

Les défis inhérents à la systématique et à la taxinomie de genres ayant connu une radiation explosive récente : le cas des orchidées du genre *Ophrys*

Les orchidées du genre *Ophrys* ont connu une radiation évolutive explosive récente. Ces orchidées ont développé, au cours des quelques derniers millions d'années, une stratégie de leurre sexuel leur ayant permis de s'adapter à différents insectes pollinisateurs (surtout les abeilles sauvages) existant eux depuis nettement plus longtemps. Au sein de ce genre, un grand nombre d'espèces ayant été décrit par des orchidophiles tarde à être validé par la communauté scientifique. La plupart de ces taxons sont interfertiles, ce qui rend l'application du concept « biologique » de l'espèce délicat à appliquer.

Si la dizaine d'espèces constituant les « têtes de groupe » du genre ont été confirmées par différentes analyses phylogénétiques, la délimitation des quelques 350 espèces restantes décrites à ce jour reste assez confuse. Dans ce contexte où l'activité taxinomique des orchidophiles tend à être plus rapide que celle des scientifiques, les progrès récents de la génomique et de la taxinomie intégrative ouvrent des perspectives prometteuses. La validation scientifique des limites entre espèces au sein du genre *Ophrys* pourrait permettre une meilleure appréhension de la diversité de ce genre emblématique par le grand public ainsi que la mise en place d'actions de conservation plus efficaces car mieux ciblées.

6.1. Introduction

Au sein de la famille des Orchidaceae, le genre *Ophrys* présente une monophylie très fortement supportée par un faisceau de données génétiques, phénotypiques et écologiques. Toutes les espèces du genre *Ophrys* partagent une stratégie commune dite de « leurre sexuel » pour attirer leur(s) insecte(s) pollinisateur(s). Cette stratégie de pollinisation constitue une innovation biologique clé permettant d'expliquer leur radiation « explosive ». Leurs fleurs ressemblent étrangement à la femelle des espèces d'abeilles sauvages assurant leur pollinisation. Cette ressemblance est non seulement morphologique (taille, forme et parfois pilosité), mais avant tout olfactive puisque l'odeur émise par le labelle (pétale central différencié sur lequel se positionne le pollinisateur) est très similaire à la phéromone sexuelle spécifique de l'espèce d'abeille (voir la revue de (Baguette *et al.* 2020)). Émergeant généralement une à deux semaines avant leurs femelles, les mâles de l'espèce d'abeille en question sont ainsi confrontés à ces fleurs particulières, en l'absence de femelles. Attirés, ils tentent de copuler avec le labelle et, dans leurs mouvements, se collent les pollinies sur le corps. En répétant ce comportement sur d'autres fleurs de la même espèce d'*Ophrys*, ils propagent le pollen de fleur en fleur. Les *Ophrys* parasitent ainsi l'attraction spécifique du mâle par la femelle d'abeille, ce qui explique que chaque espèce d'*Ophrys* soit majoritairement pollinisée par une seule espèce d'abeille ((Joffard *et al.* 2019) et références y figurant). Les abeilles sauvages se sont diversifiées au Crétacé il y a 110 à 140 millions d'années, parallèlement à la diversification des Angiospermes (Danforth *et al.* 2013). De son côté, le genre *Ophrys* serait apparu il y a seulement environ 5 millions d'années (Breitkopf *et al.* 2015) et a ensuite connu des épisodes de diversification massive à la faveur de transitions de pollinisateurs, permettant à la fois l'exploitation de nouvelles niches écologiques et la mise en place de l'*isolement reproductif* entre lignées. C'est ce contexte historique, et la relation asymétrique entre *Ophrys* et pollinisateurs, qui expliquent en grande partie la diversification spectaculaire de ce genre. Sachant que presque 2 000 espèces d'abeilles sauvages sont répertoriées en Europe (Nieto *et al.* 2014), sans compter celles d'Afrique du Nord, le genre euroméditerranéen des *Ophrys* pourrait se diversifier davantage encore sur la base d'interactions de pollinisation quasi spécifiques.

Le genre *Ophrys* ayant connu une diversification importante, rapide et récente, la systématique et, *a fortiori*, la taxinomie de ce genre sont loin d'avoir atteint l'état de consensus. Ainsi, alors que Delforge (2016) recense dans la version la plus récente de son ouvrage *Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient* pas moins de 354 espèces d'*Ophrys* dans la dition, certains auteurs reconnaissent quant à eux la pertinence de 9 espèces seulement et se montrent relativement sceptiques face à

la quantité de ce qu'ils considèrent comme des espèces « éthologiques » (Bateman 2018 ; Bateman *et al.* 2018). La plupart des scientifiques travaillant sur le genre *Ophrys* prétendront être plus intéressés par la compréhension des processus écologiques et évolutifs ayant engendré l'impressionnante diversité de ce genre que par le fait d'y délimiter des espèces. Au demeurant, c'est la définition même de l'espèce qui mène ces scientifiques à se positionner dans cette gamme allant d'une dizaine à plusieurs centaines d'espèces d'*Ophrys*. Il leur incombe donc d'argumenter ce positionnement, d'autant que celui-ci peut avoir des implications importantes, notamment en matière de biologie de la conservation. La relative démocratisation des approches de séquençage haut débit et de métabolomique, de même que l'émergence des méthodes de taxinomie intégrative, permettent désormais d'analyser de façon combinée des informations génétiques et phénotypiques (morphologie et odeurs florales par exemple). Ces approches semblent particulièrement prometteuses pour pouvoir délimiter les espèces d'*Ophrys* de façon reproductible et actualisable en se basant sur des procédures statistiques en tant qu'outils d'aide à la décision.

6.2. La spéciation chez *Ophrys* : une divergence évolutive vue comme un continuum réticulé

6.2.1. Difficulté d'appliquer le concept biologique de l'espèce dans le cas d'*Ophrys*!

L'espèce a classiquement été définie comme un groupe de populations naturelles effectivement ou potentiellement interfécondes et étant génétiquement isolées d'autres groupes similaires. Ce concept biologique de l'espèce, formulé par Mayr (1942), apparaît comme relativement peu adapté aux plantes dans la mesure où la formation même occasionnelle d'hybrides (pouvant être viables et fertiles) concernerait au moins un quart des espèces reconnues comme valides (Mallet 2005). Cette situation est d'autant plus marquée au sein du genre *Ophrys* dans lequel il apparaît que la grande majorité des espèces sont interfertiles si l'*isolement prézygotique* est contourné (voir, par exemple, (Scopee *et al.* 2007)).

Afin de proposer une définition cohérente de la notion d'espèce pour les *Ophrys*, il est donc primordial de considérer l'espèce dans le contexte du processus de la spéciation. La spéciation est généralement définie comme la formation de nouvelles espèces qui divergent à partir d'ancêtres communs. Cette divergence évolutive fait intervenir un isolement reproductif correspondant à l'émergence de barrières *pré-* ou *postzygotiques* qui se traduisent théoriquement à terme par une cessation définitive du flux génique entre lignées.

