

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale



No d'ordre :

No de série :

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat 3^{ème} Cycle

Option: Biologie et génomique végétale

Présentée par

Meriem BOUKHENANE

Etude de l'organisation du génome du complexe d'espèces *Narcissus tazetta* L. s.l. d'Algérie

01/01/20116

Devant le jury ;

Président	M. D. KHELIFI	Professeur - Université des Frères Mentouri Constantine
Encadreur	Mme N. KHALFALLAH	Professeur - Université des Frères Mentouri Constantine
Co-encadreur	Mme S. SILJAK-YAKOVLEV	Professeur - Université Paris-Sud. France
Examineurs	M. M. KAABECHE	Professeur - Université Ferhat Abbas Sétif 1
	Mme N. AMIROUCHE-HAMZA	Professeur - Université Houari Boumediene Alger
	M. R. AMIROUCHE	Professeur - Université Houari Boumediene Alger

Année universitaire 2015-2016

Dédicaces

A

Mon regretté père pour avoir illuminé mon chemin,

Ma chère mère pour son dévouement,

Ma grand-mère pour ses prières

Mon petit frère pour sa complicité,

Mon cher mari et mon petit ange pour leur amour,

Mes beaux parents pour leurs encouragements.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement ma directrice de thèse Mme Nadra KHALFALLAH, Professeur à l'Université Constantine 1 et responsable de l'équipe de cytogénétique d'avoir encadré ce travail. Qu'elle trouve ici ma gratitude pour sa précieuse aide au laboratoire comme sur le terrain, pour ses encouragements et son soutien constants et désintéressés tout au long de mes années de thèse.

Mes remerciements vont également à Mme Sonja SILJAK-YAKOVLEV, Directrice de recherche au laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution à l'université Paris XI-Orsay qui a co-dirigé ce travail et qui n'a ménagé aucun effort pour cela. Je lui suis également reconnaissante pour son accueil chaleureux durant mon séjour à Orsay.

Je remercie chaleureusement M. Douadi KHELIFI, Professeur à l'Université Constantine 1 et Directeur du Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je suis très reconnaissante à M. Mohamed KAABACH, professeur à l'université Sétif 1 de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de faire partie du jury. Je le remercie également pour nous avoir accompagnés lors de notre sortie sur le terrain à Sétif.

Ma reconnaissance va également à Mme. Nabila AMIROUCHE et M. Rachid AMIROUCHE, professeurs à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene-Alger, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail, de faire le déplacement et de faire partie du jury. Je les remercie également pour m'avoir envoyé un échantillon de narcisse de la région d'Alger.

Merci à M^{elle} Fatima PUSTAHIJA, maître de conférences à l'université de Sarajevo pour sa grande aide au laboratoire et ses précieux conseils durant mon séjour à Orsay ainsi que M. Alain FRIDLENDER pour sa collaboration.

Que M. Spencer BROWN, et M. Michael BOURGE soient remerciés de m'avoir accueilli à l'institut des Sciences du Végétal (ISV) au CNRS à Gif-sur-Yvette pour la réalisation de la cytométrie en flux.

Je tiens aussi à remercier M^{elle} Radhia DHJEGHAR, M. Nadir BELBEKRI et Mme Bouldjadj Ryma, Ingénieurs au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales et Mme Odile ROBIN, ingénieur au laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution à l'université Paris XI-Orsay pour leur aide et leur fiabilité.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont aidé dans mes sorties sur le terrain, en particulier M. Khalfallah Omar et M. Brahamia Hacène.

Je ne terminerais pas ces remerciements sans avoir une pensée pour les personnes sur qui j'ai pu compter: Hayet, Nour, Myou, Seif, Mahmoud, sans oublier ma sœur mina et mes adorables cousins : Yanis, Maya, Michou, Nassim, Malik et Lamia.

Résumé

Douze populations naturelles du complexe *N. tazetta* L. d'Algérie (10), d'Italie (1) et de France (1) ont été étudiées pour leurs nombres chromosomiques, leur taille du génome et du point de vue cytogénétique. La coloration à la chromomycine A₃ a été utilisée pour la détection des régions d'ADN riches en GC, l'hybridation *in situ* (FISH) pour la cartographie physique des gènes 35S et 5S et la cytométrie en flux pour l'évaluation de la taille du génome. Les populations étudiées présentent des différences dans le nombre chromosomique et les conditions écologiques. Neuf populations ont un nombre chromosomique de $2n=2x=20$ ($x=10$) et trois populations algériennes ont un nombre constant de $2n=2x=18$. C'est la première fois qu'on constate ce nombre chromosomique au sein du complexe *N. tazetta* plus connu généralement avec le nombre $2n=20$. La coloration à la chromomycine et la FISH révèlent une variabilité dans le nombre et l'intensité des bandes CMA positifs et des signaux 35S et 5S selon le cytotype et la présence ou l'absence de chromosomes B. La taille du génome varie de $2C = 25,56$ pg à $2C = 28,67$ pg pour les populations à $2n=20$ et de $25,69$ à $27,72$ pg pour les populations à $2n=18$. La différence entre la valeur moyenne chez le cytotype à $2n=20$ ($26,7$ pg) est négligeable par rapport à celui à $2n=18$ ($26,6$ pg). La présente étude nous a conduit à émettre l'hypothèse de l'existence d'un nouveau nombre secondaire de base $x=10-1=9$ généré suite aux réarrangements chromosomiques du cytotype à $2n=20$. Cette analyse combinée à une étude biométrique nous a amené à proposer la description d'une nouvelle espèce: *Narcissus bellirius spec. nov.* au sein du genre *Narcissus* L.

Mots clés : Caryotype, réarrangements chromosomiques, taille du génome, heterochromatine, *Narcissus tazetta*, cartographie physique des rDNA, nouvelle espèce.

Abstract

Twelve populations of the wild *N. tazetta* L. complex from Algeria (10), Italy (1) and France (1) were investigated for their chromosome number, genome size and from the cytogenetic point of view. Fluorochrom banding were used for detection of GC-rich DNA regions, fluorescnet *in situ* hybridization (FISH) for physical mapping of 35S and 5S rRNA genes and flow cytometry for genome size assessment. The investigated populations exhibit variation in chromosome number and different ecological properties. Nine populations have a chromosome number of $2n=2x=20$ ($x=10$) and three Algerian populations have a constant chromosome number of $2n=2x=18$. This is the first finding of cytotype $2n=18$ in *N. tazetta* complex which generally present $2n=20$. Fluorochrome banding and FISH revealed variability in the number and intensity of CMA positive bands (CMA⁺) and rDNA signals depending on cytotype and presence or absence of B chromosomes. Genome size ranged from $2C=25.56$ pg to $2C= 28.67$ pg for $2n=20$ and from 25.69 to 27.72 pg for $2n=18$. The difference of the mean value between the two cytotypes is insignificant: $2n=20$ (26.7 pg) versus $2n=18$ (26.6 pg). The present study lead us to hypothesize the existence of a new secondary basic number $x=10-1=9$ that would have arisen further to chromosomal rearrangements on the $2n=20$ cytotype. This analysis combined with a biometric study led us to propose a description of a new species: *Narcissus bellirius spec. nov.* within the genus *Narcissus* L.

Key-words: Karyotype, chromosomal rearrangements, genome size, heterochromatin, *Narcissus tazetta*, rDNA physical mapping, new species.

ملخص:

تم التحقيق في اثني عشر من شعوب تنتمي إلى صنف *N. tazetta* (10 منهم من الجزائر، واحدة من إيطاليا، وواحدة من فرنسا). من حيث عدد الصبغيات، حجم الجينوم و من حيث الوراثة الخلوية، حيث تم استخدام الملون *chromomycine* لكشف النطاقات الغنية بالقواعد GC، التهجين الداخلي باستعمال التفلور لكشف الخرائط الفيزيائية للجينات RNA و التدفق الخلوي لتقييم حجم الجينوم. الشعوب التي تمت دراستها تظهر اختلاف في عدد الصبغيات و الخصائص البيئية.

تسعة شعوب تحتوي عدد الصبغيات $2n=20$ ($x=10$) و ثلاثة من أصل جزائري تحتوي على عدد ثابت $2n=18$

تم الكشف عن تنوع في عدد و شدة الأشرطة الإيجابية CMA و موقع DNA حسب الشعوب و كذلك حسب وجود أو عدم وجود الصبغيات B. تراوح حجم الجينوم من $2C=25,56Pg$ و $2C=28,67Pg$ لـ $2n=20$ ومن بين $25,69Pg$ حتى $27,72$ لـ $2n=18$. هذه الدراسة أدت بنا إلى افتراض وجود عدد أساسي ثانوي جديد $x=10-1=9$ نشأ من إعادة هيكلة الكروموزومات للشعوب ذات $n=20$. هذا التحليل جانبا إلى دراسة بيومترية قادنا على وصف صنف جديد: *N. bellirius spec.nov*

الكلمات المفتاحية:

إعادة هيكلة الكروموزومات، حجم الجينوم، الكروماتين المغاير، *Narcissus tazetta* النمط النووي للجينات rDNA، صنف جديد

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. Le genre <i>Narcissus</i> L.	4
1.1 Classification	4
1.2 Evolution du genre	6
2. Le complexe <i>N. tazetta</i> L	6
2.1. Présentation du complexe <i>N. tazetta</i> L	6
2.2. Caractères morphologiques du complexe <i>N. tazetta</i> L	7
2.3. Polymorphisme caryologique du complexe <i>N. tazetta</i> L	9
3. Les chromosomes B	9
4. Les gènes ribosomiques.....	10
5. La taille du génome	10
Chapitre II : Etude cytogénétique classique et moléculaire et évaluation de la taille du génome	12
1. Matériel et méthodes	12
1.1. Matériel	12
1.2. Méthode	15
1.2.1 Méthodes de cytogénétique classique	15
1.2.2 Méthodes de cytogénétique moléculaire	17
1.2.3 Coloration au nitrate d'argent	23
1.2.4 Cytométrie en flux	24
2. Résultats	26

2.1. Analyse cytogénétique classique	26
2.2. Analyse cytogénétique moléculaire	32
2.2.1 Distribution de l'hétérochromatine révélée par CMA banding et DAPI après FISH.....	32
2.2.2 Cartographie des gènes ribosomiques 35S et 5S.....	33
2.3. Nombre de nucléoles.....	34
2.4. Evaluation de la taille du génome par cytométrie en flux	39
3. Discussion générale.....	40
3.1. Nombres chromosomiques et variation du caryotype.....	40
3.2. Distribution de l'hétérochromatine et des gènes ribosomiques.....	42
3.3. Activité des NORs	44
3.4. Chromosome B	46
3.5. Taille du génome	46
Chapitre III: <i>Narcissus tazetta</i> (Amaryllidaceae) and related species in the Algerian Tell:	
<i>Narcissus bellirius spec. nov</i>	48
Introduction	51
1. The <i>Narcissus</i> center of dispersal.....	51
2. Taxonomic uncertainties.....	53
3. The Tazette <i>Narcissus</i>	53
4. <i>Narcissus tazetta</i> in Algeria.....	58
5. Taxonomy.....	61
Conclusion.....	66

Conclusion générale et perspectives.....68

Références bibliographiques.....70

Annexes

Liste des figures

Figure 1: Photographies représentant le polymorphisme de la fleur chez le complexe <i>N. tazetta</i> L. en Algérie.....	8
Figure 2 : Zones de récolte de toutes les populations étudiées.....	14
Figure 3 : Points de prélèvement des populations Algériennes.....	14
Figure 4 : Principe de l'hybridation <i>in situ</i> par fluorescence (FISH)	19
Figure 5 : Caryotype du cytotype à $2n=20$	28
Figure 6: Caryotype du cytotype à $2n=18$	29
Figure 7: Coloration à la chromomycine A_3 (jaune), DAPI après FISH (bleu), cartographie des gènes ribosomiques 5S (vert) et 35S (rouge) et idiogramme du cytotype à $2n=20$	35
Figure 8: Coloration à la chromomycine A_3 (jaune), DAPI après FISH (bleu), cartographie des gènes ribosomiques 5S (vert) et 35S (rouge) et idiogramme du cytotype à $2n=18$	36
Figure 9 : Coloration des nucléoles au nitrate d'argent et leurs nombre par noyaux	38
Figure 10: Hypothèse sur l'évolution du nouveau nombre de base au sein du complexe <i>N. tazetta</i> L. <i>s.l</i> impliquant les paires 3, 8 et 10 du cytotype à $2n=20$ et les paires 1 et 7 du cytotype à $2n=18$	45

Liste des tableaux

Tableau 1 : Origine géographique altitude et habitat des populations étudiées pour la taille du génome et la cytogénétique	12
Tableau 2 : Composition de la mixture de sonde pour la double hybridation <i>in situ</i>	21
Tableau 3 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission correspondant à chaque fluorochrome	23
Tableau 4 : Données morphométriques du cytotype à $2n=20$	30
Tableau 5 : Données morphométriques du cytotype à $2n=18$	31
Tableau 6 : Synthèse de la caractérisation cytogénétique chez toutes les populations et nombre de nucléoles chez cinq populations de <i>N. tazetta</i>	37
Tableau 7 : Nombres chromosomiques et taille du génome des populations étudiées.....	39

Liste des abréviations

- BamH1: produite par *Bacillus amyloliquefaciens*.nSite de reconnaissance:
5'GGATCC-3'
- BSA: Bovin Serum Albumin
- CMA₃: Chromomycine A3
- CMF: Cytométrie en Flux
- 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
- Pg : picogramme

Introduction générale

Narcissus L. (Amaryllidaceae) est un genre d'environ 80 espèces (Mathew, 2002) à distribution exclusivement méditerranéenne, dont le centre d'origine et de diversité se situe principalement dans la région du sud de l'Espagne et l'Afrique du Nord (Fernandes, 1951).

Les espèces du genre peuplent essentiellement quatre types d'habitats. Les fentes des rochers des montagnes et les prairies des régions montagneuses, caractérisent principalement les formes diploïdes, tandis que les prairies des régions plaines et les prairies et sables des régions côtières caractérisent surtout les formes polyploïdes (Fernandes, 1951).

L'intérêt considérable que l'homme a porté aux Narcisses, a finalement conduit à la description de plus de 27.000 variétés cultivées (Kington, 1989), provenant principalement de *Narcissus poeticus* L., *N. pseudonarcissus* L. et *N. tazetta* L. (Wylie, 1952; Brandham et Kirton, 1993). Ce sont des espèces économiquement importantes à travers le monde. En effet au delà de leur intérêt horticole, les espèces du genre ont un intérêt pharmacologique considérable car elles ont la faculté de produire des métabolites secondaires dont les galanthamines qui auraient des applications dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Hanks, 2002).

Le genre *Narcissus* présente beaucoup de difficultés taxonomiques souvent liées aux faibles barrières reproductrices entraînant ainsi la formation d'hybrides naturels entre des espèces appartenant à la même section ou à des sections différentes. Selon Marques et al. (2007, 2011), les phénomènes d'hybridations naturelles au sein du genre sont à l'origine des réarrangements chromosomiques, de ploïdie et de variations dans la taille du génome.

La multiplication végétative par divisions des bulbes est le mode de reproduction le plus fréquent chez les Narcisses, d'où le développement de la floriculture et la facilité de

croisements entre espèces (y compris éloignées) en culture générant des graines parfois fertiles. L'origine hybride du *N. biflorus* Curtis, plante stérile mais abondamment cultivée, a été démontrée (De Dominicis *et al.* 2002).

Narcissus tazetta L. *s.l* est une des espèces les plus importantes du genre, elle occupe une aire géographique assez vaste, s'étendant de part et d'autre de la méditerranée, en allant des régions littorales du Portugal jusqu'à la péninsule ibérique et la Grèce, et de l'Afrique du nord jusqu'en Syrie et en Asie mineure. Sa distribution s'étend jusqu'aux îles canaries à l'Ouest et jusqu'en Perse, en Chine et au Japon à l'Est, où elle a été probablement anciennement introduite et où elle était devenue subspontanée (Fernandes, 1951).

Narcissus tazetta L. est considéré comme un tétraploïde ne présentant que des bivalents en méiose et un nombre de base $x=10$ (Fernandes 1950; Wylie 1952; Brandham et Kirton 1987; De Dominicis *et al.* 2002). Le nombre de base ancestrale est $p=5$ (p selon Peruzzi 2013). On pourrait le considérer comme un polyploïde complètement diploïdisé.

Le nombre de chromosomes, le niveau de ploïdie et la taille du génome (ou la quantité totale d'ADN) jouent un rôle important dans l'étude de la biodiversité et de la systématique.

La cytogénétique moléculaire demeure à son tour un excellent outil pour l'identification et l'étude de l'évolution des chromosomes. Chez les eucaryotes, les gènes ribosomiques ARNr sont les marqueurs chromosomiques les plus largement utilisés.

Dans ce travail, nous avons étudié des populations de *N. tazetta* du sud de la France, d'Italie et principalement d'Algérie, où nous avons détecté des populations qui se distinguent par un nombre chromosomique et des conditions écologiques différentes par rapport à la majorité des populations étudiées. Deux questions principales ont été abordées: quel est le niveau de différenciation chromosomique entre les deux cytotypes observés au

sein des populations algériennes, et pourrions-nous considérer ces cytotypes en tant que deux entités taxonomiques?

Pour répondre à ces questions, nous avons entrepris la caractérisation cytogénétique de 12 populations de *N. tazetta* par:

- 1) le dénombrement chromosomique par les techniques classiques;
- 2) la caractérisation de l'hétérochromatine par coloration à la chromomycine;
- 3) la cartographie physique des gènes ribosomiques 5S et 35S par double hybridation *in situ* ;
- 4) l'évaluation de la quantité d'ADN par cytométrie en flux.

Nous avons effectué en parallèle à cette étude une analyse biométrique sur l'ensemble de trois populations Algériennes appartenant aux deux cytotypes du complexe *N. tazetta*. Cette analyse combinée à la première nous ont permis de décrire une nouvelle espèce.

Le manuscrit que nous présentons comprend trois chapitres, le premier portera sur une synthèse bibliographique dans laquelle nous aborderons d'une manière générale ce qui se rapporte au genre *Narcissus* et plus particulièrement au complexe *N. tazetta*, nous parlerons également des outils de cytogénétique qui se rapportent à cette étude. Le deuxième chapitre concerne principalement une étude cytogénétique classique et moléculaire et une analyse de la taille du génome, il comprend la partie matériel et méthodes dans laquelle nous présenterons le matériel végétal étudié et les différentes techniques réalisées sur ce matériel, la partie des résultats obtenus suite à cette étude et enfin la partie discussion ou nous discuterons ces mêmes résultats en les comparant avec ceux de la littérature.

Dans le troisième chapitre nous proposerons la description d'une nouvelle espèce : *Narcissus bellirius spec. nov.* basée sur une étude biométrique.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Le genre *Narcissus* L.

1.1. Classification

Le genre *Narcissus* L. présente beaucoup de difficultés taxonomiques et controverses nomenclaturales principalement dues aux faibles barrières reproductrices conduisant à l'hybridation naturelle entre des espèces proches comme est le cas du *N. obsoletus* (Haw.) Steud., un hybride entre *N. serotinus* L. et *N. elegans* (Haw.) Spach., ou éloignées comme le *N. biflorus*, un hybride entre *N. tazetta* et *N. poeticus*. La naturalisation suite à l'introduction d'espèces cultivées dans le bassin Ouest Méditerranéen constitue une autre difficulté quant à l'établissement de la distribution géographique du genre ou il devient difficile de distinguer entre les espèces spontanées et les cultivars naturalisés (Fernandes, 1968 ; Webb, 1980). La grande variabilité phénotypique entre les individus d'une même espèce souvent, due, à la présence de plusieurs niveaux de ploïdie au sein d'une même population, compliquent la taxonomie de ce genre. C'est le cas des sections ayant des séries polyploïdes tels que *Bulbocodium*, *Pseudonarcissus*, *Hermione* et *Serotinii*. Cette variabilité a également été observée chez des espèces où la polyploïdie n'a pas été signalée (Fernandes, 1968).

Les subdivisions du genre demeurent donc incertaines dans la mesure où de nombreux taxons sont inclus dans des sous genres et des sections distinctes selon les auteurs qui, en outre, retiennent un nombre variable de sous genres (2 ou 3) et de sections.

Ainsi, Fernandes (1968) et Blanchard (1990) ont divisé le genre en deux sous-genres *Narcissus* L. et *Hermione* (Haw.) Spach., et 10 sections. Le sous-genre *Narcissus* regroupe sept sections : *Apodanthi* A. Fernandes, *Tapeinanthus* Traub, *Ganymedes* (Haw.) Schult. f., *Bulbocodium* DC., *Pseudonarcissus* DC., *Narcissus* et *Jonquilla* DC. Cette

dernière comprends les deux sous-sections : *Jonquilla* et *Juncifolii* A. Fernandes. Le sous-genre *Hermione* est constitué de trois sections : *Serotini* Parl., *Aurelia* (J.Gay) Bak. et *Hermione*. Cette dernière est subdivisée en deux sous-sections : *Angustifolii* A. Fernandes et *Hermione*. La sous-section *Hermione* regroupe les trois séries : *Hermione*, *Albiflorae* Rouy. et *Luteiflorae* Rouy.

Webb (1980) a regroupé les espèces du genre en 7 sections, en revanche, la classification qu'il a proposée a porté uniquement sur la flore d'Europe.

Mathew (2002) propose une classification principalement basée sur les travaux de Fernandes (1968) et Webb (1980). Il a divisé le genre en trois sous-genres : *Narcissus* L., *Hermione* (Salisbury) Spach, *Corbularia* (Salisb.) Pax. et 7 sections. Le sous genre *Narcissus* est divisée en cinq sections : *Narcissus*, *Pseudonarcissus* DC., *Ganymedes* Salisbury ex Schultes and Schultes fil., *Tapeinanthus* (Herbert) Traub et *Jonquillae* De Candolle, cette dernière comprends trois sous-sections : *Jonquillae*, *Apodanthi* (A. Fernandes) D.A. Webb et *Chloranthi* D.A. Webb. Le sous-genre *Hermione* est divisée en deux sections : la section *Aurelia* (J. Gay) Baker et la section *Hermione*, cette dernière comprends trois sous-sections : *Angustifolii* (A. Fernandes) F.J. Fernández Casas, *Serotini* Parlatores et *Hermione*. La sous-section *Hermione* regroupe les deux séries *Hermione* et *Albiflorae* Rouy.

La classification la plus récente est celle proposée par Zonneveld (2008) dans laquelle il distingue 11 sections réparties en deux sous genre : *Hermione* (Haw.) Spach. et *Narcissus* L. Le sous genre *Hermione* regroupe deux sections : *Serotini* Parlatores et *Tazettae* DC. Le sous genre *Narcissus* est divisé en 9 sections : *Bulbocodii* DC., *Ganymedes* Schultes & Schultes, *Juncifolii* (A. Fern.) Zonn. stat. nov., *Tapeinanthus* Traub, *Apodanthi* Fernandes, *jonquillae* DC., *Pseudonarcissi* DC., *Nevadensis* Zonn. sect. nov. et *Narcissus* L.

Les délimitations spécifiques au sein du genre diffèrent également selon les auteurs. En effet, le genre compte, entre 30 et 60 selon les auteurs Mabberley (1997), Meerow & Snijman (1998) et Zonneveld (2008) ; et entre 70 et 80 espèces selon Blanchard (1990) et Mathew (2002).

1.2. Evolution du genre

L'évolution du genre a eu lieu suivant un certain nombre de mécanismes tels que les mutations de gènes, les réarrangements chromosomiques, la polyploïdie, l'hybridation interspécifiques etc. Ces mécanismes ont agit seuls ou s'associant entre eux pour engendrer de nouveaux taxons. En effet, le mécanisme de réarrangement chromosomique est à l'origine de la formation des deux nombres de base primaires des deux sous genres *Narcissus* ($x=7$) et *Hermione* ($x=5$) à partir de l'ancêtre du genre qui serait une plante à $x=6$ et qui, suite à une translocation réciproque a engendré les deux nombres $x=5$ et $x=7$. Une hybridation entre des formes à $x=5$ avec leur ancêtre, a donné naissance au nombre secondaire $x=11$, engendrant ainsi 11 taxons à $2n=22$ (Fedorov 1969). Le deuxième nombre secondaire, $x=13$ est apparu suite à une translocation accompagnée d'élimination d'un centromère sur une forme tétraploïde de *N.bulbocodium* ($x=7$), engendrant ainsi les diploïdes et triploïdes de l'espèce *N. obesus* Salisb. (Fernandes, 1951, 1967, 1975).

2. Le complexe *N. tazetta* L.

2.1. Présentation du complexe *N. tazetta* L.

Narcissus tazetta appartient à la section *Tazettae* (sous genre *Hermione*) et constitue une des espèces les plus répandues du genre. En effet, elle pousse dans la majorité des pays de la Méditerranée à différentes altitudes, du niveau de la mer jusqu'à 1500 m, allant de la partie atlantique de la péninsule ibérique jusqu'au Moyen-Orient (Fernandes, 1951).

C'est une espèce très polymorphe (Fig. 1), en effet, on y distingue 7 sous espèces et 3 variétés en Afrique du Nord (Maire, 1952) et 3 sous espèces (ssp. *Pachybolbus* (Dur.) Baker, ssp. *Italicus* (Ker-Gawl.) Baker et ssp. *Bertolonii* (Parl.) Baker), distribué dans tout le Tell en Algérie selon Quézel et Santa (1962) ou elle est très appréciée par la population et est d'ailleurs abondamment récoltée et vendue sur les marchés.

