



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

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Option: Biotechnologies végétales

Par

KARIM BAZIZ

Thème

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

Soutenue le 12 Février 2015

Devant le jury:

Président :	Mr D. KHELIFI	Professeur à l'université de Constantine 1
Encadrant :	Mme N. KHALFALLAH	Professeur à l'université de Constantine 1
Co- Encadrant :	Mme S. SILJAK-YAKOVLEV	Professeur à l'université de Paris Sud
Examineurs :	Mme D. SATTA	Professeur à l'université de Constantine 1
	Mr R. AMIROUCHE	Professeur à l'USTHB, FSB
	Mr M. KAABECHE	Professeur à l'université de Sétif 1

Dédicace

Cette thèse représente l'aboutissement du soutien et des encouragements que mes parents m'ont prodigués tout au long de ma scolarité.

La patience et l'encouragement de mon épouse qui m'ont aidé à surmonter toutes les difficultés rencontrées au cours de cette thèse.

A mon petit garçon ADEM

A mon frère MOUNIR et mes deux sœurs NADJET et NASSIMA

REMERCIEMENTS

A Madame la Professeur NADRA KHALFALLAH, mon encadrant et directeur de thèse. Je vous serai toujours reconnaissant pour vos avis indispensables, vos conseils éclairés et pour votre disponibilité. Vous m'avez fait bénéficier de vos connaissances, de votre immense expérience scientifique et de votre rigueur dans le travail. Vos critiques, suggestions et conseils m'ont accompagné durant toute la longue période d'élaboration de ce document. Je voudrai vous dire aussi que j'ai eu grand plaisir à travailler sous votre direction.

A Madame la Professeur SONJA-SILJAK-YAKOVLEV. Merci pour avoir accepté d'être mon co-encadrant, pour m'avoir accueilli de manière si hospitalière dans votre laboratoire à l'Université Paris XI et pour votre disponibilité et questions pertinentes, tant sur l'article que sur le mémoire de thèse. Je voudrai également vous témoigner du plaisir que j'ai eu à travailler avec vous et le souhait de continuer à collaborer avec vous dans le futur.

A Monsieur le Professeur SPENCER BROWN, responsable du service de cytométrie pour sa collaboration et sa disponibilité.

A Monsieur le Professeur OMAR KHALFALLAH, du Laboratoire de recherche de Microstructures et Défauts dans les Matériaux de l'université Constantine 1 pour l'aide qu'il nous a prodigué.

A Monsieur le Professeur DOUADI KHELIFI, Directeur du Laboratoire de GBBV. Je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance votre confiance et vos remarques pertinentes. Vos encouragements m'ont été d'un grand apport. Je me sens très honoré que vous ayez accepté de présider mon jury.

A Madame la Professeur DALILA SATA pour sa confiance et sa sympathie. Je vous serai toujours reconnaissant de vos témoignages de confiance qui m'ont été d'un grand réconfort. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect, de ma grande estime et de mes remerciements sincères pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur RACHID AMIROUCHE. Trouvez ici le témoignage de ma gratitude pour votre disponibilité et pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur MOHAMED KAABECHE. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements pour votre disponibilité et pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

A Madame MERIEM BENAMARA et Madame HAYET BENHIZIA pour leur soutien à la fois scientifique et psychologique, le partage des bureaux et les agréables moments passés dans ces mêmes bureaux.

A tous mes étudiants de graduation qui ont joué un rôle déterminant dans la réalisation de cette étude. Ils m'ont accompagné lors des travaux de laboratoire et en sont grandement remerciés.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, département de biologie et d'écologie végétal de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Constantine 1. J'exprime ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce travail, en particulier Mme MALIKA TOURKI, Mr NADIR BELBEKRI, Mlle RADHIA DJEGHAR et Mme BOULDJADJ RIMA. Je remercie également Mme ODILE ROBIN du laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution (ESE) de l'Université Paris XI et Mr MICKAEL BOURGE de la plateforme de Cytométrie IBISA, unité Biologie Cellulaire de GIF pour leur précieuse aide.

