt et Johnson (2001) obtenus pour *Mystacidium venosum* où la longévité des fleurs a été réduite par la pollinisation à une moyenne de 5

jours comparativement aux fleurs non visitées qui avaient une durée de vie de 24 jours en moyenne. Plusieurs autres études ont également montré que la pollinisation réduisait considérablement la longévité des fleurs d'orchidées (Clayton et Aizen, 1996; Abdala-Roberts *et al.*, 2007; Huda et Wilcock, 2012). Par ailleurs, des résultats plus récents ont montré une durée de vie plus longue des fleurs chez *Pterostylis brumalis*, pouvant aller jusqu'à 50-56 jours (Bodley *et al.*, 2016), ce qui s'éloigne considérablement des chiffres observés pour *Cyrtorchis* qui seraient donc parmi les orchidées aux fleurs les moins longévives. Par ailleurs, les observations réalisées au cours de cette thèse nous ont également permis d'observer que chez les deux espèces, les fleurs pollinisées voyaient leur périanthe passé d'une couleur blanche à une couleur orangée et une fermeture du stigmate suivi d'un grossissement progressif de l'ovaire dans les deux jours suivant la pollinisation. Par contre chez les fleurs non pollinisées, ce changement de la couleur du périanthe suivi de la fanaison complète des fleurs (y compris de l'ovaire) et leur chute.

Nous avons également remarqué que le temps de floraison d'une plante varie en fonction du nombre d'inflorescences et de fleurs chez les deux espèces. En effet chez *C. okuensis*, cette durée de la floraison de toutes les fleurs est plus longue (5-28 jours) chez les individus ayant plus d'inflorescences (3-4 inflorescences) et des fleurs (jusqu'à 31 fleurs) que chez ceux ayant moins de fleurs (2-10 jours). Le même type de variation a été noté chez *C. letouzeyi* où on observe une durée plus longue (4-10 jours) chez les individus ayant plus d'inflorescences (2-3) et de fleurs (7-16 fleurs) que chez ceux ayant une seule inflorescence (1-5 jours). Pourtant, la production en fleurs chez ces deux espèces diffère compte tenu de l'ouverture séquentielle des fleurs sur les inflorescences, car l'une produit en moyenne presque le double de fleurs que l'autre (moyenne de 7 fleurs par individu chez *C. letouzeyi* vs 14 fleurs par individu chez *C. okuensis*) ce qui expliquerait cette longue durée de l'anthèse chez *C. okuensis* comparativement à *C. letouzeyi*.

Nos observations faites sur deux espèces de *Cyrtorchis* en milieu naturel ont montré que peu de fleurs étaient pollinisées avec succès. En effet, sur les 448 fleurs suivies chez *C. okuensis*, 16 % ont produit des fruits matures. Ce taux de fructification est plus faible chez *C. letouzeyi* ou sur un total de 215 et 117 fleurs suivies respectivement en 2018 et 2019, 7 % et 4 % respectivement de fruits matures produits. Ces résultats corroborent avec ceux réalisés chez cinq orchidées angraecoides au Kenya où la production de fruits en milieu naturel était comprise entre 3 et 17,5 % (Martins et Johnson, 2007). Ces valeurs sont également proches de la moyenne de 17 % rapportée en milieu naturel pour les orchidées tropicales (Tremblay *et al.*, 2005). Les faibles taux de fructification en conditions naturelles seraient étroitement liés à la faible fréquence de visite et à la rareté des pollinisateurs car le suivi avec les caméras ont permis d'enregistrer seulement huit événements de visite des pollinisateurs chez *C. okuensis* durant les 25 jours de suivi en continu et seulement 13 événements de visite durant les 30

jours de suivi réalisés pendant les deux années (10 événements de visite en 2018 et 3 en 2019) chez *C. letouzeyi*. En effet, l'absence ou la faible abondance des pollinisateurs peut empêcher ou limiter la production de fruits chez les orchidées (Reiter *et al.*, 2017; Vale *et al.*, 2011). Les faibles fréquences de visite conduisant à de faibles productions en fruits seraient encore plus marquées chez les orchidées pollinisées par les Sphingidae (Micheneau *et al.*, 2009; Amorim *et al.*, 2014). On note cependant dans la littérature un cas particulier de succès reproducteur élevé notamment de 62 % chez *Bonatea steudneri* qui serait associé à l'efficacité du pollinisateur, car malgré sa faible fréquence de visite, serait capable de polliniser efficacement la grande majorité des fleurs de la population (Balducci *et al.*, 2019). Cette thèse montre également que, les visites des sphinx se produisent à des moments spécifiques de la nuit notamment entre 18h et 2h pour *C. okuensis* et pendant toute la nuit entre 18h et 6h pour *C. letouzeyi*. En outre, la durée des événements de visite est relativement courte, particulièrement pour *C. letouzeyi* (en moyenne $20,5 \pm 18,68$ secondes pour les 13 événements de visites enregistrés), ce qui confirme l'assertion de Martins et Johnson (2013) selon laquelle les Sphingidae butineraient pendant des périodes relativement courtes.

IV.7 PREDATION ET HERBIVORIE

Grâce au dispositif des caméras installées dans nos différentes zones d'étude, nous avons mis en évidence des interactions différentes des interactions « classique » plantes-pollinisateurs, à savoir la prédation des pollinisateurs l'herbivorie (incluant la florivorie) par d'autres organismes. La prédation a particulièrement été observée chez *C. letouzeyi* où il a été enregistré 29 événements de visites par des mantes religieuses et des araignées qui sont connues pour être parmi les prédateurs du sphinx. Selon Wasserthal (2009, 2011), le long proboscis des Sphingidae et l'aptitude à faire du vol stationnaire seraient des adaptations développées par les sphinx pour échapper plus efficacement à la prédation. Une vidéo enregistrée a permis d'observer une mante religieuse s'attaquant un *Xanthopan morgani* pendant son butinage (Azandi. Obs.per.). Cependant, le papillon, dans notre cas, n'a pas été attrapé par la mante religieuse probablement à cause de sa taille relativement réduite, mais aussi probablement à cause des deux caractéristiques anti-prédations citées ci-dessus. Cette hypothèse d'allongement du proboscis des sphinx en réponse à la prédation reste débattue car certains auteurs pensent que les araignées observées sur les fleurs ne sont généralement pas assez corpulentes pour s'attaquer à un sphinx (Johnson et Anderson, 2010). Par ailleurs, les études phylogénétiques présentées par Netz et Renner (2017) montrent que le développement du long proboscis chez les Sphingidae serait lié à une coévolution entre les orchidées à longs éperons et leurs pollinisateurs. Des animaux tels que les chauves-souris insectivores (principalement l'espèce *Lavia frons*) ont été identifiés comme étant les principaux prédateurs des sphinx dans la zone aride du Kenya (Martins et

Johnson, 2013). Nous n'avons cependant pas observé ce prédateur dans aucun de nos enregistrements.

L'herbivorie quant à elle a été observée à travers l'activité d'oiseaux se nourrissant des parties du périanthe chez *C. okuensis*, de chenilles (larves de lépidoptères) et d'orthoptères chez *C. letouzeyi* (**Figure IV-3**). Une étude récente de Vale *et al* (2011) a démontré que la faible production en fruits chez *Broughtonia lindenii* pourrait être attribuée à la florivorie et à la prédation des fruits par les chenilles et les fourmis.

Prédation et herbivorie contribueraient ainsi à la limitation des visites du pollinisateur, mais aussi et surtout à la réduction du succès reproducteur en réduisant l'accès des pollinisateurs aux fleurs ainsi que le nombre de fleurs disponibles pour la pollinisation.

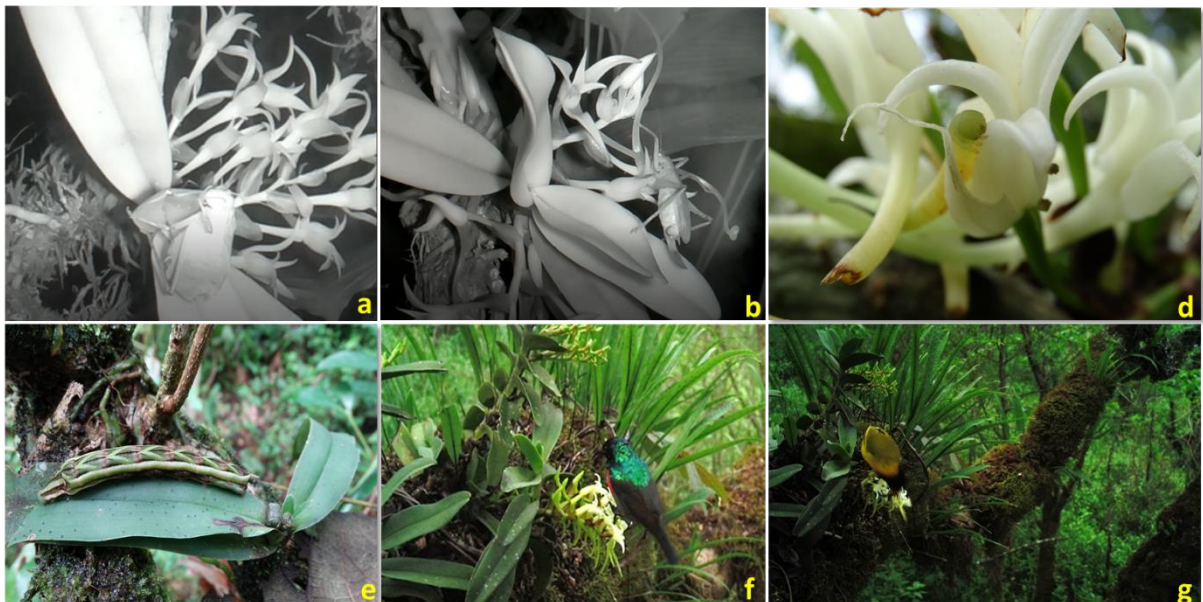


Figure IV-3. Diversité des vecteurs d'herbivorie et /ou florivorie chez *C. letouzeyi* dans la réserve du Dja (a-e) et chez *C. okuensis* au mont Oku (f-g). a. criquet ; b. sauterelle ; c-d. chenilles ; e. *Cinnyris reichenowi*; f. *Linurgus olivaceus*.

IV.8 OPTIMISATION DE LA VIABILITE DES GRAINES

Le faible taux de fructification observé chez certaines espèces de *Cyrtorchis* dans des conditions naturelles, nous a amené à tester l'intérêt de la pollinisation manuelle pour l'amélioration de la production de graines viables en vue de la conservation des espèces. Les efforts de conservation *in situ* ne suffisent plus pour assurer la préservation des populations d'espèces en milieu naturel, et par conséquent les programmes de conservation *ex situ* des espèces d'orchidées en vue de leur réintroduction éventuelle dans leurs habitats naturels sont donc plus que nécessaires (Seaton *et al.*, 2018). Il semble donc nécessaire de recenser et d'évaluer les facteurs limitants la production des fruits

et des graines viables. Dans le cadre de cette thèse, nous avons testé le système de pollinisation et la limitation des ressources dans un contexte d'établissement d'une banque de graines qui se sont révélés être important pour la reproduction des orchidées même si ceux-ci varient en fonction des espèces.

IV.8.1 INFLUENCE DU SYSTÈME DE POLLINISATION

Nos expérimentations sur deux espèces du genre *Cyrtorchis* montrent que le système de pollinisation le plus efficace pour la production de fruits et de graines viables semble varier en fonction des espèces. Globalement, la production en fruits dans les deux systèmes de pollinisation (autopollinisation et pollinisation croisée) n'a pas eu d'impact sur la production des fruits malgré l'intensité de la pollinisation (une ou trois fleurs pollinisées). On remarque cependant que chez *C. ringens* la pollinisation croisée a produit significativement plus de fruits comparativement à l'autopollinisation lorsqu'une seule fleur était pollinisée. Pour ce qui est de la viabilité des graines, une forte proportion de graines viables a été enregistrée dans les fruits issus de pollinisations croisées contrairement à ceux issus d'autopollinisation chez *C. aschersonii*, alors que cette différence n'est plus observée chez *C. ringens*. Ce résultat observé pour *C. aschersonii* est en accord avec ceux plusieurs travaux qui ont montré que chez les orchidées, la pollinisation croisée augmente la proportion de graines viables dans les fruits d'orchidées par rapport à l'autopollinisation (Micheneau *et al.*, 2006; Buyun *et al.*, 2015; Jersáková *et al.*, 2006). Globalement, il y aurait donc un effet positif de la pollinisation croisée sur la production en fruits et en graines viables. Par conséquent, afin d'évaluer efficacement le système de pollinisation le plus efficace pour la production optimale de fruits et de graines viables chez les *Cyrtorchis* et les orchidées épiphytes en général, il faudrait faire ces tests manuels de pollinisation chez chacune des espèces individuellement avec un échantillonnage conséquent.

IV.8.2 INFLUENCE DE LA LIMITATION DES RESSOURCES

La limitation des ressources sur la production en fruits et en graines est évidente lorsque la pollinisation supplémentaire ou artificielle (effectuée par exemple à travers les tests de pollinisations manuelles) ne permet pas d'augmenter la production en fruits, alors que l'augmentation des ressources y parvient (Tremblay *et al.*, 2005). Cette limitation des ressources chez les orchidées n'est pas toujours évidente à évaluer en milieu naturel, en particulier chez les orchidées épiphytes qui se développent dans des conditions particulièrement stressantes impliquant une carence en eau et en nutriments (Marler, 2018). Dans cette thèse, nous avons tenté d'évaluer la limitation des ressources sur la production de fruits mature et en observant quatre paramètres: le nombre de feuilles, la surface foliaire, et le nombre d'inflorescences.

Les résultats obtenus en fonction des modes de pollinisation appliqués mettent à nouveau en évidence des réponses différentes chez les deux espèces testées. Chez *C. aschersonii* et *C. ringens*, une faible corrélation négative a été observée entre le taux d'avortement des fruits et la surface foliaire lorsqu'une pollinisation croisée d'une fleur est appliquée (**Figure III-40** & **Figure III-42**). Cette corrélation n'est cependant pas observée dans les trois autres traitements de pollinisation. Ces résultats sur la diminution du taux d'avortement avec la surface foliaire pour une fleur pollinisée traduiraient de la disponibilité des ressources nutritives qui limiteraient le taux d'avortement de fruits lorsqu'on pollinise une seule fleur en pollinisation croisée. Ceci est en accord avec les observations de Tremblay *et al.* (2005) qui montre que la faible production en fruits par rapport aux fleurs chez plusieurs plantes serait étroitement liée à la pauvreté en ressources disponibles pour le développement des fruits. La régulation de l'investissement de la plante pour sa reproduction se traduit généralement par l'avortement des fleurs et des fruits immatures lorsque plusieurs fleurs sont pollinisées (Stephenson, 1981; Tremblay *et al.*, 2005) et que les ressources sont insuffisantes. L'absence de corrélation entre la surface foliaire et l'avortement dans les traitements d'autopollinisation (une et trois fleurs) chez *C. aschersonii* pourraient être dus à l'influence négative de l'autopollinisation sur la production des fruits et des graines au-delà de l'avortement des fruits.

Chez *C. ringens* on n'observe pas de patrons clairs de limitation des ressources compte tenu des résultats contradictoires observés.

Pour les deux espèces étudiées, la production en fruits et la viabilité des graines augmentent avec le temps de maturation des fruits (**Figure III-41** & **Figure III-43**). Il ressort de ces résultats qu'une production optimale en fruits et graines viables nécessite une longue période de maturation des fruits qui varie en fonction des espèces et du système de pollinisation appliqué.

A l'issue de l'évaluation de ces paramètres sur la limitation des ressources, nous pouvons retenir que la surface foliaire ne suffit pas pour évaluer la limitation des ressources chez ces orchidées épiphytes. Il faudrait en effet prendre en compte d'autres paramètres environnementaux à savoir la disponibilité en eau et en nutriments dans la plante qui sont les principaux facteurs limitants dans leurs habitats (Mondragon *et al.*, 2015), mais aussi faire un suivi de la reproduction en rapport avec les ressources disponibles sur une plus longue période pour estimer les coûts de celle-ci sur la possibilité de production de fruits et de graines au fil des années. Il a en effet été démontré que l'intensité de la floraison et de la fructification des orchidées peut à long terme avoir une influence sur leur croissance, leur capacité à fleurir et produire des fruits et graines les années suivantes (Ackerman et Montalvo, 1990; Tremblay *et al.*, 2005; Montalvo et Ackerman, 1987; Jersáková *et al.*, 2006). Dans le cadre de cette thèse, nous avons souvent effectué des tests de pollinisation sur les mêmes individus deux années consécutives lorsqu'il y avait floraison (compte tenu de la limitation des spécimens en fleur

disponibles pour les traitements à l'ombrière) mais nous n'avons malheureusement pas pu évaluer l'effet de cette pollinisation consécutive sur la vigueur et la reproduction de la plante qui pourrait aussi expliquer cette limitation des ressources. Cet effet à long terme de la fructification a été observé chez l'orchidée épiphyte *Ionopsis utricularioides* dont la surface foliaire, la production en fruits et la probabilité de floraison l'année suivante ont considérablement réduit chez les individus ayant fructifiés l'année précédente (Montalvo et Ackerman, 1987).

Chapitre V Conclusion et Perspectives



Piège lumineux installé au mont Oku Nord-Ouest Cameroun, Mai 2017

V.1 CONCLUSION

Au terme de cette thèse, il convient de valider ou non les différentes hypothèses postulées et qui ont porté cette étude.

Tout d'abord, l'hypothèse générale sur la nécessité d'une étude intégrative de la morphométrie, de la phylogénie et de la biologie de la reproduction pour fournir une taxonomie cohérente et naturelle du genre *Cyrtorchis* est validée. En effet, la présente étude intégrative de morphométrie, de phylogénie et de biologie de la reproduction a permis de fournir une taxonomie cohérente et naturelle du genre *Cyrtorchis* et de développer des approches efficaces et durables pour la conservation de ses espèces.

La **première hypothèse spécifique** portant sur l'existence de nouvelles entités taxonomiques au sein du genre *Cyrtorchis* a également été validée. Il est démontré que le genre *Cyrtorchis* compte six entités taxonomiques morphologiquement et/ou phylogénétiquement cohérentes qui sont actuellement non décrites. L'approche intégrative s'est également avérée efficace pour la résolution des problèmes de délimitations taxonomiques et la clarification des relations de parenté au sein du genre. Les analyses morphologiques ont confirmé les deux sections précédemment délimitées, la section *Cyrtorchis* et la section *Homocolleticon*, alors que les analyses phylogénétiques n'ont confirmé la monophylie que d'une seule des sections (*C. sect. Cyrtorchis*). Concernant la paraphilie observée pour la section *Homocolleticon*, celle-ci ne pourra être réévaluée de manière robuste qu'en incluant toutes les espèces connues dans le genre. Par ailleurs, la reconstruction de six états ancestraux a également permis de mettre en évidence l'importance taxonomique de certains caractères du gynostème et du fruit et /ou de l'ovaire qui pourrait être considéré dans la résolution des problèmes taxonomiques chez les orchidées.

La **deuxième hypothèse spécifique** est par ailleurs validée, car certains taxons du genre, investigués durant cette étude et ayant une même distribution géographique (*C. letouzeyi* et *C. chailluana*) sont isolés d'un point de vue reproducteur, parce qu'ils présentent une phénologie et/ou des pollinisateurs différents. Sur le plan phénologique, la majorité des espèces suivies en ombrière fleurissent entre août et octobre. Par ailleurs, certaines espèces ont montré des périodes de floraison plus courtes que d'autres et même des pics de floraison variables contribuant ainsi à l'établissement des barrières reproductives entre elles particulièrement pour les espèces distribuées en sympatrie. La floraison décalée des espèces constitue un outil complémentaire de délimitation taxonomique.

