

REPUBLIQUE ALGERIENNE  
DEMOCRATIQUE

ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
**UNIVERSITE CONSTANTINE 1**



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة قسنطينة 1

N° d'ordre : .....

N° de série : .....

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie et Ecologie Végétale**

**THESE**

En vue de l'obtention du diplôme de

**Doctorat en sciences**

**Option: Biotechnologies végétales**

Présentée par

**Meriem BENAMARA-BELLAGHA**

**Organisation du génome et étude palynologique de  
quelques espèces algériennes du genre *Centaurea* L.**

Devant le jury ;

Président	Mr D. KHELIFI	Professeur à l'université Constantine 1.
Encadreur	Mme N. Khalfallah	Professeur à l'université Constantine 1.
Co-encadreur	Mme S. Siljak-Yakovlev	Professeur à Université de Paris Sud. France.
Examineurs	Mme D. Satta	Professeur à l'université Constantine 1.
	Mme N. Amirouche-Hamza	Professeur à l'USTHB.
	Mr R. AMIROUCHE	Professeur à l'USTHB.

Année universitaire 2014-2015

**Á**

***Mes parents Saida et Larbi,***

***mes beaux parents Nabiha et Farouk,***

***mon mari Badis et mes petits bouts de choux Yanis et Raouf,***

***mon frère Mohamed,***

***mes sœurs et belles sœurs,***

***Hanene, Ibtissem, Karima, Lamia, Loubna et Mina,***

***mes beaux frères Chérif, Khaled et Nabil,***

***mes neveux Adel, Ceryne, Hichem, Maya et Nassim***

## **Remerciements**

*En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse Mme Nadra KHLAFALLAH, Professeur à l'Université Constantine 1 et responsable du laboratoire de cytogénétique pour m'avoir guidée tout au long de la réalisation de cette thèse. Je lui suis également reconnaissante de m'avoir assuré un encadrement rigoureux tout au long de ces années. Elle a su diriger mes travaux avec beaucoup de disponibilité, de patience et d'intérêt. Merci Madame pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.*

*Le remerciement suivant revient bien justement à ma co-directrice de thèse Mme Sonja SILJAK-YAKOVLEV, directrice de recherche au Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution végétale à l'université Paris XI d'Orsay. Les mots me manquent pour lui exprimer ma gratitude. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et de son efficacité.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à M. Douadi KHELIFI, Professeur à l'Université Constantine 1 et Directeur du Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, qui me fait l'honneur de présider le jury. Je lui présente mes profonds remerciements pour l'intérêt et le soutien chaleureux dont il a toujours fait preuve à mon égard.*

*Je me fais un immense plaisir de remercier Madame SATTA D., professeur à l'université Constantine 1 d'avoir accepté de me faire l'honneur de faire partie du jury.*

*Je suis très reconnaissante envers Mme. Nabila AMIROUCHE et M. Rchid AMIROUCHE, professeurs à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumédiène, Alger, d'avoir fait le déplacement et d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer mon travail.*

*L'étude de la structure du pollen par microscopie électronique à balayage à été réalisée au Laboratoire de Microstructures et Défauts, Département de Physique, Université Constantine 1. Je tiens ainsi à remercier chaleureusement le Pr. Omar KHALFALLAH d'avoir accepté de m'accueillir dans le laboratoire. Merci Monsieur pour votre patience et votre disponibilité.*

*Je tiens à remercier chaleureusement M. Spencer BROWN, et M. Michael BOURGE pour la réalisation de la cytométrie à l'institut des Sciences du Végétal (ISV) au CNRS à Gif-sur-Yvette.*

*Que M. Karim BAZIZ, ami et collègue au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales depuis près de dix ans, trouve ici mon plus profond respect. Karim merci pour ton aide, ton soutien moral et ta bonne humeur.*

*Merci Mme Hayet BENHIZIA, Maitre de conférences classe B à l'Université Constantine 1, pour votre gentillesse et vos encouragements*

*Je tiens à remercier tout particulièrement Radhia DHJEGHAR, Ingénieur de laboratoire au laboratoire de Génétique, Biochimie Et Biotechnologies Végétales, pour sa précieuse aide au laboratoire, sa disponibilité, sa générosité. Merci Radhia pour ta bonne humeur et ta gentillesse.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à M. Nadir BELBEKRI et Mme Malika TORKI Ingénieurs au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, pour leur aide et leur disponibilité. Mes remerciements s'adressent également à Mme Odile ROBIN, Ingénieur au Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution végétale à l'université Paris XI- d'Orsay.*

*Je clos enfin ces remerciements par celles qui m'ont accompagnées depuis la première année de Post-Graduation et qui avec le temps sont devenues une part entière de mon quotidien : Sarah BECHKRI, Hania BENMEBAREK, Soumeya BETINA, Sandra KACEM, Maya KECHID et Rym Tinhinen MAOUGAL. Merci les filles pour tous les merveilleux moments passés ensemble. Une pensée particulière à Ouahiba HAMDJ et Nadjjet MISSI.*

## Résumé

Pour une meilleure connaissance de la flore algérienne et dans le but d'évaluer la variabilité interspécifique et l'organisation des génomes, une étude cytogénétique et palynologique a été réalisée pour la première fois sur quatre espèces algériennes dont trois sont endémiques appartenant au genre *Centaurea* par le fluorochrome banding à la Chromomycine A<sub>3</sub> pour la distribution des bandes riches en bases GC, l'hybridation *in situ* par fluorescence pour la cartographie des gènes ribosomiques ARNr, la cytométrie en flux pour l'estimation de la taille des génomes et la microscopie optique et électronique à balayage pour la taille et la morphologie de grains de pollen. Les espèces étudiées appartiennent à trois sections différentes et possèdent trois nombres de bases : *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*  $2n=4x=36$  ( $x=9$ , section *Phalolepis*), *C. musimonum*  $2n=2x=20$  ( $x=10$ , section *Chamaecyanus*), *C. maroccana*  $2n=2x=24$  ( $x=12$ , section *Mesocentron*) et *C. melitensis*  $2n=2x=24$  ( $x=12$ , section *Mesocentron*). Le nombre et la distribution des bandes CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> et les loci 18S-5.8S-26S (35S) ADNr sont différents entre les espèces étudiées. Ils varient entre 6 et 80 bandes CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> et de 2 à 6 loci ADNr 35S. Un seul locus 5S ADNr a été observé en position intercalaire sur des paires différentes des quatre espèces étudiées. Chez *C. musimonum*, une colocalisation des ADNr 35S et 5S sur un même chromosome a été détectée. Tous les loci 35S sont localisés avec des marquages CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> excepté trois loci 35S chez *C. musimonum*. La taille des génomes varie entre  $2C=1.47$  pg à  $2C=2.86$  pg respectivement chez les diploïdes (*C. melitensis* et *C. maroccana*) et  $2C=4.51$  pg chez le tétraploïde *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*. Les caractéristiques palynologiques des quatre espèces ont été étudiées pour la première fois. Le diamètre polaire et équatorial, le nombre d'ouvertures et l'épaisseur de l'exine ont été mesurés en détail. Les grains de pollen sont tricolporés, prolate-sphéroïdal. L'ornementation de l'exine est microechinate. Le pollen des quatre espèces appartient au type *Jacea*. Des investigations plus poussées sur d'autres espèces algériennes du genre *Centaurea* s'imposent comme projet d'étude pour contribuer à la connaissance de la biodiversité et enrichir les bases de données.

**Mots clés :** caryotype ; heterochromatine ; gènes ARNr 35S et 5S ; taille du génome, palynologie ; *Centaurea*.

## Abstract

For a better knowledge of the Algerian flora and in order to assess the interspecific variability and genomes organization, a cytogenetic and palynological study was conducted for the first time on four Algerian species belong the genus *Centaurea*. Three of them are endemics, by chromomycin fluorochrome banding for GC-rich DNA distribution, fluorescence *in situ* hybridization for physical mapping of rRNA genes, flow cytometry for genome-size assessment, light and micron microscopy for pollen morphology. Investigated species belong to three different sections and possess three basic chromosome numbers: *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*  $2n=4x=36$  ( $x=9$ ), *C. musimonum*  $2n=2x=20$  ( $x=10$ ), *C. maroccana*  $2n=2x=24$  ( $x=12$ ) and *C. melitensis*  $2n=2x=24$  ( $x=12$ ). The number and distribution of chromomycin positive bands (CMA<sub>3</sub>) and 18S-5.8S-26S (35S) rDNA loci were different among investigated species and ranged from 6 to 80 chromomycin bands and from 2 to 6 35S rDNA loci. The four species have just one 5S rDNA locus at intercalary position on a separate chromosome pairs, except in the case of *C. musimonum* in which both rDNA loci were localized on the same chromosome. All rDNA loci were co-localized with CMA<sub>3</sub> bands, except three 35S in *C. musimonum*. Genome size ranged from  $2C=1.47$  pg to  $2C=2.86$  pg in diploid species (*C. melitensis* and *C. maroccana*, respectively) and to  $2C=4.51$  pg in tetraploid *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*. The palynological properties of the four species were investigated for the first time. Polar diameter, equatorial length, apertures and thickness of the exine were measured in detailed. The light and scanning electron microscope investigations revealed tricolporate, prolate-spheroidal pollens. Exine ornamentation was tectatae and microechinate. The investigated species pollens belong to *Jacea*-type. Further investigations of other Algerian species of the genus *Centaurea* are required as a study project to contribute to the understanding of biodiversity and enrich databases.

**Keywords:** Karyotype ; heterochromatin ; 35S and 5S rRNA genes ; genome size ; palynology; *Centaurea*.

## ملخص:

أربعة أصناف من أصل جزائري تنتمي إلى نوع *Centaurea* تم التحقيق فيها لأول مرة بواسطة الملون التالقي Chromomycine لكشف النطاقات الغنية بالقواعد GC التهجين الداخلي باستعمال التفلور لكشف الخرائط الفيزيائية للجينات rRNA ، التدفق الخلوي لتقدير حجم الجينوم ، المجهر الضوئي و الالكتروني لدراسة مرفلوجيا حبوب الطلع الأصناف التي شملتها الدراسة تنتمي إلى ثلاثة أقسام مختلفة وممثلة بثلاثة أعداد كروموزومية أساسية ( $x = 10$ )

$$، (x = 12) C. maroccana 2n = 2x = 24 ، (x = 12) (C. musimonum) 2n = 2x = 20$$

الأشربة الغنية بالقواعد G-C ( $CMA_3$ ) و المواقع 18S – 5.8S – 26S (S35) rDNA ، مختلف بين الأصناف المدروسة و يتراوح بين 6 إلى 80 شريط  $CMA_3^+$  بين 2 إلى 6 موضع rDNA 35S . الأربعة الأصناف المدروسة لا تحتوي إلا على موضع واحد rDNA 5S في موقع وسطي على أزواج كروموزومية مختلفة ، ما عدا في *C. musimonum* | ين هناك موقع مشارك مع rDNA . كل المواضع rDNA مشاركة الموقع مع أشربة  $CMA_3$  ماعدا ثلاثة مواضع 35S في *C. musimonum*. حجم الجينوم يتراوح بين  $2C = 1.47$  pg إلى  $2C = 2.86$  pg عند الأنواع ثنائية الصيغة الصبغية (*C. maroccana* , *C. melitensis* , *C. musimonum*) و  $2C = 4.51$  pg عند رباعي الصيغة الصبغية *C. tougourensis subsp. tougourensis*. خصائص حبوب الطلع للأصناف الأربعة المدروسة قدمت هنا لأول مرة. المحور القطبي ، المحور الاستوائي ، الثغور وسمك exine اظهروا أن حبوب الطلع من نوع ثلاثي الثغر ، برولايت *prolate* ، كرواني و سطح exine , شبه شوكي. حبوب الطلع للأصناف الأربعة المدروسة ينتمي إلى نوع *Jacea*

**الكلمات المفتاحية:** التهجين الداخلي بالتفلور ، الملون التالقي  $CMA_3$  ، حجم الجينوم ، الكروماتين المغاير ، النمط النووي الجينات 35rRNA ، 5S ، علم حبوب الطلع.

## Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique</b>	
1. Famille des Asteracea .....	4
1.1 Caractères généraux.....	4
1.2 Historique de la classification des Asteraceae.....	5
1.3 De la famille au genre .....	6
2. Le genre <i>Centaurea</i> L. (1753).....	7
2.1 Caractères morphologiques du genre <i>Centaurea</i> .....	9
2.2 Evolution des caryotypes dans le genre <i>Centaurea</i>	9
2.3 Importance phytochimique et pharmaceutique du genre <i>Centaurea</i> .....	10
3. Présentation des espèces étudiées.....	12
3.1 <i>Centaurea musimonum</i> Maire.....	12
3.2 <i>Centaurea maroccana</i> Ball.....	12
3.3 <i>Centaurea melitensis</i> L.....	13
3.4 <i>Centaurea tougourensis</i> subsp. <i>tougourensis</i> Q. & S .....	13
4. Notion d'endémisme.....	16
5. Asymétrie du caryotype.....	17
6. Organisation des gènes ribosomiques.....	19
7. Organismes nucléolaires et nucléoles.....	20
8. Taille du génome.....	21
9. Palynologie chez le genre <i>Centaurea</i> .....	22
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b>	
1. Matériel .....	24
2. Méthodes.....	26
2.1 Méthodes appliquées sur les méristèmes racinaires.....	26
2.2 Méthodes d'analyses cytogénétiques moléculaires.....	29
2.3 Technique de coloration au nitrate d'argent.....	34
2.4 Technique de cytométrie en flux.....	34
2.5 Technique d'étude des grains de pollen.....	35

### **Chapitre 3 : Résultats**

1. Dénombrement chromosomique et analyse du caryotype.....	40
2. Distribution des bandes d'hétérochromatine riches en bases GC.....	48
3. Cartographie des gènes ribosomiques 35S et 5S .....	48
4. Activité des organisateurs nucléolaires.....	52
5. Taille du génome et quantité d'ADN.....	52
6. Viabilité et caractères morphologiques.....	54
6.1 Viabilité du pollen .....	54
6.2 Morphologie du pollen.....	55

### **Chapitre 4 : Discussion générale**

1. Dénombrement chromosomique et analyse du caryotype.....	60
2. Origine de l'hétéromorphie de la première paire de <i>C. tougourensis</i> subsp <i>tougourensis</i> .....	61
3. L'asymétrie des caryotypes.....	62
4. Distribution des bandes hétérochromatiques riches en bases GC.....	63
5. Cartographie des gènes ribosomiques.....	65
6. Activité transcriptionnelle des ADN ribosomiques.....	66
7. Origine du tétraploïde <i>C. tougourensis</i> subsp <i>tougourensis</i> .....	67
8. Taille du génome.....	68
9. Viabilité et caractères morphologiques du pollen.....	69
9.1 Viabilité des grains de pollen.....	69
9.2 Caractères morphologiques des grains de pollen.....	70

<b>Conclusion générale et recommandations.....</b>	<b>75</b>
----------------------------------------------------	-----------

<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>78</b>
-----------------------------------------	-----------

### **Annexes**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Photographies représentant les espèces de <i>Centaurea</i> étudiées (Benamara-Bellagha 2013).....	14
<b>Figure 2</b> : Photographies représentant les akènes des espèces de <i>Centaurea</i> étudiées (Benamara-Bellagha 2013).....	15
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique d'une unité de répétition des gènes ribosomiques 18S-5,8S-26S (Sollner-Webb & Mougey 1991).....	19
<b>Figure 4</b> : Schéma représentant les différentes mesures effectuées sur le grain de pollen (Siljak-Yakovlev 1986).....	38
<b>Figure 5</b> : Caryotype de l'espèce <i>C. musimonum</i> .....	41
<b>Figure 6</b> : Caryotype de l'espèce <i>C. maroccana</i> .....	42
<b>Figure 7</b> : caryotype de l'espèce <i>C. melitensis</i> .....	45
<b>Figure 8</b> : Caryotype de l'espèce <i>C. tougourensis subsp tougourensis</i> .....	46
<b>Figure 9</b> : <b>a</b> : Coloration à la chromomycine A <sub>3</sub> . <b>b</b> : la FISH avec les sondes ADNr 35S et 5S sur plaques métaphasiques. <b>c</b> : idiogrammes avec marquage des chromosomes CMA <sub>3</sub> , 35S, 5S de <i>C. musimonum</i> .....	50
<b>Figure 10</b> : <b>a</b> : Coloration à la chromomycine A <sub>3</sub> . <b>b</b> : la FISH avec les sondes ADNr 35S et 5S sur plaques métaphasiques. <b>c</b> : idiogrammes avec marquage des chromosomes CMA <sub>3</sub> , 35S, 5S de <i>C. maroccana</i> .....	50
<b>Figure 11</b> : <b>a</b> : Coloration à la chromomycine A <sub>3</sub> <b>b</b> : la FISH avec les sondes ADNr 35S et 5S sur plaques métaphasiques, <b>c</b> : idiogrammes avec marquage des chromosomes CMA <sub>3</sub> , 35S, 5S de l'espèce <i>C. melitensis</i> .....	51
<b>Figure 12</b> : <b>a</b> : Coloration à la chromomycine A <sub>3</sub> . <b>b</b> : la FISH avec les sondes ADNr 35S et 5S sur plaques métaphasiques. <b>c</b> : idiogrammes avec marquage des chromosomes CMA <sub>3</sub> , 35S, 5S de <i>C. tougourensis subsp tougourensis</i> .....	51
<b>Figure 13</b> : Coloration des nucléoles au nitrate d'argent et leurs fréquences dans les noyaux interphasiques.....	53
<b>Figure 14</b> : Grains de pollen observés au microscope photonique.....	54
<b>Figure 15</b> : Taux de viabilité du pollen des espèces étudiées.....	55

<b>Figure 16</b> : Comparaison graphique des valeurs moyennes, des valeurs minimales et des valeurs maximales de P et de E .....	56
<b>Figure 17</b> : Différentes vues des grains de pollen des espèces étudiées observées au microscope photonique.....	58
<b>Figure 18</b> : Différentes vues des grains de pollen des espèces étudiées observées au microscope électronique à balayage.....	59
<b>Figure 19</b> : Origines possibles de l'hétéromorphie de la paire 1 chez l'espèce <i>C. tougourensis</i> subsp <i>tougourensis</i> .....	62
<b>Figure 20</b> : origines possibles de tétraploïde <i>C. tougourensis</i> subsp <i>tougourensis</i> .....	68
<b>Figure 21</b> : Schéma évolutif du type pollinique dans le genre <i>Centaurea</i> selon Wagenitz 1955 (Siljak-Yakovlev 1986).....	73

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Quelques espèces de <i>Centaurea</i> qui ont été étudiées sur le plan phytochimique et leurs citations correspondantes.....	11
<b>Tableau 2</b> : différentes méthodes d'évaluation de l'asymétrie du caryotype (Zuo et Yuan 2011).....	18
<b>Tableau 3</b> : Origine géographique du matériel végétal étudié.....	25
<b>Tableau 4</b> : Nomenclature concernant la position du centromère proposée par Levan <i>et al.</i> (1964).....	29
<b>Tableau 5</b> : Composition de la mixture de la sonde.....	32
<b>Tableau 6</b> : Données morphométriques du caryotype de <i>Centaurea musimonum</i> .....	43
<b>Tableau 7</b> : Données morphométriques du caryotype de <i>Centaurea maroccana</i> .....	43
<b>Tableau 8</b> : Données morphométriques du caryotype de <i>Centaurea melitensis</i> .....	47
<b>Tableau 9</b> : Données morphométriques de <i>Centaurea tougourensis</i> sub sp <i>tougourensis</i>	47
<b>Tableau 10</b> : Nombre et distribution des régions riches en bases GC et des sites ADNr 35S et 5S.....	49
<b>Tableau 11</b> : Quantité d'ADN estimée par cytométrie en flux chez les espèces étudiées.....	52
<b>Tableau 12</b> : Données morphologiques concernant le pollen des taxons étudiés.....	59

## Liste des abréviations

**BamH1**: produite par *Bacillus amyloliquefaciens*. Site de reconnaissance: 5'-GGATCC-3'

**BSA**: Bovin Serum Albumin

**CMA<sub>3</sub>**: Chromomycine A<sub>3</sub>

**CMF**: Cytométrie en Flux

**cs**: constriction secondaire

**CV**: Coefficient de Variation

**DAPI**: 4',6- diamidino-2-phenylindole

**EcoR1**: produite par *Escherichia coli*. Site de reconnaissance: 5'-GAATTC-3'

**FISH**: Hybridation *In Situ* par Fluorescence

**Ic**: Indice centromérique

**Kb**: Kilo base

**M**: Molaire

**mM**: Millimolaire

**Mbp**: méga-paires de base

**ng**: nanogramme

**nm**: nanomètre

**pg** : picogramme

## Introduction

Le bassin méditerranéen est considéré comme l'un des 33 points chauds (hotspots) les plus importants du point de vue nombre de plantes (25000 espèces et sous espèces) (Greuter 1991 ; Quézel 1995 ; Mittermeier *et al.* 2004) parmi lesquelles les plantes endémiques représentent près de 60% (Thompson 2005). Les changements rapides de sa biodiversité sont essentiellement dus à des influences anthropogéniques prolongées. La grande richesse floristique du bassin méditerranéen (régions amphi et péri-méditerranéen) est le résultat des processus florogénétiques et migratoires complexes, avant, pendant et après la période glaciaire. Dans le bassin méditerranéen, les trois péninsules de l'Europe du Sud, l'Afrique du Nord, ainsi que l'Asie Mineure sont des régions d'une importance particulière.

L'ancienne région Numidie (Algérie - Tunisie) est reconnue comme l'un des points chauds les plus importants de la Méditerranée (Médail & Quézel 1997; Vela & Benhouhou 2007).

De part sa situation géographique, l'Algérie chevauche entre deux empires floraux: l'Holarctis et le Paleotropis. Cette position lui confère une flore très diversifiée par des espèces appartenant à différents éléments géographiques. Sur les 3139 espèces (5402 taxons en comptant les sous espèces, les variétés et les formes) décrites par Quézel et Santa (1963) dans la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Zeraia (1983) dénombre 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques (Chouaki *et al.* 2006).

La répartition des espèces entre familles et genres montre que sept familles comptent plus de 100 espèces chacune (Chouaki *et al.* 2006).

Parmi celle-ci, la famille des Asteraceae (Compositae) comprend près de 13 000 espèces réparties en 1 500 genres. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes. En Algérie, elle est représentée par 109 genres et entre 408 et 433 espèces (Quézel & Santa 1963) et 42 espèces endémiques (Quézel, 1964).

Le genre *Centaurea* est l'un des plus importants de la famille des Asteraceae. Il contient 250 espèces (Susanna et Garcia-Jacas 2007). Il a plusieurs nombres chromosomiques de base compris entre  $x=7$  et  $x=16$  et plusieurs niveaux de ploïdies ( $2x$ ,  $4x$  et  $6x$ ) (Garcia-Jacas *et al.*

1996 ; Siljak-Yakovlev *et al.* 2005). Il est considéré du point de vue systématique, comme un groupe de plantes assez complexe. Cette situation est principalement due à un grand nombre d'hybrides interspécifiques naturels rendant la taxonomie de ce genre plus complexe. En effet, une importante diversité morphologique, caryologique et palynologique a été décrite par plusieurs auteurs (Bremer 1994; Gabrielyan 1995; Susanna *et al.* 1995; Wagenitz & Hellwig 1996).

En Algérie, à notre connaissance, mis à part des données phytochimiques, aucune étude taxonomique, morphologique ou caryologique n'a été entreprise.

L'une des raisons de ce travail est de contribuer à une connaissance de la diversité et de la complexité de ce genre en Algérie.

L'étude porte sur l'évolution de la taille du génome, la structure des chromosomes moléculaire, l'hétérochromatine et les séquences répétées (ADN). Ces caractères sont d'excellents marqueurs de la différenciation intra et inter-spécifiques, utiles pour des études de systématiques évolutives et pour la quantification de la biodiversité.

Ce travail rentre dans le cadre d'un projet de coopération soutenu par l'OTAN (**Nato Science For Peace And Security Programme. Collaborative Linkage Grant number 983838**) sous le thème de : **Global Biodiversity and Environmental Changes in the Mediterranean Region**. Il a été réalisé dans le laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université Constantine 1 et le laboratoire de Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS-UPS-AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Sud, Bat. 360, 91405 Orsay.

Pour cela notre démarche consiste à :

- établir les caryotypes et déduire les nombres chromosomiques de bases et apprécier l'organisation de l'hétérochromatine constitutive riche en bases G-C.
- cartographier les gènes ribosomiques 35S et 5S et évaluer leur activité transcriptionnelle. - estimer la taille du génome des quatre espèces
- et enfin étudier et caractériser le pollen de chacune des espèces.

Dans une première partie nous présenterons une revue bibliographique générale, dans laquelle nous décrirons la famille des Asterceae, le genre *Centaurea* et les espèces qui font

l'objet de ce travail. Nous aborderont aussi le volet systématique et relations phylogénétiques dans le genre *Centaurea*.

Dans une deuxième partie nous donnerons quelques détails sur le matériel d'étude et les différentes techniques appliquées à ce matériel.

Dans une troisième partie nous présenterons les résultats obtenus.

Dans une quatrième partie nous donnerons une discussion générale des résultats.

Et enfin, une dernière partie dans laquelle nous concluons d'une manière générale et proposons des pistes de recherche en perspectives.

## 1. Famille des Asteraceae

### 1.1. Caractères généraux

La famille des Asteraceae (Compositae) est la famille des phanérogames qui regroupe le plus grand nombre d'espèces décrites et acceptées. A supposer qu'il existe 250000 à 350000 espèces de plantes à fleurs, 1/8 à 1/12 des espèces sont des Asteraceae (près de 10%).

Le nombre de genres et espèces que contient cette famille a été fortement discuté. Selon la classification de Bremer (1994), la famille des Asteraceae comprend 1535 genres et environ 23000 espèces. Selon le *royal botanical garden of Kew*, elle comprend entre 24000 et 30000 espèces groupées en 1600 à 2000 genres. Pour Khatun (2002), la famille des Asteraceae comprend 1100 genres et 25000 espèces. Naik (2003) a estimé le nombre d'espèces à 20000 espèces groupées en 1000 genres. Sharma *et al.* (2004) ont trouvé 20000 espèces réparties en 950 genres. Sambamurty (2005) parle de 900 genres comprenant 13000 espèces.

La famille est caractérisée par des fleurons disposés sur un réceptacle à développement centripète et entourés de bractées, des anthères fusionnées en un cycle et par la présence d'akènes habituellement munis d'une aigrette ou pappus.

Bien que la famille soit bien définie, beaucoup de variations entre les membres ont été constatées : ils peuvent varier d'herbes annuelles et vivaces à arbustes ou même arbres. Peu sont de véritables épiphytes. Ils poussent dans presque tous les types d'habitats : dans les forêts et les prairies de hautes altitudes. Ils sont moins fréquents dans les forêts tropicales (Funk *et al.* 2009).

Elle est largement distribuée dans les tropiques et les régions humides tempérées du Sud, Sud- Est et Est de l'Asie, en Afrique incluant Madagascar et en Amérique du Sud.

Elle comprend de nombreuses espèces économiquement importantes qui sont utilisées dans l'alimentation, les médicaments et comme plantes ornementales.

Les espèces d'Asteraceae font l'objet de beaucoup d'études traitants l'évolution et récemment, elles sont devenues l'objet de nouveaux programmes de séquençage de génomes (Mahbubur Rahman 2013).

## 1.2. Historique de la classification des Asteraceae

La famille des Asteraceae (Martynov 1820), anciennement appelée Compositae Gisek (1792) est la famille la plus importante des plantes à fleurs du point de vue nombre d'espèces.

Le nom « Asteraceae » dérive du type de genre *Aster* alors que le nom « Compositae » est un nom ancien mais toujours valide. Il fait référence aux caractéristiques des inflorescences, le type *Pseudanthium* qu'on trouve rarement chez d'autres familles d'angiospermes (Rahman *et al.* 2011).

Dans son illustration classique, Cassini (1816 : chapitre 1, 6 et 41) a placé les tribus : Heliantheae au centre, Vernonieae et Eupatorieae à une extrémité et Mutiseae et Cichorieae (Lactuceae) à l'autre extrémité.

En 1873, Bentham a mis en évidence 13 tribus. Cette classification a été plus ou moins utilisée jusqu'aux années 1980. Cependant, certains concepts ont été changés, spécialement dans les tribus Vernonieae, Liabeae, Senecioneae et Helenieae. Les travaux de Bentham ont été développés indépendamment de ceux de Cassini et les 13 tribus données par Bentham correspondent à plusieurs des 19-20 tribus données par Cassini.

Hoffmann (1890, 1894) a essentiellement repris la classification de Bentham (1873a) (Turner 1977 ; Bremer 1994).

Bentham (1873b), plus récemment Cronquist (1955, 1977) et Turner (1977), se sont mis d'accord sur le fait que Heliantheae était la tribu la plus primitive de la famille des Asteraceae.

Carlquist (1966) a proposé de changer le système de classification de Bentham. Ces changements n'ont pas été acceptés et la classification de Bentham basée sur les 13 tribus a continué à être prise en considération.

Poljakov (1967) a réuni les tribus en deux grands groupes. Le groupe des Cichorieae-Arctotideae qui est le plus basique et le groupe Anthemideae-Heliantheae le dérivé.

Robinson (1974), Carlquist (1976), Wagenitz (1976) et Jeffrey (1978) ont divisé les Compositae en deux groupes : les Asteroideae et les non-Asteroideae.

Les plus grands changements dans la systématique des Asteraceae ont pris place à la fin des années 1980, début des années 1990. Ils sont basés sur les travaux de biologie moléculaires de Jansen et Palmer (1987, 1988), Jansen *et al.* (1991) et Jansen et Kim (1996). Ils ont chamboulé complètement la phylogénie des Compositae. Ils ont montré que c'est la tribu des Mutisieae qui était la branche de base de la famille et que la tribu des Heliantheae s.l. a été imbriquée loin dans l'arbre. Ils ont montré aussi que les tribus Eupatorieae et Vernonieae étant longtemps considérées comme étroitement liées, étaient, en effet, dans des cotés distincts de la phylogénie.

En même temps, les analyses de Bremer (1987), basées essentiellement sur des données morphologiques, sont pour la plupart en accord avec les conclusions moléculaires. Cependant, il a placé Eupatorieae étroitement liées à Astereae et non à Heliantheae.

La compréhension de la phylogénie des Compositae a parcouru un long chemin depuis les papiers de Jansen et Palmer (1987) et Bremer (1987).

L'avènement de nouvelles techniques et de nouveaux marqueurs a considérablement augmenté la quantité des données disponibles.

Les dernières données publiées par Funk *et al.* (2009) ont montré que la famille des Asteraceae est subdivisée en trois groupes :

- Le groupe monophylétique représenté par la sous-famille des Barnadesioideae qui comprend moins de 1% des espèces de composées.
- Le groupe monophylétique de la sous-famille des Asteroideae. Il comprend 65% des espèces de composées.
- Le groupe de la sous-famille des Cichorioideae (positionnée entre les deux premières sous-familles). Il comprend 35% des espèces de composées

### **1.3. De la famille au genre**

La famille des Asteraceae est divisée en trois sous-familles et 17 tribus selon Bremer et Jansen (1992) et en 12 sous-familles et 43 tribus selon Funk *et al.* (2009).

La sous famille des Carduoideae p.p. Cass. Ex Sweet regroupe plusieurs tribus, notamment la tribu des Cardueae Cass. Cette dernière comprend 83 genres et environ 2500 espèces

(Bremer 1994) et 73 genres et 2400 espèces selon Susanna et Garcia-Jacas (2009) et Barres *et al.* (2013). Il s'agit d'une tribu monophylétique, bien individualisée, subdivisée en 4 sous-tribus (Bentham 1873 ; Hoffmann 1894 ; Bremer 1994). Deux sont relativement petites, les Carlineae (Cass.) Dumort. et les Echinopsidineae (Cass.) Dumort. Les deux autres, les Carduineae (Cass.) Dumort. et les Centaureineae (Cass.) Dumort. regroupent cinq genres, très riches en espèces et aux limites incertaines.

Les Centaureineae forment un groupe monophylétique (Bremer 1994) et regroupent environ 800 espèces (Wagenitz & Hellwig 1996) réparties en 33 genres (Susanna & Garcia-Jacas 2001).

Des travaux portant sur l'étude moléculaire du genre et de la sous-tribu des Centaureineae [Susanna *et al.* (1995) ITS, Garcia-Jacas *et al.* (2001) ITS et matK], l'étude de la morphologie du type pollinique (Wagenitz 1955) et la caryologie (Siljak-Yakovlev 1986 ; Garcia-Jacas *et al.* 1996 ; Garcia-Jacas *et al.* 1997, 1998a ; Garcia-Jacas *et al.* 1998b) ont permis d'établir les limites naturelles du genre *Centaurea* (Susanna *et al.* 1995 ; Wagenitz & Hellwig 1996 ; Garcia-Jacas *et al.* 2000, 2001). Cette délimitation a été une tâche difficile car la tribu inclut les genres les plus importants (*Centaurea* L., *Cirsium* Mill., *Cousinia* Cass., et *Saussurea* DC.) (Font *et al.* 2009).

La délimitation des genres est souvent problématique et certains d'entre eux ont été fréquemment divisés en sous-genres mineurs (Judd *et al.* 1999). Les genres les plus importants du point de vue nombre d'espèces sont : *Senecio* (1500 espèces), *Vernonia* (1000 espèces), *Cousinia* (600 espèces) et *Centaurea* (600 espèces) (Mahbubur Rahman 2013).

## **2. Le genre *Centaurea* L. (1753) pro minima parte. *Bielzia* Schur (1866)**

*Synonymes:*

*Cnicus* L. (1753), nom. cons.  
*Cyanus* Mill. (1754).  
*Jacea* Mill. (1754).  
*Colymbada* Hill (1762).  
*Acosta* Adans. (1763).  
*Calcitrapa* Adans. (1763).  
*Melanoloma* Cass. (1823).  
*Chartolepis* Cass. (1826).  
*Tomanthea* DC. (1837).  
*Ptosimopappus* Boiss. (1845).  
*Phaeopappus* Boiss. (1846).  
*Hyalaea* Jaub. & Spach (1847).  
*Cheirolepis* Boiss. (1849).

*Stephanochilus* Coss. & Durieu ex Benth. (1873).  
*Chrysopappus* Takht. (1938).  
*Grossheimia* Sosn. & Takht. (1945).  
*Wagenitzia* Dostál (1973).

Le genre *Centaurea* est l'un des plus importants de la famille des Asteraceae. Il comprend 450 espèces selon Hoffmann (1897), 700 espèces selon Amberger (1960), entre 400 et 700 espèces selon Dittrich (1977), Bremer (1994) et Wagenitz et Hellwig (1996) et 250 espèces selon Susanna et Garcia-Jacas (2007).

Le centre de diversité le plus important est la Turquie. On y trouve près de 197 espèces dont 139 sont endémiques (Wagenitz 1975 ; Uzunhisarcikli *et al.* 2007). Le deuxième centre le plus important est la région Ibero-Nord-Africaine (Garcia-Jacas & Susanna 1992).

Le principal centre de spéciation du genre *Centaurea* est la méditerranée orientale. En effet selon Wagenitz (1975), la plupart des espèces sont distribuées en Turquie (34 sections) et dans la péninsule Balkanique (14 sections) où il ya un grand nombre d'espèces endémiques, principalement dans la région des Alpes Dinariques et des côtes Adriatiques (Siljak-Yakovlev *et al.* 2005).