2.2. Caractères morphologiques du complexe *N. tazetta* L.

Selon Maire (1959), *N. tazetta* est une plante herbacée verte ou plus ou moins glauque, glabre et synanthiée, a bulbe ovoïde ou subglobuleux (2,5 à 7 cm de diamètre) vêtu de tuniques membraneuses brunes, portant une tige florifère plus ou moins comprimée, striée, lisse et entourée à la base, ainsi que les feuilles de 2 à 3 gaines. Les feuilles sont au nombre de 3 à 6, planes, linéaires, plus ou moins obtuses, plus ou moins canaliculées sur la face interne, carénées sur la face externe, lisses, multinerviées, atteignant 80 cm. L'inflorescence compte de 3 à 20 fleurs obliques, horizontales ou même plus ou moins nutantes portées par des pédoncules grêles, lisses, inégaux, pouvant atteindre 6 cm ; avec une spathe membraneuse, plurinerviée, brièvement tubuleuse à la base, largement lancéolée et dressée, atteignant 6 cm longueur, blanchâtre ou brunâtre. Le périanthe est ordinairement très odorant, blanc ou jaune, ou bicolore et le tube est cylindrique, souvent verdâtre, pouvant atteindre 2 cm de longueur; les divisions sont étalées en étoile, inférieur ou égales au tube, ovales ou obovales, multinerviées, les externes plus larges que les internes, toutes ordinairement plus ou moins apiculées avec une paracorolle cupuliforme, courte (4 à 5 mm). La fleur compte 6 étamines, inégales, à filets très courts, filiformes, les 3 inférieures sont incluses dans le tube et les 3 supérieures insérées sur la gorge de celui-ci ; les anthères sont de couleur jaune; le style plus ou moins long (fleurs souvent hétérostylées) porte un stigmate peu renflé, brièvement trilobé. Graines noires,

irrégulièrement ovées ou obovées, anguleuses, un peu luisantes, à tégument irrégulièrement plissé.



Figure 1 : Photographies représentant le polymorphisme de la fleur chez le complexe *N. tazetta* L. en Algérie. (Boukhenane, 2013)

A : population 4 (Djebel Ancel, Guelma) ; B : population 2 (Mila) ;

C : population 3 (Amamcha, Sétif) ; D : population 1 (Djebel Ouahch, Constantine) ; E : population 8 (Djebel Ouahch, Constantine)

2.3. Polymorphisme caryologique du complexe *N. tazetta* L.

En plus de son polymorphisme morphologique, *N. tazetta* est caractérisée par un polymorphisme caryologique considérable. En effet, cette espèce présente des formes spontanées ou horticoles pouvant être, diploïdes, triploïdes ou encore aneuploïdes. Plusieurs nombres chromosomiques ont été rapportés pour cette espèce, $2n=14$ (Sharma & Sharma, 1961), $2n=20$ (Nagao, 1929 ; Maugini, 1953 ; Weitz & Feinbrun, 1972 ; Hong, 1982 ; Brandham & Kirton, 1987 ; De dominicis et al., 2002 ; Aquaro et al., 2008 ; Jinghua et al., 2008), $2n=21$ (Nagao, 1933 ; Fernandes, 1934), $2n=22$ (Nagao, 1929 ; Fernandes, 1934 ; Maugini, 1952, 1953 ; Brandham & Kirton, 1987 et De dominicis et al., 2002), $2n=24$ et $2n=28$ (Sharma & Sharma, 1961), $2n=30$ (Nagao, 1933, Fernandes, 1934, Sharma & Sharma, 1961 ; Weitz & Feinbrun, 1972 et Karihaloo, 1987), $2n=31$ (Nagao, 1933) et $2n=32$ (Nagao, 1929 et Sharma & Sharma, 1961).

3. Les chromosomes B

Caractérisés par un comportement non ségrégationnelle et par la présence de barrières de recombinaison avec les chromosomes A, ces chromosomes surnuméraires d'origine inconnue, ont leur propre voie évolutive. Ils sont l'une des principales sources de diversité génétique, de la variation intraspécifique de la taille du génome et du polymorphisme structurelle dans les populations naturelles (Camacho et al 2000; Jones et Houben 2003; Muratovic et al 2005; Jones et al. 2008). Certains auteurs ont suggéré l'inertie génétique mais pas fonctionnelle des chromosomes B dans les plantes, car il a été démontré que lorsque les chromosomes B sont présents en grand nombre, ils manifestent des effets néfastes sur la fertilité de la plante et la fréquence du crossing-over (Carchilan et Houben 2007; Jones et al. 2008), mais que les plantes qui ont des chromosomes B ont parfois une plus grande capacité à survivre que celles qui n'ont en pas (Jones, 1995), probablement

grâce aux gènes qu'ils possèdent. Cependant, la présence de gènes ribosomiques actifs sur les chromosomes B dans de nombreuses plantes (Jones 1995; Camacho et al 2000; Carchilan et Houben 2007; Muratović et al 2006; Pustahija 2011; Robert et al 2011) est en contradiction avec la suggestion sur leurs inertie génétique.

Les chromosomes B sont répandus au sein du genre *Narcissus*, principalement dans les variétés horticoles et leurs nombres varie de un jusqu'à un maximum de cinq (Fernandes 1952; Wylie 1952; Brandham and Kirton 1987; Takhtajan 1990; Zonneveld 2008).

4. Les gènes ribosomiques

Organisés en deux familles de gènes distinctes chez les eucaryotes, les 35S souvent associés aux régions des organisateurs nucléolaires (NORs) et les 5S, sont des ADN ribosomiques se présentant sous forme de séquences répétées en tandem sur un ou plusieurs sites chromosomiques différents. Grâce à leurs copies hautement répétées, la détection du nombre de gènes ARNr est hautement reproductible et fournit des informations intéressantes sur l'évolution chromosomique. Le nombre de copies et la distribution des chromosomes des ADNr peuvent changer rapidement et leur transposition et dispersion dans le génome des plantes est fréquemment observé (Schubert et Wobus 1985; Raskina et al 2004; Datson et Murray 2006). Ces réarrangements sont généralement corrélés avec des phénomènes de différenciation des espèces et de spéciation (Siljak-Yakovlev et al. 2014).

5. La taille du génome

L'évaluation de la taille du génome et le nombre de chromosomes permet dans plusieurs complexes d'espèces, de détecter l'existence de différents niveaux de ploïdie, des processus d'hybridation ou des phénomènes de dysploïdy. L'étude de plusieurs populations d'une seule espèce est très utile car elle peut révéler différents niveaux de ploïdie au sein de

la même espèce (Siljak-Yakovlev et al., 2010). La cytométrie en flux est une excellente méthode pour l'estimation de la taille génome chez les plantes, car elle est rapide, précise et permet de détecter de petites différences dans le contenu de l'ADN (Doležel et Bartoš 2005; Suda et al 2007; Siljak-Yakovlev et al 2008; Siljak-Yakovlev et al., 2010). Les relations entre les paramètres environnementaux (l'altitude, la latitude, le gel ou la résistance à la sécheresse et la pollution par les métaux lourds), le niveau de ploïdie, les relations phylogénétiques et la taille du génome ont également été décrites (Cerbah et al 2001; Knight et Ackerly 2002; Gregory 2005; Hidalgo et al 2008; Vidic et al 2009; Romo et al 2013). Cependant, malgré son importance, la taille du génome a été estimée pour seulement ~ 1,8% de tous les angiospermes (Bennett et Leitch 2011).

Chapitre II : étude cytogénétique classique et moléculaire et évaluation de la taille du génome

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

Le matériel d'étude est constitué de 12 populations naturelles de *N. tazetta s.l.*, récoltées en Algérie (10 populations) (Figs.2, 3), dans le Sud de la France (une population) et en Italie (une population) (Fig.2) à différentes altitudes allant du niveau de la mer jusqu'en hautes montagnes et dans différentes conditions écologiques. Trois à six individus ont été récoltés pour chaque population.

L'origine géographique de chaque population et les principales caractéristiques de leurs habitats sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Origine géographique, altitude et habitat des populations étudiées pour la taille du génome et la cytogénétique.

Numéro des populations	Population/ accession	Origine	Habitat	Alt. (m)
1	Alg-DjO1	Tafrent, Djebel Ouahch, Constantine, Algérie.	Prairie très humide	842
2	Alg-Mila	Mila, Algérie.	Prairie humide	258
3	Alg-Am	Amamcha, Setif, Algérie.	Prairie humide	1199
4	Alg-DjA	Djebel Ancel, Guelma, Algérie.	Prairie humide avec d'autres plantes bulbeuses (<i>Bellevalia</i> , ...)	828
5	Alg-RA1	Ras el Akba, Guelma, Algérie.	Paturage avec d'autres plantes bulbeuses (<i>Colchicum</i> , <i>Bellevalia</i> ,	870

			<i>Muscari</i>) sous des amandiers (<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A.Webb)	
6	Alg-OF	Oueled Fayet, Alger, Algérie.	Talus de route	150
7	Alg-BH	Beni H' midene, Mila, Algérie.	Prairie humide	500
8	Alg-Dj O2	Djebel Ouahch, Constantine, Algérie.	Sous-bois d' <i>Ampelodesmos</i> <i>mauritanicus</i> (Poir.) T.Durand et Schinz avec <i>Calicotome spinosa</i> (L.) Link et <i>Pinus halepensis</i> Mill.	1070
9	Alg-Dj O4	Djebel Ouahch, Constantine, Algérie.	Broussailles extensives d' <i>Ampelodesmos</i> <i>mauritanicus</i> .	960
10	Alg- DO5	Tafrent, Djebel Ouahch, Constantine, Algérie.	Pente pâturée pleine de chamaephytes.	1065
11	It-Ligurie	Prés de Gêne, Ligurie, Italie.	Prairie méditerranéenne thermophile et rocailleuse.	500
12	Ga-Crau	Crau, Bouches-du- Rhône, France.	Fossés humides avec <i>Salix</i> sp. pl., <i>Populus alba</i> L., <i>P.</i> <i>nigra</i> L. et <i>Fraxinus</i> <i>angustifolia</i> Vahl	3



Figure 2 : Zones de récolte de toutes les populations étudiées



Figure 3 : Points de prélèvement des populations Algériennes.

1.2. Méthodes

1.2.1. Méthodes de cytogénétique classique

- *Prélèvement et Prétraitement*

Le prélèvement des racines a lieu au moment où le pourcentage de cellules en division (l'index mitotique) est élevé, pour cela, il a fallu faire plusieurs essais pour déterminer l'heure de prélèvement appropriée durant la journée. Cette dernière se situe entre 12h et 13h30. Une fois prélevées, le prétraitement des racines dont la longueur est comprise entre 1 et 1.5 cm se fait dans un agent mitoclasique qui permet de bloquer les divisions cellulaires au stade métaphase. Le choix de ce dernier dépend de l'espèce étudiée, dans le cas des narcisses, la colchicine à 0,05% (Annexe 1) pendant 5h à température ambiante a été le plus approprié.

- *Fixation et conservation*

La fixation des racines a pour effet de bloquer l'évolution des divisions cellulaires après prétraitement. Elle se fait dans le Carnoy I [3:1 (v/v) éthanol: acide acétique] fraîchement préparé pendant au moins 24 heures à 4°C. Les racines peuvent ensuite être conservées dans l'éthanol à 70% à 4°C pendant plusieurs mois.

- *Hydrolyse chimique*

L'hydrolyse des apex racinaires se fait dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1N) à 60°C pendant 8 à 10 min. L'acide chlorhydrique permet de libérer les groupements aldéhydiques sur les molécules de sucre de l'ADN par destruction des liaisons entre les bases puriques et le désoxyribose.

- *Coloration et écrasement*

La coloration est réalisée suivant la méthode de Feulgen et Rossenbeck (1924). Après hydrolyse, les apex racinaires sont colorés au réactif de Schiff (Annexe 1) pendant 15 à 30 min à l'obscurité. Ce colorant se fixe sur les groupements aldéhydiques libérés lors de l'hydrolyse pour donner une coloration rouge aux chromosomes. L'écrasement des apex est ensuite réalisé entre lame et lamelle dans une goutte de carmin acétique à 1%.

- *Montage des lames*

Une fois les lamelles décollées selon la technique de Conger et Fairchild (1953), les lames sont séchées à l'air libre Durant 24h. Le montage définitif des préparations est ensuite réalisé dans une goutte de Depex.

- *Prise de photographies*

Les cellules dont les chromosomes sont bien étalés sont photographiées à l'aide d'un microscope Zeiss Axioscope doté d'une caméra à haute sensibilité (CCD). Le logiciel utilisé pour l'analyse des images est Axiovision.

- *Construction du caryotype*

Les mesures des bras long et des bras courts des chromosomes à partir de cinq plaques métaphasiques sélectionnées, appartenant à cinq individus différents ont été réalisées pour la construction du caryotype. La position du centromère et le type chromosomique ont été déterminés suivant Levan et al. (1964) en calculant le rapport (r) entre le bras long et le bras court et l'index centromérique (IC):

$$\text{IC}(\%) = 100 \times \text{bras court} / \text{longueur totale du chromosome}$$

L'asymétrie liée à la morphologie des chromosomes est estimée soit par calcul de l'indice d'asymétrie (IAs) selon Arano and Saito (1980) ou par calcul de la valeur

moyenne de l'asymétrie centromérique (Mca) selon Peruzzi and Eroglu (2013) et du coefficient de deviation de la longueur des chromosomes (CVcl) selon Paszko (2006):

$$\text{IAs (\%)} = 100 \times \frac{\sum_{i=1}^n \text{bras longs}}{\sum_{i=1}^n \text{longueur totale des chromosomes}}$$

$$\text{Mca} = \text{A} \times 100$$

[A = Moyenne (bras long-bras court) / (bras long+bras court) selon watanabe et al.

(1999)]

$$\text{CVcl} = \text{A2} \times 100$$

[A2 = Déviation standard / La longueur moyenne des chromosomes selon Zarco (1986)].

L'asymétrie liée à la taille des chromosomes est estimée par le rapport (R) entre la plus grande et la plus petite paire chromosomique.

1.2.2. Méthodes de cytogénétique moléculaire

Préparation des protoplastes

Les préparations chromosomiques obtenues à partir de cellules débarrassées de leurs parois pectocellulosique et du cytoplasme (protoplastes) sont utilisées suivant la méthode de Geber et Schweizer (1987) pour la réalisation du fluorochrome banding ainsi que pour la technique d'hybridation *in situ*. Les racines sont prétraitées et fixées selon le protocole décrit précédemment. Après rinçage des racines dans le tampon citrate à 0.01 M (Annexe 1) pendant 15min, les méristèmes sont digérés dans une mixture enzymatique RS [(4% cellulase RS (Yakult Honsha Co., Japan), 1% pectolyase Y-23 (Seishin, Co., Japan), 4% hemicellulase (Sigma, France)] (Annexe 1) en chambre humide à 37°C pendant 20 à 30 min selon leurs grosseurs, ensuite rincés à l'eau distillé pendant environ 10 min et dilacérés dans une goutte d'acide acétique à 45% fraîchement préparé. Les lames sont ensuite

portées au congélateur à -80°C. Après délamélation, les lames sont séchées à l'air libre. L'observation des préparations se fait au microscope à contraste de phase et les meilleures préparations sont conservées pour la réalisation du fluorochrome banding et l'hybridation *in situ*.

Fluorochrome banding

Le marquage des bases GC par coloration à la chromomycine A3 (CMA, Sigma) a été réalisé suivant le protocole de Schweizer (1976) avec quelques modifications par Siljak-yakovlev et al. (2002). Les lames sont d'abord incubées dans le tampon McIlvaine à pH=7 (Annexe 2) contenant du MgSO₄ à 0.005 M durant 15 min. Après élimination du tampon, les préparations sont colorées en déposant sur chaque lame 90 µl de chromomycine A3 (Annexe 2) durant 1h à l'obscurité. Une fois colorées, les préparations sont rincées avec le même tampon et les chromosomes subissent ensuite une contre coloration pendant 7 min à l'obscurité en immergeant les lames de vert de méthyle à 0,05% préparé dans le tampon McIlvaine à pH=5.5 (Annexe 2). Les préparations sont ensuite rincées avec le tampon McIlvaine à pH=5.5 après élimination du vert de méthyle, drainées et enfin montées dans une goutte de Citifluor AF2 (Agar scientific Ltd, UK).

Les préparations utilisées pour la coloration à la chromomycine sont décolorées pour être réutilisées dans la technique d'hybridation *in situ*. La décoloration s'effectue dans le Carnoy I, sous agitation, jusqu'à ce que les lames soient débarrassées des lamelles, suivie de trois lavages successifs pendant 3 minutes chacun, dans une série d'éthanol à 70%, 80% et 100% respectivement.

Hybridation in situ par fluorescence (FISH)

Une double hybridation *in situ*, en utilisant deux sondes d'ADN a été réalisée selon la technique de Heslop-Harrison et al. (1991) avec de légères modifications dans le but de

mettre en évidence la localisation des gènes ribosomiques 35S et 5S sur les chromosomes métaphasiques. Elle est basée sur l'utilisation de séquences d'ADN simple brin marquées par des fluorochromes appelées sondes. Ces dernières sont capables de reconnaître et de se fixer sur une séquence d'ADN complémentaire appelée cible, au sein d'une préparation chromosomique partiellement dénaturée générant ainsi un signal fluorescent correspondant à la position du gène ribosomique étudié. Un schéma représentatif du principe de la FISH est donné dans la Figure 4.

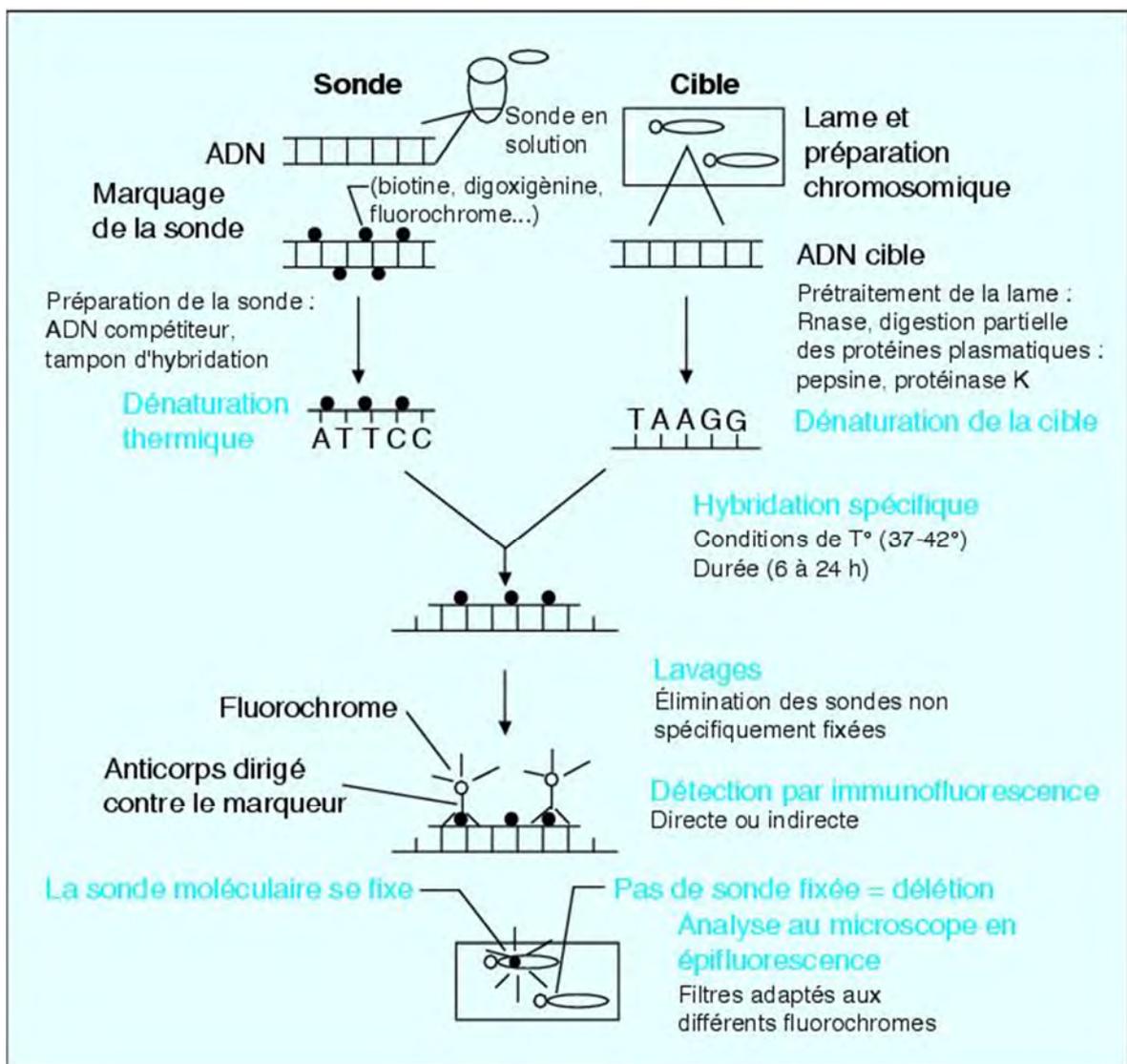


Figure 4 : Principe de l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH).

Source : <http://www.fmp-usmba.ac.ma/umvf/UMVFMiroir/campus-numeriques/campus-genetique-medicale/Enseignement/genchrom/Figure2.JPG>

La sonde utilisée pour détecter les loci 35S est un fragment *EcoRI* de 4 Kb contenant les séquences 18S-5.8S-26S d'*Arabidopsis thaliana*. La sonde est marquée par la technique de Nick-Translation utilisant un fluorochrome directe, la cyanine CY3 (Amersham, Courtaboeuf, France). La deuxième sonde utilisée pour détecter les loci 5S est un clone pTa794 (Gerlach and Dyer, 1980) contenant un fragment *BamHI* de 410 Kb de blé. Le marquage de la sonde est effectué par la technique de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) en utilisant le fluorochrome digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Meylan, France).

- *Préparations des chromosomes*

Les préparations chromosomiques subissent dans un premier temps un traitement à la Rnase (100µg/ml dans 2xSSC) à raison de 200µl par lame dans une chambre humide à 37°C pendant 1h. Les lames sont ensuite rincées deux fois successives, durant 5 min chacune, sous agitation lente dans le 2xSSC (Annexe 2), avant d'être incubées pendant 2 à 3 minutes et à température ambiante dans l'HCl 0,01N. Les préparations sont traitées dans un second temps à la pepsine (0,1 mg/ml dans HCl 0,01N à raison de 80 à 100µl par lame dans une chambre humide) à 37°C pendant 15 min. Les préparations sont finalement lavées sous agitation lente et à température ambiante avec le 2xSSC, deux fois successives pendant 5 min chacun, déshydratées dans trois bains d'alcool 70%, 90% et 100% pendant 3 minutes chacun et séchées à l'air libre pendant 1h.

- *Préparation de la mixture de sonde*

La composition de la mixture de sonde pour la double hybridation *in situ* est présentée dans le tableau 2.

- *Dénaturation de la sonde*

Une fois préparée, la mixture de sonde est portée au bain-marie à 75°C pendant 10 min, elle est ensuite immédiatement transférée dans la glace au moins 5 minutes afin d'éviter la renaturation de la sonde

- *Hybridation*

L'hybridation est réalisée en déposant sur chaque préparation 50µl de mixture de sonde, les lames sont ensuite placées dans des boites en plastique qui sont portées dans un premier temps dans un bain-marie à 72°C pendant 10 minutes dans le but de dénaturer les chromosomes et ensuite transférées dans un bain-marie à 55°C. Les lames sont finalement placées dans une chambre humide à 37°C durant toute une nuit.

Tableau 2 : Composition de la mixture de sonde pour la double hybridation *in situ*.

Composants	Concentration finale	Volume (µl) pour une lame
Formamide	50%	25
Dextran sulfate	10% W/V	10
SDS 10%	0,1% W/V	3
Sperme de saumon	250µl /mg	1,5
20X SSC		5
H2O pure		q.s.p
ADNr 18S		1
ADNr 5S		1,5
Volume final		50

q.s.p. quantité suffisante pour

- *Lavages de stringence*

Les lavages se font sous agitation douce, d'abord deux fois dans le 2xSSC pendant 3 minutes chacune à température ambiante, suivie de deux lavages successifs pendant 5 min chacun dans le 2xSSC à 42°C, deux lavages à 42°C pendant 5 min chacun dans le 0,1xSSC (Annexe 2) puis le 2xSSCT (Annexe 2), et enfin, un dernier lavage de 5 min dans le 4xSSCT (Annexe 2) à température ambiante.

- *Immuno-détection*

Les préparations sont d'abord traitées avec un tampon de détection BSA (Bovine Serum Albumin, 5% dans le 4xSSC) à raison de 100 µl par lame à l'obscurité pendant 5 min à température ambiante. L'excès de BSA sur les préparations est ensuite éliminé délicatement, pour y déposer la solution d'incubation (6 µl anti-digoxigénine dans 444 µl de BSA 5%) à raison de 50µl par lame et incuber à 37°C pendant une heure dans une chambre humide. Les lames sont ensuite rincées dans le tampon 4xSSC 3 fois successives à température ambiante pendant 5 min chacun sous agitation, séchées pendant quelques minutes sans les asséchées en les protégeant de la lumière. La contre coloration et le montage des lames s'effectuent dans un milieu de montage Vectashield contenant le DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories, UK). Les préparations sont finalement recouvertes d'une lamelle en verre et sont conservées à l'obscurité.

Observation et acquisition d'images

L'observation des préparations peut se faire directement après le montage entre lame et lamelle pour les deux techniques à l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot composé d'une série de filtres permettant une longueur d'onde d'excitation et d'émission correspondant à chaque fluorochrome utilisé (Tab. 3). La détection des signaux fluorescents est effectuée à l'aide d'une caméra CCD à haute sensibilité

(RETIGA 2000R, Princeton Instruments, Evry, France) combinée à un logiciel (Metavue, Evry, France) conçu pour l'acquisition des images. Trois images sont prises puis superposées pour chaque plaque métaphasique, la première correspond aux bandes DAPI (en bleu), la deuxième aux loci 35S (en rouge) et la troisième aux loci 5S (en vert).

Tableau 3 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission correspondant à chaque fluorochrome.