Concernant la biologie de la reproduction, l'observation du syndrome de pollinisation et des pollinisateurs réalisés chez deux espèces cibles *in situ* a permis de confirmer pour la première fois l'hypothèse de la pollinisation sphingophile suggéré dans le genre par Cribb (1989) il y a plus de 30 ans. Cinq pollinisateurs différents ont été identifiés pour chacune des espèces cibles sur la base de preuves

directes et indirectes obtenues grâce aux dispositifs de caméras et de pièges lumineux installés. La pollinisation naturelle est rare chez ces espèces du fait de la faible fréquence de visite des insectes pollinisateurs entraînant ainsi un faible pourcentage de fructification. Des interactions de prédation et d'herbivorie ont également pu être mise en évidence et contribueraient également à la réduction du succès reproducteur.

Enfin, la **troisième hypothèse spécifique** stipulant que le succès reproducteur varie entre les espèces et est influencé par le type de pollinisation et par la limitation des ressources n'est pas totalement validé. En effet, le type ou système de pollinisation influence le succès reproducteur et varie entre les espèces, pourtant l'effet de la limitation des ressources sur ce succès reproducteur n'a pas pu être mis en évidence de manière très nette. Le système de pollinisation le plus efficace pour la production des fruits et graines viables semble être le mode de pollinisation croisée, bien que celui-ci semble varier entre les espèces étudiées. L'évaluation de la limitation des ressources réalisées dans le cadre de cette thèse reste encore limitée et devrait être explorée plus en détail.

V.2 PERSPECTIVES

Des questions demeurent encore sur le plan taxonomique mais surtout sur la biologie de la reproduction du genre *Cyrtorchis* et nécessitent d'être clarifié à travers des recherches futures. Il faudra donc à cet effet que :

Sur les aspects taxonomiques

- i. un échantillonnage complémentaire soit réalisé pour les analyses phylogénétiques en rajoutant les cinq taxons non encore inclus (*C. glaucifolia*, *C. erythrae*, *C. seretii*, *C. guillaumetii* et *C. submontana*) et les 10 non résolus dans la phylogénie actuelle afin de produire une phylogénie complète en vue d'une révision taxonomique complète du genre.
- ii. des études moléculaires supplémentaires avec des marqueurs nucléaires additionnels et utilisant de nouvelles techniques de séquençage à haut débit de l'ADN génomique ou le Next Generation Sequencing (NGS) soient effectuées afin d'aider à mieux élucider ces relations entre les deux sections et par ricochet entre les taxons associés.
- iii. Les potentielles nouvelles espèces identifiées au courant de cette thèse soient décrites (*C. aff. aschersonii*, *C. okuensis*, *C. aff. praetermissa*, *C. aff. ringens* sp1, *C. aff. ringens* sp2, *C. aff. ringens* sp3) suite à une phylogénie plus élaborée incluant au moins deux spécimens de chacune de ces espèces.
- iv. l'histoire évolutive du genre soit étudiée à travers la caractérisation spatiale de la diversité génétique (étude phylogéographiques) de quelques espèces en lien avec les événements historiques passés. Ceci permettra à termes de tester la présence de barrières historiques aux flux de gènes au sein des différentes espèces ou d'identifier des zones de discontinuité présentant des niveaux de richesse et d'endémisme allélique particuliers. Cette caractérisation de la diversité génétique a jusqu'ici été essentiellement effectuée sur les arbres et très peu chez les herbacées, pourtant, l'étude de modèles biologiques originaux tels que certaines espèces d'orchidées du genre *Cyrtorchis* pourraient apporter des informations nécessaires à la compréhension de l'histoire des forêts tropicales humides africaines. Cette caractérisation de la diversité génétique pourrait également se faire en lien avec la phénologie notamment la période de floraison qui est un facteur endogène qui pourrait diverger en étant moins synchrone pendant une longue période (Texier *et al.*, 2018).

Sur les aspects de biologie de la reproduction

- i. les études des pollinisateurs au sein du genre soient approfondies et étendues aux autres genres d'orchidées angraecoïdes à travers la caractérisation des substances volatiles (parfums) et du nectar en lien avec le pollinisateur ou la communauté de pollinisateurs afin de

comprendre comment ces syndromes contribuent à la spécialisation des pollinisateurs et à leur coévolution.

- ii. les études visant à maximiser la production des fruits et des graines viables soient étendues à un nombre plus grand d'espèces pour dégager une méthodologie applicable aux plus grands nombres d'espèces d'orchidées. Il faudrait par ailleurs tester d'autres paramètres impliqués dans la limitation des ressources notamment ceux environnementaux tels que la disponibilité en eau et en nutriments qui sont les principaux facteurs limitants pour les orchidées épiphytes. En plus des tests de viabilité des graines réalisés jusqu'ici, des tests de germination devraient être réalisés afin d'évaluer l'effet de la congélation sur la préservation de la viabilité des graines d'espèces d'orchidées tropicales sur le long terme.
- iii. Enfin, les cartes de distributions de chacune des espèces de *Cyrtorchis* recensées en Afrique tropicale devront être établies, première base pour évaluer leur statut de conservation selon les catégories et critères de l'UICN, et ce afin d'identifier les espèces rares et menacées dans leur habitat naturel pour contribuer à l'identification des écosystèmes à haute valeur pour la conservation.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdala-Roberts L., Parra-Tabla V. & Navarro J., 2007. Is floral longevity influenced by reproductive costs and pollination success in *Cohniella ascendens* (Orchidaceae)? *Ann. Bot.*, 100 : 1367-1371.
- de Abreu N.L., Alves R.J.V., Cardoso S.R.S., Bertrand Y.J.K., Sousa F., Hall C.F., Pfeil B.E. & Antonelli A., 2018. The use of chloroplast genome sequences to solve phylogenetic incongruences in *Polystachya* Hook (Orchidaceae Juss). *PeerJ*, 6 : e4916.
- Ackerman J., 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, 1 (2) : 108-113.
- Ackerman J.D. & Montalvo A.M., 1990. Short-and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology*, 71 (1) : 263-272.
- Agapow P.-M., Bininda-Emonds O.R.P., Crandall K.A., Gittleman J.L., Mace G.M., Marshall J.C. & Purvis A., 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *Q. Rev. Biol.*, 79 (2) : 161-179.
- Akbulut M.K. & Şenel G., 2016. The seeds micromorphology and morphometry of certain *Dactylorhiza* (Orchidaceae) species distributed in Turkey. *Rend. Lincei*, 27 (4 LB-Akbulut2016) : 679-686.
- Aleman J.C., Jarzyna M.A. & Staver A.C., 2018. Forest extent and deforestation in tropical Africa since 1900. *Nat. Ecol. Evol.*, 2 : 26-33.
- Alexandersson R. & Johnson S.D., 2002. Pollinator-mediated selection on flower-tube length in a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.*, 269 (1491) : 631-636.
- Amorim F.W., Wyatt G.E. & Sazima M., 2014. Low abundance of long-tongued pollinators leads to pollen limitation in four specialized hawkmoth-pollinated plants in the Atlantic Rain forest, Brazil. *Naturwissenschaften*, 101 (11) : 893-905.
- Anderson G.J., Johnson S.D., Neal P.R. & Bernardello G., 2002. Reproductive biology and plant systematics: the growth of a symbiotic association. *Taxon*, 51 (4) : 637-653.
- Andersson S. & Waldmann P., 2002. Inbreeding depression in a rare plant, *Scabiosa canescens* (Dipsacaceae). *Hereditas*, 136 (3) : 207-211.
- Andriananjamanantsoa H.N., Engberg S., Louis Jr E.E. & Brouillet L., 2016. Diversification of *Angraecum* (Orchidaceae, Vandeeae) in Madagascar: revised phylogeny reveals species accumulation through time rather than rapid radiation. *PLoS One*, 11 (9) : e0163194.
- Arditti J. & Ghani A.K.A., 2000a. Tansley review No. 110 - Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.*, 145 (3) : 367-421.
- Arditti J. & Ghani A.K.A., 2000b. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications (vol 145, pg 367, 2000). *New Phytol.*, 146 (3) : 569.
- Asanga C., 2002. *Case study of exemplary forest management in Central Africa: Community forest management at the Kilum-Ijim mountain forest region, Cameroon*. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Forestry Department : 30 pp.
- Ashman T.L., 2004. Flower Longevity. In : *Plant Cell Death Processes*. Academic Press : 349-362.
- Ashworth L., Aguilar R., Martín-Rodríguez S., Lopezariza-Mikel M., Avila-Sakar G., Rosas-Guerrero V. & Quesada M., 2015. Pollination syndromes: A global pattern of convergent evolution driven by the most effective pollinator. In : *Evolutionary Biology: Biodiversification from Genotype to Phenotype*. Springer, Cham : 203-224.
- Avana-Tientcheu M.L., Momo Solefack M.C., Kamga Y.B. & Nguetsop V.F., 2018. Vulnerability assessment of *Gnidia glauca* (Thymelaeaceae) exploitation, traditional uses and domestication potential in the community forest of Kilum-Ijim, North Western Cameroon. *J. Ecol. Nat. Environ.*, 10 (8) : 182-191.
- Avana M.L., 2006. Domestication de *Prunus africana* (Hook. f.) Kalkam (Rosaceae): étude de la germination et du bouturage. Thèse Doctorat/Ph. D. en Biologie végétale, Université de Yaoundé I.
- Aybeke M., 2013. Maceration techniques on *Barlia* (Orchidaceae) seeds. *Int Res J Plant Sci*, 4 (4) : 94-96.
- Ayonghe S.N., Mafany G.T., Ntasin E. & Samalang P., 1999. Seismically activated swarm of landslides, tension cracks, and a rockfall after heavy rainfall in Bafaka, Cameroon. *Nat. hazards*, 19 (1) : 13-27.

- Azandi L., 2014. Etude morphométrique et révision taxonomique du genre *Cyrtorchis* Schltr. (Orchidaceae) en Afrique centrale. Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, Master degree, 59 p.
- Azandi L., Droissart V., Sonké B., Simo-Droissart M., D'haijère T., Farminhão J.N.M., Verlynde S., Kaymak E. & Stévant T. (sous presse). A near comprehensive phylogenetic framework gives new insights towards a natural classification of the African genus *Cyrtorchis* (Angraecinae, Orchidaceae). *Taxon*. DOI: 10.1002/tax.12511
- Azandi L., Droissart V., Sonké B., Simo-Droissart M. & Stévant T., 2018. The genus *Cyrtorchis* in Central Africa with a focus on its two sections. *Orchids*, 87 (1) : 48-55.
- Azandi L., Stevant T., Sonké B., Simo-Droissart M., Avana M.L. & Droissart V., 2016. Synoptic revision of the genus *Cyrtorchis* Schltr. (Angraecinae, Orchidaceae) in Central Africa, with the description of a new species restricted to submontane vegetation. *Phytotaxa*, 267 (3) : 165-186.
- Baker W.J., 1994. A revision of the *Cyrtorchis arcuata* (Lindl.) Schltr. complex (Orchidaceae). University of Reading, M.Sc. Thesis, United Kingdom, 90 p.
- Balducci M.G., Martins D.J. & Johnson S.D., 2019. Pollination of the long-spurred African terrestrial orchid *Bonatea steudneri* by long-tongued hawkmoths, notably *Xanthopan morgani*. *Plant Syst. Evol.*, 305 (9) : 765-775.
- Barthlott W., Große-Veldmann B. & Korotkova N., 2014. *Orchid seed diversity: A scanning electron microscopy survey*. Barthlott W. (éd.). Berlin : Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem as Englera 32 : 245 pp.
- Barthlott W., Hostert A., Kier G., Koper W., Kreft H., Mutke J., Rafiqpoor M.D. & Sommer J.H., 2007. Geographic patterns of vascular plant diversity at continental to global scales. *Erdkunde*, 61 (4) : 305-315.
- Bateman R.M., Pridgeon A.M. & Chase M.W., 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis* sensu stricto. *Lindleyana*, 12 : 113-141.
- Beentje H., 2010. *The Kew Plant Glossary, an illustrated dictionary of plant terms*. Kew, Richmond : The Royal Botanic Gardens : 164 pp.
- van den Berg C., Goldman D.H., Freudenstein J. V., Pridgeon A.M., Cameron K.M. & Chase M.W., 2005. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *Am. J. Bot.*, 92 (4) : 613-624.
- van den Berg C., Higgins W.E., Dressler R.L., Whitten W.M., Arenas S., Culham A. & Chase M.W., 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*, 15 (2) : 96-114.
- Bertin R.I., 2008. Plant phenology and distribution in relation to recent climate change. *J. Torrey Bot. Soc.*, 135 : 126-146.
- Betti J.L., 2011. Stock of *Prunus africana* stems on the mount Cameroon forest. *African J. Plant Sci.*, 5 (13) : 781-789.
- Biesmeijer J.C., Roberts S.P.M., Reemer M., Ohlemüller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A.P., Potts S.G., Kleukers R. & Thomas C.D., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* (80-), 313 (5785) : 351-354.
- Bissiegou P., 2014. *Systematics, evolution and historical biogeography of the family Ochnaceae with emphasis on the genus Campylospermum*. Wageningen : Wageningen University : 358 pp.
- Blattner F.R., 1999. Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR. *Biotechniques*, 27 (6) : 1180-1186.
- Boberg E., Alexandersson R., Jonsson M., Maad J., Ågren J. & Nilsson L.A., 2014. Pollinator shifts and the evolution of spur length in the moth-pollinated orchid *Platanthera bifolia*. *Ann. Bot.*, 113 (2) : 267-275.
- Bodley E.J., Beggs J.R., Toft R. & Gaskett A.C., 2016. Flowers, phenology and pollination of the endemic New Zealand greenhood orchid *Pterostylis brumalis*. *New Zeal. J. Bot.*, 54 (3) : 291-310.
- Bogarín D., Fernández M., Borkent A., Heemskerck A., Pupulin F., Ramírez S., Smets E. & Gravendeel B., 2018. Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 186 (4) : 510-543.
- Boom A.F., Migliore J., Kaymak E., Meerts P. & Hardy O.J., 2021. Plastid introgression and evolution of African miombo woodlands: New insights from the plastome-based phylogeny of *Brachystegia* trees. *J. Biogeogr.*

1-14.

- Brandrud M.K., Baar J., Lorenzo M.T., Athanasiadis A., Bateman R.M., Chase M.W., Hedrén M. & Paun O., 2020. Phylogenomic relationships of diploids and the origins of allotetraploids in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Syst. Biol.*, 69 (1) : 91-109.
- Bray L., 2009. L'espèce, discussion d'une notion intuitive. *Hommes et planètes*, 43 : 32-35.
- Brooks T.M., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Da Fonseca G.A.B., Rylands A.B., Konstant W.R., Flick P., Pilgrim J., Oldfield S., Magin G. & Hilton-Taylor C., 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conserv. Biol.*, 16 (4) : 909-923.
- Brown R., 1810. *Prodromus floræ Novæ Hollandiæ et Insulæ Van-Diemen: exhibens characteres plantarum quas annis 1802-1805. typis R. Taylor et socii* : .
- Brzosko E. & Wróblewska A., 2013. Genetic diversity of nectar-rewarding *Platanthera chlorantha* and nectarless *Cephalanthera rubra*. *Bot. J. Linn. Soc.*, 171 (4) : 751-763.
- Buyun L.I., Cherevchenko T.M., Kovalska L.A. & Ivannikov R. V., 2015. Reproductive biology of *Angraecum eburneum* subsp. *superbum* (Orchidaceae) under glasshouse conditions. *Environ. Exp. Biol.*, 13 : 33-39.
- Cable S. & Cheek M., 1998. *The plants of Mount Cameroon, a conservation checklist*. Cable S. & Cheek M. (éd.). Kew : Royal Botanic Gardens : 277 pp.
- Cai J., Liu X., Vanneste K., Proost S., Tsai W.-C., Liu K.-W., Chen L.-J., He Y., Xu Q., Bian C., Zheng Z., Sun F., Liu W., Hsiao Y.-Y., Pan Z.-J., Hsu C.-C., Yang Y.-P., Hsu Y.-C., Chuang Y.-C., et al., 2014. The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*. *Nat. Genet.*, 47 (1) : 65-72.
- Cameron K.M., 2004. Utility of plastid *psaB* gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31 (3) : 1157-1180.
- Cameron K.M., 2005. Leave it to the leaves: A molecular phylogenetic study of Malaxideae (Epidendroideae, Orchidaceae). *Am. J. Bot.*, 92 (6) : 1025-1032.
- Cameron K.M. & Chase M.W., 1999. Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America-eastern Asia phytogeographic disjunction. *J. Plant Res.*, 112 (3) : 317-329.
- Cameron K.M., Chase M.W., Whitten W.M., Kores P.J., Jarrell D.C., Albert V.A., Yukawa T., Hills H.G. & Goldman D.H., 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *Am. J. Bot.*, 86 (2) : 208-224.
- Carlswald B.S., Stern W.L. & Bytebier B., 2006a. Comparative vegetative anatomy and systematics of the angraecoids (Vandeeae, Orchidaceae) with an emphasis on the leafless habit. *Bot. J. Linn. Soc.*, 151 (2) : 165-2018.
- Carlswald B.S., Whitten W.M. & Williams N.H., 2003. Molecular phylogenetics of Neotropical leafless Angraecinae (Orchidaceae): reevaluation of generic concepts. *Int. J. Plant Sci.*, 164 (1) : 43-51.
- Carlswald B.S., Whitten W.M., Williams N.H. & Bytebier B., 2006b. Molecular phylogenetics of Vandeeae (Orchidaceae) and the evolution of leaflessness. *Am. J. Bot.*, 93 (5) : 770-786.
- Chambers J.M. & Hastie T.J., 1992. *Statistical models in S*. Pacific Grove: Wadsworth & Brooks/Cole : 624 pp.
- Chapman C.A., Chapman L.J., Struhsaker T.T., Zanne A.E., Clark C.J. & Poulsen J.R., 2005. A long-term evaluation of fruiting phenology: Importance of climate change. *J. Trop. Ecol.*, 21 : 31-45.
- Chapman C.A., Valenta K., Bonnell T.R., Brown K.A. & Chapman L.J., 2018. Solar radiation and ENSO predict fruiting phenology patterns in a 15-year record from Kibale National Park, Uganda. *Biotropica*, 50 : 384-395.
- Charlesworth D. & Charlesworth B., 1995. Quantitative genetics in plants: the effect of the breeding system on genetic variability. *Evolution (N. Y.)*, 49 (5) : 911-920.
- Chase M.W., 1999. Molecular systematics, parsimony, and orchid classification. In : *Genera orchidacearum, vol. 1, General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen F.N. (éd.). Oxford : Oxford University Press : 81-88.
- Chase M.W., Cameron K.M., Barrett R.L. & Freudenstein J. V., 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In : *Orchid conservation*. Dixon Kell S. P., Barrett R. L. and Cribb P. J. K.W. (éd.). Kota Kinabalu, Sabah : Natural History Publications (Borneo) : 69-89.
- Chase M.W., Cameron K.M., Freudenstein J. V., Pridgeon A.M., Salazar G., van den Berg C. & Schuiteman A., 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Bot. J. Linn. Soc.*, 177 : 151-174.