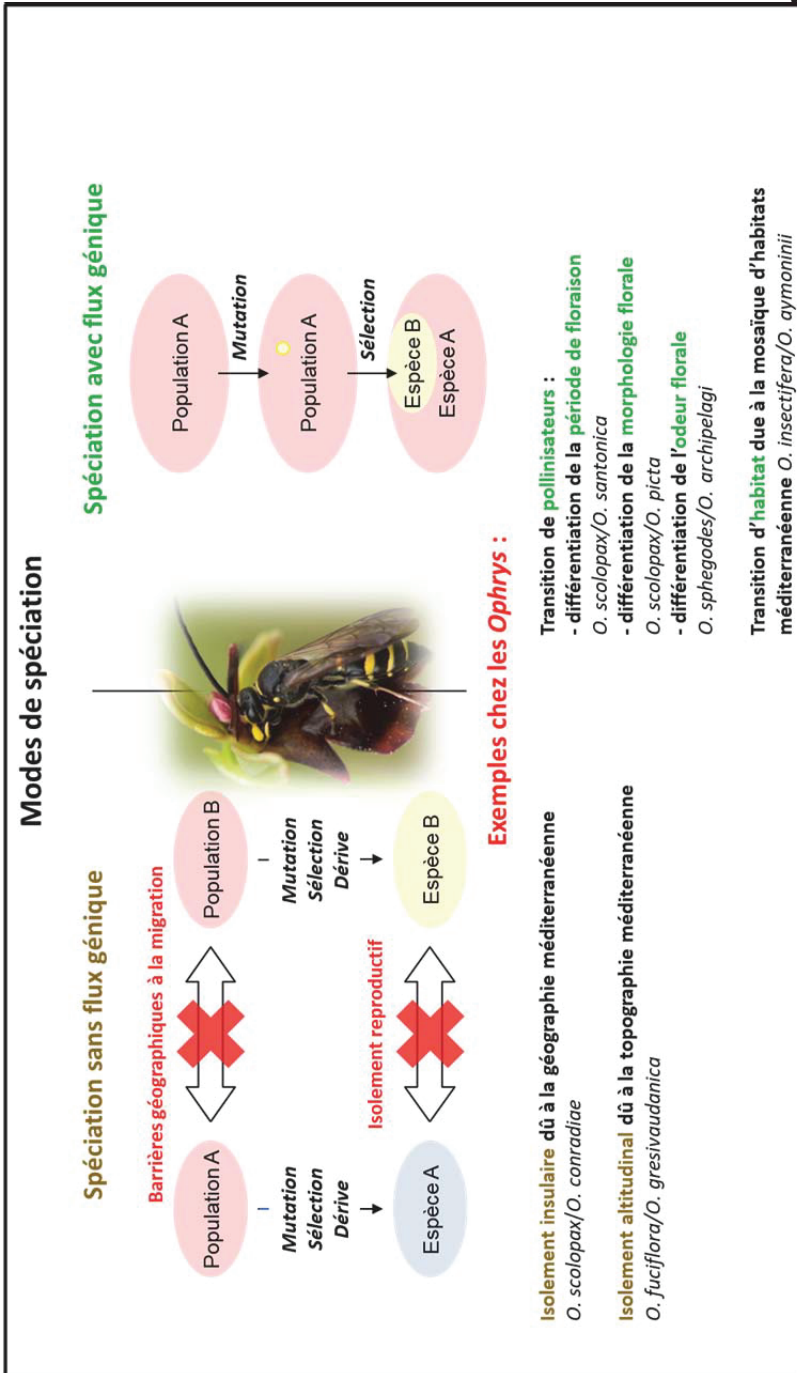


Figure 6.1. Récapitulatif des différents processus de spéciation connus dans le genre *Ophrys* (photos de S. Witzthum)

6.2.2. Causes de l'isolement reproductif chez *Ophrys*

L'isolement reproductif (figure 6.1) est d'autant plus facile à appréhender qu'il se matérialise par une cessation immédiate, totale et permanente du flux génique entre lignées, initiant par la même occasion le processus de spéciation. Des populations peuvent ainsi se retrouver complètement isolées génétiquement les unes des autres par une barrière physique infranchissable par les propagules responsables du flux de gènes (graines ou pollen) : c'est le phénomène de *spéciation allopatrique*, vicariante ou géographique. Ce mode de spéciation – souvent considéré comme le mode par défaut – se caractérise par une absence de migration de sorte qu'aucun flux génique ne vient contrecarrer l'effet des autres forces évolutives que sont la mutation, la sélection naturelle et la dérive génétique de part et d'autre de la barrière physique. Ce mode de spéciation serait relativement répandu chez *Ophrys* où pas moins de 45 espèces ont été recensées comme endémiques de systèmes insulaires méditerranéens, que ce soit au sein de grandes îles ou au sein des îles de taille plus modeste comme Malte, Karpathos, Andros ou Rhodes – sachant que ce nombre ne considère pas les espèces présentes sur plusieurs groupes d'îles (Schatz 2017). À titre d'exemple, le groupe d'*Ophrys bertolonii* est représenté aux Baléares par *O. balearica*, le groupe d'*O. lunulata* à Malte par *O. melitensis* et celui d'*O. bornmuelleri* sur Andros par *O. andria*. Ces espèces d'*Ophrys* sont endémiques de ces îles sur lesquelles elles se sont vraisemblablement différenciées en conséquence de leur isolement géographique. Il est à noter que leur insecte pollinisateur principal n'est quant à lui pas endémique de ces îles. Cette différenciation peut, le cas échéant, être amplifiée par les effets conjugués d'une adaptation aux contraintes particulières d'une écologie insulaire et de la dérive génétique, d'autant plus attendus dans le cas où la lignée insulaire se serait formée à partir de petits effectifs. En milieu continental, les cas de vicariance sont généralement plus délicats à documenter mais l'observation de taxa d'*Ophrys* présentant des aires de distribution disjointes (entre autres *O. santonica*, présent en Saintonge (Poitou-Charentes) et dans le sud de la France) met en exergue et confirme l'importance des facteurs géographiques dans la spéciation.

Par ailleurs, la divergence évolutive peut également se produire en l'absence d'isolement géographique et être d'ordre purement écologique. Bien longtemps, la notion même de *spéciation sympatrique* a été débattue. Or, dans le cas particulier des *Ophrys*, il est désormais admis que l'isolement reproductif pourrait assez fréquemment s'initier en réponse à un isolement écologique seul (revue par (Baguette *et al.* 2020)). Un nombre croissant d'études étaye ainsi un scénario suivant lequel des mutations modifiant de façon localement rare ou inédite le bouquet d'odeur émis par un individu d'*Ophrys* pourraient lui conférer un avantage adaptatif concernant son aptitude à attirer une nouvelle espèce de pollinisateur. Ce franchissement de pics dans le paysage olfactif de la guildes des insectes pollinisateurs, analogues aux pics de valeur sélective (*fitness*)

dans le paysage adaptatif proposé par Wright (1932), permettrait d'initier la mise en place de l'isolement reproductif prézygotique. La sélection directionnelle imposée par le nouveau pollinisateur pourrait par la suite renforcer la barrière reproductrice en façonnant la morphologie florale de la lignée émergente et/ou en induisant des décalages phénologiques (c'est-à-dire période de floraison), ces derniers engendrant de plus un isolement reproductif temporel. Ainsi, certains groupes, comme celui d'*O. scolopax*, présentent des taxa très proches qui ont des pollinisateurs différents et qui diffèrent par la taille de la fleur (par exemple plus petite chez *O. picta*) ou par des périodes de floraison sans recouvrement (par exemple plus tardive chez *O. santonica*). Il est à noter que bien que moins importantes, les préférences d'habitat peuvent aussi induire un isolement reproductif d'ordre écologique (ou géographique) chez les *Ophrys*. Si la plupart des espèces d'*Ophrys* s'épanouissent sur sol calcaire, certaines s'accommodent en effet d'un substrat au pH légèrement acide (telles qu'*O. scolopax*, *O. conradiae* et *O. tenthredinifera* parmi celles de France métropolitaine). Pour assurer leur germination, tous les *Ophrys* doivent par ailleurs établir à l'état de graine une symbiose mycorrhizienne avec des champignons du sol dépendant de l'habitat. Cependant, il n'existe à notre connaissance aucune étude démontrant que ces mycorhizes interviennent dans l'isolement reproductif entre espèces d'*Ophrys*, ce thème restant encore peu exploré (Roche *et al.* 2010 ; Schatz *et al.* 2010 ; Gervasi *et al.* 2017).