A tous mes collègues et amis de promotion, à mes amis qui m'ont encouragé, en particulier CHERIF et MOULOUD.

RÉSUMÉ

Cette étude contribue à la connaissance taxonomique et évolutive de 4 taxons d'astragales. Deux sont endémiques de l'Afrique du Nord : *Astragalus armatus* subsp. *tragacanthoïdes* et *A. armatus* subsp. *numidicus*. Un autre est endémique du sahara, *A. pseudotrigonus* alors que *A. cruciatus* est un taxon répandu sur tout le pourtour méditerranéen. L'approche adoptée vise à explorer la diversité sur des critères cytogénétiques et palynologiques. L'étude cytogénétique classique et moléculaire (coloration à l'acéto orcéine, chromomycine A₃ et FISH) a permis d'établir un nombre de chromosomes identique pour les 4 taxons à $2n = 2x = 16$, une variation du nombre et de la position des bandes d'ADN riches en base GC associées ou non aux NOR'S. L'étude a également révélé l'existence d'un seul locus 35S et 5S chez tous les taxons, situé dans des positions différentes. Les données sur la taille du génome dévoilent une variation de la valeur C entre *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* et *A. armatus* subsp. *numidicus* d'une part, et les deux autres taxons d'autre part. Les résultats de l'analyse palynologique attestent que la variabilité s'exprime en termes de taille et de forme des grains de pollen. Les résultats obtenus ont fourni des informations et des connaissances de base sur les 4 taxons. Nous suggérons une investigation élargie à l'ensemble du genre dans l'objectif d'apporter des précisions et des réponses soulevées par des interrogations d'ordre taxonomique et évolutif et de compléter la base de données des espèces algériennes.

Mots clefs : *Astragalus* L., Hybridation in situ en fluorescence, fluorochrome banding, Cartographie rDNA, Taille du génome, Pollen.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو الدراسة التصنيفية والتطورية لأربعة أصناف من *Astragalus* L:

A.armatus subsp. *numidicus* و *A.armatus* subsp. *tragacanthoides*

متوطن شمال أفريقيا، *A. pseudotrigonus*, متوطن في الصحراء و أخيرا *A. cruciatus*

الموجود في جميع أنحاء البحر الأبيض المتوسط من خلال دراسة التنوع في حبوب

اللقاح الدراسة الكاربيوتيبية الكلاسيكية والجزيئية عن طريق تقنيات تلوين

لفتمخت مثل Acéto-orceine (CMA 3), Fluorochrome Banding (FISH), و حجم

الجينوم .

التلوين بإستعمال Acéto orceine أظهر أن النمط الصبغي للأصناف الأربعة هو

$2N = 2X = 16$.

كما أظهر التلوين Chromomycine A3 و FISH اختلاف في عدد وموقف المناطق

DNA الغنية في قاعدة GC مرتبطة أو لا بموقع NOR'S و وجود موقع واحد لجينات

5S و 35S في جميع الأصناف متموقع يف مواقع مختلفة.

وتكشف البيانات عن حجم الجينوم تغيير في قيمة C بين

A. armatus subsp. *numidicus* و *A.armatus* subsp. *tragacanthoides*

من جهة و الصنفان الأخران من جهة أخرى .

وتشير أيضا نتائج تحليل حبوب اللقاح عن وجود تباين من حيث حجم وشكل حبوب

اللقاح.

النتائج التي تم الحصول عليها توفر المعلومات والمعارف الأساسية على الأصناف الأربعة.