Fluochrome	Filtre	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
DAPI	01	365	> 397
35S	09	490	525
5S	15	540-560	540

1.2.3. Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent permet d'effectuer le dénombrement des nucléoles et de déterminer l'activité des NORs qui est liée à celle des gènes ribosomiques 35S. La méthode utilisée est celle de Howell et Black (1980). Les racines sont plongées dans une solution de nitrate d'argent (Ag NO_3) à 7.5% (pH=5.5) à 60°C durant toute une nuit, après 5 rinçages successives à l'eau distillée sous agitation afin d'éliminer le fixateur. Les racines sont ensuite transférées dans une solution de révélation : une mixture d'hydroquinone à 1% et de Formaldéhyde à 10% (V:V) pendant 15 min. les racines sont finalement rincées à l'eau distillée et écrasées entre lame et lamelle dans une goutte d'acide

acétique à 45% fraîchement préparée. Le dénombrement des nucléoles s'est effectué sur 100 cellules appartenant à trois individus différents de cinq populations (1, 2, 3, 4 et 8).

1.2.4. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Elle est basée sur l'analyse de signaux émis par des cellules en suspension coupant le faisceau lumineux d'un laser. Ces signaux optiques qui ont une intensité corrélée avec les propriétés cellulaires sont collectés par des photomultiplicateurs ou ils sont convertis en signaux électriques qui sont à leur tour convertis en signaux numériques par un convertisseur analogique-digital assimilables par l'ordinateur et ou ils peuvent être stockés. Les résultats sont présentés sur l'écran du cytomètre en flux sous forme d'histogrammes monoparamétriques ou biparamétriques. La quantité d'ADN est calculée par le rapport des intensités de la fluorescence des noyaux de l'échantillon et de celle d'une plante de référence dont la taille du génome est déjà connue selon l'équation suivante :

$$\text{Valeur } 2C \text{ échantillon (pg)} = \frac{\text{Intensité } 2C \text{ échantillon}}{\text{Intensité } 2C \text{ étalon}} \times \text{Valeur } 2C \text{ étalon}$$

La valeur 2C correspond à la quantité d'ADN total du lot diploïde d'un individu.

La cytométrie en flux a été réalisée suivant la méthode de Marie et Brown (1993) dans le but d'estimer la taille du génome de 2 à 6 individus dans toutes les populations étudiées. Les feuilles d'*Artemisia* utilisée comme étalon [2C = 11.43 pg (Garcia et al. 2006)] et de *Narcissus* sont finement coupées d'une manière à libérer les noyaux sans les abimer dans 600 µl de la solution tampon Galbreith (Galbreith et al., 1983) contenant 0,1% (m/v) de Triton X-100, 10 mM de métabisulfite de sodium et 1% de polyvinylpyrrolidone 10.000. La suspension est ensuite filtrée en utilisant une maille de nylon avec des pores de 48 µl traitée à l'ARNase (100 µg/ml) et colorée dans 50µg/ml d'un agent intercalant de l'ADN, l'Iodure de Propidium (IP) qui produit une fluorescence proportionnelle à la taille du

génome. Le cytomètre en flux utilisé est un Elite EPS (Beckman-Coulter, Roissy-France) utilisant le laser Argon   532 nm pour l'Iodure de Propidium   une intensité lumineuse de 20Mw.

2. Résultats

2.1. Analyse cytogénétique classique

La coloration au Feulgen a permis d'établir deux nombres chromosomiques différents pour *N.tazetta s.l.* En effet, les sept populations Algériennes (Alg-DjO1, Alg-Mila, Alg-DjA, Alg-Am, Alg-RA1, Alg-OF et Alg-BH), la population du sud de la France et celle d'Italie, présentent le nombre chromosomique $2n=2x=20$ (Fig. 5). Chez trois populations Algériennes (Alg-DjO2, Alg-DjO4, Alg-DjO5) on dénombre 18 chromosomes ($2n=2x=18$; Fig. 6).

L'analyse du caryotype à $2n=20$ a montré l'existence de deux types chromosomiques (Tab. 4, Fig. 5): submétacentrique et subtélocentrique. Cinq paires submétacentriques (3, 6, 8, 9 et 10) et cinq subtélocentriques (1, 2, 4, 5 et 7) dont la paire 7 porte un satellite. La formule chromosomique correspondante est la suivante :

$$2n = 2x = 20 = 10 \text{ sm} + 8 \text{ st} + 2 \text{ st-sat.}$$

Un chromosome B de type submétacentrique a été observé chez trois populations algériennes (1, 2 et 3). Sur 50 plaques appartenant à un seul individu observées pour chaque population, la fréquence des chromosomes B a été calculée. Elle est respectivement de 40,74%, 60 % et 48 % chez les trois populations. Sur cinq individus observés pour la population 1 et 3, le nombre d'individus contenant le chromosome B est respectivement 3 et 2 ; chez la population 2, deux individus sur six comportent un chromosome B. Chez les autres populations, la présence du chromosome B n'a pas été observée.

Pour le caryotype à $2n=18$ étudié dans trois populations algériennes (8, 9 et 10), on dénombre quatre paires submétacentriques (1, 6, 7 et 8) et cinq subtélocentriques (2, 3, 4, 5 et 9), parmi lesquelles la paire 9 porte un satellite (Tab. 5, Fig. 6).

La formule chromosomique pour ce caryotype est la suivante :

$$2n = 2x = 18 = 8 \text{ sm} + 8 \text{ st} + 2 \text{ st-sat.}$$

Chez la population 8, un chromosome B de type submétacentrique a également été observé dans trois individus sur cinq avec une fréquence de 66% calculée sur 50 plaques métaphasiques appartenant à un seul individu.

Les données morphométriques des deux caryotypes respectifs sont présentées dans les tableaux 4 et 5.

La longueur totale des chromosomes (LT) varie entre 3,09 et 8,67 μm dans le caryotype des populations à $2n=20$ et entre 3,2 et 8,75 μm chez les populations à $2n=18$. Les valeurs du rapport entre la plus grande et la plus petite paire chromosomique (R) et de la longueur totale du lot diploïde des chromosomes sont de 2,8 et 116,72 μm pour le premier caryotype et 2,73 et 112,78 μm pour le deuxième. Ces deux valeurs sont très proches. Les indexes d'asymétrie (AsI) sont très similaires entre les deux caryotypes ; 75,35% pour le premier et 76,5% pour le deuxième. La valeur moyenne de l'asymétrie centromérique (Mca) ainsi que le coefficient de variation de la longueur des chromosomes (CVcl) sont respectivement 50,68% et 37,5% pour le premier caryotype et 53,03% et 32,75% pour le deuxième. Le caryotype à $2n=18$ présente la valeur d'asymétrie intrachromosomale la plus élevée et la valeur interchromosomale la plus petite comparé caryotype à $2n=20$ (Tab. 4 et 5).

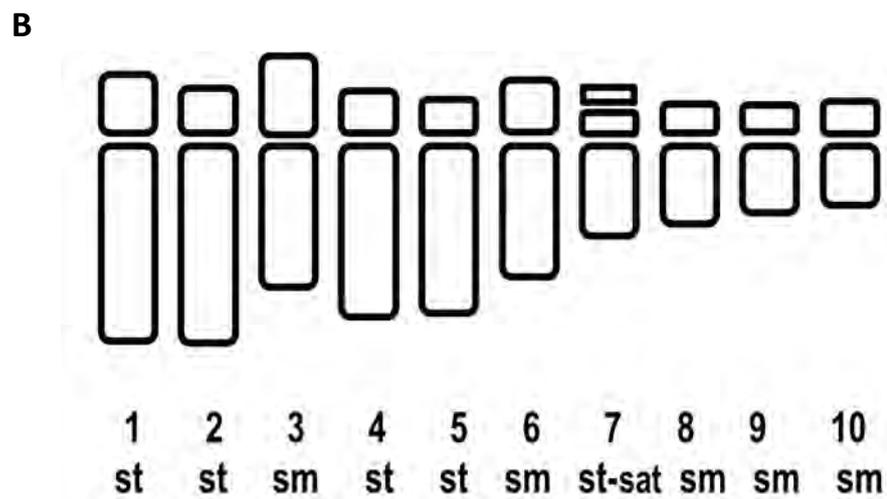
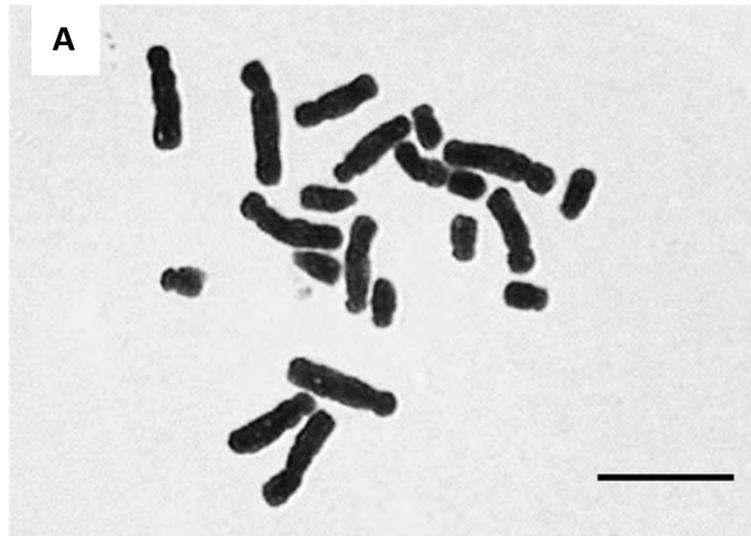


Figure 5 : Caryotype du cytotype à $2n=20$.

A : plaque métaphasique, B : idiogramme

Echelle=10 μ m

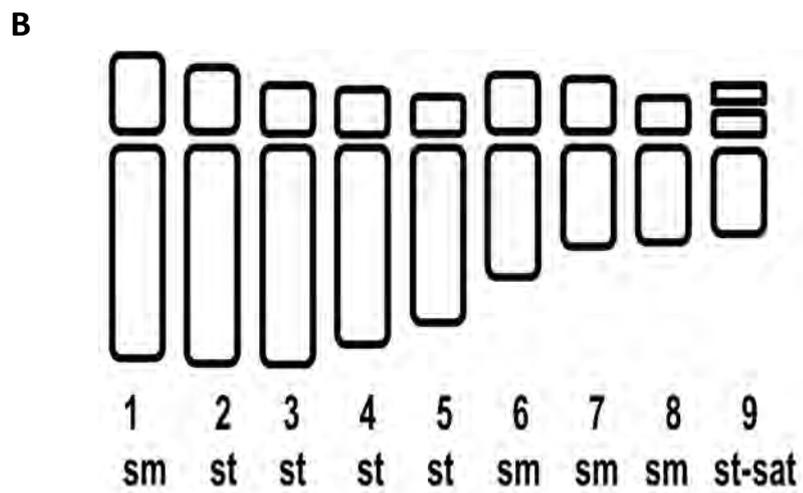


Figure 6: Caryotype du cytotypage à $2n=18$.

A : plaque métaphasique, B : idiogramme

Echelle=10 μ m

Tableau 4 : Données morphométriques du cytotype à $2n=20$.

Pair chromosomique	Bras long (μm)	Bras court (μm)	Long. Totale (μm)	Index Centromerique (IC)	Rapport BL/BC (r)	Type chromosomique (T)
1	6.65 (0.16)*	2.02 (0.05)	8.67	23.30	3.29	st
2	6.70 (0.25)	1.54 (0.06)	8.24	18.69	4.35	st
3	4.76 (0.09)	2.71 (0.08)	7.47	36.28	1.76	sm
4	5.80 (0.09)	1.43 (0.03)	7.23	19.78	4.05	st
5	5.66 (0.25)	1.14 (0.09)	6.80	16.76	4.96	st
6	4.46 (0.17)	1.79 (0.08)	6.25	28.64	2.49	sm
7	3.04 (0.09)	0.75 (0.01)	3.79	19.79	4.05	st-sat
8	2.64 (0.06)	1.00 (0.05)	3.64	27.47	2.64	sm
9	2.26 (0.07)	0.92 (0.01)	3.18	28.93	2.46	sm
10	2.00 (0.09)	1.09 (0.02)	3.09	35.27	1.83	sm

Longueur totale du lot chromosomique diploïde (TLC)=116.72 μm ; rapport entre la plus grande et la plus petite paire chromosomique (R)=2.8; index d'asymétrie (AsI)=75.35%; coefficient de variation de la longueur chromosomique (CVcl)=37.5%; moyenne d'asymétrie centromérique (Mca)=50.68%; Type morphologique des chromosomes (t) selon Levan et al. (1964): submetacentrique (sm), subtolocentrique (st), sat=satellite; BL=Bras long, BC=Bras court, (*)=deviation standard

Tableau 5 : Données morphométriques du cytotype à $2n=18$.

Pair chromosomique	Bras long (μm)	Bras court (μm)	Long. totale (μm)	Index centromérique (CI)	Rapport BL/BC (r)	Type chromosomique (T)
1	6.41 (0.13)*	2.34 (0.13)	8.75	26.74	2.74	sm
2	6.56 (0.14)	1.90 (0.18)	8.46	22.46	3.45	st
3	6.57 (0.29)	1.47 (0.13)	8.04	18.28	4.47	st
4	5.99 (0.22)	1.37 (0.11)	7.36	18.61	4.37	st
5	5.32 (0.09)	1.12 (0.13)	6.44	17.39	4.75	st
6	3.91 (0.07)	1.73 (0.09)	5.64	30.67	2.26	sm
7	3.00 (0.06)	1.61 (0.14)	4.61	34.92	1.86	sm
8	2.86 (0.11)	1.03 (0.07)	3.89	26.48	2.78	sm
9	2.52 (0.15)	0.68 (0.12)	3.20	21.25	3.70	st-sat

Longueur totale du lot chromosomique diploïde (TLC)=112.78 μm ; rapport entre la plus grande et la plus petite paire chromosomique (R)=2.73; index d'asymétrie (AsI)=76.5%; coefficient de variation de la longueur chromosomique (CVcl)=32.75%; moyenne d'asymétrie centromérique (Mca)=53.03%; Type morphologique des chromosomes (t) selon Levan et al. (1964): submetacentrique (sm), subtelocentrique (st), sat=satellite; BL=Bras long, BC=Bras court (*)=deviation standard.

2.2. Analyse cytogénétique moléculaire

2.2.1. Distribution de l'hétérochromatine révélée par CMA banding et DAPI après FISH

La coloration à la chromomycine A_3 a révélé une variabilité interpopulations du nombre et de l'intensité des bandes, et même entre deux chromosomes homologues (Figs. 7A, C, E).

Le caryotype commun présente un total de 6 bandes riches en GC révélées chez les populations à $2n=20$ et portées par les paires 1, 7 et 8 se présentant sous deux bandes en région subterminale des bras longs des chromosomes de la paire 1 et quatre bandes en région télomérique des bras courts de la paire 8 et des bras courts et des satellites de la paire 7 (Fig. 7G).

Toutefois, quelques populations manifestent certaines exceptions. En effet, la population 1 et 3 présentent un marquage supplémentaire situé sur leurs chromosome B : en région télomérique du bras court chez la population 1 (Fig. 7G, Bs1) et en région centromérique chez la population 3 (Fig. 7G, Bs2). Dans la population 11, la paire 8 présente un seul marquage sur un seul chromosome homologue de la même paire (un seul site) ce qui fait un total de 5 bandes au sein de cette population (Fig. 7C). Chez la population 2, huit bandes GC sont observées. Ces marquages supplémentaires sont localisés l'un en région télomérique d'un seul chromosome homologue de la paire 1 (un seul site) et l'autre sur le bras court du chromosome B (Figs. 7E, G).

Chez les population algériennes à $2n=18$, quatre bandes riches en GC sont portées par les 2 paires chromosomiques 2, 9 (portant le satellite) se présentant sous deux fines bandes en région subterminale des bras longs des chromosomes de la paire 2 et deux épaisses bandes en région télomérique des bras courts et des satellites de la paire 9. La population 8

présente une bande additionnelle en région télomérique du bras court du chromosome B (Figs. 8A, G).

La coloration au DAPI après FISH a révélé la présence de deux bandes d'hétérochromatine constitutive chez toutes les populations, positionnées en région subterminale des bras longs des chromosomes de la paire 1 chez les populations à $2n=20$ et de la paire 2 chez les populations à $2n=18$. Une bande supplémentaire portée sur un seul chromosome homologue de la paire 1 localisée en région télomérique du bras long a été observée dans la population 2. Le chromosome B de la population 3 possède une bande en région centromérique du chromosome B. Les résultats montrent que toutes les bandes DAPI⁺ (hétérochromatine constitutive) sont également CMA⁺ (régions d'ADN riches en GC) mais avec une intensité moindre.

2.2.2. Cartographie des gènes ribosomiques 35S et 5S

Les résultats de FISH ont permis de mettre en évidence deux loci 35S colocalisées avec les bandes riches en GC sur les deux paires chromosomiques 7 et 8 (Fig. 7G) chez toutes les populations à $2n=20$, excepté la population 1 et 2 qui possèdent un locus 35S supplémentaire colocalisé avec une bande CMA⁺ en région télomérique du chromosome B (Fig. 7G, Bs1). Le chromosome B chez la population 3 ne porte pas de gènes ribosomiques (Fig. 7B). L'intensité de fluorescence des signaux varie entre les populations et parfois entre les sites homologues. En effet, chez la population 11, seulement 3 sites ont été détectés en région télomérique : du bras court de la paire 7 (portant le satellite) et sur le bras court d'un seul chromosome homologue de la paire 8 (Fig. 7D).

La FISH a également révélé la présence d'un locus 5S en région subterminale des bras longs de la paire 1 chez toutes les populations à $2n=20$. Chez la population 2, un deuxième

locus 5S situé sur un seul site en position terminale du bras long de la même paire chromosomique a été observé (Figs. 7F, G).

Chez les populations à $2n=18$, un seul locus 35S a été observé situé en région télomérique des bras courts de la plus petite paire chromosomique (9 portant le satellite) et un locus 35S supplémentaire en région télomérique a été détecté sur le chromosome B chez la population 18 (Figs. 8B, C). Un locus 5S en région subterminale des bras longs de la paire chromosomique 2 a été observé chez toutes les populations à $2n=18$.

Dans toutes les populations on remarque que les loci 35S et 5S correspondent aux régions d'ADN riches en GC (bandes CMA⁺), et que seuls les loci 5S sont constitués d'hétérochromatine constitutive (bandes DAPI⁺).

2.3. Nombre de nucléoles

Sur 1200 noyaux observés en interphase à partir de quatre populations à $2n=20$, deux nucléoles par noyau ont été dénombrés dans la majorité des cas (Figs. 9A, C). Un maximum de cinq nucléoles par noyau ont été retrouvé chez la population 1, jusqu'à quatre nucléoles chez la population 3 et 4 et trois chez la population 2. Chez la population 8 à $2n=20$, la majorité des cellules comptent un seul nucléole, avec un nombre maximum de trois nucléoles par noyau (Figs. 9B, C). Tous les NORs portés par les chromosomes B semblent actifs. Le chromosome B ne portant pas de rDNA a été retrouvé uniquement chez la population 3.

Une synthèse des résultats obtenus de la caractérisation cytogénétique ainsi que le nombre des NORs est présentée dans le tableau 6.

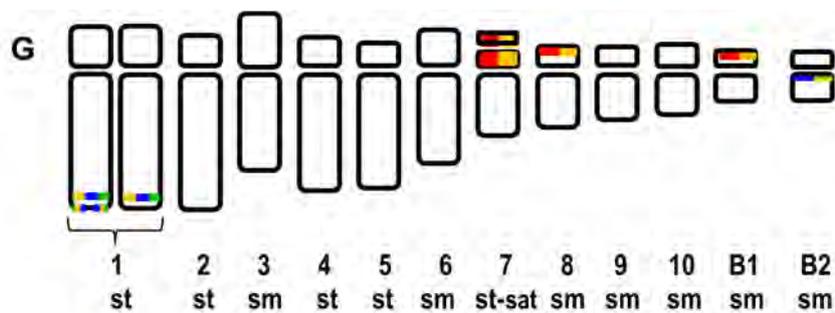
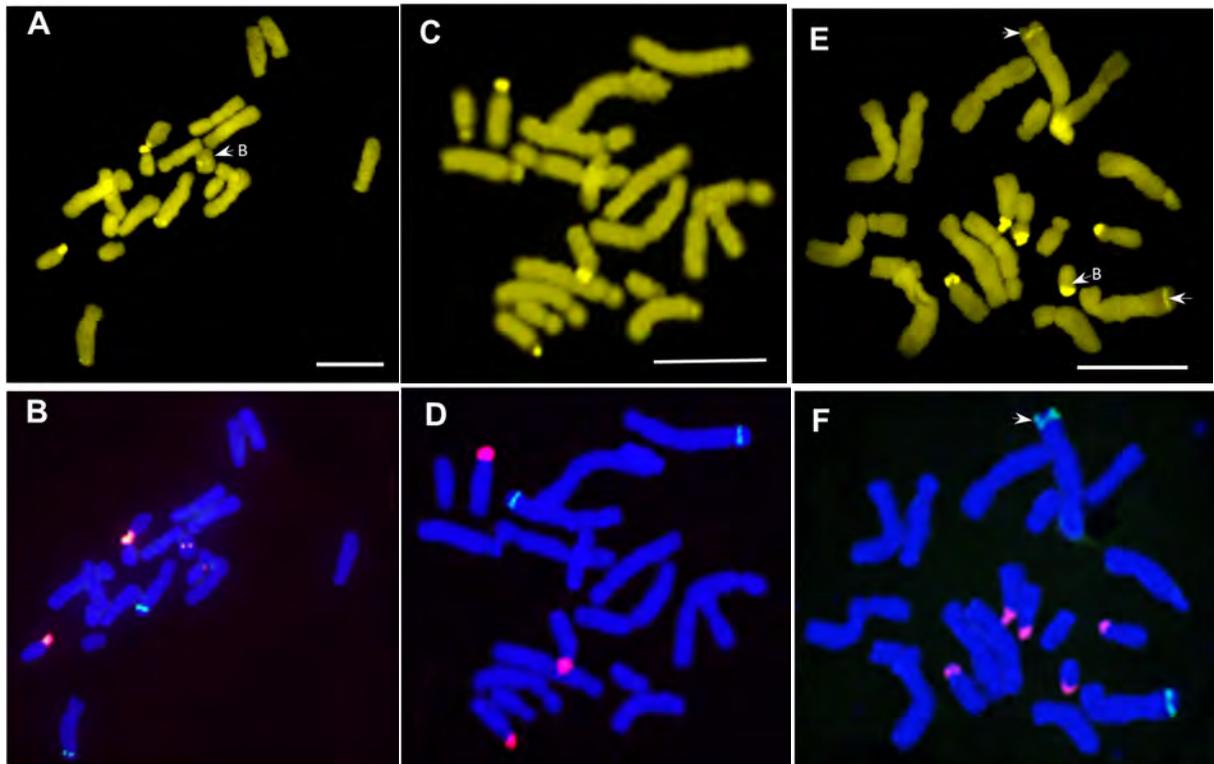


Figure 7: Coloration à la chromomycine A₃ (jaune), DAPI après FISH (bleu), cartographie des gènes ribosomiques 5S (vert) et 35S (rouge) et idiogramme du cytotype à 2n=20.

A et B : Population 3 (Amamcha), C et D : population 11 (Liguria), E et F : population 2 (Mila), G : idiogramme. Echelle=10 µm.

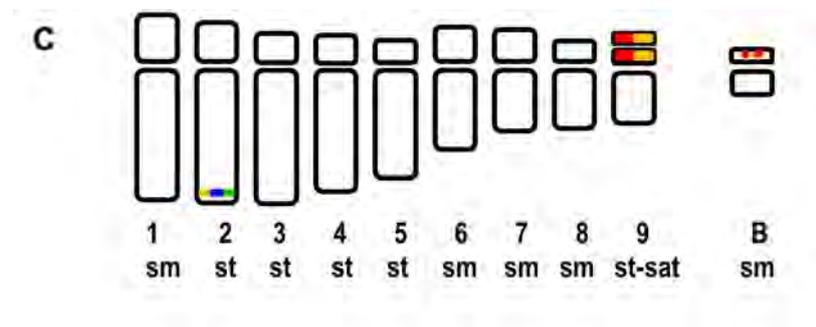
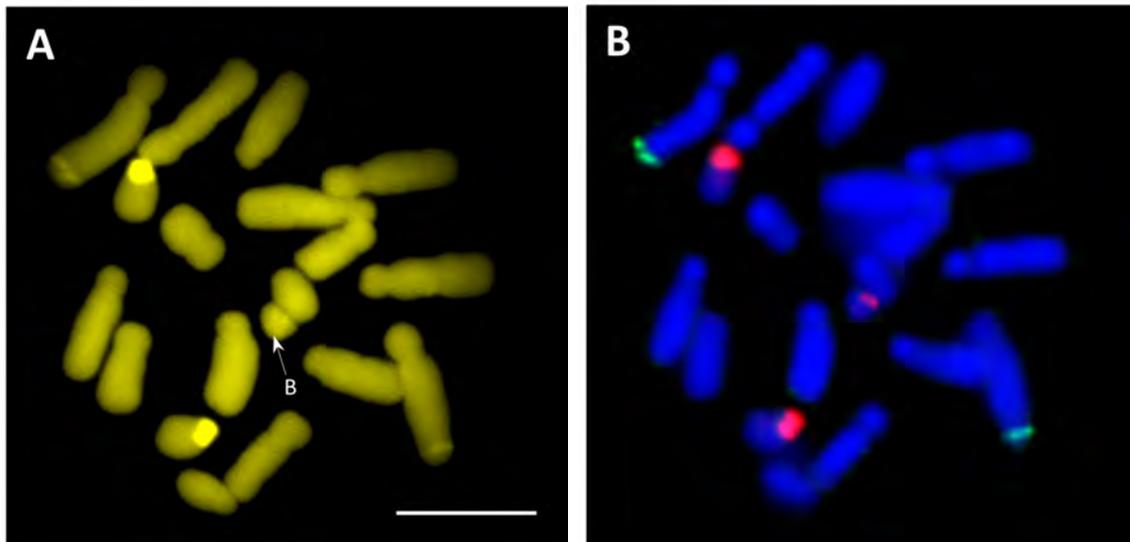


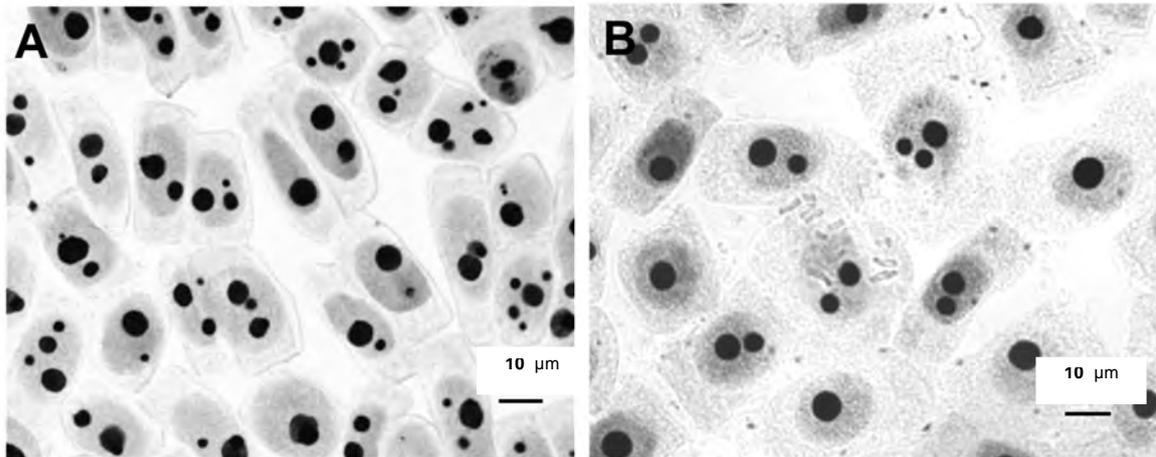
Figure 8: Coloration à la chromomycine A₃ (jaune), DAPI après FISH (bleu), cartographie des gènes ribosomiques 5S (vert) et 35S (rouge) et idiogramme du cytotype à 2n=18.