6.2.3. Conséquences de la mise en place de l'isolement reproductif dans le cas particulier du genre *Ophrys*!

La difficulté à replacer le concept d'espèce dans les deux précédents scénarios tient au fait que la cessation du flux génique peut ne pas être totale mais tend plutôt à se mettre en place progressivement en commençant pas être décelable sur les seuls traits (et gènes) impliqués dans l'*adaptation* et l'isolement reproductif (figure 6.2). Cette considération est importante car elle permet d'adopter une vision moins catégorique de la spéciation qui peut alors être vue comme un continuum allant d'une divergence évolutive en l'absence totale de flux de gènes à des scénarios plus nuancés dans lesquels l'isolement reproductif est d'abord partiel puis, éventuellement, se consolide au cours du temps. À cela s'ajoute le fait que l'isolement reproductif peut-être dynamique, aussi bien dans le temps que dans l'espace. Chez les *Ophrys* comme chez d'autres plantes et animaux, certaines espèces présentent ainsi des aires de distribution partiellement chevauchantes (*parapatriques*). C'est par exemple le cas pour des espèces à large répartition, telle qu'*O. insectifera*, qui se trouvent localement en contact avec des taxa endémiques à distribution bien plus restreinte du même groupe tels qu'*O. aymoninii* ou *O. subinsectifera* formant çà et là des *zones d'hybridation* peu étendues mais potentiellement stables dans l'espace et dans le temps (Triponez *et al.* 2013 ; Gervasi *et al.* 2017). Chez d'autres groupes taxinomiques, il a été montré

qu'une telle situation résulterait souvent d'une *remise en contact secondaire* entre deux taxa ayant préalablement divergé en allopatrie plutôt que d'une divergence parapatrique naissante. Les zones d'hybridation sont donc généralement le théâtre de la reprise même partielle et temporaire d'un flux de gènes suite à l'expansion géographique de l'aire de distribution d'au moins une des deux espèces.

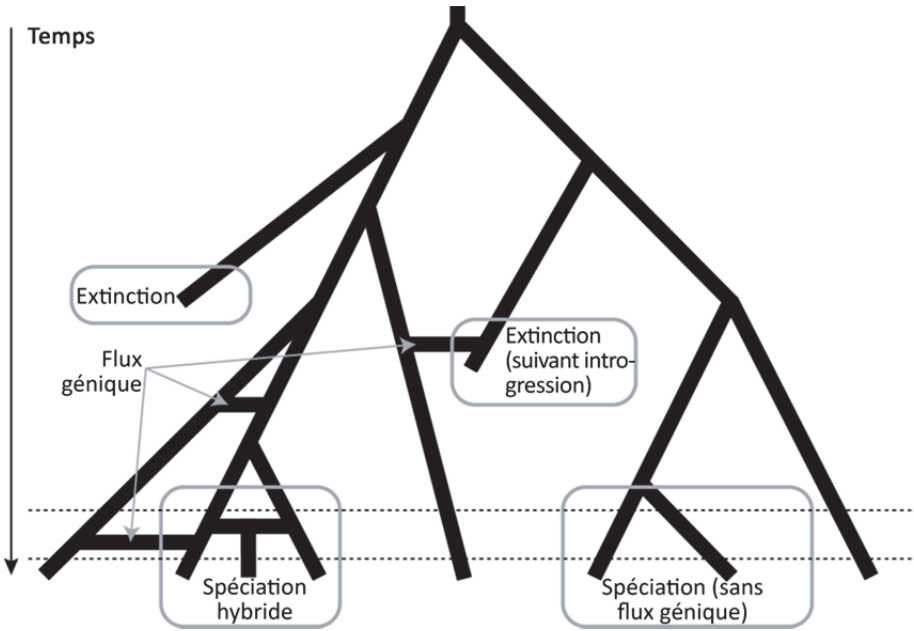


Figure 6.2. La spéciation dans un contexte d'évolution réticulée

COMMENTAIRE SUR LA FIGURE 6.2.— La partie droite illustre une divergence évolutive « classique » sans flux génétique au cours de la spéciation. La partie gauche illustre les conséquences possibles d'une évolution réticulée. L'hybridation introgressive peut tantôt être à l'origine de lignées évolutives inédites (spéciation hybride), tantôt menacer l'intégrité de lignées préexistantes, tantôt avoir lieu sans altérer de manière perceptible l'intégrité des lignées. Le positionnement du « curseur taxinomique » (en pointillés) détermine le rang taxinomique des lignées : ici 6 ou 8 suivant les critères.

Tous ces cas de divergence impliquant un flux de gènes réduit mais non nul (synonyme d'un isolement reproductif incomplet) attestent donc d'une évolution potentiellement *réticulée* dans laquelle des lignées commenceraient à diverger les unes des autres avant de potentiellement fusionner à nouveau, menant ainsi à l'émergence

d'une lignée hybride inédite (*spéciation hybride*) ou d'un *essaim hybride* en complément d'au moins une des deux lignées parentales. Il est à noter que l'hybridation n'est pas nécessairement génératrice de diversité, par exemple lorsque l'intégrité d'au moins une des lignées parentales se voit menacée par le maintien des hybrides et l'*introgression* avec les lignées parentales. Lorsque des espèces produisent des hybrides non viables, stériles, ou d'une manière générale moins aptes à survivre et à se reproduire, l'existence de barrières postzygotiques est alors supposée. Chez les *Ophrys*, les connaissances actuelles font état d'hybrides majoritairement viables (Scopece *et al.* 2007) mais qui pourraient être stériles (Vereecken *et al.* 2010) ou auraient en tout cas une valeur sélective (*fitness*) souvent moindre que celle des taxa parentaux (Cortis *et al.* 2009).

La notion d'espèce est donc *a priori* subjective dans le sens où elle dépend d'un seuil de divergence « minimal » sur lequel on positionne le « curseur taxinomique » sur le continuum de la divergence évolutive. Le positionnement de ce curseur est bien sûr d'autant plus difficile dans un contexte d'évolution réticulée. Dans le cas de l'étude de la spéciation chez *Ophrys*, il nous apparaît pertinent de considérer la lignée évolutive comme unité de travail, à partir du moment où elle montre des signaux (multiples) d'isolement pré- ou postzygotique. Ainsi, deux taxa très proches, montrant à la fois des différences, même subtiles, au(x) niveau(x) morphologique et/ou phéno-logique et attirant manifestement des espèces de pollinisateurs différentes, pourraient être considérés comme aux premiers stades du processus de spéciation. Dans ce contexte, la définition unificatrice de l'espèce basée sur une dynamique évolutive en métapopulations (De Queiroz 2005, 2007) est particulièrement intéressante car elle présente le double avantage d'une pertinence conceptuelle et d'une efficacité opérationnelle en termes de conservation. Comme la divergence entre lignées est récente et qu'une évolution réticulée est très vraisemblable, il apparaît par ailleurs peu approprié d'adopter de manière stricte le concept d'espèce phylogénétique dans le genre *Ophrys* comme proposé par certains auteurs (Bateman 2018). Ce concept vise à reconnaître comme espèces sœurs valides des groupes réciproquement monophylétiques (clades) significativement divergents les uns des autres (Devillers et Devillers-Terschuren 2013). Concernant *Ophrys* jusqu'à présent, la plupart des hypothèses phylogénétiques proposées n'étaient basées que sur une poignée de gènes tout au plus, chacun contenant de toute façon trop peu de signaux pour discriminer clairement les espèces les unes des autres. La réalisation d'études à l'échelle phylogénomique devrait permettre d'obtenir une phylogénie plus consensuelle du genre et aura au moins le mérite de mieux appréhender le degré de réticulation de son évolution. Dans l'attente, nous proposons ici de se baser sur une accumulation de preuves d'isolement reproductif dans une démarche intégrative afin de définir des taxa avec pour objectif principal d'identifier et de décrire des lignées pertinentes du point de vue de la spéciation, à savoir engagées dans un processus de divergence évolutive.