- Chase M.W., Cameron K.M., Hills H.G. & Jarrell D., 1994. Molecular systematics of the Orchidaceae and other lilioid monocots. *In* : *Proceedings of the 14th World Orchid Conference*. Pridgeon A. (éd.). London : HMSO : 61-73.
- Chase M.W., Christenhusz M.J.M., Fay M.F., Byng J.W., Judd W.S., Soltis D.E., Mabberley D.J., Sennikov A.N., Soltis P.S., Stevens P.F., Briggs B., Brockington S., Chautems A., Clark J.C., Conran J., Haston E., Möller M., Moore M., Olmstead R., et al., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.*, 181(1) : 1-20.
- Chase M.W. & Hills H.G., 1991. Silica gel: an ideal desiccant for preserving field-collected leaves for use in molecular studies. *Taxon*, 40 : 215-220.
- Chase M.W. & Hills H.G., 1992. Orchid phylogeny, flower sexuality, and fragrance-seeking. *Bioscience*, 42 (1) : 43-49.
- Chase M.W. & Palmer J.D., 1989. Chloroplast DNA systematics of lilioid monocots: resources, feasibility, and an example from the Orchidaceae. *Am. J. Bot.*, 76 : 1720-1730.
- Chase M.W. & Palmer J.D., 1992. Floral morphology and chromosome number in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae): evolutionary insights from a phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation. *In* : *Molecular systematics of plants*. Soltis Soltis, P. S. and Doyle, J. J. D.E. (éd.). Chapman and Hall, New York : 324-339.
- Chase M.W. & Palmer J.D., 1997. Leapfrog radiation in floral and vegetative traits among twig epiphytes in the orchid subtribe Oncidiinae. *In* : *Molecular evolution and adaptive radiation*. Givnish Sytsma, K. J. T.J. (éd.). Cambridge University Press, Cambridge, UK : 331-352.
- Cheek M., Onana J.-M. & Pollard B.J., 2000. *The Plants of Mount Oku and the Ijim Ridge, a Conservation Checklist*. Cheek M., Onana J.-M. & Pollard B.J. (éd.). Kew : Royal Botanic Gardens : iv + 211 pp.
- Cheek M., Pollard B.J., Darbyshire I., Onana J.-M. & Wild C., 2004. *The Plants of Kupe, Mwanenguba and the Bakossi Mountains, Cameroon: A Conservation Checklist*. Cheek M., Pollard B.J., Darbyshire I., Onana J.-M. & Wild C. (éd.). Kew : Royal Botanic Gardens : 512 pp.
- Chessel D., Dufour A.-B. & Thioulouse J., 2004. The ade4 package-I- One-table methods. *R News*, 4 : 5-10.
- Chinsamy M., 2012. South African medicinal orchids: a pharmacological and phytochemical evaluation. Ph.D. thesis, University of KwaZulu-Natal, 240 p.
- Chiron G., 2001. Le genre *Cyrtorchis* Schlechter, avec une nouvelle espèce du Cameroun. *Richardiana*, 1 (2) : 70-79.
- Clayton S. & Aizen M.A., 1996. Effects of pollinia removal and insertion on flower longevity in *Chloraea alpina* (Orchidaceae). *Evol. Ecol.*, 10 : 653-660.
- Couvreur T.L.P., Dauby G., Blach-Overgaard A., Deblauwe V., Desein S., Droissart V., Hardy O.J., Harris D.J., Janssens S.B., Ley A.C., Mackinder B.A., Sonké B., Sosef M.S.M., Stévant T., Svenning J.C., Wieringa J.J., Faye A., Missouf A.D., Tolley K.A., et al., 2021. Tectonics, climate and the diversification of the tropical African terrestrial flora and fauna. *Biol. Rev.*, 96 (1) : 16-51.
- Cox A. V., Pridgeon A.M., Albert V.A. & Chase M.W., 1997. Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae, Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. *Plant Syst. Evol.*, 208 (3) : 197-223.
- Cracraft J., 1983. Species concepts and speciation analysis. *In* : *Current Ornithology*. Johnston R. (éd.). New York : Plenum Press : 159-187.
- Cribb P., Hermans J. & Rakotoarinivo M., 2009. *Field guide to the orchids of Madagascar*. Kew : Royal Botanic Gardens : 1-456 pp.
- Cribb P.J., 1989. Orchidaceae 3. *In* : *Flora of Tropical East Africa*. Polhill R.M. (éd.). Rotterdam : Balkema : 413-651.
- Cribb P.J., Kell S.P., Dixon K.W. & Barrett R.L., 2003. Orchid conservation: a global perspective. *In* : *Orchid conservation*. Dixon Kell S. P., Barrett R. L. and Cribb P. J. K.W. (éd.). Kota Kinabalu, Sabah : Natural History Publications (Borneo) : 1-24.
- La Croix I., 2003. *Cyrtorchis crassifolia*: Orchidaceae. *Curti's Bot. Mag.*, 20 (4) : 213-2018.
- la Croix I.F. & Cribb P.J., 1998. Orchidaceae part 2. *In* : *Flora Zambesiaca: Mozambique, Malawi, Zambia, Zimbabwe, Botswana*. Pope G. V (éd.). Kew : Royal Botanic Gardens : 321-569.
- la Croix I.F. & la Croix E., 1997. *African orchids in the wild and in cultivation*. Portland, Oregon : Timber Press : 379 pp.

- la Croix I.F., la Croix E.A.S. & la Croix T.M., 1991. *Orchids of Malawi : the epiphytic and terrestrial orchids from South and East Central Africa*. Rotterdam : A. A. Balkema : 358 pp.
- la Croix I.F., la Croix E.A.S., la Croix T.M., Hutson J.A. & Johnston-Stewart N.G.B., 1983. *Malawi orchids, volume 1 -- epiphytic orchids*. The National Fauna Preservation Society of Malawi and the Southern Africa Regional Tourism Council : 149 pp.
- Cuénoud P., Savolainen V., Chatrou L.W., Powell M., Grayer R.J. & Chase M.W., 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *Am. J. Bot.*, 89 (1) : 132-144.
- Cunningham A.B., 2005. CITES significant trade review of *Prunus africana*. In : Review of Significant Trade in specimens of Appendix-II species. Sixteenth meeting of the Plants Committee, Lima (Peru), 3–8 July 2006. PC16 Doc.10.2. : 55.
- Cupido C.N., 2003. Systematic studies in the genus *Merciera* (Campanulaceae): A re-assessment of species boundaries. *Adansonia*, 25 (1) : 33-44.
- D'hajjère T., Mardulyn P., Dong L., Plunkett G.M., Simo-Droissart M., Droissart V. & Stévant T., 2019. Molecular phylogeny and taxonomic synopsis of the angraecoid genus *Ypsilopus* (Orchidaceae, Vandeeae). *Taxon*, 68 (3) : 455-470.
- Dafni A., 1987. Pollination in Orchis and related genera: evolution from reward to deception. In : *Orchid biology: reviews and perspectives*. Arditti J. (éd.). Ithaca & London : Cornell University Press : 79-104.
- Darbyshire I., Anderson S., Asatryan A., Byfield A., Cheek M., Clubbe C., Ghrabi Z., Harris T., Heatubun C.D. & Kalema J., 2017. Important Plant Areas: revised selection criteria for a global approach to plant conservation. *Biodivers. Conserv.*, 26 (8) : 1767-1800.
- Darwin C., 1859. *On the origins of species by means of natural selection*. London : John Murray : 281pp.
- Darwin C., 1862. *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing*. London : J. Murray : 365 pp.
- Das M., Bhattacharya S., Basak J. & Pal A., 2007. Phylogenetic relationships among the bamboo species as revealed by morphological characters and polymorphism analyses. *Biol. Plant.*, 51 (4) : 667-672.
- Davies K.L., Stpiczyńska M. & Kamińska M., 2013. Dual deceit in pseudopollen-producing *Maxillaria* s.s. (Orchidaceae: Maxillariinae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 173 (4) : 744-763.
- Delpino F., 1874. Ulteriori osservazioni e considerazioni sulla dicogamia nel regno vegetale. 2 (IV). Delle piante zoidifile. *Atti della Soc. Ital. Sci. Nat.*, 16 : 151-349.
- Demenou B.B., Migliore J., Heuertz M., Monthe F.K., Ojeda D.I., Wieringa J.J., Dauby G., Albrecht L., Boom A. & Hardy O.J., 2020. Plastome phylogeography in two African rain forest legume trees reveals that Dahomey Gap populations originate from the Cameroon volcanic line. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 150 : 106854.
- Descourvières P., Farminhão J.N.M., Droissart V., Dubuisson J., Simo-droissart M. & Stévant T., 2018. A new genus of angraecoid orchids (Orchidaceae: Angraecinae) with highly distinctive pollinaria morphology, including three new species from tropical West and Central Africa. *Phytotaxa*, 373 (2) : 099-120.
- Deswal D.P. & Chand U., 1997. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. *Seed Sci. Technol.*, 25 (3) : 409-417.
- Devos N., Tyteca D., Raspé O., Wesselingh R.A. & Jacquemart A.L., 2003. Patterns of chloroplast diversity among western European *Dactylorhiza* species (Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.*, 243 (1) : 85-97.
- Dixon K. & Phillips R.D., 2007. The Orchid conservation challenge. *Lankesteriana Int. J. Orchid.*, 7 (1-2) : 11-12.
- Dodson C.H., 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. *Am. Orchid Soc. Bull.*, 31 : 525-534.
- Donkpegan A.S.L., Doucet J.L., Migliore J., Duminil J., Dainou K., Piñeiro R., Wieringa J.J., Champluvier D. & Hardy O.J., 2017. Evolution in African tropical trees displaying ploidy-habitat association: The genus *Afzelia* (Leguminosae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 107 : 270-281.
- Douzery E.J.P., Pridgeon A.M., Kores P., Linder H.P., Kurzweil H. & Chase M.W., 1999. Molecular phylogenetics of *Diseae* (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. *Am. J. Bot.*, 86 (6) : 887-899.
- Doyle J.J. & Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19 (1) : 11-15.
- Dray S. & Dufour A.-B., 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.*,

- 22 (4) : 1-20.
- Dray S., Dufour A.-B. & Chessel D., 2007. The ade4 package II: Two-table and K-table methods. *R news*, 7 (2) : 47-52.
- Dressler R., 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge : Cambridge University Press : 330 pp.
- Dressler R.L., 1974. Classification of the orchid family. (Clasificación de las orquídeas.). 7 : 259-279.
- Dressler R.L., 1981. *The Orchids: Natural History and Classification*. Cambridge, Mass. : Harvard University Press : 344 pp.
- Droissart V., 2009. Etude taxonomique et biogéographique des plantes endémiques d'Afrique centrale atlantique : le cas des Orchidaceae. Université Libre de Bruxelles, 270 p.
- Droissart V., Azandi L., Onguene E., Savignac M., Smith T.B. & Deblauwe V., 2021. PICT: A low cost, modular, open-source camera trap system to study plant-insect interactions. *Methods Ecol. Evol.* DOI: 10.1111/2041-210X.13618. 1-8.
- Droissart V., Dauby G., Hardy O.J., Deblauwe V., Harris D.J., Janssens S., Mackinder B.A., Blach-Overgaard A., Sonké B. & Sosef M.S.M., 2018. Beyond trees: Biogeographical regionalization of tropical Africa. *J. Biogeogr.*, 45 (5) : 1153-1167.
- Droissart V., Sonké B., Simo M. & Stévant T., 2009. New orchid records from Atlantic Central Africa. *Edinburgh J. Bot.*, 66 (1) : 115-132.
- Drummond A., Suchard M.A., Xie D. & Rambaut A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.*, 29 (8) : 1969-1973.
- Duminil J., Kenfack D., Viscosi V., Grumiau L. & Hardy O.J., 2012. Testing species delimitation in sympatric species complexes: the case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 62 (1) : 275-285.
- Duminil J., Koffi G.K., Debout G., Sebastiani F., Vendramin G.G., Heuertz M., González-Martínez S.C. & Hardy O.J., 2011. Isolation of SSR markers for two African tropical tree species, *Erythrophleum suaveolens* and *E. ivorense* (Caesalpinioideae). *Am. J. Bot.*, 98 (5) : e106-e108.
- Duminil J. & Di Michele M., 2009. Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosyst.*, 143 (3) : 528-542.
- Dunham A.E., Razafindratsima O.H., Rakotonirina P. & Wright P.C., 2018. Fruiting phenology is linked to rainfall variability in a tropical rain forest. *Biotropica*, 50 : 396-404.
- Edgar R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32 (5) : 1792-1797.
- Ellis A.G. & Johnson S.D., 2010. Gender differences in the effects of floral spur length manipulation on fitness in a hermaphrodite orchid. *Int. J. Plant Sci.*, 171 (9) : 1010-1019.
- Erixon P., Svennblad B., Britton T. & Oxelman B., 2003. Reliability of Bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics. *Syst. Biol.*, 52 (5) : 665-673.
- ESRI., 2017. ArcGIS 10.5.1. for desktop, Redlands, CA.
- Essomo S.E., Fonge B.A., Bechem E.E., Tabot P.T. & Arrey B.D., 2016. Flowering Phenology and Reproductive Success of the orchids of Mt Cameroon in relation to a changing environment. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.*, 3 (10) : 21-35.
- Farminhão J.N.M., D'hajjère T., Droissart V., Dumbo Isonga L., Dong L., Verlynde V., Plunkett G.M., Simo-Droissart M. & Stévant T., 2020. An elegy to Rangaeris, including a description of two new genera in the *Cyrtorchis-Tridactyle* clade (Orchidaceae, Angraecinae). *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 205 (3) : 300-322.
- Farminhão J.N.M., Meerts P., Descourvieres P., Droissart V., Simo-Droissart M. & Stevant T., 2018. A revised concept of *Rhipidoglossum* (Angraecinae, Orchidaceae). *Phytotaxa*, 349 (3) : 247-256.
- Farminhão J.N.M., Verlynde S., Kaymak E., Droissart V., Simo-Droissart M., Collobert G., Martos F. & Stévant T., 2021. Rapid radiation of angraecoids (Orchidaceae, Angraecinae) in tropical Africa characterised by multiple karyotypic shifts under major environmental instability. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 159 : 107105.
- Fay M. & Rankou H., 2016. Slipper orchids on the IUCN Red List. In: 2015 Annual Report to the Environment Agency—Abu Dhabi. 106-111 p.
- Fay M.F., 2018. Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Bot. Stud.*, 59

(1) : 16.

- Fay M.F., Bayer C., Alverson W.S., De Bruijn A.Y. & Chase M.W., 1998. Plastid rbcL sequence data indicate a close affinity between *Diegodendron* and *Bixa*. *Taxon*, 47 : 43-50.
- Fay M.F. & Chase M.W., 2009. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Ann. Bot.*, 104 (3) : 359-364.
- Fay M.F., Pailler T. & Dixon K.W., 2015. Orchid conservation: making the links, .
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution (N. Y.)*, 783-791.
- Fenster C.B., Armbruster W.S., Wilson P., Dudash M.R. & Thomson J.D., 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35 : 375-403.
- Fischer E., Killmann D. & Fischer, E., Killmann, D., Delepierre, G., Lebel J.P., 2010. *The orchids of Rwanda*. Koblenz Ge. Koblenz : Koblenz Dept. of Biology, Inst. for Integrated Natural Sciences, Universität Koblenz-Landau : 438 pp.
- Fisher R.A., 1935. *Design of Experiments*. Oliver and. London. 256pp.
- França Neto J.B., 1999. *Teste de tetrazólio para determinação do vigor de sementes [Tetrazolium test for seed vigour determination]*. ABRATES. F.C. Krzyzanowski R.D.V. and J. (éd.). Londrina : 218 pp.
- Franke T., 2004. *Afrothismia saingei* (Burmanniaceae, Thismieae), a new myco-heterotrophic plant from Cameroon. *Syst. Geogr. Plants*, 27-33.
- Freudenstein J. V. & Chase M.W., 2015. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: Progressive specialization and diversification. *Ann. Bot.*, 115 (4) : 665-681.
- Freudenstein J. V, van den Berg C., Goldman D.H., Kores P.J., Molvray M. & Chase M.W., 2004. An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analysis of jackknife branch support strategy. *Am. J. Bot.*, 91 (1) : 149-157.
- Freudenstein J. V & Doyle J.J., 1994. Character transformation and relationships in Corallorhiza (Orchidaceae: Epidendroideae). I. Plastid DNA. *Am. J. Bot.*, 81 : 1449-1457.
- Freudenstein J. V & Rasmussen F.N., 1999. What does morphology tell us about orchid relationships? - A cladistic analysis. *Am. J. Bot.*, 86 (2) : 225-248.
- Freudenstein J. V, Senyo D.M. & Chase M.W., 2000a. Mitochondrial DNA and relationships in the Orchidaceae. In : *Monocots: Systematics and evolution*. Wilson K.L. & Morrison D.A. (éd.). CSIRO, Collingwood : 421-429.
- Freudenstein J. V, Senyo D.M. & Chase M.W., 2000b. Phylogenetic implications and comparative utility of 26S and ITS2 sequences in Orchidaceae. *Am. J. Bot.*, 87 : 127-128.
- Frodin D.G., 2001. *Guide to standard floras of the world: an annotated, geographically arranged systematic bibliography of the principal floras, enumerations, checklists and chorological atlases of different areas*. Cambridge University Press : .
- Fu Q., Diez J.B., Pole M., Ávila M.G., Liu Z.J., Chu H., Hou Y., Yin P., Zhang G.Q., Du K. & Wang X., 2018. An unexpected noncarpellate epigynous flower from the Jurassic of China. *Elife*, 7 : 1-24.
- Fulton M. & Hodges S.A., 1999. Floral isolation between *Aquilegia formosa* and *Aquilegia pubescens*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 266 (1435) : 2247-2252.
- Gale S.W., Fischer G.A., Cribb P.J. & Fay M.F., 2018. Orchid conservation: bridging the gap between science and practice. *Bot. J. Linn. Soc.*, 186 (4) : 425-434.
- Gamarra R., Cela P.G. & Ortúñez E., 2019. Orchidaceae in Equatorial Guinea (West Tropical Africa): nomenclatural and taxonomic notes, new records and critical taxa. *Kew Bull.*, 74 (1) : 2.
- Gamarra R., Ortúñez E., Cela P.G. & Merencio Á., 2018. Seed micromorphology of orchidaceae in the Gulf of Guinea (West Tropical Africa). *Plant Syst. Evol.*, 304 (5) : 665-677.
- Gamisch A., Fischer G.A. & Comes H.P., 2014. Recurrent polymorphic mating type variation in Madagascan *Bulbophyllum* species (Orchidaceae) exemplifies a high incidence of auto-pollination in tropical orchids. *Bot. J. Linn. Soc.*, 175 : 242-258.
- Gamisch A., Fischer G.A. & Comes H.P., 2015. Multiple independent origins of auto-pollination in tropical orchids (*Bulbophyllum*) in light of the hypothesis of selfing as an evolutionary dead end. *BMC Evol. Biol.*, 15 (1) : 1-18.
- Garay L.A., 1960. On the origin of the Orchidaceae. *Bot. Mus. Leafl. Harvard Univ*, 19 : 57-96.