الدراسة . نقترح إجراء نفس التجارب على الجنس بأكمله من أجل توضيح والإجابة على الأسئلة

التي أثارتها هذه

الكلمات المفتاحية:

اصطراغوس ,التهجين الداخلي بالتفلور, الملون التالقي CMA3, التوزيع الخراطي لجينات

لريبوزوم, كمية الحمض النووي, حبوب الطلع

ABSTRACT

This study contributes to a better taxonomical and evolutionary knowledge about four *Astragalus* taxa. Two of them are endemic of North Africa: *Astragalus armatus* subsp. *tragacanthoides* and *A. armatus* subsp. *numidicus*. The third one is endemic of Sahara: *A. pseudotrigonus* and the last one is a widespread mediterranean, *A. cruciatus*. This approach seeks to explore the diversity upon karyological and palynological criteria. The cytogenetic study using different coloration technics, with or without fluorescence staining, established an identical chromosome number for all taxa $2n = 2x = 16$. The Chromomycin coloration technic A_3 and the fluorescence staining *in situ* hybridization (FISH) with double labeling, showed a variation in the number and the position of the GC-rich DNA regions associated or not to NOR'S. The study also showed the existence, in all taxa, of a single locus of 35S and 5S located at different positions. Nuclear DNA amount shows variation of the C value between the two subspecies of *A. armatus*, on one hand, and the other two taxa, on the other hand. The palynological investigations point out pollen variability in terms of size and form of pollen grains. These results provide basic information about the 4 taxa. We suggest further and exhaustive explorations on the entire genus in order to clarify its taxonomical and evolutionary specificities.

Key words: *Astragalus* L., fluorescence in situ hybridization, fluorochrome banding CMA3, rDNA mapping, DNA content, Pollen.

LISTE DES ABBREVIATIONS

- ADN** Acide désoxyribonucleique.
- ADNr** ADN ribosomique.
- ARN** Acide Ribonucléique.
- ARNr** ARN ribosomique.
- AT** Adenosine Thymine.
- Batt.** Battandier.
- Benth.** Bentham.
- Bertol.** Bertoloni.
- Boiss.** Boissier.
- BSA** Bovin Serum Albumin.
- CMA 3** Chromomycine A3.
- CMA+** coloration positive avec les séquences GC.
- Coss.** Cosson.
- cs** Constriction secondaire.
- CV** Coefficient de Variation.
- DAMD** Directed Amplification of Minisatellite-Region DNA.
- DAPI** 4",6- diamidino-2-phenylindole.
- DC.** de Candolle.
- Desf.** Desfontaines.
- DPX** Distrène, Phtalate de butyle et Xylène, liquide de montage.
- Dur.** Durieux.
- FISH** Hybridation *In Situ* par Fluorescence.
- GC** Guanine Cytosine.
- H** Heure.
- Ic** Indice centromérique.
- IRLC** Inverted Repetition Lacking Clade.
- ISSR** Internal simple sequence repeat.
- Kb** Kilo base.
- Labill.** de La Billardière.
- M** Mole.

Mbp Méga-paires de base.

min Minute.

mM Millimolaire.

Murb. Murbeck.

NORs Régions à organisateurs nucléolaires.

nrDNA ITS Nuclear ribosomal *DNA* (nrDNA) internal transcribed spacer (*ITS*).

OTAN- NATO Organisation du Traité de l'Atlantique Nord.

PCR Poly Chain Reaction.

pg Picogramme.

pTa71 Clone de 4 Kilobase obtenu à partir d'un fragment *EcoR1* incluant des séquences ADNr 35S d'*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

pTa794 Clone de 410 paires de base obtenu à partir d'un fragment *BamHI* incluant des séquences d'ADNr 5S de *Triticum vulgare* Vill.

RAPD *Random Amplified Polymorphic DNA*.

RFLP *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

Rpoc 1 et **Rpoc 2** RNA polymérase chloroplastiques genes.

Sat Satellite.

SDS Sodium Dodecyl Sulfate.

SSC Salt Sodium Citrate.

Speg. Spegazzini

Subsp. Sous espèce.

THC Temperate Herbaceous Group.

Trab. Trabut.

UICN Union Internationale pour la Conservation de la Nature.

