

ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE COMPARÉE DE TROIS TAXONS DU GENRE *HYOSERIS* L.

J. C. KLEIN, M. SAHNOUNE, J. VALLÈS XIRAU,
M. CERBAH, J. COULAUD & S. SILIAK-YAKOVLEV
(COLLABORATION TECHNIQUE: O. ROBIN)

Abstract

Three taxa belonging to the genus *Hyoseris* L. are compared from the caryological point of view. *H. radiata* L. and *H. scabra* L. are regarded as "good species", whereas the taxonomic status of *H. lucida* L. is doubtful. This study is carried out on several populations collected in North Africa and the Iberian peninsula. Karyotypic differences occur in the morphology of chromosomes and in their banding patterns with the fluorochromes Chromomycin A₃ and Hoechst 33258, which settle on DNA rich in GC and AT bases respectively. Chromosome morphology differentiates *H. scabra* from both other taxa, which can be distinguished from each other by the number of GC-rich centromeric bands. The length of the heterochromatic part of chromosome pair 3 displays a variation within *H. scabra*. Ribosomal RNA genes are located by *in situ* hybridization on chromosome pair 3 in *H. scabra* and provide additional evolutionary markers.

Introduction

Le genre *Hyoseris* L., qui s'étend sur tout le pourtour méditerranéen, se structure autour de 2 espèces: *H. scabra* L. et *H. radiata* L.. Chez *H. radiata*, la morphologie des feuilles varie de l'état charnu, en bordure de mer, à l'état non charnu en situation continentale. SELL (1976) distingue ainsi la sous-espèce littorale *graeca* Halacsy (= *H. lucida* L.) de la sous-espèce *radiata*.

Depuis plusieurs décennies, les systématiciens ont tendance à extraire de *H. radiata* les spécimens à feuilles charnues, pour les ériger en nouvelles espèces: *H. taurina* (Pamp.) G. Martinoli, *H. baetica* (Kunze) Font Quer (*) (repris par GARBARI (1982) in *Flora d'Italia*), *H. frutescens* Brullo & Pavone.

A travers les caractères cytogénétiques révélés par les méthodes modernes, nous essaierons de tester la validité des taxons ainsi détachés en les comparant aux deux espèces les plus généralement acceptées, *H. radiata* et *H. scabra*.

Pour débiter cette étude, les premiers échantillonnages ont été effectués en Algérie orientale, à la fois dans la zone littorale et dans les régions continentales de Sétif et de Constantine. Ils ont été ensuite étendus à une population égyptienne, ainsi qu'à deux populations ibériques.

(*) *H. radiata* var *baetica* (G. Kunze) Pau & Font Quer in Font Quer *Iter Maroc*. 1928 n. 426 (30-IV-1929), in sched.

Materiel et methodes

L'origine et les caractéristiques des populations étudiées sont présentées dans le Tableau 1. Pour l'étude du caryotype, trois techniques de marquage sont mises en oeuvre: 1, coloration de Feulgen pour l'établissement des idiogrammes; 2, fluorochrome banding avec la chromomycine A₃ (CMA₃) et le Hoechst 33258 (Ho), pour mettre en évidence les zones d'ADN riches respectivement en bases GC et AT; 3, hybridation *in situ* avec une sonde 18S d'ADN ribosomal.

Après le prétraitement à la colchicine 0,05 % pendant 2 h, la fixation est réalisée dans un mélange d'éthanol et d'acide acétique (3:1) pendant au moins 24 h. L'hydrolyse est effectuée dans l'HCl N, 12 min à 60°C pour la coloration au réactif de Schiff et dans l'acide acétique à 45 %, 15 min à 60°C, pour la coloration aux fluorochromes et pour l'hybridation *in situ*.

Dans les trois cas, l'écrasement est réalisé dans une goutte d'acide acétique à 45 % fraîchement préparé (ÖSTERGREN & HANEEN, 1962). Après examen des préparations les lamelles sont décollées à l'aide de neige carbonique (CONGER & FAIRCHILD, 1953).