- Garay L.A., 1973. Systematics of the genus *Angraecum* (Orchidaceae). *Kew Bull.*, 28 (3) : 495-516.
- Geerinck D., 1992. Orchidaceae (seconde partie). In : *Flore d'Afrique centrale (Zaire, Rwanda, Burundi). Spermatophyte*. Bamps P. (éd.). Meise : Jardin Botanique National de Belgique : 297-780.
- Gentry A.H. & Dodson C.H., 1987. Diversity and Biogeography of Neotropical Vascular Epiphytes. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 74 (2) : 205-233.
- Ghosh S., Patil S., Ahire M., Kitture R., Gurav D.D., Jabgunde A.M., Kale S., Pardesi K., Shinde V. & Bellare J., 2012. *Gnidia glauca* flower extract mediated synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its chemocatalytic potential. *J. Nanobiotechnology*, 10 (1) : 17.
- Givnish T.J., Spalink D., Ames M., Lyon P.S., Hunter S.J., Zuluaga A., Iles W.J.D., Clements M.A., Arroyo M.T.K., Leebens-Mark J., Endara L., Kriebel R., Neubig K.M., Whitten W., Williams N.H. & Cameron K.M., 2015. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proc. R. Soc.*, 282 : 20151553.
- Givnish T.J., Spalink D., Ames M., Lyon S.P., Hunter S.J., Zuluaga A., Doucette A., Caro G.G., McDaniel J. & Clements M.A., 2016. Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *J. Biogeogr.*, 43 (10) : 1905-1916.
- Goldman D.H., Freudenstein J. V, Kores P.J., Molvray M., Jarrell D.C., Whitten W.M., Cameron K.M., Jansen R.K. & Chase M.W., 2001. Phylogenetics of Arethuseae (Orchidaceae) based on plastid matK and rbcL sequences. *Syst. Bot.*, 26 (3) : 670-695.
- Górniak M., Paun O. & Chase M.W., 2010. Phylogenetic relationships within Orchidaceae based on a low-copy nuclear coding gene, *Xdh*: Congruence with organellar and nuclear ribosomal DNA results. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 56 (2) : 784-795.
- Govaerts R., Bernet P., Kratochvil K., Gerlach G., Carr G., Alrich P., Pridgeon A.M., Pfahl J., Campacci M.A., Holland Baptista D., Tigges H., Shaw J., Cribb P.J., George A., Kreuz K. & Wood J., 2019. World Checklist of Orchidaceae., .
- Govaerts R., Bernet P., Kratochvil K., Gerlach G., Carr G., Alrich P., Pridgeon A.M., Pfahl J., Campacci M.A., Holland Baptista D., Tigges H., Shaw J., Cribb P.J., George A., Kreuz K. & Wood J., 2020. World Checklist of Orchidaceae. <http://wcsp.science.kew.org>.
- Govaerts R., Campaccil M.A., Baptista D.H., Cribb P.J., George A., Kreuz K. & Wood J., 2016. World checklist des orchidaceae. <http://www.kew.org/wcsp/>.
- Gravendeel B., Smithson A., Slik F.J.W. & Schuiteman A., 2004. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.*, 359 (1450) : 1523-1535.
- Le Guyader H., 2002. doit-on abandonner le concept d'espèce? *Le Courr. l'environnement l'INRA*, 46 : 51-64.
- Harvey Y., Pollard B.J., Darbyshire I., Onana J.-M. & Cheek M., 2004. *The Plants of Bali Ngemba Forest Reserve, Cameroon: A Conservation Checklist*. Harvey Y., Pollard B.J., Darbyshire I., Onana J.-M. & Cheek M. (éd.). Kew : Royal Botanic Gardens : 154 pp.
- Hegland S.J., Nielsen A., Lázaro A., Bjerknes A.L. & Totland Ø., 2009. How does climate warming affect plant-pollinator interactions? *Ecol. Lett.*, 12 : 184-195.
- Heinrichs J., Klugmann F., Hentschel J. & Schneider H., 2009. DNA taxonomy, cryptic speciation and diversification of the Neotropical-African liverwort, *Marchesinia brachiata* (Lejeuneaceae, Porellales). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 53 (1) : 113-121.
- Helmstetter A.J., Kamga S.M., Bethune K., Lautenschläger T., Zizka A., Bacon C.D., Wieringa J.J., Stauffer F., Antonelli A. & Sonké B., 2020. Unraveling the phylogenomic relationships of the most diverse African palm genus *Raphia* (Calamoideae, Arecaceae). *Plants*, 9 (4) : 549.
- Herlihy C.R. & Eckert C.G., 2002. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature*, 416 (6878) : 320-323.
- Hey J., 2006. On the failure of modern species concepts. *Trends Ecol. Evol.*, 16 (7) : 326-329.
- Heyduk K., Hwang M., Albert V.A., Silvera K., Lan T., Farr K.M., Chang T.H., Chan M.T., Winter K. & Leebens-Mack J., 2019. Altered Gene Regulatory Networks are Associated with the Transition from C3 to Crassulacean Acid Metabolism in *Erycina* (Oncidiinae: Orchidaceae). *bioRxiv*, 9 : 2000.
- Hill M.O. & Smith A.J.E., 1976. Principal component analysis of taxonomic data with multi-state discrete characters. *Taxon*, 25 (2/3) : 249-255.
- Hinsley A., De Boer H.J., Fay M.F., Gale S.W., Gardiner L.M., Gunasekara R.S., Kumar P., Masters S., Metusala D.,

- Roberts D.L., Veldman S., Wong S. & Phelps J., 2018. A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Bot. J. Linn. Soc.*, 186 (4) : 435-455.
- Hinsley A., Nuno A., Ridout M., John F.A.V.S. & Roberts D.L., 2017. Estimating the Extent of CITES Noncompliance among Traders and End-Consumers; Lessons from the Global Orchid Trade. *Conserv. Lett.*, 10 (5) : 602-609.
- Hollander M. & Wolfe D.A., 1973. Nonparametric Statistical Methods, 115-120.
- Holsinger K.E. & Thomson J.D., 1994. Pollen discounting in *Erythronium grandiflorum*: mass-action estimates from pollen transfer dynamics. *Am. Nat.*, 144 (5) : 799-812.
- Hörandl E. & Stuessy T.F., 2010. Paraphyletic groups as natural units of biological classification. *Taxon*, 59 (6) : 1641-1653.
- Hosomi S.T., Santos R.B., Custodio C.C., Seaton P.T., Marks T.R. & Machado-Neto N.B., 2011. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Sci. Technol.*, 39 : 178-189.
- Hosomi, Silvério T., Custódio C. C., Seaton, Philip T., Marks R. T. & Machado-Neto N. B., 2012. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *Vitr. Cell. Dev. Biol.*, 48 (1) : 127-136.
- Hu S., Dilcher D.L., Jarzen D.M. & Taylor D.W., 2008. Early steps of angiosperm-pollinator coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (1) : 240-245.
- Huda M.K. & Wilcock C.C., 2012. Rapid floral senescence following male function and breeding systems of some tropical orchids. *Plant Biol.*, 14 : 278-284.
- Huelsenbeck J.P. & Ronquist F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17 : 754-755.
- Ikabanga D.U., Stevart T., Koffi K.G., Monthe F.K., Doubindou E.C.N., Dauby G., Souza A., M'BATCHI B. & Hardy O.J., 2017. Combining morphology and population genetic analysis uncover species delimitation in the widespread African tree genus *Santiria* (Burseraceae). *Phytotaxa*, 321 (2) : 166-180.
- IPNI., 2020. International Plant Names Index. <http://www.ipni.org>.
- Isaac N.J.B., Mallet J. & Mace G.M., 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends Ecol. Evol.*, 19 (9) : 464-469.
- IUCN., 1996. *Orchids: Status survey and conservation action Plan*. E. Hagsäter and V. Dumont (éd.). Los Gatos : Graphic express : 153 pp.
- IUCN., 2001. IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1., ii+30 pp.
- IUCN., 2012. IUCN Red List Categories and Criteria : Version 3.1. second edition., 32.
- IUCN., 2014. Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 11, .
- IUCN., 2019. Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 14, 60.
- IUCN., 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1.
- Jarrell D.C. & Clegg M.T., 1995. Systematic implications of the chloroplast-encoded matK gene on the tribe Vandeeae (Orchidaceae). *Am. J. Bot.*, 82 : 137.
- Jenkins C.N., Pimm S.L. & Joppa L.N., 2013. Global patterns of terrestrial vertebrate diversity and conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110 (28) : E2602-E2610.
- Jersáková J., Johnson S.D. & Kindlmann P., 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biol. Rev.*, 81 (2) : 219-235.
- Joffard N., Massol F., Grenié M., Montgelard C. & Schatz B., 2019. Effect of pollination strategy, phylogeny and distribution on pollination niches of Euro-Mediterranean orchids. *J. Ecol.*, 107 : 478-490.
- Johnson L.A. & Ragusto R.A., 2016. The long-tongued hawkmoth pollinator niche for native and invasive plants in Africa. *Ann. Bot.*, 117 : 25-36.
- Johnson L.A. & Soltis D.E., 1994. Matk DNA-Sequences and Phylogenetic Reconstruction in Saxifragaceae S-Str. *Syst. Bot.*, 19 (1) : 143-156.
- Johnson S.D. & Anderson B., 2010. Coevolution between Food-Rewarding Flowers and Their Pollinators. *Evol. Educ. Outreach*, 3 : 32-39.
- Johnson S.D. & Edwards T.J., 2000. The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Syst. Evol.*, 222 (1) : 243-269.
- Johnson S.D., Moré M., Amorim F.W., Haber W.A., Frankie G.W., Stanley D.A., Cocucci A.A. & Raguso R.A., 2017.

- The long and the short of it: a global analysis of hawkmoth pollination niches and interaction networks. *Funct. Ecol.*, 31 (1) : 101-115.
- Johnson S.D. & Steiner K.E., 1997. Long-Tongued Fly Pollination and Evolution of Floral Spur Length in the *Disa draconis* Complex (Orchidaceae). *Evolution (N. Y.)*, 51 (1) : 45-53.
- Johnson S.D. & Steiner K.E., 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends Ecol. Evol.*, 15 (4) : 140-143.
- Karremans A.P., Pupulin F., Grimaldi D., Beentjes K.K., Butôt R., Fazzi G.E., Kaspers K., Kruizinga J., Roessingh P., Smets E.F. & Gravendeel B., 2015. Pollination of *Specklinia* by nectar-feeding *Drosophila*: The first reported case of a deceptive syndrome employing aggregation pheromones in Orchidaceae. *Ann. Bot.*, 116 (3) : 437-455.
- Katoh K. & Standley D.M., 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.*, 30 (4) : 772-780.
- Koopowitz H., 2001. *Orchids and their conservation* 176 pp.
- Koopowitz H., Lavarack P.S. & Dixon K.W., 2003. The nature of threats to orchid conservation. In : *Orchid conservation*. Dixon Kell S. P., Barrett R. L. and Cribb P. J. K.W. (éd.). Kota Kinabalu, Sabah : Natural History Publications (Borneo) : 25-42.
- Kores P.J., Cameron K.M., Molvray M. & Chase M.W., 1997. The phylogenetic relationships of Orchidoideae and Spiranthoideae (Orchidaceae) as inferred from rbcL plastid sequences. *Lindleyana*, 12 (1) : 1-11.
- Kores P.J., Weston P.H., Molvray M. & Chase M.W., 2000. Phylogenetic relationships within the Diurideae (Orchidaceae): inferences from plastid matK DNA sequences. In : *Monocots: systematics and evolution*. Wilson D. A. K.L. and M. (éd.). CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia : 449-456.
- Kress W.J., Prince L.M. & Williams K.J., 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. *Am. J. Bot.*, 89 (10) : 1682-1696.
- Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M., Senfeld T. & Calcott B., 2016. Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.*, 34 : 772-773.
- Lawler L.J., 1984. *Ethnobotany of the orchidaceae: review and perspective. Vol III*. Ithaca, Arditto J. (éd.). Cornell University press. : 27-149 pp.
- Lee C. & Wen J., 2003. Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC-trnD intergenic region and the utility of trnC-trnD in interspecific studies of plants. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31 (3) : 894-903.
- Lee M.S.Y., 2003. Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *J. Evol. Biol.*, 16 (2) : 179-188.
- Leon C. & Lin Y., 2017. *Chinese medicinal plants, herbal drugs and substitutes: an identification guide*. Kew : Kew Publishing : 816 pp.
- Lewis P.O., 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Syst. Biol.*, 50 (6) : 913-925.
- Li Y.X., Li Z.H., Schuitman A., Chase M.W., Li J.W., Huang W.C., Hidayat A., Wu S.S. & Jin X.H., 2019. Phylogenomics of Orchidaceae based on plastid and mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 139 : 106540.
- Linder H.P., de Klerk H.M., Born J., Burgess N.D., Fjeldså J. & Rahbek C., 2012. The partitioning of Africa: statistically defined biogeographical regions in sub-Saharan Africa. *J. Biogeogr.*, 39 (7) : 1189-1205.
- Lindley J., 1839. *Edwards's Botanical Register or Ornamental Flower-garden and shrubbery*. Piccadilly, London : James Ridgway and sons : 400 pp.
- Lindley J., 1840. *The genera and species of Orchidaceous plants*. London : Ridgways : 553 pp.
- Lissambou B., Couvreur T.L.P., Atteke C., Stévant T., Piñeiro R., Dauby G., Monthe F.K., Ikabanga D.U., Sonké B. & M'batchi B., 2019. Species delimitation in the genus *Greenwayodendron* based on morphological and genetic markers reveals new species. *Taxon*, 68 (3) : 442-454.
- Lubbers A.E. & Lechowicz M.J., 1989. Effects of leaf removal on reproductions vs. belowground storage in *Trillium grandiflorum*. *Ecology*, 70 (1) : 85-96.
- Luyt R. & Johnson S.D., 2001. Hawkmoth pollination of the African epiphytic orchid *Mystacidium venosum*, with special reference to flower and pollen longevity. *Plant Syst. Evol.*, 228 (1) : 49-62.
- Maddison W.P. & Maddison D.R., 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis Version 3.51, .
- Maisels F.G., Cheek M. & Wild C., 2000. Rare plants on Mount Oku summit, Cameroon. *ORYX*, 34 (2) : 136-140.

- Marler T.E., 2018. Host tree identity influences leaf nutrient relations of the epiphyte dendrobium guamense Ames. *Horticulturae*, 4 (4) : 43.
- Martins D.J. & Johnson S.D., 2007. Hawkmoth pollination of aerangoid orchids in kenya, with special reference to nectar sugar concentration gradients in the floral spurs. *Am. J. Bot.*, 94 (4) : 650-659.
- Martins D.J. & Johnson S.D., 2013. Interactions between hawkmoths and flowering plants in east africa: Polyphagy and evolutionary specialization in an ecological context. *Biol. J. Linn. Soc.*, 110 : 199-213.
- Martos F., Le Péchon T., Johnson S.D. & Bytebier B., 2018. A reassessment of Angraecopsis, Mystacidium and Sphyrarhynchus (Orchidaceae: Vandaeae) based on molecular and morphological evidence. *Bot. J. Linn. Soc.*, 186 (1) : 1-17.
- Mattila E. & Kuitunen M.T., 2000. Nutrient versus pollination limitation in Platanthera bifolia and Dactylorhiza incarnata (Orchidaceae). *Oikos*, 89 (2) : 360-366.
- Mayden R.L., 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. *Syst. Assoc. Spec. Vol.*, 54 : 381-424.
- Mayr E., 1982. *The growth of biological thought: diversity, evolution, and inheritance*. Cambridge, Massachussets : Belknap Press of Harvard University Press : 896 pp.
- Mbale K., Lukoki L. & Lejoly J., 2014. Phénologie et saisonnalité de la floraison sous-ombrière à Kinshasa des Orchidées de Mai-Ndombe en RDC. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 8 (5) : 2042-2052.
- McDonald J.H., 2014. *Handbook of Biological Statistics (3rd ed.)*. Baltimore, Maryland : Sparky House Publishing : 296 pp.
- McKey D. & Hossaert-McKey M., 2008. La coévolution entre les plantes et les animaux. *Aux Orig. des Plantes. Fayard, Paris*, 482-505.
- Meléndez-Ackerman E.J., Ackerman J.D. & Rodríguez-Robles J.A., 2000. Reproduction in an orchid can be resource-limited over its lifetime. *Biotropica*, 32 (2) : 282-290.
- de Mendiburu F. & de Mendiburu M.F., 2019. Package 'agricolae'. *R Packag. Version*, 1-2.
- Menz M.H.M., Phillips R.D., Anthony J.M., Bohman B., Dixon K.W. & Peakall R., 2015. Ecological and genetic evidence for cryptic ecotypes in a rare sexually deceptive orchid, *Drakaea elastica*. *Bot. J. Linn. Soc.*, 177 (1) : 124-140.
- Menzepoh S.B., 2011. Les orchidées comestibles chez le peuple Bagam, au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.*, 15 (4) : 509-514.
- Merritt D.J. & Dixon K.W., 2011. Restoration seed banks—a matter of scale. *Science (80-.)*, 332 (6028) : 424-425.
- Metsare M., Ilves A., Haldna M., Kull T. & Tali K., 2015. Four seed-quality measures in orchids with different pollination systems. *Acta Bot. Gall.*, 162 (4) : 263-269.
- Micheneau C., Carlsward B.S., Fay M.F., Bytebier B., Pailler T. & Chase M.W., 2008a. Phylogenetics and biogeography of Mascarene angraecoid orchids (Vandaeae, Orchidaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 46 (3) : 908-922.
- Micheneau C., Fournel J., Gauvin-Bialecki A. & Pailler T., 2008b. Auto-pollination in a long-spurred endemic orchid (*Jumellea stenophylla*) on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Plant Syst. Evol.*, 272 (1) : 11-22.
- Micheneau C., Fournel J. & Pailler T., 2006. Bird pollination in an angraecoid orchid on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Ann. Bot.*, 97 (6) : 965-974.
- Micheneau C., Fournel J., Warren B.H., Hugel S., Gauvin-Bialecki A., Pailler T., Strasberg D. & Chase M.W., 2010. Orthoptera, a new order of pollinator. *Ann. Bot.*, 105 (3) : 355-364.
- Micheneau C., Johnson S.D. & Fay M.F., 2009. Orchid pollination: from Darwin to the present day. *Bot. J. Linn. Soc.*, 161 (1) : 1-19.
- Miller M.A., Pfeiffer W. & Schwartz T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *In* : Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010. : 1-8.
- Missoup A.D., Nicolas V., Eiseb S., Chung E.K. & Denys C., 2016. Phylogenetic position of the endemic Mount Oku rat, *Lamottemys okuensis* (Rodentia: Muridae), based on molecular and morphological data. *Zool. J. Linn. Soc.*, 177 (1) : 209-226.
- Molvray M.P., Kores J. & Chase M.W., 2000. Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters. *In* : *Monocots: systematics and evolution*. Morrison K.L.W. and D.A.