Le genre *Centaurea* avec son nombre important d'espèces, sa diversité morphologique et sa capacité à l'hybridation est traditionnellement considéré comme étant le plus problématique et le plus compliqué de la famille des Asteraceae (Fernandez-Casas & Susanna 1992; Garcia-Jacas *et al.* 2000, 2001, 2006 ; Ochsmann 2001 ; Petit *et al.* 2001 ; Koutecky 2007 ; Mráz *et al.* 2011). Aucune des précédentes tentatives de subdivisions n'a été acceptée (Cassini 1829 ; Boissier 1875 ; Dostál 1969, 1973 ; Holub 1973, 1974).

Plusieurs espèces et groupes anciennement considérés comme Centaurées sont maintenant classés dans des genres indépendants. Ainsi, le genre *Centaurea* se trouve réduit à seulement trois sous-genres (Susanna & Garcia-Jacas 2007) :

- Le sous-genre *Centaurea* (anciennement appelé groupe *Jacea* sensu stricto par Garcia-Jacas *et al.* (2006) totalise près de 120 espèces.
- Le sous-genre *Lopholoma* (Cass.) Dobrocz (appelé aussi *Acrocentron*) compte 100 espèces.
- Le sous-genre *Cyanus* (Mill.) Hayek, contient 30 espèces.

### **2.1. Caractères morphologiques du genre *Centaurea***

Les espèces appartenant au genre *Centaurea* sont caractérisées par des capitules multiflores à fleurs homomorphes ou dimorphes. L'involucre est ovoïde ou globuleux, à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Les bractées sont homomorphes, dimorphes, ou polymorphes. On y distingue pour la classification: des bractées extérieures (ou inférieures) plus courtes, des bractées moyennes et des bractées internes ou supérieures. Les bractées peuvent être surmontées ou non par un appendice différencié. Cet appendice, très utilisé en systématique, peut être scarieux ou non, penné, pectiné, triangulaire, décurrent (se prolongeant sur le corps de la bractée), armé, constitué par une ou plusieurs épines, etc. Le réceptacle est plan ou subplan, garni de soies abondantes. Les fleurs marginales sont généralement neutres et souvent rayonnantes. Celles du disque sont hermaphrodites et ± irrégulières. Les anthères sont sagittées à la base. Le style est à branches courtes. Les akènes sont oblongs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non. L'aigrette est soit absente soit présente. Elle peut être simple ou double, persistante ou caduque. Les Centaurées sont des plantes herbacées, annuelles ou vivaces (Quézel & Santa 1963).

### **2.2. Evolution des caryotypes dans le genre *Centaurea***

Comme la plupart des espèces végétales, chez les Centaurées, il existe une étroite corrélation entre la caryologie et la systématique (Romaschenko *et al.* 2004).

L'importance de la caryologie dans la famille des Asteraceae a été initialement suggérée par Guinochet et Foissac (1962) et plus profondément traitée plus tard par Tonjan (1980), Garcia-Jacas et Susanna (1992), Susanna *et al.* (1995), Garcia-Jacas *et al.* (1996) et Wagenitz et Hellwig (1996).

Ces espèces appartiennent aux plantes où la polyploïdie joue un rôle considérable dans l'évolution et engendre des difficultés taxonomiques (Vanderhoeven *et al.* 2002 ; Koutecky 2007). Durant l'évolution de ce genre, allo et autopolyploïdisation sont suivis d'une dispoloïdie et de restructurations chromosomiques.

Comme beaucoup de genre de la famille (*Crepis* L. et *Leontodon* L.), le genre *Centaurea s.l.* montre une dispoloïdie descendante du plus grand nombre de base  $x=16$  au plus petit  $x=7$ . (Susanna *et al.* 1995 ; Garcia-Jacas *et al.* 1996 ; Garcia-Jacas *et al.* 1997), et comprend trois niveaux de ploïdies ( $2x$ ,  $4x$  et  $6x$ ) (Romaschenko *et al.* 2004 ; Siljak-Yakovlev *et al.* 2005)

Les espèces avec un nombre de base supérieur à 12 sont considérées comme étant les plus primitives et celle qui ont un nombre de base inférieur à 12 sont considérées comme les plus évoluées. Ainsi, les limites entre les espèces primitives et les dérivées (les plus évoluées) peuvent être placées au niveau de  $x=12$  (Garcia-Jacas *et al.* 1996 ; Susanna & Garcia-Jacas, 2009).

### **2.3. Importance phytochimique et pharmaceutique du genre *Centaurea***

Les espèces appartenant au genre *Centaurea* sont très riches en métabolites secondaires. Ces métabolites constituent de bons protecteurs contre les herbivores (Olson & Kelsey, 1997 ; Susanna & Garcia-Jacas 2009) et ont une bonne activité antimicrobienne (Karioti 2001 ; Ugur *et al.* 2009). Ces métabolites sont essentiellement composés de substances lipophiliques, spécialement les lactones sesquiterpènes (Tarasov *et al.* 1975 ; Koukoulista *et al.* 2005 ; Karamenderes *et al.* 2007). On trouve aussi les flavonoïdes (Zapesochnaya *et al.* 1978, Nacer *et al.* 2006) et les phénols (Bubenchikov *et al.* 1992).

Plusieurs espèces appartenant au genre *Centaurea* ont été largement utilisées en médecine traditionnelle, pour guérir différentes maladies telles que hémorroïdes, abcès et rhume commun (Baytop 1999 ; Kargioglu *et al.* 2008, 2010; Sezik *et al.* 2001). Elles ont aussi été utilisées comme anti-diarrhéiques, antipyrétiques, dimétiques, cholérétiques, anti-inflammatoires, et antibactériens (Arif *et al.* 2004 ; Kargioglu *et al.* 2010 ; Gokhan *et al.* 2011). Plusieurs espèces de *Centaurea* ont été étudiées par rapport à leurs propriétés curatives et leurs compositions chimiques (Tab. 2).

**Tableau 1** : Quelques espèces de *Centaurea* qui ont été étudiées sur le plan phytochimique et leurs citations correspondantes.

Espèces	Articles publiés
<i>C. affinis</i>	Tešević <i>et al.</i> 2007
<i>C. aggregata</i>	Zapesochnaya <i>et al.</i> 1978 ; Yildirim <i>et al.</i> 2009
<i>C. arenaria</i>	Tešević <i>et al.</i> 2007 ; Csapi <i>et al.</i> 2010
<i>C. aplolepa</i>	Tava <i>et al.</i> 2010 (ssp. <i>Carueliana</i> )
<i>C. attica</i>	Koukoulista <i>et al.</i> 2005
<i>C. austro-anatolica</i>	Ugur <i>et al.</i> 2009
<i>C. besseriana</i> ( <i>C. ovina</i> Aggr.)	Formisano <i>et al.</i> 2011
<i>C. cadmea</i>	Karamenderes <i>et al.</i> 2007
<i>C. kalolepis</i>	Tekeli <i>et al.</i> 2010, 2011 ; Erel <i>et al.</i> 2010
<i>C. cariensis</i>	Tekeli <i>et al.</i> 2010 ; 2011 (ssp <i>maculeseps</i> & <i>macrolepis</i> ) ; Ugur <i>et al.</i> 2010 (ssp <i>niveotomentosa</i> )
<i>C. cristata</i>	Formisano <i>et al.</i> 2010
<i>C. cuneifolia</i>	Tešević <i>et al.</i> 2007 ; Rosselli <i>et al.</i> 2009
<i>C. cyanus</i>	Chiru 2009
<i>C. deusta</i>	Karioti <i>et al.</i> 2001 ; Koukoulista <i>et al.</i> 2005 ; Tešević <i>et al.</i> 2007 (ssp <i>splendens</i> )
<i>C. dichora</i>	Altintas <i>et al.</i> 2004
<i>C. diffusa</i>	Tharayil <i>et al.</i> 2009
<i>C. euxina</i>	Rosselli <i>et al.</i> 2009
<i>C. glaberrima</i>	Tešević <i>et al.</i> 2007
<i>C. gracilentia</i>	Formisano <i>et al.</i> 2011
<i>C. musimonum</i>	Medjroubi <i>et al.</i> 1997
<i>C. pelia</i>	Lazari <i>et al.</i> 2000
<i>C. pseudomaculosa</i>	Zapesochnaya <i>et al.</i> 1978 ; Bubenchikov <i>et al.</i> 1992
<i>C. spinosa</i>	Saroglou <i>et al.</i> 2011
<i>C. spinosociliata</i>	Formisano <i>et al.</i> 2010
<i>C. stoeb</i>	Perry <i>et al.</i> 2005 ; Broz et Vivanco 2006 ; Tešević <i>et al.</i> 2007 ; Tharayil et Triebwasser 2010 ; Pollock <i>et al.</i> 2011
<i>C. thessala</i> ssp <i>drakiensis</i>	Lazari <i>et al.</i> 2000 ; Koukoulista <i>et al.</i> 2005
<i>C. tougourensis</i>	Nacer <i>et al.</i> 2006
<i>C. virgata</i>	Tarasov <i>et al.</i> 1975 (ssp <i>squarrosa</i> ) ; Tešević <i>et al.</i> 2007 (ssp <i>squarrosa</i> ) ; Yildirim <i>et al.</i> 2009 ; Takeli <i>et al.</i> 2011
<i>C. zuccariniana</i>	Lazari <i>et al.</i> 2000

### 3. Présentation des espèces étudiées

#### 3.1. *Centaurea musimonum* Maire.

Maire, Bull. Soc. Hist. Nat. Afrique N 9 :180 (1918)

Chez cette espèce les bractées de l'involucre sont à appendice constitué par une forte épine vulnérante (sans épines secondaires latérales ou basales). C'est une plante subcaule cespiteuse, de petite taille (10-15 cm). Les feuilles sont lyrées pinnatifides; les basilaires longuement pétiolées, évaginées et semi amplexicaules. Les capitules terminaux sont de 1 cm<sup>2</sup> (fleurons et épines non compris). Les appendices des bractées sont munis d'un tomentum blanchâtre à la base interne. Les corolles sont longuement exsertes, jaunes. Les akènes sont chauves, de 4 mm de long environ. Selon Quézel et Santa (1963) c'est une espèce qui a été localisée dans les rochers et les ravins des montagnes arides. Elle a été signalée par ces mêmes auteurs comme endémique des confins algéro-marocains. (Quézel & Santa 1963) (Fig 1a, 2a).

#### 3.2. *Centaurea maroccana* Ball. (Ball 1873)

≡ *Calcitrapa maroccana* (Ball.) Holub (1973. Preslia 45(2) : 143 (1973).

= *Centaurea pterodonta* Pomel (1874) Nouv. Fl. Atl. : 28 (1974)

Les corps des bractées moyennes et les appendices sont de couleurs différentes (corps jaunâtre et appendice brun-noir). Les appendices sont constitués d'une épine fine et longue (de 2 à 2,5 cm) avec 4 épines plus courtes (2-3 de chaque côté). C'est une plante annuelle du Tell et des hauts plateaux, à tige ailée. C'est une plante pubescente laineuse, de 20-40 cm. Les tiges sont rameuses, divariquées. Les capitules sont soit terminaux soit situés dans les dichotomies. Les fleurs sont jaunes, involuclés par des feuilles bractéales linéaires et courtes, ovoïdes coniques. Les akènes sont de couleur noire, de très petite taille, à aigrette blanche et plus longue qu'eux. Elle se rencontre généralement dans les champs, les pâturages arides Ibéro-Maurétanien. Elle est appelée dans le dialecte local le *Neggar*. Selon Ozenda (1991), *C. maroccana* est une espèce endémique algérienne (Fig 1b, 2b).

#### 3.3. *Centaurea melitensis* L. (Linné 1753)

≡ *Calcitrapa melitensis* (L.) Soják

= *Centaurea melitensis* var. *apila* Rouy (1905). Fl. France (Rouye) 9 :16 (1905)

= *Centaurea apula* Lam. (1785). Encycl. (Lamarck) 1 : 674 (1785)

= *Centaurea melitensis* var. *couferta* Webb et Berthel. (1844). Hist. Nat. Iles Canaries (Phytogr.) 3 (2) : 360 (1844).

C'est une plante annuelle. Les bractées de l'involucre sont à appendices comportant 2 à 6 épines latérales et non scarieux à la base. Ce sont des plantes de taille variable. La tige est droite et rude et étroitement ailée. Les feuilles sont décurrentes sur la tige. Les capitules sont petits (1 cm de large sur 1,5 cm de long), ils sont souvent en corymbe dense, plus ou moins aranéeux, à fleurs jaunes et glanduleuses. Les appendices sont à épine médiane plus récurvée. Les akènes sont de 3 mm environ, de couleur grisâtre. Ils sont pubescents, à aigrette plus courte ou égalant le corps. C'est une espèce qui se rencontre souvent dans les champs, les pâturages arides dans toute l'Algérie. Souvent appelée : *Croix de Malte*, ou bien en arabe dialectal : «*Alitime* », (Quézel & Santa 1963) (Fig. 1c, 2c).

#### **3.4. *Centaurea tougourensis* subsp *tougourensis* Q. et S.**

≡ *Centaurea tougourensis* Boiss. et Reut. subsp *tougourensis* (1856). Diagn. Pl. Orient., Ser. 2 3 :76 (1856).

= *Centaurea tougourensis* var *brevimucronata* Maire (1938). Bull. Soc. Hist. Nat. Afrique N. 29 : 2490 425 (1938).

= *Centaurea tougourensis* var *medians* Maire.

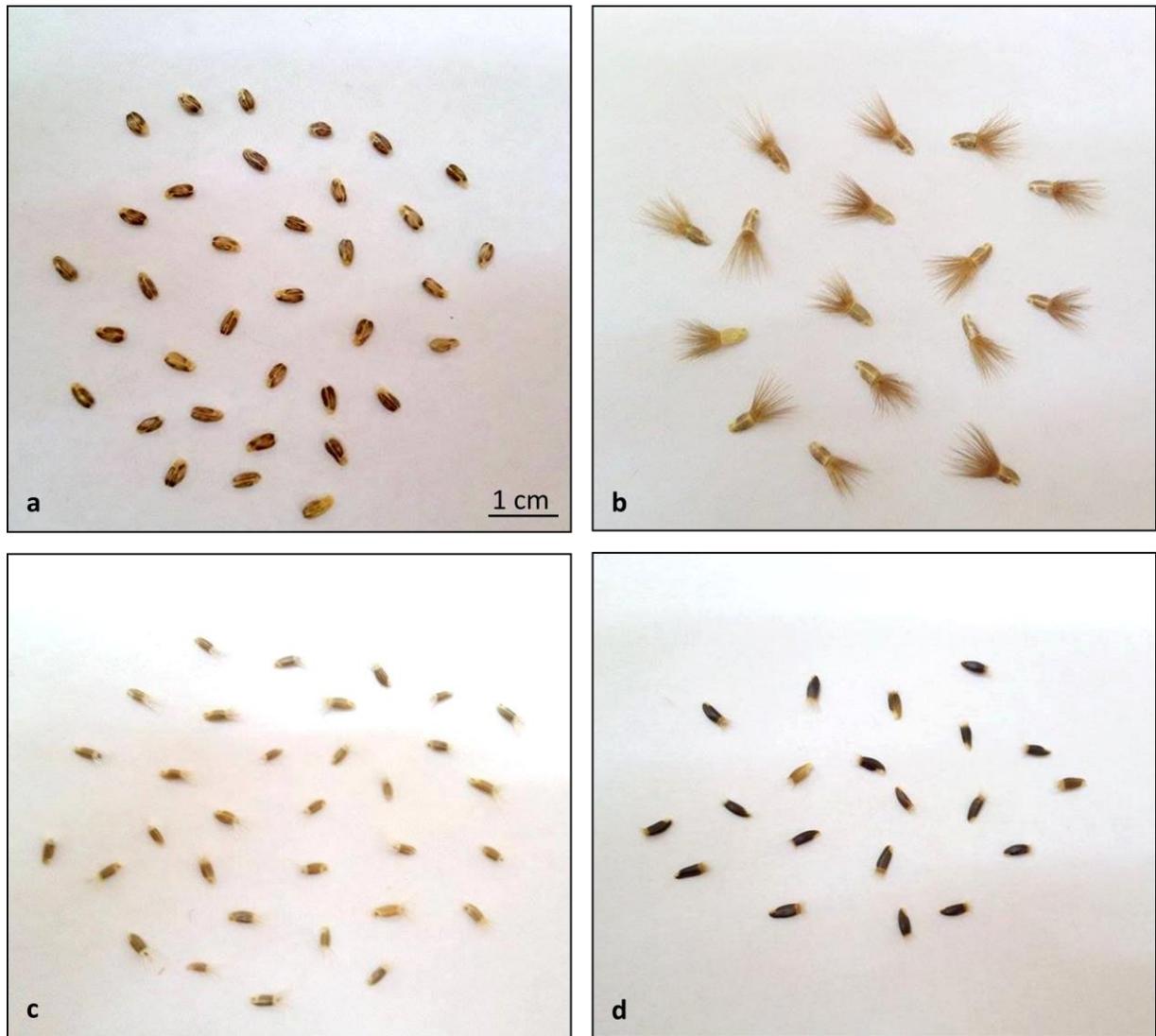
= *Centaurea tougourensis* var. *transiens* Maire. Bull. Soc. Hist. Nat. Afrique N. 26 : 1846 213 (1935).

Les appendices des bractées ont une partie scarieuse-blanchâtre très marquée possédant 10-14 laciniures. Les plantes sont ligneuses à la base, mesurant de 30-40 cm. Elles sont cendrées- pubescentes. Les tiges sont rameuses. Les rameaux sont rigides. Les feuilles sont pinnatilobées à lobes linéaires; non décurrentes sur la tige. Les capitules sont petits de 5-10 mm de large sur 15 mm de long. Les fleurs sont purpurines. Les bractées sont munies de nervures très apparentes. L'Aigrette est trois fois plus courte que l'akène, l'interne est semblable à l'externe. C'est une espèce qui se rencontre dans les rocailles, aux Aurès, à Djebel Tougour, Djebel Guethiane, Guadoust. Elle est endémique Algérienne, (Quézel et Santa 1963) (Fig. 1d, 2d)



**Figure 1** : Photographies représentant les espèces de *Centaurea* étudiées (Benamara-Bellagha 2013)

a : *C. musimonum* ; b : *C. maroccana*; c: *C. melitensis*; d: *C. touqourensis* ssp *touqourensis*



**Figure 2 p:** Photographies représentant les akènes des espèces de *Centaurea* étudiées (Benamara-Bellagha 2013)

a : *C. musimonum* ; b : *C. maroccana*; c: *C. melitensis*; d: *C. tougourensis* ssp *tougourensis*

#### 4. Notion d'endémisme

Le terme endémisme a été utilisé pour la première fois en Biologie Végétale par De Candolle (1820). Il désigne des espèces poussant exclusivement dans une aire déterminée.

La catégorisation des espèces endémiques sélectionnées selon des critères bien connus (par exemple l'écologie, l'âge, etc.) est l'une des questions les plus controversées. La caryologie est considérée comme l'un des outils d'analyse le plus informatif utilisé pour éclaircir cette question (Hinz 1989; Ferreira & Boldrini 2011). Chiarugi (1949) a été le premier à introduire les techniques caryologiques dans l'étude de la flore endémique, suivi de près par Martinoli (1954).

En 1961, Favarger et Contandriopoulos ont proposé la première classification des plantes endémiques basée sur des données cytotaxonomiques.

L'étude de l'hétérochromatine constitutive et les différents marquages de cytogénétique moléculaire dans l'étude des espèces a aidé à comprendre et à déterminer le processus de différenciation et d'évolution des espèces endémiques.

Dans la même optique Favarger et Siljak-Yakovlev (1986) ont utilisé une nouvelle caractérisation cytogénétique pour compléter la définition des espèces endémiques avec des distinctions plus précises entre les espèces endémiques et les espèces voisines dans le cas où le nombre chromosomique et le niveau de ploïdie sont identiques (Siljak-Yakovlev & Peruzzi 2012). Toujours selon ces mêmes auteurs, ces espèces peuvent être des reliques de taxons très anciens. Elles sont appelées **paléo-endémiques** si elles sont taxonomiquement isolées (genre ou famille monotypique). Elles sont **patro-endémiques** si elles sont diploïdes et ont des espèces apparentées polyploïdes dont elles peuvent être à l'origine. D'autres espèces sont issues d'événements récents de spéciation, ce sont les **néo-endémiques**. Elles peuvent apparaître soit à partir d'événements de polyploïdisation (**apo-endémiques**) soit par différenciation progressive des populations dans certaines zones de l'aire de répartition de l'espèce génitrice (**schizo-endémiques**).

Dans la flore Algérienne, il a été signalé la présence de 700 espèces endémiques (Zeraia 1983). En se basant sur la flore de Quézel et Santa (1963), 653 espèces endémiques ont été répertoriées. Le genre *Centaurea* en contient dix (Annexe 1, Tab. 1).

Le taux d'endémisme en Algérie est de 12,6%. Parmi les espèces endémiques, 165 sont endémiques Nord Africaines, 270 endémiques Algériennes. Alors que l'UICN (Union Internationale de Conservation de la nature) ne signale que 168 endémiques spécifiques à l'Algérie.

## 5. Asymétrie du caryotype

Le concept d'asymétrie, c'est-à-dire, un caryotype marqué par la prédominance de chromosomes avec des centromères terminaux et subterminaux (asymétrie intrachromosomique) et une grande hétérogénéité dans la taille du génome (asymétrie interchromosomique) a été développé en premier par Levitsky (1931). Plus tard Stebbins (1971) a proposé une méthode quali-quantitative pour l'estimation de l'asymétrie des caryotypes. 12 catégories en tenant compte de quatre classes (de 1 à 4) définies en fonction de l'augmentation de la proportion des chromosomes avec un arm ratio  $< 2 : 1$ , sont combinées avec trois classes (A, B, C) définies par rapport à l'augmentation du ratio entre le plus grand et le plus petit chromosome du complément.

Il existe deux types d'asymétrie :

- **L'asymétrie interchromosomique** : résulte de l'hétérogénéité entre la taille des chromosomes. Plusieurs auteurs ont proposés des estimations quantitatives de cette asymétrie : l'index **Rec** (Greilhuber & Speta 1976; Venora *et al.* 2002), l'index **A<sub>2</sub>** (Romero Zarco 1986), le ratio **R** (Siljak-Yakovlev 1986), le **CV<sub>CL</sub>** (Lavania & Srivastana 1992 ; Watanabe *et al.* 1999 ; Paszko 2006). Ce dernier est considéré comme un paramètre statistiquement correct et capable de capturer même les petites variations entre les tailles des chromosomes dans un complément (Tab 3).

- **L'asymétrie intrachromosomique** : est plus complexe, elle est due aux différentes positions du centromère. Le premier index quantitatif le **TF%** a été proposé par Huziwara (1962) suivie du **AsK** de Arano (1963). Plus tard, de nouvelles propositions ont vu le jour : le **Sy<sub>i</sub>** (Greilhuber & Speta 1976 ; Venora *et al.* 2002), le **AsI%** (Arano & Saito 1980), le **A<sub>1</sub>** (Romero Zarco 1986), le **CG** (Lavania & Srivastava 1992), le **A** (Watanabe *et al.* 1999), **CV<sub>CL</sub>** (Paszko 2006) (Tab. 2)

Ce dernier paramètre (coefficient de variation de l'indice centromérique a été revendiqué par Paszko (2006) comme étant le seul paramètre à fondement statistique. Toutefois, sa

proposition a été vivement critiquée par Zuo et Yuan (2011) qui témoignent que le  $CV_{Cl}$  n'est pas en mesure de saisir et d'exprimer quantitativement le sens original du caryotype asymétrique (c'est-à-dire la prévalence de chromosomes télocentriques et subtélocentriques) mais seulement de quantifier la variation relative (hétérogénéité) entre les positions du centromère dans le caryotype. Par conséquent, le problème d'une bonne estimation de l'asymétrie intrachromosomique est resté ouvert jusqu'aux travaux de Peruzzi et Eroğlu (2013), où ils proposent un nouvel indice, le  $M_{CA}$  (Mean Centromeric Asymmetry). C'est un paramètre qui est particulièrement utile lorsque la variation de la taille des chromosomes est négligeable (Peruzzi & Eroğlu 2013).

**Tableau 2 :** Différentes méthodes d'évaluation de l'asymétrie du caryotype (Zuo & Yuan 2011)

Références	Méthodes d'évaluation de l'asymétrie
Stebbins (1971)	Intrac Proportion des chromosomes avec un ratio des bras <2:1 1.00 = 1; 0.99–0.51 = 2; 0.50–0.01 = 3; 0.00 = 4 Bimod le plus long/le plus court: <2:1 = A; 2:1–4:1 = B; >4:1 = C
Huziwara (1962)	Intrac TF% = longueur total des bras courts/longueur totale des chromosomes. Bimod
Arano (1963)	Intrac Ask% = longueur des bras longs du lot chromosomique/longueur totale des chromosomes Bimod
Greihuber et Speta (1976)	Intrac $S_{yi} = (\text{moyenne longueur bras courts} / \text{moyenne longueur bras longs}) \times 100$ Bimod Rec = $(\sum CL_i / LC) / n \times 100$ ( $CL_i$ = longueur de chaque chromosome; LC = longueur du chromosome le plus long; n = nombre de chromosomes analysés)
Romero Zarco (1986)	Intrac $A_1 = 1 - \sum (b_i/B_i) / n$ ( $b_i$ = la moyenne de la longueur du bars court dans chaque paire chromosomique; $B_i$ = la moyenne de la longueur du bras long dans chaque paire chromosomique; n = le nombre de paires chromosomiques) Bimod $A_2 = s/x$ (s = déviation standard de la longueur chromosomique; x = la moyenne de la longueur chromosomique)
Lavana et Srivastava (1992)	Intrac CG = (longueur médiane bras court/ longueur médiane des chromosomes) x 100 Bimod CV = $(S_{CL} / x_{CL}) \times 100$ ( $S_{CL}$ = déviation standard de la longueur chromosomique; x CL = moyenne de la longueur chromosomique) DI = $(CG \times CV) / 100$
Watanabe <i>et al.</i>	$A = \sum (B_i - b_i / B_i + b_i) / n$ ( $B_i$ = longueur du bras long de chaque chromosome; $b_i$ = longueur du bras court de chaque chromosome, n = le nombre

(1999)	haploïde de chromosomes Bimod
Paszko (2006)	Intrac $CV_{CI} = (S_{CI} / \bar{x}_{CI}) \times 100$ ( $S_{CI}$ = deviation standard de l'index centromérique; $\bar{x}_{CI}$ = moyenne de l'index centromérique) Bimod $CV_{CL} = A_2 \times 100$ ( $A_2$ proposé par by Romero Zarco 1986) $AI = (CV_{CL} \times CV_{CI})/100$

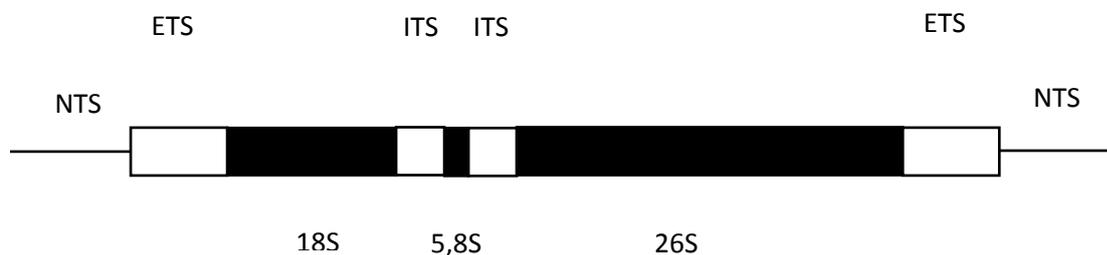
Intrac: asymétrie intrachromosomique, bimod: bimodalité

## 6. Organisation des gènes ribosomiques

Les ADN ribosomiques (35S et 5S) sont les segments d'ADN les plus utilisés pour la cartographie et le marquage chromosomique chez les plantes. Ils sont hautement conservés et largement utilisés comme marqueur cytogénétique moléculaire (Yakovlev *et al.* 2014).

- **Les ADN ribosomiques 35S (18S-5,8S-26S)** : se présentent sous forme de séquences répétées en tandem, associées aux organisateurs nucléolaires riches en hétérochromatine (Long & David 1980). Les unités de transcriptions alternent avec des espaceurs intergéniques non transcrits (NTS). Chaque unité est formée de trois unités, 18S, 5,8S et 26S. Les sous-unités sont séparées par des espaceurs transcrits (Internal Transcribed Spacer), ITS<sub>1</sub> et ITS<sub>2</sub> respectivement (Fig. 3).

Chez les plantes, chaque unité peut mesurer en moyenne 10 Kb. Des centaines ou même des milliers de copies d'unités répétées peuvent être présentes et représenter plus de 10% du génome (Pruitt & Meyerowitz 1986 ; Heslop-Harrison 2000). Les ADNr sont organisés en tandem au sein des organisateurs nucléolaires (NORs).



**Figure 3** : Représentation schématique d'une unité de répétition des gènes ribosomiques 18S-5,8S-26S (Sollner-Webb & Mougey 1991). Les bandes noires correspondent aux régions codantes. Les bandes blanches correspondent aux régions « espaceurs » transcrits présentes uniquement dans l'ARN messager. ETS : espaceur externe transcrit, ITS : espaceur interne transcrit, NTS : séparant les unités géniques.

- **Les ADN ribosomiques 5S** : Ils sont cartographiés en dehors des NORs. Ils sont organisés en séquences hautement répétées en tandem de l'unité de base. Ils sont de 200 à 900 pb de long, et près de 1000 à 5000 copies (Goldsbrough *et al.* 1981, Long & David 1980). Le gène peut mesurer 120 pb de long et contient des régions codantes et des espaceurs intergéniques de tailles variables.

La localisation chromosomique des 5S rDNA a été étudiée chez plusieurs espèces végétales par hybridation *in situ*. Leur nombre est généralement différent de celui des loci des ADNr 35S dans le génome du même individu (Baum & Appels 1991).

Chez les eucaryotes supérieurs les gènes ribosomiques 35S et 5S sont relativement indépendants l'un de l'autre. Ils sont souvent organisés sur des loci localisés sur des chromosomes différents ou en des positions différentes sur le même chromosome (Sastri *et al.* 1992 ; Leitch & Heslop-Harrison 1993 ; Badaeva *et al.* 1996 ; Labaretz *et al.* 1996 ; Brown & Carlson 1997).

Les gènes ribosomiques 35S et 5S ont été largement étudiés pour comprendre l'organisation chromosomique et les relations évolutives et phylogéniques entre les taxa étroitement proches (Badaeva *et al.* 1996 ; de Bustos *et al.* 1996 ; Hanson *et al.* 1996).

## **7. Organismes nucléolaires et nucléoles**

Les NORs (régions des organisateurs nucléolaires) sont les sites de la formation des nucléoles (Shaw 2005). Ils sont visibles sur les constriction secondaires et ont tendance à être étroitement liés aux télomères. Leur nombre varie selon les espèces et chacun est localisé sur un chromosome différent.

Les nucléoles sont une sous structure nucléolaire formée pour la synthèse du ribosome (Mélèse & Xue 1995). Sa taille varie énormément selon l'activité cellulaire. Il est généralement formé à proximité de loci aux extrémités des chromosomes (NORs), et sont constitués de gènes répétés en tandem codant pour l'ARNr (Hernandez-Verdum 2006; Raska *et al.* 2006)

La formation des nucléoles est un signe d'activité des régions des organisateurs nucléolaires. Il existe une corrélation positive entre la taille de la constriction secondaire et la taille du nucléole formé par celle-ci (Anastassova-Kristeva *et al.* 1977; Nicoloff *et al.* 1979).

Les NORs sont généralement localisés sur les constriction secondaires des chromosomes et représentent les sites codants pour les gènes ribosomiques 18S-5,8S-26S. Ces gènes sont présents en tandem, et forment des NORs quand ils sont transcrits et leur nombre varie largement entre les espèces (Sumner 1990).

Ils peuvent être colorés par la technique du N-banding, par la coloration au nitrate d'argent et même avec les fluorochromes tels que la chromomycine qui colorie sélectivement l'ADN riche en bases GC (Schweizer 1976).

## **8. Taille du génome**

L'expression taille du génome a été utilisée pour la première fois par Hinegardner (1976). Elle désignait la masse ou la quantité d'ADN dans le génome haploïde non répliqué.

Cavalier-Smith (1985) et Gregory et Hebert (1999) ont considéré que « taille du génome » et « valeur C » sont équivalentes. Ils donnent comme définition : la quantité d'ADN mesurée par poids ou en nombre de paires de bases dans une seule copie de toutes les séquences d'ADN du noyau d'un organisme.

Ces définitions ne sont plus d'actualité. Selon Greilhuber *et al.* (2005), il est plutôt linguistiquement et scientifiquement acceptable d'utiliser « taille du génome » dans son sens large. Elle désigne à la fois tout le complément chromosomique (avec le nombre chromosomique  $n$ ) et sa quantité d'ADN et le génome monoploïde (avec le nombre chromosomique  $x$ ) et sa quantité d'ADN chez les polyploïdes.

Selon ces mêmes auteurs, trois notions ont été proposées :

- Génome holoploïde : pour désigner tout le complément chromosomique sans tenir compte du degré de ploïdie d'un organisme.
- Taille du génome holoploïde : pour désigner la quantité d'ADN de tout le complément chromosomique d'un organisme.
- La valeur  $C_x$  ou taille du génome monoploïde : pour désigner la quantité d'ADN du génome monoploïde chez les polyploïdes et les non polyploïdes

Elle a été estimée chez les espèces végétales pour la première fois depuis 25 ans (Galbraith *et al.* 1983). Malgré son importance, la taille du génome a été estimée pour seulement près

de 1,8% des angiospermes et 28% de gymnospermes (Doležel & Bartôš 2005; Leitch & Bennett 2007).

La littérature actuelle vise à montrer les mécanismes de l'évolution de la taille du génome (Shmidt *et al.* 2000; Gregory 2005) et les relations entre celle-ci et les facteurs écologiques (Slovak *et al.* 2009).

L'analyse de la quantité d'ADN nucléaire est utile dans la compréhension de la biologie moléculaire des plantes, l'évolution des génomes, la taxonomie, l'écologie, la physiologie et le développement (Bennett *et al.* 2000), dans la systématique et l'évolution (Godelle *et al.* 1993; Martel *et al.* 1997; Cerbah *et al.* 1998; Ohri 1998; Cerbah *et al.* 2001).

### **9. Palynologie chez le genre *Centaurea***

On désigne sous le nom de pollen l'ensemble des spores ou des spores germées mâles (gamétophytes mâles) des plantes à fleurs, gymnospermes et angiospermes.

Un pollen est constitué de plusieurs cellules destinées à intervenir dans la fécondation des organes femelles. Ces cellules sont enfermées dans une enveloppe complexe constituée schématiquement de deux parties :

- L'intine, constituées de polysaccharides et peu résistante donc non fossilisable.
- L'exine formée de sporopollénine (matière organique terpénique polymérisée) qui n'est détruite que par oxydation. Elle est très résistante donc fossilisable.

Cette enveloppe comporte une ou plusieurs ouvertures de forme caractéristiques (pores ou sillons) qui permettent le passage du tube pollinique lors de la germination du pollen sur la fleur femelle. Sa surface est en général porteuse d'une ornementation spécifique.