UTP Uridine triphosphate.

µm micron.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Historique de la taxonomie du genre *Astragalus* L.

Figure 2. Cladogramme des relations phylogénétiques du groupe IRLC.

Figure 3. a, b, c *Astragalus armatus* subsp. *tragacanthoïdes*, d, e, f *Astragalus armatus* subsp. *numidicus*, g, h, i *Astragalus cruciatus*, j, k, l *Astragalus pseudotriginus*.

Figure 4. Localisation des sites de prélèvement.

Figure 5. Caryotype d'*A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme.

Figure 6. Caryotype d'*A. armatus* subsp. *numidicus* (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme.

Figure 7. Caryotype d'*A. cruciatus* (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme.

Figure 8. Caryotype d'*A. pseudotriginus* (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme.

Figure 9. Coloration à la chromomycine, hybridation in situ avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaques métaphasiques et idiogrammes d'*A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*.

Figure 10. Coloration à la chromomycine, hybridation in situ avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaques métaphasiques et idiogrammes *A. armatus* subsp. *numidicus*.

Figure 11. Coloration à la chromomycine, hybridation in situ avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaques métaphasiques et idiogrammes d'*A. cruciatus*.

Figure 12. Coloration à la chromomycine, hybridation in situ avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaques métaphasiques et idiogrammes d'*A. pseudotriginus*.

Figure 13. Fréquence des nucléoles dans les noyaux interphasiques.

Figure 14. Coloration des nucléoles au nitrate d'argent : (a) *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*; (b) *A. armatus* subsp. *numidicus*; (c) *A. cruciatus*; (d) *A. pseudotriginus*. Les flèches indiquent les nucléoles.

Figure 15. Pollen observé au microscope photonique chez a) *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*, b) *A. armatus* subsp. *numidicus* et c) *A. cruciatus*. Les flèches indiquent le pollen non viable.

Figure 16. Pollen observé au microscope photonique (a, c, e) vue équatoriale ; (b, d, f) vue polaire. *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*; (a, b) *A. armatus* subsp. *numidicus*; (c, d) *A. cruciatus* (e, f).

Figure 17. Pollen observé au microscope électronique (a, b, c) vue équatoriale; (d, e, f) ; structure de l'exine. (a, d, g) *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* ; (b, e, h) *A. armatus* subsp. *numidicus* ; (c, f, i) *A. cruciatus*.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Historique de la classification infra-générique du genre *Astragalus* L.

Tableau 2. Espèces du genre *Astragalus* L. en Algérie décrites par Quézel et Santa (1962).

Tableau 3. Caractères morphologiques des taxons étudiés.

Tableau 4. Données écologiques des populations étudiées.

Tableau 5. Nomenclature chromosomique proposée par Levan et *al.* (1964).

Tableau 6. Données numériques de la garniture chromosomique d'*A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*.

Tableau 7. Données numériques de la garniture chromosomique d'*A. armatus* subsp. *numidicus*.

Tableau 8. Données numériques de la garniture chromosomique d'*A. cruciatus*.

Tableau 9. Données numériques de la garniture chromosomique d'*A. pseudotrigonus*.

Tableau 10. Nombre et types d'hétérochromatine observés chez les taxons étudiés.

Tableau 11. Nombre et position des loci 35S et 5S observés chez les taxons étudiés.

Tableau 12. Estimation de la taille du génome par cytométrie en flux des taxons étudiés.