La technique d'AMBROS & SCHWEIZER (1987) a été utilisée pour la coloration à la chromomycine A₃ et celle de MARTIN & HEISEMANN (1988) pour la coloration au Hoechst 33258. Les deux techniques ont été légèrement modifiées et adaptées à notre matériel (COULAUD & al., 1995; CERBAH & al., 1995).

Les organisateurs nucléolaires (NORs) sont mis en évidence dans *H. scabra* par hybridation *in situ*, selon la méthode d'HESLOP-HARRISON & al (1991) modifiée. La sonde d'ADN ribosomal utilisée représente un fragment Taq de 0,8 kb contenant une partie (ADNr 18S de blé) de la pTA71 (GERLACH & BEDROOK, 1979).

Les idiogrammes sont construits à partir des mesures obtenues sur 5 plaques métaphasiques colorées au Feulgen. Les marquages obtenus par les colorations différentielles et l'hybridation *in situ* sont reportés sur les idiogrammes.

Espèces	Localités	Altitude	Collecteur	no d'herbier
<i>H. radiata</i>	Sétif (Algérie)	1 100 m s m	M. Sahnoune	BCF 41059
	Begur, près du château (Catalogne)	bord de la mer	J. Vallès	BCF 39363
	Blanes, Sa Palomera (Catalogne)	100 m s m	J. Vallès	BCF 39370
<i>H. lucida</i>	Ijouraf (Algérie)	bord de la mer	M. Sahnoune	BCF 41058
	Burg el Arab (Egypte)	bord de la mer	J. Vallès	BCF 40424
<i>H. scabra</i>	Akbou (Algérie)	300 m s m	M. Sahnoune	BCF 41060

Tableau 1. Origine et caractéristiques des populations étudiées

Resultats et discussion

Les taxons que nous avons étudiés sont tous à $2n = 16$ chromosomes. Ce nombre a déjà été signalé par divers auteurs comme, entre autres, MARTINOLI (1953), BARTOLO & al. (1978), BRULLO & PAVONE (1988), SAHNOUNE (1985), TZANOUDAKIS & KYPRIOTAKIS (1987) et BRULLO & al. (1990).

Les caryotypes de *H. radiata* et de *H. lucida* apparaissent très similaires après la coloration de Feulgen. Par contre, le fluorochrome banding (CMA_3) montre quelques différences au niveau du nombre de bandes centromériques et de chromocentres interphasiques (Tab. 2. Fig. 1a, b, c ; 2a et b).

La coloration au Hoechst ne révèle aucune bande riche en AT dans le matériel étudié. Cependant, les satellites, fortement marqués par la CMA_3 , apparaissent ainsi nettement moins colorés que le reste du chromosome.

Hyoseris scabra présente un caryotype différent des autres taxons, et ce, aussi bien pour la morphologie des chromosomes que pour l'emplacement des bandes CMA_3 (Fig. 3a, b, c et 4). Cette espèce apparaît donc nettement bien différenciée. La paire chromosomique porteuse de la constriction secondaire montre une grande variabilité de la longueur de la partie du bras court située entre le centromère et la constriction secondaire (Fig. 3 et 4, flèches). La coloration à la CMA_3 montre que tout le bras court est hétérochromatique et riche en bases GC. La variabilité observée peut s'expliquer par le fait que des séquences répétées peuvent évoluer très rapidement et augmenter en nombre, comme cela a été signalé pour d'autres taxons. Peut-on considérer cette variabilité comme un exemple d'ADN "égoïste" ? L'étude mérite d'être approfondie dans le cadre particulièrement propice du genre *Hyoseris*.

L'hybridation *in situ* a montré chez *H. scabra* un site d'ADNr au niveau de la constriction secondaire sur la paire chromosomique n° 3. Ce site contient les gènes d'ADNr 18S-5.8S-26S et représente la localisation de l'organisateur nucléolaire.