Echelle = 10 μm

Tableau 6: Synthèse de la caractérisation cytogénétique chez toutes les populations et nombre de nucléoles chez cinq populations de *N.tazetta*.

Numéro de population	2n	Bandes CMA	Bandes DAPI	Sites 35S	Sites 5S	Nombre de nucléoles
1	20+1B	7	2	5	2	1-5*
2	20+1B	8	3	5	3	1-3
3	20+1B	7	3	4	2	1-4
4	20	6	2	4	2	1-4
5	20	6	2	4	2	
6	20	6	2	4	2	
7	20	6	2	4	2	
8	18+1B	5	2	3	2	1-3*
9	18	4	2	2	2	
10	18	4	2	2	2	
11	20	5	2	3	2	
12	20	6	2	4	2	

*Le nombre maximum de nucléoles a été observé chez les individus avec des chromosomes B portant des gènes rRNA 35S.



C

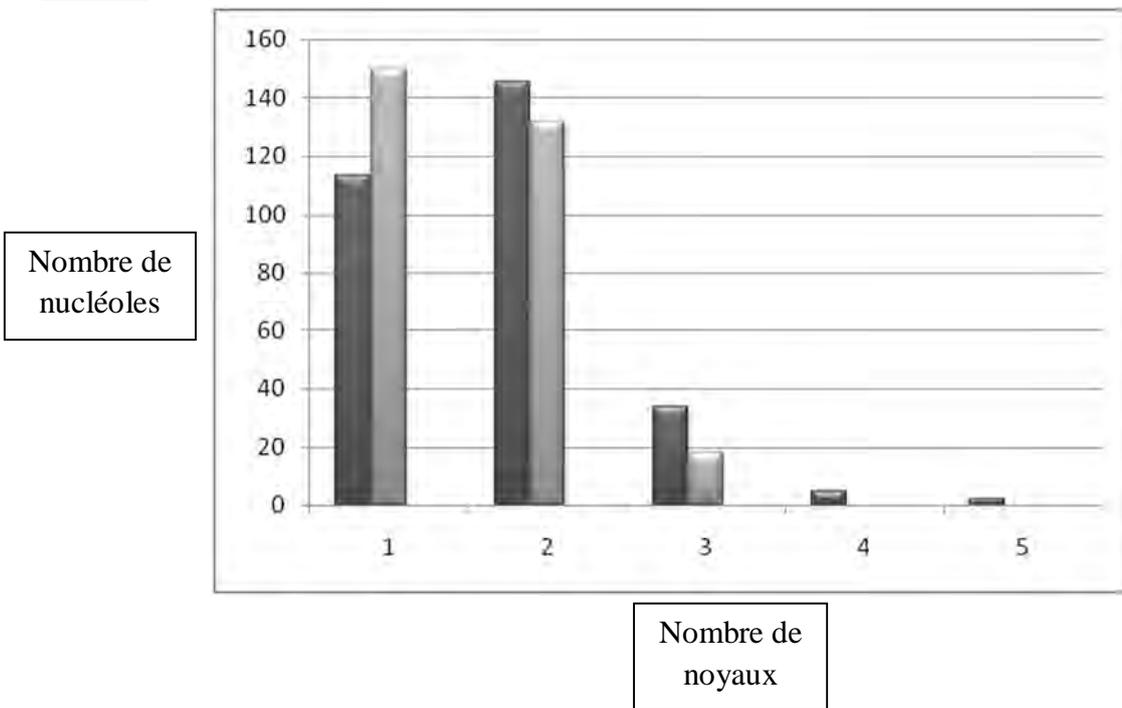


Figure 9 : Coloration des nucléoles au nitrate d'argent et leurs nombre par noyaux

A-C : cytotype à $2n=20$ (gris foncé), B-C : cytotype à $2n=18$ (gris clair)

2.4. Evaluation de la taille du génome par cytométrie en flux

La technique de cytométrie en flux a permis l'évaluation de la taille du génome au sein des populations étudiées. La valeur moyenne 2C correspondant à la quantité d'ADN génomique du lot diploïde a été calculée chez 1 à 6 individus par population (Tab. 7). Elle varie entre 25,56 et 28,67 pg avec une moyenne de 26,7 pg ($\pm 1,04$) chez les populations à $2n=20$. Chez les populations à $2n=18$, la valeur moyenne 2C est estimée à 26,6 pg ($\pm 1,03$).

Tableau 7: Nombres chromosomiques et taille du génome des populations étudiées.

Nombre de population	2n	2C-value (pg)*	N	D.S.
1	20+1B	27.76	6	0.37
2	20+1B	26.35	4	0.30
3	20+1B	25.56	5	0.14
4	20	25.96	3	0.66
5	20	26.86	3	0.36
6	20	26.44	3	0.65
7	20	26.00	3	0.50
11	20	28.67	2	0.08
12	20	-	-	-
		26.7 (1.04)**		
8	18+1B	25.69	6	0.86
9	18	27.72	3	0.24
10	18	26.4	1	-
		26.6 (1.03)**		

*1 pg=978 Mbp (Doležel et al. 2003); N=nombre d'individus; ** valeur moyenne avec DS

3. Discussion générale

3.1. Nombres chromosomiques et variation du caryotype

Les populations de *N. tazetta* L. s.l. présentent deux nombres chromosomiques différents ($2n=20$ et 18).

Neuf populations sont caractérisées par le nombre $2n=20$, déjà signalé sur des populations d'Italie (Maugini, 1953 ; De Dominicis et al., 2002 ; Aquaro et al., 2008), de Grèce (Hong, 1982), et de Chine (Jin-ghua et al., 2011). Plusieurs formules chromosomiques ont été établies pour ce caryotype : $2n=20=2\text{ sm}+16\text{ st}+2\text{ st-sat}$ (Maugini, 1953) ; $2n=20=4\text{ sm}+10\text{ st}+4\text{ t}+2\text{ t-sat}$ (Hong, 1982) ; $2n=20=4\text{ sm/m}+14\text{ st}+2\text{ st-sat}$ (De Dominicis et al., 2002) ; $2n=20=8\text{ sm}+8\text{ st}+2\text{t}+2\text{ st-sat}$ (Aquaro et al., 2008). Cette dernière se rapproche de celle que nous avons mise en évidence dans cette étude: $2n=20=10\text{ sm}+8\text{ st}+2\text{ st-sat}$.

Trois populations Algériennes (Alg-DjO2, Alg-DjO4 et Alg-DjO5) présentent un nombre chromosomique constant de $2n=18$ avec la formule chromosomique suivante : $2n=2x=18=8\text{sm}+8\text{st}+2\text{st-sat}$. C'est le nouveau nombre chromosomique de base ($x=9$) dans la section *tazettae* à laquelle appartient l'espèce *N. tazetta*. Dans cette section, on a rapporté à ce jour, uniquement le nombre de base $x=10$ (*N. elegans* Spach) et $x=11$ (*N. italicus* Ker-Gawl., *N. aureus* Lois., *N. pachybolbus* Dur., *N. barlae* Parl., *N. polyanthos* Lois., *N. papyraceus* Ker-Gawl., *N. panizzianus* Parl.)

La comparaison du caryotype des populations à $2n=20$ avec celui des populations à $2n=18$ nous a permis de constater que sept paires chromosomiques sont similaires du point de vue morphologique et structural. En effet, les paires 1, 2, 4, 5, 6, 7 et 9 chez le premier caryotype correspondent respectivement aux paires 2, 3, 4, 5, 6, 9 et 8 du deuxième (Figs. 5B, 6B et 10).

La longueur totale du lot diploïde des chromosomes du caryotype à $2n=20$ (116,72 μm) est légèrement supérieure à celle du deuxième (112,78 μm).

Ces observations nous amènent à formuler l'hypothèse de l'existence d'un nombre de base secondaire $x=10-1=9$ qui aurait pris naissance suite à des réarrangements chromosomiques à partir du cytotype à $2n=20$. Cette hypothèse est renforcée par les faits suivants : les paires 3, 8 et 10 du cytotype à $2n=20$ auraient subi des restructurations chromosomiques accompagnées d'élimination d'un centromère entraînant ainsi la formation des paires 1 et 7 du cytotype à $2n=18$ (Fig. 10).

Les valeurs de la longueur totale du lot diploïde des deux caryotypes sont proches, cela suppose que les réarrangements chromosomiques n'ont pas causé une perte considérable au sein du génome du cytotype à $2n=18$. Un phénomène comparable a été décrit par Fernandes (1963, 1967) au cours de l'évolution du genre lors de la formation du nombre de base secondaire $x=13$ suite à des translocations accompagnées d'élimination d'un centromère sur des tétraploïdes de l'espèce *N.bulbocodium* ($2n=28$) donnant ainsi naissance à des hypotétraploïdes avec l'apparition de l'espèce *N.obesus* ($2n=26$). Les réarrangements chromosomiques entraînant la formation de différents nombres chromosomiques avec différents nombres de base au sein d'une même espèce chez un genre proche ont été décrits. En effet, *Prospero autumnale* s.l. (*Hyacinthaceae*) comprends 4 cytotypes avec 3 nombres de bases et des caryotypes différents résultant des restructurations chromosomiques qu'a subit l'espèce (Ainsworth et al., 1983; Jang et al., 2013).

Le nombre $2n=36$ a été rapporté chez *N. tortifolius* Fernández casás (Romero et al., 1983), endémique rare d'Espagne dont le caryotype présente des similitudes avec les cytotypes à $2n=20$ et $2n=18$. Cette espèce tétraploïde appartient à la section *xDubii* Fernández casás et

serait issue d'une hybridation interspécifique entre des formes diploïdes de la section *Jonquillae* DC. ($2n=14$) et de la section *Hermione* (Haw.) Spach ($2n=22$) suivie d'un dédoublement chromosomique. Qu'elle est la relation entre nos cytotypes à $2n=18$ et $2n=20$ et l'espèce *N. tortifolius* à $2n=36$? Sommes-nous en présence d'une série polyploïde?

Si toutefois *N. tortifolius* est le tétraploïde issu de notre cytotype diploïde à $2n=18$, ils formeraient une série polyploïde avec le nombre de base $x=9$ et notre hypothèse ne serait donc pas en adéquation avec celles décrite par Romero et al. (1983) concernant l'origine du *N. tortifolius*.

3.2. Distribution de l'hétérochromatine et des gènes ribosomiques

Les marquages à la chomomycine, au DAPI après FISH et la cartographie des ADNr 5S et 35S ont permis d'identifier trois paires de chromosomes marqueurs chez les populations à $2n=20$ et deux paires de chromosome chez les populations à $2n=18$. La localisation des bandes GC-riches diffère légèrement de celles rapportée par De Dominicis et al. (2002) sur des populations d'Italie. En effet, ils ont signalé les mêmes marquages sur le bras long de la paire 1 et le bras court de la paire 7, un marquage supplémentaire en région terminale sur le bras court de la paire 1 mais aucun marquage sur la paire 8. Chez les populations à $2n=18$, uniquement 4 bandes CMA⁺ ont été observées sur les paires 2 et 9 correspondant aux paires 1 et 7 des populations à $2n=20$. Ces marquages confortent notre hypothèse quant à l'origine hypoaneuploïde de ces populations.

Nos résultats de FISH chez les populations à $2n=20$ sont légèrement différents de ceux de Jin-ghua et al. (2011) qui ont signalé un locus 5S positionné sur le bras long de la deuxième paire.

Dans cette étude les gènes 5S et 35S sont tous colocalisés avec les régions d'ADN riches en bases GC. Ce type de colocalisation a déjà été rapporté de nombreuses fois pour les deux familles de gènes ribosomiques (Siljak-Yakovlev, 2002 ; Hamon, 2009 ; Muratovic et al., 2010 ; Bareka et al. 2012). Les sites 5S sont DAPI positifs chez toutes les populations étudiées, bien visible en interphase car restent condensés tout au long du cycle cellulaire (Martel et al., 1996 ; Ansari et al., 1999 ;). Les sites d'ADNr 35S sont par contre DAPI négatifs, correspondant aux portions d'ADN AT-pauvres.

La paire chromosomique 8 du cytotype à $2n=20$, se singularise par un polymorphisme des marquages des bandes GC et des ADNr 35S (Figs. 7A, C, E). La taille des signaux 35S localisés en région télomérique varie d'une population à une autre (Figs. 7 B, D, F) et au sein de la même population entre les sites homologues (Fig. 7D). Cette hétérogénéité est probablement due à une différence dans le nombre de répétition des copies géniques, comme signalé dans nombreuses études (Leitch et Heslop-Harrison, 1992; Murata et al., 1997; Ansari et al., 1999; Shan et al., 2003; Bogunic et al. 2011 ; Garnatje et al. 2012).

On note l'absence d'un deuxième locus d'ADNr 35S chez le cytotype à $2n=18$. Ces faits permettent de supposer que la paire 8 a subi une délétion de la partie télomérique de son bras court ou la perte de ce dernier en entier chez les formes à $2n=20$ au moment où les réarrangements chromosomiques ont surgi pour donner naissance au cytotype à $2n=18$ maintenus par la reproduction végétative de ces populations (Fig. 10).

Le nombre de loci 35S est variable au sein des populations à $2n=20$ et entre celles-ci et celles à $2n=18$. Cette variabilité interpopulations a été également observée chez le genre *Brassicaceae* (Hasterok et al., 2006). Le nombre impair des signaux 35S observé chez la population 11 (Fig. 7D) a été aussi signalé chez le cytotype diploïde de *Paspalum*

quadrifarium (Vaio et al., 2005), due, selon les auteurs à l'auto-incompatibilité au sein de cette espèce.

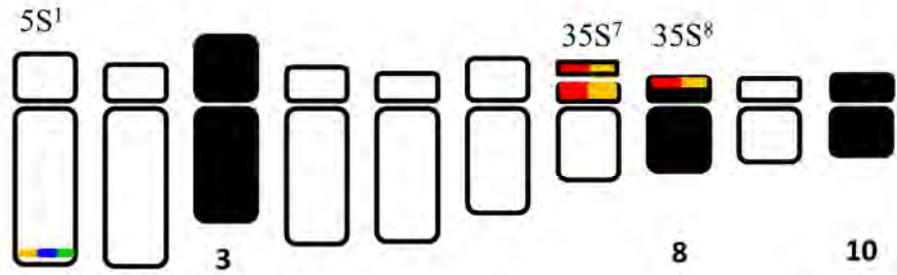
L'imparité et la variabilité du nombre de loci 5S chez la population 2 (Fig. 7F) ont également été constatées. Les mêmes observations ont été rapporté chez l'espèce *Byblisrorida* (Fukushima et al., 2011) de même que la variabilité du nombre a été signalée chez le complexe *Prospero autumnale* (Jang et al. 2013).

Le polymorphisme du nombre de loci 35S et 5S traduit une instabilité ce qui témoigne d'une fréquence élevée des réarrangements chromosomiques au sein de ce complexe. Ces réarrangements sont fortement liés aux phénomènes de spéciation (Siljak-Yakovlev et al., 2014).

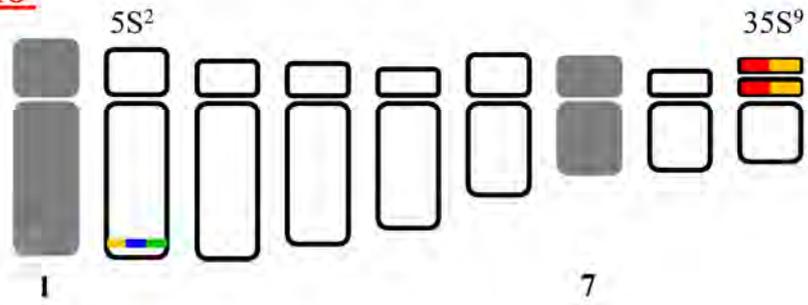
3.3. Activité des NORs

Le nombre maximum de nucléoles chez le cytotype à $2n=20$ a été observé dans la population 1 ($2n=20+1B$) et chez le cytotype à $2n=18$ chez la population 8 ($2n=18+1B$). Chez ces deux populations le chromosome B porte un locus 35S. Ceci implique que ces gènes ribosomiques (y compris ceux portés par le chromosome B) peuvent tous être actifs, comme il a été démontré dans d'autres exemples chez le genre *Picea* (Siljak-Yakovlev, 2002) et le complexe *Rhoeo spathacea* (Golczyk et al. 2005). Chez la population 2, il semble que le deuxième locus 35S ne soit pas actif car on observe un nombre maximum de trois nucléoles. Chez la population 3, le chromosome B ne porte pas de gène 35S et on observe un nombre maximum de quatre nucléoles, ce qui signifie que tous les gènes 35S portés par les chromosomes A sont tous actifs dans cette population.

Cytotype à $2n=20$



Cytotype à $2n=18$



Hypothèse

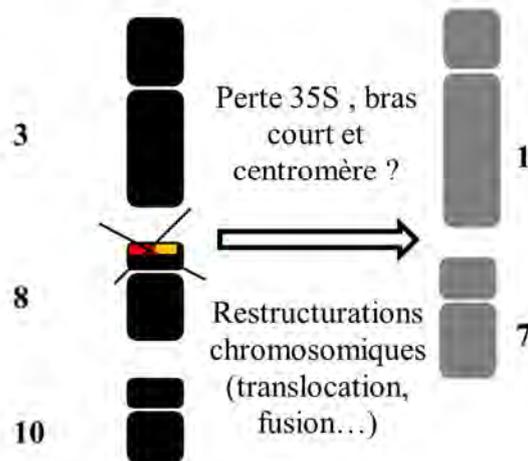


Figure 10: Hypothèse sur l'évolution du nouveau nombre de base au sein du complexe *N. tazetta* L. s. l. impliquant les paires 3, 8 et 10 du cytotype à $2n=20$ (noir) et les paires 1 et 7 du cytotype à $2n=18$ (gris).

3.4. Chromosome B

Les chromosomes B ont été observés au sein du genre par différents auteurs. Leur nombre est variable : jusqu'à cinq chez *N.bulbocodium* (Wylie, 1952 ; Fernandes 1952, 1963), jusqu'à 3 chromosomes B ont été signalés Chez *N. tazetta*, (Weitz and Feinbrun, 1972) et *N. triandrus* L. (Brandham and Kirton, 1987), deux chez *N. poeticus* L. (Pustahija, 2011) et un chez *N.cyclamineus* D.C. (Wylie, 1952 ; Brandham and Kirton, 1989) et *N.minimus* Kunth (Wylie 1952; Brandham and Kirton 1987). Tous les chromosomes B des narcisses font environ les deux tiers de la taille des plus petits chromosomes, ils peuvent être heterochromatiques ou pas, portant ou non des gènes ribosomiques (Zonneveld 2008; Pustahija 2011).

Dans cette étude, deux types de chromosomes B ont été observés : le premier (Bs1) porte un marquage CMA⁺ colocalisé avec un locus 35S chez la population 1, 2 et 8 ; Le deuxième (Bs2) ne porte pas de gènes ribosomiques (population 3). Des chromosomes B portant des gènes ribosomiques ont été rapportés chez d'autres espèces tels que *Brachycome dichromosomatica* (Donald et al., 1995), *Crepis capillaris* (Maluszinska and Schweizer, 1989 ; Maluszinska, 1990 ; Jamilena et al., 1994), *Hepaticanobilis* (Matsuda et al., 1993), *Lilium martagon* (Muratovic et al. 2006). Chez *Narcissus poeticus* deux chromosomes B portant des gènes 35S actifs ont été observés chez des populations poussant dans des conditions environnementales défavorables (Pustahija, 2011). Dans notre étude, aucune liaison n'a été établie entre la présence des chromosomes B et des conditions environnementales particulières.

3.5. Taille du génome

La valeur moyenne 2C (28.67 pg) chez la population Européenne à $2n=20$ est légèrement supérieur comparée à celle de nos populations d'Afrique du Nord (26.42 pg ±

0.7) et d'une population libanaise rapportée dans la littérature (Bou Dagher-Karrat et al. 2013). La valeur 2C rapporté par Zonneveld (2008) pour *N. tazetta s.l.* varie entre 29.5 et 31.6 pg. Ces valeurs s'éloignent de celles rapportées dans cette étude, ces variations sont probablement due à de nombreux facteurs méthodologiques : l'utilisation d'un étalon différent, la solution tempon et le colorant, le type de la machine, la présence de chromosomes B et de réarrangements chromosomique. La différence dans la taille du génome mise en évidence pour les populations à $2n=20$ (26.7 pg) et celles à $2n=18$ (26.6 pg) n'est pas considérable ce qui signifie que « la perte de deux chromosomes » ne se manifeste pas par la diminution de la taille du génome. Ceci vient consolider notre hypothèse concernant les réarrangements chromosomiques qu'a pu subir le cytotype à $2n=20$ pour engendrer celui à $2n=18$ avec une perte négligeable de la quantité d'ADN.

Chapitre III: *Narcissus tazetta* (Amaryllidaceae) and related species in the Algerian Tell: *Narcissus bellirius spec. nov.*

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes intéressés à la caractérisation cytogénétique de populations naturelles appartenant au complexe *N. tazetta*, au sein desquelles nous avons pu établir deux nombres chromosomiques différents : $2n=20$ ($x=10$) et $2n=18$ ($x=9$). Ce dernier n'a jamais été rapporté auparavant au sein du genre et est mis en évidence pour la première fois chez des populations Algériennes.

Lorsque la différenciation chromosomique entre deux taxons commence à se manifester au niveau du caryotype surtout quand il s'agit d'une variation du nombre chromosomique, nous sommes probablement déjà en présence de taxons distincts. En outre, leur période de floraison est décalée, celui à $2n=20$ fleurit de décembre à mars et celui à $2n=18$ en Avril, ils coexistent côte à côte, mais occupent des conditions écologiques et des habitats très différents: le premier pousse dans les prairies humides et le second dans des sols rocailloux au milieu de touffes de *Ampelodesmos mauritanicus* (Poir.) T. Durand et Schinz. et de *Calicotome spinosa* (L.) Link.

Ainsi, nos données cytogénétiques et nos propres observations sur le terrain combinées à une étude biométrique nous ont permis de décrire une nouvelle espèce : *Narcissus bellirius spec. nov.*

L'étude biométrique a été réalisée sur 20 à 40 individus appartenant à chacune des trois populations : la population 1 du taxon à $2n=20$ et les populations 9 et 10 du taxon à $2n=18$ (Tab. 1). Vingt (20) caractères morphologiques ont été choisis dont douze (12) concernent la partie reproductrice (la fleur) de la plante et huit (8) la partie végétative.

Les mesures effectuées ont concerné les caractères suivants : le diamètre de la couronne, la longueur de la couronne, la longueur et la largeur du pétale interne, la longueur et la

largeur du pétale externe, la longueur du tube, la longueur de l'ovaire, la longueur du style, la longueur des étamines internes et externes, la taille de l'anthère inférieur et supérieur, la longueur du scape, la longueur de la feuille (la plus externe), la largeur de la feuille (à la base), le nombre de feuilles, le nombre d'inflorescence, le diamètre du bulbe, la hauteur du bulbe et le nombre des bulbes fils (dans les cas où ils étaient présents).

Les moyennes ont été calculées et les résultats de cette analyse (annexe 2) en plus de nos observations des conditions écologiques ont fait l'objet d'une publication rédigée et prête à être soumise à la revue *Phytotaxa*.

Narcissus tazetta (Amaryllidaceae) and related species in the Algerian Tell: *Narcissus bellirius* spec. nov.