- (éd.). Melbourne, Australia : CSIRO Publishing : 441-448.
- Momo S.M.C., Kamga Y.B., Nguetsop V.F., Tiokeng B., Avana - Tientcheu M.L. & Kemeuze V.A., 2017. Diversité Floristique Et Variation Altitudinale De La Structure Des Formations A Gnidia Glauca (Fresen) Gilg. Dans Les Forêts Communautaires De Kilumijim (Nord-Ouest Cameroun). *Eur. Sci. Journal, ESJ*, 13 (6) : 17-37.
- Mondragon D., Valverde T. & HERNÁNDEZ-APOLINAR M., 2015. Population ecology of epiphytic angiosperms: A review. *Trop. Ecol.*, 56 (1) : 1-39.
- Montalvo A.M. & Ackerman J.D., 1987. Limitations to Fruit Production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica*, 19 : 24–31.
- Monthe F.K., Duminiel J., Kasongo Yakusu E., Beeckman H., Bourland N., Doucet J.L., Sosef M.S.M. & Hardy O.J., 2018. The African timber tree *Entandrophragma congoense* (Pierre ex De Wild.) A.Chev. is morphologically and genetically distinct from *Entandrophragma angolense* (Welw.) C.DC. *Tree Genet. Genomes*, 14 (5) : 1-13.
- Moore R., 1985. *Handbook on tetrazolium testing*. Zurich, Switzerland : ISTA : 99 pp.
- MSBP., 2020. Millennium Seed Bank Partnership. <http://brahmsonline.kew.org/msbp>.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A.B. & Kent J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403 (6772) : 853-858.
- Neal P.R. & Anderson G.J., 2005. Are « mating systems » « breeding systems » of inconsistent and confusing terminology in plant reproductive biology? Or is it the other way around? *Plant Syst. Evol.*, 250 : 173-185.
- Neiland M.R.M. & Wilcock C.C., 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *Am. J. Bot.*, 85 (12) : 1657-1671.
- Neto N.B.M. & Custódio C.C., 2005. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. *Selbyana*, 26 (1/2) : 316-317.
- Netz C. & Renner S.S., 2017. Long-spurred *Angraecum* orchids and long-tongued sphingid moths on madagascar: A time frame for Darwin's predicted *Xanthopan/Angraecum* coevolution. *Biol. J. Linn. Soc.*, 122 (2) : 469-478.
- Neubig K.M., Whitten W.M., Carlsward B.S., Blanco M.A., Endara L., Williams N.H. & Moore M., 2009. Phylogenetic utility of *ycf1* in orchids: A plastid gene more variable than *matK*. *Plant Syst. Evol.*, 277 (1) : 75-84.
- Neyland R. & Urbatsch L.E., 1995. A terrestrial origin for the Orchidaceae suggested by a phylogeny inferred from *ndhF* chloroplast gene sequences. *Lindleyana*, 10 : 244-251.
- Neyland R. & Urbatsch L.E., 1996a. Phylogeny of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae) inferred from *ndhF* chloroplast gene sequences. *Am. J. Bot.*, 83 (9) : 1195-1206.
- Nguembou Kamgang C., 2008. Révision taxonomique du genre *Bertiera* (Rubiaceae) en Afrique: phylogénie, distribution, écologie et taxonomie. Université libre de Bruxelles, 216 p.
- Niesenbaum R.A., 1996. Linking herbivory and pollination: defoliation and selective fruit abortion in *Lindera benzoin*. *Ecology*, 77 (8) : 2324-2331.
- van der Niet T., A. J. & Johnson S.D., 2015. Is the timing of scent emission correlated with insect visitor activity and pollination in long-spurred *Satyrion* species? *Plant Biol.*, 17 (1) : 226–237.
- Van Der Niet T., Hansen D.M. & Johnson S.D., 2011. Carrion mimicry in a South African orchid: Flowers attract a narrow subset of the fly assemblage on animal carcasses. *Ann. Bot.*, 107 (6) : 981-992.
- Nilsson L.A., 1992. Orchid pollination biology. *Trends Ecol. Evol.*, 7 (8) : 255-259.
- Nilsson L.A., 1998. Deep flowers for long tongues. *Trends Ecol. Evol.*, 13 (7) : 259-260.
- Nilsson L.A., Johnsson L., Ralison L. & Randrianjohany E., 1987. *Angraecoid* orchids and hawkmoths in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica*, 310-318.
- Nilsson L.A., Jonsson L., Rason L. & Randrianjohany E., 1985. Monophily and pollination mechanisms in *Angraecum arachnites* Schltr.(Orchidaceae) in a guild of long-tongued hawk-moths (Sphingidae) in Madagascar. *Biol. J. Linn. Soc.*, 26 (1) : 1-19.
- Nilsson L.A. & Rabakonandrianina E., 1988. Hawk-moth scale analysis and pollination specialization in the epilithic Malagasy endemic *Aerangis ellisii* (Reichenb. fil.) Schltr.(Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 97 (1) : 49-61.
- Nsom C.L. & Dick J., 1992. *An ethnobotanical tree survey of the Kom area*.
- Nunes C.E.P., Amorim F.W., Mayer J.L.S. & Sazima M., 2016. Pollination ecology of two species of *Elleanthus*

- (Orchidaceae): Novel mechanisms and underlying adaptations to hummingbird pollination. *Plant Biol.*, 18 (1) : 15-25.
- OCA., 2017. The orchid conservation alliance. <https://orchidconservationalliance.org/>.
- Ollerton J., Alarcon R., Waser N.M., Price M. V., Watts S., Cranmer L., Hingston A., Peter C.I. & Rotenberry J., 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Ann. Bot.*, 103 (9) : 1471-1480.
- Ollerton J., Rech A.R., Waser N.M. & Price M. V., 2015. Using the literature to test pollination syndromes—Some methodological cautions. *J. Pollinat. Ecol.*, 16 (17) : 119-125.
- Onana J.M., Cheek M. & Pollard B.J., 2011. *Red data book of the flowering plants of Cameroon*. Royal Botanic Gardens, Kew : .
- Ornduff R., 1969. Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon*, 18 (2) : 121-133.
- Oxelman B., Liden M. & Berglund D., 1997. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Syst. Evol.*, 206 (1-4) : 393-410.
- Pace M.C., Giraldo G., Frericks J., Lehnebach C.A. & Cameron K.M., 2019. Illuminating the systematics of the *Spiranthes sinensis* species complex (Orchidaceae): ecological speciation with little morphological differentiation. *Bot. J. Linn. Soc.*, 189 (1) : 36-62.
- Pace M.C., Orzell S.L., Bridges E.L. & Cameron K.M., 2017. *Spiranthes igniorchis* (Orchidaceae), a new and rare cryptic species from the south-central Florida subtropical grasslands. *Brittonia*, 69 : 323-339.
- Pandey A.K., Dwivedi M.D. & Gholami A., 2016. Reproductive Biology Data in Plant Systematics—An Overview. *Int. J. Plant Reprod. Biol.*, 8 (1) : 65-74.
- Pansarin E.R. & Ferreira A.W.C., 2015. Butterfly pollination in *Pteroglossa* (Orchidaceae, Orchidoideae): a comparative study on the reproductive biology of two species of a Neotropical genus of *Spiranthisinae*. *J. Plant Res.*, 128 (3) : 459-468.
- Pant S. & Rinchen T., 2012. *Dactylorhiza hatagirea*: A high value medicinal orchid. *J. Med. plants Res.*, 6 (19) : 3522-3524.
- Pauw A. & Hawkins J.A., 2011. Reconstruction of historical pollination rates reveals linked declines of pollinators and plants. *Oikos*, 120 (3) : 344-349.
- Pavlinov I., 2013. *The Species Problem. Ongoing Issues*. Pavlinov I. (éd.). Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia : 290 pp.
- Peakall R. & Whitehead M.R., 2014. Floral odour chemistry defines species boundaries and underpins strong reproductive isolation in sexually deceptive orchids. *Ann. Bot.*, 113 (2) : 341-355.
- Pellegrino G. & Bellusci F., 2014. Effects of human disturbance on reproductive success and population viability of *Serapias cordigera* (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 176 (3) : 408-420.
- Perez-Vera F., 2003. *Les Orchidées de Côte D'Ivoire*. Mèze, France : Collection Parthénope, éditions Biotope : 576 pp.
- Pessoa E.M., Viruel J., Alves M., Bogarín D., Whitten W.M. & Chase M.W., 2018. Evolutionary history and systematics of *Campylocentrum* (Orchidaceae: Vandaeae: Angraecinae): a phylogenetic and biogeographical approach. *Bot. J. Linn. Soc.*, 186 (2) : 158-178.
- Peter C.I., 2009. Pollination, floral deception and evolutionary processes in *Eulophia* (Orchidaceae) and its allies, 193.
- Peter C.I. & Johnson S.D., 2013. Generalized food deception: Colour signals and efficient pollen transfer in bee-pollinated species of *Eulophia* (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, .
- Peter C.I. & Johnson S.D., 2014. A pollinator shift explains floral divergence in an orchid species complex in South Africa. *Ann. Bot.*, 113 (2) : 277-288.
- Peter C.I. & Venter N., 2017. Generalist, settling moth pollination in the endemic South African twig epiphyte, *Mystacidium pusillum* Harv. (Orchidaceae). *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants*, 232 : 16-21.
- Petit R.J. & Excoffier L., 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends Ecol. Evol.*, 24 (7) : 386-393.
- Pfitzer E.H.H., 1887. *Entwurf einer natürlichen Anordnung der Orchideen*. Carl Winter's Universitätsbuchhandlung, Heidelberg : 114 pp.
- Phillips D.P. & Bytebier B., 2020. A morphometric and molecular phylogenetic analysis of the African orchid genus *Stenoglottis* (Orchidaceae: Orchidoideae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 193 (3) : 340-362.
- Phillips R.D., Peakall R., Retter B.A., Montgomery K., Menz M.H.M., Davis B.J., Hayes C., Brown G.R., Swarts N.D.

- & Dixon K.W., 2015. Pollinator rarity as a threat to a plant with a specialized pollination system. *Bot. J. Linn. Soc.*, 179 (3) : 511-525.
- Phillips R.D., Reiter N. & Peakall R., 2020. Orchid conservation: from theory to practice. *Ann. Bot.*, 126 : 345-362.
- Phillips R.D., Scaccabarozzi D., Retter B.A., Hayes C., Brown G.R., Dixon K.W. & Peakall R., 2014. Caught in the act: Pollination of sexually deceptive trap-flowers by fungus gnats in *Pterostylis* (Orchidaceae). *Ann. Bot.*, 113 (4) : 629-641.
- Pijl L. & Dodson H., 1969. Orchid flowers. Their pollination and evolution. *Univ. Miami*, 214.
- Pillon Y. & Chase M.W., 2007. Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. *Conserv. Biol.*, 21 (1) : 263-265.
- Piña-Rodrigues F.C. F.M.B. and P.M., 2004. Quality test. *In* : *Germination-from the basic to the applied*. Porto Alegre : Art med : 283-297.
- Pinhey E.C., 1962. *Hawkmoths of central and southern Africa*. Cape Town : Longmans : 139 pp.
- Potter D. & Freudenstein J. V., 2005. Character-based phylogenetic Linnaean classification: taxa should be both ranked and monophyletic. *Taxon*, 54 (4) : 1033-1035.
- Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O. & Kunin W.E., 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.*, 25 (6) : 345-353.
- Poulsen A.D. & Nordal I., 2005. A phenetic analysis and revision of Guineo-Congolese rain forest taxa of Chlorophytum (Anthericaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 148 (1) : 1-20.
- Pratt D.B. & Clark L.G., 2001. *Amaranthus rudis* and *A. tuberculatus*, one species or two? *J. Torrey Bot. Soc.*, 282-296.
- Pridgeon A.M. & Chase M.W., 1998. Phylogenetics of subtribe Catasetinae (Orchidaceae) from nuclear and chloroplast DNA sequences. *In* : Proceedings of the 15th World Orchid Conference. Pereira C.E.B. (éd.) : 275-281.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N., 1999. *Genera Orchidacearum. Volume 1: General Introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae*. M. P.A., J. C.P., W. C.M. & N. R.F. (éd.). Oxford : Oxford University Press : 230 pp.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N., 2001. *Genera Orchidacearum. Volume 2: Orchidoideae (Part 1)*. M. P.A., J. C.P., W. C.M. & N. R.F. (éd.). Oxford : Oxford University Press : 438 pp.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N., 2003. *Genera Orchidacearum. Volume 3: Orchidoideae (Part 2): Vanillaioideae*. Oxford : Oxford University Press : 378 pp.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N., 2005. *Genera Orchidacearum. Volume 4: Epidendroideae (Part 1)*. Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N. (éd.). Oxford : Oxford University Press : 696 pp.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N., 2009. *Genera Orchidacearum. Volume 5: Epidendroideae (Part 2)*. Oxford : Oxford University Press : 612 pp.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W. & Rasmussen F.N., 2014. *Genera Orchidacearum, Volume 6: Epidendroideae (Part 3)*. Oxford : Oxford University Press : 576 pp.
- Primack R. & Stacy E., 1998. Cost of reproduction in the pink lady's slipper orchid (*Cypripedium acaule*, Orchidaceae): an eleven-year experimental study of three populations. *Am. J. Bot.*, 85 (12) : 1672-1679.
- Primack R.B., 1985. Longevity of individual flowers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 16 : 15-37.
- Primack R.B. & Hall P., 1990. Costs of reproduction in the pink lady's slipper orchid: a four-year experimental study. *Am. Nat.*, 136 (5) : 638-656.
- Proctor H.C. & Harder L.D., 1994. Pollen load, capsule weight, and seed production in three orchid species. *Can. J. Bot.*, 72 (2) : 249-255.
- R Core Team., 2020. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.r-project.org>.
- R Core Team., 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>. Accessed 10 March 2019.
- Raguso R.A., Levin R.A., Foose S.E., Holmberg M.W. & McDade L.A., 2003. Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination « syndromes » in *Nicotiana*. *Phytochemistry*, 63 (3) : 265-284.
- Rakotoarivelo F.P., Razafimandimbison S.G., Mallet B., Faliniaina L. & Pailler T., 2012. Molecular systematics and evolutionary trends and relationships in the genus *Jumellea* (Orchidaceae): Implications for its species

- limits. *Taxon*, 61 (3) : 534-544.
- Rambaut A., 2016. FigTree v1. 4.3. *Mol. Evol. phylogenetics Epidemiol.* 2016, .
- Rankou H. & Kumar P., 2015. *Paphiopedilum fairrieanum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T43320321A43327829, .
- Rasmussen F.N., 1985. Orchids. *In* : *The families of the monocotyledons*. Dahlgren R. M. T. C.H.T. and Y.P.F. (éd.). Springer-Verlag, Berlin : 249-274.
- Raven P.H., Gereau R.E., Phillipson P.B., Chatelain C., Jenkins C.N. & Ulloa C.U., 2020. The distribution of biodiversity richness in the tropics. *Sci. Adv.*, 6 (37) : eabc6228.
- Reichenbach H.G., 1878. New garden plants. *Gard. Chron. Agric. Gaz.*, 1 : 138.
- Reiter N., Vlcek K., O'Brien N., Gibson M., Pitts D., Brown G.R., Bower C.C. & Phillips R.D., 2017. Pollinator rarity limits reintroduction sites in an endangered sexually deceptive orchid (*Caladenia hastata*): Implications for plants with specialized pollination systems. *Bot. J. Linn. Soc.*, 184 : 122-136.
- Renner S.S., 2006. Rewardless flowers in the angiosperms and the role of insect cognition in their evolution. *In* : *Plant-Pollinator Interactions from Specialization to Generalization*. Waser Ollerton, J. N.M. (éd.). Chicago, Illinois : The University of Chicago Press : 123-144.
- Reydon T.A.C., 2004. Why does the species problem still persist? *BioEssays*, 26 (3) : 300-305.
- Rice R., 2005. *A preliminary checklist and survey of the subtribe Aerangidinae*. Dora Creek : Oasis The Journal Publishing Department : 51 pp.
- Robbitt K.M., Davy A.J., Hutchings M.J. & Roberts D.L., 2011. Validation of biological collections as a source of phenological data for use in climate change studies: A case study with the orchid *Ophrys sphegodes*. *J. Ecol.*, 99 : 763-771.
- Roberts D.L., 2003. Pollination biology: the role of sexual reproduction in orchid conservation. *In* : *Orchid conservation*. Dixon Kell S. P., Barrett R. L. and Cribb P. J. K.W. (éd.). Kota Kinabalu, Sabah : Natural History Publications : 113-136.
- Roberts D.L. & Dixon K.W., 2008. Orchids. *Curr. Biol.*, 18 (8) : R325-R329.
- Rodríguez-Gironés M.A. & Llandres A.L., 2008. Resource competition triggers the co-evolution of long tongues and deep corolla tubes. *PLoS One*, 3 (8) : e2992.
- Rodríguez-Gironés M.A. & Santamaría L., 2006. Models of optimal foraging and resource partitioning: Deep corollas for long tongues. *Behav. Ecol.*, 17 (6) : 905-910.
- Rodríguez-Gironés M.A. & Santamaría L., 2007. Resource competition, character displacement, and the evolution of deep corolla tubes. *Am. Nat.*, 170 (3) : 455-464.
- Rokni S., Matimele H.A., Alves M.T., Chelene I., Darbyshire I., Datizua C., De Sousa C., Langa C., Massingue A.O., Mucaleque P.A., Odorico D., Osborne J., Rulkens A.J.H., Timberlake J. & Viegas A., 2018. *Cyrtorchis glaucifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T120961124A120980358. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T120961124A120980358.en>.
- Rolfe R.A., 1912. *Listrostachys O'brieniana*. *Orchid Rev.*, 20 : 281-284.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A. & Huelsenbeck J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.*, 61 (3) : 539-542.
- Rothchild L.W. & Jordan K., 1903. A revision of the lepi- dopterous family Sphingidae. *Novit. Zool.*, 9 (Suppl.) : 1-972.
- Rousseau-Gueutin M., Keller J., De Carvalho J.F., Aïnouche A. & Martin G., 2018. The intertwined chloroplast and nuclear genome coevolution in plants. *In* : *Plant Growth and Regulation-Alterations to Sustain Unfavorable Conditions*. IntechOpen : .
- Royston J.P., 1982. An extension of Shapiro and Wilk's W test for normality to large samples. *Appl. Stat.*, 31 : 115-124.
- Russell A., 2010. Molecular phylogeny, genome evolution and biogeography of *Polystachya* (Orchidaceae). Universität Wien, Austria, 167 p.
- Russell A., Samuel R., Bogarín D., Fernando S., Wijesundera S., Klejna V. & Chase M.W., 2011. Genetic variation and phylogenetic relationships of a pantropical species group in *Polystachya* (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 165 (3) : 235-250.