Dans les trois taxons, la plus grande paire de chromosomes montre une fragilité centromérique (Fig. 1a). Ce phénomène de fragilité peut suggérer une origine de cette paire par fusion robertsonienne, mécanisme qui est le plus souvent à la base du processus de dysploidie descendante.

Nos premières observations soulèvent plusieurs problèmes fondamentaux d'évolution qui sont plus particulièrement intéressants à étudier dans un complexe

espèces	Nombre de			
	bandes télomériques	bandes centromériques	chromocentres interphasiques	nucléoles
<i>H. radiata</i>	4	6	12 et +	2 à 4
<i>H. lucida</i>	4	2	4 gros et 2 à 4 petits	2 à 4
<i>H. scabra</i>	2	2 à 4	1 à 2 gros et 2 petits	1 à 2

Tableau 2. Résultats de la coloration à la chromomycine et nombre de nucléoles des trois taxons étudiés.

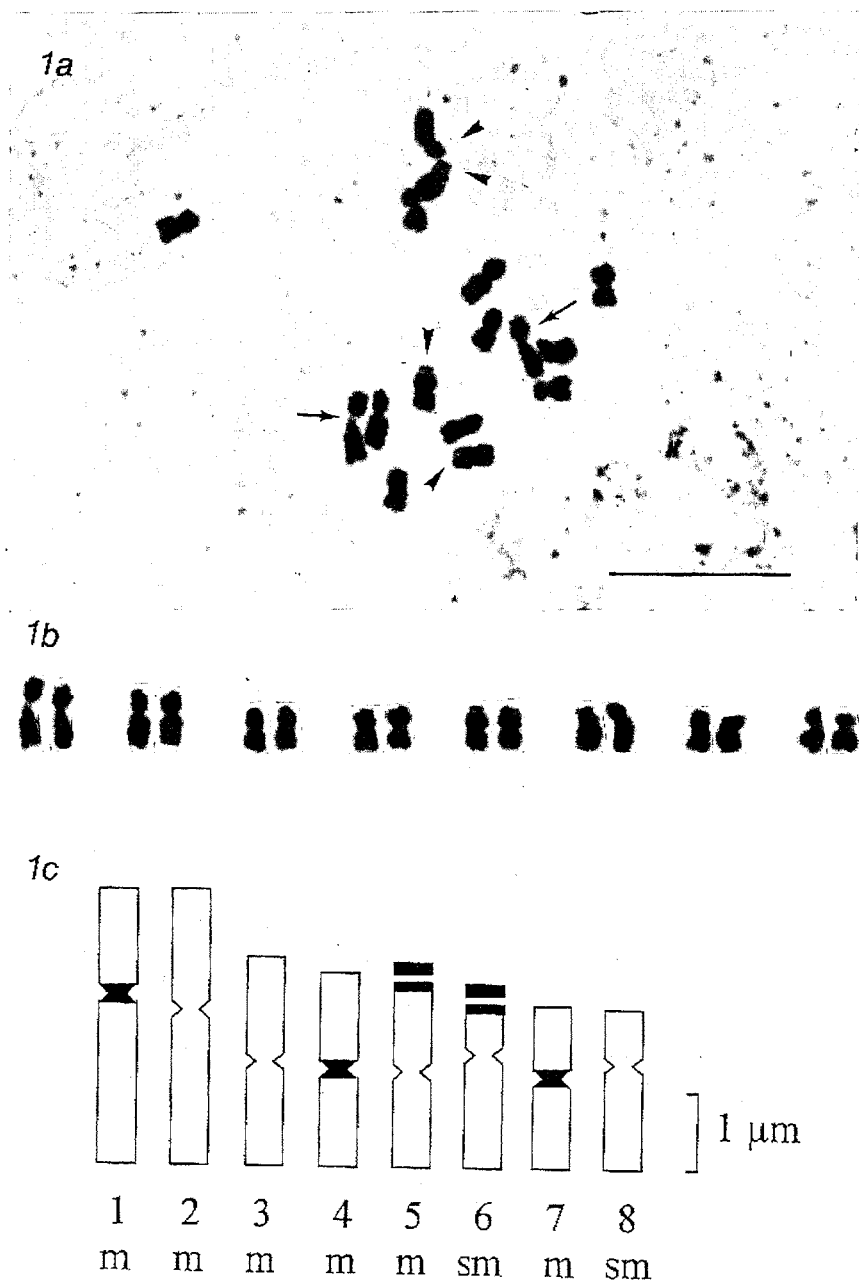
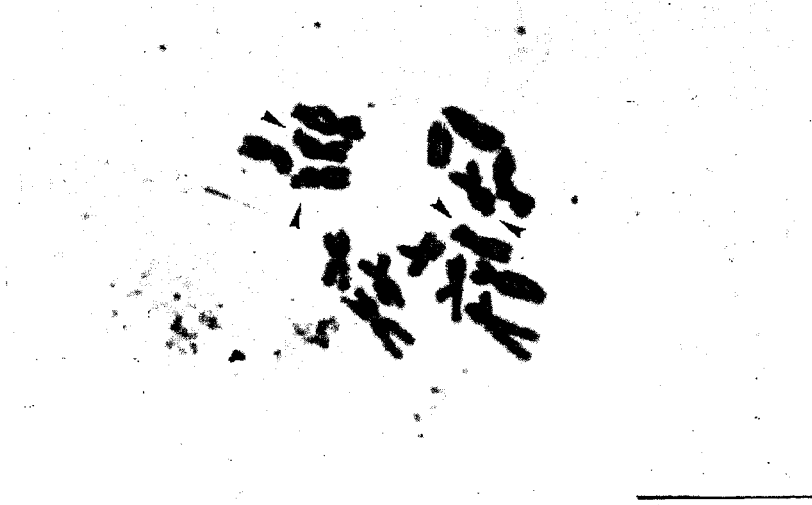