BOUKHENANE MERIEM¹, KHALFALLAH NADRA^{1,4}, SILJAK-YAKOVLEV SONJA², FRIDLENDER ALAIN³

¹Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université Constantine 1. 25000 Constantine, Algeria. E-mail : nkhalfallah@yahoo.fr

²CNRS, Ecologie, Systématique & Evolution, UMR 8079, CNRS-UPS-AgroParisTech, Université Paris-Sud, Bat. 360, 91405 Orsay, France.

³Faculté des Sciences, Université de Provence, case 75, UFR Sciences-AMU, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 3, France.

⁴Corresponding author

Ready to be submitted to *Phytotaxa* journal.

Abstract

In the genus *Narcissus*, sect. *Tazettae*, species delimitation remains controversial. In France as in Algeria, *N. tazetta* subsp. *tazetta* is native and relatively well identified, whereas *N. tazetta* subsp. *italicus* is probably not indigenous. *Narcissus bellirius* is described herein as a new species to eastern Algerian Tell. Flowers of this endemic daffodil are quite similar to those of *N. tazetta* subsp. *tazetta* ones, but with quite distinct leaf and scape morphology, habit and ecology. This new rocky mountainous *Narcissus* is also different from all other related taxa (*N. papyraceus*, *N. tazetta* subsp. *italicus*, and others), and in some respect seems to be more related to *N. Dubii* Gouan (e.g., leaf and scape morphology, solitary bulb and ecology).

Key words: Algeria; Constantine; *Narcissus*; new species

Introduction

Since antiquity, the narcissi (*Narcissus* L. (1753: 289), Amaryllidaceae) have attracted great interest in horticulture and, to a lesser degree in pharmacology (Hanks 2002). Since its introduction, the narcissi have been extensively cultivated throughout the northern hemisphere, floriculture being more easily developed than vegetative propagation, in general, by the formation of daughter bulbs.

Furthermore, crosses between species (including those remote) are relatively common in cultivation, occasionally producing fertile seeds. It has been demonstrated that *N. biflorus* Curtis, (1792: 197), which is sterile yet widely cultivated still, is of hybrid origin (De Dominicis *et al.* 2002).

In nature, hybrids between sympatric species are commonly observed, but do not spread as much as non-hybrids, mainly due to ecological, phenological and biological barriers (e. g., pollinators which are often sensitive to corolla tube length).

Because of their relative toxicity to livestock along with multiplication capacity, they have mainly flourished in the secular silvopastoral system: with meadows, pastures and olive groves covered with daffodils, which have been admired over centuries. In recent decades, changes in agricultural practices (drainage, use of fertilizers, sowing of grasslands, and herbicides) have led to a widespread decline of these magnificent populations (Fridlender & Pignal 2013).

1. The *Narcissus* center of dispersal

This genus, the distribution of which is centred around the Mediterranean, consists of ca. 40 species, ranging, depending on the author from 30 to 60 species (Mabberley 1998, Meerow & Snijman 1998). But taxonomic boundaries of this genus vary considerably. In

some monographs, 70–80 species are recorded (Blanchard 1990, Mathew 2002). Its centre of diversity is Spain and Morocco where most of the species described to date can be found. Only a few pan-Mediterranean species reach the Levant, e.g., *N. tazetta* L. (1753: 290), and *N. serotinus* L. (1753: 290), in Israel (Feinbrun-Dothan & Danin 1998). In Eastern Mediterranean, most of *N. tazetta* related taxa (i.e. *N. cypri* (Haw.) Haw (1831: 10) are probably introduced (Sweet 1838). In the Italian Peninsula, the 36 species listed by Parlato (1858) do not correspond to the modern taxonomic approach; in fact, only 5 to 6 species are found in the Italian territory (Pignatti 1982): 3 species seemingly present spontaneously in Sicily, and the status of three other taxa remaining ambiguous (Giardina *et al.* 2007). In *Flora Europaea*, Webb (1980) lists 26 species and 4 hybrids. Therefore there are 22 species and 2 hybrids for Spain against only 10 species and 4 hybrids described in France. According to the classical French floras (Coste 1901, Fournier 1946, Guinochet & Vilmorin 1978, Tison *et al.* 2014), the French territory would host respectively: 16, 11 (13), 12 (16), and 9 species. Barra *et al.* (2011) recognizes 30 species in the Iberian Peninsula; Aedo (2013) records 25 species and 7 subspecies in Spain. Fernández Casas (2002) cites 13 daffodil species in northern Morocco. For North Africa, Dobignard & Chatelain (2010) log 29 species of *Narcissus*. The classification adopted by Maire (1959) for the whole of North Africa is complex with 8 species, 17 subspecies, 3 hybrids and numerous varieties and forms considered indigenous, as well as 3 further introduced European *Narcissi* which are locally subsponaneous. In the western Mediterranean basin, the massive introduction of botanical species, cultivars and hybrids that are sometimes naturalized, have drastically disrupted natural dispersal barriers which complicates plotting daffodil distribution native areas. In addition, indigenous and introduced plants probably crossbreed, making it difficult to distinguish between spontaneous species and subsponaneous ones.

2. Taxonomic uncertainties

The complexities described above show how the genus *Narcissus* L. presents taxonomic difficulties and nomenclatural controversies. Adding to this, the taxonomic interpretation of polymorphisms varies amongst botanists. For example, the mainly Franco-Iberian and alpine *N. pseudonarcissus* L. (1753: 289) group is divided into 24 species by Blanchard (1990), while modern floras (see above) recognize only 2–3 for France and 7–8 for Spain. Jiménez *et al.* (2009) later showed that numerous Iberian species of the sect. *Pseudonarcissi* were morphologically and genetically identical. In general, floral variability between individual plants, with phenotype differences probably arising from several alleles with different frequencies and expression patterns (which still need to be elucidated), has resulted in taxa assigning that is often still recognized by some taxonomists. Thus, in the sect. *Narcissus* (Poet's Narcissus), Mathew (2002) described 2 species and 9 infraspecific binomials, while later chromosomal and genetic identity was demonstrated between these forms (Tucci *et al.* 2004). Similarly, genus subdivisions remain uncertain, in that many taxa are included in different sections depending on the authors, whom furthermore accept different numbers of sections: 7 (Webb 1980), 10 (Blanchard 1990), 11 (Zonneveld 2008), 12–13 subsections and series (Mathew 2002), 16 (Fernandes 1968). For such reasons, the distinction between 2 or 3 subgenera (*Hermione* (Haw.) Salisb. (1812: 357), *Narcissus* L. and *Corbularia* Salisb. Ex. Herbert (1812: 349) may not have great relevance.

3. The Tazette *Narcissus*

Relatively early in time, the sect. *Tazettae* DC. (\equiv *Tazettes* DC. 1815, 6: 322 = subgenus *Hermione* (Salisbury) Spach.) was brought to light by De Candolle (1815): " Flat leaves;

slightly glaucous; multiflora scape; elongated flower tube; cup-shaped corona, complete or very faintly toothed edged. In these gamopetalous, the flower throat relates to the top of the tube, while the corona (presented as an extension of the tepal or an exsurgence of stamen filaments) has also been named as "paracorolla", "godet [cup]" (cf. De Candolle) or even "nectaire [nectaries]" (cf. Redouté).

This section classically includes *N. bertolonii* Parl. (1858: 132), *N. cyprii* Haw, *N. dubius* Gouan (1773: 22), *N. italicus* Ker Gawler,(1809, 29:1188) *N. pachybolbus* Dur. (1846: 425), *N. papyraceus* Ker-Gawler, *N. patulus* Loisel. (1809:276), and *N. tazetta* L., to which we can add tens of species, subspecies and related varieties (e.g., *N. chrysanthus* DC. (1815: 323), *N. ochroleucus* Lois. (1810:163), *N. panizzianus* Parl. (1858:128), *N. polyanthos* Lois. (1809: 277), *N. tortifolius* Fern. Casas (1977: 43), *N. stellatus* DC. (1815:323), and most of the narcissi originally classified under the genus *Hermione*). Some authors also include *N. elegans* Spach (1846: 452) and *N. viridiflorus* Schousb. (1800: 157).

Narcissus tazetta s.l. has the largest geographic distribution area, being known across the majority of the Mediterranean basin (doubtfully spontaneous in the Canary island), and subsontaneous as far as China and Japan (Fernandes 1951).

Since it was first described by Linnaeus, there are great controversies concerning the delimitation of the species due to its polymorphism, and even the type (ind. loc: *Habitat in Galliae Narbonensis, Lusitaniae, Hispaniae maritimis*) remains ambiguous (Aedo 2010, Ferrer Gallego & Laguna Lumbreras 2013). Clusius (1576) drew the *Narcissus totus albus prior* and the *N. florum multiplici*, a horticultural narcissus which had already been widely introduced across the Mediterranean basin ("*Constantinopoli ad nos delatus*") and still subsontaneous in some places. Unfortunately he did not illustrate his *Narcissus medio luteus* (*Hab. Hispaniae, circa Monspelium pratis*). The culture of Iberian endemic taxa

belonging to the *Pseudonarcissus* group between the 16th and 18th century is attested in Central Europe (Rivera-Núñez *et al.* 2003). The excellent and first widely accessible colour plates illustrating the *N. tazetta* *s.l.* by Curtis (1806), Redouté (1814–1816) and Reichenbach (1847), undeniably represent a cultivated form of the flower with yellow tepals and dark orange or yellowish corona. Redouté wrote that he "had never seen the fruit of this plant", which is surprising as the wild *N. tazetta* abundantly bears fruits. However, the splendid *N. praecox* Ten. (1819: 39) plate furnished by Tenore (1811–1815) represents a typical wild form of *N. tazetta*. Numerous conflicting elements which only add to the confusion surround this flower.

Countless taxa have been described in this section with plants collected in “pastures”, “hills” and “woods” of Italy and southern France in the 19th century, when these plants were grown on a large scale for ornamental purposes. Today, these *Narcissus* have all but disappeared there. In France, the most notable examples are the taxa with yellowish free tepals (*N. aureus* Loisel., *N. chrysanthus* DC, *N. ganymedoides* Rouy (1912: 45), *N. gussonei* Rouy (1912: 45), *N. intermedius* Loisel. (1806: 191). and *N. redoutei* Rouy (1912: 46), which did not acclimatize well, and disappeared soon after the cultivated crops were abandoned. Thus, these binomes (species originally described in France) have little taxonomic significance, since they clearly are derived from clones or cultivars most closely related to the *N. italicus* Ker Gawl. *s.l.* group, with some probably originating from growing in other regions such as Italy.

The numerous taxa described as having bicoloured flowers, such as the 32 species of the genus *Hermione* named by Jordan and Fourreau (1866–1868) and whose origin is somewhat ambiguous ("*patria incognita* ", "*gallo-provinciale* ") could correspond to simple morphological variations propagated clonally. A similar situation occurs amongst the forms described by Gussone (*N. canaliculatus* Guss (1855: 329), *N. elatus* Guss. (1851:

627), *N. obliquus* Guss. (1851: 627), *N. varians* Guss: ex Parl. (1858: 141) or F. Parlatore (*N. bertolonii* Parl. (1858: 132), *N. etruscus* Parl. (1858: 146), *N. puccinelli* Parl. (1858: 133) , *N. ricasiolanus* Parl. (1858: 147), *N. siculus* Parl. (1858: 149), *N. vergellensis* Parl. (1858: 148). All these clones have arisen from polymorphism of *N. tazetta*. Interestingly, several botanists were fully aware that they were classifying native species, introduced plants and cultivars by the same scheme, yet accepted and even defended such approach: "It would appear, based on works from the 15th to 17th century, that the number of species of *Narcissus* is significantly greater than we are aware: at this time, studies even of the most common flowerbed plants was not neglected, and differences were noted with care; today these plants are abandoned to florists, and common species in our gardens are much overlooked by botanists" (Redouté 1814–1816); "It is grown in ornamental gardens. Mr. Loiseleur said that M. Robert found the wild var. α near Toulon, and that var. β is also believed to grow in the south" (De Candolle 1815). However, they could not resist the tropism of *Narcissus*: "The large number of species ... forces me to reproduce here, this entire beautiful genus" (De Candolle 1815). More recently, convinced by a "dynamic origin of the species" following which hybridization is one of the "dei piu efficienti meccanismi citogenetici dell'evoluzione della specie", Maugini (1952, 1953) sharply criticized Levier's interpretations made in 19th century, which this author considered as backwards, as for Levier, *N. bertolonii* and *N. aureus* were obviously very old horticultural varieties ("*ora sconosciute e dimenticate, delle quali nessuna tradizione orticola ci trasmise i particolari*").

Most of these *Narcissus* have been recorded as originating mainly from the territories bordering the Ligurian Sea and to a lesser extent the Tyrrhenian Sea, which were major areas for the first floral productions and floral selections. Virtually all of these species are, however, simultaneously cited in the early 20th century as: wild, spontaneous (escaped

from field) and cultivated (Albert & Jahandiez 1908). Most herbaria sheets, in which they are represented, also date from this period (and then more or less escaped from flowerbeds). Daffodil industry has undergone major changes in techniques used, varietal palette and most specifically location of production areas. Between 1980 and 1990 the *Narcissus* crop field surface area of France and Italy fell from 100 to 50 ha, while world production area was 7600 ha (Hanks 2002). Today, in France and in Corsica, all these "species", originally described as belonging to the south of France can only be found in a few horticulturists and collectioners. A similar situation of rarefaction can be found in Italy. The high numbers of taxa described over the last two centuries in these floral crop areas are, therefore local or imported horticultural varieties. However, it cannot be ruled out that some clones are native forms (horticulturalists' "botanical species"), found here and there in the Mediterranean and brought to Provence and Liguria for cultivation. The *N. tazetta* observed at present in Andalusía probably escaped from cultivation (Valdés 1987, Navarro 2009).

Unfortunately, at present, it is impossible to distinguish the old horticultural varieties from natural clones. Subsequently, we could adopt, with prudence, the name of *N. tazetta* L. subsp. *tazetta* for plants with bicolor flowers (yellow / orange corona and white free tepals). The truly yellow concolourous flowers are mostly cultivars and/or wild populations of unknown origin that we report here as *N. tazetta* subsp. *italicus* (Ker Gawl.) Baker (1888: 8) (see all described forms from France and Italy, cited above). In Malta and some rocky Sicilian places, plants with less glaucous leaves bloom in autumn (October to mid December). The correct name of this subspecies remains unclear, possibly *Narcissus tazetta* subsp. *biancae* (Tod.) Fridl. **stat. nov.** ≡ *N. biancae* Tod. Index Seminum Panorm. ann. 1857: 43 (1858) = ? *N. tazetta* subsp. *siculus* (Parl.) Fridl. **stat. nov.** ≡ *N. siculus* Parl. Flora Italiana III: 149 (1858). = *N. lanzae* Lojac) = ? *N. lanzae* Lojac (1909: 84).

Plants with yellow corona and yellowish white or very pale yellow free tepals, that can still be seen occasionally in nature (e.g., Mallorca and Sardinia), could be considered as simple natural and fertile variations of *N. tazetta* subsp. *tazetta*. This would therefore place them closer to *N. intermedius* Loisel. 1806: 191) or *N. ochroleucus* Loisel. (1810: 163) (= *N. tazetta* subsp. *ochroleucus* (Loiseleur-Deslongchamps) Baker), which appear to be the oldest binomes to have been used for such flower colours. Many clones are found in various horticultural collections with these names, some of which are sterile and unambiguously of hybrid origin. However, it cannot be confirmed if some of them really are the plants described originally by Loiseleur- Deslongchamps (1806, 1810).

4. *Narcissus tazetta* in Algeria

In North Africa, Maire (1959) identified 6–7 subspecies and 3 varieties of *N. tazetta*. However, the author's proposed classification is often confusing and sometimes contradictory [cf. subsp. *gussonei* (Rouy) Maire (1937, 28: 381), subsp. *aureus* (Jordan et Fourr.) Baker (1888: 9)]. The *N. tazetta* is known throughout the Tell in Algeria (Quézel & Santa 1962) where it is very popular and extensively harvested for markets (Fig. 1). As in Europe, many populations are subsponaneous and/or more or less maintained to allow picking of daffodils. This is particularly the case in the plains, valleys and around certain towns where the native origin of *Narcissus* populations is impossible to establish, due to the magnitude of ecological and agronomic transformations which took place from 1830 to 1950, when numerous entire ecosystems were wiped out for agronomic purposes (Chevassut *et al.* 1958), and completed for 50 years of forest destruction by fires, and growing urbanization (Bouazza *et al.* 2001, Amirouche & Misset 2009). In Chetma (Biskra), an arborist even reported to us that the *N. tazetta* present in his palm grove had been brought there from the northern coastal plains!

It would seem reasonable to adopt, at least temporarily, the same nomenclature approach in Algeria as in Europe: eastern Algerian bicolor plants may correspond to *N. tazetta* subsp. *tazetta* (*N. tazetta* subsp. *bertolonii* auct. var. *discolor* Batt., *N. tazetta* subsp. *eutazetta* Briq. 1910: 326).

The yellow concolourous flowers are more common in the west, notably in Algiers and Oran where *Hermione tazetta* var. *algerica* Roemer and *N. algirus* Pomel (1875: 384) were described, compared to the east where bicolor corollas dominate (Fig. 1). Such plants “jaune très pâle [very light yellow]” (Pomel 1874), “*tepala sulfurea*” (Maire 1937), “jaune plus ou moins foncé ... / ... jaune vif [more or less dark yellow ... bright yellow]” (Maire 1959), were understandably reported by our predecessors as binomes designating yellow concolourous European plants that we include in the *N. tazetta* subsp. *italicus* (see above, i.e. *N. tazetta* L. subsp. *bertolonii* (Parl.) Baker, *N. tazetta* subsp. *bertolonii* var. *primulinus* Maire). However, in many populations of *N. tazetta* subsp. *tazetta* of Algeria some individuals are bi-colored and others have yellow or yellowish white tepals. All these forms clearly correspond to an east-west transitional variability of tepal color suggesting an allele expression of variable frequency following an east-west cline. Our first cytogenetic studies (Boukhenane et al. 2015) however demonstrate they all forms have $2n = 20$ chromosomes, and identical karyotype to bicolor plants. This finding would therefore make these plants distinct from European *N. tazetta* subsp. *italicus*, as defined above, which have $2n = 22$ chromosomes and whose naturalness in Algeria remains unclear. These latter *Narcissus* represent a variety of yellow tepaled *N. tazetta* subsp. *tazetta* which may correspond to those described in the neighborhood of Oran by Pomel (1874): ***N. tazetta* L. var. *algirus* (Pomel) Fridl. stat. comb. nov.** (\equiv *N. algirus* Pomel Nouv. Mat. Fl. Atlantique 2: 384 (1874 [1875])).

However, it would seem we still cannot decide on the appropriate epithet because (1) the oldest binomes that apply to these types of colors are of plants whose origins and morphologies are relatively unclear (i.e., *N. ochroleucus* and *N. intermedius*), (2) other names apply to horticultural or subsontaneous forms, or may be wild but distinct *Narcissus* taxa (cf. *N. tazetta* subsp. *italicus* s.l.), (3) the status of *Hermione tazetta* var. *algerica* Roemer (= *N. tazetta* subsp. *bertolonii* var. *algericus* (Roem.) Maire & Weiller (1959, 6: 70) remains uncertain. This last species is presently being studied.

Concolourous white flowered narcissi are clearly distinguishable from *N. tazetta* and may be related to the polymorphic *N. papyraceus* Ker. Gawl. 1806, 24: 947 (incl. *N. gennarii* Parl. (1858, 3: 130), *N. barlae* Parl. (1858, 3: 129), *N. unicolor* Ten. (1811, 1: 144), *N. panizzianus* Parl. (1858, 3: 128)). The status of *N. pachybolbus* Durieu (1846, 2: 425) and *N. tortifolius* Fernández Casas (1977, 8:43) remains controversial (Aedo 2013). *N. tortifolius* is often confused with *N. dubius* Gouan or *N. papyraceus*; moreover, these taxa are sometimes viewed as simple variants of *N. papyraceus* or even of *N. tazetta* by some authors. With the current state of knowledge, we propose maintaining the following 4 taxonomic entities: *N. papyraceus*, abundant at low altitudes and widely cultivated (South of the Iberian and Italian peninsulas, northern Morocco, etc.); *N. Pachybolbus*, of the Oran and Tlemcen regions; *N. pachybolbus* Durieu subsp. *tortifolius* (Fernández Casas) **Fridl. comb. stat. nov.** (≡ *N. tortifolius* Fernández Casas, Saussurea (8)33: 43, 1977), of south-east Spain; and *N. dubius*, a Franco-Iberian endemic species, scattered in scrubland and arid hills of the Mediterranean from Alicante to Provence.

In Constantine Tell, wild narcissi are bicoloured with free white tepals (*Tazettinae bicolor*) and thus all belong indisputably to *N. tazetta* subsp. *tazetta*. Studies of numerous populations, however show there are in fact two very distinct daffodils: one grows in damp meadows and fully corresponds with *N. tazetta* subsp. *tazetta* from French and Spanish

“classical localities”, the other is found in the rocky grasslands of the high mountains of eastern Algeria. As no binome currently exists for this pretty little arid growing daffodill, we will describe it below.

5. Taxonomy

Narcissus bellirius Fridl. & M. Boukhenane, *spec. nov.* (Fig. 1g-h, 2, 3a-b, 4e)

Bulbus globosus-subglobosus ($m = 27-37 \times 24-34\text{mm}$), *solitarius cum tunicis fuscis*. 2–3(4) *Folia saepe erecto-patentia et decumbentia, aut procumbentia aliquando decumbentia, raro erecta, semiteretia vel subcanaliculata ; longe linearia, 30–50cm longa, 6–11mm larga, saepe canaliculata; limbi glaucescentes-viridentes. Scapus angulosus 17–33cm in anthaese, subteres-teres, nunc obtusangulatus, nunc crenatus-striatus; generatim plus minus lacunosus in apice, numquam in basi. Scapi juniores obliqui : ubi e terra exeunt sunt obliqui, deinde erecti fiunt. Tubus corolae 18–22mm longus. Tepala candida, formis variis, saepe late obovata, aliquando inaequalia ; tepala exteriora saepe mucronata (9–12.5mm longa, 6–9.5mm larga), interiora saepe mutica vel subretusa. Corona armeniaca nitida vel luteo-aurantiaca paene tam alta quam larga (diam. 4.5–6.5mm). Stylus 17–22.5mm longus; stigma inter stamina inferiora et stamina superiora. Antherae luteae, 3.4–3.5mm longae.*

N. tazetta (L.) subsp. tazetta differt : *bulbus brevior* ($m = 32\text{mm}$) *et plerumque solitarius* (*versus* $m = 43\text{mm}$ *et aggregatus in* *N. tazetta*) ; 2–3(4) *folia angusta, m = 8.5mm larga* (4–5 *folia per bulbo, latitudo m = 18.5mm in* *N. tazetta solum in montibus cirtensibus*) ; *scapus plenus in basi (cavus in omni longitudine in* *N. tazetta)* ; *spatha generaliter cum 3–7 floribus (7–14 in* *N. tazetta)* ; *in pascuis siccis et collibus petrosis (in pratis udis in* *N. tazetta)*.

Habitat:—*in montibus borealis Numidia, ad Cirtam (in ditione Constantinae et Guelmae).*

Etym.:—*Hic Narcissus nominatur “belliri” in Algeria.*

Type:—ALGERIA. Constantine: Djebel Ouahch, 960 m, versant caillouteux en pâturage ovin semi extensif, refus dominé par le Diss (*Ampelodesmos mauritanica* (Poir.) T. Durand & Schinz) et quelques buissons souvent épineux (cistes, calicotome) ; les premières fleurs associées à celles des *Narcissus* sont *Anemone palmata* L., *Ophrys tenthredinifera* Willd. et *Romulea sp. pl.* [Rocky slope in semi-extensive ovine pasture, refus dominated by Diss and some shrubs often spiny], 2 Mars 2014 *Khalfallah & Fridlender* (holotype CLF 104628!, isotypes P!, herbier privé *Fridlender*). **Icon.:**—Fig. 1–4.

Description:—Geophyte with compound bulb units (Hanks 2002) generally small or unbranched, sub-globose to broadly ovate of 2.5–3.5 cm (height $m = 32.1 \pm 5.82$ mm, diameter $m = 29.13 \pm 5.44$ mm); with reduced vegetative propagation; dark to brownish-black smooth tunics.

Erect-decumbent or sometimes procumbent leaves, limbs rarely erect, often bent (erectopatient), grouped in 2–3 [4] ($m = 2.9 \pm 0.6$), long linear 30–50 [85!] \times 0.7–0.9 cm ($m = 413 \pm 11 \times 8.5 \pm 2.6$ mm). Channelled leaf blades of variable section (often trapezoidal), more or less glaucescent, dark green.

These narcissi are synanthous, but, especially at high altitudes, the inflorescence appears shortly after leaf emergence and long before foliar full development. The floral scape usually grows bent and gradually straightens at anthesis. The scape is quite variable: subterete to obtuse angled, rarely sub-ancipitate. In full bloom it usually measures between 20 and 30 [45!] cm ($m = 252 \pm 83$ mm) growing continuously until fruiting. At its base it is always solid becoming lacunate in its upper part (Fig. 3). Numerous scapes have only 2–3

flowers but in all populations there are individuals (presumably older ones) carrying 10–14 [15!] flowers; most commonly scapes bear 4–7 flowers ($m = 5.7 \pm 2.5$). Young corollas are sometimes yellowish, greenish or dirty white, but adult flowers have tubes and free tepals of clear white or ivory with yellowish-orange corona. Flowers have slightly flared tubes, $m = 19.77 \pm 2.07$ mm in length. Internal tepals are slightly smaller than the external ones ($m = 10.38 \pm 1.68 \times 7.13 \pm 1.42$ mm, versus $m = 10.65 \pm 1.67 \times 7.78 \pm 1.63$ mm). Petal limbs of different shapes: sometimes unequal, broadly obovate to ovate-cordate, with external petals usually terminated by a thickened tip (mucronate), and internals more often simply retuse (rarely subulate or awl-shape cucullated). The diameter of coronas (4.5–6.5 mm) is slightly greater than the height (4–6 mm), $m = 5.06 \pm 0.81 \times 5.40 \pm 0.91$ mm (Fig. 1–2). White styles, 18–22 [26!] mm long ($m = 19.86 \pm 2.56$ mm) for long styled flowers; styles are occasionally positioned above the upper stamens. Stigmata are generally situated between the two anthers levels, but, as in *N. tazetta* L., there are some brevistyle flowers (style 10–12 mm) of varying number, depending on the population (approximately 8% of the individuals). Internal stamens are 16–19 mm long ($m = 17.72 \pm 1.67$ mm) and outer stamens 20–24 mm ($m = 22.42 \pm 1.98$ mm); internal and external anthers are identical, yellow. Anther's length is 2–4 mm ($m = 2.89 \pm 0.37$ mm) but it appears quite variable between individuals (Fig. 2). Flowers have a slightly fruity perfume, sweeter than that of *N. tazetta*, and not as heady in an enclosed space as that generated by *N. tazetta*. Ovary: 5–12 mm long at anthesis ($m = 7.99 \pm 2.05$ mm); fruit: capsule of about 1 cm long.