La classification des grains de pollen repose sur :

- La présence ou non de pores ou de sillons :
  - Sans ouvertures (ni pore ni sillon) : pollen inaperturé.
  - Pores seules (petites ouvertures circulaire) : pollen poré
  - Sillons seules (ouverture très allongée) : pollen colpé.
  - Sillons et pores peuvent coexister : pollen colporé.
- Aspect de la surface (ornementation et structure de l'exine)
- Taille et allongement peuvent aussi être pris en compte.

Selon Dimon (1971a et b), le pollen de la famille des Asteraceae, est principalement caractérisé par:

- la présence d'un tectum structuré
- la surface tectale toujours pourvue d'épines de taille et de formes variables
- l'existence d'un système apertural complexe avec une aperture externe (ectoaperture), une aperture moyenne (mesoaperture) située sous la précédente et une aperture interne (endoaperture).

Chez le genre *Centaurea*, la morphologie du pollen a été étudiée pour la première fois par Wagenitz (1955). Il est généralement isopolaire à symétrie radiale d'ordre 3. Tricolporé, longiaxe ( $P > E$ ), aquiaxe ( $P = E$ ) et plus rarement bréviaxe ( $P < E$ ). Le P et le E étant, respectivement, l'axe polaire et l'axe équatorial (Siljak-Yakovlev 1986).

Plusieurs types polliniques ont été identifiés (Wagenitz 1955 ; Martin-Villodre & Garcia-Jacas 2000 ; Garcia-Jacas *et al.* 2006) :

- Le type *Centaurea scabiosa* dans le sous-genre *Lopholoma*.
- Le type *Cyanus* et *Montana* dans le sous-genre *Cyanus*.
- Le type *Jacea* dans le sous-genre *Centaurea*

Parmi les 303 espèces étudiées par Wagenitz (1955), 180 possèdent le type de pollen *Jacea* ce qui représente près de 61%.

Wagenitz (1955, 1974b), donne un classement évolutif des différents types polliniques. Les types *Cyanus* et *Montana* sont les plus primitifs et les types *Centaurea scabiosa* et *Jacea* sont les plus évolués.

## **Matériel et méthodes**

### **1. Matériel**

#### **- Le matériel :**

Nous avons échantillonné le long d'un transect Nord Sud (de Constantine à Tolga). Le tableau 3 représente les localités précises où nous avons récolté nos populations. Rappelons que les endémiques ont une aire de distribution restreinte. Ainsi, sept populations et une dizaine d'individus par population ont été récoltés.

Du point de vue climatique, la wilaya de Batna est caractérisée par un étage bioclimatique semi-aride frais. Cette zone reçoit en moyenne 348.4 mm/an. Cette semi-aridité se traduit sur le terrain par une amplitude thermique élevée (20°), par des étés brûlants et des hivers glacés, de fréquents vents chauds et très secs pendant la saison chaude. La saison biologiquement sèche dure de 4 à 5 mois en moyenne.

La wilaya de Biskra est caractérisée par un étage bioclimatique aride à hiver doux. La moyenne annuelle des précipitations est de 131,46 mm/an pour un nombre de jours de pluie de 35 jours environ. La région se caractérise par une forte température (moyenne annuelle : 22,67°C) avec de fortes variations saisonnières (34,89°C en juillet et 11,25°C en janvier).

#### **- La période de collecte :**

Pour l'étude cytogénétique, la récolte s'est étalée sur plusieurs années (de 2006 à 2009). Des sorties sur terrains ont été organisées d'abord au printemps à la période de floraison (avril et mai), afin de procéder à la localisation et l'identification des espèces qui s'est faite sur la base de la description de Quézel et Santa (1963), puis en été fin Juin, début juillet à la période de formation du fruit pour récolter les akènes. Des centaines d'akènes par espèces ont été utilisées.

Pour la partie palynologique, la collecte des capitules floraux s'est faites sur deux années : printemps 2013 et printemps 2014.

**Tableau 3** : Origine géographique du matériel végétal étudié

Espèces	Sections	Localités	Latitudes	Longitudes
<i>C. musimonum</i> Maire	<i>Chamaecyanus</i> Willk.	Ain yagout	35° 46' 35'' N	6° 27' 7'' E
		Ain touta	35° 22' 36'' N	6° 45' 18'' E
		Batna	35° 32' 41'' N	6° 9' 35'' E
<i>C. maroccana</i> Ball.	<i>Mesocentron</i> (Cass.) DC.	El Kantara	35° 13' 33'' N	5° 42' 43'' E
		Biskra	35° 06' 39'' N	6° 27' 7'' E
<i>C. melitensis</i> L.	<i>Mesocentron</i> (Cass.) DC.	Tamarins	35° 19' 30'' N	55° 50' 08'' E
<i>C. tougourensis</i> subsp <i>tougourensis</i> Q. et S.	<i>Phalolepis</i> (Cass.) DC.	Djebel Tougour	35° 06' 27'' N	6° 45' 18'' E

Des difficultés ont été rencontrées lors de la collecte des échantillons de *C. tougourensis* subsp *tougourensis*. Les touffes étaient pour la plupart localisées sur le bord de la route et en petit nombre. Suite à des travaux d'élargissement de la chaussée la plupart des individus ont été arrachés.

Lors des différentes sorties de prospection, d'autres espèces (qui ne sont pas endémiques) ont été collectées : *C. sphaerocephala* L. dans la région de Skikda, *C. incana* Desf. dans les balcons du Ghoufi et *C. omphalotricha* Coss. et Dur. dans la région de Arris.

*C. incana* a présenté des capitules qui, pour la plupart, étaient vides, ou comportaient des akènes stériles ou infestés d'insectes. Pour *C. sphaerocephala* et *C. omphalotricha* nous n'avons pas pu faire germer les akènes et ceci malgré plusieurs tentatives. Nous avons finis pour l'instant par différer l'étude de ces trois espèces.

## **2. Méthodes**

### **2.1 Méthodes appliquées sur les méristèmes racinaires**

L'établissement des caryotypes a été réalisé selon les méthodes proposées par Jahier (1992).

Il comporte les étapes suivantes :

#### **a/ Germination**

Les akènes sont mis à germer dans des boîtes de Pétri tapissées de papier Whatman, imbibé d'eau distillée. Les boîtes de Pétri sont ensuite transférées à 24<sup>0</sup> C à l'étuve. La germination des akènes est obtenue après 3 à 6 jours selon les espèces.

#### **b/ Prétraitement**

Le prétraitement des racines est une étape essentielle pour l'étude des chromosomes somatiques. Il remplit plusieurs fonctions: arrête la formation de fuseaux, augmente le nombre de cellules en métaphase en bloquant les divisions au stade métaphasique, contracte les chromosomes en rendant les constriction bien distinctes, et augmente la viscosité du cytoplasme.

De nombreux agents de prétraitement peuvent être utilisés. Nous avons choisi deux d'entre eux : la colchicine et la 8 hydroxy-quinoléine.

Nous avons utilisé en premier la colchicine (0,05%). Nous n'avons pu obtenir des résultats satisfaisants (chromosomes tassés, plaques métaphasiques trop compacts formées de chromosomes non individualisés).

Nous avons pu obtenir en utilisant la 8 hydroxy-quinoléine à 0,002 M pendant 3h à une température de 16<sup>0</sup> C de meilleurs résultats.

Un prétraitement avec la 8 hydroxy-quinoléine est efficace pour les plantes dont les chromosomes sont de petite taille. Il rend les constriction primaires (kinétochores) et les constriction secondaires (organisateurs nucléolaires) très clairs.

#### **c/ Fixation**

La science de l'étude des chromosomes dépend de la bonne fixation. La fonction d'un fixateur est de fixer, ou arrêter les cellules à un stade souhaité de la division cellulaire sans causer de distorsion, de l'enflure, ou le rétrécissement des chromosomes (Sharma & Sharma 1965)

Nous avons utilisé le Carnoy I composé d'éthanol acétique (3v :1v) (Carnoy 1886). Les racines sont plongées dans ce fixateur fraîchement préparé pendant au moins 48h à 4<sup>0</sup>C.

#### **d/ Stockage**

Les racines fixées peuvent se conserver pendant plusieurs jours, voir plusieurs mois dans de l'éthanol à 70% à une température de 4<sup>0</sup>C (Jahier 1992).

#### **e/ Hydrolyse**

Les racines sont hydrolysées dans de l'HCl 1N à 60<sup>0</sup>C pendant 12mn. L'hydrolyse permet un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelles.

#### **f/ Coloration**

Afin de mettre en évidence les zones méristématiques, les racines hydrolysées sont colorées à l'acéto-orcène pendant seulement quelques minutes (annexe).

#### **g/ Montage**

Le montage des lames est réalisé selon la technique de Conger et Fairchild (1953). Pour obtenir des préparations permanentes, les lamelles sont décollées après un passage d'au moins 24h dans un congélateur à -80<sup>0</sup>C, puis rincées à l'éthanol absolu et séchées à l'air libre pendant 24h. Les lames sont ensuite montées au Depex.

#### **h/ Construction du caryotype**

Un caryotype est constitué d'une plaque métaphisique d'un caryogramme et d'un idiogramme.

Différents paramètres caractérisent un caryotype, tels que le nombre chromosomique de base, la longueur totale des chromosomes, la longueur relative de chaque paire chromosomique, la présence de satellites, le degré de symétrie qui tient compte des longueurs totales des chromosomes et des positions centromériques.

Le caryogramme est une représentation systématisée des chromosomes d'une cellule, associés successivement d'après leurs caractères morphologiques (Siljak-Yakovlev 1986). Il est réalisé par la détection des chromosomes homologues et la détermination de la position de chacun d'eux selon la méthode de Levan *et al.* (1964). L'identification des types

chromosomiques en fonction de la position du centromère sur chaque chromosome a été effectuée selon ces mêmes auteurs.

Un degré de spiralisation trop important peu rendre difficile l'observation des satellites et des constriction secondaires. Selon Bentzer *et al.* (1971), le degré de spiralisation des chromosomes devrait être relativement le même pour toutes les plaques, la différence de longueur des chromosomes d'une préparation à une autre ne dépassant pas le seuil de 10%.

Les plaques métaphasiques sélectionnées ont été photographiées à l'aide d'un microscope Zeiss Axioscop muni d'une caméra Sony Color Video, model : MC-3255 série 406768 et d'un logiciel Axiovision 2.0.5.

La construction de l'idiogramme a été réalisée après des mesures effectuées sur cinq plaques métaphasiques appartenant à cinq individus différents de la même population.

Chaque type chromosomique est caractérisé par une position particulière du centromère (constriction primaire). Plusieurs méthodes et plusieurs nomenclatures ont vu le jour suite au développement intense de la cytogénétique humaine. Deux formules utilisées pour la localisation du centromère ont été adoptées suite au colloque sur la nomenclature des chromosomes humains en 1960 à Denver (Siljak-Yakovlev 1986) : le rapport des longueurs des bras  $r = Bl/Bc$  et l'indice centromérique  $Ic = Bc \times 100 / LT$ .

Outre le rapport  $Bl/Bc$  et l'indice centromérique ( $Ic$ ) d'autres paramètres sont proposés par Levan *et al.* (1964) tels que la différence entre les longueurs des bras longs et bras courts  $d = Bl - Bc$ .

Ainsi tous les paramètres pris en considération pour la construction des idiogrammes sont :

- Longueurs des bras courts ( $Bc$ ) et des bras longs ( $Bl$ )
- Longueur totale de chaque chromosome  $LT = Bc + Bl$
- Longueur totale relative de tous les chromosomes  $LTR = (LT / \sum LT) \times 100$
- Valeur moyennes des rapports bras longs / les bras courts  $r = Bl / Bc$
- Différence entre la longueur du bras long et celle du bras court  $d = Bl - Bc$

- Indice centromérique pour chaque paire chromosomique  $lc \% = (BC / BL) \times 100$
- Indice d'asymétrie intrachromosomal :  $M_{CA} = A \times 100$  où  $A = \text{moyenne } (BL-BC) / (BL+BC)$
- Indice d'asymétrie interchromosomal :  $CV_{CL} = A_2 \times 100$  où  $A_2 = s/x$  ( $s$  : déviation standard et  $x$  : moyenne des longueurs chromosomiques)
- Rapport R entre la paire chromosomique la plus longue et la plus courte de la garniture chromosomique.

Suite à cela on peut distinguer six types chromosomiques représentés dans le tableau 4.

**Tableau 4** : Nomenclature concernant la position du centromère proposée par Levan *et al.* (1964)

Position du centromère	d	r	lc	Type chromosomique
Point médian	00.0	1.0	50.0	M
Région médiane	00.0-02.5	1.0-1.7	50.0-37.5	m
Région submédiane	02.5-05.0	1.7-3.0	37.5-25.0	sm
Région subterminale	05.0-07.0	3.0-7.0	25.0-12.5	st
Région terminale	07.0-10.0	7.0-∞	12.5-00.0	t
Position terminale	10.0	∞	00.0	T

**M** : métacentrique, **m** : métacentrique senso largo, **sm** : submétacentrique, **st** : subtélocentrique, **t** : acrocentrique, **T** : télocentrique

## 2.2 Méthodes d'analyse cytogénétique moléculaire

La paroi des cellules végétales constitue une barrière pour un bon étalement des chromosomes. Il est recommandé d'utiliser des suspensions de protoplastes.

### **a/ Technique d'obtention des protoplastes**

C'est une technique qui a été mise au point par Geber et Schweiser (1987), elle consiste à obtenir des cellules débarrassées de leurs parois pectocellulosiques. Généralement un traitement enzymatique est nécessaire. Elle comprend les étapes suivantes :

- Prélèvement des méristèmes racinaires et les rincer dans un tampon citrate à pH 4,6 pendant au moins 20 min à température ambiante.
- Immersion des méristèmes dans une mixture enzymatique [4% R-10 cellulase (Yakult Honsha Co. Tokyo, Japan), 1% pectolyase Y-23 (Seishin Co. Tokyo, Japan), 4% hemicellulase (Sigma)] à 37° C pendant 20 à 25 min.
- Rinçage des racines dans de l'eau distillée pendant 20 min.
- Ecrasement dans une goutte d'acide acétique à 45%.
- Montage des pointes racinaires entre lame et lamelle.

### **b/ Technique de fluochrome-banding « coloration à la chromomycine A<sub>3</sub> »**

Cette technique met en évidence les parties de l'hétérochromatine riches en bases G-C. La technique adoptée est celle de Schweizer (1976) modifiée par Siljak-Yakovlev *et al.* (2002). Elle comprend les étapes suivantes :

- Incubation des protoplastes dans le tampon McIlvaine à pH 7 contenant 20 mM de MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O pendant 15 mn. Les lames sont ensuite débarrassées de l'excès de tampon.
- Dépôt d'une goutte de chromomycine A<sub>3</sub> (CMA, Sigma) sur la préparation durant 10 mn à l'obscurité.
- Rinçage avec le tampon McIlvaine à pH 7.
- Contre coloration des préparations avec le vert de méthyle à 0.01 % dans un tampon McIlvaine à pH 5,5 pendant 10 mn.
- Rinçage rapide avec le tampon McIlvaine à pH 5,5.
- Séchage des lames le plus possible
- Montage dans une goutte de Citifluor.
- Observation des lames au microscope à épifluorescence avec un filtre permettant une longueur d'onde d'excitation de 450 nm et d'émission de 560nm.

### **c/ Technique d'hybridation *in situ* par fluorescence**

L'hybridation *in situ* est définie comme l'hybridation d'une sonde d'acides nucléiques (ARN ou ADN) avec les acides nucléiques sur une préparation cytologique. Cette technique permet une localisation très précise des séquences complémentaires de la sonde. Appliquée sur des chromosomes en métaphase, le site de toute séquence ou gène peut être localisé. Cette méthode constitue donc un nouvel outil pour l'établissement de cartes génétiques.

Les lames utilisées pour la technique de coloration à la chromomycine A<sub>3</sub> ont été décolorées dans une solution fixatrice (3 :1 éthanol : acide acétique glacial) et déshydratées dans des bains d'éthanol à différentes concentrations (70%, 90%, 100%). Les lames sont ensuite séchées pendant au moins 12 heures à température ambiante.

Une double FISH en utilisant deux sondes d'ADN a été réalisée. La sonde utilisée pour localiser les 35S (18S-5,8S-26S) pTa71 est un clone de 4 Kb obtenu à partir d'un fragment EcoR1 incluant les séquences ADNr 35S à partir d'*Arabidopsis thaliana* marqué avec le fluorochrome Cy3 (Amershan, Courtaboeuf, France) par nick translation. La sonde utilisée pour localiser les ADNr 5S pTa794 (Gerlach et Dyer 1980) contient 410 pb de fragment de BamH1 isolé à partir du blé et marquée à la digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Maylan, France).

La technique d'hybridation *in situ* par fluorescence appliquée est celle proposée par Heslop-Harrison *et al.* (1991) avec de légères modifications.

- **Prétraitement des préparations chromosomiques**

- Déshydrater les lames dans une série de bains d'alcool (70%, 90% et 100%) pendant 5 min puis les sécher.

- Traiter les lames avec de la RNase (100 µg/ml dans 2xSSC) pendant 1 h à 37°C. C'est une étape nécessaire pour prévenir l'hybridation entre l'ADN et l'ARN cytoplasmique et pour éclaircir le cytoplasme autour des chromosomes.

- Rincer les lames avec 2xSSC pendant 3 x 5 min à température ambiante.

- Traiter les lames avec de la Pepsine (70 µl, 0.1mg/ml dans HCl 0.01 N) pendant 30 min à 37°C.

- Rincer avec 2xSSC pendant 3 x 5 min et déshydrater dans une série de bains d'alcool puis sécher pendant 1 h.

- **Préparation de la mixture de la sonde**

Les mélanges des sondes sont préparés en respectant les quantités mentionnées dans le tableau 5.

**Tableau 5** : Composition de la mixture de la sonde

Eléments	Volume de prise (µl)
Formamide à 50%	25 µl par lame
Dextran sulfate 10%	10 µl par lame
SDS à 10%	3 µl par lame
Sperme de saumon 250µl/mg	1.5 µl par lame
20xSSC	5 µl par lame
Sonde 35S	20 à 30 µg par lame
Sonde 5S	20 à 30 µg par lame
H <sub>2</sub> O pure	Compléter jusqu'à 50 µl de mixture.

- **Dénaturation et hybridation**

- Dénaturer la mixture de sonde dans une solution dénaturante (70% formamide dans 2xSSC) pendant 10 min à 70°C puis refroidir immédiatement dans de la glace pendant au moins 10 min.

- Déposer 50µl de mixture de la sonde dénaturée sur chaque lame. Recouvrir ensuite les lames de lamelles en plastiques. Les mettre ensuite dans des boîtes fermées hermétiquement par un ruban adhésif.

- Dénaturer l'ADN chromosomique et l'ADN de la sonde à 72°C pendant 10 min pour dénaturer les chromosomes, puis à 55°C pendant 5 min.

- Laisser incubé dans une chambre humide pendant toute une nuit à 37°C pour l'hybridation.

- **Rinçage post-hybridation**

Le rinçage après hybridation est nécessaire pour éliminer les sondes qui s'hybrident d'une manière non spécifique.

Après avoir laissé les lames en hybridation toute une nuit à 37°C, les lamelles sont enlevées délicatement et les lames rincées successivement avec balancement doux dans une série de 7 bains :

- 2 x SSC pendant 3 min à température ambiante
- 3 x 5 min dans 2 x SSC à 42° C
- 2 x 5 min dans 20% formamide à 42°C
- 5 min dans 0.1 x SSC à 42°C
- 3 x 5 min dans 2 x SSC à 42°C
- 5 min dans 4 x SSCT à 42°C
- 5 min dans 4 x SSCT à température ambiante avec agitation douce

Les lames sont laissées séchées à température ambiante sur un papier absorbant.

- **Traitement des lames avec un tampon de détection**

Après avoir incubé les lames dans le sérum d'albumine bovine (BSA) [5% BSA dans 4xSSC, (100 µl / lame) pendant 5 min à 37°C], les sondes marquées sont détectées par les anticorps anti- digoxigenine conjugué à la fluorescéine. Les lames sont incubées à 37°C pendant 1h et sont rincées dans 4 x SSCT pendant 3 x 5 min à température ambiante sous agitation douce et à l'obscurité. Les lames sont ensuite contre colorées au DAPI (2 µl/ml; 4', 6 diamidino-2-phenylindole dans le Tampon McIlvain citrate (pH 7). Ensuite les lames sont rincées avec 4xSSCT (~ 1 ml).

- **Montage et analyse des images**

Le montage des lames se fait dans un agent anti-fade dans 30 µl de Citifluor AF2 (Agar Ltd), elles sont ensuite observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence, Zeiss Axiophot. Une série de filtres 01 (excitation 365 nm, émission > 397 nm) pour le DAPI, 09 (excitation 490 nm, émission 525 nm) pour détecter les signaux 18S et 15 (excitation 540-560, émission 580 nm) pour détecter les signaux 5S. La détection et les analyses des signaux fluorescents ont été performées à l'aide d'une camera CCD ultrasensible (RETIGA 2000R, Princeton

Instruments, Evry, France) et le logiciel « *Metavue* » (Evry, France) comme analyseur d'images.

### **2.3. Technique de coloration au nitrate d'argent**

C'est une méthode qui a été proposée par Howell et Black (1980), elle comprend les étapes suivantes :

- Rincer les racines convenablement à l'eau distillée 6 fois jusqu'à élimination totale du fixateur.
- Plonger les racines dans une solution de nitrates d'argent à 15% et à pH 5,5 à 60°C toute la nuit (à peu près 16 heures)
- Rincer soigneusement les racines plusieurs fois à l'eau distillée.
- Placer les racines dans une solution de révélation (1% hydroquinone + formaldéhyde 10M, 1 :1) pendant 5mn
- Rincer les racines quand elles deviennent jaunes marron.
- Ecraser la pointe racinaire sur la lame dans une goutte d'acide acétique à 45%.

### **2.4 Technique de cytométrie en flux**

Cette technique consiste à doser la quantité d'ADN directement dans les cellules isolées à partir d'un échantillon de tissu frais selon la méthode de Galbraith *et al.* (1983).

Elle se base sur l'action d'un agent intercalant fluorescent qui se fixe sur l'ADN et permet de colorer le génome. La quantité d'intercalant fixée, et donc la valeur C inférée, dépendent du niveau d'empaquetage de la chromatine qui lui-même dépend du niveau de stress de l'organisme, de l'état énergétique de la cellule ou de la température de la pièce (Nardon *et al.* 2003 ; Doležel & Bartoš 2005).

- **Etapes de la technique de cytométrie en flux**

La Cytométrie en Flux a été réalisée à l'*ISV-CNRS (Gif-Sur-Yvette)*. Selon les étapes suivantes :

- **Extraction des noyaux**

Des feuilles fraîches ont été recueillies à partir des différentes populations des espèces de *Centaurea*. La taille du génome et le pourcentage de GC ont été estimées selon Marie et Brown (1993). *Petunia hybrida* (Hook) vilum. 'cv. PxPc6' (2C = 2.85 pg, Marie & Brown 1993) et *Solanum lycopersicum* L. 'Montfavet 63-5' (2C= 1,99 pg, Lepers-Andrzejewski *et al.* 2011)

ont été utilisées comme étalons internes. Les feuilles ont été hachées ensemble à l'aide d'une lame de rasoir dans 600 µl de tampon Galbraith d'extraction de noyaux (Galbraith *et al.* 1983) contenant 0.1 (p/v) Triton X-100 avec ajout 10 mM métabisulfite de sodium frais (agent réducteur et stabilisant) et 1% polyvinylpyrrolidone 10,000 (Sigma P6755) qui permet de complexer les polyphénols fluorescents et empêche leur polymérisation.

La suspension a été ensuite filtrée sur un nylon à pores calibrés (taille du pore: 48 µm) et conservée à 4°C. L'ADN nucléaire total a été estimé en utilisant un intercalant d'ADN, le colorant Iodure de Propidium (IP) (50 µg/ml; Sigma) après addition de RNase (2.5 unités/ml; Roche) pendant 15 min.

#### - **Mesures**

Les mesures sont effectuées sur 5000 à 10000 noyaux et répétées deux ou trois fois pour chaque échantillon.

#### - **Analyse des données**

L'ADN nucléaire total a été calculé comme le rapport entre les pics de l'échantillon et de l'étalon multiplié par le contenu de l'ADN de l'étalon. Toutes les mesures ont été effectuées à l'aide d'un Cytomètre en Flux Elite ESP (Beckman Coulter, Roissy, France) avec un laser à argon refroidi à l'eau.

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes (+ /- écart type)

## **2. 5 Techniques d'étude des grains de pollen**

### **a/ En microscopie photonique**

L'enveloppe du grain de pollen ou sporoderme est constitué de deux parois : l'exine de nature sporopollinique (essentiellement constituée de sporopollinine qui est un ensemble de polymère de carotènes et/ou d'esters de caroténoïdes et l'intine de nature pecto-cellulosique).

#### • **Prélèvement du matériel**

La technique de prélèvement des anthères s'est faite d'après la méthode décrite par Siljak-Yakovlev (1986). Selon l'anatomie de la fleur de la famille des Asteraceae, les anthères sont soudées en un tube entourant le style, leur dissection est ainsi particulièrement difficile (Siljak-Yakovlev 1986). Les anthères peuvent être prélevées sur des échantillons conservés en herbier ou bien sur des fleurs fraîchement cueillies. Une fois les anthères prélevées, une simple agitation peut faire libérer les grains de pollen.

Pour une interprétation rigoureuse des résultats et pour éliminer une éventuelle variabilité intra-individuelle il est préférable de prélever les fleurs sur des capitules dont la position est toujours la même.

- **Test de viabilité du pollen**

C'est un test qui permet de différencier le pollen viable du pollen non viable. Nous avons utilisé la technique du Carmin acétique décrite par Jahier *et al.* (1992). Des anthères sont prélevées à partir de fleurs fraîchement cueillies. Les grains de pollen sont extraits par dissection des anthères sur une lame propre. Tous les déchets sont éliminés au maximum. Mettre quelques gouttes de carmin acétique et laisser agir quelques minutes. Une fois les grains de pollen se sont imprégnés du colorant, il faut recouvrir d'une lamelle et passer à l'observation au microscope photonique. Les grains de pollen viables apparaissent colorés en rouge et les stériles (avortés) non colorés et plus petits. Le test se fait sur le pollen de cinq fleurs par espèces. Le comptage des grains de pollen viables se fait sur 300 grains au total.

- **Méthode de Wodehouse (1935)**

Cette méthode est utilisée pour s'assurer à la fois de l'abondance relative et l'état des grains de pollen. C'est une technique qui s'applique sur du pollen non acétolysé. Ils sont lavés plusieurs fois dans de l'alcool absolu directement sur lames et montés dans de la gélatine glycinée colorée avec de la fuschine (Siljak-Yakovlev 1986).

- **Observation au microscope photonique et Mesure du diamètre des grains de pollen**

Une fois le pollen monté entre lame et lamelle dans de la gélatine glycinée, il peut être conservé pendant une longue période à température ambiante. Les mesures ne doivent pas se faire avant une période d'au moins quatre semaines. C'est la période nécessaire pour la

stabilisation du volume des grains de pollen car les grains continuent à gonfler dans leur milieu de montage (Reitsma 1969).

Les observations ont été effectuées au microscope optique LEICA DM 4000 B LED à l'objectif (x 10) pour les mesures et à l'objectif à immersion (x100) pour les détails de la forme. Les mesures ont été effectuées avec le logiciel Métavue, Leica MM AF 2.1 au laboratoire de cytogénétique (Laboratoire de génétique, biochimie et biotechnologies végétales).

Nous avons effectué les mesures suivantes (Fig. 4) :

En coupe optique méridienne :

La longueur de l'axe polaire (P), le diamètre équatorial (E).

L'épaisseur de l'exine en zone polaire (EZP), en zone intermédiaire (EZI) et en zone équatoriale (EZE).

- En vue méridienne (zone aperturale)

La hauteur de la mésoaperture (hma)

La longueur de la mésoaperture (lma)

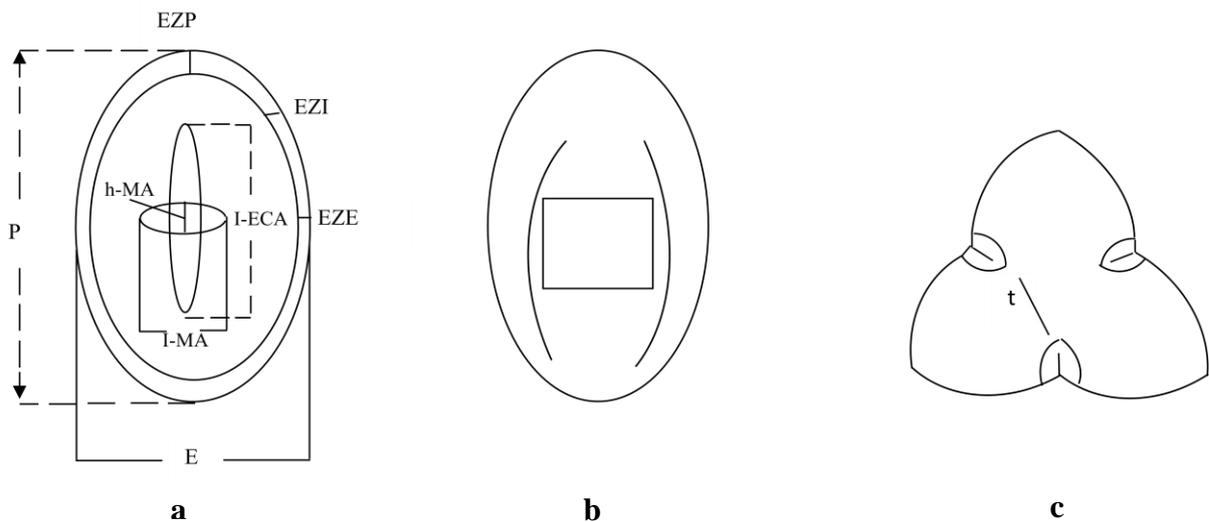
- En vue méridienne (zone interaperturale)

L'évaluation de la densité des éléments sculpturaux sur une surface donnée

- En vue polaire superficielle

Le coté du triangle polaire (t)

Les mesures ont été effectuées sur un échantillon de 30 grains de pollen pour chaque espèce étudiée.



**Figure 4 :** Schéma représentant les différentes mesures effectuées sur le grain de pollen  
(Siljak-Yakovlev 1986)

a) Vue méridienne (zone aperturale) et coupe optique méridienne : P- axe polaire, E- diamètre équatorial, EZP- épaisseur de l'exine en zone polaire, EZI- épaisseur de l'exine en zone intermédiaire, EZE : épaisseur de l'exine en zone équatoriale. Mise au point sur le système apertural : I-ECA= longueur de l'ectoaperture, I-MA= longueur de la mésoaperture, h-MA= hauteur de la mésoaperture. b) Vue méridienne (zone interaperturale) d'un grain de pollen de type non fenestré. Surface pour l'évaluation de la densité des éléments sculpturaux. c) Vue polaire : t- coté du triangle polaire.

**b/ Observation au microscope électronique à balayage : Acétolyse (méthode d'Erdtman 1960 adaptée par Siljak-Yakovlev 1986)**

L'acétolyse est une technique qui permet une bonne observation des grains de pollen. Pour cela on procède à l'élimination du contenu cellulaire ou les substances huileuses et résineuses dans lesquelles ils sont enrobés. Dans le cas des Asteraceae, la paroi sporopollinique est généralement épaisse, il est indispensable de la rendre transparente pour une meilleure observation.

Pour réaliser cette technique on procède à une hydrolyse ménagée à 100°C dans un mélange de 9 volumes d'anhydride acétique et d'1 volume d'acide sulfurique. Cette étape permet la solubilisation de l'intine qui est de nature pectocellulosique ce qui entraîne l'élimination du contenu cytoplasmique. Après ébullition de 1 min à peu près, on laisse refroidir le mélange

contenant le pollen avant de procéder à une série de centrifugations (10 min à 1000 tours/minute) et de rinçage à l'acide acétique. A ce stade, on vide le surnageant et on le remplace avec de l'alcool absolu. Il faut bien mélanger avec une tige en verre et centrifuger une dernière fois. Il faut vider le surnageant et laisser le pollen au fond avec quelques gouttes d'alcool. Le pollen est ensuite transféré sur des lamelles rondes de 12 mm de diamètre fixées sur des lames porte échantillons. Le pollen est ainsi prêt pour être métallisé dans un métalliseur Cressington Sputter Coater 108 et observé au microscope électronique à balayage VEGA TS 5130 MM.

## Analyses cytogénétiques classiques

### 1- Dénombrement chromosomique et analyse du caryotype

Le stade choisi pour l'étude des caryotypes des différentes espèces étudiées est la métaphase mitotique. Les chromosomes sont généralement bien condensés. Leur morphologie (bras long, bras court et position du centromère) est bien visible.

Pour le nombre chromosomique et le caryotype, les populations de chaque espèce ne présentent pas de variabilité interpopulation.

Les données morphométriques des caryotypes sont présentées en détail dans les tableaux 6, 7, 8 et 9.

- ***Centaurea musimonum*** est une espèce diploïde avec un nombre de base  $x=10$ . Le caryotype de cette espèce est représenté par 20 chromosomes, 18 métacentriques et 02 submétacentriques (fig. 5). La formule chromosomique est la suivante :

$$2n= 2x= 20=14m+2m-sc+2m-sat+2sm-sat.$$

Le caryogramme a montré la présence d'une constriction secondaire sur le bras long de la paire 2 et des satellites sur les bras courts des paires 4 et 10 (fig. 5).

La longueur totale de chaque chromosome varie entre 3,18 et 4,51 $\mu$ m. La longueur moyenne des chromosomes est de 3,96 $\pm$ 0,39  $\mu$ m (tab.6). Le rapport entre la taille de la paire la plus longue et celle de la paire la plus courte est de  $R=1,41$ .

L'index d'asymétrie centromérique moyenne  $M_{CA}$  est de 10,5%. Le coefficient de variation des longueurs chromosomiques  $CV_{CL}$  est de 10%.

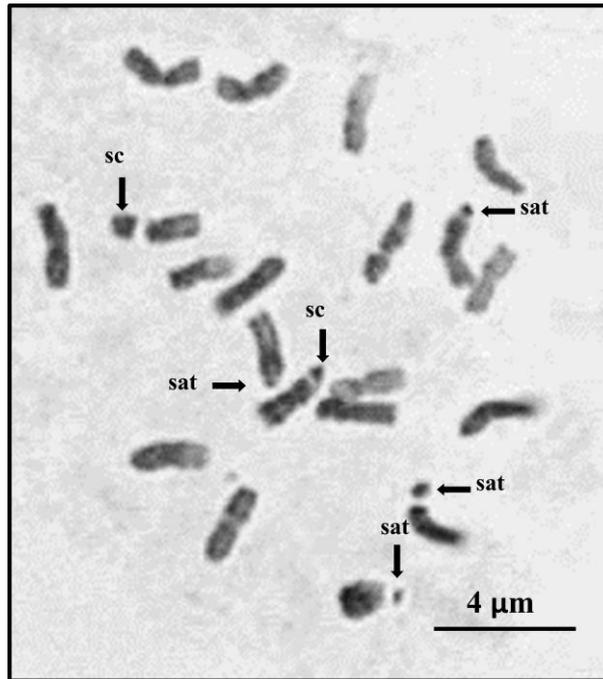
Selon la classification de Stebbins (1971), le caryotype de l'espèce *C. musimonum* appartient à la classe 4A.