Fig. 1. Plaque métaphasique d'*H. radiata* (1a), caryogramme correspondant (1b) et idiogramme avec les bandes chromomycine positive (1c). Trait, 10 µm.

2a



2b

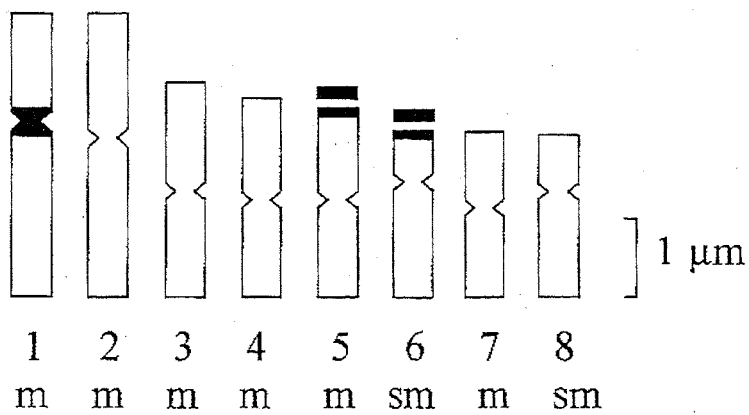
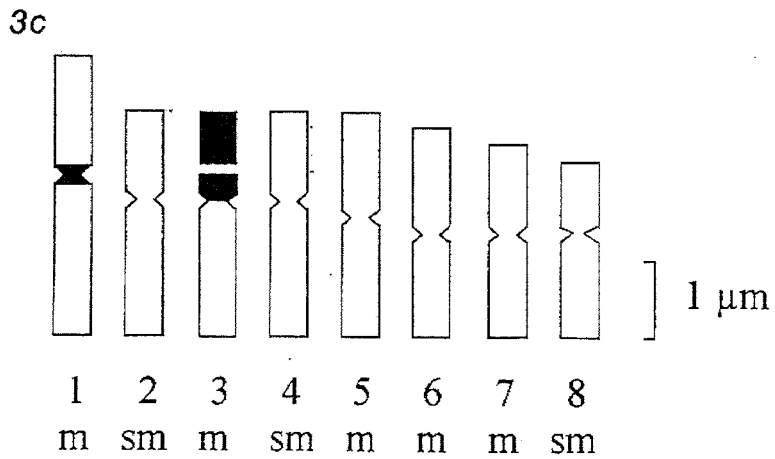
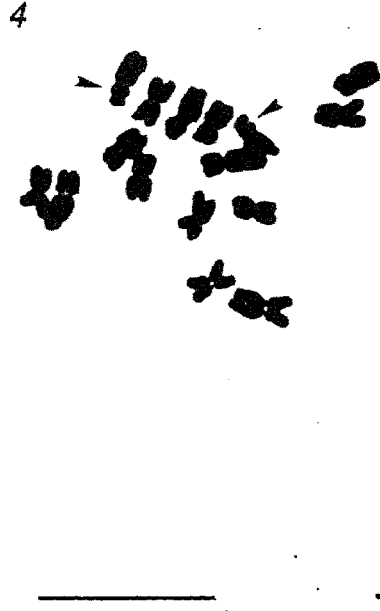
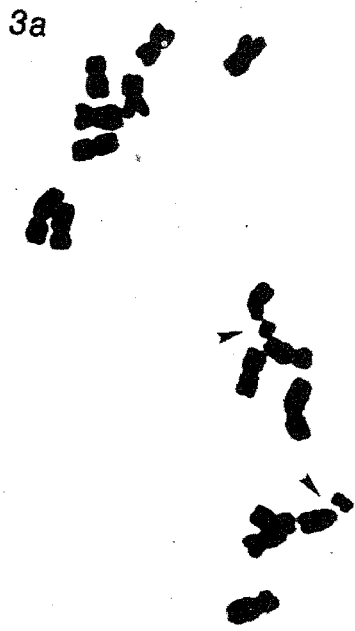