Narcissus bellirius is smaller than the *N. tazetta* subsp. *tazetta* from Constantine (bulb $m = 32.1 \times 29.1$ mm, leaves $m = 41.3 \times 0.85$ cm, scape $m = 25$ cm at flowering (versus $m = 42.8 \pm 5.8 \times 42.4 \pm 5.1$ mm, $m = 43.8 \pm 5.7 \times 1.9 \pm 0.34$ cm, $m = 44.8 \pm 5.8$ cm for *N. tazetta*). It also differs in many other characteristics. In cross section (Fig. 3), leaves of *N. bellirius* are much narrower and trapezoidal in shape (rather than elliptical as in *N. tazetta*);

scapes are rather terete-angular (rarely elliptic) in shape, and more or less lacunar towards their upper parts in *N. bellirius* (almost entirely hollow and somewhat circular or not often circular ancipitate in *N. tazetta*). It is generally less floriferous with 4–7 flowers compared to 8–11 ($m = 9.3 \pm 2.8$) in *N. tazetta* from Constantine. The flowers are very similar yet averaged measurements performed on numerous flowers highlight some differences: the floral tube is generally more elongated ($m = 19.8$ mm versus $m = 18.71 \pm 1.73$ mm); corona height is barely shorter than width ($m = 5.06 \pm 0.81 \times 5.40 \pm 0.91$ mm), whereas in *N. tazetta* from Constantine it is much more flared ($m = 5.37 \pm 0.95 \times 7.72 \pm 1.13$ mm), with a ratio of diameter/length of $m = 1.09 \pm 0.23$ in *N. bellirius* against $m = 1.48 \pm 0.32$ in *N. tazetta*. Furthermore, although the average length of the outer stamens is the same in both taxa, the difference between the length of the inner and outer stamens is greater in *N. bellirius* ($m = 4.70 \pm 1.11$ mm versus $m = 3.75 \pm 1.57$ mm in *N. tazetta*), which does not however, show a styler polymorphism as marked as in the *N. tazetta* (Dulberger 1964, Arroyoa & Dafni 1995). In the Constantine area, at the same altitude, *N. bellirius* always blossoms later than *N. tazetta* (March–April versus February–March), but in cultivation in Marseille, it is sometime the contrary.

For certain characteristics, *N. bellirius* would seem to be related to the description of *N. patulus* Lois. provided by Loiseleur-Deslongchamps (1806, 1828) or De Candolle (1815), "*N. foliis glaucescentibus subcanaliculatis patulis, scapo subcylindrico 2–4-floro (rarius 5–6-floro)*", "its leaves are spread, very narrow, glaucous, quite strongly curved; 2-lines thick [5 mm]". In addition, *N. patulus* grows in siliceous rocks of the Stoechades coastlines, an archipelago which is well known for hosting relictual plants, including most notably southern Mediterranean species, which have taken refuge there. In this archipelago, localisation of "classical localities" has not changed for a century (Albert & Jahandiez 1908) but we observed a disconcerting polymorphism within *N. tazetta* subsp.

tazetta individuals, high vegetative propagation as well as solitary bulbs, small, narrow and partially decumbent leaves; nonetheless, their foliage does not really correspond to the first assessment and descriptions (see above). Additional studies (culture, cytology) will perhaps help us to understand if they represent introgressed populations (with extensively cultivated *N. tazetta*) or if they are extreme forms due to growth in coastal rocks. The dimensions of all plant parts, as well as the shape of leaves and scapes varied significantly between individuals from the same population, making it imperative to compare a high number of plants. In any case, the *N. patulus* of Stoechades look closer to *N. tazetta* and are very different from *N. bellirius*.

Distribution and ecology:—up to now, *N. bellirius* seems to be endemic to Constantine and Guelma Mountain in more or less rocky areas above 800m. Nevertheless, field observations remain too scarce (one week in March), so it is probably present in other Numidian mountains. Various localities of *Narcissus* had to be checked (i.e., SKIKDA, *Narcissus* sp. in vegetative stage, Djebel Filfila, *Quercus suber* forest, 5 March 2014, Fridlender s. n., private herbarium!). Individuals, with a single axis each, grow isolated from each other, hence never form dense clumps of flowers nor flower-covered meadows, as observed with the proliferative *N. tazetta* (Fig. 4).

Eponymy:—In Algerian Arabic, “belliri” is the common name used for both *Narcissus tazetta* and *N. bellirius*; in Constantine area some shepherds use the distinct local name “bhar” for *N. bellirius*.

Additional specimens examined of *Narcissus bellirius* from Algeria:—

CONSTANTINE: Djebel Ouahch, 1045m, diss mountain pastures (*Ampelodesmos mauritanicus* (Poir.) T. Durand & Schinz) with *Calicotome spinosa* (L.) Link and some *Pinus halepensis* Miller, 2 March 2014 Khalfallah & Fridlender (Fridlender s.n., private

herbarium!); *loc. ibid.* 865m, extensive diss grazed slope with abundance of chamaephytes (*Calicotome...*), 3 March 2014 *Khalfallah, Boukhenane & Fridlender* (CLF104629!); *loc. ibid.*, 840–880m, partially grazed area below degraded Oak and Pine forest, 3 March 2014 *Khalfallah, Boukhenane & Fridlender* (CLF 104630!). —GUELMA, Ras el Akba, 1200m, dry extensive Tell pasture, 5 March 2014 *Fridlender* (*Fridlender* s.n., private herbarium!).

Specimens of *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* from Algeria cited:—CONSTANTINE : Djebel Ouahch, 840m, in a wet meadow and among tall grasses in water oozing , 3 March 2014 *Khalfallah, Boukhenane & Fridlender* (CLF 104631!). —GUELMA, Ras el Akba, 860–880m, almond tree planting area in a damp valley, 5 March 2014, *Khalfallah, Boukhenane & Fridlender* (CLF 104632!).

Conclusion

With probably less than 3000 species, Algeria hosts 256 endemic taxa, as well as approximately 300 endemic species in common with Morocco (Enríquez-Barrosos & Gómez-Campo 1991). Algeria however has always been considered floristically poor in comparison to Morocco (with 1130 endemic species including 830 strictly endemic to Morocco) and in particular the East of the country, which is often considered as "an area of little interest" for its flora (Quézel 1964). This view may well reflect a lack of knowledge of the area, due to the difficulties experienced in accessing and exploring it since the early 19th century (Alcaraz 1976). Recently, Yahi *et al.* (2012) identified the Djebel Ouahch as an "Important Plant Area", characterized by the presence of 6 "trigger species" including *Erodium choulettianum* Coss. (= *E. asplenoides* (Des.) Willd.). Therefore, in the *E. foetidum* (L. Nath.) L'Hér. complex, this *Erodium* of mountains of Constantine would be a vicariant of *E. cheilanthifolium* Boiss. endemic to the south-eastern Iberian mountains. Finally autumn-flowering daffodils present in the Constantine mountains (*N. serotinus* L.,

N. elegans (Haw.) Spach.), also show a remarkably similar polymorphism. The discovery of this new *Narcissus* makes it clear that the east-Algerian mountains are of biogeographical interest where little is known yet. It is also the first known North African endemic *Narcissus* which is strictly Algerian (about 10 endemics in Morocco).

The centre of the *Narcissus* diversity is probably not restricted to the Baetic-Riffian area, even if it is a major centre of endemism and biodiversity (Galland 1988). Cytological and genetic studies will further help to elucidate the relationships and affinities among all these narcissi taxa.

Acknowledgements

We would particularly express our gratitude to Joan Vallès for critical reading of manuscript, Jean Louis Charlet for Latin translation and Ugo D'Ambrosio and Fabrice Paraque for English revision.

Figure captions

FIGURE 1. a–f. *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* flower polymorphism in Algeria: **a, e, f.** White free tepals; **b.** White and white-yellowish tepals in one Guelma population; **d.** Concolourous yellow flowers from Algiers (*Hort. Constantinae*); **f.** Varying size of flowers from the same population (Constantine); **c.** Very large corona and visible anthers; **e.** Herb vendor with a display of daffodils. **g– h.** *Narcissus bellirius*: **g.** unusual very long styled flower (compare to more classical one in **h**). *Photographs: A. Fridender, Algeria, March 2014.*

FIGURE 2. Silhouettes of a few *Narcissus bellirius* flowers. Notice the position of the flowers (erect bud, flower in early horizontal bloom, then straightening when it fades, the fruits being in a vertical position (Constantine); biflore scape at the beginning of anthesis (Guelma); anthers length variability in 3 long-styled flowers (Dj. Ouahch 960m type locality). *Illustrations: A. Fridlender, Algeria, Constantine 2 March 2014 & Guelma 5 March 2014.*

FIGURE 3. Comparison of successive cross sections of leaves and scapes from bottom (left) to top (right). **a–b.** *Narcissus bellirius*: **a.** Scape and scape axillary leaf in three separate individuals (Constantine), **b.** Tri-foliolate axis and successive limbs cross sections (Guelma): limbs (usually asymmetric), irregular striated margins, depressed trapezoidal, trapezoidal biconcave, plano-convex; scape ellipsoidal becoming more or less irregular, lacuna appearing progressively toward the top, slightly elliptical and almost entirely lacunar, quickly becoming empty and weakly striated ancipitate. **c–e.** *Narcissus tazetta* subsp. *Tazetta*: **c, d.** Scape and the scape axillary leaf in two distinct individuals (Constantine); **e.** Scape and leaves from three individuals (Constantine): blade leaf section open V or open U, sometimes more or less bent but never trapezoidal, more or less concave becoming linear elliptic; hollow scape along

its entire length, circular ellipsoid, obtuse to acute angled. *Illustrations: A. Fridlender, Algeria, March 2014.*

FIGURE 4. Ecology of *Narcissus tazetta* and *Narcissus bellirius* in Algeria. **a, b.** *Narcissus tazetta* in wheat meadow and underneath almond tree; **c.** Ras el Akba area viewed from top of the Tell: foreground *N. bellirius* stony diss pasture habitat (1100–1200m), middle ground *N. tazetta* fresh humide valley habitat (750–850m); **d.** Aspect of Tell top covered by *Ampelodesmos* and *Asphodelus* extensive pasture in Guelma at the beginning of *N. bellirius* blooming; **e.** *Narcissus bellirius* protected from sheep and goat by *Asphodelus*. *Photographs: A. Fridlender, March 2014.*

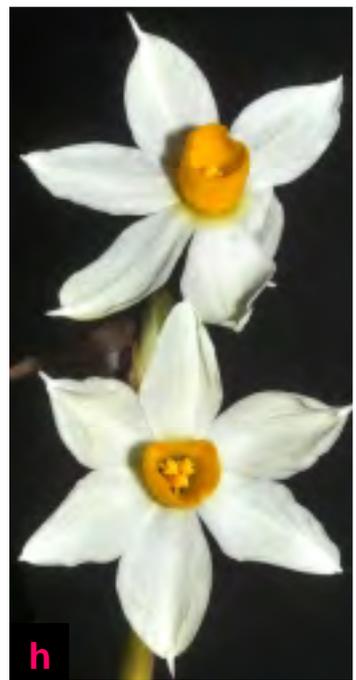
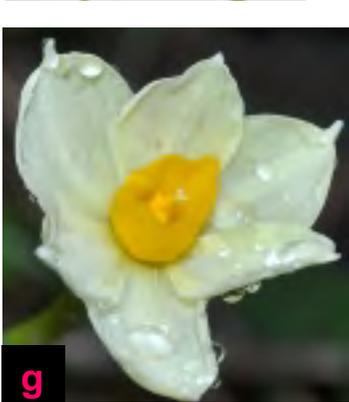


Fig. 1

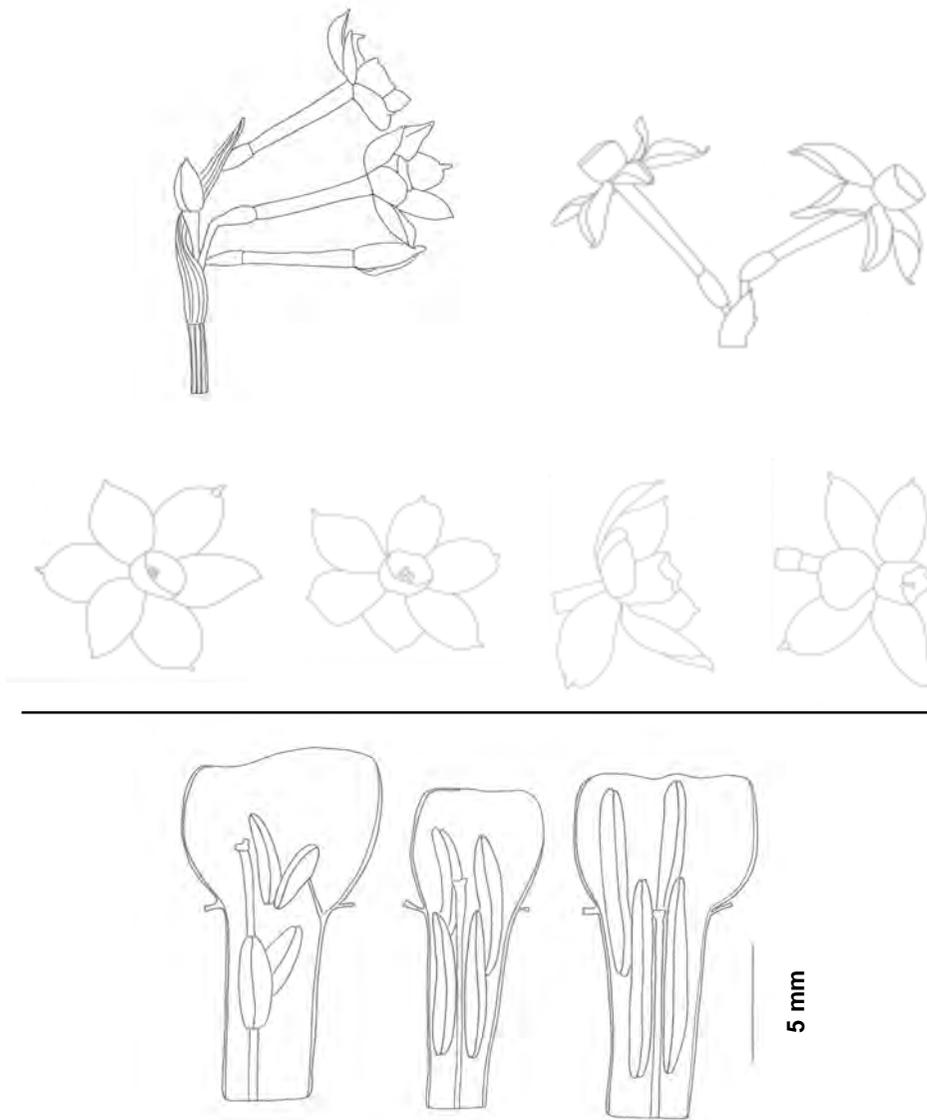


Fig. 2

Fig. 3

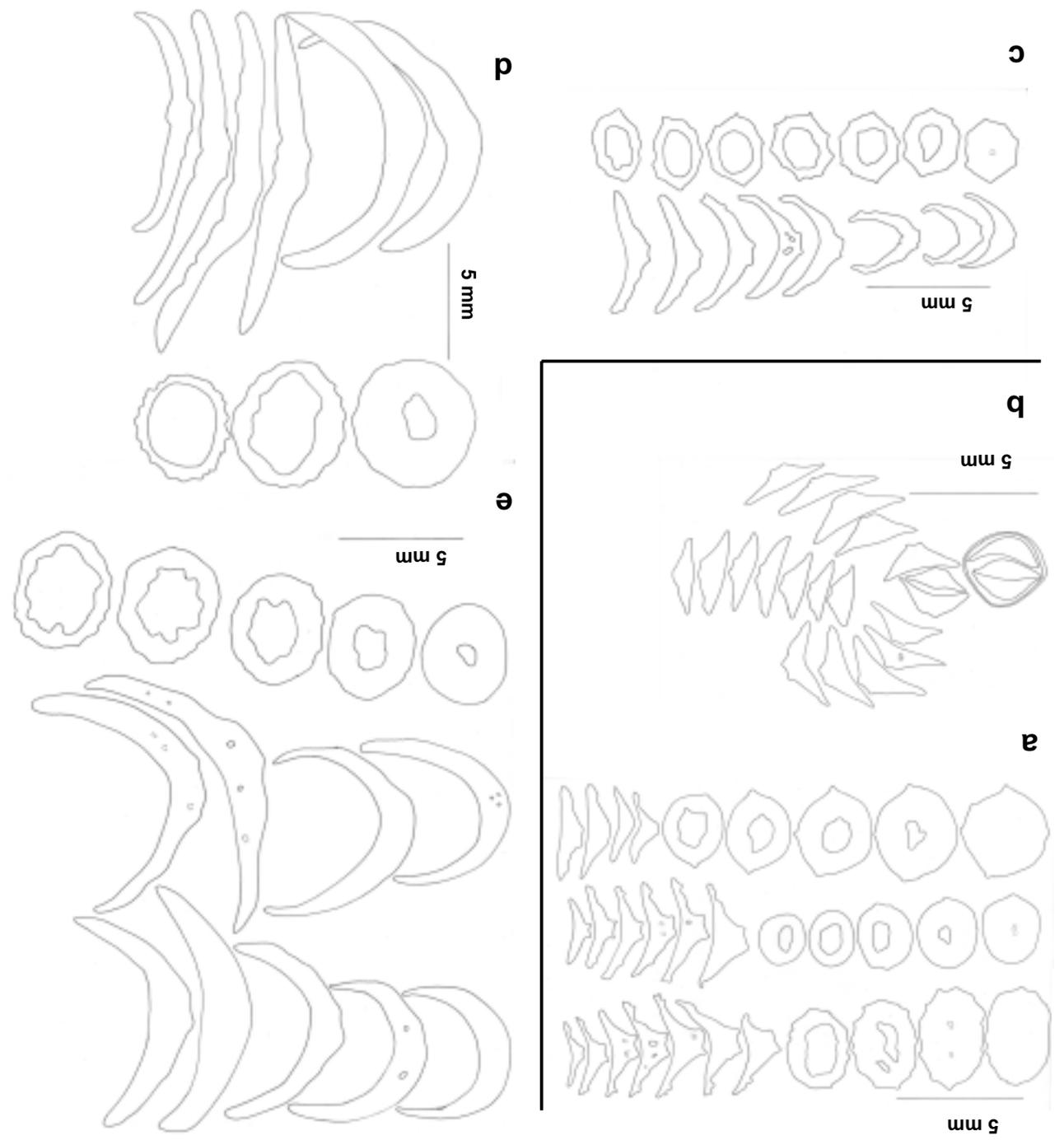




Fig. 4

Conclusion générale et perspectives

Dans une première approche, une étude cytogénétique associée à une évaluation de la taille du génome a été réalisée sur 12 populations de *N. tazetta* L., dont 10 algériennes étudiées pour la première fois dans ce domaine de recherche.

Les techniques classiques nous ont permis d'établir le dénombrement chromosomique et le niveau de ploïdie. Chez neuf populations, le nombre chromosomique était $2n=2x=20$ ($x=10$). Trois populations algériennes présentaient un nouveau nombre chromosomique avec un nouveau nombre de base au sein du genre ($2n=2x=18$, $x=9$).

Grâce aux techniques moléculaires nous avons pu détecter une variabilité interpopulations dans le nombre et l'intensité des régions d'ADN riches en GC ainsi que des marquages des gènes ribosomiques 5S et 35S. Une imparité intra-individuelle des signaux 5S et 35S a également été observée dans cette étude.

L'analyse de la quantité d'ADN génomique nous a permis de constater une différence négligeable entre les deux taxons à $2n=20$ (26.7 pg) et celui à $2n=18$ (26.6 pg).

Tous ces résultats nous ont conduits à établir un nouveau nombre chromosomique ($2n=18$) avec un nouveau nombre de base ($x=9$) dans la section *Tazettae*. Ces résultats combinés à nos propres observations suite à nos sorties sur le terrain et à une analyse biométrique nous ont amené à décrire une nouvelle espèce au sein du genre : *Narcissus bellirius spec. nov.*

***Narcissus bellirius* Fridl. & M. Boukhenane, spec. nov.**: Herbe glaucescente à verte sombre, synanthée. Bulbe sub-globuleux à ovale légèrement déprimé (2,9 cm diam. et 3,2 cm Haut.), a tuniques lisses, brune-noirâtre, portant souvent un seul axe, les plus jeunes souvent isolés et les plus âgés se multiplient rarement. Scape florifère sub-cylindrique, anguleux ou crénelé, rarement sub-ancipité, a base pleine ne devenant lacunaire que dans

sa partie supérieure, atteignant jusqu'à 45 cm à la fructification. Feuilles 2 à 4, procumbantes, rarement dressées, souvent recourbées, longuement linéaires atteignant jusqu'à 75 cm à la floraison, plus ou moins étroites (8,5 mm larg.). Inflorescence 4 à 7 fleurs a tépales libres blanc intense ou blanc ivoire les externes à peine plus larges que les internes. Paracorolle cupuliforme, courte (5 mm), jaune foncé. Fleurs odorantes. Tube faiblement évasé atteignant 2cm de long. Etamines 6 (3 internes et 3 externes), anthères internes et externes identiques, jaunes, longues de 2 à 4 mm. Style blanc long de 18-22[26 !] mm, quelques individus ont des fleurs brévistyles. Ovaire long de 5 à 12 mm à l'anthèse. Fruits : capsule de 1 cm de long. Floraison : Mars-Avril. $2n=18$.

Narcissus tazetta L. s.l. est un complexe spécifique très polymorphe, en perspective, nous proposons:

1. D'élargir l'échantillonnage de nos populations le long d'un transect Est-Ouest et Nord-Sud pour évaluer l'ampleur du polymorphisme caryotypique (niveau de ploïdie, aneuploïdie, chromosome B, gènes ribosomiques) et morphologique (couleur des tépales) résultant des hybridations au sein de ce complexe.
2. De réaliser une analyse phylogénétique pour consolider notre théorie sur le phénomène de spéciation observé dans cette étude.