- ***C. maroccana*** est une espèce diploïde avec un nombre de base  $x=12$ , caractérisée par un caryotype composé de 24 chromosomes, 20 chromosomes métacentriques et quatre submétacentriques (fig. 6). La formule chromosomique est la suivante :

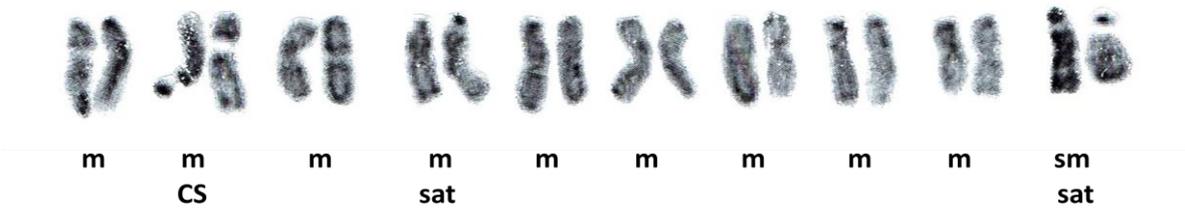
$$2n= 2x= 24=18m+2sm+2m-sat+2sm-sat.$$

Le caryogramme montre la présence de satellites sur les bras courts des paires 10 et 11 (fig. 6). La taille des chromosomes varie entre 3,41 et 5,63  $\mu$ m (tab. 7). La longueur moyenne des chromosomes est de 4,13  $\mu$ m  $\pm$  0,74. Le rapport entre la taille de la paire la plus longue et la plus courte est  $R= 1,65$ . L'index  $M_{CA}$  est de 17% et le  $CV_{CL}$  est de 17%. Cette espèce possède un caryotype qui appartient à la classe 3A de Stebbins (1971).

a



b



c

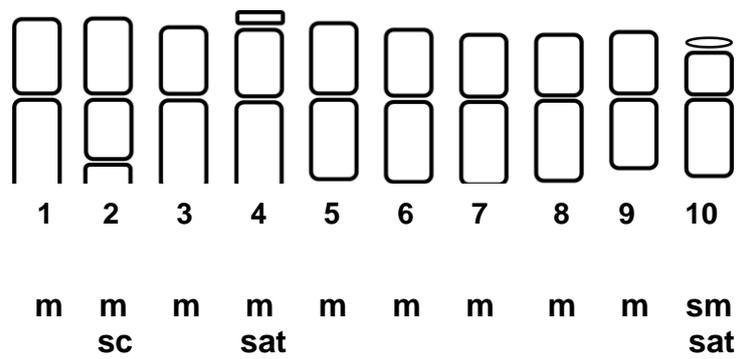
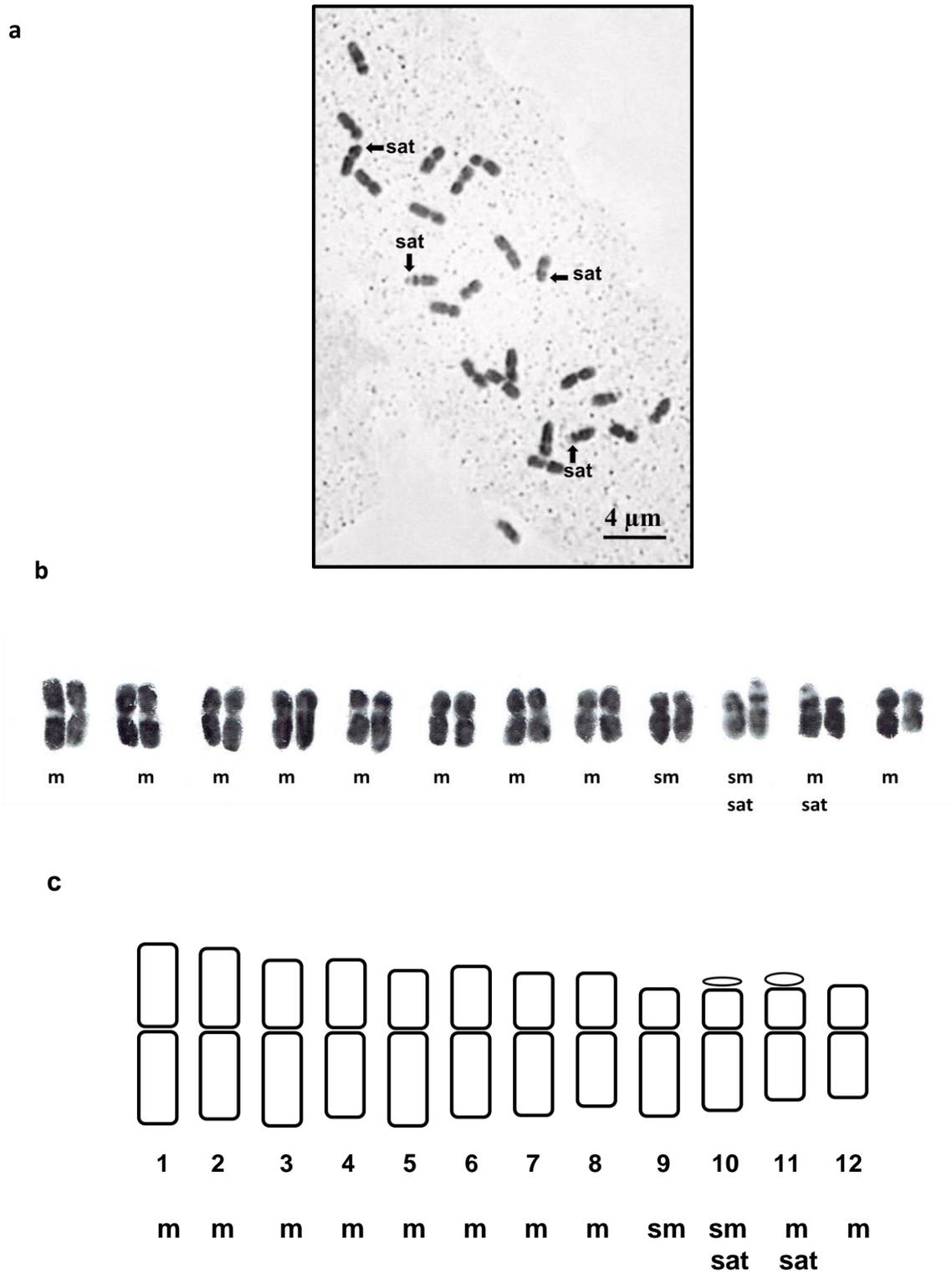


Figure 5 : Caryotype de l'espèce *C. musimonum*

a : plaque métaphasique, b : caryogramme, c : idiogramme



**Figure 6** : Caryotype de l'espèce *C. maroccana*

a : plaque métaphasique, b : caryogramme, c : idiogramme

**Tableau 6.** Données morphométriques du caryotype de *Centaurea musimonum*.

**P ch** - Paire chromosomique; **BL** – bras long; **BC** – bras court; **LT** – longueur totale du chromosome; **d** - différence entre le bras long et le bras court; **r** – ratio bras long/court; **lc** - Index centromérique =  $100 \times S/(L+S)$ ; **Tc** - Type chromosomique; **m** - métacentrique; **sm** - submetacentrique; **sc** - constriction secondaire; **sat** - satellite (selon Levan *et al.* 1964); **DS** - Deviation Standard.

<b>P ch</b>	<b>BL (µm)</b>	<b>BC (µm)</b>	<b>LT (µm)</b>	<b>d</b>	<b>r</b>	<b>lc%</b>	<b>Tc</b>
1	2.51 (0.40) <sup>DS</sup>	2.00 (0.07)	4.51	0.51	1.25	44.34	m
2	2.30 (0.35)	2,03 (0.23)	4.33	0.27	1.13	46.88	m-sc
3	2.41 (0.18)	1.81 (0.17)	4.22	0.60	1.33	42.89	m
4	2.38 (0.37)	1.81 (0.29)	4.19	0.57	1.31	43.19	m-sat
5	2.15 (0.29)	1.91 (0.04)	4.06	0.24	1.12	47.07	m
6	2.17 (0.27)	1.78 (0.17)	3.95	0.39	1.21	45.06	m
7	2.22 (0.19)	1.66 (0.27)	3.88	0.56	1.33	42.78	m
8	2.17 (0.40)	1.64 (0.25)	3.80	0.53	1.32	43.04	m
9	1.85 (0.07)	1.66 (0.16)	3.51	0.19	1.11	47.29	m
10	2.06 (0.07)	1.12 (0.04)	3.18	0.49	1.83	35.22	sm-sat

**Tableau 7.** Données morphométriques du caryotype de *Centaurea maroccana*

<b>P ch</b>	<b>BL (µm)</b>	<b>BC (µm)</b>	<b>LT (µm)</b>	<b>d</b>	<b>R</b>	<b>lc%</b>	<b>Tc</b>
1	2.96 (0.19) <sup>SD</sup>	2.67 (0.12)	5.63	0.29	1.10	47.42	m
2	2.81 (0.20)	2.55 (0.29)	5.36	0.26	1.10	47.57	m
3	3.01 (0.29)	2.18 (0.27)	5.19	0.83	1.38	42.00	m
4	2.72 (0.20)	2.18 (0.43)	4.90	0.54	1.24	44.48	m
5	3.00 (0.41)	1.87 (0.14)	4.87	1.13	1.60	38.39	m
6	2.72 (0.27)	2.00 (0.12)	4.72	0.72	1.36	42.37	m
7	2.66 (0.18)	1.78 (0.06)	4.44	0.88	1.49	40.09	m
8	2.36 (0.36)	1.77 (0.09)	4.13	0.49	1.33	42.85	m
9	2.69 (0.16)	1.27 (0.17)	3.96	1.42	2.11	32.07	sm
10	2.51 (0.18)	1.24 (0.13)	3.75	1.27	2.02	33.06	sm-sat
11	2.16 (0.09)	1.27 (0.35)	3.43	0.89	1.70	37.02	m-sat
12	2.04 (0.31)	1.37 (0.14)	3.41	0.67	1.48	40.17	m

- ***C. melitensis*** est une espèce diploïde avec un nombre de base  $x=12$  caractérisé par un caryotype composé de 24 chromosomes exclusivement de type métacentrique.

La formule chromosomique est donc la suivante :

$$2n=2x=20m+4m\text{-sat}$$

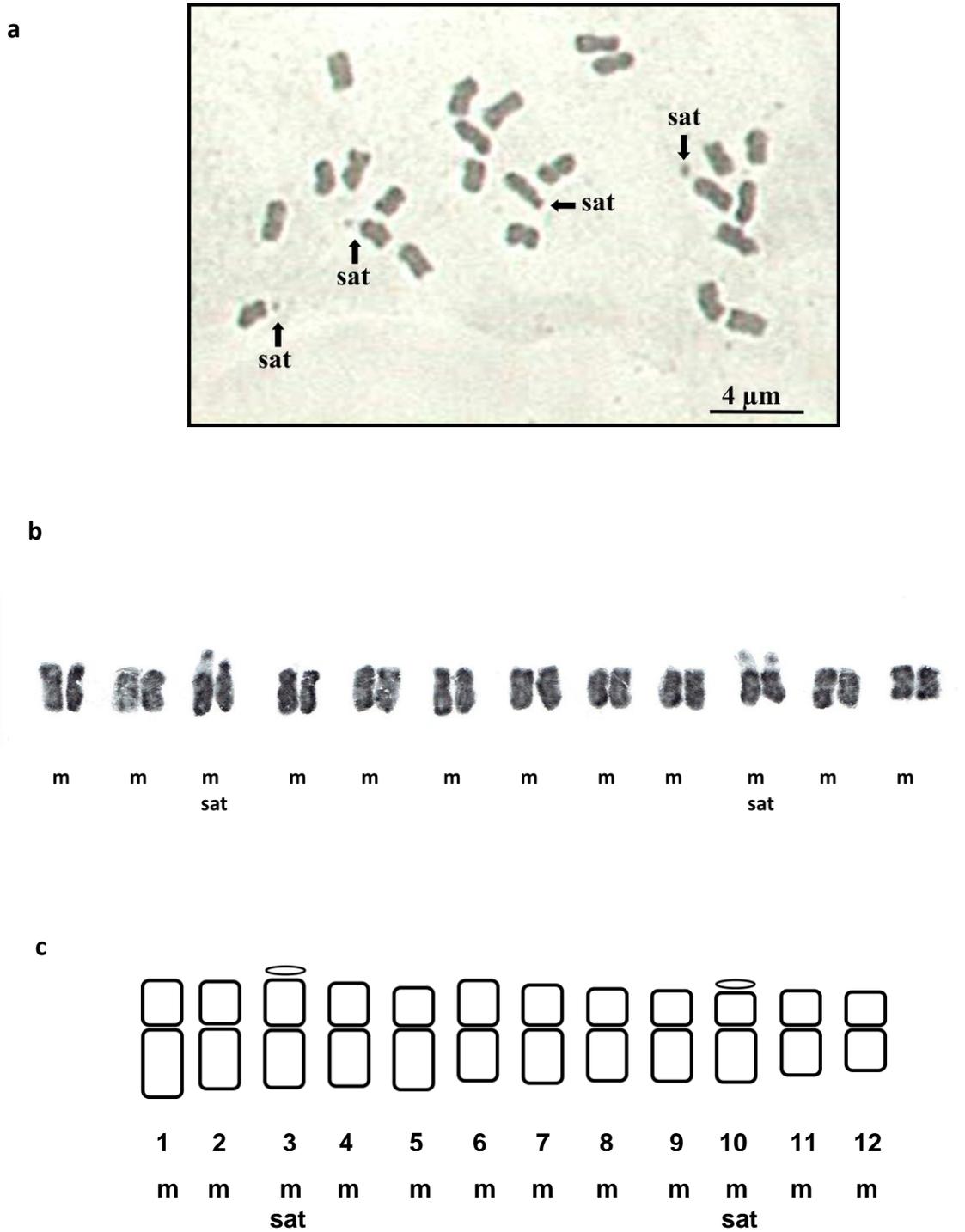
Les satellites sont présents sur les bras courts des chromosomes des paires 3 et 10 (fig. 7). La taille des chromosomes varie entre 2,34 et 3,53  $\mu\text{m}$  (tab. 8). La longueur moyenne des chromosomes est de  $2,92\pm 0,33 \mu\text{m}$ . La différence entre la taille de la paire la plus longues et la plus courte est  $R=1,50$ . Le  $M_{CA}$  est de 15% et le  $CV_{CL}$  est de 11%. Le caryotype appartient à la classe 4A de Stebbins (1971).

- ***C. tougourensis subsp. tougourensis*** est une espèce tétraploïde avec un nombre de base  $x=9$ . Le caryotype est représenté par 36 chromosomes, 28 métacentriques et 8 submétacentriques (fig. 8). La formule chromosomique est la suivante :

$$2n=4x=36=22m+6sm+6m\text{-sat}+2sm\text{-sat}$$

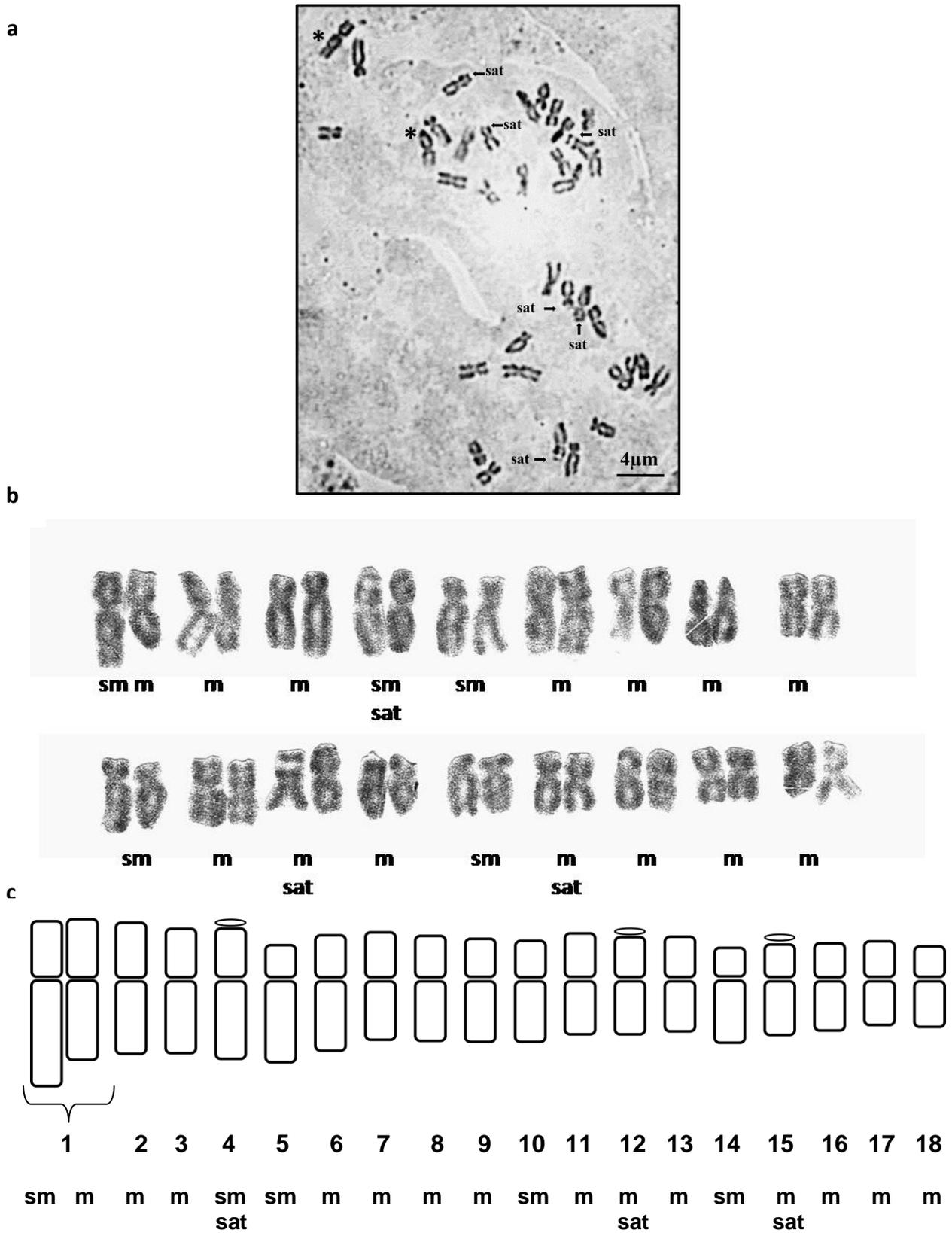
Une différence de taille entre les chromosomes homologues de la première paire chromosomique a été observée. Le plus long, submétacentrique, mesure 6,50  $\mu\text{m}$  l'autre, métacentrique, mesure 5,55  $\mu\text{m}$  (tab.9).

Des satellites ont été détectés sur les bras courts des chromosomes des paires 4, 12 et 15. La taille des chromosomes varie entre 3,07 et 6,02  $\mu\text{m}$ . La longueur moyenne des chromosomes est de  $4,08\pm 0,74 \mu\text{m}$ . le rapport entre la taille de la paire la plus longue et la paire la plus courte est  $R= 1,96$ . Le  $M_{CA}$  est de 21% et le  $CV_{CL}$  est de 18%. Le caryotype de cette espèce correspond à la classe 3A de Stebbins (1971).



**Figure7:** caryotype de l'espèce *C. melitensis*

a : plaque métaphasique, b : caryogramme, c : idiogramme



**Figure 8 :** Caryotype de l'espèce *C. tougouensis* subsp *tougouensis*

a : plaque métaphasique, b : caryogramme, c : idiogramme

**Tableau 8** : Données morphométriques du caryotype de *Centaurea melitensis*

P Ch	BL (µm)	BC (µm)	LT (µm)	d	r	lc%	Tc
1	2,12 (0,10)	1,41(0,20)	3,53	0,71	1,50	39,94	m
2	1,89 (0,07)	1,33 (0,20)	3,22	0,56	1,45	41,30	m
3	1,80 (0,20)	1,42 (0,09)	3,22	0,38	1,26	44,09	m-sat
4	1,77 (0,12)	1,33 (0,10)	3,10	0,44	1,33	42,90	m
5	1,88 (0,18)	1,18 (0,19)	3,06	0,70	1,59	38,56	m
6	1,61 (0,08)	1,40 (0,10)	3,01	0,21	1,15	46,51	m
7	1,69 (0,09)	1,27 (0,07)	2,96	0,42	1,33	42,90	m
8	1,61 (0,20)	1,15 (0,21)	2,76	0,46	1,40	41,66	m
9	1,63 (0,07)	1,09 (0,21)	2,72	0,54	1,49	40,07	m
10	1,65 (0,23)	1,01 (0,07)	2,66	0,64	1,63	37,96	m-sat
11	1,43 (0,16)	1,08 (0,06)	2,51	0,35	1,32	43,02	m
12	1,29 (0,14)	1,05 (0,07)	2,34	0,24	1,22	44,87	m

**Tableau 9** : Données morphométriques de *Centaurea tougourensis* subsp *tougourensis*

P ch	BL (µm)	BC (µm)	LT (µm)	d	r	lc %	Tc
1*	4.26 (0.51) <sup>SD</sup>	2.24 (0.15)	6.50	2.02	1.90	34.46	sm
	3.21 (0.16)	2.34 (0.01)	5.55	0.87	1.37	42.70	m
2	2.92 (0.05)	2.20 (0.43)	5.12	0.72	1.32	42.88	m
3	2.90 (0.06)	1.94 (0.25)	4.84	0.96	1.49	40.08	m
4	3.13 (0.26)	1.48 (0.26)	4.61	1.65	2.11	32.10	sm-sat
5	3.26 (0.36)	1.29 (0.22)	4.55	1.97	2.52	28.35	sm
6	2.80 (0.50)	1.69 (0.06)	4.49	1.11	1.65	37.63	m
7	2.36 (0.33)	1.80 (0.29)	4.16	0.56	1.31	43.26	m
8	2.41 (0.13)	1.67 (0.38)	4.08	0.74	1.44	40.93	m
9	2.45 (0.68)	1.53 (0.17)	3.98	0.92	1.60	38.44	m
10	2.44 (0.17)	1.46 (0.54)	3.90	0.98	1.67	37.43	sm
11	2.14 (0.23)	1.75 (0.28)	3.89	0.39	1.22	44.98	m
12	2.15 (0.38)	1.60 (0.02)	3.75	0.55	1.34	42.66	m-sat
13	2.03 (0.15)	1.63 (0.24)	3.66	0.40	1.24	44.53	m
14	2.51 (0.48)	1.14 (0.09)	3.65	1.37	2.20	31.23	sm
15	2.17 (0.32)	1.3 (0.14)	3.47	0.87	1.66	37.46	m-sat
16	1.98 (0.38)	1.36 (0.29)	3.34	0.62	1.45	40.71	m
17	1.76 (0.15)	1.43 (0.22)	3.19	0.33	1.23	44.82	m
18	1.85 (0.18)	1.22 (0.32)	3.07	0.63	1.51	39.73	m

Note: \* Hétéromorphie sur la paire 1

## 2- Distribution des bandes d'hétérochromatine riche en bases GC

La coloration à la chromomycine A<sub>3</sub> a révélé la présence d'hétérochromatine riche en bases GC chez toutes les espèces étudiées, en positions intercalaire et télomérique. Aucun marquage centromérique n'a été observé. Le nombre et l'intensité des bandes CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> diffèrent d'une espèce à une autre. Les satellites des quatre espèces étudiées sont tous riches en bases GC et sont marqués CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>.

### Chez les espèces diploïdes

- *C. musimonum* : toutes les paires chromosomiques présentent des marquages CMA<sup>+</sup> sauf les paires 5 et 9. Les bandes CMA<sup>+</sup> sont en position télomérique sur les bras longs des paires 1, 2, 3, 7, et 8 et sur les bras courts des paires 3, 6 et 7. Deux bandes intercalaires ont également été observées sur les bras courts de la paire 2 et de la paire 4. Les deux satellites des paires 4 et 10 sont nettement marqués (fig. 9a, 9c, tab 10).
- *C. maroccana* : on constate un nombre très réduit de bandes CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, une bande télomérique du bras court de la paire 11, une bande intercalaire sur le bras long de la paire 4. Les deux satellites de la paire 10 et 11 présentent un marquage d'intensité différente (fig 10a, 10c).
- *C. melitensis* : seules quelques bandes CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> ont été identifiées. Un marquage sur le bras long de la paire 4 et sur les satellites des paires 3 et 10 (fig. 11a, 11c, tab 10).

### Chez l'espèce tétraploïde

- *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* : tous les chromosomes de la garniture présentent des signaux CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. Au total un nombre de 80 bandes a été observé. Ces bandes sont de différents types. Des bandes très larges se localisent sur le bras court de la paire 3. Des bandes fines ont été observées sur les paires 2, 3, 4, 5, 13, 14, 15, 16 et 18, et des bandes larges sur le reste des chromosomes (fig 12a, 12c, tab 10).

## 3- Cartographie des gènes ribosomiques 35S et 5S

La technique d'hybridation *in situ* par fluorescence a permis de localiser les gènes codant pour l'ARN ribosomique 35S et 5S.

Chez *C. musimonum*, les signaux 35S ont été observés dans les régions télomériques des chromosomes des paires 1, 5 et 6, intercalaires des chromosomes de la paire 2 et 10 et sur le satellite de la paire 4. Un locus 5S a été détecté en position intercalaire sur les bras courts de la paire 4 (Fig. 9b, 9c, tab 10).

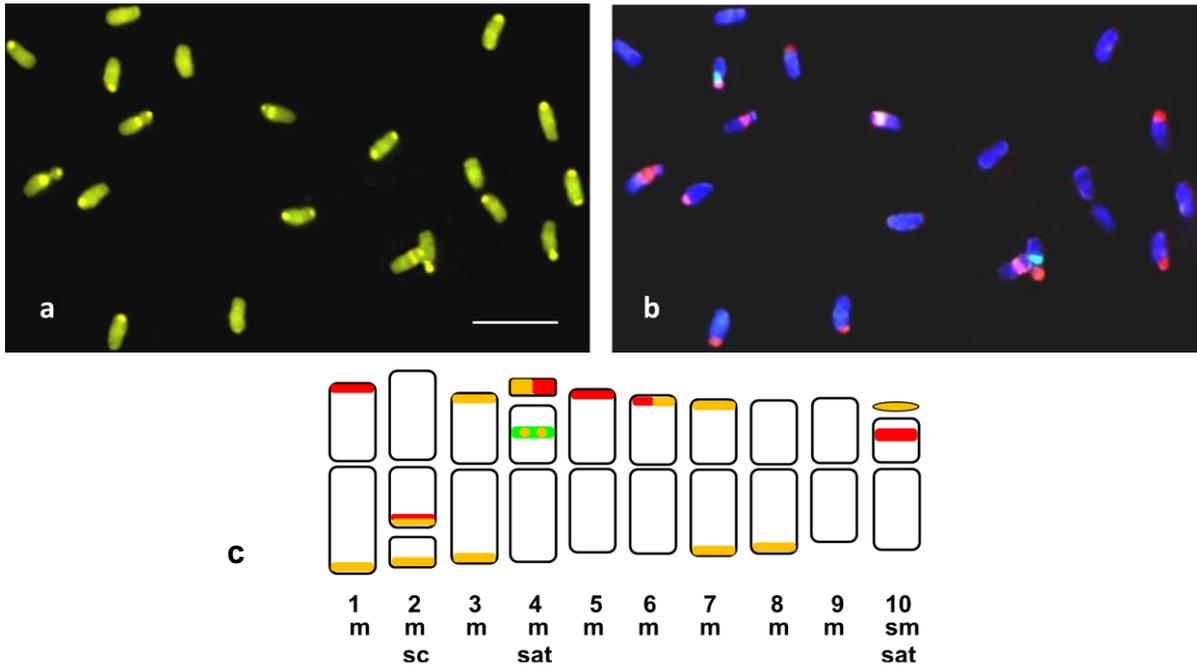
*C. maroccana* présente des marquages correspondants aux ADNr 35S sur les satellites des paires chromosomiques 10 et 11. Un signal 5S a été détecté sur chaque bras long des chromosomes de la paire 4 colocalisés avec une bande CMA<sup>+</sup> (Fig 10b, 10c, tab 10).

*C. melitensis* présente des spots correspondants aux ADNr 35S sur les satellites des paires 3 et 10 et des spots correspondants aux ADNr 5S en position intercalaire du bras long de la paire chromosomique 9 en colocalisation avec les bandes CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (Fig 11b, 11c, tab 10).

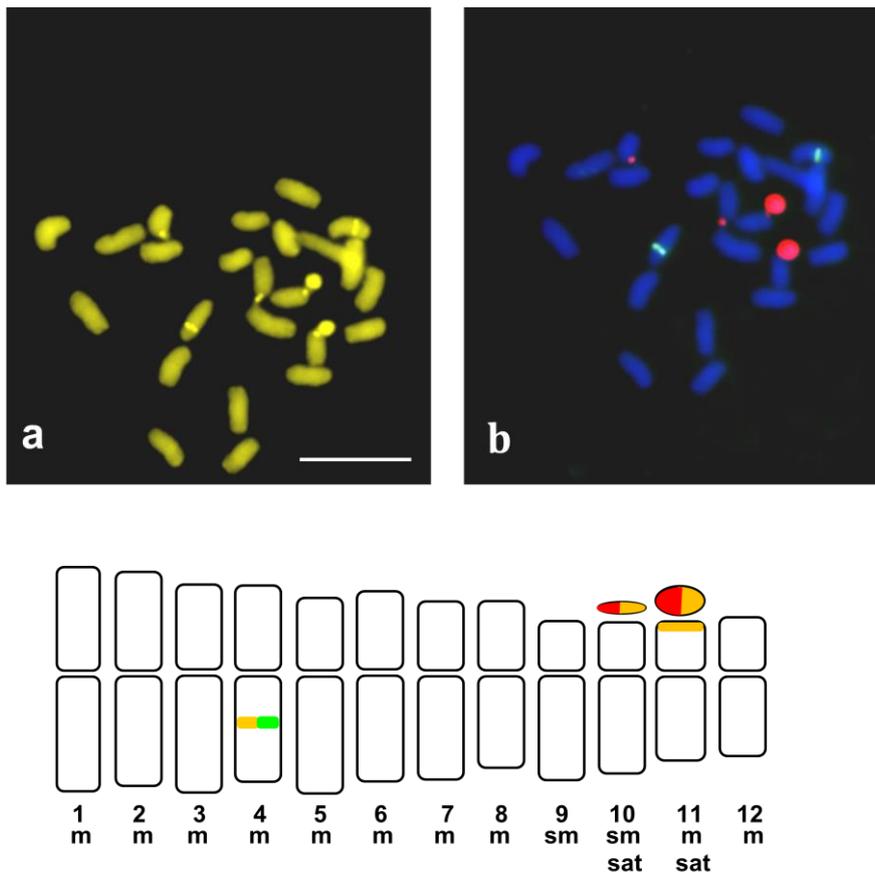
Chez *C. tougourensis* subsp *tougourensis*, les ADNr 35S ont été localisés sur les satellites des paires chromosomiques 4, 12 et 15 et sur les télomères des bras courts des paires 2 et 16. Un locus ADNr 5S a été localisé sur la paire 18 (Fig 12b, 12c, tab 10).

**Tableau 10** : Nombre et distribution des régions riches en bases GC et des sites ADNr 35S et 5S (t - télomérique ; i - intercalaire ; sat - satellites)

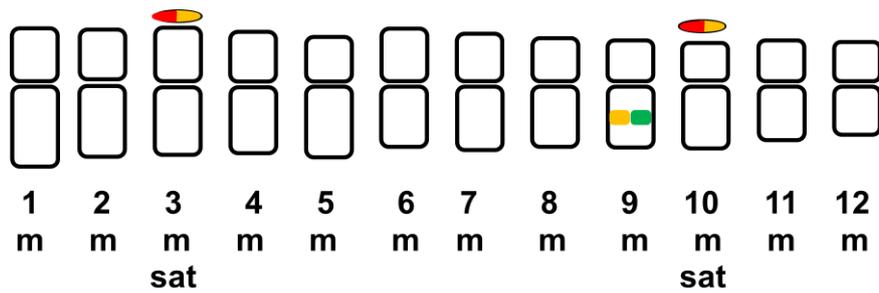
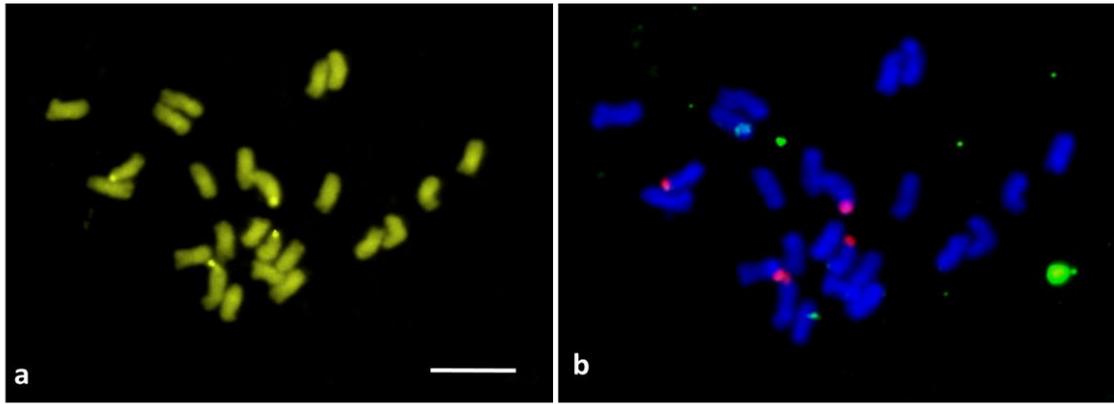
Taxon	CMA	FISH	
		35S	5S
<i>C. musimonum</i>	24 (16t, 4i, 4sat)	12 (4i, 2sat)	2i
<i>C. maroccana</i>	8 (2t, 2i, 4sat)	4 sat	2i
<i>C. melitensis</i>	6(2i, 4 sat)	4 sat	2i
<i>C. tougourensis ssp tougourensis</i>	80 (10t, 64i, 6sat)	10 (4i, 6sat)	2i



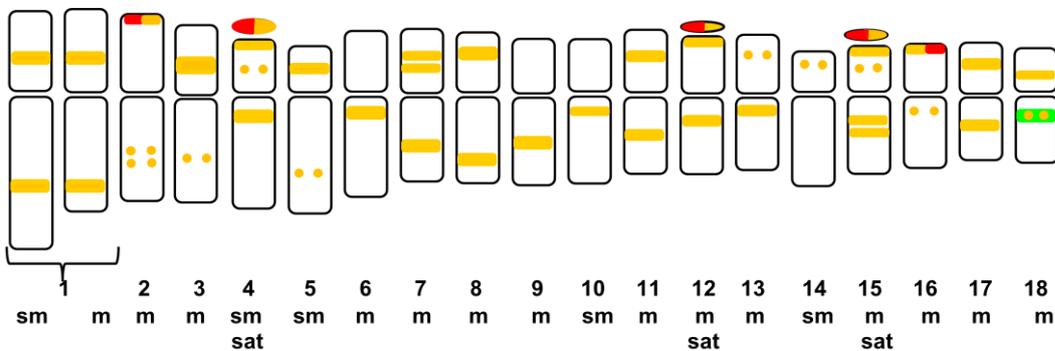
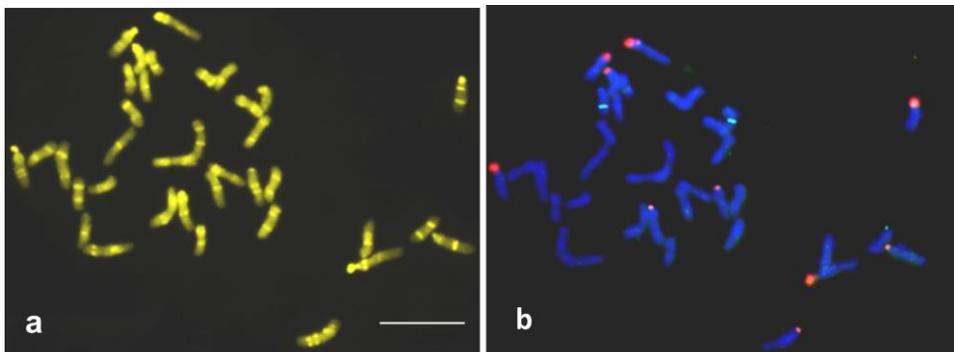
**Figure 9** : a : Coloration à la chromomycine A<sub>3</sub>. b : FISH avec les sondes ADNr 35S et 5S sur plaques métaphasiques. c : idiogrammes avec marquage des chromosomes CMA<sub>3</sub> (jaune), 35S (rouge), 5S (vert) de *C. musimonum*



**Figure 10** : a : Coloration à la chromomycine A<sub>3</sub>. b : FISH avec les sondes ADNr 35S et 5S sur plaques métaphasiques. c : idiogrammes avec marquage des chromosomes CMA<sub>3</sub> (jaune), 35S (rouge), 5S (vert) de *C. maroccana*



**Figure 11** : a : Coloration à la chromomycine A<sub>3</sub> b : FISH avec les sondes ADNr 35S et 5S sur plaques métaphasiques, c : idiogrammes avec marquage des chromosomes CMA<sub>3</sub> (jaune), 35S (rouge), 5S (vert) de *C. melitensis*



**Figure 12** : a : Coloration à la chromomycine A<sub>3</sub>. b : FISH avec les sondes ADNr 35S et 5S sur plaques métaphasiques. c : idiogrammes avec marquage des chromosomes CMA<sub>3</sub> (jaune), 35S (rouge), 5S (vert) de *C. tougourensis subsp. tougourensis*

#### 4- Activité des organisateurs nucléolaires

La coloration au nitrate d'argent nous a permis de mettre en évidence l'activité des NORs et le nombre de nucléoles dans les cellules méristématiques pour chaque espèce étudiée. Les résultats sont reportés dans la figure 13.