Tableau 13. Viabilité et morphométrie des grains de pollen.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Les Fabacées	4
2. Le genre <i>Astragalus</i> L	4
2.1. Historique de la classification du genre <i>Astragalus</i>	5
2.2. Corrélation entre la répartition géographique et le nombre de base x....	9
2.3. Systématique du genre <i>Astragalus</i>	9
2.4. Description botanique du genre <i>Astragalus</i>	10
2.5. Le genre <i>Astragalus</i> en Algérie.....	10
2.6. Importance économique et usages traditionnels.....	17
3. Notions de Cytogénétique.....	18
3.1. L'hétérochromatine.....	19
3.2. Les nucléoles.....	19
3.2.1. Les NORs et les gènes ribosomiaux	19
4. Quantité d'ADN	20
5. Le pollen : taille, morphologie et types aperturaux.....	21
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	
1. Matériel végétal.....	23
2. Méthodes	25
2.1. Techniques de cytogénétique classique.....	25
2.1.1. Dénombrement chromosomique et établissement du caryotype ...	25
2.2. Coloration au nitrate d'argent AgNO ₃	27
3. Méthodes de cytogénétique moléculaire.....	28
3.1. Fluorochrome banding.....	28
3.2. Hybridation in Situ (FISH).....	29
3.3. Cytométrie en flux	32

4. Etude Palynologique	33
CHAPITRE III. RÉSULTATS	
1. Dénombrement chromosomique	35
2. Analyse des caryotypes	35
3. Fluorochrome banding	43
4. Nombre et distribution des ADNr (5S et 35S)	44
5. Activité transcriptionnelle de l'ADNr 35S	47
6. Taille du génome.....	48
7. Viabilité des grains de pollen	49
7.1. Description des grains de pollen.....	50
CHAPITRE IV. DISCUSSION	
1. Dénombrement chromosomique et morphologie des caryotypes	54
2. L' hétérochromatine GC	56
3. Cartographie de l'ADNr	57
4. Activité transcriptionnelle de l'ADNr 35S.....	58
5. Taille du génome.....	58
6. Viabilité du pollen et caractères palynologiques	60
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	65
ANNEXES	
ARTICLE SCIENTIFIQUE	

Introduction

INTRODUCTION

De par sa position géographique, l'Algérie présente une grande richesse écosystémique (zones humides, massifs montagneux, écosystèmes steppiques et sahariens) et bioclimatique (humide, subhumide, semi-aride, aride et désertique). Cette variabilité a joué un grand rôle dans la diversité: en effet 5 402 taxons, (en comptant les sous espèces, les variétés et les formes), sont recensés (Quézel et Santa, 1962) parmi lesquels on relève 168 espèces endémiques algériennes et 1 611 espèces rares, très rares ou rarissimes (Zeraïa, 1983).

Après des siècles fortement marqués par une activité agro-pastorale en déclin dans de nombreuses régions du pays, se sont les bouleversements climatiques (désertification, sécheresses, inondations), biologiques (invasions acridiennes) et surtout l'intensification de l'activité humaine (agriculture intensive, urbanisation, industrie, développement des infrastructures) qui constituent, directement ou indirectement, un danger potentiel pour la diversité végétale. Afin de protéger ce patrimoine, une stratégie nationale a été élaborée, portant création des aires protégées et protection par la loi de certaines espèces menacées ou vulnérables (IUCN 2001). Une réactualisation des connaissances sur la biodiversité des espèces algériennes basée sur une approche cytogénétique et palynologique, se révèle donc, d'une importance capitale afin de délimiter les espèces, de comprendre leur liens de parenté et leur processus évolutif. Les données recueillies pourront constituer sans aucun doute un apport remarquable dans l'optique de conservation et de valorisation du patrimoine biologique.

Astragalus L. constitue un genre complexe à grande richesse spécifique (3 000 espèces). Cette complexité vient de la forte différenciation morphologique et de la large répartition géographique du genre (Zarre et Azani, 2013). En Afrique du Nord, on comptabilise près de 105 taxons (Dobignard et Chatelain, 2010-2013); en Algérie, le genre *Astragalus* est représenté par 40-45 espèces annuelles et vivaces appartenant à 18 sections, qui couvrent des aires géographiques très diversifiées comprenant les régions côtières, les hauts plateaux et les régions sahariennes (Quézel et Santa, 1962). Certaines espèces jouent un rôle dans l'alimentation du

bétail (Belkassoui et *al.*, 2007) tandis que d'autres sont toxiques, et constituent donc une source potentielle de composés à intérêt pharmaceutique (Abd El-Latif et *al.*, 2003 ; Yip et Kwan, 2006) .