6.3. État des lieux des connaissances actuelles sur la systématique des *Ophrys*!

6.3.1. Systématique moléculaire : aperçu des connaissances actuelles!

Les études se basant sur des phylogénies moléculaires ont grandement contribué à clarifier 1) le positionnement d'*Ophrys* parmi les autres genres de la famille des Orchidaceae et 2) les relations entre lignées au sein du genre. Le genre *Ophrys* a d'abord été considéré comme genre frère d'un groupe incluant les genres *Anacamptis* (*sensu lato*) et *Serapias* (Pridgeon *et al.* 1997 ; Bateman *et al.* 2003) puis d'un groupe incluant *Anacamptis* (*sensu lato*) et *Serapias* mais aussi *Himantoglossum* (Inda *et al.* 2012). Plus récemment encore, une étude incluant en plus l'espèce *Steveniella satyrioides* suggère que ce genre monospécifique pourrait être le genre frère d'*Ophrys*, ces deux genres formant le groupe frère d'un autre clade incluant *Anacamptis* (*sensu lato*), *Serapias* et *Himantoglossum* (Jin *et al.* 2017). Si les relations entre les genres *Ophrys*, *Anacamptis*, *Himantoglossum*, *Serapias* – et dans une moindre mesure *Steveniella* – ont désormais été corroborées par des travaux utilisant des marqueurs génétiques et des méthodes sensiblement différentes, le branchement de ce clade par rapport à d'autres genres de la sous-tribu des *Orchidineae* demeure incertain.

Ces différentes études ont pour dénominateur commun l'utilisation des *espaceurs internes transcrits 1 et 2* (ITS1/ITS2 pour *Internal Transcribed Spacers 1/2*) et le gène de la petite sous-unité 5.8S de l'acide ribonucléique, une région de l'ADN ribosomique située entre les petites et grandes sous-unités (18S et 26S, respectivement). Cette portion d'ADN, portée par certains chromosomes (sur le génome nucléaire), est répétée en tandem un grand nombre de fois. Cette importante quantité d'ADN matrice facilite son amplification puis son séquençage. De plus, les sous-unités de l'ARN ribosomique sont essentielles au bon fonctionnement de tout organisme, de sorte que les fortes pressions de sélection stabilisantes s'exerçant sur les gènes qui les codent assurent une relative homogénéité de ces séquences entre espèces pourtant relativement éloignées d'un point de vue phylogénétique. Elles fournissent ainsi des régions conservées favorables pour définir des amorces « universelles », afin de cibler une amplification des régions ITS qui sont variables et informatives d'un point de vue phylogénétique. En effet, les séquences ITS ne subissent pas de telles contraintes sélectives et peuvent ainsi accumuler davantage de mutations sans que cela n'impacte de manière significative les individus qui les portent. Un tel niveau de polymorphisme permet de fournir davantage d'informations pour inférer les relations phylogénétiques entre espèces n'ayant divergé que relativement récemment. D'autres atouts de cette portion d'ADN pour l'étude de la phylogénie moléculaire des *Ophrys* ont par ailleurs été explicités par Bateman (2018).

Il est à noter que les séquences ITS peuvent en revanche se révéler inexploitable pour reconstruire une phylogénie à des niveaux taxinomiques supérieurs (par exemple à l'échelle de la famille) en raison de leur évolution trop rapide pour inférer l'homologie des caractères moléculaires. Par exemple, des séquences ITS d'espèces appartenant aux genres *Ophrys* et *Cypripedium*, dont l'ancêtre commun aurait vécu il y a plus de 75 millions d'années, sont en pratique impossibles à aligner sans ambiguïté. Pour obtenir davantage d'informations, si possible en provenance de *loci* indépendants des ITS, d'autres auteurs comme Inda *et al.* (2012) ont inclus des *loci* plastidiques (*rpl16*) et mitochondriaux (*cox1*) alors que Jin *et al.* (2017) ont inclus à la fois un plus grand nombre de *loci* plastidiques (*matK*, *psaB*, *rbcl*, *trnL-F*, *trnH-psba*) ainsi qu'un gène nucléaire additionnel, celui de la xanthine déshydrogénase (*Xdh*). Dans la mesure où ces études étaient focalisées sur des niveaux taxinomiques supérieurs, aucune n'a en revanche proposé un échantillonnage taxinomique exhaustif du genre *Ophrys*.

La phylogénie moléculaire du genre *Ophrys* a également été explorée plus en détail. Ainsi, dès 2001, Soliva *et al.* proposaient par exemple une phylogénie incluant 32 espèces et se basant sur les ITS et la séquence intronique chloroplastique *trnL-F*. Si les relations entre les différentes espèces demeurent incertaines, cette étude met en évidence l'existence de trois lignées principales qui ne correspondent pas tout à fait à la dichotomie *Euophrys/Pseudophrys* ayant traditionnellement servi à la classification des *Ophrys* sur la base de critères morpho-écologiques. Les termes *Euophrys* et *Pseudophrys* classent les *Ophrys* suivant la partie du corps de l'insecte sur laquelle sont déposées les pollinies lors de la pseudocopulation. Par définition, les *Pseudophrys* correspondent aux *Ophrys* chez lesquels les pollinies sont déposées sur la région abdominale de l'insecte pollinisateur, tandis que les *Euophrys* correspondent aux espèces chez lesquelles les pollinies sont déposées sur la région céphalique du pollinisateur. Le travail de Soliva *et al.* (2001), comme la majorité des études ultérieures, établit que les *Pseudophrys* appartiendraient à une lignée commune avec les groupes d'*O. bombyliflora*, *O. tenthredinifera* et *O. speculum*, cette lignée étant elle-même sœur d'une lignée incluant le groupe *O. insectifera* d'une part, ainsi qu'une autre lignée regroupant tous les autres *Euophrys* (*Euophrys* « récents » (Tyteca et Baguette 2017)) d'autre part. Par opposition, les *Euophrys* « archaïques » forment un groupe polyphylétique incluant à la fois le groupe *O. insectifera* et les groupes *O. bombyliflora*, *O. speculum* et *O. tenthredinifera*.

Cette topologie sera en partie contredite par les études ultérieures qui positionnent le groupe *O. insectifera* tantôt comme groupe frère des *Pseudophrys* et des autres *Euophrys* « archaïques » (Bateman *et al.* 2003, 2018), tantôt en position basale (Breitkopf *et al.* 2015 ; Devey *et al.* 2018), là où d'autres études ne parviendront pas à trancher quant à la position de ce groupe (Tyteca et Baguette 2017).

L'étude de Devey *et al.* (2008) élargit l'échantillonnage taxinomique en incorporant 131 espèces dont le séquençage des ITS et des régions chloroplastiques *trnD-trnT* et *trnH-psbA* permettra notamment de clarifier les relations entre macro-espèces (telles que définies par (Bateman *et al.* 2018)) ou espèces « tête de groupe » d'*Ophrys* (10 groupes (notés de A à J) aisément distinguables sur la base des marqueurs utilisés comme la morphologie florale). Il est à noter que les travaux de Tyteca et Baguette (2017) auront le mérite d'incorporer 107 espèces mais sur un nombre d'individus plus important encore (189) même si ces travaux se basent sur le séquençage des ITS seuls.