Le nombre de nucléoles varie de un à six. Leur taille diminue en fonction de l'augmentation de leur nombre dans la cellule. Chez les diploïdes on constate une plus grande fréquence de un nucléole : 68% chez *C. musimonum*, 66% chez *C. maroccana* et 79% chez *C. melitensis*. Chez le tétraploïde *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* c'est la fréquence de deux nucléoles, 40%, qui est la plus grande.

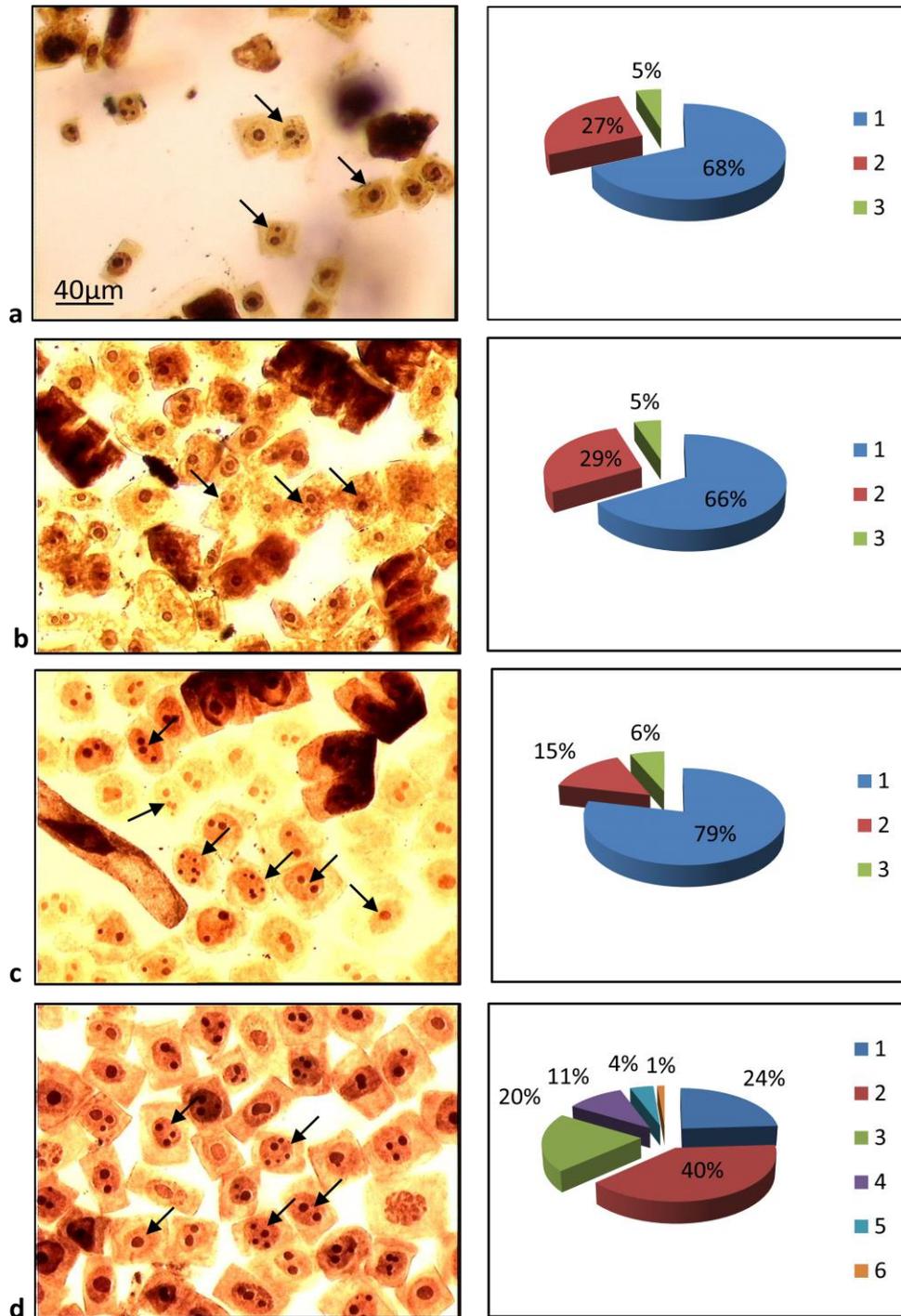
#### 5- Taille du génome et quantité d'ADN

Les résultats des mesures des quantités d'ADN des différentes espèces étudiées sont représentés dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Quantité d'ADN estimée par cytométrie en flux chez les espèces étudiées. <sup>1</sup> 1pg (picogramme)= 978 Mpb (Doležel *et al.* 2003) ; <sup>2</sup> Coefficient de variation ; <sup>3</sup> taille du génome monoploïd selon Greilhuber *et al.* (2005) ; Mpb= méga paires de bases.

Taxon	2n	niveau de ploïdie	ADN 2C (pg) <sup>1</sup>	CV% <sup>2</sup>	1Cx (Mpb) <sup>3</sup>	taille du chromosome (Mpb)
<i>C. musimonum</i>	20	2x	1,66 (0,03)	1,63	812	81
<i>C. maroccana</i>	24	2x	2,86 (0,01)	0,49	1399	117
<i>C. melitensis</i>	24	2x	1,47 (0,02)	1,48	714	60
<i>C. tougourensis</i> <i>ssp</i> <i>tougourensis</i>	36	4x	4,51 (0,05)	1,19	1103	123

Les valeurs moyennes de la quantité d'ADN (2C) sont exprimées en picogrammes et celles du génome haploïde 1Cx en méga paires de bases. Elles varient selon les espèces : 1,66 ± 0,03 pg et 812 Mpb pour *C. musimonum*, 2,86 ± 0,01 pg et 1399 Mpb pour *C. maroccana*, 1,47 ± 0,02 pg et 714 Mpb pour *C. melitensis* et 4,51 ± 0,05 pg et 1103 Mpb pour le tétraploïde *C. tougourensis ssp tougourensis*.



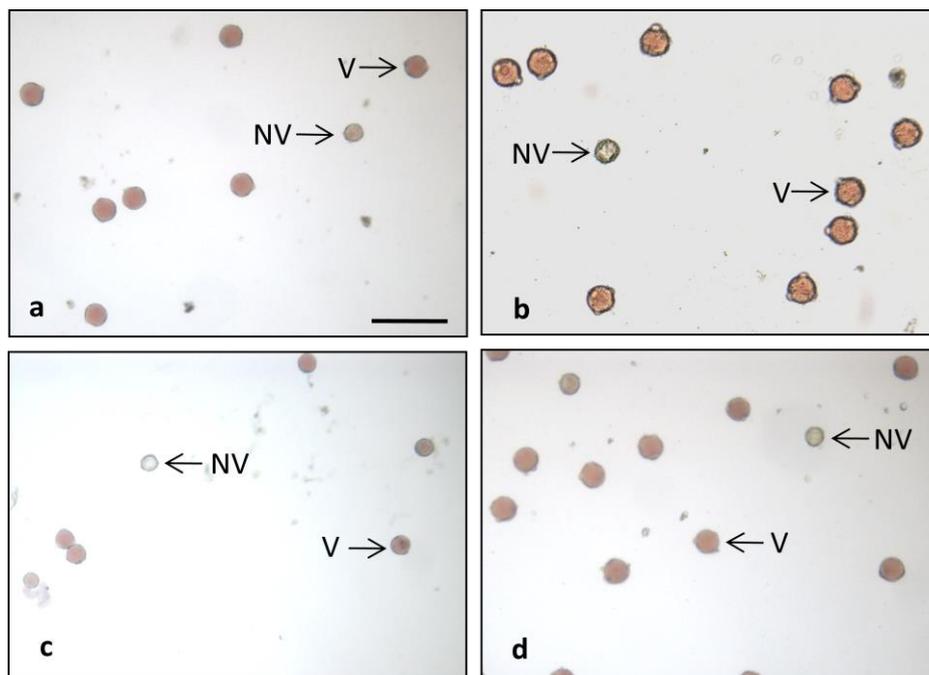
**Figure 13 :** Coloration des nucléoles au nitrate d'argent et leurs fréquences dans les noyaux interphasiques. **a :** *C. musimonum* ; **b :** *C. maroccana* ; **c :** *C. melitensis* ; **d :** *C. tougourensis* subsp *tougourensis*.

## 6- Viabilité et caractères morphologiques des grains de pollen

### 6-1 Viabilité du pollen

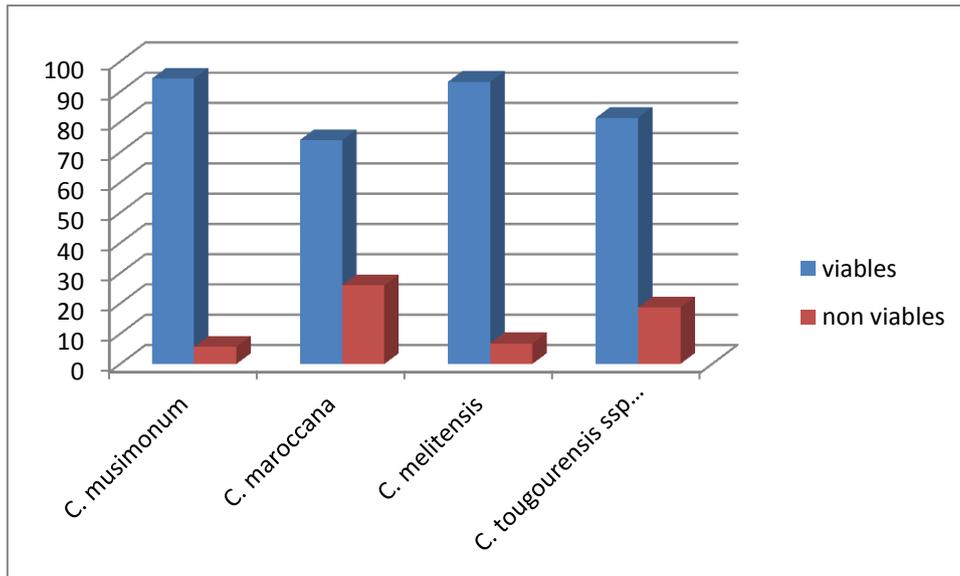
La technique de coloration au carmin acétique des grains de pollen nous a permis de déterminer le taux de viabilité du pollen des espèces étudiées (Fig. 14).

Toutes les espèces présentent un taux de viabilité assez élevé. On note en moyenne 94, 33% pour *C. musimonum*, 74% pour *C. maroccana*, 93,22% pour *C. melitensis* et 81, 33% pour *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* (Fig. 15)



**Figure 14** : Grains de pollen observés au microscope photonique.  
a : *C. musimonum*, b : *C. maroccana*, c : *C. melitensis*, d : *C. tougourensis* subsp.  
*tougourensis*

V: viable, NV: Non viable. Echelle : 10  $\mu$ m



**Figure 15** : Taux de viabilité du pollen des espèces étudiées

## 6-2/ Morphologie du pollen

Dans cette partie nous avons analysé le pollen des quatre espèces étudiées au microscope optique et au microscope électronique à balayage. Rappelons que ces espèces appartiennent à trois sections différentes.

Les résultats des différentes mesures effectuées sur les grains de pollen sont présentés dans le tableau 12.

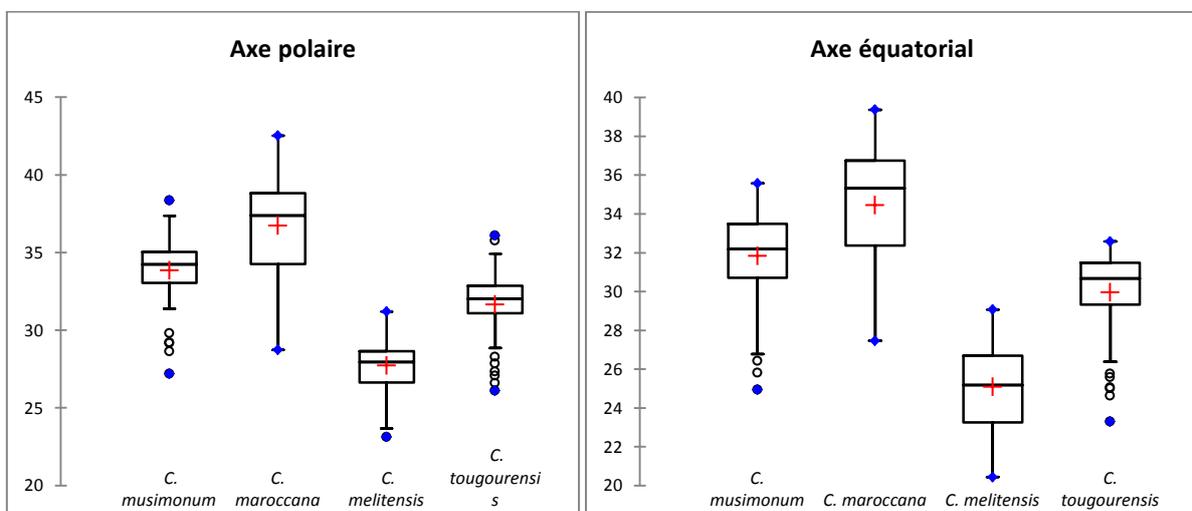
L'amplitude des variations des axes polaires et équatoriaux sont représentés dans la figure 16.

La longueur de l'axe polaire de *C. musimonum* varie de 27,19  $\mu\text{m}$  à 38,35  $\mu\text{m}$  avec une moyenne de  $33,85 \pm 2,21 \mu\text{m}$ . Celui de *C. maroccana* varie de 28,74  $\mu\text{m}$  à 42,52  $\mu\text{m}$  avec une moyenne de  $36,74 \pm 3,55 \mu\text{m}$ . Chez *C. melitensis*, il est de 23,12  $\mu\text{m}$  à 31,20  $\mu\text{m}$  et d'une moyenne de  $27,27 \pm 2,14 \mu\text{m}$ . Le pollen de *C. tougourensis ssp tougourensis* présente un axe polaire qui varie entre 26,10  $\mu\text{m}$  et 36,10  $\mu\text{m}$  avec une moyenne de  $31,65 \pm 2,14 \mu\text{m}$ .

La longueur de l'axe équatorial de *C. musimonum* varie de 24,94  $\mu\text{m}$  à 35,58  $\mu\text{m}$  avec une moyenne de  $31,83 \pm 2,40$ . Celui de *C. maroccana* varie entre 27,46  $\mu\text{m}$  à 39,37  $\mu\text{m}$  avec une moyenne de  $34,45 \pm 3,20 \mu\text{m}$ . Chez *C. melitensis* il va de 20,44 à 29,06 et une moyenne de  $25,08 \pm 2,38 \mu\text{m}$ . Pour *C. tougourensis ssp tougourensis* l'axe équatorial varie de 23,30  $\mu\text{m}$  à 32,58  $\mu\text{m}$  et une moyenne de  $29,96 \pm 2,38 \mu\text{m}$ .

Tous les grains de pollen étudiés présentent 03 ectoapertures (sillons longs ou colpi) qui s'élargissent au niveau équatorial et qui s'effilent au niveau polaire et 03 mésoapertures (pori) légèrement étirées au niveau équatorial: ce sont des pollens de type tricolporé et de forme longiaxe ( $P > E$ ) (Tab. 12 ; Fig 17).

Les ornémentations visibles au microscope électronique à balayage sur la surface tectale montre la présence de petites épines non détectables au microscope photonique qui ont été décrites par Wagenitz (1955) comme de petites verrues. Ces épines donnent un aspect échinulé au grain de pollen, il est donc microechinate (Fig. 18).



**Figure 16** : Comparaison graphique des valeurs moyennes, des valeurs minimales et des valeurs maximales de P et de E

**Tableau 12** : Données morphologiques concernant le pollen des taxons étudiés

Taxons	P			E			P/E	Exine			T	LoP	LaP	LoC	LaC
	Moy	Pmin	Pmax	Moy	Emin	Emax		EZP	EZE	EZI					
<i>C. musimonum</i>	33,85	27,19	38,35	31,83	24,94	35,58	1,06	2,60	2,92	2,27	11,06	10,62	8,83	9,91	27,93
	(2,21)			(2,40)				(0,40)	(0,41)	(0,37)	(0,97)	(1,59)	(1,18)	(1,76)	(1,89)
<i>C. maroccana</i>	36,74	28,74	42,52	34,45	27,46	39,37	1,07	3,05	3,35	2,82	11,16	10,05	7,72	9,65	29,85
	(3,55)			(3,20)				(0,35)	(0,36)	(0,30)	(1,16)	(1,40)	(1,39)	(1,89)	(2,27)
<i>C. melitensis</i>	27,27	23,12	31,20	25,08	20,44	29,06	1,11	2,27	2,86	2,02	8,68	10,07	8,69	8,94	25,03
	(1,56)			(2,08)				(0,32)	(0,49)	(0,31)	(0,80)	(1,52)	(1,56)	(1,59)	(1,86)
<i>C. tougourensis</i>	31,65	26,10	36,10	29,96	23,30	32,58	1,06	2,30	2,87	2,34	9,60	10,97	8,38	8,91	26,99
	(2,14)			(2,38)				(0,33)	(0,41)	(0,44)	(1,60)	(1,53)	(1,46)	(1,46)	(2,17)

P : axe polaire

X ( ) : moyenne (erreur standard)

LoP : longueur du porus

P min : P minimum

EZP : épaisseur de l'exine en zone polaire

LaP : largeur du porus

P max : P maximum

EZI : épaisseur de l'exine en zone intermédiaire

LoC : Longueur du colpus

E : diamètre équatorial

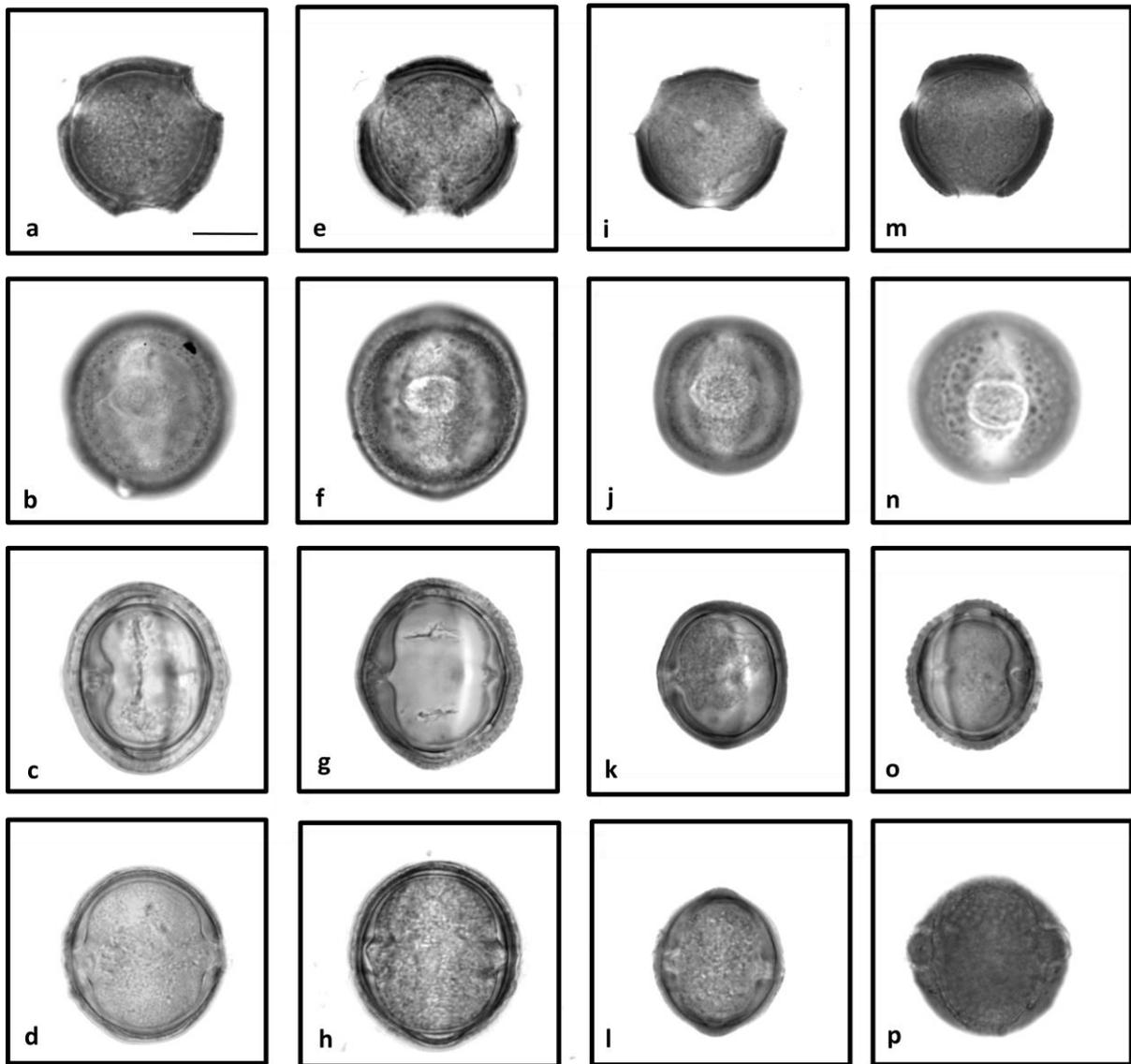
EZE : épaisseur de l'exine en zone équatoriale

LaC : largeur du colpus

E max : E maximum

T : côté du triangle polaire

E min : E minimum



**Figure 17** : Différentes vues des grains de pollen observées au microscope optique

*C. musimonum*: **a – d**,

*C. maroccana*: **e – h**,

*C. melitensis*: **i – l**,

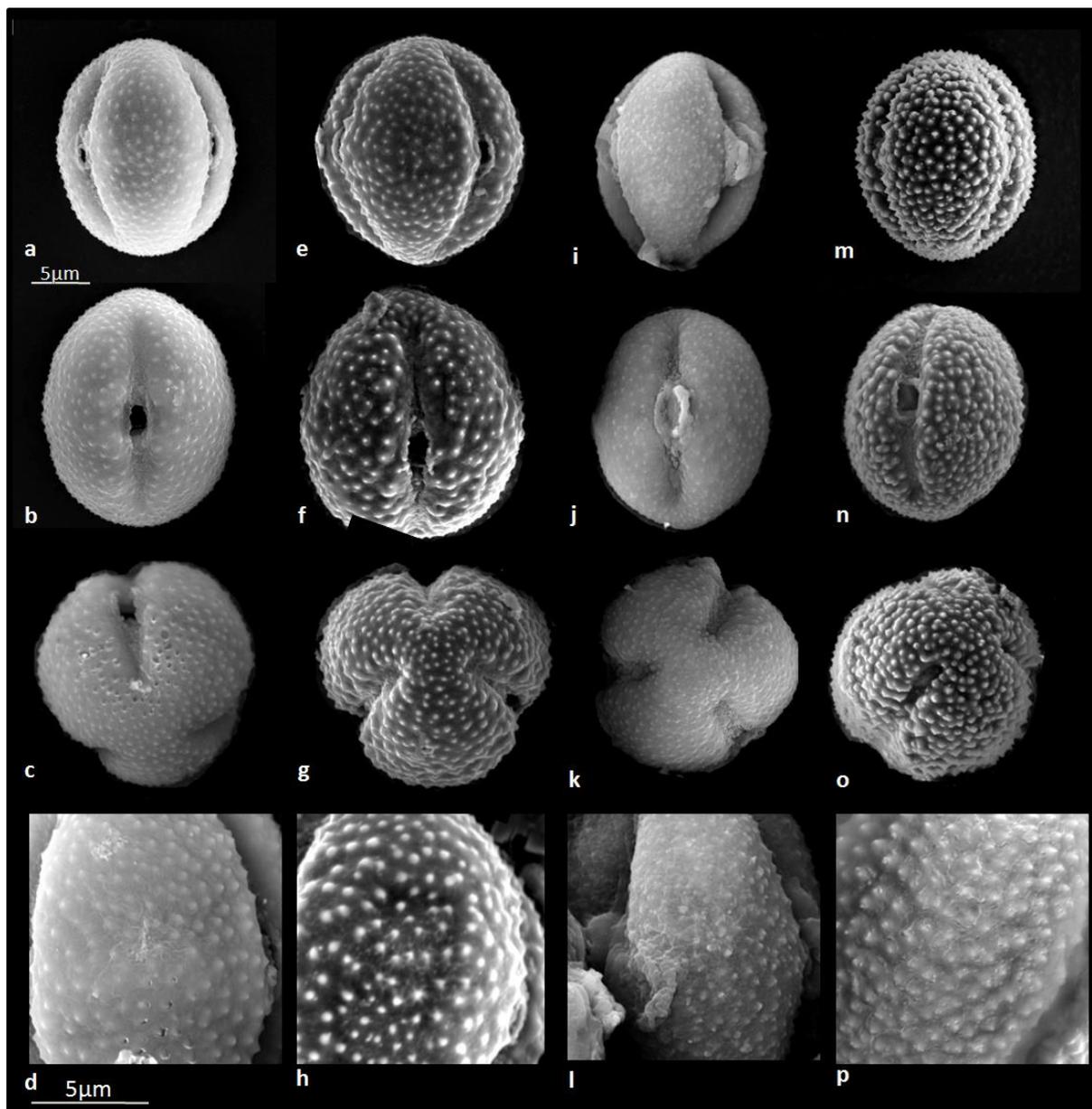
*C. tougourensis subsp. tougourensis*: **m – p**.

**a, e, i, m**: vues polaires.

**b, f, j, n**: vues aperturales de face.

**c, g, k, o**: vues méridiennes

**d, h, l, p**: vues méridiennes superficielles, zones interaperturales.



**Figure 18** : Différentes vues des grains de pollen observées au microscope électronique à balayage

*C. musimonum*: a – d

*C. maroccana*: e – h

*C. melitensis* : i – l

*C. tougourensis subsp tougourensis*: m –p

**a, e, i, m**: vues méridiennes, zones interaperturales.

**b, f, j, n**: vues méridiennes, zone aperturales.

**c, g, k, o**: vues polaires.

**d, h, l, p**: zones interaperturales

## Discussion générale

Les espèces qui font l'objet de cette étude sont traitées ici pour la première fois sur le plan cytogénétique (établissement du caryotype, distribution de l'ADN riche en bases GC, cartographie et activité des ADN ribosomiques, détermination de la quantité d'ADN et étude palynologique). Seuls le nombre chromosomique de *C. maroccana* et *C. melitensis* ont été déterminés respectivement par Hellwig *et al.* (1994) et Natarajan (1981) et la taille du pollen de *C. melitensis* a été avancée par Villodre et Garcia-Jacas (2000).

### 1- Dénombrement chromosomique et analyse du caryotype

Très peu de données caryologiques concernant des espèces appartenant aux mêmes sections que les espèces étudiées sont disponibles dans la littérature.

Le genre *Centaurea* présente plusieurs nombres chromosomiques de base allant de  $x=7$  à  $x=16$ . La plupart des espèces sont soit diploïdes soit tétraploïdes. Elles présentent rarement un niveau de ploïdie plus élevé (*Centaurea montis-borlae* Soldano à  $2n=84$ , *C. kunkelii* Garcia-Jacas à  $2n=11x=110$ ) (Siljak & Gorenflot 1977; Viegi & Renzoni 1981 ; Garcia-Jacas 1998 ; Garcia-Jacas *et al.* 1996, 1998a, 1998b ; Romaschenko *et al.* 2004 ; Siljak-Yakovlev *et al.* 2005 ; Dydak *et al.* 2009)

Les espèces étudiées présentent trois nombres chromosomiques de bases ( $x=9$ ,  $x=10$  et  $x=12$ ), deux niveaux de ploïdie ( $2x$  et  $4x$ ) et appartiennent à trois sections différentes (*Chamaecyanus* Willk. (Battandier 1919), *Mesocentron* (Cass.) DC (Hellwig *et al.* 1994) et *Phalolepis* (Cass.) DC. (Hilpold *et al.* 2009)

#### Dans la section *Chamaecyanus*

La taille des chromosomes de *C. musimonum* varie entre 3,18  $\mu\text{m}$  et 4,51  $\mu\text{m}$ . Ces valeurs montrent que les chromosomes de cette espèce sont petits en comparaison avec *Centaurea toletana* Boiss. & Reuter de la même section dont la taille varie entre 3,93  $\mu\text{m}$  et 8,68  $\mu\text{m}$  (Font *et al.* 2008).

#### Dans la section *Mesocentron*

*C. melitensis* appartiendrait à la section *Mesocentron* selon Hayek (1901), Garcia-Jacas et susanna (1997) et Devesa Alcaraz *et Lopez Nieto* (2013), et la section *Hymenocentron* selon Garcia-Jacas *et al.* (1996) et Garcia-Jacas *et al.* (2000). Nous considérerons dans ce travail que *C. melitensis* appartient à la section *Mesocentron*.

*C. melitensis* présente un caryotype avec des chromosomes de taille plus petite (entre 2,34  $\mu\text{m}$  et 3,53  $\mu\text{m}$ ) que ceux de *C. maroccana* (entre 3,41  $\mu\text{m}$  et 5,63  $\mu\text{m}$ ).

#### Dans la section *Phalolepis*

La taille des chromosomes de *C. tougourensis* susp *tougourensis* varie entre 3,07 et 6,02  $\mu\text{m}$ . Ce sont des chromosomes relativement grands à comparer avec l'espèce tétraploïde *C. subciliaris* Boiss. & Heldr. dont la taille des chromosomes varie entre 2,13 et 3,63  $\mu\text{m}$  et dont le caryotype ne possède qu'une seule paire satellifère (Samaropoulou *et al.* 2013).

Le nombre de satellites observés ne varie pas beaucoup entre les espèces : trois chez *C. musimonum* et *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* et deux chez *C. maroccana* et *C. melitensis*.

Pour toutes les espèces étudiées, les caryotypes sont constitués de chromosomes de petites tailles (< 6,02 $\mu\text{m}$ ). La petite taille des chromosomes des Centaurées et la présence du type chromosomique métacentrique et submétacentrique constituent une caractéristique importante de ces espèces (Dydak *et al.* 2009).

Les caryotypes des quatre espèces étudiées sont représentés par des chromosomes pour la majorité de type métacentrique avec un nombre variable de paires submétacentriques. On note une paire chez *C. musimonum*, deux paires chez *C. maroccana*, aucune chez *C. melitensis* et quatre paires chez *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*. Ceci a été constaté chez beaucoup d'espèces du genre *Centaurea* : deux paires chez *C. toletana* (2n=20) (Font *et al.* 2008), deux paires chez *C. napulifera* ssp *tuberosa* Rochel (2n=20), quatre paires chez *C. cuspidata* Vis. (2n=18) et six paires chez *C. dalmatica* A. Kern. (2n=36) (Siljak-Yakovlev 1986). Néanmoins, des paires de type subtélocentrique ont été observées : deux paires chez *C. kosaninii* Hayek (2n=22), deux paires chez *C. incompta* subsp. *derwentana* (Vis. & Pancic) Dostál (2n=18) (Siljak-Yakovlev 1986).

#### **2- Origine de l'hétéromorphie de la première paire de *C. tougourensis* ssp *tougourensis***

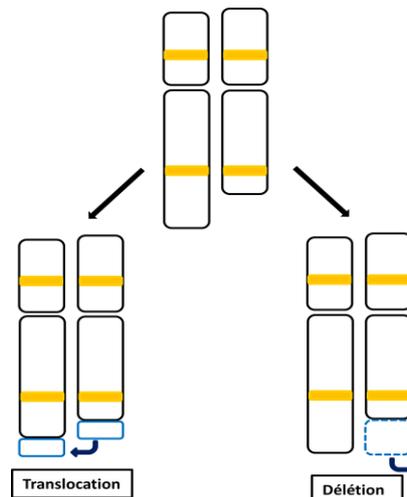
Les chromosomes de la paire 1 de cette espèce présentent une hétérozygotie structurale (un chromosome de type submétacentrique mesurant 6,50  $\mu\text{m}$  et l'autre de type métacentrique mesurant 5,55  $\mu\text{m}$ ). Des phénomènes similaires ont été observés chez plusieurs espèces du

genre *Quercus* L. (Fagaceae) (D'Emerico *et al.* 1995), chez *Alstroemeria inodora* Herb. (Alstroemeriaceae) (Buitendjik & Ramanna 1996), chez *Armeria maritima* (Mill.) Wild (Plumbaginaceae) (Coulaud *et al.* 1999) et chez *Aspidistra grandiflora* H.-J. Tillich (Asparagaceae) (Gao & Liu 2012).

Les inversions péricentriques et les translocations réciproques inégales ont été suggérées comme principales causes pour de telles dissemblances (Shafiq & Vahidy 1998).