Références bibliographiques

- Aedo C (2010) Typifications of the names of Iberian accepted species of *Narcissus* L. (*Amaryllidaceae*). *Acta Botanica Malacitana* 35: 133–142.
- Aedo C (2013) *Narcissus* L. In Castroviejo S (ed.). *Flora Ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e islas Baleares*. Real Jardín Botánico de Madrid–CSIC, Madrid, 20: 340–397.
- Ainsworth CC, Parker JS, Horton DM (1983) Chromosome variation and evolution in *Scilla autumnalis*. In: Brandham PE and Bennett MD (eds) *Kew chromosome conference II*, George Allen & Unwin, London, pp. 261–268
- Albert A & Jahandiez E (1908) *Catalogue des plantes vasculaires qui croissent naturellement dans le département du Var*. Klincksieck, Paris, pp. 455
- Alcaraz C (1976) Recherches géobotaniques sur la végétation de l'Ouest Algérien. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle d'Afrique du Nord* 67(1–2): 20–36.
- Amirouche R & Misset MT (2009) Flore spontanée d'Algérie: différenciations écogéographiques des espèces et polyploidie. *Cahiers agricultures* 18 (6): 474–480. Doi: 10.1684/agr.2009.0347
- Ansari HA, Ellison NW, Reader SM, Badaeva ED, Friebe B, Miller TE, Williams WM (1999) Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S-26SrDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. *Ann Bot (Oxford)* 83: 199–206
- Aquaro G, Capparelli KF, Peruzzi L (2008) Numeri cromosomici per la flora Italiana. *Inform Bot Ital* 40(1): 91–95
- Arano H, Saito H (1980) Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in subtribe *Seselinae*. *Kromosomo* 17: 471–480
- Baker JG (1888) *Handbook of the Amaryllideae*: 9
- Bareka P, Siljak-Yakovlev S, Kamari G (2012) Molecular cytogenetic of *Bellevalia* (Hyacinthaceae) species occurring in Greece. *Pl Syst Evol* 298(2): 421–430

- Barra A, Blanco E & Grijalbo J (2011) Narcisos ibéricos : junquillos, campanillas, capirotes o trompones. *Quercus* 301: 40–52.
- Baziz K, Benamara-Bellagha M, Pustahija F, Brown CS, Siljak-Yakovlev S, Khalfallah N (2014) First karyotype analysis, physical rDNA mapping and genome size assessment in four North African *Astragalus* taxa (Fabaceae). *Turkish J Bot* 38: 1248–1258 doi: 10.3906/bot-1405-40
- Bennett MD, Leitch IJ (2011) Nuclear DNA amounts in angiosperms - targets, trends and tomorrow. *Ann Bot (Oxford)* 107: 467–590 doi:10.1093/aob/mcq258
- Blanchard JW (1990) *Narcissus*: A guide to wild daffodils. Alpine Garden Society, Surrey, UK, pp. 203
- Bogunic F, Siljak-Yakovlev S, Muratovic E, Pustahija F, Medjedovic S (2011) Molecular cytogenetic and flow cytometry reveal conserved genome organization in *Pinus mugo* and *P. uncinata*. *Ann For Sci* 68: 179–187 doi: 10.1007/s13595-011-0019-9
- 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. *Pl Biosystems* 147(4): 1228–1237 doi: 10.1080/11263504.2013.861530
- Bouazza M, Mahboubi A, Loisel R & Benabadji N (2001) Bilan de la flore de la région de Tlemcen. *Forêt méditerranéenne* 22(2): 130–136.
- Boukhenane M, Khalfallah N, Pustahija F, Siljak-yakovlev S (2015) Cytogenetic characterization of six populations of *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae) from western Mediterranean. *International journal of advanced research* 3(11): 1538-1546
- Brandham PE, Kirton PR (1987) The chromosome of species, hybrids and cultivars of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). *Kew Bull* 42(1): 65–102
- Brandham PE, West JP (1993) Correlation between nuclear DNA values and differing optimal ploidy levels in *Narcissus*, *Hyacinthus* and *Tulipa* cultivars. *Genetica* 90: 18
- Briquet JI (1910) *Prodrome de la Flore Corse* : 326

- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B–chromosome evolution. *Philos Trans, Sér. B* 355: 163–178
- Candolle AP de (1815) Flore Française ou description succincte de toutes les plantes qui croissent naturellement en France. Desray, Paris, 5(6): 319–327.
- Carchilan M, Houben A (2007) Transcription analysis of rye B-chromosomes. *Chromosome Res* 15: 72
- 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
- Chevassus G, Laby H & Potentier J (ca.1958) Aspects et réalités de l'Algérie agricole. Association des Anciens Elèves de l'Institut Agricole d'Algérie ENA, La Typo-Litho & Carbonel J, Alger, pp.148.
- Clusius C (1576) *Rariorum aliquot stirpium per Hispanias observatarum Historia*. Antverpiae – Ex Officina Cristophori Plantini, Arhitypographi Regij, pp. 264–269.
- Conger AD, Fairchild LM (1953) A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol* 28: 281–283
- Coste H (1901) Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes, 1901-1906. Klincksieck, Paris, 3 volumes, XXXVI+416/627/VII+807.
- Cui L, Wall PK, Leebens-Mack J, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res* 16: 738–749 doi: 10.1101/gr.4825606
- Curtis W (1792) *Botanical Magazine* 6: t. 197
- Curtis W (1806) *Curtis's Botanical Magazine or Flower-Garden*. Vol. XXIII, N° 946–948.
- D'Amato G (2004) Karyotype and heterochromatin characterization in some species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Caryologia* 57(1): 99–105

- Datson PM, Murray BG (2006) Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Res* 14: 845–857
- De Dominicis RI, D'Amato G & Tucci GF (2002) On the hybrid origin of *Narcissus biflorus* (Amaryllidaceae): Analysis of C-banding and rDNA structure. *Caryologia* 55 (2): 129–134. Doi : 10.1080/00087114.2002.10589268
- De Dominicis RI, D'Amato G, Tucci GF (2002) On the hybrid origin of *Narcissus biflorus* (Amaryllidaceae): Analysis of C-banding and rDNA structure. *Caryologia* 55(2): 129–134
- Diaz Lifante Z, Camacho CA, Viruel J, Caballero AC (2009) The allopolyploid origin of *Narcissus obsoletus* L. (Alliaceae): Identification of parental genomes by karyotype characterization and genomic *in situ* hybridization. *Bot J Linn Soc* 159: 477–498
- Dobignard A & Chatelain C (2010) Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord. Conservatoire et Jardin Botaniques, Genève, Volume 1: Pteridophyta, Gymnospermae, Monocotyledoneae, pp. 75–80
- Doležel J, Bartoš J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot (Oxford)* 95: 99–110 doi:10.1093/aob/mci005
- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51:127–128
- Donald TM, Leach CR, Timmis JN (1995) Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. *Heredity* 74: 556–561
- Durieu de Maisonneuve MC (1846) In : Duchartre. *Revue Botanique* 2: 425
- Enríquez-Barrosos A & Gómez-Campo C (1991) Les plantes endémiques de l'Afrique du Nord-Ouest : Algérie, Maroc et Tunisie. *Botanika Chronika* 10: 517–520
- Fedorov AA (1969) Chromosome numbers of flowering plants, Academy of Sciences of the USSR, V L Komarov Botanical Institute, Nauka, Leningrad, pp 26–28
- Feinbrun-Dothan N & Danin A (1998) Analytical flora of Eretz-Israel. CANA Publishing House Ltd., Jerusalem, pp.1008

- Fernandes A (1950) La meiose chez *Narcissus poetaz* 'Alsace'. Genet Iber 2: 149–174
- Fernandes A (1951) Sur la phylogénie des espèces du genre *Narcissus* L. Bol Soc Brot 2 (25): 113–190
- Fernandes A (1952) Sur le rôle probable des heterochromatinosomes dans l'évolution des nombres chromosomiques. Sci Genet 4(3): 168–181
- Fernandes A (1963) Sobre a evoluciono no subgénero *Corbularia* do género *Narcissus* L. Mem Acad Ci Lisboa, Cl Ci 8: 3–21
- Fernandes A (1967) Contribution à la connaissance de la biosystématique de quelques espèces du genre *Narcissus* L. Portugaliae Acta Biol Sér, B, Sist 9: 1–44
- Fernandes A (1968) Keys to identification of native and naturalized taxa of the genus *Narcissus* L. Daffodil and Tulip year book 33: 37–66
- Fernandes A (1975) L'évolution chez le genre *Narcissus* L. Anales Inst Bot Cavanilles 32(2): 843–872
- Fernández Casas FJ (1977) Recuentos cromosomicos en plantas vasculares españolas. Saussurea 8: 33–55.
- Fernández Casas FJ (2002) *Narcissus* L. In: Valdés B, Rejdali M, Achhal El Kadmiri A, Jury JL & Montserrat JM (eds.) Catalogue des plantes vasculaires du Nord du Maroc, incluant des clés d'identification. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Volume II, pp. 879–882
- Ferrer Gallego PP & Laguna Lumbreras E (2013) Nueva propuesta de tipificación de *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae). Bouteloua 14: 111–113.
- Fournier P (1946) Les quatre flores de France, Corse comprise: Générale, alpine, méditerranéenne, littorale. Lechevalier (Ed.), Paris, pp. 1947
- Fridlender A & Pignal M (2013) Les colchiques de Provence: état de conservation et nouveautés taxonomiques. Nature de Provence 2: 19–35.

- Fukushima K, Imamura K, Nagano K, Hoshi Y (2011) Contrasting patterns of the 5S and 45S rDNA evolutions in the *Byblis liniflora* complex (Byblidaceae). J Pl Res 124: 231–244 doi: 10.1007/s10265-010-0366-x
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JR, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220 (4601): 1049–1051
- Galland N (1988) Recherche sur l'origine de la flore orophile du Maroc : Etude caryologique et cyto-géographique. Travaux de l'Institut Scientifique, Rabat, Série Botanique 35, pp. 167
- Garcia S, Garnatje T, Twibell JD, Vallès J (2006) Genome size variation in the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and its cultivars. Genome 49:244–253
- Garnatje T, Hidalgo O, Vitales D, Pellicer J, Valles J, Robin O, Garcia S, Siljak-Yakovlev S (2012) Swarm of terminal 35S in *Cheirolophus* (Asteraceae, Centaureinae). Genome 55(7): 529–535doi: 10.1139/g2012-041
- Gerlach WT, Dyer TA (1980) Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. Nucl Acids Res 8(21): 4851–4865
- Giardina G, Raimondo FM & Spadaro V (2007) A catalogue of plants growing in Sicily. Bocconea 20: 1–582.
- Golczyk H, Hasterok R, Joachimiak AJ (2005) FISH-aimed karyotyping and characterization of Renner complexes in permanent heterozygote *Rhoeo spathacea*. Genome 48(1): 145–153 doi: 10.1139/G04-093
- Gouan A (1773). Observationes Botanicae : 22
- Graham SW & Barrett SCH (2004) Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphism in *Narcissus* (Amaryllidaceae). Amer J Bot 91(7): 1007–1021
- Gregory TR (2005) The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. Ann Bot (Oxford) 95: 133–146
- Guinochet M & Vilmorin R (1978) Flore de France. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, Tome 3, pp. 1135–1138

- Gussone G (1851). In Bertoloni Flora Italica. Vii: 627
- Gussone G (1855). Enumeratio Plantarum Vascularium in Insula Inarime sponte provenientium vel oeconomico usu passim cultarum., t. 15: 329
- Gussone G ex Parlatore F (1858) Flora italiana. Firenze 3(1): 141.
- Hamon P, Siljak-Yakovlev S, Srisuwan S, Robin O, Oncet ., 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 Res 17: 291–304 doi: 10.1007/s10577-009-9033-2
- Hanks GR (2002) Commercial production of *Narcissus* bulbs. In: Hanks GR (ed.) Narcissus and Daffodil: The genus *Narcissus*. Taylor and Francis, New York, pp. 53–130.
- Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kovalczyk M, Kulak-Ksiazczyk S, Ksiazczyk T, Heneen WK, Maluszynska J (2006) Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. Ann Bot (Oxford) 97: 205–216 doi:10.1093/aob/mcj031
- Haworth A H (1831) Monograph on the *Narcissus*. 1. *Sweet's British. Flower Garden*, t. 92,
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anamthawat-Jónsson K, Leitch AR, Shi M, Leitch IJ (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. Technique 3: 109–115
- Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Garnatje T, Romaschschenko K, Susanna A, Siljak-Yakovlev S (2008) Extreme environmental conditions and phylogenetic inheritance: systematics of *Myopordon* and *Oligochaeta* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae). Taxon 57(3): 769–778
- Hong D Y (1982) A new karyotype for *Narcissus tazetta* L. Hereditas (Beijing) 96: 29–31
- Hongzhi W, Munikote S, Ramanna P A, van Tuyl JM (2011) Genome constitution of *Narcissus* variety, ‘Te^hte-a^h-Te^hte’ analysed through GISH and NBS profiling. Euphytica 181:285–292 DOI 10.1007/s10681-011-0438-6

- 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
- Jamilena M, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M (1994) A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *J Cell Sci* 107: 703–708
- Jang TS, Emadzade K, Parker J, Temsch EM, Leich AR, Speta F, Weiss-Shneeweiss H (2013) Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evol Biol* 13: 136
- Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PS, Soltis DE, Clifton SW, Schlarbaum SE, Schuster SC, Ma H, Leebens-Mack J, de Pamphilis CW (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473: 97–100 doi: 10.1038/nature09916
- Jiménez JF, Sánchez-Gomez P, Guerra J, Molins A & Rosello JA (2009) Regional speciation or taxonomic inflation. The status of several narrowly distributed and endangered species of *Narcissus* using ISSR and nuclear ribosomal ITS markers. *Folia Geobotanica* 44:145–158. Doi : 10.1007/s12224-009-9040-2
- Jones RN (1995) Tansley review no. 85: B-chromosomes in plants. *New Phytol* 131: 411–434
- Jones RN, Houben A (2003) B-chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends Pl Sci* 8(9): 417–423 doi: 10.1016/S1360-1385(03)00187-0
- Jones RN, Viegas W, Houben A (2008) A century of B-chromosomes in plants: So what? *Ann Bot (Oxford)* 101: 767–775 doi:10.1093/aob/mcm167
- Jordan A & Fourreau JP (1866–1868) *Breviarum plantarum novarum (& Icones ad Floram Europae Tomus 1)*, Pitratise, Lyon, Fascicule II, pp. 108–120
- Ker Gawler JB (1806) *Botanical Magazine*. 24: 947
- Ker-Gawler JB (1809) *Botanical Magazine* 29: t. 1188
- Kington S (1989) *The international daffodil checklist*. Royal Horticultural Society, London
- Knight CA, Ackerly DD (2002) Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. *Ecol Lett* 5: 66–76

- Leitch AR & Leitch IJ (2008) Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320: 481–483 doi: 10.1126/science.1153585
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS (1992) Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* 35: 1013–1018
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromere position in chromosomes. *Hereditas (Lund)* 52: 201–220
- Linnaeus C (1753) *Species Plantarum*. L. Salvius, Stockholm, pp.1200
- Loiseleur-Deslongchamps JLA (1806) *Flora Gallica, seu enumeratio in Gallia sponte nascentium*. Vol. 1, pp. 190–191
- Loiseleur-Deslongchamps JLA (1809) In : Desveaux NA, *Journal of Botany* 2: 276
- Loiseleur-Deslongchamps JLA (1810) *Recherches historiques botaniques et médicales sur les Narcisses indigènes, pour servir à l'histoire des plantes de France*, Auduin.
- Lojacono M (1909) *Flora Sicula o Descrizione delle Piante Vascolari Spontanee o Indigenate Sicilia*. Palermo 3: 84
- Mabberley DJ (1998) *The Plant Book*. Cambridge University Press, pp. 858
- Maire R (1937) *Narcissus tazetta* subsp. *Gussonei* Rouy forma *primulinus* Maire. *Bulletin de la Société d'histoire naturelle de l'Afrique du Nord* 28: 380
- Maire R (1959) *Flore de l'Afrique du Nord*. Paul Lechevalier, Paris, Vol. 6, pp. 51–76.
- Maire R & Weiller M (1959) *Flore d'Afrique du Nord* 6: 70
- Maluszynska J (1990) B chromosome of *Crepis capillaris* (L.) Waller. *in vivo* and *in vitro*. University of Slasky, Katowice, pp 1–92
- Maluszynska J, Schweizer D (1989) Ribosomal RNA genes in B chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive *in situ* hybridisation. *Heredity* 62: 59–65
- Marie M, Brown SC (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell* 78: 41–51

- Marques I, Rossello-Graell A, Draper D, Iriondo JM (2007) Pollination patterns limit hybridization between two sympatric species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 94: 1352–1359
- Marques I, Feliner GN, Martins-Loução MA, Aguilar JF (2011) Genome size and base composition variation in natural and experimental *Narcissus* (Amaryllidaceae) hybrids. *Ann Bot (Oxford)* 109: 257–264 doi:10.1093/aob/abq186
- 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
- Mathew B (2002) Classification of the genus *Narcissus* L. In: Hanks, G.R. (ed.). *Narcissus and Daffodil: The genus Narcissus*. Taylor and Francis, New York, pp. 30–52
- Matsuda T, Kaneta H, Nishigaya K (1993) On B chromosome in *Hepatica nobilis*: Detection of nucleolar organizer regions and polymorphism of B chromosomes and Sat-chromosomes. *Sci Rep Yokohama Nat Univ* 40: 19–30
- Maugini E (1952) Osservazioni cariologiche su *narcissus italicus* Ker.Gawl. *Caryologia* 5: 101–112. Doi: 10.1080/00087114.1953.10797430
- Maugini E (1953) Citosistematica di alcuni *Narcissus* della flora italiana appartenenti alla sect. *Hermione*. *Caryologia* 5: 313–341 Doi: 10.1080/00087114.1953.10797449
- Meerow HW & Snijman DA (1998) Amaryllidaceae. In: Kubitzki K. (eds.). *Families and genera of vascular plants*. Springer-Verlag, Berlin, vol.3, pp. 83–110
- 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. *Pl J* 12: 31–37
- Muratovic E, Bogunic F, Soljan D, Siljak-Yakovlev S (2005) Does *Lilium bosniacum* merit species rank? A classical and molecular cytogenetic approaches. *Pl Syst Evol* 252: 97–109 doi: 10.1007/s00606-004-0282-4

- Muratovic E, Robin O, Bogunic F, Soljan D, Solic M E, Siljak-Yakovlev S (2006) B chromosomes in some species of genus *Lilium*. IV International Balkan Botanical Congress, Sofia, Bulgaria, Abstract paper, pp. 187
- Muratović E, Robin O, Bogunic F, Soljan D, Siljak-Yakovlev S (2010) Speciation of European lilies from *Liriotypus* section based on karyotype evolution. *Taxon* 59: 165–175
- Navarro FB (2009) *Narcissus* L. In: Blanca G, Cabezudo B, Cueto M, Fernández López C & Morales Torres C (eds.) *Flora Vascular de Andalucía Oriental*. Conserjería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla, Tome 1, pp. 171–180
- Parlatore F (1858) *Flora Italiana*. Ossa descrizione delle piante che nascono salvatiche o si sono insalvatichite in Italia e nelle Isole ad essa adiacenti. Tipografia Le Monnier, Firenze Vol III, pp. 690
- Paszko A (2006) A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Pl Syst Evol* 258: 39–48 doi: 10.1007/s00606-005-0389-2
- Peruzzi L (2013) ‘x’ is not a bias but a number with real biological significance. *Pl biosystems* 147 (4): 1238–1241 doi: 10.1080/11263504.2013.861533
- Peruzzi L, Eroglu HE (2013) Karyotype asymmetry: Again, how to measure and what to measure? *Comp Cytogenet* 7(1): 1–9doi: 10.3897/CompCytogen.v7i1.4431
- Pignatti S (1982) *Flora d’Italia*. Edagricola, Bologna, Tome 3, pp. 407–409
- Pomel AN (1874) *Nouveaux matériaux pour la flore atlantique*. Savy/ juillet St-lager, Paris/Alger, pp. 384
- Pustahija F (2011) *Genome response to abiotic stress: case of serpentinophyte plants in Central Bosnia*. PhD Thesis. University of Paris Sud and University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina
- Quézel P & Santa S (1962) *Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales*. C.N.R.S., France, Tome I, pp. 215
- Quézel P. (1964) L’endémisme dans la flore de l’Algérie. *Comptes Rendues de la Société de Biogéographie* 361: 137–149

- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004) Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA clustervariability in natural populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(41): 14818–14823 doi:10.1073/pnas.0405817101
- Redouté PJ (1814–1816) *Les Liliacées*. Chez l’auteur, Paris, Tome 1 & 8
- Reeves A, Tear J (2000) MicroMeasure for Windows, version 3.3. <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>.
- Reichenbach L (1847) *Icones Florae Germanicae et Helveticae*. IX : Typhaceae, Irideae, Narcissineae et Juncaceae in *Flora Germanicae recensitae*. Friediricum Hofmeister, Lipsiae, Volumen nonum (11): CCCLXVI-CCCLXCVII.
- Rivera-Núñez D, Obón de Castro C, Ríos Ruiz SS & Alcaraz Ariza F (2003) The origin of cultivation and wild ancestors of daffodils (*Narcissus* subgenus Ajax-Amaryllidaceae) from an analysis of early illustrations. *Scientia Horticulturae* 98: 307–330. Doi: 10.1016/S0304-4238(03)00055-4
- Robert R, Khalfallah N, Martel E, Lamy F, Poncet V, Allinne C, Remigereau MS, Rekima S, Leveugle M, Siljak-Yakovlev S, Sarr A (2011) *Pennisetum*. In: Kole C (ed) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, pp 217–255
- Romero AT, Castillo PMS, Rejón MR (1983) Sobre cariólogía, morfología y corología de *Narcissus tortifolius* Fernández Casas. *Fontqueria* 4: 7–10
- Romero Zarco C (1986) A new method of estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526–530
- Romo A, Hidalgo O, Boratyński A, Sobierajska K, Jasińska AK, Vallès J, Garnatje T (2013) Genome size and ploidy levels in highly fragmented habitats: the case of western Mediterranean *Juniperus* (Cupressaceae) with special emphasis on *J. thurifera* L. *Tree Genet Genom* 9:587–599 doi: 10.1007/s11295-012-0581-9
- Rouy G (1912) *Flore de France*. Société des Sciences naturelles de la Charente-Inférieure, France, Tome 13, pp. 280
- Salisbury RA (1812) *Transactions of the Horticultural Society of London*. 1: 357.

- Schousboe PKA (1800) Iagttagelser over Vextriget i Marokko. (t. 2):157
- Schubert I, Wobus U (1985) *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92: 143–148
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma (Berl)* 58: 307–324
- Shan F, Yan G, Plummer JA (2003) Cyto-evolution of *Boronia* genomes revealed by fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes. *Genome* 46(3): 507–513
- Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Coulaud J, Stoian V, Brown SC, Zoldos V, Jelenic S, Papes D (2002) Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theor Appl Genet* 104: 505–512
- Siljak-Yakovlev S, Stevanovic V, Tomasevic M, Brown S, Stevanovic B (2008) Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*: cytogeography of living fossils. *Environm & Exp Bot* 62: 101–112
- Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Šolić EM, Bogunić F, Muratović E, Bašić N, Catrice O, Brown SC (2010) Towards a genome size and chromosome number database of Balkan flora: C-values in 343 taxa with novel values for 242. *Advanced Sci Lett* 3: 190–213
- Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Vicic V, Robin O (2014) Molecular cytogenetics (FISH and Fluorochrome Banding): Resolving species relationships and genome organization. In: Pascal Besse (ed.). *Molecular plant taxonomy: Methods and protocols, Methods in molecular biology*, Vol 1115, pp 309–323doi: 10.1007/978-1-62703-767-9_15
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, Depamphilis CW, Wall PK, Soltis PS(2009) Polyploidy and angiosperm diversification. *Amer J Bot* 96(1):336–348 doi:10.3732/ajb.0800079
- Spach É (1846) *Histoire Naturelle des Végétaux*. *Phanerogames* 12: 452
- Suda J, Kron P, Husband BC, Trávníček P (2007) Flow Cytometry and Ploidy: Applications in Plant Systematics, Ecology and Evolutionary Biology. In: Doležel J,

- Greilhuber J, Suda J (eds). Flow cytometry with plant cells. Wiley-VCH, Weinheim, pp 103–130
- Sweet R (1838) The British Flower Garden containing coloured figures and descriptions. Ridgway J & Sons, Piccadilly, N°92
- Takhtajan A (1990) Numeri chromosomatum magnoliophytorum florae URSS, Aceraceae–Menyanthaceae, Nauka, Leningrad, pp 47
- Tenore M (1811–1815) Flora Napolitana ossia descrizione delle piante indigene del Regno di Napoli. Stamperia Reale, Napoli, Vol. 1, pp. 143–144 & Tab. XXVII.
- Tenore M (1819) Cat. Hort. Neapolitan: 39
- Tison JM, Jauzein P, & Michaud H (2014) Flore de la France méditerranéenne continentale. Conservatoire botanique national méditerranéen de Porquerolles-Naturalia, Turriers, pp. 2078
- Todaro A (1858) Index Seminum Horti Regii Botanici Panormitani. 1857: 43
- Tucci GF, Winfield MO, D'Amato GF, Gregori C & De Dominicis RI (2004) Genetic diversity in *Narcissus poeticus* L. and *N. radiiflorus* Salisb. (Amaryllidaceae) in two different populations: AFLP and karyological studies. *Caryologia* 57(4): 405–411. Doi:10.1080/00087114.2004.10589424
- Vaio M, Speranza P, Valls JF, Guerra M, Mazzella C (2005) Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the *Quadrifaria* group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Ann Bot (Oxford)* 96: 191–200 doi:10.1093/aob/mci168
- Valdés B (1987). *Narcissus* L. In : Valdés-Castrillón B, Talavera S & Fernández-Galiano E (Eds) *Flora Vasculare de Andalucía Occidental*. Ketres, Barcelona, Vol. 3, pp. 463–476
- Vidic T, Greilhuber J, Vilhar B, Dermastia M (2009) Selective significance of genome size in a plant community with heavy metal pollution. *Ecol Appl* 19(6): 1515–1521
- Watanabe K, Yahara T, Denda T, Kosuge K (1999) Chromosomal evolution in genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): statistical tests regarding correlation between

changes in karyotype and habit using phylogenetic information. J plnt res 112: 145–161

Webb DA (1980) Amaryllidaceae. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, Chater AO & Richardson IBK (Eds.) Flora Europaea. Cambridge University Press, Cambridge, vol. 5, pp. 78–84

Weitz S, Feinbrun N (1972) Cytology and systematics of *Narcissus tazetta* L. in Israel. Israel J Bot 21: 9–20

Wu J, Zhang ZZ, Lü LX (2011) Molecular cytogenetic analysis of special germplasm of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. Acta Hort Sin 38(4): 740–746

Wylie AP (1952) The history of the garden Narcissi. Heredity 6:137–156

Yahi N, Vela E, Benhouhou S, De Belair G & Gharzouli R (2012) Identifying Important Plants Areas (Key biodiversity Areas for Plants) in Northern Algeria. Journal of Threatened Taxa 4(8): 2753–2765. Doi: <http://dx.doi.org/10.11609/JoTT.o2998.2753-65>

Zonneveld BJM (2008) The systematic value of nuclear DNA content for all species of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). Pl Syst Evol 275: 109–132 doi: 10.1007/s00606-008-0015-1

Annexe 1

1. Colchicine à 0.05%

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

2. Réactif de Schiff

Pour 1 litre de solution, faire bouillir 800 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer, une fois l'eau bouillie, éteindre la source de chaleur et verser 4 g de fuschine basique. Agiter la solution puis laisser refroidir jusqu'à 50°C. Ajouter 120 ml d'acide chlorhydrique (HCl 1N) et Filtrer. Ajouter ensuite à la solution 12 g de métabisulfite de potassium.

Si la solution est encore rose ou rouge, ajouter le charbon, agiter fortement pendant 2 min, puis filtrer à nouveau.

3. Tampon citrate à 0.01 M

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

- Mélanger 25.5ml d'acide citrique et 24.5ml de citrate de sodium.

- Compléter à 100 ml avec l'eau distillée.

4. Préparation de l'enzyme RS

- Tampon citrate 0.05M (pour la préparation de l'enzyme RS)

A : Acide citrique 0.48g/ 50ml

B : Citrate de sodium 0.73g/ 50ml

- Enzyme R

Hémicellulase 4%, Pectolyase 1% et Cellulase R10 4%

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

Annexe 2

5. Tampon McIlvaine

A: Solution d'acide citrique 1.05g/50ml H₂O

B: Na₂HPO₄, H₂O 1.068g/30ml H₂O.