Fig. 2. Plaque métaphasique d'*H. lucida* (2a) et idiogramme avec les bandes chromomycine positive(2b). Trait, 10 μm.



d'espèces en nombre réduit comme celui du genre *Hyoseris*. Ainsi, l'étude de la variabilité observée au niveau des séquences répétées ("ADN égoïste") associées aux NORs, devrait être poursuivie en étudiant un plus grand nombre d'individus et de populations. Il serait également intéressant de réaliser des croisements entre des individus dont la quantité d'hétérochromatine est très différente et d'en suivre la descendance.

L'évolution du nombre de NORs dans le genre (1 paire chez *H. scabra*, au moins 2 chez *H. radiata* et *H. lucida*), ainsi que la variabilité du nombre de nucléoles, indicateurs de leur activité, seront étudiées par hybridation *in situ* et coloration au nitrate d'argent. Par ailleurs, en étudiant un plus grand nombre de populations de différentes origines géographiques avec des méthodes complémentaires de marquage (C-banding, fluorochrome banding, FISH), il serait plus facile d'appréhender le niveau de différenciation caryotypique entre *H. radiata* et *H. lucida*.

Enfin, en ce qui concerne la fragilité du centromère de la première paire chromosomique chez les trois taxons, il convient de vérifier l'hypothèse d'une fusion robertsonienne qui pourrait être à l'origine d'un processus de dysploïdie à partir du nombre de base ancestral ($x=9$) de la famille des *Asteraceae*.