Dans notre cas, une inversion pericentrique n'a pu se produire à cause des positions identiques des bandes GC en région intercalaires de chacun des bras des chromosomes homologues de cette paire.

En ce basant sur cette hypothèse, on suggère que cette hétéromorphie résulte d'une délétion ou d'une translocation des régions télomériques sur l'un ou sur les deux chromosomes homologues (Fig 19).



**Figure 19:** Origines possibles de l'hétéromorphie de la paire 1 chez l'espèce *C. tougourensis* ssp *tougourensis*

### 3- L'asymétrie des caryotypes

Le concept d'asymétrie du caryotype, c'est à dire un caryotype marqué par la prédominance de chromosomes avec des centromères terminaux à subterminaux (asymétrie intrachromosomique) et des tailles des chromosomes très hétérogènes (asymétrie interchromosomique), était développé pour la première fois par Levitsky (1931). Un caryotype symétrique est caractérisé par la prédominance de chromosomes métacentriques et submétacentriques ayant approximativement la même taille.

L'augmentation de l'asymétrie peut se produire soit par le changement de la position du centromère (de médiane, submédiane à subterminale) soit par l'accumulation de différences dans la taille relative entre les chromosomes du complément (Zuo & Yuan 2011).

La classification de Stebbins (1971) a permis de montrer que les quatre espèces présentent un certain degré de distinction. Les espèces étudiées appartiennent à deux classes différentes la classe 4A pour les espèces les plus symétriques (*C. musimonum* et *C. melitensis*) et la classe 3A pour les espèces les plus asymétriques (*C. maroccana* et *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*). La comparaison entre les classes des espèces étudiées avec celles de certaines espèces citées dans la bibliographie *C. oxylepis* (Wimm. & Grab.) (2A), *C. phrygia* L. (2A), *C. jacea* L. (2A) (Dydak *et al.* 2009), *C. toletana* (2B) (Font *et al.* 2008) montre que les espèces étudiées présentent une symétrie plus importante.

Cette classification a été la méthode la plus utilisée pour l'évaluation de l'asymétrie des caryotypes et les relations caryotypiques entre différents groupes de taxa : *Lathyrus* L. (Seijo & Fernandez 2003), *Ophrys* L. (Bernardos *et al.* 2003), entre *Davidia involucreta* Baill. et *Camptotheca acuminata* Decne. (He *et al.* 2004), le complexe d'espèces *Centaurea toletana* et *C. ornata* Willd. (Font *et al.* 2008). C'est une méthode qualitative, elle est donc moins puissante et moins souple en termes de type de conclusions qu'elle peut fournir (Paszko 2006).

Actuellement, le coefficient de variation: le  $CV_{CL}$  donné par Paszko 2006 et le  $M_{CA}$  (mean centromeric asymetry) donné par Peruzzi et Eroğlu (2013) permettent d'estimer respectivement l'asymétrie inter et intrachromosomique.

*C. musimonum* présente les valeurs les plus faibles de  $CV_{CL}$  et de  $M_{CA}$  (10% et 10,5% respectivement) et le tétraploïde *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* présente celles qui sont les plus élevées (18% et 21% respectivement). Plus les valeurs de ces deux paramètres sont faibles plus le caryotype est symétrique et le génome est stabilisé (Shamurailat-Pam *et al.* 2012) et plus les valeurs sont importantes plus le caryotype est asymétrique (Harpke *et al.* 2014).

#### **4- Distribution des bandes hétérochromatiques riches en bases G-C**

Une coloration différentielle au fluorochrome banding  $CMA_3$  a permis de localiser les régions riches en bases GC (Schweizer 1976).

Chez *C. musimonum*, 20 sur les 24 régions riches en bases GC sont en position terminale. Comme c'est le cas chez d'autres espèces du genre *Centaurea* : *C. ornata*, *C. haenseleri* (Boiss.) Boiss. & Reuter, *C. toletana* (Font et al. 2008), *C. phrygia*, *C. oxylepis* et *C. jacea* (Dydak et al. 2009). Et d'autres Cardueae, tels que le genre *Xeranthemum* L. qui est un genre relativement proche du genre considéré ici (Garnatje et al. 2004).

Les diploïdes *C. maroccana* et *C. melitensis* de la même section (*Mesocentron*) présentent le même nombre de marquage CMA<sup>+</sup> mais positionnés sur des chromosomes différents

Chez le tétraploïde *C. tougourensis* ssp *tougourensis*, 80 bandes CMA<sup>+</sup> réparties sur tous les chromosomes ont été observées. Dans la littérature, la présence d'un nombre aussi élevé de bandes riches en bases GC est assez inhabituel. Le tétraploïde *C. oxylepis* (Sect. *Jacea*) possède seulement 10 chromosomes marqués en CMA<sup>+</sup> (Dydak et al. 2009).

Dans cette étude, nous rapportons pour la première fois, chez les centaurees la présence de bandes CMA<sup>+</sup> en position intercalaire.

Les satellites des quatre espèces étudiées sont marqués CMA<sup>+</sup>, l'intensité de ces marquages est importante chez *C. maroccana* et *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*. Ceci est peut être dû aux différents niveaux de décondensation de la chromatine dans les ADNr comme c'est le cas chez le genre *Ribes* L. (Chiche et al. 2003).

Les bandes CMA<sup>+</sup> sont présentes en co-localisation avec les NORs (régions des organisateurs nucléolaires) chez toutes les espèces étudiées, ce qui indique que l'hétérochromatine riche en bases GC accompagne les gènes ribosomiques codant pour les 5S. Cette co-localisation n'est pas vérifiée pour les paires 1 et 5 chez *C. musimonum*. Le nombre de bases GC pourrait être insuffisant pour permettre la visualisation du fluorochrome (minimum requis 3 bases GC, Godelle et al. 1993), ou le nombre de bases est suffisant mais la coloration est faible (Chiche et al. 2003).

L'hétérochromatine riche en bases GC peut aussi, dans quelques cas, être co-localisée avec les loci d'ADN 5S, dans le genre *Ribes* (Chiche et al. 2003), dans le genre *Retama* L. (Benmiloud-Mahyeddine et al. 2011), dans le genre *Hypochaeris* L. (Cerbah et al. 1995). Dans notre cas, cette co-localisation a été observée chez toutes les espèces étudiées.

Le fluorochrome banding appliqué à l'analyse des chromosomes peut mettre en évidence des marqueurs chromosomiques supplémentaires pour certains groupes d'espèces : Rutaceae, Aurantioideae (Guerra et al. 2000)

## 5- Cartographie des gènes ribosomiques

Douze, quatre et trois sites 35S ADNr ont été observés respectivement chez les diploïdes *C. musimonum*, *C. maroccana* et *C. melitensis* et dix sites ont été observés chez le tétraploïde *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*.

Une variation dans la taille et l'intensité des signaux d'hybridation ont été observés chez *C. maroccana* et *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*. C'est probablement dû à la différence dans le nombre de répétition des ADNr (Li *et al.* 1997; Murata *et al.* 1997). Le même phénomène a été observé chez plusieurs espèces (Weiss-Schneeweiss *et al.* 2003; Srisuwan *et al.* 2006; Hamon *et al.* 2009).

Les gènes codant pour l'ARNr 35S sont détectés sur les satellites en co-localisation avec les régions des organisateurs nucléolaires.

Généralement, les séquences d'ADNr 35S sont riches en bases GC (Takaiwa *et al.* 1984 ; Kiss *et al.* 1988). La co-localisation de ces régions avec les bandes CMA<sup>+</sup> a été rapportée chez plusieurs espèces animales et végétales (Cuellar *et al.* 1996 ; Xu & Earle 1996 ; Vallés & Siljak-Yakovlev 1997; Zoldos *et al.* 1997 ; Cerbah *et al.* 1998 ; Bou Dagher-Kharrat *et al.* 2001 ; Siljak-Yakovlev *et al.* 2002 ; Srisuwan *et al.* 2006 ; Muratovic *et al.* 2010 ; Bogunić *et al.* 2011 ; Bareka *et al.* 2012). Il a été rapporté que les gènes ribosomiques semblent être mêlés à l'hétérochromatine (Fitch *et al.* 1990 ; Zoldos *et al.* 1999). Cependant, cette co-localisation n'est pas toujours vérifiée.

Chez *C. musimonum*, par exemple, les loci 35S sur les chromosomes 1 et 5 ne sont pas co-localisés avec les bandes CMA<sup>+</sup>. Cette absence de co-localisation a aussi été observée chez *Hydrangea aspera* (Mortreau *et al.* 2010).

En général, la polyploidie est accompagnée d'une augmentation dans le nombre de loci d'ADNr, tel qu'il a été observé chez *Ipomea batatas* L. (Convolvulaceae) (Srisuwan *et al.* 2006), *Panicum maximum* Jacq (Poaceae) (Akiyama *et al.* 2008) ou *Cenchrus ciliaris* L. (Poaceae) (Kharrat-Suissi *et al.* 2012). Dans le cas des espèces étudiées ce n'est pas tout à fait vérifié. Deux des espèces diploïdes (*C. maroccana* et *C. melitensis*) présentent deux loci ADNr 35S, alors que l'autre diploïde *C. musimonum* possède un nombre important et inhabituel de loci ADNr 35S (6 loci pour 2n=20). Des cas similaires ont été observés chez quelques espèces du genre *Cheirolophus* qui appartient à la même tribu (Centaureineae) (Garnatje *et al.* 2012).

*C. tougourensis* subsp *tougourensis* présente cinq loci ADNr 35S. Le nombre impair (cinq) pourrait s'expliquer soit par une origine hybride, c'est-à-dire le résultat d'un croisement interspécifique soit une par une origine autoploïde.

Dans l'hypothèse où c'est une autoploïdisation, la perte d'un locus peut se produire, tel qu'il a été rapporté chez quelques populations du tétraploïde *C. jacea* L. (Dydak *et al.* 2009). Toutes les espèces étudiées montrent un seul locus d'ADNr 5S. Chez *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* la perte du locus 5S dupliqué durant les réarrangements du génome après polyplôidisation est évidente.

Trois espèces européennes appartenant au genre *Centaurea* ont été étudiées pour le nombre et la position des ADN ribosomiques (Dydak *et al.* 2009). *C. jacea* et *C. oxylepis* à  $2n=4x=44$  présentent quatre loci 5S et cinq ou six loci 35S. *C. phrygia* L. présente deux loci 5S et trois loci 35S. Les deux familles de gènes pour les sept espèces de *Centaurea* (étudiées par Dydak *et al.* 2009 et celles qui font l'objet de cette étude) sont localisées sur des paires chromosomiques différentes, excepté pour *C. musimonum*.

Le nombre des gènes ARN ribosomiques 5S chez les plantes est souvent supérieur à celui des gènes codant pour les ARN ribosomique 35S (Hemleben & Werts 1988). Il a aussi été suggéré qu'en plus des loci majeurs, des loci mineurs peuvent être distribués tout au long du génome (Sastri *et al.* 1992). En accord avec des résultats obtenus chez d'autres espèces d'angiospermes (Badaeva *et al.* 1996 ; Hanson *et al.* 1996 ; Linares *et al.* 1996 ; Martel *et al.* 1996 ; Thomas *et al.* 1996 ; Moscone *et al.* 1999), le nombre de loci ADNr 5S chez les espèces étudiées est nettement inférieur à celui des ADNr 35S.

Les données, présentées ici, montrent une grande variabilité dans le nombre de loci ADNr et l'hétérochromatine riche en base GC dans les quelques espèces représentant le genre *Centaurea* étudiées jusque là.

## **6- Activité transcriptionnelle des ADN ribosomiques**

La coloration au nitrate d'argent a permis de détecter le nombre de nucléoles dans les cellules au stade interphase pour toutes les espèces étudiées.

Les espèces diploïdes (*C. musimonum*, *C. maroccana* et *C. melitensis*) présentent une majorité de un nucléole par cellule, ce qui est inférieur au nombre des régions des organisateurs nucléolaires qui sont au nombre de deux pour les espèces diploïdes. Deux

mécanismes ont été proposés par Chiche *et al.* (2003) : soit il y a fusion des deux NORs actives pour former un seul nucléole de grande taille, soit un seul site est actif.

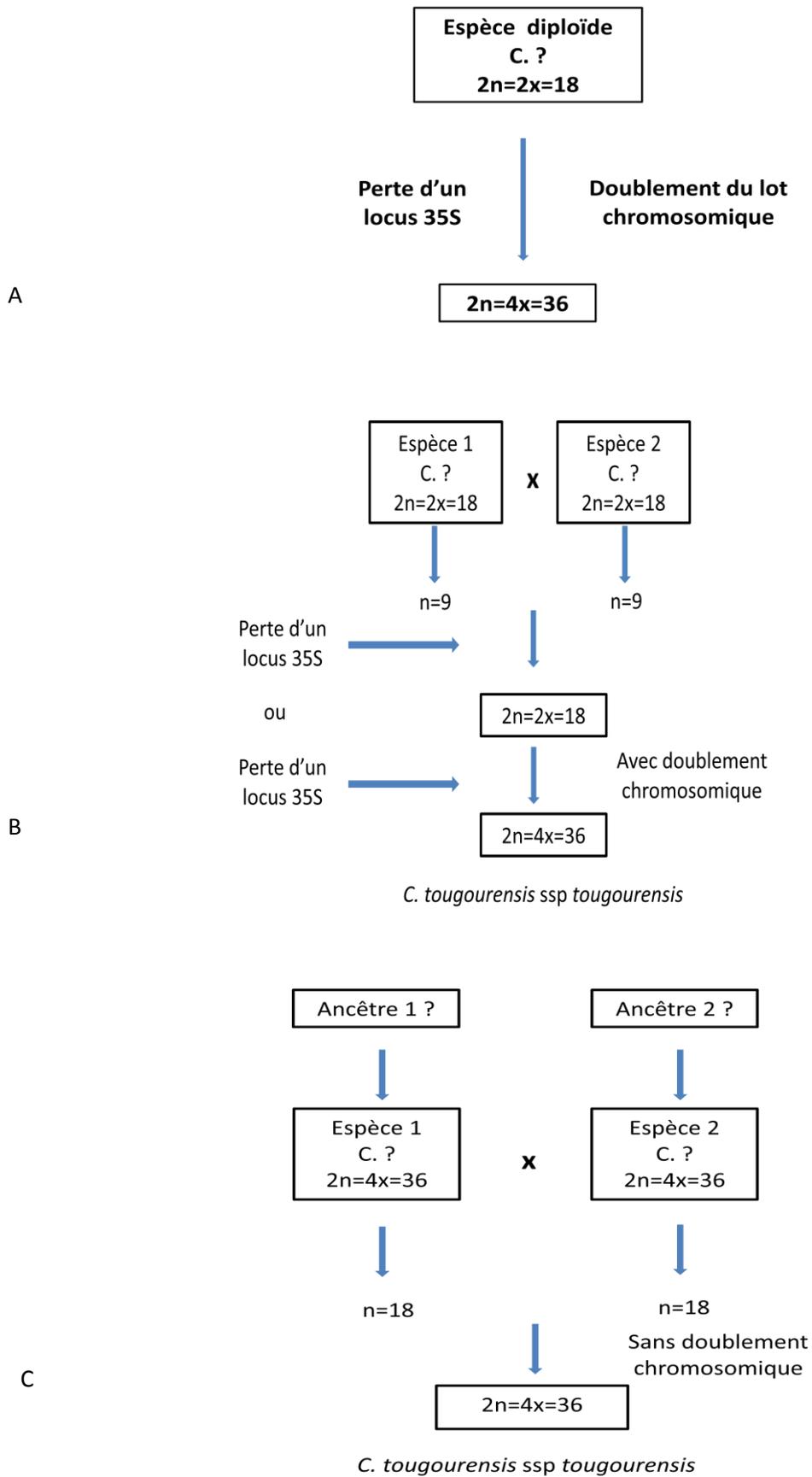
Le fait que les gènes ribosomiques 35S ne soient pas tous transcriptionnellement actifs a déjà été décrit pour quelques espèces de *Centaurea* (Dydak *et al.* 2009) et pour l'espèce *Lupinus consentinii* (Hajdera *et al.* 2003).

*C. musimonum* possède six paires portant à leurs télomères des loci 35S. Le nombre maximum de nucléoles dans les cellules interphasiques de cette espèce est trois nucléoles avec une majorité de un nucléole. Trois sites paraissent inactifs. Sachant que la présence de satellites (constrictions secondaires) indique généralement une activité transcriptionnelle des gènes ribosomiques, on déduit que les loci ADNr inactifs sont localisés sur les paires non satellifères 1, 5 et 6. Le même phénomène a été décrit chez *Hipochaeris chillensis* (Cerbah *et al.* 1998). L'inactivité et l'absence d'expression de ces gènes est due à une méthylation ou à un autre mécanisme de régulation d'expression (Dydak *et al.* 2009)

Après observation des cellules interphasiques de *C. tougourensis ssp tougourensis*, un maximum de six nucléoles a été observé avec une majorité de deux nucléoles par noyau. Ce qui correspond au nombre de sites des gènes ADN ribosomiques qui sont au nombre de six.

#### **7- Origine du tétraploïde *C. tougourensis ssp tougourensis***

Nous avons essayé d'établir une origine possible du tétraploïde *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*. Il peut provenir soit, d'une autopolyploïdie (Fig. 20 A), de l'hybridation entre deux espèces diploïdes ( $2n=2x=18$ ) en doublant son génome diploïde (alloautopolyploïdie) (Fig. 20 B) ou d'une hybridation homoploïde entre deux espèces tétraploïdes ( $2n=4x=36$ ) sans doublement du lot chromosomique c'est une allopolyploïdie (Fig. 20 C). Dans l'alloautopolyploïdie les chromosomes parentaux seraient partiellement homologues ce qui facilite l'hybridation, dans le deuxième cas la situation est plus complexe car non seulement cela suppose qu'il faut remonter plus loin dans la chaîne d'évolution mais que les chromosomes parentaux soient homologues



**Figure 20** : Origines possibles de tétraploïde *C. tougourensis ssp tougourensis*  
 (A) autopolyploïdie, (B) alloautopolyploïdie, (C) allopolyploïdie

## 8- Taille du génome

Les données de la taille du génome sont présentées ici pour la première fois pour les quatre espèces étudiées.

Jusqu'à présent seulement 44 espèces parmi les 400 à 700 espèces de Centaurées connues ont été étudiées pour la taille de leur génome (Garnatje *et al.* 2011 ; GSAD : A genome size in the Asteraceae database, Release 2.0)

Selon la littérature, la taille du génome des Centaurées étudiées varie de  $2C=1,65$  à  $4,30pg$  (Siljak-Yakovlev *et al.* 2005 ; Bancheva & Greilhuber 2006 ; Dydak *et al.* 2009 ; Bou Dagher-Kharrat *et al.* 2013 ; Garcia *et al.* 2013 ; Pustahija *et al.* 2013).

La taille du génome des espèces étudiées varie de  $1,47pg$  à  $4,51 pg$ .

Une classification des génomes des espèces a été établie par Leitch *et al.* (1998) et Soltis *et al.* (2003). Cinq catégories ont été proposées en fonction de la valeur  $1C$ . Les génomes peuvent être :

- Très petits  $1C \leq 1,4pg$ .
- Petits  $1,4 < 1C \leq 3,5pg$ .
- Intermédiaires  $3,5 < 1C < 14pg$ .
- larges  $14 \leq 1C < 35pg$ .
- Très larges  $1C \geq 35pg$

Les espèces étudiées font parties de deux catégories :

- Génomes très petits pour les diploïdes *C. musimonum* ( $1C=0,83pg$ ), *C. melitensis* ( $1C=0,73pg$ ) et le tétraploïde *C. tougourensis ssp tougourensis* ( $1C=1,12$ )
- Génome petit pour le diploïde *C. maroccana* ( $1C=1,43$ ) (qui présente la taille du génome la plus importante parmi les quatre espèces étudiées).

En général, les espèces de Centaurées avec un nombre de base  $x=9$  sont caractérisées par des génomes et des chromosomes de petites tailles ( $0,09$  à  $0,12 pg/chromosomes$ ). La taille des chromosomes des espèces avec un nombre de base  $x=10$  ou  $x=11$  est plus grande ( $0,12$  à  $0,18 pg/chromosome$ ) (Siljak-Yakovlev *et al.* 2005). Cette hypothèse n'est pas vérifiée dans notre cas. *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* ( $x=9$ ) a une moyenne de  $0,12 pg/chromosome$  (ou  $123 Mpb$ ) alors que *C. musimonum* ( $x=10$ ) a une moyenne de  $0,08 pg/chromosome$  (ou  $81 Mpb$ ).

*C. melitensis* ( $x=12$  et  $0,06 pg/chromosome$ ) présente un génome plus petit que celui de *C. maroccana* ( $x=12$  et  $0,11 pg/chromosome$ ).

La variation dans la taille des génomes soulève plusieurs questions quand à la nature de l'ADN accumulé, aux forces et mécanismes à l'origine de cette variation, et ces conséquences sur les organismes en termes évolutifs et adaptatifs (Mahe 2009). La transposition s'avère être la cause principale des variations de taille de génome en dehors de la polyploïdie. Les éléments transposables sont capables de s'auto-répliquer et peuvent donc générer rapidement un grand nombre de copies d'eux même. Ils peuvent conduire à un doublement de la taille du génome comme chez *Oryza australiensis* (Piégu *et al.* 2006).

## **9- Viabilité et caractères morphologiques du pollen**

### **9-1 Viabilité des grains de pollen**

La viabilité a été définie comme ayant la capacité de vivre, grandir, germer ou se développer (Lincoln *et al.* 1982).

Le terme viabilité est utilisé pour décrire des grains de pollen capables : de germer sur le stigmate (Morse 1987, Preston 1991, Vaughton & Ramsey 1991, Niesenbaum 1992), de germer *in vitro* (Shchori *et al.* 1992, Beardsell *et al.* 1993, Lindgren *et al.* 1995), de fixer certains colorants (Bernhardt *et al.* 1980, Becker et Ewart 1990, Mione et Anderson 1992, Nyman 1992) et d'engendrer des graines vigoureuses après la pollinisation (Smith-Huerta & Vasek 1984).

Les quatre espèces étudiées présentent des taux de viabilité assez élevés. Le plus faible est rencontré chez *C. maroccana* (74%) et le plus élevé chez *C. musimonum* (94,33%). La qualité du pollen est souvent assimilée à une bonne viabilité (Kelly *et al.* 2002). La viabilité peut donner une indication sur l'habilité des grains de pollen à délivrer aux cellules le sperme pour le sac embryonnaire au cours de la pollinisation (Stefans 2006).

### **9-2 Caractères morphologiques des grains de pollen**

Wagenitz en 1955, a caractérisé les grains de pollen du genre *Centaurea* par des critères morphologiques. Il a utilisé les paramètres suivants : forme du grain de pollen, ornementation de l'exine, couches externes et internes de la columelle, longueur du colpus et forme du pore (Özler *et al.* 2009). Ces paramètres sont très importants pour la caractérisation des espèces (Edeoga *et al.* 1998 ; Edeoga & Ikem 2002 ; Mbagwu & Edeoga 2006 ; Mbagwu *et al.* 2008 ; Adekanmbi 2009)

La taille des grains de pollen des plantes varie en général de 5µm chez le myosotis jusqu'à 200 à 300 µm chez la citrouille (Frenguelli 2003). Les grains de pollen des espèces qui font l'objet de cette étude sont de taille moyenne (le diamètre varie de 25 µm à 49 µm).

La forme des grains de pollen analysés est de type prolata sphéroïdal ( $1,01 < P/E < 1,14$ ) comme chez : *C. incompta* subsp. *incompta*, *C. kartshiana* (Siljak-Yakovlev 1986), *C. calcitrapa*, *C. diffusa*, *C. pulchella* et *C. galastifolia* (Villodre & Garcia-Jacas 2000). D'autres formes ont été rencontrées chez d'autres espèces de Centaurées :

- La forme oblate-sphéroïdal ( $0,89 < P/E < 0,99$ ) chez *C. alpina* (Siljak-Yakovlev 1986), *C. cariensis* subsp. *maculiceps*, *C. carduiformis* subsp. *carduiformis*, *C. pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* (Özler et al. 2009).
- La forme subprolate ( $1,15 < P/E < 1,33$ ) chez *C. kosaninii*, *C. nicolai*, *C. dalmatica* (Siljak-Yakovlev 1986), *C. alba*, *C. aucheri*, *C. behen*, *C. diluta*, *C. eriophora* et *C. fragilis* (Villodre & Garcia-Jacas 2000).
- La forme prolata ( $1,34 < P/E < 2$ ) chez *C. ragusina* subsp. *lungensis* (Siljak-Yakovlev 1986), *C. antiochia* Boiss., *C. pichleri* ssp. *extrarosularis* (Özler et al. 2009).

Tous les grains de pollen des espèces étudiées sont de forme isopolaire, à symétrie radiale d'ordre 3 et tricolporés. Ces caractères ont été rencontrés chez beaucoup d'espèces de *Centaurea* : *C. nicolai*, *C. alpina*, *C. glaberrima* (Siljak-Yakovlev 1986) *C. ptosimopappa* (Çelik et al. 2008), *C. cadmea*, *C. luschaniana*, *C. lossiensis*, *C. solstitialis* ssp. *pyracantha* (Özler et al. 2009), *C. polyclada* (Uysal et al. 2005), *C. lycopifolia* Boiss. et Kotschy (Gomürgen et al. 2010).

La forme tricolporée est la plus répandue chez les espèces du genre *Centaurea*, les grains de pollen sont rarement tétracolporés (Özler et al. 2009). D'après Walker et Doyle (1975), les données paléontologiques montrent que, chez les angiospermes, le pollen a évolué du type monoaperturé au type pluriaperturé en passant par une forme sans aperture et que les formes pluriaperturés ont évolué à partir des types triaperturés. Selon ces mêmes auteurs, les types polliniques à quatre, cinq et six apertures sont des formes dérivées du type à trois apertures et marquent ainsi une certaine évolution : l'aperture est le point de germination du tube pollinique et constitue un point de réception des stimuli.

Dans ce travail nous avons aussi mesuré des paramètres supplémentaires tels que l'épaisseur de l'exine aux niveaux polaire, intermédiaire et équatorial, le diamètre de l'apocolpium, la largeur des colpi et la longueur et la largeur des pori.

Nous avons pu classer le pollen des quatre espèces étudiées, en se basant sur les classifications de Wagenitz (1955) et de Siljak-Yakovlev (1986).

Selon Wagenitz (1955), toutes les espèces du genre *Centaurea* de la section *Chamaecyanus* appartiennent au type *Scabiosa* exceptée *C. musimonum* qui appartient au type *Jacea*. La taille des grains de pollen de cette espèce est remarquablement plus petite que celle donnée par Wagenitz (1955) et Siljak-Yakovlev (1986) concernant les espèces du type *Scabiosa*. Elle correspond plus à la taille des grains de pollen des espèces qui appartiennent au type *Jacea*. Ainsi, *C. musimonum* (Sect. *Chamaecyanus*, sous-groupe *Lopholoma*), *C. maroccana* et *C. melitensis* (Sect. *Mesocentron*, sous-groupe *Jacea*) et *C. tougourensis* ssp *tougourensis* (Sect. *Phalolepis*, sous-groupe *Jacea*) appartiennent toutes au type pollinique *Jacea*.

Les résultats concernant la taille du pollen sont donnés ici pour la première fois pour toutes les espèces sauf pour *C. melitensis* dont une population espagnole a déjà été étudiée par Villodre et Garcia-Jacas (2000). La taille du pollen de cette population est plus petite ( $P=21,96 \pm 2,06 \mu\text{m}$ ,  $E=17,92 \pm 2,95 \mu\text{m}$ ,  $P/E=1,22$ ) que celle trouvée chez la population algérienne ( $P=27,27 \pm 1,56 \mu\text{m}$ ,  $E=25,08 \pm 2,08 \mu\text{m}$ ,  $P/E=1,22$ ). Le pollen de la population espagnole est de forme subprolate avec une sculpture de tectum de type scarbate. Pour la population algérienne, nous avons conclu que le pollen est de forme prolate-sphéroïdal et de sculpture tectale microéchinat.

Les quatre espèces ont des grains de pollen de taille moyenne ( $25 \mu\text{m} < \phi < 49 \mu\text{m}$ ). Des espèces du même type ont des tailles presque similaires : *C. kartschiana* ( $P=31,48 \pm 0,49$ ,  $E=27,76 \pm 0,36$ ), *C. glaberrima* ( $P=37,76 \pm 0,49$ ,  $E=32,60 \pm 0,53$ ) (Siljak-Yakovlev, 1986), *C. cadmea* ( $P=30,14 \pm 1,33$ ,  $E=29,09 \pm 1,25$ ), *C. tossiensis* ( $P=27,03 \pm 1,53$  et  $E=26,52 \pm 1,44$ ) (Özler *et al.* 2009).

L'exine au niveau équatorial est assez fine chez *C. melitensis* ( $EZE=2,86 \pm 0,49 \mu\text{m}$ ) et *C. tougourensis* ssp *tougourensis* ( $EZE=2,87 \pm 0,41 \mu\text{m}$ ), elle l'est moins chez *C. musimonum* ( $EZE=2,92 \pm 0,41 \mu\text{m}$ ), elle est plus importante chez *C. maroccana* ( $EZE=3,35 \pm 0,36 \mu\text{m}$ ). Rappelons que *C. maroccana* a été collectée du côté de la wilaya de Biskra qui est caractérisée par un étage bioclimatique aride. Chez les espèces du même type pollinique

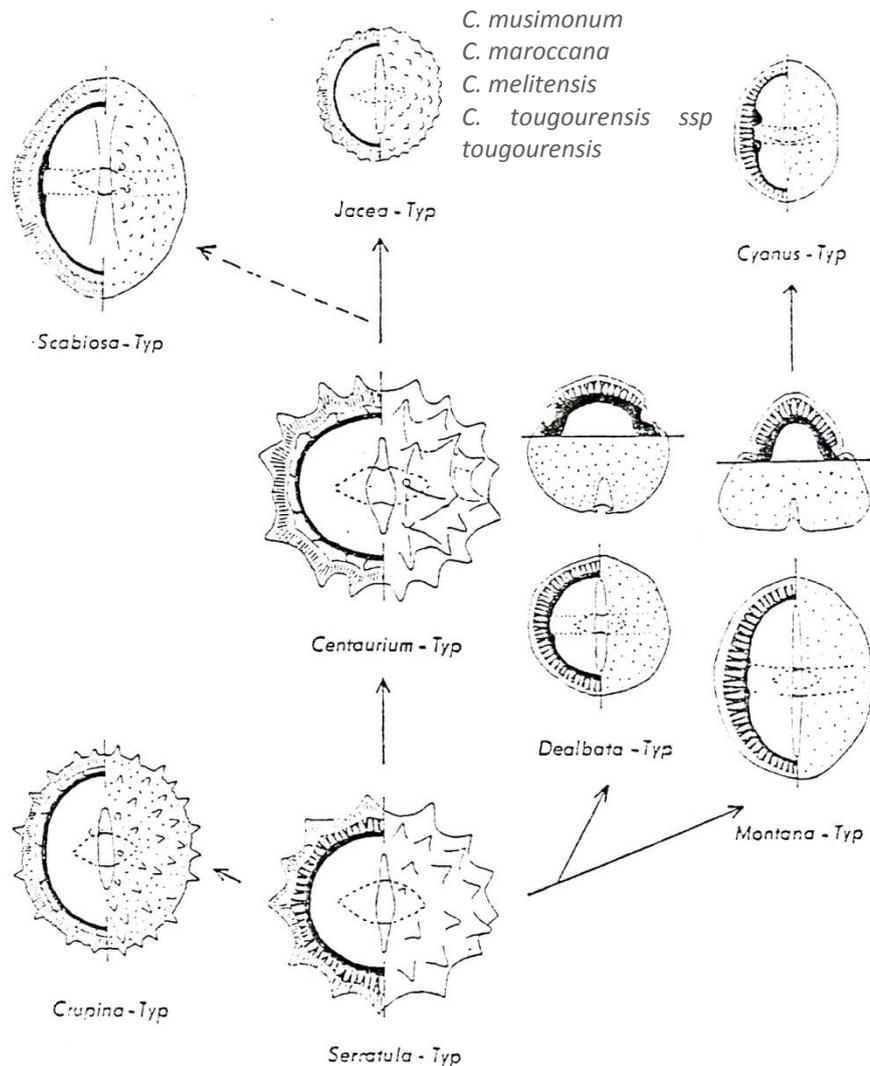
étudiées par Siljak-Yakovlev (1986), l'épaisseur de l'exine varie de 2 à 4  $\mu\text{m}$ , elle est de  $2,45 \pm 0,34 \mu\text{m}$  chez *C. cadmea* et de  $3,67 \pm 0,47$  chez *C. lossiensis* (Özel et al. 2009). L'épaisseur de l'exine a déjà été signalée par Cerceau-Larrival et Roland-Heydacker (1978) comme une forme d'adaptation à la sécheresse chez les genres *Trachymene* (Araliaceae), *Uldinia* (Apiaceae) et *Xanthosia* (Umbelliferae) (Siljak-Yakovlev 1986).

L'exine chez le groupe du type *Jacea* est *Helianthoïde* (caveate) (Siljak-Yakovlev 1986). Selon Wagenitz (1955, 1976), Skvarla et al. (1977), Bolick (1978), le type *Hélianthoïde* (caveate) est plus évolué que le type *Anthemoïde* (acaveate). C'est un type adapté aux habitats relativement secs (Bolick 1978, 1981)

Malgré que le groupe *Jacea* soit un groupe très large, l'homogénéité de son pollen est remarquable. Les seules différences sont au niveau de la forme : de subprolate à prolate-sphéroïdal), et les sculptures de scarbate à échinata (Villodre & Garcia-Jacas 2000).

Le type pollinique *Jacea* est le type le plus évolué à comparer avec les autres types (*Serratula*, *Montana*, *Dealbata*, *Cyanus*, *Centaureum*, *Scabiosa*). Les processus d'évolution ont abouti au type non-épineux et caveate. Cet aperçu d'évolution a été suggéré par Wagenitz (1955), confirmé par de études morphologiques (Wagenitz & Hellwig 1996) et par une étude moléculaire (Susanna et al. 1995 ; Garcia-Jacas et al. 2000, 2001) (Fig 21).

Garcia-Jacas (2000) et Vilatersana et al. (2001) ont attesté que le type pollinique est une des caractéristiques les plus fiables pour établir la phylogénie dans le genre *Centaurea*.



**Figure 21** : Schéma évolutif du type pollinique dans le genre *Centaurea* selon Wagenitz 1955 (Siljak-Yakovlev 1986)

Chez les angiospermes, une corrélation positive a été suggérée entre la taille du génome et la taille des grains de pollen (Misset & Gouret 1996). Nos résultats permettent de vérifier cette corrélation. En effet, chez *C. maroccana* la taille du génome est la plus importante (1Cx=1399 Mbp) et les grains de pollen les plus grands ( $P= 36,74 \pm 3,55$ ,  $E=34,45 \pm 3,20$ ) et chez *C. melitensis* la taille du génome (1Cx=714 Mpb) est la plus petite et les grains de pollen les plus petits ( $P=27,27 \pm 1,56 \mu\text{m}$ ,  $E=25,08 \pm 2,08 \mu\text{m}$ ).