À ce jour, l'hypothèse phylogénétique la plus utilisée reste celle proposée par Breitkopf *et al.* (2015). Elle inclut 37 espèces d'*Ophrys* mais innove dans le fait d'avoir incorporé 5 marqueurs nucléaires développés sur la base de la première ressource génomique publiée pour le genre, à savoir la séquence d'un transcriptome d'*Ophrys sphegodes* (Sedeek *et al.* 2013). À l'instar de l'amplification des ITS, le principe du développement de ces marqueurs génétiques consiste à cibler l'amplification de régions introniques supposées variables, longues de quelques centaines de nucléotides, en ancrant des amorces sur les régions exoniques adjacentes, supposées quant à elles conservées entre espèces proches. Ces *loci* ont été désignés par les auteurs sous les appellations suivantes : *beta-galactosidase-like* (BGP), *cinnamoyl alcohol dehydrogenase* (CAD), *fatty acid desaturase* (FAD), *putative long-chain acyl-CoA-synthase* (LACS) et *transcription factor-like* (MYB). En outre, les auteurs ont incorporé LEAFY/FLORICULA (LFY), un *locus* nucléaire simple copie ayant précédemment démontré son utilité chez le genre *Ophrys* (Schlüter *et al.* 2007). Cette étude soutient elle aussi l'hypothèse selon laquelle le genre *Ophrys* comporterait trois clades principaux : un « clade A » (comprenant *O. insectifera*), un « clade B » (comprenant les groupes *O. speculum*, *O. bombyliflora*, *O. tenthredinifera* et *O. fusca*) et un « clade C » regroupant tous les autres *Euophrys* (*O. apifera*, *O. heldreichii*, *O. umbilicata*, *O. scolopax*, *O. holoserica* (syn. *O. fuciflora*) et *O. sphegodes* (les trois derniers étant difficiles à discriminer)).

6.3.2. Systématique moléculaire à l'ère de la phylogénomique

L'hypothèse phylogénétique la plus récente concernant le genre *Ophrys* a été publiée par Bateman *et al.* (2018). Elle n'inclut « que » 32 espèces d'*Ophrys* mais peut être considérée comme la première étude *phylogénomique* pour le genre dans la mesure où elle se base sur une matrice de 4 159 variants génétiques (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) qui constituent autant de caractères obtenus par une approche de sous-échantillonnage du génome de type RADseq (*Restriction site Associated DNA sequencing*). Le génome des *Ophrys* étant de trop grande taille pour être intégralement séquencé simultanément sur un nombre satisfaisant d'individus, le principe

de cette approche consiste dans un premier temps à faire digérer l'ADN génomique total par des enzymes de restriction. Ces endonucléases coupent l'ADN dès qu'elles reconnaissent sur sa séquence un motif particulier. Par exemple, l'enzyme de restriction EcoRI entre en action dès qu'elle est en présence des 6 nucléotides GAATTC, mais d'autres enzymes reconnaîtront d'autres motifs, parfois de taille différente, qui leur sont propres. Les extrémités de ces fragments sont ensuite séquencées par des techniques de séquençage haut débit et les lectures traitées pour fournir des marqueurs génétiques comparables entre individus, populations et espèces. Bien que l'appellation RADseq corresponde souvent à un terme générique regroupant dans la réalité une multitude de protocoles, tous font intervenir au moins une étape de digestion du génome par au moins une enzyme de restriction et un séquençage des fragments obtenus par des méthodes de séquençage haut débit (on parle aussi parfois de « méthodes de génotypage par séquençage »). Les résultats de l'étude de Bateman *et al.* (2018) sont globalement concordants avec les précédents résultats de Breitkopf *et al.* (2015) à l'exception notable de la position du clade *O. insectifera*. Par ailleurs, l'étude de Bateman *et al.* clarifie les relations systématiques entre les différents clades d'*Ophrys* (appelés « macro-espèces » par Bateman *et al.* (2018)).

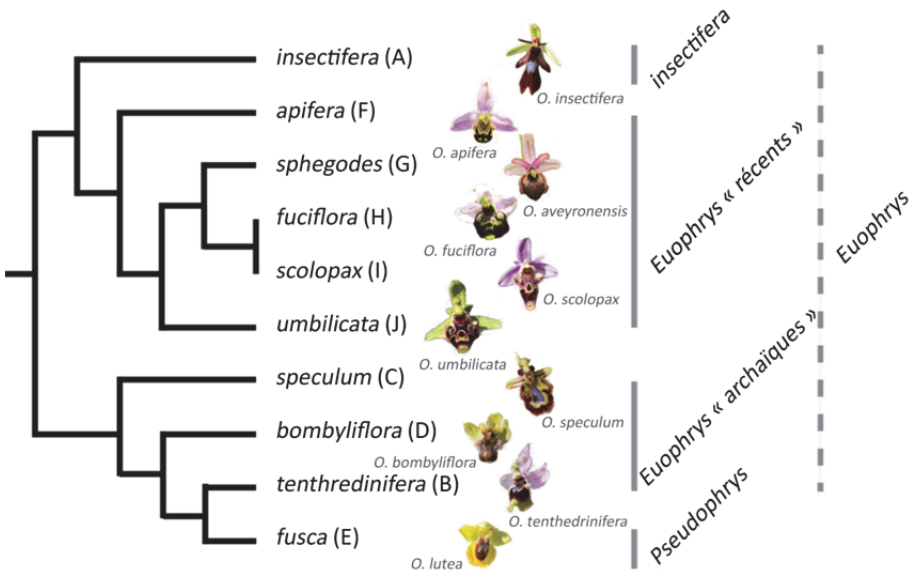


Figure 6.3. Topologie la plus probable pour représenter les relations phylogénétiques entre les espèces « tête de groupe » (macro-espèces) d'*Ophrys* à la lumière des données génomiques les plus récentes (photos de J. Bertrand, B. Schatz et « Orchi » (Wikimedia Commons)).

6.4. Génomique et taxinomie intégrative : perspectives et enjeux!

6.4.1. Vers une généralisation des jeux de données à l'échelle génomique

Comme bon nombre d'autres organismes non modèles, le système *Ophrys* bénéficie à l'heure actuelle de la relative démocratisation des méthodes de séquençage haut débit. Des travaux pionniers tels que ceux de Sedeeck *et al.* (2014) à une échelle « intraspécifique » ou de Bateman *et al.* (2018) à une échelle « interspécifique » devraient ainsi tendre à se généraliser au cours des prochaines années. L'étude de systèmes subissant des phénomènes de diversification évolutive si « explosifs » impose en effet l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs génétiques pour 1) espérer avoir la résolution suffisante pour inférer des hypothèses phylogénétiques informatives et fiables et 2) confronter les différentes topologies obtenues à partir de ces milliers de marqueurs génétiques afin d'espérer appréhender le degré de réticulation de l'arbre évolutif des *Ophrys*, en tentant notamment de distinguer les phénomènes de flux de gènes (introgression) de ceux de *tri incomplet des lignées* (*incomplete lineage sorting*). Pour ce faire, certains optent pour l'utilisation d'outils dérivés de la génétique des populations *a priori* dédiés à l'étude de la diversité et de la différenciation génétiques à une échelle intraspécifique : c'est par exemple le cas des approches de séquençage de type RAD (ou génotypage par séquençage).