- 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 + MgSO₄

- Ajouter à 50ml du tampon McIlvaine (pH 7) 61.62mg de MgSO₄.

6. Préparation de la chromomycine

2 mg de chromomycine pour 10ml de solution (tampon McIlvaine pH 7 + MgSO₄).

Conserver à l'obscurité, à 4°C.

7. Solutions de lavages de stringence

- **20 x SSC**

NaCl (175.3 g)

Citrate de sodium (88.2 g)

Eau ultra pure qsp (1000 ml)

- **4 x SSC Tween**

Tween 20 (1 ml)

20 x SSC (100 ml)

Eau ultra pure (400 ml)

➤ **4 x SSC**

20 x SSC (100 ml)

Eau ultra pure (400 ml)

➤ **2 x SSC**

20 x SSC (100 ml)

Eau ultra pure (200 ml)

➤ **0.1 x SSC**

2 x SSC (13 ml)

Eau ultra pure (247 ml)

Tableau 1: Mesures de la partie végétative de la populations 9

N°	Bulbe								Bulbe fils						
	Long.scape	Long.feuille	Larg.feuille	Nbr.feuille	Inflo.	Nbr. Axe	H.bulbe	Diam.bulbe	Long.scape	Long.feuille	Larg.feuille	Nbr.feuille	H.bulbe	Diam.bulbe	Inflo
1	37.2	55.2	1	3	9	1	5	4							
2	34	51.2	0.8	3	4	1	3.5	3							
3	39.5	49	0.8	3	8	1	3.1	3.3							
4	28.5	49	0.8	3	5	1	3.5	3.2							
5	25.5	35.2	0.8	3	5	1	2.5	2.9							
6	20.5	30.8	0.6	3	4	1	2.5	2.3							
7	45.3	56.6	1	2	6	1	3.5	2.8							
8	32.5	52	1.1	3	7	1	3.5	3.3							
9	20.5	30.5	0.6	2	4	1	3	3.1							
10	22.3	32	0.6	3	5	1	3	2.4							
11	32	49	0.8	3	5	1	4	3.2							
12	44.5	58	1.3	3	7	2	4	4							
13	25	50	0.9	2	7	1	3.5	3.1							
14	22.5	46.5	0.8	4	5	1	3	2.8							
15	20.5	34.5	1	3	5	1	3.7	2.9							
16	27	54	1.1	4	10	1	4.3	3.7							
17	28.2	35.3	0.7	2	6	1	3	3							
18	26	29	0.8	3	4	1	2.7	2							
19	32	57.6	1.3	3	3	1	3.3	3.2	20	24	0.6	2	2	1.6	4
20	22.2	49.4	0.8	4	9	1	3.5	3.3							
21	34	43.7	1.1	4	11	3	3.5	2.8							
22	19.5	25.5	0.6	3	3	1	2.5	2.1							
23	36	75	0.6	3	4	1	2.5	2.7							
24	12	32	0.7	3	4	1	2.7	2.2							
MOYENNE	28.6333333	45.0416667	0.85833333				3.3041667	2.97083333							
MAX	45.3	75	1.3	4	11	3	5	4	20	24	0.6	2	2	1.6	4

Tableau 2: Mesures de la partie reproductrice de la populations 9

N°	Diam.couron	H.couronne	Long.pét.l.	Larg.pét.l.	Long.pét.ex	Larg.pét.ex	Long.tube	Lng.ovaire	Long.fleure	Long.pedicel.	Long.style	H.anth.inf.	H.anth.sup	Lng.anth.inf	Lng.anth.sup
1	4.32	5.37	12.81	9.71	13.54	10.5	17.12	13.07	36.54	60	19.36	17.52	20.32	3.73	3.73
2	5.42	4.75	9.03	7.07	10.41	6.81	18.27	11.1	32.08	64	18.62	15.59	20.52	3	2.58
3	7.91	5.25	13.98	6.47	14.2	6.86	19.23	7.57	34.39	43	24.55	18.55	23.55	3.43	3.2
4	5.38	4.87	9.63	8.37	9.64	8.02	16.31	5.39	28.02	48	16.88	12.71	18.53	2.92	2.64
5	7.54	4.68	10.98	8.98	12.37	12.03	19	9.27	35.02	41	20.87	17.1	21.74	3.16	3.15
6	4.97	4.35	10.16	8.3	12.12	10.99	17.92	8.11	32.3	35	20.62	17.05	20.75	3.44	3.09
7	5.37	4.61	10.1	6.71	11.26	6.59	18.9	8.14	31.01	46	19.39	16.63	21.79	2.91	2.79
8	4.6	4.26	13.88	9.87	12.88	10.19	20.3	10.02	35.37	49	21.92	18.64	23.95	3.67	3.24
9	5.16	5.08	13.98	8.13	15.04	8.58	19.35	9.34	34.05	42	22.72	18.58	23.12	3.52	3.4
10	5.65	6.13	12.85	8.98	13.11	9.73	17.37	11.69	36	50	20.85	15.03	19.99	2.81	2.65
11	7.49	4.64	11.9	8.9	13.83	9.06	19.5	8.76	34.4	36	20.26	17.16	21.87	2.42	2.1
12	5.63	6.07	11.27	5.22	11.2	5.66	20.86	10.99	37.81	50	22.42	19.29	23.58	3.46	3.03
13	5.29	5.76	11.98	9.51	13.27	9.33	16.7	7.74	31.41	55	21.01	17.19	20.87	2.72	2.74
14	4.66	4.8	9.28	7.21	10.53	7.72	16.81	6.96	30.71	53	15.62	15.16	19.33	3.1	2.69
15	5.95	3.71	10.75	8.21	10.99	7.63	18.16	8.5	32.35	65	19.15	17.25	21.38	3.55	3.13
16	5.83	4.81	11.4	8.31	12.05	10.06	18.39	7.48	33.85	45	19.63	18.29	21.22	2.88	2.49
17	3.98	4.1	11.28	5.92	12.12	7.67	21.86	6.11	32.13	36	12.41	20.52	24.36	2.75	2.84
18	4.09	4.89	7.63	4.93	8.99	7.5	21.62	4.66	31.88	37	21.77	20.53	23.99	3.01	2.85
19	5.98	4.45	9.59	6.45	8.9	7.31	19.1	7.17	31.84	43	21.9	19.47	22.17	2.77	2.85
21	5.43	5.78	9.73	7.45	9.9	10	20.88	9.14	35.86	40	22.33	18.69	22.95	2.62	2.65
22	6.87	5.39	11.86	9.45	11.27	11.28	17.32	11.25	36.02	66	20.22	16.36	20.31	3.35	3.47
25	5.38	4.27	10.38	7.28	9.44	8.9	22.3	6.43	33.3	45	18.97	18.65	23.5	2.43	2.3
26	5.62	5.21	9.55	8.23	10.2	10.59	20.47	8.78	35.15	41	24.87	18.7	22.08	2.37	2.3
27	4.95	4.03	10.47	5.11	11.28	5	19.17	8.1	30.95	35	20.08	17.94	22.41	3.85	3.37
28	4.87	6.15	11.69	6.56	11.37	7.93	16.64	9.61	33.01	45	19.11	16.89	20.8	3.2	3.58
29	5.46	3.91	11.15	6.53	10.72	8.56	17.11	9.64	31.25	50	16.81	15.88	19.93	2.85	2.59
30	7.1	4.19	11.36	10.87	11.47	10.03	19.83	8.94	35.54	65	20.45	19.09	22.65	3.13	2.3
31	5.78	5.69	11.61	8.55	12.26	9.58	20.23	13.14	39.84	55	20.14	19.86	23.06	3.58	3.31
32	5.61	5.18	11.71	6.96	11.44	8.44	20.95	7.1	33.52	30	21.65	17.83	22.79	2.31	2.51
33	4.4	5.31	8.41	7.64	9.06	8.5	18.49	5.08	30.01	31	19.18	16.95	21.04	2.67	2.18
34	5.04	5.68	11.83	5.98	10.9	6.69	19.51	7.72	33.03	45	22.7	16.99	22.33	2.62	2.5
35	6.71	5.55	9.67	8.09	10.74	7.8	21.62	7.39	35.2	42	18.87	19.85	24.35	3.6	3.69
36	3.06	3.43	10.46	6.09	9.78	6.76	15.99	4.7	25.14	41	15.81	14.52	16.65	2.4	2.36
37	6.23	5.73	14.58	7.66	14.21	7.6	23.44	11.53	41.84	59	20.25	21.22	25.99	2.99	2.73
38	5.2	4.9	11.2	7.16	11.94	7.64	18.17	8.96	32.21	48	18.94	16.24	20.35	2.49	2.41
39	4.36	4.3	8.67	7.61	9.19	8.09	17.24	10.47	34.62	45	19.89	16.29	20.71	3.06	2.91
40	5.31	3.61	8.28	5.25	8.29	4.39	15.37	5.09	25.6	34	9.98	14.89	18.26	2.37	2.57
41	3.84	3.12	10.58	5.59	10.89	6.45	19.14	8.48	31.87	48	16.49	17.41	21.07	2.6	2.5
Moyenne	5.43263158	4.84236842	10.9386842	7.50815789	11.3368421	8.32815789	18.9642105	8.51631579	33.2926316	46.3947368	19.6497368	17.5397368	21.6910526	2.99315789	2.82684211
MAX	7.91	6.15	14.58	10.87	15.04	12.03	23.44	13.14	41.84	66	24.87	21.22	25.99	3.85	3.73

Tableau 3: Mesures de la partie végétative de la populations 10

N°	Long.scape	Long.feuille	Larg.feuille	Nbr.feuille	Inflo.	Nbr. Axe	H.bulbe	Diam.bulbe	Long.scape	Long.feuille	Larg.feuille	Nbr.feuille	H.bulbe	Diam.bulbe	Inflo
21	26.5	50.8	0.9	3	8	1	3.2	3							
22	18.5	34.7	1	3	8	1	3	3.5							
23	17.5	32.7	0.8	3	3	1	2.8	3							
24	27.5	37	0.7	4	4	1	3.5	2.5	18.5	22.5	0.4	3	2.5	1.5	2
25	33	57.5	0.8	2	7	1	3	2.8							
26	21.3	29.4	0.5	2	4	1	2.5	2							
27	14.2	29.5	0.5	2	5	1	2.5	2							
28	26.3	44	1.2	3	10	1	3.3	3							
29	14.3	31.1	0.8	2	5	1	3.5	3							
30	19.5	38.5	1	2	7	1	4	3.3							
31	26.7	38.7	0.6	2	3	1	3	3							
32	28	40	0.9	3	4	1	3.5	3							
33	28.5	39	0.8	3	3	1	3.5	3							
34	18.3	31	0.55	2	3	1	2.5	1.8							
35	19.6	36.6	0.9	3	4	1	3	2.4							
36	16.1	29.2	0.6	3	4	1	3	2.8							
37	17.8	26.8	0.5	2	2	1	2	2.1							
38	10	30	0.9	3	4	1	2.8	3.1							
39	24.7	44.2	1.3	4	11	1	3.5	3.6							
40	13.2	38.5	1.8	4	12	1	4.1	4							
Moyenne	21.075	36.96	0.8525				3.11	2.845							
Max	33	57.5	1.8	4	12	1	4.1	4	18.5	22.5	0.4	3	2.5	1.5	2

Tableau 4: Mesures de la partie reproductrice de la populations 10

N°	Diam.couron	H.couronne	Long.pét.l.	Larg.pét.l.	Long.pét.ex	Larg.pét.ex	Long.tube	Lng.ovaire	Long.fleure	Long.pedicel.	Long.style	H.anth.inf.	H.anth.sup	Lng.anth.inf	Lng.anth.sup
1	4.88	3.89	8.97	5.21	9.53	5.53	18.45	5.59	29.55	54	18.29	14.94	20.48	2.73	2.22
2	5.93	5.65	10.85	7.4	10.64	7.36	20.78	8.58	35.25	42	20.17	17.97	22.97	3.34	3.08
3	4.72	5.15	9.78	6.02	10.32	6.17	20.69	7.12	34.28	56	20.09	18.43	23.78	2.95	2.67
4	5.59	5.17	8.9	5.65	9.43	6.52	16.63	5.91	28.05	48	17.68	15.12	18.45	2.73	2.6
5	5.08	5.22	10.27	6	10.62	7.47	22.79	6.44	33.92	43	20.5	17.98	24.47	3.17	2.78
6	5.39	4.47	10.63	5.96	10.42	6.61	20.69	9.54	36.9	55	19.92	18.35	24.06	3.08	3.01
7	4.7	5.16	8.67	5.65	9.58	6.97	16.51	6.08	28.19	36	18.02	16.01	19.6	3.16	2.83
8	5.74	5.31	8.86	6.71	9.58	8.84	17.09	5.32	29.15	45	15.46	15.05	19.66	2.93	3.1
9	4.79	5.72	7.77	4.75	8.89	5.8	20.13	6.53	34.08	40	18.59	18.98	24.58	3.01	2.61
10	5.44	6.09	11.28	7.71	11.3	8.51	23	9.71	38.86	82	22.62	20.28	25.51	3.4	3.15
11	6.98	5.68	11.68	7.14	12.23	7.83	22.13	7.45	36.09	61	20	19.02	24.62	3.17	2.98
12	5.98	6.28	10.91	6.87	11.43	7.92	22.8	7.4	33.79	48	21	19.27	23.89	3.31	3.09
13	5.82	4.85	10.27	8.95	11.09	7.73	19.75	8.48	35.48	78	20.81	18.43	23.61	3.43	3.23
14	5.16	6.19	10.86	5.59	11.14	7.17	22.82	6.23	35.59	45	22.71	19.46	25.93	3.38	3.09
15	5.09	5.52	7.82	6.18	8.26	5.12	21.62	9.6	36.08	59	21.23	19.27	23	3.21	2.65
16	4.72	5.69	9.83	6.82	9.79	7.26	22.5	6.48	35.61	60	20.14	18.86	24.23	3.31	3.11
17	3.47	5.02	7.47	4.47	8.36	5.41	19.82	6.94	31.8	83	20.81	17.25	22.2	2.85	2.83
18	5.41	4.52	9.97	7.19	9.23	6.72	21.07	5.64	32.4	50	16.99	16.29	22.55	2.29	2.12
19	4.54	5.14	7.79	6.1	8.48	7.38	20.68	9.31	35.43	42	20.56	19	22.93	3	3.03
20	4.92	4.32	9.83	6.08	9.38	5.64	18.13	5.48	29.62	35	18	18.97	20.89	2.76	2.61
21	5.76	5.69	10.79	7.15	9.89	7.26	21.57	9.11	27.23	52	22.97	17.35	24.06	2.81	2.81
22	5.55	5.09	11.36	5.85	11.37	7.8	17.26	12.78	35.85	53	18.92	17.22	22.15	3.53	3.5
23	6.87	7.04	12.1	10.25	13.83	10.78	22.65	9.72	39.98	67	25.8	19.83	26.03	3.09	3.14
24	5.05	6.16	12.53	6.56	11.96	7.73	18.76	8.48	33.88	42	20.48	18.23	22.04	3.06	2.7
25	5.75	5.31	9	6.31	8.44	7.73	21.67	4.38	31.75	55	22.16	17.56	23.99	2.86	2.81
26	3.8	4.31	7.78	4.36	7.83	4.19	21.14	5.21	30.84	44	19.16	18.99	22.51	2.62	2.1
27	4.34	5.6	11.09	6.81	10.43	7.87	21.01	7.16	34.52	44	22.94	17.86	22.79	3.37	2.89
28	5.29	4.4	10.07	7.45	10.65	8.07	20.49	8.6	35.13	38	19.41	18.71	23.44	3.2	2.97
29	5.44	5.55	11.33	7.46	10.56	8.14	19.82	6.28	32.43	54	18.57	17.92	23.3	2.86	2.62
30	4.56	5.49	8.24	7.26	8.26	7.79	19.8	6	31.93	45	18.1	16.09	23.43	2.36	2.05
31	6.21	4.27	8.2	6.95	9.57	7.36	21.19	6.61	32.19	49	19.13	18.59	23.98	2.53	2.9
32	6.73	4.62	11.47	7.65	10.27	7.83	20.61	6.6	32.96	41	18	18	23.4	3.1	2.88
33	5.9	4.67	9.35	7.84	9.84	8.1	19	7.65	31.51	37	16.88	16.5	21.96	2.93	2.82
34	5.29	4.71	7.9	5.9	8.1	4.6	20.1	4.7	29.35	34	18.75	15.21	21.35	2.1	2
35	6.54	4.4	10.12	7.25	10.56	6.27	22.52	7.75	35.67	35	23.82	18.83	24.77	2.8	2.65
36	5.8	6.47	10.78	8.9	10.27	9.12	20.31	9.8	36.59	46	20.48	17.94	22	2.75	3
37	4.5	5.1	7.42	5.9	8.16	7	20.13	9.6	35.26	49	19.13	17.04	23	2.9	2.5
38	5.4	3.78	8.6	6.7	7.4	6.9	20	7.3	32.12	25	21.6	16.44	23.13	2.7	2.4
39	5.34	5.8	9.64	7.4	9.7	7.4	19.21	7.7	31.67	69	18.64	16.53	21.65	2.8	2.6
40	5.9	7.44	14	10.24	13.11	10.21	26.12	10	43.2	52	24	21.55	27.9	2.74	2.45
Moyenne	5.35925	5.2735	9.8545	6.766	9.9975	7.25275	20.536	7.4815	33.6045	49.825	20.06325	17.883	23.10725	2.958	2.7645
Max	6.98	7.44	14	10.25	13.83	10.78	26.12	12.78	43.2	83	25.8	21.55	27.9	3.53	3.5

Tableau 5: Mesures de la partie végétative de la populations 1

N°	Bulbe					Bulbe fils									
	Long.scape	Long.feuille	Larg.feuille	Nbr.feuille	Inflo.	Nbr. Axe	H.bulbe	Diam.bulbe	Long.scape	Long.feuille	Larg.feuille	Nbr.feuille	H.bulbe	Diam.bulbe	Inflo
1	51	39	2	3	11	1	5	5.5	49	37	2	3	4.5	5	8
2	45.7	46	1.8	4	9	2	4.5	5	47.5	46.3	1.7	4	3.3	3.9	8
3	45.2	38	2	4	10	1	4.5	4.3							
4	45.4	52	1.5	3	9	2	5	3.5							
5	41.5	48.5	1.6	3	10	1	5	4							
6	51.2	55.2	1.6	2	9	1	4.5	4	54	54.3	1.7	3	4	3.7	7
7	35.5	38.4	1.6	4	8	1	4.5	4							
8	34.5	32.5	2.1	3	4	2	3.7	3.8		36	1.4	2	3	3.3	
9	52	47.2	1.2	3	9	2	5	4.7							
10	41.5	44.8	2.6	3	8	2	5	4.8							
11	40.2	39.6	2	3	11	2	5	4.8							
12	36.5	42.9	1.7	3	7	2	4	4.7	35	40.5	1.8	4	4	4.5	5
13	49.5	43.5	2	4	16	1	3.5	4.5	49	45.2	1.8		4	4.2	9
14	42.2	50.5	1.7	3	13	1	4.5	4.1		46	1.9		4.5	4	
15	42	44.5	2	4	16	1	3.8	4	45	38.5	1.9		3.5	3.7	10
16	50	52.2	2.5	3	11	1	4.5	4.2							
17	41.5	40.5	1.6	3	12	2	5	4.6							
18	53	47.5	2	4	11	1	4	4	52.5	46	1.6	3	4	3.8	9
Moyenne	44.35555556	44.6	1.861111111				4.5	4.361111111	47.4285714	43.31111111	1.755555556		3.866666667	4.011111111	
MAX	53	55.2	2.6	4	16	2	5	5.5	54	54.3	2	4	4.5	5	10

Tableau 6: Mesures de la partie reproductrice de la populations 1

N°	Diam.couron	H.couronne	Long.pét.l.	Larg.pét.l.	Long.pét.ex	Larg.pét.ex	Long.tube	Lng.ovaire	Long.fleure	Long.pedicel.	Long.style	H.anth.inf.	H.anth.sup	Lng.anth.inf	Lng.anth.sup
1	7.54	4.58	12.5	7.01	11.61	8.97	18.51	6.73	29.38	36	21.2	16.32	21.45	3.39	2.6
2	8.62	4.92	14.39	5.31	12.73	6.86	15.27	6.53	27.14	41	18.99	16.35	18.89	2.9	2.37
3	8.39	5	10.07	9.39	9.56	8.58	18.06	7.19	31.24	68	22.15	22.5	18.24	2.81	2.43
4	7.04	5.46	12.37	9.63	12.37	10.36	19.27	6.94	31.84	64	20.36	17.59	22.13	4.56	3.75
5	6.67	4.44	11.1	8.8	11.75	6.38	19.43	7.48	30.72	35	25.99	18.55	23.18	2.93	2.74
6	9.68	5.21	13.12	9.68	15.3	9.05	17.14	6.14	29.09	72	21.14	18.4	21.21	3.5	3.45
7	7	4.92	12.89	8.22	14.05	8.34	17.91	7.15	30.67	51	21.44	17.53	20.81	3.61	2.98
8	8.3	6.3	12.04	10.73	13.55	7.64	18.59	7.76	33.17	42	22.01	21.69	16.43	2.84	2.64
9	9.78	5.63	13.82	9.16	16.07	9.66	19.58	9.15	32.84	77	19.75	22.8	24.15	3.6	3.5
10	8.8	5.55	15.11	9.92	11.97	10.2	17.29	7.98	32.48	45	21	19.8	21.06	3.66	3.28
11	7.13	4.81	12.3	9.67	14.2	10.58	20.38	8.35	33	50	20.23	18.46	21.69	4.26	3.49
12	6.81	5.73	12.81	6.72	16.32	8.08	15.93	6.53	28.24	54	11.71	18.32	19.39	3.12	3.18
13	8.91	4.11	9.99	6.32	10.54	6.11	21.7	10.46	36.65	43	23.24	20	23.84	3.12	2.9
14	6.97	4.79	15.39	9.22	14.58	7.72	19.92	6.69	31.71	50	23.48	17.82	22.93	3.21	3.04
15	7.23	3.87	9	7.07	10.63	5.6	19.79	5.67	29.91	48	10.35	19.27	22.93	3.17	3.09
16	6.8	5.47	16.75	6.7	14.5	4.64	19.97	6.38	31.49	56	23.09	22.07	23.26	2.84	3.03
17	7.17	5.25	12.3	8.92	12.31	8.47	16.86	9.15	31.61	58	23.34	16.84	20.83	3.13	3.1
18	6.56	5.12	11.9	7.99	12.9	7.67	16.97	7.02	29.93	49	8.33	15.4	21.06	3.16	3.06
19	8.09	6.3	13.53	8.22	12.07	7.97	18.59	8.35	32.17	38	21.34	17.61	22.22	2.65	2.28
20	8.36	4.97	12.58	8.51	11.91	7.92	15.86	9.04	30.04	69	20.23	16.49	19.87	3.01	2.22
21	7.2	4.22	13.88	9.66	16.21	7.72	19.11	7.72	24.72	45	22.58	21.37	21.4	3.18	2.89
22	7.28	5.64	11.89	8.24	14.08	5.62	17.78	5.62	30	52	19.35	15.31	20.21	3.75	2.76
23	6.5	4.34	12.44	8.51	11.81	6.88	17.75	6.88	29.5	48	1036	18.06	20.99	3.02	2.82
24	6.52	5.3	15.65	8.17	14.84	7.11	20.15	7.11	33.45	69	21.23	21.15	24.96	3.29	2.86
25	7.59	4.95	9.21	7.98	11.03	6.22	19.35	6.22	30.63	52	23.01	20.4	23.92	3.34	3.09
26	9.7	6.19	15.98	9.85	15.34	8.91	21.26	8.91	38.25	42	24.96	18.39	25.58	3.5	2.94
27	7.21	3.67	11.53	6.94	11.28	5.85	22	5.85	32.15	52	10.87	21.37	23.8	2.43	2.57
28	7.74	6.68	12.31	9.28	13.88	8.35	17.45	8.35	31.89	48	11.11	17.38	21.8	2.97	2.7
29	9.83	6.27	14.52	10.45	16.25	7.28	18.86	7.28	32.21	78	10.93	19.48	23.08	4.06	3.49
30	8.31	7.72	17.69	10	18.98	11.14	20.74	11.14	39.97	67	28.39	21.9	25.96	3.41	3.27
31	8.39	6.45	12.17	9.53	13.69	8.53	18	8.53	32.12	52	19.63	16.59	21.05	3.18	3.13
32	6.39	6.84	13.02	11.39	14.84	11.27	18.98	11.27	33.3	50	11.38	19.21	22.43	3.45	3.4
33	4.83	7.27	15.52	9.14	15.87	11.2	17.07	11.2	34.39	52	22.98	15.47	22.35	3.52	3.11
34	7.84	6.41	15.38	9.46	14.12	9.64	17.73	9.64	34.56	60	22.02	16.73	21.6	3.36	3.02
35	9.48	4.25	15.02	8.81	14.92	8.76	20.9	8.76	33.78	63	24.62	21.26	26.18	3.9	3.55
36	7.94	5.24	16.03	8.79	17.91	11.24	16.42	11.24	30.99	37	20.62	18.12	19.99	3.1	2.96
37	7.16	4.7	13.03	10.33	12.18	9.43	21.69	9.43	34.81	43	24.56	19.97	24.81	3.17	2.77
Moyenne	7.72324324	5.36675676	13.2224324	8.74918919	13.6797297	8.26891892	18.7097297	7.99567568	31.892973	52.8648649	47.3948649	18.81	22.0454054	3.3	2.98540541
MAX	9.83	7.72	17.69	11.39	18.98	11.27	22	11.27	39.97	78	1036	22.8	26.18	4.56	3.75