Une autre corrélation a été mise en évidence par Siljak-Yakovlev (1986). Il a été constaté que le type pollinique *Jacea* (type le plus évolué), est le type des espèces ayant un

faible nombre chromosomique de base, le plus souvent chez les espèces polyploïdes. Cette corrélation se vérifie pour *C. tougourensis* ssp *tougourensis* espèces tétraploïde avec un nombre chromosomique de base  $x=9$ . Il a été déduit que, chez le genre *Centaurea*, le processus évolutif serait accompagné d'une réduction du nombre de base (Siljak-Yakovlev 1986).

## Conclusion générale et Recommandations

### Conclusion générale

Le but de cette étude était la caractérisation pour la première fois du génome de quatre espèces nord africaines appartenant au genre *Centaurea* (trois d'entre elles sont endémiques Algériennes). Pour cela nous avons combiné à la fois des méthodes de cytogénétique classique et moléculaire, une méthode d'estimation de la taille du génome et des méthodes d'étude du pollen.

Grace aux méthodes de cytogénétique classique, nous avons déterminé pour la premières fois le nombre chromosomique, le nombre de base et le niveau de ploïdie des espèces *C. musimonum* ( $2n=2x=20$ ,  $x=10$ ) et *C. tougourensis* ssp. *tougourensis* ( $2n=4x=36$ ,  $x=9$ ). Nous avons pu confirmer le nombre chromosomique et déduire le nombre de base de *C. maroccana* ( $2n=2x=24$ ,  $x=12$ ) et *C. melitensis* ( $2n=2x=24$ ,  $x=12$ ).

L'établissement des caryogrammes et des idiogrammes de chacune des espèces étudiées ont permis de déduire que les chromosomes des espèces sont tous de type métacentrique et submétacentrique, leur taille ne dépassant pas les 6,05  $\mu\text{m}$ .

Le caryotype de l'espèce *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* présente une paire hétéromorphique en position 1. Pour expliquer ce phénomène nous avons émis deux hypothèses. Dans la première nous suggérons qu'une délétion s'est produite sur le bras long du chromosome métacentrique entraînant ainsi une diminution de la taille de celui-ci par rapport à son chromosome homologue. Dans la deuxième hypothèse nous suggérons la possibilité qu'il y'ait une translocation au niveau télomérique induisant la diminution de la taille du chromosome métacentrique et l'augmentation de la taille du chromosome submétacentrique.

Pour ce qui est de l'origine du tétraploïde *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*, plusieurs possibilités ont été proposées, autoploïdie, alloautoploïdie ou allopolyploïdie. Rappelons que c'est une espèce endémique stricte Algérienne. Signalons que nos investigations sur le terrain et les données de la littérature n'ont pas permis de supposer l'existence à l'heure actuelle de ces supposés parents.

Grace à la classification de Stebbins et les paramètres d'estimation de l'asymétrie intra- et interchromosomale nous avons établi un ordre évolutif des caryotypes. Ainsi *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* est l'espèce la plus évoluée avec le caryotype le plus asymétrique et *C. musimonum* est l'espèce la moins évoluée avec le caryotype le plus symétrique.

La distribution des bandes hétérochromatiques riches en base G-C nous a permis de mettre en évidence une grande variabilité dans le nombre et la position des bandes CMA<sup>+</sup> entre les espèces étudiées. 80 bandes CMA<sup>+</sup> observées chez *C. tougourensis* subsp. *tougourensis*, 24 chez *C. musimonum* et seulement 8 et 6 chez *C. maroccana* et *C. melitensis* respectivement.

La cartographie des gènes ribosomiques 35S nous a aussi permis de constater une grande variabilité dans le nombre et l'intensité des marquages chez les espèces étudiées. Ils sont tous localisés sur les télomères et pour la plupart co-localisés avec les NORs. *C. musimonum* présente le plus grand nombre de loci 35S ce qui est assez inhabituel pour un diploïde. Nous avons suggéré que les cinq loci 35S chez le tétraploïde *C. tougourensis* ssp *tougourensis* peuvent avoir soit une origine hybride soit une origine autoploïde. Dans ce cas là, un locus a probablement été perdu. Nous n'avons pas constaté une grande variabilité dans le nombre et l'intensité des loci 5S. Chacune des espèces n'en présente qu'un seul.

En estimant pour la première fois la taille du génome, nous avons contribué à l'enrichissement des données contenues dans le GSAD (A genome size in the Asteraceae database, Release 2.0). Le génome des espèces étudiées varie de très petit à petit selon la classification donnée par Leitch *et al.* (1998) et Soltis *et al.* (2003).

L'analyse palynologique nous a permis de compléter l'étude et la caractérisation de nos espèces. D'abord par l'estimation du taux de viabilité qui est assez élevé chez toutes les espèces étudiées. Ensuite par l'étude de la morphologie des grains de pollen en mesurant leur taille (axe polaire et axe équatorial), en déterminant la forme, le type d'ornementation de l'exine, la longueur du colpus et les formes du porus.

Selon l'appartenance des espèces à tel ou tel sous groupe, nous avons pu classer les grains de pollen dans deux types distincts : type *jacea* et type *scabiosa*

Nous appuyons et nous confirmons l'hypothèse émise par Wagenitz (1955) dans laquelle il classe *C. musimonum* dans le type *Jacea* et non dans le type *Scabiosa* comme les autres espèces de la même section.

### **Pespectives**

- La paire hétéromorphique, la perte d'un locus 35S, l'origine tétraploïde et le statut d'endémique stricte algérienne de la sous espèce *C. tougourensis* subsp. *tougourensis* font qu'elle mérite une attention particulière par l'élargissement des prospections en vue de trouver les supposés ancêtres et confirmer l'origine par hybridation génomique *in situ* (GISH).

La deuxième sous espèce *C. tougourensis* ssp *foucauldiana* (Maire.) Q. et S. endémique des hautes montagnes du Sahara Central devrait faire l'objet d'études approfondies pour la comparer à la sous espèce *tougourensis* si le matériel est accessible à la récolte.

- La pauvreté de données bibliographiques concernant la cytogénétique classique et moléculaire, la taille du génome et la palynologie des espèces algériennes de *Centaurea* s'impose comme projet d'étude pour contribuer à la connaissance de la biodiversité et enrichir les bases de données.

## Références bibliographiques

- Adanson M. 1763. Families des plantes 2. Vincent, Paris.
- Adekanmbly OH. 2009. Pollen grains of Asteraceae and analogous echinate grains. *International Journal of Botany* 5(4): 295-300.
- Akiyama Y, Yamada-Akiyama H, Yamanouchi H, Takahara M, Ebina M, Takamizo T, Sugita SI, Nakagawa H. 2008. Estimation of genome size and physical mapping of ribosomal DNA in diploid and tetraploid guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland Science* 54: 89–97.
- Altintas A, Kose YB, Yucel E, Demirci B, Baser KHC. 2004. Composition of the essential oil of *Centaurea dichroa*. *Chemistry of Natural Compounds* 40 (6): 604-605.
- Amberger E. 1960. Darstellung und Eigenschaften von Monochlorstannan *Angewandte Chemie* 72 (2) : 78–79.
- Anastassova-Kristeva M, Nicoloff H, Kvnzel G, Rieger R. 1977. Nucleolus formation in structurally reconstructed barley karyotypes with six satellite chromosomes. *Chromosoma* 62: 111-117.
- Arano H, Saito H. 1980. Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in the subtribe Seselinae. *Kromosomo* 2: 471–480.
- Arano H. 1963. Cytological studies in sub family Carduoideae (Compositae) of Japan, IX, The karyotype analysis and phylogenic consideration of *Pretya* and *Ainsliaea*. *Bot. Mag. Tokyo* 79: 32 – 39.
- Arif R, Küpeli E, Ergun F. 2004. The biological activity of *Centaurea* L. species (Review). *Gazi Univ. J. Sci* 17(4): 149-164.
- Badaeva ED, Friebe B, Gill BS. 1996. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. *Genome* 29: 293-306.
- Bancheva S, Greilhuber J. 2006. Genome size in Bulgarian *Centaurea* s.l. (Asteraceae). *Pl Syst Evol* 257: 95–117.
- Bareka P, Siljak-Yakovlev S, Kamari G. 2012. Molecular cytogenetics of *Bellevalia* (Hyacinthaceae) species occurring in Greece. *Plant Syst Evol* 298 (2): 421-430.
- Barres L, Sanmartín I, Anderson CL, Susanna A, Buerki S, Galbany-Casals M, Vilatersana R. 2013. Reconstructing The Evolution And Biogeographic History Of Tribe Cardueae (Compositae). *American Journal of Botany* 100(5): 867–882.

- Baum M, Appels R. 1991. Review: The cytogenetic and molecular architecture of chromosome 1R—one of the most widely utilized sources of alien chromatin in wheat varieties. *Chromosoma* 101 (1): 1-10.
- Baytop T. 1999. Therapy with medicinal plants in Turkey, Past and Present, second ed, Nobel Tıp Basımevi. Istanbul. Turkey.
- Beardsell DV, Knox RB, Williams EG. 1993. Breeding system and reproductive success of *Thryptomene calycina* (Myrtaceae). *Aust J Bot* 41: 333-353.
- Becker WA, Ewart LC. 1990. Pollination, seed set, and pollen tube growth investigation in *Viola odorata* L. *Acta Hort* 272: 33-36.
- Benmiloud-Mahieddine R, Abirached-Darmency M, Brown SC, Kaid-Harche M, Siljak-Yakovlev S. 2011. Genome size and cytogenetic characterization of three Algerian *Retama* species 7 (5): 987-998
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ, 2000. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses—807 New Estimates. *Annals of Botany* 86: 859–909.
- Bennett MD, Leitch IJ, Hanson L. 1998. DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 121–134.
- Bentham G. 1873. Compositae, In: Bentham G, Hooker J, D, (eds.) *Genera plantarum* 2(1). London pp 162–533.
- Bentham G. 1873a. Notes on the classification, history, and geographical distribution of the Compositae. *J Linn Soc Bot* 13:335-577.
- Bentham G. 1873b. Compositae, In Bentham, GkD. Hooker, Gen, Pl, 2:163-533, A, Black, London. Great Britain.
- Bentzer B, Bathomer RV, Engstrand L, Gustavsson M, Snogerup S. 1971. Some sources of error in the determination of arm ratios of chromosomes. *Bot Not* 124: 65-74.
- Bernardos S, Amich F, Gallego F. 2003. Karyological and taxonomical notes on *Ophrys* (Orchidoideae, Orchidaceae) from the Iberian Peninsula. *Bot J Linn Soc* 142: 395–406.
- Bernhardt P, Knox RB, Calder DM. 1980. Floral biology and self-incompatibility in some Australian *mistletoes* of the genus *Amyema* (Loranthaceae). *Aust J Bot* 28: 437- 451.
- Bogunić F, Siljak-Yakovlev S, Muratovic E, Pustahija F, Medjedovic S. 2011, Molecular cytogenetics and flow cytometry reveal conserved genome organization in *Pinus mugo* and *P. uncinata*. *Ann For Sci* 68: 179-187.

- Boissier E. 1845. Voyage botanique dans le midi de l'Espagne pendant l'année 1837. Volume 2. Gide. Bibliothèque nationale d'Autriche.
- Boissier E. 1846. Diagnoses plantarum orientalium novarum, ser. 1. 1 (6). Geneve, Leipzig. Paris et Como.
- Boissier E. 1849. Diagnoses plantarum orientalium novarum additis nonnullis Europaeis et Boreali-Africanis, Ducloux.
- Bolick MR. 1978. Taxonomic, Evolutionary, and Functional Considerations of Compositae Pollen Ultrastructure and Sculpture. *Plant Systematics and Evolution* 130(1): 209-218.
- Bolick MR. 1981. A cladistic analysis of *Salmea* DC, (Compositae-Heliantheae). pp 115-125 in *Advances in cladistics (Proceedings of the first meeting of the Willi Hennig Society)*, eds V,A, Funk and D,R, Brooks, New York: New York Bot, Gard.
- Bou dagher-Kharrat M, Abdel-Samad N, Douaihy B, Bourge M, Fridlender A, Siljak-Yakovlev S, Brown SC. 2013. Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora. *Plant biosyst* 147 (4): 1228-1237.
- Bou Dagher-Kharrat M, Grenier G, Bariteau M, Brown SC, Siljak-Yakovlev S, Savour A. 2001. Karyotype analysis reveals inter specific differentiation in the genus *Cedrus* despite genome size and base composition constancy. *Theor Appl Genet* 103:846–854.
- Bremer K, Jansen RK. 1992. A new subfamily of the Asteraceae. *Ann Missouri Bot Gard* 79: 414–415.
- Bremer K. 1987. Tribal interrelationships of the Asteraceae. *Cladistics* 3: 210–253.
- Bremer K. 1994. Asteraceae, Cladistics & classification. Portland. OR: Timber Press.
- Brown GR, Carlson JE. 1997. Molecular cytogenetics of the genes encoding 18S-5.8S-26S rRNA and 5s rRNA in two species of spruce (*Picea*). *Theoretical and Applied Genetics* 95 (1-2): 1-9.
- Broz AK, Vivanco JM. 2006. Secondary metabolites and allelopathy in plant invasions: A case study of *Centaurea maculosa*. A companion to *Plant Physiology*, fourth edition by Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger.
- Bubenchikov VN, Kitvinenko VI, Popova TP. 1992. Phenolic compounds of *Centaurea pseudomaculosa*. *Chemistry of Natural Compounds* 28 (5): 507
- Buitendijk JH, Ramanna M. 1996. Giemsa C-banded karyotypes of eight species of *Alstromeria* L. and some of their Hybrids. *Ann Bot* 78:449-457.
- Candolle AP. 1837. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*, pars VI. Treuttel et Wurtz, Paris.

- Carlquist S. 1966. Wood anatomy of Compositae: a summary with comments on factors controlling wood evolution. *Aliso* 6: 25–44.
- Carlquist S. 1976. Tribal interrelationships and phylogeny of the Asteraceae. *Aliso* 8. (4): 465–492. -
- Carnoy JB. 1886. La cytodierese de l'oeuf, *Cellule*. 3, 1.
- Cassini H. 1816. Tableau exprimant les affinités des tribus naturelles de famille des Synanthérées, suivant la méthode de classification de M. Henri Cassini. In: Cuvier, G, (ed.), *Dictionnaire des Sciences Naturelles*, ed. 2. Vol. 3. Le Normant. Paris.
- Cassini H. 1823. Mémoire sur les genres *Melanthera*, *Chylochia* et *Blainvillea*. *J. Phys. Chim. Hist. Nat. Arts* 96: 207–220.
- Cassini, H. 1826. *Opuscules Phytologiques*, vols. 1–2. Levrault, Paris.
- Cassini H. 1829. Tableau synoptique des synanthérées, *Annales de Sciences Naturelles* 17: 387–423, Paris, Cited from the reprint by King R, Janaske PC, Lellinger B. 1995, Cassini on Compositae 3:445–481, Missouri: Missouri Botanical Garden.
- Cavalier-Smith T. 1985. *The evolution of genome size*. Wiley. Chichester.
- Çelik S, Yücel E. 2008. Conservation strategy of critical endemic *Centaurea hausknetchii* Boiss. (Section: Cynaroides) and effects of different salt, nitrate and acid concentrations on the germination of seeds; *Asian J Chem* 20(5):4051–4058.
- Cerbah M, Coulaud J, Siljak-Yakovlev S. 1998. rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *J Hered* 89: 312-318.
- Cerbah M, Mortreau E, Brown S, Siljak-Yakovlev S, Bertrand H, Lambert C. 2001. Genome size variation and species relationships in the genus *Hydrangea*; *Theor Appl Genet*, 103: 45-51.
- Cerbah M, Coulaud J, Godelle B, Siljak-Yakovlev S. 1995. Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. *Genome* 38: 686-695.
- Cerceau-Larrival MT, Roland-Heydacker F. 1978. Apport de la palynologie a la connaissance des Ombellifères actuelles et fossiles. In: Cauwet-Marc, A, -M, and Carbonnier, J ed(s). *Les Ombellifères*: 213 – 229 *Caryologia* 1: 362 – 377.
- Chiarugi A. 1949. Saggio di una revisione cito-sistemica della Flora Italiana, I: Il tetraploidismo della *Bellevalia webbiana* Parl. e il suo diritto di cittadinanza nella Flora Italiana.

- Chiche J, Brown SC, Leclerc JC, Siljak-Yakovlev S. 2003. Genome size, heterochromatin organisation, and ribosomal gene mapping in four species of *Ribes*. *Can J Bot* 81: 1049 – 1057
- Chiru T. 2009. Phytochemical Study Of *Centaurea Cyanus* L. Scientific Papers. USAMV Bucharest. Series A, LII: 1222-5339.
- Chouaki S, Bessedik F, Chebouti A, Maamri F, Oumata S, Kheldoun S, Hamana Mf, Douzene M, Bellah F. 2006. Deuxième Rapport National Sur L'état Des Ressources phytogénétiques INRAA, FAO. 92 p.
- Conger AD, Fairchild LM. 1953. A Quick-freeze method for making smear slides permanent, *Stain Technol* 28: 281-283.
- Coulaud J, Barghi N, Lefèbvre C, Siljak-Yakovlev S. 1999. Cytogenetic variation in populations of *Armeria maritima* (Mill.) Willd in relation to geographical distribution and soil stress tolerances. *Can J Bot* 77: 673-685.
- Coulaud J, Barghi N, Lefèbvre C, Siljak-Yakovlev S. 1999. Cytogenetic variation in populations of *Armeria maritima* (Mill.) Willd in relation to geographical distribution and soil stress tolerances, *Can J Bot* 77: 673-685.
- Cronquist A. 1955. Phylogeny and taxonomy of the Compositae, *American Midland Naturalist* 52: 478–511.
- Cronquist A. 1977. On the Taxonomic Significance of Secondary Metabolites in Angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* 1: 179-189.
- Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi A, Forgo P, Szabó P, Hohmann J. 2010. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *J Phytother Res* 24: 1664–1669.
- Cuellar T, Belhassen E, Fernández-Calvín B, Orellana J, Bella JL. 1996. Chromosomal differentiation in *Helianthus annuus* var, *macrocarpus*: heterochromatin characterization and rDNA location. *Heredity* 76: 586-591.
- D'Alleizette C. 1921. Protologue : *Bull Soc Hist Nat Afrique N* 12: 96.
- D'Emerico S, Bianco P, Medagli P, Schirone. 1995. Karyotype analysis in *Quercus* spp, (Fagaceae). *Silvae Genet* 44:66-70.
- De Bustos A, Cuadrado A, Soler C, Jouve N. 1996. Physical mapping of repetitive DNA sequences and 5S and 18S-26S rDNA in five wild species of the genus *Hordeum*, *Chromosome Research* 4: 491–499.
- De Candolle AP. 1820. *Essai élémentaire de géographie botanique*, Strasbourg.

- Devesa Alcaraz Ja, López Nieto E. 2013. Estudio Taxonómico De *Centaurea* Sect. *Mesocentron* (Cass.) Dc. Y Sect. *Hymenocentron* (Cass.) Dc. (Asteraceae) En La Península Ibérica Y Baleares. *Flora Montiberica* 55: 3-25.
- Dimon MT. 1971b. Problèmes généraux soulevés par l'étude pollinique de composées méditerranéennes, *Naturalia Monspeliensia Serie Botanique* 22: 129-144.
- Dimon, M.T. 1971a. Etude des types polliniques des composés échinulés du bassin Méditerranéen occidental. PhD thesis, Academie de Montpellier Université des Sciences et Techniques Du Languedoc, Montpellier.
- Dittrich M. 1977. Cynareae -systematic review, In: Heywood VH, Harborne JB, Turner BL, (eds) *The biology and chemistry of the Compositae*. vol, 2, London: Academic Press pp: 999–1015.
- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51:127–129.
- Doležel J, Bartoš J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot (London)* 95: 99–110.
- Dostál J. 1969. Taxonomická o celedich Lycopodiaceae a Asteraceae o redech Lyco-podium a *Centaurea* (Studia Taxonomica I), *Acta Univ, Palackianae Olomouensis. Fac Rer Nat* 31: 5-39.
- Dostál J. 1973. Preliminary notes on the subtribe Centaureinae, *Acta Bot Acad Sci Hung* 19:73 – 79.
- Dydak M, Kolano B, Nowak T, Siwinska D, Maluszynska J. 2009. Cytogenetic studies of three European species of *Centaurea* L. (Asteraceae). *Hereditas* 146: 152–161.
- Edeoga HO, Ikem IC. 2002. Structural morphology of the pollen grains in three Nigerian Species of *Boerhavia* L. *New Bot* 29:89-95.
- Edeoga HO, Ugbo HN, Osawe PI. 1998. Polymorphology of species of *Commelina* L. and *Senna* Tourn. Ex. Mill from Nigeria,. *New Bot* 25:1-10.
- Erdtman G. 1960. The acetolysis method: a revised description. *Svensk Bot Tidskr* 54: 561–564.
- Erel SB, Bedir E, Ikhlas A, Khan IA, Karaalp C. 2010. Secondary metabolites from *Centaurea ensiformis* P.H. Davis. *Biochem Syst Ecol* 38:1056–1058.
- Favarger C, Contandriopoulos J. 1961. Essai sur l'endémisme. *Bull Soc Bot Suisse* 71: 384–408.

- Favarger C, Siljak-Yakovlev S. 1986. A propos de la classification des taxons endémiques basée sur la cytotaxonomie et la cytogénétique. Colloque international de botanique pyrénéenne. La Cabanasse (Pyrénées-Orientales), Société Botanique de France, Groupement Scientifique Isard, Paris pp : 287–303.
- Fernandez-Casas J, Susanna A. 1992. Karyological notes on *Centaurea* sect, *Acrocentron*. *Pl Syst Evol* 179: 1-18.
- Ferreira PMA, Boldrini II. 2011. Potential reflection on distinct ecological units in plant endemism categories. *Conserv Biol* 25: 672–679.
- Fitch DHA, Strausbaugh LD, Barret V. 1990. On the origins of tandemly repeated genes: Does histone gene copy number in *Drosophila* reflect chromosomal location, *Chromosoma* 99: 18–124.
- Font M, Garcia-Jacas N, Vilatersana R, Roquet C, Susanna A. 2009. Evolution and biogeography of *Centaurea* section *Acrocentron* inferred from nuclear and plastid DNA sequence analyses. *Ann Bot* 103:985–997.
- Font M, Vallès J, Susanna A, Garcia-Jacas N. 2008. Auto- and allopolyploidy in *Centaurea* sect. *Acrocentron* s.l. (Asteraceae, Cardueae): karyotype and fluorochrome banding pattern analyses. *Collectanea Botanica (Barcelona)* 27: 7-18.
- Formisano C, Senatore F, Bancheva S, Bruno M, Rossellic S. 2010. Volatile components from aerial parts of *Centaurea spinosociliata* Seenus ssp. *cristata* (Bartl.) Dostál and *Centaurea spinosociliata* Seenus ssp. *spinosociliata* growing wild in Croatia. *Croat Chem Acta* 83 (4): 403–408.
- Fregonezi JN, Torezan JMD, Vanzela ALL. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA<sub>3</sub> banding. *Genetics and Molecular Biology* 27(2): 223-227.
- Frenguelli G. 2003. Pollen structure and morphology Struktura i morfologia pyłku, *PDiA* XX, 4: 200–204.
- Funk VA, Anderberg AA, Baldwin BG, Bayer RJ, Bonifacino JM, Breitwieser I, Brouillet L, Carbajal R, Chan R, Coutinho AXP, Crawford DJ, Crisci JV, Dillon MO, Freire SE, Galbany-Casals M, Garcia-Jacas N, Gemeinholzer B, Gruenstaeudl M, Hansen HV, Himmelreich S, Kadereit JW, Källersjö M, Karaman-Castro V, Karis PO, Katina L, Keeley SC, Kilian N, Kimball RT, Lowrey TK, Lundberg J, McKenzie RJ, Mort ME, Nordenstam B, Oberprieler C, Ortiz S, Pelsner PB, Randle CP, Robinson H, Roque N, Sancho G, Semple JC, Serrano M, Stuessy TF, Susanna A, Tadesse M, Unwin M, Urbatsch L, Urtubey E, Vallès J, Vogt R, Wagstaff S, Ward JM, Watson LE. 2009. Compositae metatrees: The next generation. Pp: 747–777 in: Funk, VA, Susanna A, Stuessy TF,

- Bayer R. (eds.), Systematics, evolution, and biogeography of Compositae, Vienna: IAPT.
- Gabrielyan E. 1995. On the generic status of certain groups of Centaureinae (Compositae). In: Hind DJN, Jeffrey C, Pope GV (eds.) Advances in Compositae Systematics. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 145-152.
- Galbraith D, Harkins K, Maddox J, Ayres N, Sharma D, Firoozabay E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049–1051.
- Gao Q, Liu Y. 2012. Karyomorphology of *Aspidistra grandiflora* H.-J. Tillich from Indonesia. *Nucleus* 55: 139-141.
- Garcia S, Hidalgo O, Jakovljević I, Siljak-Yakovlev S, Vigo J, Garnatje T, Vallès J. 2013. New data on genome size in 128 Asteraceae species and subspecies, with first assessments for 40 genera, 3 tribes and 2 subfamilies. *Plant Biosyst* 147: 1219-1227.
- Garcia-Jacas N, Susanna A, Garnatje T, Vilatersana R. 2001. Generic delimitation and phylogeny of the subtribe Centaureinae (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann Bot* 87: 503-515.
- Garcia-Jacas N, Susanna A, Mozaffarian R, Ilarsan R. 2000. The natural delimitation of *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae): ITS sequence analysis of the *Centaurea jacea* group. *Plant Syst Evol* 223: 185-199.
- Garcia-Jacas N, Susanna A. 1992. Karyological notes on *Centaurea* sect. *Acrocentron* (Asteraceae). *Plant Syst Evol* 179: 1-18.
- Garcia-Jacas N, Uysal T, Romaschenko K, Suárez-Santiago VN, Ertuğrul K, Susanna A. 2006. *Centaurea* Revisited : A molecular survey of the *Jacea* group. *Ann Bot* 98: 741-753.
- Garcia-Jacas N, Susanna A, Ilarsan R. 1996. Aneuploidy in Centaureinae (Compositae): is  $n=7$  the end of the series? *Taxon* 45: 39-42.
- Garcia-Jacas N, Susanna A, Ilarslan R, Ilarslan H. 1997. New chromosome counts in the subtribe Centaureinae (Asteraceae, Cardueae) from West Asia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 125: 343–349.
- Garcia-Jacas N, Susanna A, Mozaffarian V. 1998a. New chromosome counts in the subtribe Centaureinae (Asteraceae, Cardueae) from West Asia, III. *Bot J Linn Soc* 128: 413–422.
- Garcia-Jacas N, Susanna A, Vilatersana R, Guara M. 1998b. New chromosome counts in the subtribe Centaureinae (Asteraceae, Cardueae) from West Asia, II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 128: 403–412.

- Garnatje T, Canela MÁ, Garcia S, Hidalgo O, Pellicer J, Sánchez-Jiménez I. 2011. GSAD: a genome size in the Asteraceae database. *Cytometry* 79(Part A) (6): 401–404.
- Garnatje T, Hidalgo O, Vitales D, Pellicer J, Vallès J, Robin O, Garcia S, Siljak-Yakovlev S. 2012. Swarm of terminal 35S in *Cheirolophus* (Asteraceae, Centaureinae). *Genome* 55: 529-535.
- Garnatje T, Vallès J, Vilatersana R, Garcia-Jacas N, Susanna A, Siljak-Yakovlev S. 2004. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Plant Biol* 6(2): 140–146.
- Geber G, Schweizer D. 1987. Cytochemical hetero-chromatin differentiation in *Sinapis alba* (Crucifereae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Syst Evol* 158: 97-106.
- Gerlach WL, Dyer TA. 1980. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of the wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 8: 4851- 4865.
- Giseke PD. 1792. *Praelectiones in Ordines Naturales Plantarum*. Hoffmann, Hamburg.
- Godelle B, Cartier D, Marie D, Brown SC, Siljak-Yakovlev S. 1993. Heterochromatin study demonstrating the nonlinearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry* 14:618 – 626.
- Gokhan Z, Gokalp OG, Yavuz SC, Abdurrahman A. 2011. Antioxidant capacity and fatty acid profile of *Centaurea kotschyi* (Boiss. & Heldr.) Hayek var. *persica* (Boiss.) Wagenitz from Turkey. *grasas y aceites* 62 (1): 90-95.
- Goldsbrough PB, Ellis TH, Cullis CA. 1981. Organization of the 5 S RNA genes in flax. *Nucleic Acids Res* 9(22):5895 – 5904.
- Gömürgen AN, Potoğlu Erkara I, Altnözlü H. 2010. Chromosome And Pollen Morphology Of The Rare Endemic *Centaurea Lycopifolia* Boiss, & Kotschy. *Bangladesh J Bot* 39(2): 223-228.
- Gregory TR, Hebert PDN. 1999. The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome Research* 9: 317–324.
- Gregory TR. 2005. The C-value Enigma in Plants and Animals: A Review of Parallels and an Appeal for Partnership. *Annals of Botany* 95: 133–146.
- Greilhuber J, Dolezel J, Lysak M, Bennett MD. 2005. The origin, evolution, and proposed stabilization of the terms, genome size and C-value to describe nuclear DNA contents. *Ann, Bot* 95: 255–260.

- Greilhuber J, Speta F. 1976. C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group *S. persica*, and *Puschkinia* (Liliaceae). *Plant Syst Evol* 126: 149-188.
- Greuter W. 1991. Botanical diversity, endemism, rarity and extinction in the Mediterranean area: an analysis based on the published volumes of Med-Checklist. *Botanika Chronika* 10: 63-79.
- GSAD : A genome size in the Asteraceae database, Release 2,0.
- Guerra M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol* 23(4): 1029-1041.
- Guinochet, M, Foissac, J. 1962. Sur les caryotypes de quelques espèces du genre *Centaurea* L. et leur signification taxonomique. *Rev Cytol Biol Veg* 25: 373-389.
- Hajdera I, Siwinska D, Hasterok R, Maluszynska J. 2003. Molecular cytogenetic analysis of genome structure in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus cosentinii*. *Theor Appl Genet* 107(6) 988-996.
- Hamon P, Siljak-Yakovlev S, Srisuwan S, Robin O, Poncet V, Hamon S, de Kochko A. 2009. Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. *Chromosome Research* 17:291 – 304.
- Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA, Crane CF, Ji Y, McKnight TD, Stelly DM, Price HJ. 1996. Distribution of 5S and 18S–28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105: 55–61.
- Harpke D, Carta A, Tomovic G, Randelovic V, Randelovic N, Blattner FR, Peruzzi L. 2014. Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* series *Verni* (Iridaceae). *Plant Syst Evol*,
- Hayek Avon. 1901. Die *Centaurea* Arten Österreich-Ungarns. *Kaiserl. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. Kl.* 70: 585–773.
- He ZC, Li JQ, Wang HC. 2004. Karyomorphology of *Davidia involucreta* and *Camptotheca acuminata*, with special reference to their systematic positions. *Bot. J. Linn. Soc* 144: 193–198.
- Hellwig FH. 1994. Chromosomenzahlen aus der Tribus Cardueae (Compositae), *Willdenowia* 24: 219-248.
- Hemleben V, Werts D. 1988. Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S rRNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Matthiola incana*. *Gene* 15: 165–169.

- Hernandez-Verdum D. 2006. Nucleolus: from structure to dynamics Histochem. Cell Biol 125: 127-137.
- Heslop-Harrison JS. Schwarzacher T. Anamthawat-Jónsson K. Leitch AR. Shi M. Leitch IJ. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. Technique 3: 109–116.
- Heslop-Harrison JS. 2000. Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. American Society of Plant Physiologists. 12 : 5 617-635.
- Hill J. 1762. The vegetable system 4. London
- Hilpold A. Garcia-Jacas N. Vilatersana R. Susanna A. 2009. Two additions to the *Jacea-Lepteranthus* complex: parallel adaptation in the enigmatic species *Centaurea subtilis* and *C. exarata*. Collect Bot (Barcelona) 28: 47–58.
- Hinegardner R. 1976. Evolution of genome size. In FJ. Ayala (Ed.). Molecular evolution (p: 179-199) Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Hinz PA. 1989. L'endémisme: Concepts généraux, Saussurea 20: 145–168.
- Hoffmann O. 1889. Compositae In: Engler A. Prantl K. (eds.) Die natarlichen Pflanzen familien, 4(5): 87-387.
- Hoffmann O. 1894. Compositae. In A. Engler, and K. Prantl [eds.], Die natürlichen Pfl anzenfamilien, 324–333. Engelmann, Leipzig, Germany.
- Hoffmann O. 1897. Compositae In Die naturalichen Pflanzenfamilien. 4 (4-5). (Engler A. and Prantl K, eds.). Leipzig, pp: 87-387.
- Hoffmann, O. 1890. Compositae. In: Engler, A. & Prantl, K. (Eds.). Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Verlag. Leipzig: 87-391.
- Holub J. 1972. On correct generic names of *Acrocentron* Cass. and *Acrolophus* Cass. (*Centaurea* L. s.l) Preslia 44: 215–218.
- Holub J. 1973. Some new nomenclatural combinations in Centaureinae (Asteraceae). Preslia 45: 142–146.
- Holub J. 1974. Some new nomenclatural combinations in Centaureinae (Asteraceae) II. Preslia 46: 225–229.
- Howell WM. Black DA. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method, Experientia 36: 1014-1015.

- Huziwara Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae, VIII, Further studies on the chromosomes of Aster. *Amer J Bot* 49: 116-119.
- Jahier J, Chevre AM, Delourme R, Eber F, Tanguy AM. 1992. *Techniques de cytogénétique végétale*. INRA, France, 184p
- Jansen RK, Kim KJ. 1996. Implications of chloroplast DNA data for the classification and phylogeny of the Asteraceae, In: Hind, DJN, Beentje, HJ, (eds.) *Compositae: systematics, Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994* (DJN, Hind, Editor-in-Chief), Royal Botanic Gardens, Kew, (1): 317–339.
- Jansen RK, Michaels HJ, Palmer JD. 1991. Phylogeny and character evolution in the Asteraceae based on chloroplast DNA restriction site mapping. *Syst Bot* 16: 98–115.
- Jansen RK, Palmer JD. 1988. Phylogenetic implications of chloroplast DNA restriction site variation in the Mutisieae (Asteraceae). *Amer J Bot* 75: 753–766.
- Jansen RK, Palmer JD. 1987. A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). *Proc. Natl Acad Sci USA* 84: 5818–5822.
- Jaub. & Spach, Ill. *Pl. Orient.* 3: 23. 1847
- Jeffrey C. 1978. *Compositae*, In: Heywood, VH, (ed.) *Flowering plants of the world*, New York: Mayflower Books pp. 263–268,
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg E and Stevens PF. 1999. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Karamenderes C, Konyalioglu S, Khan S, Khan IA. 2007. Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaurea* L. species. *Phytother Res* 21: 488-491.
- Kargioglu M, Cenkci S, Evliyaoglu N, Konuk M, Kok MS, Bagcı y. 2008. An ethnobotanical survey of inner- West Anatolia. *Turkey hum Ecol* 36, 763-777.
- Kargioglu M, Cenkci S, Serteser A, Konuk M, vural G. 2010. Traditional uses of wild plants in the middle Aegean region of Turkey. *Hum Ecol* 38: 429-450.
- Karioti A, Skaltsa H , Lazari D , Sokovic M ,Garcia B and Harvala C. 2001. Secondary Metabolites from *Centaurea deusta* with Antimicrobial Activity. *Z Naturforsch* 57: 75-80.
- Kelly JK, Rasch A, Kalisz S. 2002. A method to estimated pollen viability from pollen size variation. *Amer J Bot* 89: 1021-1023.