Si ces approches se révèlent puissantes pour résoudre l'histoire évolutive de lignées proches, elles se frotteront à différentes limites à chaque fois que sera abordée l'échelle taxinomique supérieure. Parmi les principaux inconvénients de ce type d'approches, il est possible de citer le fait que les modifications de l'ADN expliquent que les sites de restrictions au niveau desquels les enzymes coupent l'ADN ont d'autant plus de chances de varier que les individus génotypés sont divergents du point de vue évolutif. En conséquence, la quantité de données manquantes dans la matrice tend à augmenter au fur et à mesure que sont incorporées des lignées de plus en plus divergentes, diminuant d'autant la taille du jeu de données. Une alternative serait d'utiliser des méthodes globales qui consistent, à la base, à séquencer de façon aléatoire des portions de génome en visant à assembler *de novo* le plus grand nombre de fragments possible en espérant trouver des régions homologues entre individus.

Ces approches ont récemment permis de séquencer et d'assembler avec succès à un coût maîtrisé des portions relativement répétées du génome des *Ophrys* telles que celles des chloroplastes d'*O. sphegodes* et *O. fusca iricolor* (Roma *et al.* 2018) ou encore d'*O. aveyronensis* (Bertrand *et al.* 2019). Des sophistications de ces approches permettent par ailleurs de cibler des zones particulières du génome mais leur développement nécessite des connaissances préalables étendues du génome. À ce jour, il n'existe que quatre transcriptomes (Piñeiro Fernández *et al.* 2019) et aucun génome

de référence publié pour *Ophrys*. Ce retard relatif dans la génération de ressources génomiques disponibles pour *Ophrys* peut en grande partie s'expliquer par la taille importante des génomes de ces plantes (Leitch *et al.* 2009). Au demeurant, on peut s'attendre à la publication prochaine de davantage de génomes chloroplastiques et de transcriptomes, de même qu'à celle du premier génome de référence. Dès que ce vide sera comblé, tous les ingrédients seront disponibles pour mettre en place des approches de type capture de séquence qui pourront permettre de séquencer simultanément des centaines, voire des milliers de régions génomiques.

6.4.2. Démarche de taxinomie intégrative!

Les confusions taxinomiques au sein du genre *Ophrys* ont des conséquences non négligeables en termes de conservation. Plusieurs de ses espèces sont classées dans la catégorie « données insuffisantes » des listes rouges de l'IUCN, y compris en France (IUCN *et al.* 2010), notamment du fait d'incertitudes concernant leur rang taxinomique. Pour cette raison, il est urgent de redéfinir les limites entre espèces d'*Ophrys* pour améliorer la connaissance de leur état de conservation et l'appropriation de ces limites par les acteurs de terrain.

Comme mentionné précédemment, tous les scientifiques 1) n'ont pas la même définition de ce qu'est une espèce, 2) n'utilisent pas les mêmes critères pour distinguer les espèces les unes des autres (Bateman *et al.* 2011 ; Vereecken *et al.* 2011), et 3) ne requièrent pas le même niveau de différenciation entre deux taxa pour considérer ces derniers comme des espèces (c'est-à-dire l'opposition entre les *lumpers* et les *splitters* (Pedersen et Faurholdt 2007 ; Delforge 2016)). En particulier, il existe un débat (Bateman *et al.* 2011 ; Vereecken *et al.* 2011) entre les partisans des critères « morphogénétiques », qui soutiennent que les taxa devraient avoir atteint la monophylie réciproque et/ou être caractérisés par des caractères morphologiques diagnostiques pour être considérés comme de « bonnes » espèces (Devey *et al.* 2008), et les partisans des critères « éco-éthologiques », qui soutiennent que les interactions entre les *Ophrys* et les pollinisateurs sont plus informatives que les marqueurs neutres en raison de leur rôle clé dans la spéciation (Schiestl et Ayasse 2002 ; Ayasse *et al.* 2011).

Dans le même temps, les orchidophiles continuent de décrire de nouvelles espèces d'*Ophrys* sur des bases essentiellement morphologiques et à élever des variétés ou des sous-espèces au rang d'espèces, un phénomène dénommé « inflation taxinomique » (Isaac *et al.* 2004). Cette forte activité de la part des orchidophiles se traduit par l'édition d'ouvrages visant à décrire de nouvelles espèces, souvent sans réelle justification scientifique. Dans le même temps, les scientifiques tardent à réévaluer la pertinence de chacune de ces nouvelles espèces d'*Ophrys* du fait de la logistique complexe d'échantillonnage à réaliser sur l'ensemble du bassin méditerranéen et des coûts d'analyse.

Ceci explique le débat perpétuel autour de l'identification des *Ophrys*, et il convient de trouver une issue constructive à ce débat.

Dans ce contexte, l'application d'une démarche de taxinomie dite « intégrative », qui permettrait de réconcilier critères morphogénétiques et éco-éthologiques, semble particulièrement prometteuse. Parce qu'il est souvent utile de combiner l'analyse de plusieurs types de données – idéalement génétiques et phénotypiques – pour détecter au mieux les limites entre espèces, notamment dans le cas de complexes d'espèces ayant divergé récemment, de plus en plus d'auteurs préconisent l'utilisation d'une telle démarche (Dayrat 2005 ; Will *et al.* 2005 ; Padial *et al.* 2010), plutôt que des approches reposant sur l'utilisation d'un type de données unique, comme le *metabarcoding* moléculaire (Hebert *et al.* 2003). Cependant, dans la plupart des études taxinomiques se voulant intégratives, les données génétiques et phénotypiques ont été intégrées de manière plutôt « itérative », ce qui implique de hiérarchiser ces données et introduit donc une grande part de subjectivité dans cette démarche (Schlick-Steiner *et al.* 2010 ; Yeats *et al.* 2011). Il est à noter qu'au cours de ces dernières années, plusieurs auteurs se sont pourtant employés à développer des méthodes de délimitation des espèces basées sur des modèles statistiques faisant des hypothèses explicites sur les processus évolutifs à l'œuvre afin d'améliorer l'objectivité et la rigueur statistique de ces délimitations (Fujita *et al.* 2012 ; Naciri et Linder 2015).

Ce n'est cependant que récemment que de telles méthodes ont été étendues à l'analyse simultanée de données génétiques et non génétiques (phénotypiques ou géographiques, par exemple), ouvrant ainsi la voie à une taxinomie véritablement intégrative (Guillot *et al.* 2012 ; Edwards et Knowles 2014 ; Solís-Lemus *et al.* 2015). À titre d'exemple, le programme iBPP, mis au point par Solís-Lemus *et al.* (2015), est une extension du programme BPP (Rannala et Yang 2003 ; Yang 2015) qui permet d'associer à l'analyse de séquences d'ADN celle de données phénotypiques, dont l'évolution est modélisée par un mouvement brownien. Ce programme permet de tester l'adéquation entre plusieurs modèles de délimitation d'espèces et lesdites données, analysées simultanément ou indépendamment les unes des autres, dans un cadre bayésien. Ainsi, l'intérêt majeur de cette méthode est qu'elle permet de s'affranchir d'une hiérarchisation *a priori* des différents types de données et d'une décision arbitraire quant au niveau de différenciation requis pour que deux taxa soient reconnus comme deux espèces distinctes.!

Ce programme a été récemment utilisé pour redéfinir les limites d'espèces au sein du groupe des 12 *Pseudophrys* de France, pour lesquelles ont été collectées des données génétiques et phénotypiques (morphologie et odeurs florales) (Joffard 2017). Analysées seules, les données génétiques ne permettent de reconnaître que 4 espèces. Analysées en combinaison avec les données morphologiques et/ou chimiques, elles permettent en revanche de distinguer 11 et 10 espèces, respectivement, tandis que l'analyse

simultanée de ces trois types de données aboutit à la reconnaissance de 10 espèces, les paires *O. bilunulata/O. marmorata* d'une part et *O. funerea/O. zonata* d'autre part étant fusionnées. Ces deux fusions font sens puisque la similarité morphologique et écologique de ces deux paires de taxa avait déjà été soulignée par certains auteurs (Bournérias et Prat 2005 ; Tison et Foucault 2014). Par ailleurs, il est intéressant de constater que les données morphologiques ont un pouvoir résolutif équivalent, voire supérieur, à celui des données d'odeurs florales, bien que ces dernières jouent indéniablement un rôle clé dans la spéciation. Les orchidophiles amateurs ou les acteurs de la conservation pourraient donc pleinement contribuer à la recherche sur la taxinomie des *Ophrys* via la collecte de données particulièrement informatives sur le plan systématique.