- Russell A., Samuel R., Klejna V., Barfuss M.H.J., Rupp B. & Chase M.W., 2010. Reticulate evolution in diploid and tetraploid species of *Polystachya* (Orchidaceae) as shown by plastid DNA sequences and low-copy nuclear genes. *Ann. Bot.*, 106 (1) : 37-56.
- Ryan A., Whitten W.M., Johnson M.A.T. & Chase M.W., 2000. A phylogenetic assessment of *Lycaste* and *Anguloa* (Orchidaceae: Maxillarieae). *Lindleyana*, 15 (1) : 33-45.
- Sainge M.N., 2012. Systematics and Ecology of Thismiaceae of Cameroon. University of Buea, 110 p.
- Sainge M.N., 2016. Patterns of distribution and Endemism of Plants in the Cameroon Mountains: A case study of Protected Areas in Cameroon: Rumpi Hills Forest Reserve (RHFR) and the Kimbi Fungom National Park (KFPN). 171 p.
- Sainge M.N., Franke T. & Agerer R., 2005. A new species of *Afrothismia* (Burmanniaceae, tribe Thismieae) from Korup National Park, Cameroon. *Willdenowia*, 35 (2) : 287-291.
- Sainge M.N., Onana J.-M., Nchu F., Kenfack D. & Peterson A.T., 2017. Botanical sampling gaps across the Cameroon Mountains. *Biodivers. Informatics*, 12.
- Sainge S N, Franke T., Merckx V. & Onana J.M., 2010. Distribution of myco-heterotrophic (saprophytic) plants of Cameroon. In : *Systematics and conservation of African plants*. van der Burgt X., van der Maesen J., Onana J.-M. (éd.). Kew : Royal Botanic Gardens : 279-286.
- Scarcelli N., Mariac C., Couvreur T.L.P., Faye A., Richard D., Sabot F., Berthouly-Salazar C. & Vigouroux Y., 2016. Intra-individual polymorphism in chloroplasts from NGS data: where does it come from and how to handle it? *Mol. Ecol. Resour.*, 16 (2) : 434-445.
- Schatz B., Hossaert-McKey M. & Kjellberg F., 2013. Chapitre 36. Histoire évolutive et diversité des interactions insectes pollinisateurs-plantes. In : *Interactions insectes-plantes*. Sauvion N. & Paul-André Calatayud, Denis Thiéry F.M.-P. (éd.) 565-576.
- Schiestl F.P. & Johnson S.D., 2013. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends Ecol. Evol.*, 28 (5) : 307-315.
- Schlechter R., 1914. *Die Orchideen: ihre Beschreibung, Kultur und Züchtung Orchideenliebhaber, Züchter und Botaniker*. 1^{re} éd. Berlin : P. Parey : 595 pp.
- Schlechter R., 1926. Das system der Orchidaceen. *Notizblatt des Bot. Gartens und Museums zu Berlin-Dahlem*, 9 : 563-591.
- Scopece G., Cozzolino S. & Bateman R.M., 2010. Just what is a genus? Comparing levels of postzygotic isolation to test alternative taxonomic hypotheses in Orchidaceae subtribe Orchidinae. *Taxon*, 59 (6) : 1754-1764.
- Seaton P., Kendon J.P., Pritchard H.W., Puspitaningtyas D.M. & Marks T.R., 2013. Orchid conservation: the next ten years. *Lankesteriana*, 13 (1-2) : 93-101.
- Seaton P.T., Hosomi S.T., Custódio C.C., Marks T.R., Machado-Neto N.B. & Pritchard H.W., 2018. Orchid Seed and Pollen: A Toolkit for Long-Term Storage, Viability Assessment and Conservation. In : *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols*. New York, NY : Humana Press New York, NY : 71-98.
- Seaton P.T., Hu H., Perner H. & Pritchard H.W., 2010. Ex situ conservation of orchids in a warming world. *Bot. Rev.*, 76 (2) : 193-203.
- Seaton P.T. & Pritchard H.W., 2003. Orchid germplasm collection, storage and exchange. In *Orchid conservation . Nat. Hist. Publ. Borneo, Kota Kinabalu.*, 227-258.
- Senapathi D., Biesmeijer J.C., Breeze T.D., Kleijn D., Potts S.G. & Carvalheiro L.G., 2015. Pollinator conservation - The difference between managing for pollination services and preserving pollinator diversity. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 12 : 93-101.
- Simo-Droissart M., Plunkett G.M., Droissart V., Edwards M.B., Farminhão J.N.M., Ječmenica V., D'hajjère T., Lowry P.P., Sonké B., Micheneau C., Carlswald B.S., Azandi L., Verlynde S., Hardy O.J., Martos F., Bytebier B., Fischer E. & Stévant T., 2018a. New phylogenetic insights toward developing a natural generic classification of African angraecoid orchids (Vandaeae, Orchidaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 126 : 241-249.
- Simo-Droissart M., Sonké B., Droissart V., Micheneau C., Lowry P.P., Plunkett G., Hardy O. & Stévant T., 2013. Morphometrics and molecular phylogenetics of the continental African species of *Angraecum* section *Pectinaria* (Orchidaceae). *Plant Ecol. Evol.*, 146 (3) : 295-309.
- Simo-Droissart M., Sonké B., Droissart V., Micheneau C., Lowry P.P., Hardy O.J., Plunkett G.M. & Stévant T., 2016. Morphometrics and molecular phylogenetics of *Angraecum* section *Dolabrifolia* (Orchidaceae,

- Angraecinae). *Plant Syst. Evol.*, 302 (8) : 1027-1045.
- Simo-Droissart M., Sonké B., Droissart V. & Stévert T., 2018b. Afropectinariella (Vandaeae, Orchidaceae), a new genus of the Angraecum alliance. *PhytoKeys*, (96) : 79.
- Simo-Droissart M., Stévert T., Sonké B. & Droissart V., 2020. Rare and Threatened Orchids of Central Africa Part 2. *Lindleyana*, 89 : 820-827.
- Simo-Droissart M., Stévert T., Sonké B. & Droissart V., 2020. Rare and Threatened Orchids of Central Africa Part 1. *Lindleyana*, 89 : 484-490.
- Simo M., 2014. Etude taxonomique et phylogénétique de deux sections du genre *Angraecum* (Orchidaceae) en Afrique continentale et dans les îles du Golfe de Guinée. Université de Yaoundé I, 293 p.
- Singer R.B. & Sazima M., 2001. Flower morphology and pollination mechanism in three sympatric Goodyerinae orchids from southeastern Brazil. *Ann. Bot.*, 88 (6) : 989-997.
- Sletvold N. & Ågren J., 2015. Climate-dependent costs of reproduction: Survival and fecundity costs decline with length of the growing season and summer temperature. *Ecol. Lett.*, 18 : 357-364.
- Sneath P.H.A. & Sokal R.R., 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
- So J. & Lee N., 2020. Phylogenetic analysis of *Neottia japonica* (Orchidaceae) based on ITS and matK regions. *Korean J. Plant Taxon.*, 50 (4) : 385-394.
- Sokal R.R. & Rohlf F.J., 1995. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition*. New York : WH Freeman and company : 887 p pp.
- Sosef M.S.M., 1997. Hierarchical models, reticulate evolution and the inevitability of paraphyletic supraspecific taxa. *Taxon*, 46 (1) : 75-85.
- Sosef M.S.M., Dauby G., Blach-Overgaard A., Van Der Burgt X., Catarino L., Damen T., Deblauwe V., Dessein S., Dransfield J. & Droissart V., 2017. Exploring the floristic diversity of tropical Africa. *BMC Biol.*, 15 (1) : 1-23.
- Sosef M.S.M., Engledow H. & Meerts P., 2020. *Classification botanique et nomenclature une introduction* —. Meise : Jardin botanique de Meise : 72 pp.
- Sreekala A.K., 2017. Importance of plant reproductive biology in conservation. In : National conference on Bioresources: conservation, utilization and future prospects at GRI-DU. : 16-17.
- Stamatakis A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30 (9) : 1312-1313.
- Stephenson A.G., 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 12 (1) : 253-279.
- Stévert T., 2003. Etude taxonomique, écologique et phytogéographique des Orchidaceae en Afrique centrale atlantique. Université Libre de Bruxelles, 225 p.
- Stévert T., Akouangou E., Andriamahefarivo L., Azandi L., Bakita B., Biteau J., Mayogo S., Nyangala C., Oliveira F. De, Rajaonarivelo N., Rakotoarivony F., Ramandimbisoa B., Randrianasolo A., Razafindramanana J., Razanatsima A.A., Simo-droissart M., Verlynde S., Williams T. & Droissart V., 2020. The Missouri Botanical Garden. In : *World Orchid Collections*. Hermans J., Hermans C., Linsky J. & Li C.W. (éd.). Tainan, Taiwan : Taiwan Orchid Growers Association : 26-43.
- Stévert T., Dauby G., Lowry P., Blach-Overgaard A., Droissart V., Harris D.J., Mackinder A.B., Schatz G.E., Sonké B., Sosef M.S.M., Svenning J.C., Wieringa J. & Couvreur T.L.P., 2019. A third of the tropical African flora is potentially threatened with extinction. *Sci. Adv.*, 5 (11) : eaax9444.
- Stévert T., Delepierre G., Lebel J.P. & Geerinck D., 2010. Les Orchidaceae du Parc National de Nyungwe (Rwanda). In : *Systématique et Conservation des Plantes Africaines*. van der Maesen L.J.G. & Onana J.-M. (éd.). Kew, Richmond : Royal Botanic Gardens : 91-100.
- Stewart J., Hermans J. & Campbell B., 2006. *Angraecoid Orchids: Species from the African Region*. Portland, Oregon : Timber Press : 432 pp.
- Stewart K.M., 2003. The African cherry (*Prunus africana*): can lessons be learned from an over-exploited medicinal tree? *J. Ethnopharmacol.*, 89 (1) : 3-13.
- Suetsugu K., Kawakita A. & Kato M., 2015a. Avian seed dispersal in a mycoheterotrophic orchid *Cyrtosia septentrionalis*. *Nat. Plants*, 1 (5) : 1-2.
- Suetsugu K., Naito R.S., Fukushima S., Kawakita A. & Kato M., 2015b. Pollination system and the effect of inflorescence size on fruit set in the deceptive orchid *Cephalanthera falcata*. *J. Plant Res.*, 128 (4) : 585-594.

- Sugiura N., 2013. Specialized pollination by carpenter bees in *Calanthe striata* (Orchidaceae), with a review of carpenter bee pollination in orchids. *Bot. J. Linn. Soc.*, 171 (4) : 730-743.
- Summerhayes V.S., 1936. Orchidaceae. In : *Flora of West Tropical Africa, the British West African colonies, British Camerons, the French and Portuguese colonies south of the tropic of cancer to lake Chad, and Fernando Po*. Hutchinson J. & Dalziel J.M. (éd.). Crown agents for the colonies, London : 400-463.
- Summerhayes V.S., 1948. African Orchids: XVIII. *Kew Bull.*, 3 (2) : 277-302.
- Summerhayes V.S., 1960. African Orchids: XXVII. *Kew Bull.*, 14 (1) : 126-157.
- Sun M., Gross K. & Schiestl F.P., 2014. Floral adaptation to local pollinator guilds in a terrestrial orchid. *Ann. Bot.*, 113 (2) : 289-300.
- Sun M., Schlüter P.M., Gross K. & Schiestl F.P., 2015. Floral isolation is the major reproductive barrier between a pair of rewarding orchid sister species. *J. Evol. Biol.*, 28 (2015) : 117-129.
- Swartz N.D. & Dixon K.W., 2009. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends Plant Sci.*, 14 (11) : 590-598.
- Szlachetko D.L., 2003. Gynostemia Orchidaliium – Vol. 3. *Acta Bot. Fenn.*, 3 : 233-236.
- Szlachetko D.L. & Olszewski T.S., 2001. Orchidacées 3. In : *Flore du Cameroun 36*. Achoundong G. & Morat P. (éd.). MNHN, Paris - Herbar National, Yaoundé : 666-948.
- Szlachetko D.L. & Rutkowski P., 2000. Gynostemia Orchidaliium – Vol. 1 Apostasiaceae, Cyripediaceae, Orchidaceae (Thelymitroideae-Vanilloideae). *Acta Bot. Fenn.*, 169 : 1-380.
- Szlachetko D.L., Tukałło P., Mytnik-Ejsmont J. & Grochocka E., 2013. Reclassification of the Angraecum-alliance (Orchidaceae, Vandoideae) based on molecular and morphological data. *Biodivers. Res. Conserv.*, 29 (1) : 1-23.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J., 1991. Universal Primers for Amplification of 3 Noncoding Regions of Chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, 17 (5) : 1105-1109.
- Tanko M.U. & Hassan U.T., 2016. Leaf area determination for maize (*Zea mays* L), okra (*Abelmoschus esculentus* L) and cowpea (*Vigna unguiculata* L) crops using linear measurements. *J. Biol. Agric. Healthc.*, 6 (4) : 103-111.
- Systematics Association Committee for Descriptive Biological Terminology, 1962a. II. Terminology of simple symmetrical plane shapes (Chart 1). *Taxon*, 11 (5) : 145-156.
- Systematics Association Committee for Descriptive Biological Terminology, 1962b. IIa, Terminology of simple symmetrical plane shapes (Chart 1a), addendum. *Taxon*, 11 (8) : 245-247.
- Texier N., Deblauwe V., Stévant T., Sonke B., Simo-Droissart M., Azandi L., Bose R., Djuikouo M.-N., Kamdem G. & Kamdem N., 2018. Spatio-temporal patterns of orchids flowering in Cameroonian rainforests. *Int. J. Biometeorol.*, 62 (11) : 1931-1944.
- Thien L.B., Bernhardt P., Devall M.S., Chen Z.D., Luo Y.B., Fan J.H., Yuan L.C. & Williams J.H., 2009. Pollination biology of basal angiosperms (ANITA grade). *Am. J. Bot.*, 96 (1) : 166-182.
- Thiers B., 2016. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff, .
- Thiers B., 2018. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>.
- Thiers B., 2019. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>.
- Tremblay R.L., 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Can. J. Bot.*, 70 (3) : 642-650.
- Tremblay R.L., Ackerman J.D., Zimmerman J.K. & Calvo R.N., 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biol. J. Linn. Soc.*, 84 (1) : 1-54.
- Vaidya G., Lohman D.J. & Meier R., 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27 (2) : 171-180.
- Vale A., Rojas D., Álvarez J.C. & Navarro L., 2011. Breeding system and factors limiting fruit production in the nectarless orchid *Broughtonia lindenii*. *Plant Biol.*, 13 (Suppl. 1) : 51-61.
- Vale Á., Rojas D., Álvarez J.C. & Navarro L., 2013. Distribution, habitat disturbance and pollination of the endangered orchid *Broughtonia cubensis* (Epidendreae: Laeliinae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 172 (3) : 345-357.
- Veldman S., Otieno J., van Andel T., Gravendeel B. & de Boer H.J., 2014. Efforts urged to tackle thriving illegal orchid trade in Tanzania and Zambia for chikanda production. *Traffic Bull.*, 26 (2) : 47-50.

- Verlynde S., Dubuisson J.Y., Stévant T., Simo-Droissart M., Geerinck D., Sonké B., Cawoy V., Descourvières P. & Droissart V., 2013. Taxonomic revision of the genus *Bolusiella* (Orchidaceae, Angraecinae) with a new species from Cameroon, Burundi and Rwanda. *Phytotaxa*, 114 (1) : 1-22.
- Verlynde S., Haese C.A.D., Plunkett G.M., Simo M., Molly D., Droissart V. & Stévant T., 2018. Molecular phylogeny of the genus *Bolusiella* (Orchidaceae, Angraecinae). *Plant Syst. Evol.*, 304 (2) : 269-279.
- Vermeulen P., 1966. The system of the Orchidales. *Acta bot. neerl.*, 15 : 224-253.
- de Vogel E.F., 1987. *Manual of herbarium taxonomy: theory and practice*. UNESCO, Regional Office for Science and Technology for Southeast Asia : 164 pp.
- Vogel S., 1954. *Floral-biological syndromes as elements of diversity within tribes in the flora of South Africa*. Pischtschan E. (éd.). Shaker Verlag, Aachen : 396 pp.
- Vogel S., 2012. *Floral-biological syndromes as elements of diversity within tribes in the flora of South Africa: 1954*. Shaker : 396 pp.
- Vojtkó A.E., Sonkoly J., Lukács B.A. & Molnár V A., 2015. Factors affecting reproductive success in three entomophilous orchid species in Hungary. *Acta Biol. Hung.*, 66 (2) : 231-241.
- Wallace A.R., 1867. Creation by law. *QJ Sci*, 4 (16) : 470-488.
- Walsh R.P., Arnold P.M. & Michaels H.J., 2014. Effects of pollination limitation and seed predation on female reproductive success of a deceptive orchid. *AoB Plants*, 6 : plu031.
- Walsh R.P. & Michaels H.J., 2017. When it pays to cheat: Examining how generalized food deception increases male and female fitness in a terrestrial orchid. *PLoS One*, 12 (1) : 1-15.
- Waser N., Ollerton J. & Erhardt A., 2011. Typology in pollination biology: Lessons from an historical critique. *J. Pollinat. Ecol.*, 3 (1) : 1-7.
- Wasserthal L.T., 1997. The pollinators of the Malagasy star orchids *Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. *Bot. Acta*, 110 (5) : 343-359.
- Wasserthal L.T., 2009. Bungee jumping spiders challenge Darwin's hypothesis of a coevolutionary race between long spurred orchids and long tongued moths. *In* : Annual Meeting of Deutsche Zoologische Gesellschaft. : 67.
- Wasserthal L.T., 2011. Evolution of Long-Tongued Hawkmoths and Pollination of Long-Spurred *Angraecum* Orchids. *In* : Proceedings of the 20th World Orchid Conference. : 280-284.
- Wei T. & Simko V., 2017. R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84), .
- White F., 1979. The Guineo-Congolian Region and its relationships to other phytochoria. *Bull. du Jard. Bot. Natl. Belgique*, 49 : 11-55.
- White F., 1983. *The vegetation of Africa. A descriptive memoir to accompany the Unesco/AETFAT/UNSO vegetation map of Africa*. Unesco/AETFAT/UNSO (éd.). Paris : Copedith : 356 pp.
- Whittall J.B., Hellquist C.B., Schneider E.L. & Hodges S.A., 2004. Cryptic species in an endangered pondweed community (Potamogeton, Potamogetonaceae) revealed by AFLP markers. *Am. J. Bot.*, 91 (12) : 2022-2029.
- Whittall J.B. & Hodges S.A., 2007. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, 447 (7145) : 706-709.
- Whitten W.M., Williams N.H. & Chase M.W., 2000. Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. *Am. J. Bot.*, 87 (12) : 1842-1856.
- De Wildeman E.A.J., 1916. Decades Novarum Specierum Florae Congolanae XXI. *In* : *Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat à Bruxelles*. Meise : Jardin botanique national de Belgique : 1-258.
- Williams N.H., Chase M.W., Fulcher T. & Whitten W.M., 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscriptions of *Cyrtorchilum*, *Erycina*, *Otoglossum*, and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). *Lindleyana*, 16 (2) : 113-139.
- Willis (Ed.) K.J., 2017. State of the World's Plants 2017. Report. 98 p.
- Willmer P., 2011. *Pollination and floral ecology*. Princeton, New Jersey : Princeton University Press : 828 pp.
- Wolfe K.H., Li W.-H. & Sharp P.M., 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84 (24) : 9054-9058.
- Xiang X., Li D., Jin X., Hu H., Zhou H., Jin W. & Lai Y., 2012. Monophyly or Paraphyly—The Taxonomy of *Holcoglossum* (Aeridinae: Orchidaceae). *PLoS One*, 7 (12) : 1-10.

- Xu S., Schlüter P.M., Scopece G., Breitkopf H., Gross K., Cozzolino S. & Schiestl F.P., 2011. Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids. *Evolution (N. Y.)*, 65 (9) : 2606–2620.
- Yukawa T., Kita K. & Handa T., 2000. DNA phylogeny and morphological diversification of Australian *Dendrobium* (Orchidaceae). In : *Monocots: systematics and evolution*. Wilson D. A. K.L. and M. (éd.). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia : 465-471.
- Yukawa T., Ohba H., Cameron K.M. & Chase M.W., 1996. Chloroplast DNA phylogeny of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae): Insights from a combined analysis based on rbcL sequences and restriction site variation. *J. Plant Res.*, 109 (2) : 169-176.
- Zemagho L., Liede-Schumann S., Sonké B., Janssens S., Lachenaud O., Verstraete B. & Dessein S., 2016. Phylogenetics of tribe Sabiceae (Ixoroideae, Rubiaceae) revisited, with a new subgeneric classification for Sabicea. *Bot. J. Linn. Soc.*, 182 (3) : 551-580.
- Zhang G.Q., Liu K.W., Li Z., Lohaus R., Hsiao Y.Y., Niu S.C., Wang J.Y., Lin Y.C., Xu Q., Chen L.J., Yoshida K., Fujiwara S., Wang Z.W., Zhang Y.Q., Mitsuda N., Wang M., Liu G.H., Pecoraro L., Huang H.X., et al., 2017. The *Apostasia* genome and the evolution of orchids. *Nature*, 549 : 379–383.
- Zhang L., Chen F., Zhang G.Q., Zhang Y.Q., Niu S., Xiong J.S., Lin Z., Cheng Z.M. & Liu Z.J., 2016. Origin and mechanism of crassulacean acid metabolism in orchids as implied by comparative transcriptomics and genomics of the carbon fixation pathway. *Plant J.*, 86 (2) : 175-185.
- Zhang Y., Zhao S., Liu D., Zhang Q. & Cheng J., 2014. Flowering phenology and reproductive characteristics of *Cypripedium macranthos* (Orchidaceae) in China and their implication in conservation. *Pakistan J. Bot.*, 46 (1303-1308).
- Zotz G., Schickenberg N. & Albach D., 2017. The velamen radicum is common among terrestrial monocotyledons. *Ann. Bot.*, 120 : 625-632.

INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES SUR LES APPROCHES MOLECULAIRES

COMPLEMENT 1. EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN

Les feuilles d'au moins deux individus par taxon des deux sections du genre *Cyrtorchis* ont été extraites selon leur disponibilité et leur répartition géographique. Les extractions d'ADN ont été effectuées sur du matériel frais ou conservé dans du silica gel selon la méthode de Chase et Hills (1991). Globalement, l'ADN total a été extrait à partir d'échantillons frais ou conservés dans du silica gel en utilisant des méthodes adaptées. Pour le matériel frais, 1 g de feuilles fraîches pesé à l'aide d'une balance a été utilisé selon un protocole d'extraction au CTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide) modifié (Doyle et Doyle, 1987). L'extraction de certains échantillons de feuilles séchées a également été réalisée suivant cette méthode. Pour chacun des échantillons de feuilles, des tubes de centrifugation contenant 10 ml de CTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide) et 40 µl de β-mercaptoéthanol, sont préalablement chauffés au bain-marie à 65 °C. Ensuite, les feuilles pesées sont déposées dans un mortier en porcelaine, dans lequel sont ajoutés une partie de la solution de CTAB préchauffée ainsi que du silica gel stérilisé. L'ensemble feuilles + solution de CTAB + sable ou silica gel est broyé à l'aide d'un pilon pour obtenir une solution homogène. La suspension obtenue pour chacun des échantillons est remise dans les tubes de centrifugation et incubée au bain-marie durant 20 à 60 mn. Ici, le CTAB va agir en solubilisant les lipides qui forment la membrane cellulaire. Après cette phase d'incubation au bain-marie, 10 ml de SEVAG (mélange chloroforme/alcool isoamylique 24:1) ont été rajoutés dans chacun des tubes, et le mélange en suspension est constamment agité pendant 30 à 60 mn à l'aide d'un agitateur. Pendant ce temps d'agitation, les couvercles sont desserrés à un moment pour libérer le gaz produit dans chacun des tubes. Cette solution de SEVAG permet d'éliminer les polysaccharides, les composés phénoliques, les protéines et les restes du lysat cellulaire restant dans le surnageant produit dans les tubes issus du bain-marie. A la fin de cette période d'agitation, les tubes sont centrifugés à 5100 rpm à 25°C pendant 30 mn. Le surnageant obtenu après centrifugation des tubes est précipité dans deux volumes d'éthanol conservé à -20 °C pendant toute une nuit. Lorsque le matériel extrait provient d'un échantillon d'herbier, le surnageant est précipité dans ⅓ de volume d'isopropanol pour une à deux semaines (Fay *et al.*, 1998).

Pour les échantillons séchés dans du silica-gel, 20 – 30 mg de feuilles ont été mesurés et l'ADN extrait suivant une méthode alternative avec le kit d'extraction NucleoSpin® Plant de Macherey-Nagel, en suivant le protocole du fabricant. Les feuilles pesées et insérées dans des tubes en plastique avec, dans chacun d'eux, une bille pour faciliter le broyage. Lesdits tubes sont trempés dans de l'azote liquide pour figer les feuilles, et ces dernières sont broyées à l'aide d'un agitateur. A la poudre obtenue, les produits du kit d'extraction sont rajoutés suivant le protocole du fabricant. Après l'extraction, les concentrations d'ADN ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND-2000. Cependant, certaines de ces concentrations étant faibles (inférieures à

15 ng/μl) se sont révélées quelques fois compromettantes pour la suite des manipulations car les amplifications d'amorces, lorsqu'elles avaient lieu, ne permettaient pas toujours d'obtenir de bonnes séquences nucléotidiques. Les extraits d'ADN turbides ou colorés par des impuretés ont été purifiés sur des colonnes de Macherey-Nagel à la fin de l'extraction. Cette opération a montré une nette augmentation de la qualité de l'ADN sans diminution importante de sa concentration par comparaison avec la concentration d'ADN initiale.

COMPLEMENT 2. AMPLIFICATION DE L'ADN

Pour l'amplification et le séquençage des différentes régions de l'ADN, des paires d'amorces ont été choisies parce qu'elles sont largement utilisées dans le cadre des reconstructions phylogénétiques et surtout parce qu'elles ont été testées sur plusieurs autres genres d'Orchidaceae angraecoides (Voir Simo-Droissart *et al.*, 2018a; D'hajjère *et al.*, 2019). Les amorces suivantes ont été utilisées pour l'amplification PCR et le séquençage de chaque région chloroplastique individuelle : (i) l'exon *trnL(UAA)*3' et le gène *trnF(GAA)* (**Figure V-1**) pour l'espace intergénique *trnL-F* (Taberlet *et al.*, 1991), (ii) *rps16-1F* et *rps16-2R* (**Figure V-2**) pour l'intron *rps16* (Oxelman *et al.*, 1997), (iii) 19F (Molvray *et al.*, 2000), 1326R (Cuénoud *et al.*, 2002), 390F (Cuénoud *et al.*, 2002) et *trnK-2R* (Johnson et Soltis, 1994) (**Figure V-3**) pour le *matK*, (iv) *trnC* et *petN-1R* (**Figure V-4**) pour l'espace intergénique *trnC-petN* (Lee et Wen, 2003), et (v) 3720F, intR, intF, et 5500R (**Figure V-5**) pour *ycf1* (Neubig *et al.*, 2009). Le marqueur nucléaire nrITS-1 a été amplifié séparément à l'aide des amorces ITS-A et ITS-C (**Figure V-6**), conçus pour les angiospermes (Blattner, 1999).

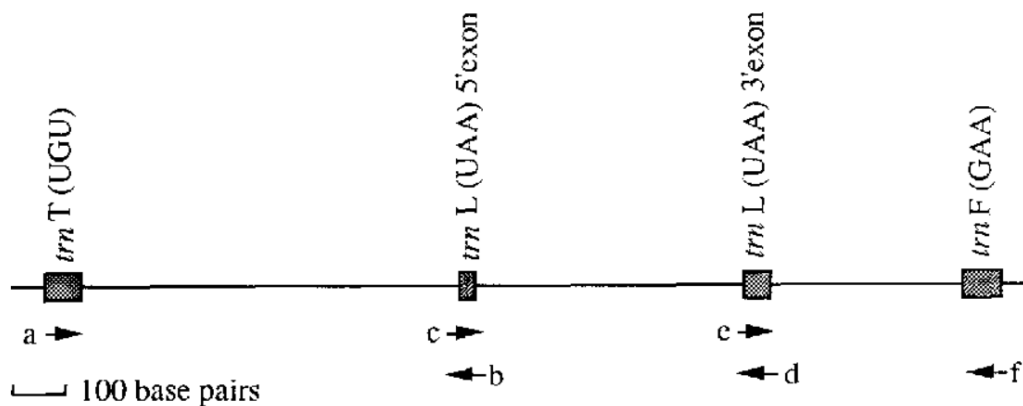


Figure V-1. Positions et directions des amorces Tab-E (*trnL(UAA)*3') et Tab-F (*trnF(GAA)*) du marqueur *trnL-F*. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris de Taberlet *et al.*, 1991).

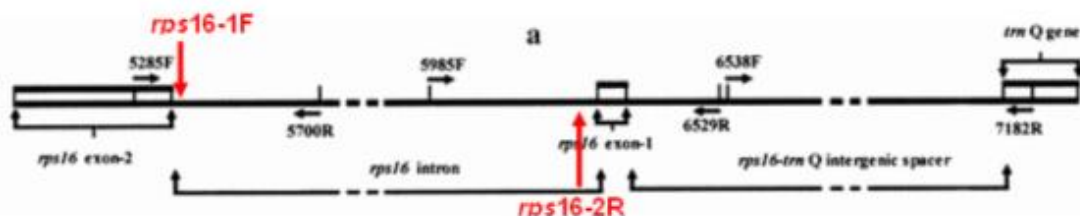


Figure V-2. Positions et directions des amorces *rps16-1F* et *rps16-2R* utilisées dans cette étude. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces.

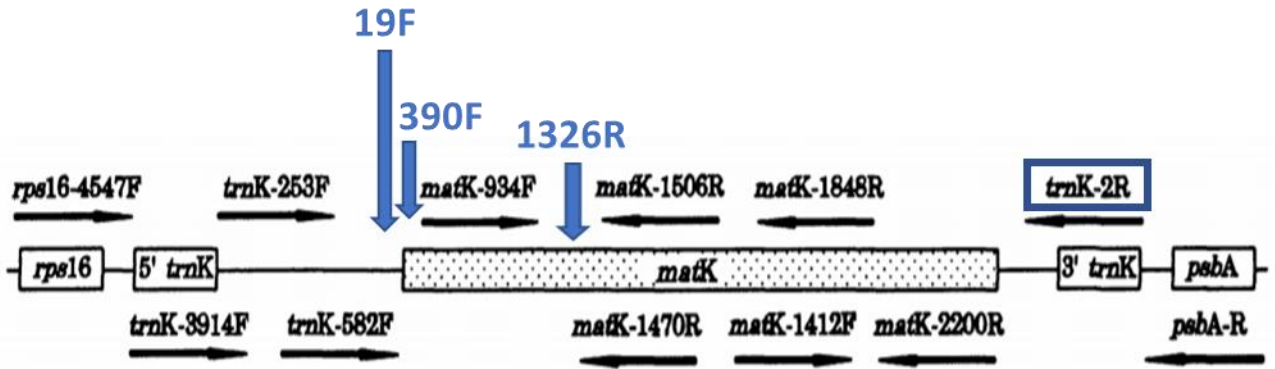


Figure V-3. Positions et directions des amorces utilisées pour le marqueur *matK*. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris et modifié de Johnson et Soltis, 1994).

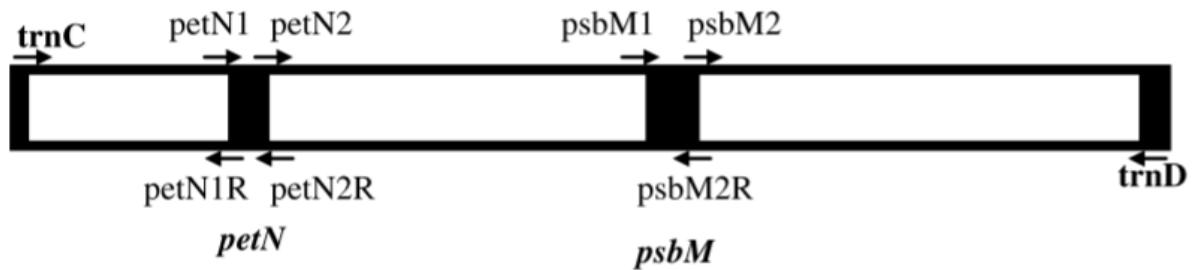


Figure V-4. Positions et directions des amorces *trnC* et *petN-1R* utilisées dans cette étude. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris de Lee et Wen, 2003).

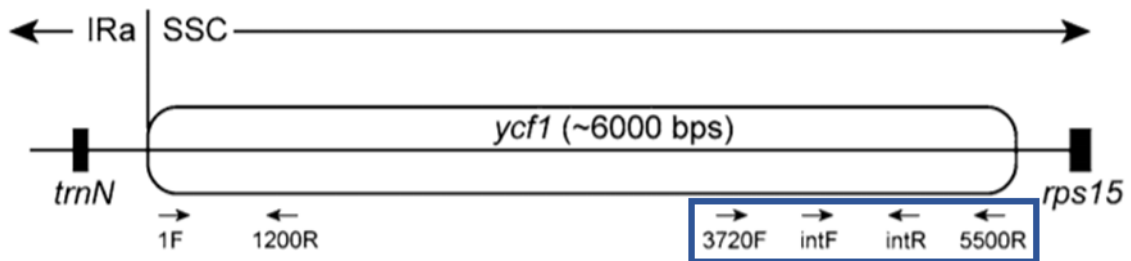


Figure V-5. Positions et directions des quatre amorces utilisées pour le marqueur *ycf1*. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris et modifié de Neubig *et al.*, 2009).

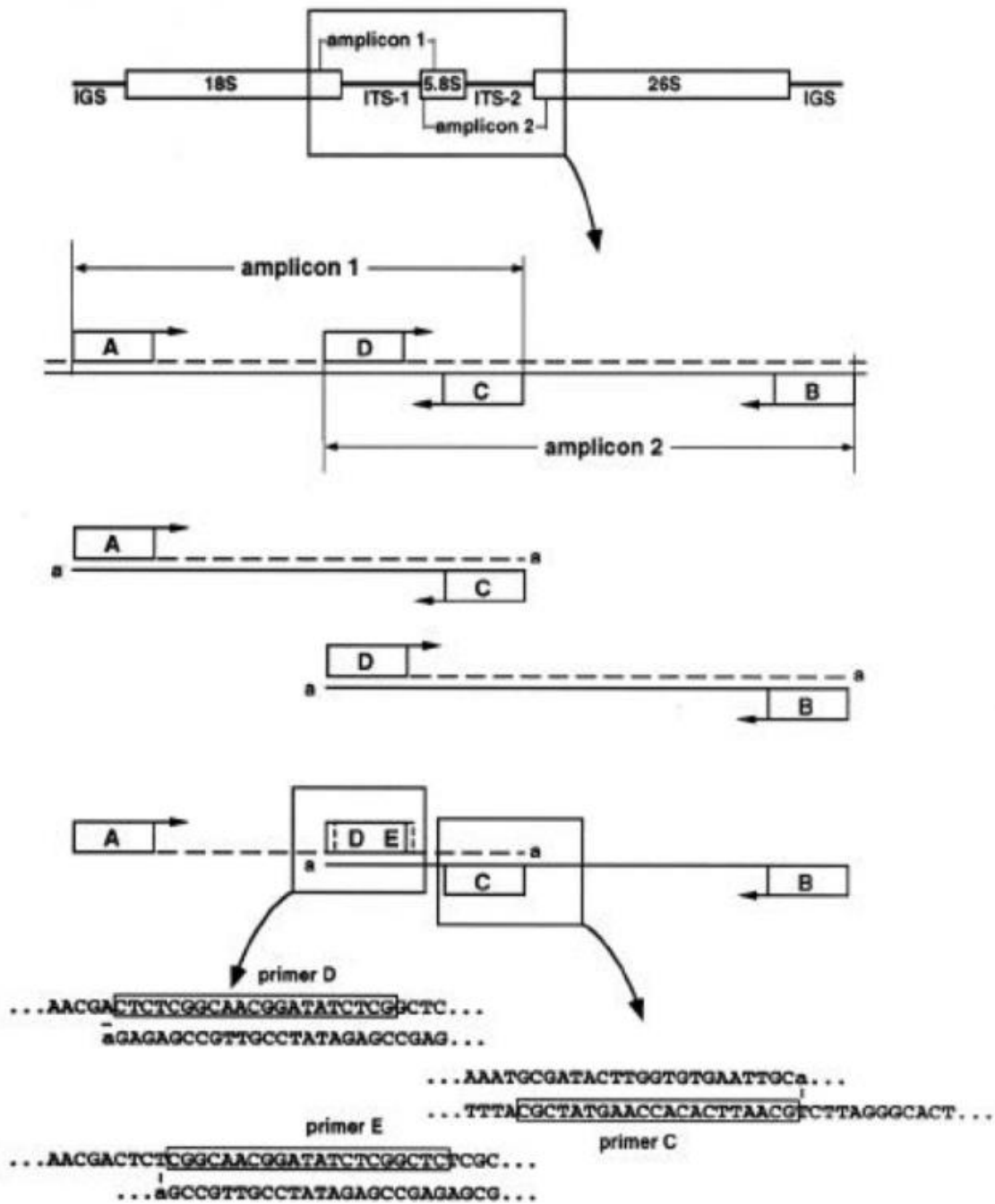


Figure V-6. Positions et directions des amorces utilisées pour le marqueur nrITS-1. Les bouts des flèches indiquent les extrémités 3' des amorces (repris de Blattner, 1999).

Les séquences nucléotidiques des différentes amorces utilisées ainsi que les programmes d'amplification correspondants sont présentées ci-après **Tableau V-1**.

Tableau V-1. Locus, séquences des amorces et noms des programmes d'amplification correspondants.

Locus	Amorce	Séquences	Programme PCR
Marqueurs chloroplastiques			
<i>trnL-F</i>	<i>trnL(UAA)3'</i>	5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3'	<i>trnL-F+rps16+</i> <i>trnC-petN+</i> ITS
	<i>trnF(GAA)</i>	5' ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG 3'	
<i>rps16</i>	<i>rps16-1F</i>	5'-GTG GTA GAA AGC AAC GTG CGA CTT 3'	<i>trnL-F+rps16+</i> <i>trnC-petN+</i> ITS
	<i>rps16-2R</i>	5'-TCG GGA TCG AAC ATC AAT TGC AAC 3'	
<i>matK</i>	19F	5' CGT TCT GAC CAT ATT GCA CTA TG 3'	<i>matK,</i> <i>ycf13720F/intR</i>
	1326R	5' TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T 3'	
	390F	5' CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTT C 3'	
	<i>trnK-2R</i>	5'-AAC TAG TCG GAT GGA GTA G 3'	
<i>trnC-petN</i>	<i>trnC</i>	5'-CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC 3'	<i>trnL-F+rps16+</i> <i>trnC-petN+</i> ITS
	<i>petN-1R</i>	5'-CCC AAG CAA GAC TTA CTA TAT CC 3'	
<i>ycf1</i>	3720F	5' TAC GTA TGT AAT GAA CGA ATG G 3'	<i>matK</i> <i>+ycf13720F+int</i> <i>R</i>
	<i>intR</i>	5' TAC GTA TGT AAT GAA CGA ATG G 3'	
	<i>intF</i>	5' GAT CTG GAC CAA TGC ACA TAT T 3'	<i>ycf1intF+5500R</i>
	5500R	5' GCT GTT ATT GGC ATC AAA CCA ATA GCG 3'	
Marqueur nucléaire			
<i>nrITS-1</i>	ITS-A	5' GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G 3'	<i>trnL-F+rps16+</i> <i>trnC-petN+</i> ITS
	ITS-B	5' CTT TTC CTC CGC TTA TTG ATA TG 3'	
	ITS-C	5' GCA ATT CAC ACC AAG TAT CGC 3'	
	ITS-D	5' CTC TCG GCA ACG GAT ATC TCG 3'	

Les amplifications de PCR des différentes régions chloroplastiques et nucléaires pour les spécimens dans le laboratoire EBE de l'ULB en Belgique ont été effectuées dans l'un des trois thermocycleurs (Eppendorf Mastercycler x 50s) produisant un volume total de 25 µL, chaque réaction contenant 1-2 µL d'extrait d'ADN génomique (de concentration variable), 0,125 µL (5 U/µL) d'enzyme Taq polymérase (Qiagen), 2,5 µL de tampon PCR, 1 µL MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL dNTPs (10 µM), 0,25 µL de chaque amorce (10 µM), et 18,375-19,375 µL de H₂O.