- Kharrat-Suissi A, Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Chaieb M. 2012. Physical mapping of 5S and 18S-5,8S-26S RNA gene families in polyploid series of *Cenchrus ciliaris* Linnaeus, 1771 (Poaceae). *Comp Cytogenet* 6: 273–286,
- Khatun R. 2002. *Plant Taxonomy*, Eureka Book Agency, New Market, Rajshahi, Bangladesh pp:384-393,
- Kiss T, Kis M, Abel S, Solymosy F. 1988. Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from tomato rDNA. *Nucleic Acids Res* 16: 71–79.
- Koukoulitsa E, Skaltsa, H, Karioti, A, Demetzos, C, Dimas, K. 2005. Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines in vitro. *Planta Med.* 68 (7): 649-52.
- Koutecky P. 2007. Morphological and ploidy level variation of *Centaurea phrygia* Agg, (Asteraceae) in the Czech Republic, Slovakia and Ukraine, *Folia Geobot* 42: 77–102.
- Lavania UC, Srivastava S. 1992. A simple parameter of dispersion index that serves as a adjunct to karyotype asymmetry. *J Biosci* 17: 179–182.
- Lazari DM, Skaltsa HD, Conrstantinidis T. 2000. Volatile constituents of *Centaurea pelia* DC, C, thessala Hausskn, subsp, drakiensis (Freyn & Sint) 15(1): 7-11
- Leitch IJ, Bennett MD, 2007. Genome Size and its Uses: The Impact of Flow Cytometry, In: Doležel J, Greilhuber J, Suda J,(eds.) *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, Wiley-VCH, Weinheim, pp: 153-176.
- Leitch IJ, Chase MW, Benett MD. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Ann Bot* 82: 85–94.
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS. 1993. Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the alpha amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 36: 517–523.
- Lepers-Andrzejewski S, Siljak-Yakovlev S, Brown S, Wong M, Dron M. 2011. Diversity and dynamics of plant genome size: An example of polysomaty from a cytogenetic study of *Tahitian vanilla* (*Vanilla tahitensis*, Orchidaceae). *Am J Bot* 98: 986–997.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromere position in chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.
- Levitsky GA. 1931. The karyotype in systematic. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding* 27: 220–240.

- Li X, Guo R, Pedersen C, Hayman D, Langridge P. 1997. Physical localization of rRNA genes by two-color fluorescent in situ hybridization and sequence analysis of the 5S rRNA gene in *Phalaris coerulescens*. *Hereditas* 126: 289–294,
- Linares C, González J, Ferrer E, Fominaya A. 1996. The use of double fluorescence *in situ* hybridization to physically map the positions of 5S rDNA genes in relation to the chromosomal location of 18S-5,8S-26S rDNA and a C genome specific DNA sequence in the genus *Avena*, *Genome*, 39(3):535 – 542,
- Lincoln RJ, Boxshall GA, Clark PF. 1982. A dictionary of ecology, evolution and systematic. University Press. New York.
- Lindgren D, Paule L, Xihuan S, Yuazdani R, Segerst6rm O, Wallin J-E, Lezbro M, L. 1995. Can viable pollen carry Scots pine genes over long distances. *Grana* 34: 64-69.
- Linné C. 1753. *Species plantarum*. Holmiae. Stockholm: Laurentii Salvii.
- Long EO, Dawid IB. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 727–764.
- Mahbubur Rahman AHM. 2013. Systematic studies on Asteraceae in the northern region of Bangladesh. *American Journal of Life Sciences* 1(4): 155-164.
- Mahe F. 2009. Phylogénie, éléments transposables et évolution de la taille des génomes chez les lupins, Thèse de doctorat.
- Marie D, Brown SC. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell* 78: 41–51.
- Martel E, De Nay D, Siljak-Yakovlev S, Brown S, Sarr A. 1997. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. *J Hered* 88: 139 – 143.
- Martel E, Ricroch A, Sarr A. 1996. Assessment of genome organization among diploid species ( $2n=2x=14$ ) belonging to primary and tertiary gene pools of pearl millet using fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes, *Genome* 39: 680-687.
- Martìn Villodre J, Garcia-Jacas N. 2000. Pollen studies in subtribe Centaureinae (Asteraceae): the *Jacea* group analyzed with electron microscopy, *Bot J Linn Soc* 133: 473-484
- Martinoli G. 1954. La cytotaxonomie expérimentale appliquée à des espèces végétales de la Sardaigne et en particulier aux endémiques, VIII ème Congrès Intern Bot, Paris, 10 (9) :78–79.
- Martynov II. 1820. *Tekhno-Botanicheskii Slovar*. Rossilska Akademia, St. Petersburg
- Mbagwu FN, Edeoga HO. 2006. Palynological studies on some Nigerian species of *Vigna savi*. *J Biol Sci* 6(6): 1122-1125.

- Mbagwu, FN, Chime EG, Unamba CIN. 2008. Palynological studies of five species of Asteraceae. *J Pl Sci* 3(1): 126 – 129.
- Médail F, Quézel P. 1997. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 112–127.
- Medjroubi K, Benayache F, Benayache S, Akkal S, Khalfallah N, Aclinou P. 1997. Guaianolides from *Centaurea musimomum*. *Phytochemistry* 45: 1449-1452.
- Mélèse T, Xue Z. 1995. The nucleolus: and organelle formed by the act of building ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 7: 319-324.
- Miller P. 1754. *The gardeners dictionary*. Abridged ed. 4. Privately published, London.
- Mione T, Anderson GJ. 1992. Pollen-ovule ratios and breeding system evolution in *Solanum* section *Basarthrum* (Solanaceae). *Amer J Bot* 79: 279-287.
- Misset M, Gouret JP. 1996. Flow cytometric analysis of the different ploidy levels observed in the genus *Ulex* L, Faboideae-Genisteae in Brittany (France). *Botanica Acta* 109(1): 72-79.
- Mittermeier RA, Robles Gil P, Hoffmann M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreux J, Da Fonseca GAB. 2004. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions, Preface by Peter A. Seligmann, Foreword by Harrison Ford, Cemex/Conservation International/Agrupacion, Sierra Madre/Monterrey/Mexico. pp 392.
- Morse DH. 1987. Roles of pollen and ovary age in follicle production of the common milkweed *Asclepias syriaca*. *Amer J Bot*. 74: 851-856.
- Mortreau E, Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Brown SC, Bertrand H, Lambert C. 2010. Cytogenetic characterization of *Hydrangea involucrata* Sieb, and *H. aspera* D. Don complex (Hydrangeaceae): genetic, evolutionary, and taxonomic implications. *Tree Genet Genomes* 6: 137–148.
- Moscone EA, Klein F, Lambru M, Fuchs J, Schweizer D. 1999. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42:1224 – 1233.
- Mraz P, Bouchier RS, Treier UA, Schaffner U, Muller-Scharer H. 2011. Polyploidy in phenotypic space and invasion context: A morphometric study of *Centaurea stoebe* s.l. *Int J Plant Sci* 172(3): 386–482.

- Murata M, Heslop-Harrison JS, Motoyoshi F. 1997. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multicolor fluorescence *in situ* hybridization in cosmid clones. *Plant J* 12: 31–37.
- Muratović E, Robin O, Bogunić F, Soljan D, Siljak-Yakovlev S. 2010. Speciation of European lilies from *Liriotypus* section based on karyotype evolution. *Taxon* 59: 165–175.
- Nacer A, Bernard A, Boustie J, Touzani R. 2006. Aglycone flavonoids of *Centaurea tougourensis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds* 42(2): 230-231.
- Naik VN. 2003. *Taxonomy of Angiosperms*. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. New Delhi, India, pp 74-160.
- Nardon Ch, Weiss M, Vieira C, Biémont Ch. 2003. Variation of the genome size estimate with environmental conditions in *Drosophila melanogaster*. *Cytometry Part A*, 55A (1): 43-49.
- Natarajan G. 1981. In Löve A, (Ed.) *Chromosome number reports LXXII*. *Taxon* 30(3): 698-699.
- Nicoloff H, Anastassova-Kristeva M, Rieger R, Kunzel G. 1979. 'Nucleolar dominance' as observed in barley translocation lines with specifically reconstructed SAT chromosomes. *Tliror Aplil Grnef* 55: 247-251.
- Niesenbaum RA. 1992. Sex ratio, components of reproduction and pollen deposition in *Lindera benzoin* (Lauraceae). *Amer J Bot* 79: 495-500.
- Nyman I. 1992. Pollination mechanisms in six *Campanula* species (Campanulaceae), *Plant Syst Evol* 188: 97-108.
- Ochsmann I. 2001. *Morphologische und molekularsystematische Untersuchungen an der Centaurea stoebe L. Gruppe (Asteraceae – Cardueae) in Europa*. Diss Bot Stuttgart 324.
- Ohri D. 1998. Genome Size Variation and Plant Systematics. *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 75-83.
- Olson, B.E. and R.G. Kelsey. 1997. Effect of *Centaurea maculosa* on sheep rumen microbial activity and mass *in vitro*. *J Chem Ecol.* 23:1131–1144.
- Ozenda P. 1991. *Flore et végétation du Sahara*, 3rd ed. CNRS. Paris Edition.
- Özler H, Kaya Z, Pehlivan S. 2009. Pollen Morphology Of Some *Centaurea L. Psephellus* Cass. and *Cyanus* Miller. *Taxa Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51 (2): 53–66.
- Paszko B. 2006. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Syst Evol* 258: 39–48.

- Perry LG, Thelen GC, Ridenour WM, Weir TL, Callaway RM, Paschke MW, Vivanco JM. 2005. Dual role for an allelochemical: ( $\pm$ )-catechin from *Centaurea maculosa* root exudates regulates conspecific seedling establishment. *J Ecol* 93:1126 – 1135.
- Peruzzi L, Eroğlu M. 2013. Karyotype asymmetry: Again, how to measure and what to measure? *Comp Cytogenet* 7: 1–9.
- Petit D, Mathez J, Qaid A. 2001. Phylogeny of the Carduae (Asteraceae) based on analysis of morphological and palynological characters, In: *Bocconeia* 13 Palermo p:41-53.
- Piégu B, Guyot R, Picault N, Roulin A, Sanyal A, Kim H, Collura K, Brar DS, Jackson S, Wing RA. 2006. Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposon-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice, *Genome Res* 16: 1262–1269.
- Poljakov PP. 1967. Sistematika i proiskhozhdenie slozhnotsvetnykh [Systematics and origin of the Compositae], Nauka, AlmaAta, *Journal of Chemical Ecology* September 2011. 37, (9): 1044-1053.
- Pollock JL, Kogan LA, Thorpe AS, Holben WE. 2011. ( $\pm$ )-Catechin, A Root Exudate of the Invasive *Centaurea Stoebe* Lam. (Spotted Knapweed) Exhibits Bacteriostatic Activity Against Multiple Soil Bacterial Populations. 37 (9): 1044-1053.
- Pruitt RE, Myerowitz EM. 1986. Characterization of the genome of *Arabidopsis Thalian*, *Journal of Molecular Biology*, 187: 169-183.
- Pustahija F, Brown SC, Bogunić F, Bašić N, Muratović E, Ollier S, Hidalgo O, Bourge M, Stevanović V, Siljak-Yakovlev S. 2013. Small genomes dominate in plants growing on serpentine soils in West Balkans, an exhaustive study of 8 habitats covering 308 taxa. *Plant Soil* 373: 427–453.
- Quézel P. 1964. Végétation des Hautes Montagnes de la Grèce Méridionale. *Plant ecology* 12 (5-6) : 289-385.
- Quézel P. 1995. La flore du bassin méditerranéen: origine, mise en place, endémisme = Mediterranean Basin flora : origin, establishment, endemism. CNRS-univ. Aix-Marseille III, IMEP/URA 1152 lab. botanique écologie méditerranéenne, 13397 Marseille, FRANCE
- Quézel P, Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome 1), Paris, France: Editions du CNRS.
- Rahman AHMM, Islam AKMR, Rahman MM. 2011. The Family Asteraceae of Rajshahi Division, Bangladesh, VDM Verlag Dr. Muller Publishing House Ltd. Germany pp.1-176.

- Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. 2006. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 18: 325–334.
- Reitsma TJ. 1969. Size Modification of Recent Pollen Grains Under Different Treatments. *Review of Palaeobotany and Palynology* 9: 175-202.
- Robinson H, Brettell RD. 1974. Studies in the Liabeae (Asteraceae), II: Preliminary survey of the genera. *Phytologia* 28: 43–63.
- Romaschenko K, Ertuğrul K, Susanna A, Garcia-Jacas N, Uysal T, Arslan E. 2004. New chromosome counts in the *Centaurea jacea* Group (Asteraceae, Cardueae) and some related taxa. *Bot J Linn Soc.* 145: 345–352.
- Romero Zarco C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526–530.
- Rosselli S, Bruno M, Maggio A, Angela RR, Bancheva S, Senatore F, Formisano C. 2009. Essential oils from the aerial parts of *Centaurea cuneifolia* Sibth. and Sm. and *C. euxina* Velen., two species growing wild in Bulgaria. *Biochem. Syst. Ecol.* 37:426-431
- Samaropoulou S, Bareka P, Artelari R, Kamari Sambamurty G. 2013. Karyological studies on some endemic and rare species of *Kephalonia*, Ionian Islands, Greece FI, *Medit* 23: 215-221.
- Sambamurty AVSS. 2005. *Taxonomy of Angiosperms*. I.K. International Pvt. Ltd. New Delhi. India. pp.408-417.
- Saroglou V, Karioti A, Demetzos C, Dimas K, Skaltsa H. 2011. Correction to Sesquiterpene Lactones from *Centaurea spinosa* and Their Antibacterial and Cytotoxic Activities. *J Nat Prod* 74 (9):2029–2029.
- Sastri DC, Hilu K, Appels R, Lagudah ES, Playford J, Baum BR. 1992. An overview of evolution in plant 5S-DNA, *Plant Syst Evol* 183(3 – 4):169 – 181.
- Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, Barnett S, Capecchi MR. 2000. Illegitimate dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *PNAS* 97(25) 13702–13707.
- Schweizer D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307–324.
- Seijo G, J and Fernandez A. 2003. Karyotype analysis and chromosome evolution in South American species of *Latyrus* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 90: 980-987.
- Sezik E, Yesilada E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T. 2001. Traditional medicine in Turkey X, Folk medicine in Central Anatolia. *J Ethnopharmacol* 75, 95–115.

- Shafiq FA, Vahidy AA. 1998. Chromosomal heteromorphy in karyotypes of three local cultivars of *Hippeas vittatum* (Amaryllidaceae). Pak J Biol Sci 1: 5–10.
- Shamurailat Pam A, Madhanav L, Yadav RR, Bhat KV, Rao SR. 2012. Chromosome diversity analysis in various species of *Vigna savi* from India, Nucleus 55(2): 107–114.
- Sharma AK, Sharma A. 1965. Chromosome Techniques. Theory and Practice, Butterworths, London,
- Sharma OP. 2004. Plant Taxonomy, Tata Mc Grow Hill Publishing Co, Ltd, New Delhi, India pp: 312-318.
- Shaw RA, Durant AJ, Mi Y. 2005. Heterogeneous surface crystallization observed in undercooled water. J Phys Chem B 109: 9865–9868.
- Shchori Y, Goren T, Ben-Jaacov J. 1992. Pollen germination and storage in Banksia and some other proteaceae plants. Acta Hort 316: 19-20.
- Siljak S, Gorenflot R. 1977. Contribution à l'étude cytotoxinomique de deux espèces du genre *Centaurea* L. CR Acad Sci Paris 285: 775–778.
- Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Vicic V, Robin O. 2014. Molecular Cytogenetics (FISH and Fluorochrome Banding): Resolving Species Relationships and Genome Organization, Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol, 1115.
- Siljak-Yakovlev S, Solić ME, Catrice O, Brown SC, Papeš D. 2005. Nuclear DNA content and chromosome number in some diploid and tetraploid *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae) from the Dalmatia region. Plant Biol 7: 397–404.
- Siljak-Yakovlev S, Peruzzi L. 2012, Cytogenetic characterization of endemics: past and future, Plant Biosystems 146 (3): 694–702.
- Siljak-Yakovlev S. 1986. Etude cytogénétique et palynologique de Compositae endémiques ou reliques de la flore yougoslave, Doctorat és-Science, Université Paris Sud.
- Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Coulaud J, Stoian V, Brown SC, Zoldoš V. 2002. Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. Theor Appl Genet 104: 505–512.
- Skvarla JJ, Turner BL, Patel VC, Tomb AS. 1977. Pollen morphology in the Compositae and in morphologically related families, In: Heywood VH, Harborne JB, Turner BL, (eds.). The biology and chemistry of the Compositae, London: Academic Press pp: 141–265.

- Slovák M, Vít P, Urfus T, Suda J. 2009. Complex pattern of genome size variation in a polymorphic member of the Asteraceae. *Journal of Biogeography* 36 (2) : 372–384
- Smith-Huerta NL, Vasek FC. 1984. Pollen longevity and stigma-pre-emption in *Clarkia*. *Amer J Bot.* 71: 1183-1191.
- Sollner-Webb B, Mougey EB. 1991. News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends in Biochemical Science.* 16 : 58–62.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist* 161:173–191.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist* 161: 173–191.
- Srisuwan S, Sihachakr D, Siljak-Yakovlev S. 2006. The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Sci* 171: 424–433.
- Stebbins GL. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*, Reading, MA: Addison-Wesley.
- Stefans B. 2006. Evaluation of transgenic *Campanula carpatica* plants. Master's thesis.
- Sumner AT. 1990. *Chromosome banding*, Unwin Hyman, London.
- Susanna A, Garcia-Jacas N, Soltis DE, Soltis PS. 1995. Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. *American Journal of Botany* 82: 1056-1068.
- Susanna A, Garcia-Jacas N. 2001. Tribus Cardueae, In “The Families and Genera of Vascular Plants: Compositae” (K, Kubitzki, Ed.), Springer-Verlag, Heidelberg.
- Susanna A, Garcia-Jacas N. 2007. The families and genera of vascular plants, vol 8, Flowering plants, Eudicots, In: Kadereit JW, Jeffrey C, editors, *Asterales*, Berlin: Springer pp: 123–146.
- Susanna A, Garcia-Jacas N. 2009. The tribe Cardueae, In: Funk VA, Susanna A, Stuessy T, Bayer R, editors, *Systematic, evolution and biogeography of the Compositae*, Vienna: IAPT pp: 293–313.
- Takaiwa F, Oono K, Sugiura M. 1984. The complete nucleotide sequence of a rice 17S rRNA gene. *Nucleic Acids Res* 12: 5441–5448.
- Takht A. 1938. In *Bot. Mater. Gerb. Bot. Inst. Komarova Akad. Nauk SSSR* 7: 276.
- Talavera S, Devesa JA, Fernández-Galiano E. 1984: Notas cario sistemáticas sobre plantas norte-africanas, 1, Compositae, – *Candollea* 39: 271-280.

- Tarasov VA, Kasymov SZ, Sidyakin GP. 1975. The isolation of Cnicin from *Centaurea squarrosa*. Chemistry of natural Compounds 9: 414.
- Tava A, Esposti S, Boracchia M, Viegi L. 2010. Volatile Constituents of *Centaurea paniculata* Subsp. *carueliana* and *C. rupestris* s.l. (Asteraceae) From Mt, Ferrato (Tuscany, Italy). Journal of Essential Oil Research 22 (3): 223-227.
- Tekeli Y, Sezgin M, Aktumsek A, Guler GO, Sanda MA. 2010. Fatty acid composition of six *Centaurea* species growing in Konya, Turkey. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters. 24 (20): 1883-1889.
- Tekeli Y, Zengin G, Aktumsek A, Sezgin M, Torlak E. 2011. Antibacterial activities of extracts from twelve *Centaurea* species from Turkey. Arch Biol Sci 63: 685–690.
- Tešević V, Millosavljević S, Vajs V, Janacković P, Djordjević, Jadranin M, Vucković I. 2007. Quantitative analysis of sesquiterpene lactone cnicin in seven *Centaurea* species Wild- growing in Serbia and Montenegro using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Journal of the Serbian Chemical Society. 72:1275-1280.
- Tharayil N, Triebwasser DJ. 2010. Elucidation of a diurnal pattern of catechin exudation by *Centaurea stoebe*. J Chem Ecol. 36: 200–204.
- Tharayil N, Bhowmik P, Alpert P, Walker E, Amarasiriwardena D, Xing B. 2009. Dual purpose secondary compounds: phytotoxin of *Centaurea diffusa* also facilitates nutrient uptake. 181(2): 424–434.
- Thompson JD. 2005. Plant Evolution in the Mediterranean. Oxford University Press, Oxford.
- Tonjan TR. 1980. Svjaz'mezdu cislom hromosomi nekotorymi morfoloģiceskimi prizna-kami u predstabilitelej podtriby *Centaureinae* Less. [Relation between chromosome number and some morphological signs of *Centaureinae* Less, representatives,] Biol. Zurn. Armenii 33: 552-554.
- Turner BL, Bacon J, Urbatsch L, Simpson B. 1977. Chromosome numbers in South American Compositae. Am J Bot 66: 173 – 178.
- Ugur A, Duru ME, Ceylan O, Sarac N, varol O, Kivrak I. 2009. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Centaurea ensiformis* Hub.-Mor (Asteraceae), a species endemic to Mugla (Turkey). nat Prod Res 23(2), 149-167.
- Ugur A, Sarac N, Ceylan O, and ME Duru. 2010. Antimicrobial activity and chemical composition of endemic *Centaurea cariensis* subsp, niveo-tomentosa. Nat Prod Res 24: 861-872.

- Uysal I, Celik S, Menemen Y. 2005. *Centaurea* species in Turkey (B): Comparative studies of two closely related species *C. kurdica* Reichardt and *C. sclerolepis* Boiss., International J Biodiv Sci and Manag 1(2): 121-128.
- Uzunhisarcikli ME, Doğan E, Duman H. 2007. A new species of *Centaurea* L. (Cardueae:Asteraceae) from Turkey. Bot J Linn 153: 61–66.
- Vallès J, Siljak-Yakovlev S. 1997. Cytogenetic studies in the genus *Artemisia* L.: fluorochrome banded karyotypes of five taxa, including the Iberian endemic species *A. barrelieri* Besser. Canadian Journal of Botany 75: 595–606.
- Vanderhoeven S, Hardy O, Vekemans X, Lefèbre C, De Loose M, Lambinon J. 2002. Amorphometric study of populations of the *Centaurea jacea* complex (Asteraceae) in Belgium. Plant Biol 4: 403–412.
- Vaughton G,, Ramsey M. 1991. Floral biology and inefficient pollen removal in *Banksia spinulosa* var *neoangelica* (Proteaceae). Aust J Bot 39: 167-77.
- Véla E, Benhouhou S. 2007. Evaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le Bassin méditerranéen (Afrique du Nord). Comp Rend Biol 330: 589-605.
- Venora G, Blangiforti S, Ruffini Castiglione M, Pignone D, Losavio F, Cremonini R. 2002. Chromatin organization and computer aided karyotyping of *Triticum durum* Desf. cv Timilia. Caryologia 55: 91–98.
- Viegi L, Renzoni G. 1981. Numeri cromosomici per la Flora Italiana: 831–835. Inform Bot Ital 13: 168–171.
- Vilatersana R, Martìn Villodre J, Susanna A, Garcia-Jacas N, Garnatje T. 2001. Pollen Studies in Subtribe Centaureinae (Asteraceae): The *Carthamus* Complex and the Genus *Aegialophila* Analyzed with Electron Microscopy, Plant biol 3: 607-615.
- Villodre JM, Garcia-Jacas N. 2000. Pollen studies in subtribe Centaureinae (Asteraceae): the *Jacea* group analyzed with electron microscopy. Botanical Journal of the Linnean society 133:473-484.
- Wagenitz G, Hellwig FH. 1996. Evolution of characters and phylogeny of the Centaureinae. In: Hind DJN, Beentje HG, (eds.) Compositae: Systematics, Proceedings of the International Compositae Conference. Royal Botanical Gardens. Kew pp 491-510.
- Wagenitz G. 1955. Pollen morphologie und Systematik in der Gattung *Centaurea* L. s.l. Flora 142: 213-279.
- Wagenitz G. 1974b. Parallele Evolution von Merkmalen in der Gattung *Centaurea*, Phytion (Austria) 16: 301-312.

- Wagenitz G. 1975. Floristic connection between the Balkan Peninsula and the Near East as exemplified by the genus *Centaurea* L. In: Problems of the Balkan flora and vegetation. Sofia: pp: 223–228.
- Wagenitz G. 1976. Systematics and phylogeny of the *Compositae* (*Asteraceae*). Plant Systematics and Evolution 125 (1): pp 29-46.
- Walker JW, Doyle JA. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: Palynology. Ann Missouri Bot Gard, 62: 664-723.
- Watanabe K, Yahara T, Denda T, Kosuge K. 1999. Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (*Asteraceae*, *Astereae*): Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. J Plant Res 112: 145–161.
- Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Siljak-Yakovlev S, Baeza CM, Parker J. 2003. Karyotype evolution in South American species of *Hypochaeris* (*Asteraceae*, *Lactuceae*). Plant Syst Evol 241: 171–184.
- Wodehouse RP (1935) Pollen grains, Mc Grew Hill, New York
- Xu J, Earle ED. 1996. High resolution physical mapping of 45S (5.8S, 18S and 25S) rDNA gene loci in the tomato genome using a combination of karyotyping and FISH of pachytene chromosomes. Chromosoma 104: 545–550.
- Yildirim T.2009. Strong Coupling of the Fe-Spin State and the As-As Hybridization in Iron Pnictide Superconductors from First-Principle Calculations. Physical Review Letters 102.
- Zapesochnaya GG, Ivanova SZ, Sheichenko VI, Tyukavkina NA, Medvedeva SA. 1978. O-acylated flavonoid glycoside of the needles of *Picea obovata*. Chemistry of Natural Compounds Volume 14 (5): 490-494.
- Zeraïa L. 1983. Protection de la flore, Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes, Station Centrale de Recherche en Ecologie Forestière, Alger, Algérie.
- Zoldos V, Papes D, Brown S, Panaud O, Siljak-Yakovlev S. 1997. Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. Genome 41: 161–168.
- Zoldos V, Papes D, Cerbah M, Panaud O, Besendorfer V, Siljak-Yakovlev S. 1999. Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. Theor Appl Genet. 99: 969–977.
- Zuo L, Yuan Q. 2011. The difference between the heterogeneity of the centromeric index and intrachromosomal asymmetry. Pl Syst Evol 297: 141 – 145.

## Annexe 1

**Tableau1:** Les espèces endémiques Algériennes du genre *Centaurea* (Quézel et Santa, 1963 ; Ozenda 1991)

Espèces	synonymes homotypiques	Synonymes hétérotypiques	Noms communs	Endémiques
<i>C. africana</i> var. <i>africana</i> (Bonnet.) M	-			Algéro-tunisienne
<i>C. amara</i> ssp <i>ropalon</i> (Pomel) Arènes	≡ <i>Centaurea jacea</i> subsp. <i>ropalon</i> (Pomel) Maire ≡ <i>Centaurea ropalon</i> Pomel ≡ <i>Jacea ropalon</i> (Pomel) Holub )	= <i>Centaurea jacea</i> var. <i>illudens</i> Maire = <i>Centaurea ropalon</i> var. <i>tunizensis</i> Maire		Algéro-tunisienne
<i>C. incana</i> Desf.	≡ <u><i>Colymbada incana</i> (Desf.) Holub</u>	= <i>Centaurea pubescens</i> Willd. subsp. <i>pubescens</i> = <i>Centaurea incana</i> subsp. <i>pubescens</i> (Willd.) Maire = <i>Centaurea pubescens</i> Willd. = <i>Centaurea reflexa</i> subsp. <i>pubescens</i> (Willd.) Ball = <i>Centaurea incana</i> var. <i>abdelkaderi</i> Sennen & Mauricio = <i>Centaurea incana</i> var. <i>amourensis</i> auct. = <i>Centaurea incana</i> var. <i>carbonelli</i> Sennen & Mauricio = <i>Centaurea incana</i> var. <i>fulgida</i> Maire		

		<p>=<i>Centaurea incana</i> var. <i>hookeriana</i> Ball</p> <p>=<i>Centaurea incana</i> var. <i>pauana</i> Maire</p> <p>=<i>Centaurea incana</i> var. <i>ignea</i> Emb. &amp; Maire</p> <p>=<i>Centaurea incana</i> var. <i>leucophylla</i> Alleiz.</p> <p>=<i>Centaurea pubescens</i> var. <i>litoralis</i> Batt.</p> <p>=<i>Centaurea incana</i> var. <i>litoralis</i> (Batt.) Maire</p> <p>=<i>Centaurea incana</i> var. <i>pseudacaulis</i> Maire</p> <p>=<i>Centaurea incana</i> var. <i>spillmanniana</i> Maire</p> <p>=<i>Centaurea pubescens</i> var. <i>integrifolia</i> Alleiz.</p> <p>=<i>Centaurea pubescens</i> var. <i>leucophylla</i> Alleiz.</p> <p>=<i>Centaurea abdelkaderi</i> Sennen &amp; Mauricio</p> <p>=<i>Centaurea carbonellii</i> Sennen &amp; Mauricio</p> <p>=<i>Centaurea incana</i> var. <i>battandieri</i> Sennen ex Maire</p> <hr/>		
<i>C. involucrata</i> Desf. (1799)		= <i>Centaurea involucrata</i> var. <i>paulini</i>	Seguia	Algéro-marrocaïne

	≡ <i>Centaurea pullata</i> subsp. <i>involucrata</i> (Desf.) Talavera	<u>Maire &amp; Sennen</u>		
<i>C. maroccana</i> Ball.	≡ <i>Calcitrapa maroccana</i> (Ball) Holub	= <i>Centaurea pterodonta</i> Pomel	Neggar	Algéro-marrocaïne
<i>C. musimonum</i> Maire	-	-	-	Algéro-marrocaïne
<i>C. nana</i> Desf.	≡ <i>Colymbada nana</i> (Desf.) Holub	-	-	Algéro-marrocaïne
<i>C. phaeolepis</i> Coss.	-	-	-	Algérienne
<i>C. pungens</i> Pomel	≡ <i>Calcitrapa pungens</i> (Pomel) Holub ≡ <i>Centaurea pungens</i> Pomel subsp. <i>pungens</i>	= <i>Centaurea pungens</i> var. <i>conillii</i> <u>Sennen &amp; Mauricio</u>		Algérienne
<i>C. tougourensis</i> ssp <i>tougourensis</i>	≡ <i>Centaurea tougourensis</i> Boiss. & Reut.	= <i>Centaurea tougourensis</i> var. <i>brevimucronata</i> Maire  = <i>Centaurea tougourensis</i> var. <i>medians</i> Maire  = <i>Centaurea tougourensis</i> var. <i>transiens</i> Maire	Guadoust	Algérienne

## Annexe 2

### 1- La 8-hydroxyquinoléine à 0.002%

0.03g de la 8-hydroxyquinoléine dans 100 ml d'eau distillée.

### 2- Colchicine à 0.05%

50 mg de colchicine en poudre dans 100 ml d'eau distillée.

### 3- Solution mère d'orcéine

- Dissoudre par ébullition ménagée 2,2 g d'orcéine (Gurr) dans 100 ml d'acide acétique glacial
- Laisser refroidir, agiter et filtrer

**La solution d'orcéine standard 1% (La dilution se fait au moment de l'emploi)**

- Mélanger 4,5 ml de solution mère avec 5,5 ml d'eau distillée

### 4- Carmin acétique à 1%

- Dans un grand Erlenmeyer, porter 1 litre d'eau acétique (45% acide acétique) à ébullition.
- Verser 10 g de carmin et faire mijoter la solution pendant 5 min.
- Laisser décanter jusqu'au refroidissement.
- Filtrer.
- Additionner quelques gouttes de perchlorure de fer dans la solution obtenue pour accentuer l'intensité de la coloration.

La solution de carmin ainsi obtenue, se conserve très longtemps dans un flacon en verre fumé.

### 5-Tampon phosphate

- Mettre dans un erlenmeyer contenant 100 ml d'eau distillée, 1.17 g de phosphate dissodique ( $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ ) avec 0.69 g de phosphate monopotassique ( $\text{KH}_2 \text{PO}_2$ ).
- Mélanger.
- Ajuster le pH à 6.8.

Cette préparation doit être extemporanée.

### 6- Solution saline 2 x SSC (Salt Sodium Citrate)

Mélanger 17.5 g de chlorure de sodium et 8.8 g de citrate de sodium dans un litre d'eau distillée.

## Annexe 3

### 1- Tampon citrate

#### 0.01M

Le tampon citrate est formé de deux solutions A et B

A : solution d'acide citrique 0.096g/50ml.

B : solution de citrate de sodium 0.147g/50ml.

Pour un pH 4.6

- Prendre 25.5ml d'acide citrique et 24.5ml de citrate de sodium.
- Compléter à 100 ml avec l'eau distillée.

#### 0.05M (pour la préparation de l'enzyme R)

- Acide citrique 0.48g/ 50ml

- Citrate de sodium 0.73g/ 50ml

### 2- Préparation de l'enzyme R

Hémicellulase 4%

Pectolyase 1%

Cellulase R10 4%

Diluer les trois enzymes dans le tampon citrate 0.05M à pH 4.6

### 3- Tampon Mcllvaine

A: solution d'acide citrique 1.05g/50ml H<sub>2</sub>O

B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 1.068g/30ml H<sub>2</sub>O.

#### Pour un pH 7

- Prendre 6.5ml de la solution A et 43.6ml de la solution B.
- Compléter à 100ml par de l'eau distillée.

#### Pour un pH 5.5

- Prendre 43.2 ml de la solution A et 56.8ml de la solution B.
- Compléter à 200ml par de l'eau distillée

Tampon McIlvaine pH 7 + MgSO<sub>4</sub>

- Prendre 50ml du tampon McIlvaine (pH 7).
- Ajouter 61.62mg de MgSO<sub>4</sub>.

#### 4- Préparation de la chromomycine

2mg de chromomycine pour 10ml de solution (tampon McIlvaine pH 7 + MgSO<sub>4</sub>) .  
Entourer le flacon avec du papier aluminium pour l'obscurité et conserver à 4°C.

#### 5- Préparations des tampons et des enzymes pour la FISH

20 x SSC

NaCl	175.3g
Citrate de sodium	88.2g
Eau ultra pure	qsp 1000ml

4 x SSC Tween

Tween 20	1ml
20 x SSC	100ml
Eau ultra pure	400ml

4 x SSC

20 x SSC	100ml
Eau ultra pure	400ml

2 x SSC

20 x SSC	100ml
Eau ultra pure	200ml

0.1 x SSC

2 x SSC	13ml
Eau ultra pure	247ml

Formamide 20%

0.1 x SSC	160ml
Formamide	40ml

RNase (stock à 10mg/ml diluée à 1/100)

RNase à 10mg/ml	16µl
2 x SSC	1584µl

Pepsine (stock à 500mg/ml)

Pepsine 500 mg	500mg
HCl 0.01 M	1ml

Tampon de détection (préparé extemporanément)

5% BSA (Bovine serum albumin): 0.1g de BSA dans 2ml 4 x SSCT.

Diluer dans un petit récipient et laisser à 37°C jusqu'à la dilution complète.