Cependant, nous attirons l'attention sur deux précautions à prendre dès lors qu'est appliquée cette démarche de taxinomie intégrative : 1) les informations apportées pour chaque espèce doivent être représentatives de l'ensemble de l'aire de distribution de cette dernière, incluant en particulier sa localité type, afin de pouvoir en toute confiance associer un nom d'espèce validé aux données collectées ; 2) il est impératif de garder à l'esprit que les espèces ainsi redélimitées restent avant tout des hypothèses que les progrès taxinomiques (collecte et inclusion de nouvelles données, par exemple) sont susceptibles de remettre en question. Cette approche propose différents scénarios avec différents nombres d'espèces et avec une valeur de vraisemblance. Ainsi, le choix final de fusionner deux taxa reste celui des scientifiques adoptant cette approche ; ils doivent donc expliquer ce choix et argumenter en faveur ou non de ces fusions. En tenant compte de ces précautions, nous encourageons ici l'application de cette démarche de taxinomie intégrative à d'autres groupes d'*Ophrys* afin de résoudre les problèmes de confusion taxinomique au sein de ce genre et d'améliorer les stratégies de conservation de ces espèces emblématiques mais souvent menacées.

6.5. Conclusion

En dépit de l'apport des outils de la génétique, et ce depuis une vingtaine d'années maintenant, la systématique (de même que la taxinomie) demeure particulièrement problématique au niveau du genre *Ophrys*. Le nombre croissant de génomes chloroplastiques disponibles s'accompagnera dans les prochains mois de la mise à disposition de plusieurs transcriptomes supplémentaires et, à moyen terme, d'un génome de référence de haute qualité pour *Ophrys*. Ces ressources ouvriront à coup sûr une nouvelle ère dans le développement de marqueurs génétiques inédits pour parfaire les connaissances concernant la systématique du genre. Elles ouvriront aussi pleinement la voie de l'étude des bases génomiques de l'adaptation et de l'isolement reproductif. En parallèle, leur couplage à des approches de taxinomie intégrative s'appuyant sur de solides études de terrain intégrant des données phénotypiques (morphologie, odeur, etc.) et écologiques

(variables d'habitats, estimation de la valeur sélective relative) devrait permettre de faire un grand bond en avant dans la compréhension des causes de la radiation évolutive des *Ophrys*.

6.6. Remerciements

Nous remercions les différents supports financiers ayant contribué à ces recherches : l'OSU-Oreme pour les observations à long terme, le GDR Pollineco n° 2058 (CNRS-MTES) ; la thèse de Nina Joffard a été financée par HESAM Université et son programme « Paris Nouveaux Mondes ». Michel Baguette et Joris Bertrand sont membres du Labex TULIP (ANR-10-LABX-41) ; Nina Joffard et Bertrand Schatz sont membres du Labex CEMEB. Michel Baguette remercie Pierre Devillers, Virginie M. Stevens et Daniel Tyteca pour leurs apports considérables.

6.7. Bibliographie

- Ayasse, M., Stökl, J., Francke, W. (2011). Chemical ecology and pollinator-driven speciation in sexually deceptive orchids. *Phytochemistry*, 72(13), 1667–1677.
- Baguette, M., Bertrand, J.A.M., Stevens, V.M., Schatz, B. (2020). Why are there so many Bee-Orchid species? Adaptive radiation by intraspecific competition for mnesic pollinators. *Biological Reviews*, sous presse.
- Bateman, R.M. (2018). Two bees or not two bees? An overview of *Ophrys* systematics. *Ber. Arbeitskrs. Heim. Orchid.*, 35(1), 5–46.
- Bateman, R.M., Hollingdworth, P.M., Preston, J., Yi-Bo, L., Pridgeon, A.M., Chase, M.W. (2003). Molecular phylogenetics and evolution of orchidineae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 142, 1–40.
- Bateman, R.M., Bradshaw, E., Devey, D.S., Glover, B.J., Malmgren, S., Sramkó, G., Rudall, P.J. (2011). Species arguments: Clarifying competing concepts of species delimitation in the pseudo-copulatory orchid genus *Ophrys*. *Bot. J. Linn. Soc.*, 165(4), 336–347.
- Bateman, R.M., Sramkó, G., Paun, O. (2018). Integrating restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) with morphological cladistic analysis clarifies evolutionary relationships among major species groups of bee orchids. *Ann. Bot.*, 121(1), 85–105.
- Bertrand, J.A.M., Gibert, A., Llauro, C., Panaud, O. (2019). Characterization of the complete plastome of *Ophrys aveyronensis*, a Euro-Mediterranean orchid with an intriguing disjunct geographic distribution. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2), 3256–3257.

- Bournérias, M., Prat, D. *et al.* (2005). *Les Orchidées de France, Belgique et Luxembourg* (2^e édition). Biotope Éditions, Mèze.
- Breitkopf, H., Onstein, R.E., Cafasso, D., Schlüter, P.M., Cozzolino, S. (2015). Multiple shifts to different pollinators fueled rapid diversification in sexually deceptive *Ophrys* orchids. *New Phytol.*, 207(2), 377–389.
- Cortis, P., Vereecken, N.J., Schiestl, F.P., Barone Lumaga, M.R., Scrugli, A., Cozzolino, S. (2009). Pollinator convergence and the nature of species' boundaries in sympatric Sardinian *Ophrys* (Orchidaceae). *Ann. Bot.*, 104(3), 497–506.
- Danforth, B.N., Cardinal, S., Praz, C., Almeida, E.A.B., Michez, D. (2013). The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annu. Rev. Entomol.*, 58, 57–78.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.*, 85(3), 407–415.
- De Queiroz, K. (2005). Different species problem and their resolution. *Bioessays*, 27(12), 1263–1269.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.*, 56(6), 879–886.
- Delforge, P. (2016). *Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient*. Delachaux & Niestlé, Lausanne.
- Devey, D.S., Bateman, R.M., Fay, M.F., Hawkins, J.A. (2008). Friends or relatives? Phylogenetics and species delimitation in the controversial European orchid genus *Ophrys*. *Ann. Bot.*, 101(3), 385–402.
- Devillers, P., Devillers-Terschuren, J. (2013). Orchidées et concepts modernes de l'espèce. *Natural. Belges*, 94(26), 61–74.
- Edwards, D.L., Knowles, L.L. (2014). Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy?. *Proc. R. Soc. B*, 281(1777), 20132765–20132765.
- Fujita, M.K., Leaché, A.D., Burbrink, F.T., McGuire, J.A., Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, 27(9), 480–488.
- Gervasi, D.L., Selosse, M.A., Sauve, M., Wittko, F., Vereecken, N.J., Cozzolino, S., Schiestl, F.P. (2017). Floral scent and species divergence in a pair of sexually deceptive orchids. *Ecol. Evol.*, 7(15), 6023–6034.
- Guillot, G., Renaud, S., Ledevin, R., Michaux, J., Claude, J. (2012). A unifying model for the analysis of phenotypic, genetic, and geographic data. *Syst. Biol.*, 61(6), 897–911.

- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.*, 270(1512), 313–321.
- Inda, L.A., Pimentel, M., Chase, M.W. (2012). Phylogenetics of tribe Orchidoideae (Orchidaceae: Orchidoideae) based on combined DNA matrices: inferences regarding timing of diversification and evolution of pollination syndromes. *Ann. Bot.*, 110(1), 71–90.
- Isaac, N.J., Mallet, J., Mace, G.M. (2004). Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends Ecol. Evol.*, 19(9), 464–469.
- IUCN France, MNHN, FCBN, SFO (2010). La liste rouge des espèces menacées de France : orchidées de France métropolitaine. Rapport.
- Jin, W.-T., Shuiteman, A., Chase, M.W., Li, J.-W., Chung, S.-W., Hsu, T.-C., Jin, X.H. (2017). Phylogenetics of subtribe Orchidinae s.l. (Orchidaceae; Orchidoideae) based on seven markers (plastid *matK*, *psaB*, *rbcL*, *trnL-F*, *trnH-psba*, and nuclear *nrITS*, *Xdh*): implications for generic delimitation. *BMC Plant Biol.*, 17(1), 222.
- Joffard, N. (2017). Diversification des orchidées méditerranéennes : niches de pollinisation, évolution des traits floraux et taxinomie intégrative. Thèse de doctorat, Université PSL, Paris.
- 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(1), 478–490.
- Leitch, I.J., Kahandawala, I., Suda, J., Hanson, L., Ingrouille, M.J., Chase, M.W., Fay, M.F. (2009). Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Ann. Bot.*, 104(3), 469–481.
- Mallet, J. (2005). Hybridisation as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.*, 20(5), 229–237.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Naciri, Y., Linder, H.P. (2015). Species delimitation and relationships: The dance of the seven veils. *Taxon*, 64(1), 3–16.
- Nieto, A., Roberts, S.P., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., García Criado, M. *et al.* (2014). European red list of bees. Office des publications de l'Union européenne, Luxembourg, 98.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I.J., Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.*, 7, 16.
- Pedersen, H.Æ., Faurholdt, N. (2007). *Ophrys: the bee orchids of Europe*. Royal Botanic Gardens, Kew.

- Piñeiro Fernández, L., Byers, K.J.R.P., Cai, J., Seedeek, K.E.M., Kellenberger, R.T., Russo, A., Qi, W., Fournier Aquino, C. (2019) A phylogenomic analysis of the floral transcriptomes of sexually deceptive and rewarding European orchids, *Ophrys* and *Gymnadenia*, *Front. Plant Sci.*, 10, 1553.
- Pridgeon, A.M., Bateman, R.M., Cox, A.V., Hapeman, J.R., Chase, M.W. (1997). Phylogenetics of subtribe Orchidineae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on Nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana*, 12(2), 89–109.
- Rannala, B., Yang, Z. (2003). Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics*, 164(4), 1645–1656.
- Roche, S.A., Carter, R.J., Peakall, R., Smith, L.M., Whitehead, M.R., Linde, C.C. (2010). A narrow group of monophyletic *Tulasnella* (Tulasnellaceae) symbiont lineages are associated with multiple species of *Chiloglottis* (orchidaceae): Implications for orchid diversity. *Am. J. Bot.*, 97(8), 1313–1327.
- Roma, L., Cozzolino, S., Schlüter, P.M., Scopece, G., Cafaso, D. (2018). The complete plastid genomes of *Ophrys iricolor* and *O. sphegodes* (Orchidaceae) and comparative analyses with other orchids. *PLOS One*, 13(9), e0204174.
- Schatz, B. (2017). The orchid species of Cavallo island (Lavezzi archipelago, Corsica): an amazing abundance of the protected species *Gennaria diphylla*. *Ecologia Mediterranea*, 43(2), 159–170.
- Schatz, B., Geoffroy, A., Dainat, B., Bessièrè, J.M., Buatois, B., Hossaert-McKey, M., Selosse, M.A. (2010). A case study of modified interactions with symbionts in a hybrid Mediterranean orchid. *Am. J. Bot.*, 97(8), 1278–1288.
- Schatz, B., Sauvion, N., Kjellberg, F., Nel, A. (2017). Plant-insect interactions: a paleontological and an evolutionary perspective. *Advances in Botanical Research*, 81, 1–24.
- Schiestl, F.P., Ayasse, M. (2002). Do changes in floral odor cause speciation in sexually deceptive orchids?. *Plant Syst. Evol.*, 234(1-4), 111–119.
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R.H. (2010). Integrative taxonomy: A multisource approach to exploring biodiversity. *Annu. Rev. Entomol.*, 55, 421–438.
- Schlüter, P.M., Kohl, G., Stuessy, T.F., Paulus, H.F. (2007). A screen of low-copy nuclear genes reveals the LFY gene as phylogenetically informative in closely related species of orchids (*Ophrys*). *Taxon*, 56(2), 493–504.
- Scopece, G., Musacchio, A., Widmer, A., Cozzolino, S. (2007). Patterns of reproductive isolation in Mediterranean deceptive orchids. *Evolution*, 61(11), 2623–2642.

- Sedeek, K.E.M., Qi, W., Schauer, M.A., Gupta, A.K., Poveda, L., Xu, A., Liu, Z., Grossniklaus, U., Schiestl, F.P., Schlüter, P.M. (2013). Transcriptome and proteome data reveal candidate genes for pollinator attraction in sexually deceptive orchids. *PLOS One*, 8(5), e64621.
- Sedeek, K.E.M., Scopece, G., Staedler, Y.M., Schönenberger, J., Cozzolino, S., Schiestl, F.P., Schlüter, P.M. (2014). Genic rather than genome-wide differences between sexually deceptive *Ophrys* orchids with different pollinators. *Mol. Ecol.*, 23(24), 6192–6205.
- Solís-Lemus, C., Knowles, L.L., Ané, C. (2015). Bayesian species delimitation combining multiple genes and traits in a unified framework. *Evolution*, 69(2), 492–507.
- Soliva, M., Kocyan, A., Widmer, A. (2001). Molecular phylogenetics of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Mol. Phylogenetics Evol.*, 20(1), 78–88.
- Tison, J., de Foucault, B. (2014). *Flora gallica : flore de France*. Biotope Éditions, Mèze.
- Triponez, Y., Arrigo, N., Pellissier, L., Schatz, B., Alvarez, N. (2013). Morphological, ecological and genetic aspects associated with endemism in the Fly Orchid group. *Mol. Ecol.*, 22(5), 1431–1446.
- Tyteca, D., Baguette, M. (2017). *Ophrys* (Orchidaceae) systematics – When molecular phylogenetics, morphology and biology reconcile. *Ber. Arbeitskrs. Heim. Orchid.*, 34(1), 37–103.
- Vereecken, N.J., Cozzolino, S., Schiestl, F.P. (2010). Hybrid floral scent novelty drives pollinator shift in sexually deceptive orchids. *BMC Evol. Biol.*, 10, 103.
- Vereecken, N.J., Streinzer, M., Ayasse, M., Spaethe, J., Paulus, H.F., Stökl, J., Schiestl, F.P. (2011). Integrating past and present studies on *Ophrys* pollination: a comment on Bradshaw *et al.* *Bot. J. Linn. Soc.*, 165, 329–335.
- Will, K.W., Mishler, B.D., Wheeler, Q.D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.*, 54(5), 844–851.
- Wright, S. (1932). The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding, and selection in evolution. *Proceedings of the Sixth International Congress on Genetic*, 355–366.
- Yang, Z. (2015). The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Curr. Zool.*, 61(5), 854–865.
- Yeates, D.K., Seago, A., Nelson, L., Cameron, S.L., Joseph, L., Trueman, J.W.H. (2011). Integrative taxonomy, or iterative taxonomy?. *Syst. Entomol.*, 36(2), 209–217.