Les profils PCR utilisé pour l'amplification des six régions de l'AND se sont inspirés des travaux de (Simodroissart *et al.*, 2013).

Un mix contenant tous les produits à l'exception de l'ADN à amplifier, a été préparé au préalable pour éviter les pertes liées aux faibles quantités prélevées lors des PCR dans chacun des laboratoires et pour limiter les risques de contaminations. Le calcul des quantités à mélanger tient compte d'un à deux puits supplémentaires (selon le nombre d'individus à amplifier) par mix et par marqueur. Dans la plaque à PCR, seul un puits comprenant uniquement le mix permettra de vérifier la pureté de celui-ci, c'est-à-dire l'absence de contamination, lors de la migration sur gel d'électrophorèse.

Les programmes d'amplification PCR (*trnL-F+rps16+ trnC-petN+ ITS*, *matK*, *ycf13720F/intR* et *ycf1intF+5500R*) utilisés au laboratoire de l'EBE sont présentés dans le **Tableau V-2** ci-dessous.

Tableau V-2. Programme d'amplification PCR utilisés pour les différentes régions au laboratoire EBE

Etapes	Programme <i>trnL-F+rps16+ trnC-petN+ITS</i>		Programme <i>matK+ycf13720F/intR</i>		Programme <i>ycf1intF+5500R</i>	
	Température	Durée	Température	Durée	Température	Durée
Préchauffage	94 °C	3 mn	94 °C	3 mn	98 °C	30 s
Dénaturation	94 °C	30 s	94 °C	30 s	98 °C	10 s
Hybridation	52 °C	30 s	51 °C	30 s	50 °C	30 s
Elongation	72 °C	1 mn	72 °C	90 s	72 °C	90 s
Elongation finale	72 °C	10 mn	72 °C	10 mn	72 °C	10 mn
Nombre de cycles	30		30		30	

COMPLEMENT 3. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Afin de vérifier le succès des amplifications, une migration sur gel d'agarose a été réaliser sur les produits d'amplification au laboratoire. Les plateaux de coulage et les peignes adéquats ont été choisis en fonction du nombre d'échantillons à faire migrer, de la durée de la migration et de cuve utilisée. Les gels sont préparés avec une concentration de 1 g d'agarose pour 100 ml de tampon TBE (Tris, acide borique et EDTA) dilué dix fois. La solution est portée à ébullition dans un four micro-ondes (± 1 mn 40 s) juste assez pour la rendre limpide par dissolution complète de l'agarose, en évitant une importante évaporation. Le produit SYBR®Safe d'Invitrogen a été ajouté (0,5 μ l pour 10 ml de gel) lorsque la solution suffisamment refroidie ne s'évaporait plus. Cette précaution évite ainsi l'inhalation de ce produit. Le SYBR®Safe est un agent intercalant qui permet de révéler la

présence d'ADN sous une lampe UV. Le gel est alors coulé dans le plateau sur lequel sont fixés les peignes jusqu'au refroidissement complet.

Une partie des produits PCR est mélangée à un « Loading Dye » dans une plaque propre. Ce « Loading Dye » a pour rôle d'indiquer le front de migration du contenu du puits tout au long de l'électrophorèse et « d'alourdir » l'ADN pour qu'il reste bien au fond du puits lors de la migration. Pour chaque échantillon à analyser, 4 µl d'ADN ont été mélangés à 2 ou 4 µl de « Loading Dye » (bleu de bromophénol ou 10X Coral Load selon la disponibilité au laboratoire).

Dans un puits, pour chacune des lignes sur le gel, 1,5 µl d'un marqueur de taille allant de 100 bp à 1kb (GeneRuler DNA ladder, Fermentas) a été utilisé comme référence. La migration a été effectuée sous une différence de potentiel de 90 volts pendant 30 à 45 mn. Une fois la migration terminée, le gel est délicatement déposé sur un générateur à UV relié à un appareil photographique et une image est prise sous UV. En fonction de l'intensité des bandes obtenues le volume de produit PCR à prélever pour la réaction de séquençage au laboratoire EBE a été estimé (1 à 4 µl). Mais avant d'y arriver, les produits PCR sont purifiés pour éliminer les fragments d'amorces.

COMPLEMENT 4. PURIFICATION DES PRODUITS PCR ET REACTION DE SEQUENÇAGE

Les produits amplifiés issus de la PCR ont ensuite été purifiés par digestion enzymatique à l'aide d'Exosap Qiagen. Le mélange réactionnel ajouté dans les puits des plaques pour la purification contenait 1,1 µL de solution Exosap Qiagen (0,1 µl exonucléase, 1 µl de Sap). Le programme de purification utilisé sur les thermocycleurs est de 37 °C pendant 1 h 30 mn puis 80 °C pendant 15 mn. Le kit de séquençage de cycle BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems Inc., ABI, Lennik, Pays-Bas) a été utilisé pour la réaction de séquençage. Pour chaque échantillon à séquencer, le séquençage s'est fait avec les mêmes amorces forward et reverse utilisée pour l'amplification PCR. Le mélange réactionnel contenait 1,5 µL de tampon de séquençage, 1 µL de terminateur BigDye avec 0,2 µL de 10 µM d'amorce, 1-3 µL de produit amplifié (de concentration unquantifié), et 4,3-6,3 µL de H₂O pour un volume réactionnel total de 10 µL. Un thermocycleur T-Professional (Biometra) a servi à effectuer la réaction de séquençage suivant le programme repris dans le **Tableau V-3**.

Tableau V-3. Programme utilisé pour la réaction de séquençage.

Etapes	Température	Durée
Préchauffage	94°C	30 mn
Dénaturation	94°C	30 s
Hybridation	52°C	30 s
Elongation	72°C	1 mn
Nombre de Cycles		30

La température est réduite à 12°C à la fin des cycles jusqu'à la récupération de la plaque dans le thermocycleur. Les produits issus du cycle de séquençage ont été nettoyés par précipitation dans de l'éthanol et les séquences ont ensuite été analysées et générées par électrophorèse capillaire sur un séquenceur ABI 3100 en suivant les

protocoles du fabricant (ABI) (ABI, Applied Biosystems Inc., Warrington, Cheshire, UK) en suivant le protocole du fabricant.

COMPLEMENT 5. ASSEMBLAGE, ÉDITION ET ALIGNEMENT DES SÉQUENCES

Les chromatogrammes à séquences complémentaires et chevauchantes (séquences forward et reverse) générés pour chaque gène (*matK*, *rps16*, *trnC-petN*, *trnL-F*, and *ycf1* et nrITS-1) et pour chaque individu ont été importés dans le logiciel Geneious 9.1.7. (Drummond *et al.*, 2012), automatiquement découpés aux deux extrémités avec une erreur de 5 % en fonction des bases nucléotidiques. L'assemblage, l'édition et l'alignement des séquences ont été faite et assemblés à l'aide du même logiciel. Geneious est en effet une plateforme logicielle d'alignement, d'assemblage et d'analyse des séquences protéiques d'ADN, d'ARN, intégrant les outils de bioinformatique et de biologie moléculaire dans une interface facile à l'utilisation. La procédure d'édition a consisté en la vérification et la correction manuelle de chaque base ambiguë dans les chromatogrammes en fonction de la précision des pics observés afin d'assurer la cohérence des deux brins (**Figure V-7**)

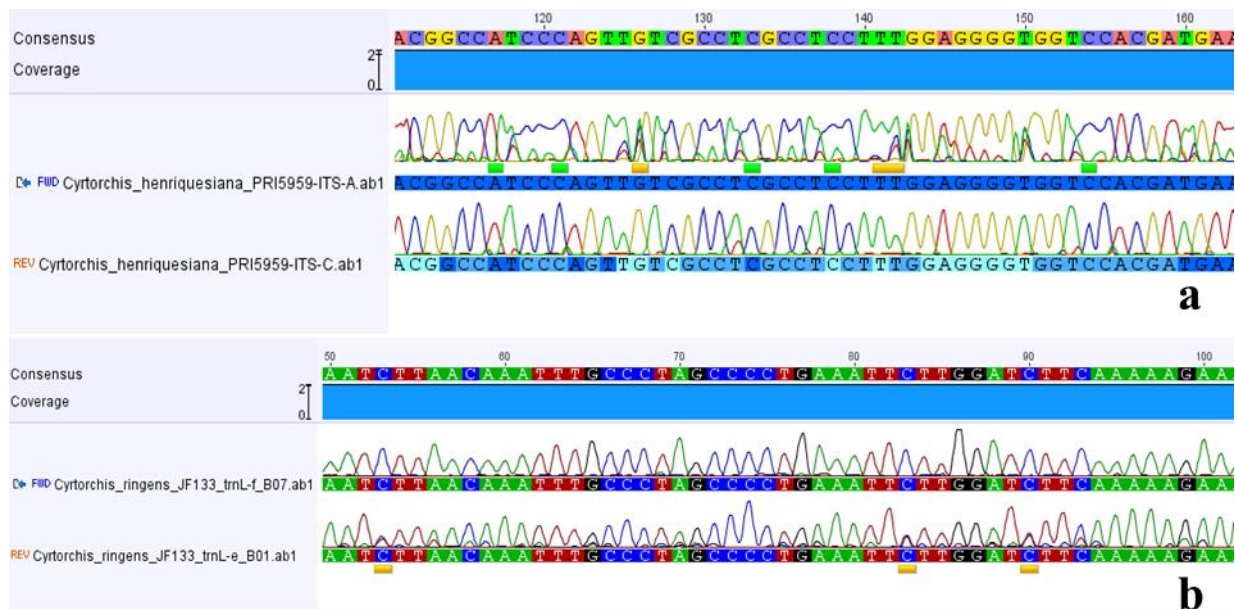


Figure V-7. Edition de séquences consensus pour la portion ITS-A et ITS-C du marqueur nrITS-1(a) et e-f du marqueur *trnL-F* (b) avec le logiciel Geneious. Les marques jaunes et verts en dessous des nucléotides des chromatogrammes indiquent les bases corrigées.

Les séquences de consensus ont été alignées avec le plugin MAFFT (Kato et Standley, 2013) implémenté dans Geneious et l'alignement résultant a été édité manuellement. Les alignements multiples de séquences ont été effectués automatiquement suivant l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004) tel qu'il est implémenté dans Geneious (**Figure V-8**), puis ont été vérifiés visuellement et ajustés quand nécessaire dans le même logiciel. Les deux bouts des marqueurs *matK* et *ycf1* ont été obtenus par l'assemblage des quatre séquences lors de l'édition. Les insertions (zones où un ou plusieurs nucléotides sont insérés) et les délétions ou gaps (zones où un ou plusieurs nucléotides sont perdus) présentant des caractères informatifs ont été identifiés lors de l'alignement des séquences. Les gaps ont été codés dans la matrice comme des données manquantes. Les séquences produites

ont été ajoutées aux 71 séquences précédemment publiées dans des études antérieures (Carlswald *et al.*, 2006a; b; Simo-Droissart *et al.*, 2018a; D'hajjère *et al.*, 2019; Farminhão *et al.*, 2020) et disponibles dans GenBank avec leurs noms d'espèces mis à jour conformément aux concepts taxonomiques actuels. L'assemblage de toutes les séquences produites et celles issues de GenBank s'est effectuée automatique dans Geneious suivant la méthode précisée plus haut.

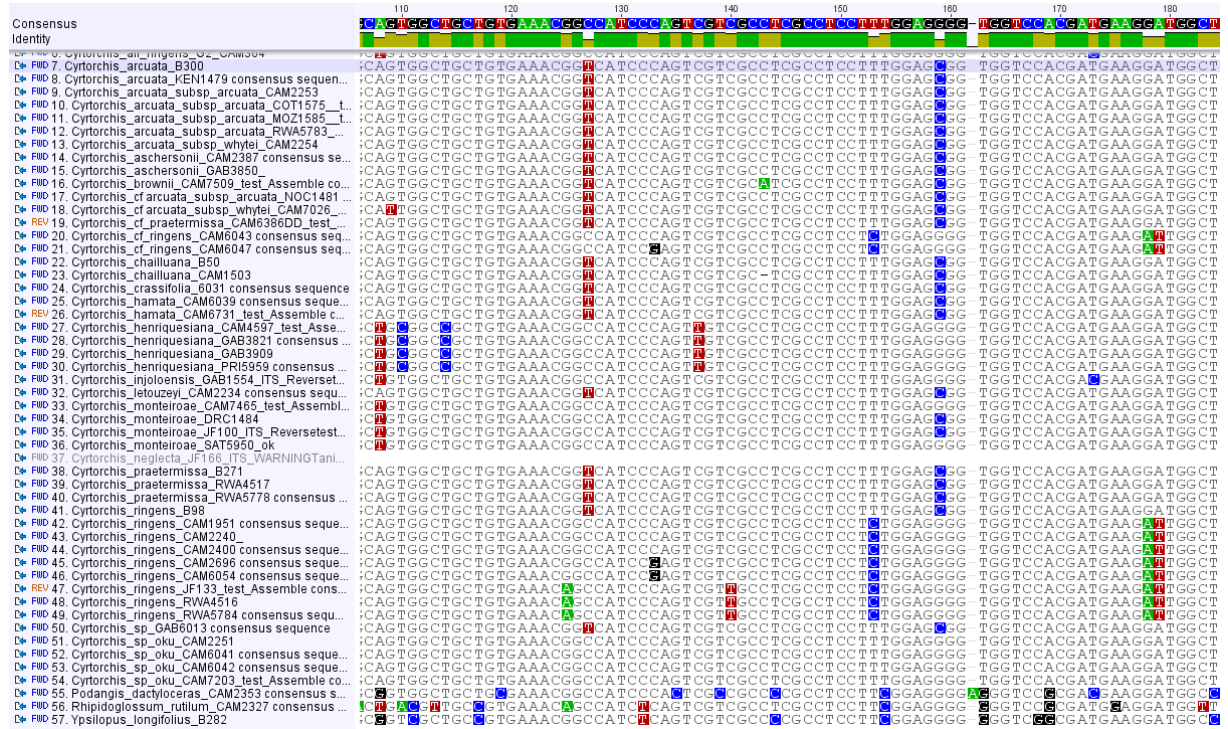


Figure V-8. Alignement de plusieurs séquences consensus pour le marqueur nrITS-1dans le logiciel Geneious. Les nucléotides encadrés de différentes couleurs illustrent le polymorphisme pour un même site nucléotidique.

COMPLEMENT 6. ANALYSE DU MAXIMUM DE VRAISEMBLANCE

Les analyses ont été réalisées sur différents jeux de données à savoir sur la matrice issue de l'alignement des séquences pour le marqueur nucléaire nrITS-1, celle issue de la combinaison des cinq régions plastidiques (*matK*, *rps16*, *trnC-petN*, *trnL-F* et *ycf1*), et une matrice combinant les cinq régions plastidiques à la matrice nucléaire. Pour chacune de ces matrices, les gaps terminaux ont été codés comme des points d'interrogation et les gaps internes n'ont pas été codés. Le modèle évolutif le mieux adapté pour chaque ensemble de données a été déterminé pour chaque marqueur en utilisant le logiciel PartitionFinder 2 sur XSEDE (V2.1.1) (Lanfear *et al.*, 2016). L'hétérogénéité des sites a été modélisée suivant une distribution gamma. Le modèle général de substitution réversible ou «general time reversible» dans le temps avec une distribution gamma (GTR + Γ) a été utilisé dans les analyses ultérieures comme le modèle disponible le plus proche pour les matrices combinées et plastidiques dans les logiciels phylogénétiques. Pour la matrice nucléaire, le modèle de substitution recommandé le plus proche utilisé est K80+ Γ . L'analyse du maximum de vraisemblance a été réalisé dans le logiciel RAXML-HPC BlackBox version 8.2.10 (Stamatakis, 2014) implémenté dans le portail scientifique CIPRES (Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research) pour la recherche phylogénétique ou « CIPRES Science

Gateway » (Miller *et al.*, 2010) en appliquant le modèle de substitution des nucléotides GTR + Γ pour la recherche de l'arbre le plus performant. CIPRES est une ressource publique pour l'inférence de grands arbres phylogénétiques conçus pour permettre à tous les chercheurs d'accéder aux vastes ressources de calcul par le biais d'une simple interface de navigateur. Les arbres phylogénétiques résultant de ces analyses ont été édités avec le logiciel FigTree version 1.4.3 (Rambaut, 2016). Pour accéder au support des clades, les valeurs du support bootstrap (BS) ont été calculées sous le même modèle, en appliquant l'algorithme bootstrap rapide avec 1000 pseudo-répliques (Felsenstein, 1985). Les valeurs BS ont été considérées comme faibles (< 50 %), faibles (50 %-70 %), modérées (> 70 %-85 %), ou fortes (> 85 %) (Kress *et al.*, 2002).

COMPLEMENT 7. ANALYSE BAYESIENNE

Afin de comparer les résultats obtenus avec l'analyse du maximum de vraisemblance, l'analyse bayésienne a été effectuée sur la matrice combinant les cinq régions plastidiques d'une part, et la matrice combinant les six régions et la matrice nucléaire d'autre part. Les analyses bayésiennes ont été effectuées à l'aide du logiciel MrBayes v3.2.6 x86 (Huelsenbeck et Ronquist, 2001; Ronquist *et al.*, 2012). Des analyses parallèles, avec quatre passages indépendants de Monte Carlo à chaîne de Markov (MCMC), ont été menées pendant 10 millions de générations, en échantillonnant les arbres toutes les 1000 générations. Les modèles disponibles dans MrBayes qui étaient les plus proches de celles suggérées par PartitionFinder 2 étaient K80+ Γ pour le nrITS-1, GTR+ Γ pour l'ensemble de données sur les plastes, la matrice nucléaire et plastidique combinée. Ensuite, un arbre de consensus à 50 % a été construit à partir des 5000 arbres échantillonnés pour estimer les probabilités postérieures de clade en utilisant la somme des fonctions dans MrBayes. Les premiers 25 % des arbres échantillonnés ont été rejetés comme fraction de brûlage. Les probabilités postérieures (PP) ont été considérées comme très faibles (< 0,90), faibles (0,90 à < 0,95), modérées (0,95 à < 0,98) et fortes (\geq 0,98) (Erixon *et al.*, 2003) et ont été générées à partir de l'échantillon post-brûlage.

COMPLEMENT 8. RECONSTRUCTION DES ETATS ANCESTRAUX

Six caractères discrets ont été retenus pour l'analyse de l'évolution des caractères ancestraux : (1) la structure du viscidium ; (2) la forme des stipites ; (3) la forme de l'apex des stipites ; (4) la forme des lobes latéraux du rostre ; (5) le point d'insertion des stipites ; et (6) la forme des ovaires et des fruits (**Appendix III-7**). L'estimation de l'état ancestral a été réalisée sur l'arbre de consensus majoritaire issu des analyses bayésiennes en utilisant la reconstruction de l'état des caractères à maximum de vraisemblance pour construire l'évolution de ces caractères dans la version 3.51 de Mesquite (W. Maddison et D. Maddison, 2018) sous le modèle à un paramètre de l'état k de Markov (MK1) (Lewis, 2001). Les reconstructions ont été effectuées sur des nœuds supportés sur une distribution a posteriori de 1000 arbres post-brûlage sélectionnés au hasard à partir de l'analyse bayésienne et résumés sur l'arbre de consensus majoritaire issu des analyses bayésiennes avec un échantillon par espèce. *Rangaeris longicaudata* a été utilisé comme groupe de référence pour la reconstruction des caractères car c'est l'espèce la plus proche du genre *Cyrtorchis* (Farminhão *et al.*, 2020).