Bibliographie

- AMBROS, P. F. & D. SCHWEIZER (1987). Non-radioactive *in situ* hybridization and chromosome banding. *Ann. Univ. Sarav. Medic., Supplement 7*: 10-18.
- BARTOLO, G., S. BRULLO, M. GRILLO, P. PAVONE & A. ZIZZA (1978). Numeri cromosomici per la Flora Italiana. *Inform. Bot. Ital.* **10**: 382-397.
- BRULLO, S. & P. PAVONE (1978). Numeri cromosomici per la Flora Italiana. *Inf. Bot. Ital.*, **10**: 464-483.
- & P. PAVONE (1988). *Hyoseris frutescens*, a new species from Gozo (Malta). *Candollea* **43**: 717-726.
- , A. GUGLIEMO, P. PAVONE & M. C. TERRASI (1990). Chromosomes counts of flowering plants from N. Cyrenaica. *Candollea* **45**: 65-74.
- CERBAH, M., J. COULAUD., B. GODELLE & S. SILJAK-YAKOVLEV (1995). Genome size, fluorochrome banding and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. *Genome* **38**: 687-695.
- CONGER, A. D. & L. M. FAIRCHILD (1953). A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technology* **28**: 281-283.
- COULAUD, J., S. BROWN & S. SILJAK-YAKOVLEV (1995). First cytogenetic investigation in populations of *Acacia heterophylla*, endemic from La Reunion island, with reference to *A. melanoxylon*. *Ann. Bot. (London)* **75**: 95-100.

Fig. 3. Plaque métaphasique d'*H. scabra* (3a), caryogramme correspondant (3b) et idiogramme avec les bandes chromomycine positive (3c). Les signaux d'hybridation *in situ* se trouvent au niveau de la C. S. sur le chromosome 3.

Fig. 4. Métaphase mitotique chez *H. scabra*. Les flèches indiquent les régions chromosomiques riches en bases GC, dont la taille montre une variabilité individuelle (comparer avec la fig. 3). Le trait sur les photographies représente 10 μ m.

- GARBARI, F. (1982). *Hyoseris*. In S. PIGNATTI (ed.), *Flora d'Italia* 3: 225-226.
- GERLACH, W. L. & J. R. BEDBROOK (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucl. Acids Res.* 7: 1869-1885.
- HESLOP-HARRISON, J. S., T. SCHWARZACHER, K. ANAMTHAWAT-JONSSON, A. R. LEITCH, M. SHI & I. J. LEITCH (1991). *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique. J. Methods Cell Mol. Biol.* 3: 109-116.
- MARTIN, J. & C. V. HEISEMANN (1988). Evaluation of improved Giemsa C- and fluorochrome banding techniques in rye chromosomes. *Heredity* 61: 459-467.
- MARTINOLI, G. (1953). Studio citotassonomico dei generi *Hyoseris* e *Robertia* con particolare riguardo all' *Hyoseris taurina* G. Martinoli sp. nov. (Asteraceae). *Caryologia* 5: 253-281.
- ÖSTERGREEN, G. & K. W. HANEEN (1962). A squash technique for chromosome morphological studies. *Hereditas* 48: 332-341.
- SAHNOUNE, M. (1985). *Méthodologie d'étude du genre Hyoseris L. appliquée à quelques populations du Hyoseris radiata L. du Nord-est algérien*. Mémoire du DEA d'Ecologie et Systématique des Phanérogames. Université Paris-Sud (France).
- SELL, P. D. (1976). *Hyoseris*. In, T. G. TUTIN, V. H. HEYWOOD, N. A. BURGESS, D. H. MOORE, D. H. VALENTINE, S. M. WALTERS & D. A. WEBB (eds.), *Flora Europaea* 4: 307. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne.
- TZANOUDAKIS, D. & Z. KYPRIOTAKIS (1987). Chromosome studies in the greek flora III. Karyotypes of eight aegean species. *Bot. Helvetica* 97: 229-237.

Adresses des auteurs:

Dr. J. C. Klein, Laboratoire de Biologie des Populations et Communautés, URA 2154 CNRS, Université Paris-Sud, bâtiment 362, 91405 Orsay Cedex, France; Dr. M. Sahnoune, Laboratoire de Botanique, Université d'Orléans, France; Dr. J. Vallès-Xirau, Laboratori de Botànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n. 08028 Barcelona, Espagne; Dr. M. Cerbah, Dr. J. Coulaud, O. Robin, & Dr. S. Siljak-Yakovlev, Laboratoire d'Evolution et Systématique, URA 2154 CNRS, Université Paris-Sud, bâtiment 360, 91405 Orsay Cedex, France.