Contrairement au grand nombre de données écologiques et anatomomorphologiques contenues dans des flores anciennes (Battandier et Trabut, 1884 ; Maire, 1952-1977 ; Quézel et Santa, 1962), peu d'études ont été réalisées aux niveaux palynologiques, génétiques et moléculaires. Les recherches cytologiques relatives aux astragales ont surtout concerné des taxons turcs et iraniens ; elles se sont concentrées essentiellement sur l'étude de mitoses somatiques visant à déterminer le nombre de chromosomes, leurs morphologies et parfois l'établissement de caryotypes (Martin et *al.*, 2008). Celles-ci font état, pour la plupart d'un nombre de base $x = 8$ et d'une variation du nombre de chromosome allant de $2n = 16, 32, 48, 64$ (Çetin et *al.*, 2010) jusqu'à $2n = 96$ (Abdel Samad et *al.*, 2014). Tout comme les travaux de cytogénétique, les travaux concernant la taille du génome sont insignifiants par rapport au nombre d'espèces composant ce genre : seulement 2% des 3 000 espèces ont été estimés (Siljak-Yakovlev et *al.*, 2010; Temsch et *al.*, 2010; Bou Dagher-Kharrat et *al.*, 2013; Pustahija et *al.*, 2013; Abdel Samad et *al.*, 2014; Vallès et *al.*, 2014).

Cette étude, menée dans le laboratoire de " Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales" (Université Constantine 1) et l'UMR CNRS 8079 "Ecologie, Systématique, Evolution" (Université Paris-Sud), avec le soutien financier de l'OTAN dans le cadre du programme "Science for Peace and Security" (Collaborative Linkage Grant number 983838), se propose de caractériser quatre taxons du genre *Astragalus* : deux endémiques Nord Africaines: *A. armatus* subsp. *tragacanthoides* (Desf.) Maire et *A. armatus* subsp. *numidicus* (Coss. et Dur.) Maire section *Poterion* Bunge; un endémique saharienne, *A. pseudotrigonus* Batt. et Trab section *Astragalus* Boiss et un taxon à large répartition méditerranéenne, *A. cruciatus* Link. section *Annulares* DC. Cette caractérisation s'appuiera sur 1) l'étude de l'organisation du génome par une approche cytogénétique classique (coloration à l'acéto orcéine) et moléculaire (la coloration à la chromomycine A_3 , hybridation fluorescente *in situ* (FISH) avec double étiquetage 35S et 5S) ; 2) l'évaluation de la taille du génome par cytométrie en flux et 3) l'analyse de la viabilité et de la diversité des grains de pollen. L'approche

moléculaire permet d'étudier l'implication des séquences répétées et plus particulièrement de l'hétérochromatine, dans la structure et la différenciation des génomes. Ces séquences constituent un très bon marqueur de différenciation intra- et interspécifique.

Au sein d'une même espèce, les caractéristiques des grains de pollen peuvent varier en fonction de la génétique et des conditions environnementales. Il s'agit alors d'une variabilité palynologique, une espèce pouvant être homogène au niveau de son caryotype et produire des grains de pollen de formes différentes. Si dans des facteurs environnementaux uniformes, les grains de pollen d'espèces proches se ressemblent, le niveau de ressemblance peut alors traduire leurs liens de parenté (Wodehouse, 1959).

Ce travail aspire à valoriser la flore et à contribuer à sa conservation en décrivant la diversité, les relations de parenté intra spécifique et inter spécifique et la manière par laquelle les génomes s'organisent dans l'environnement respectif de chaque taxon. Signalons par ailleurs, que cette approche multidisciplinaire n'a jamais été abordée pour les taxons de ce genre.

Le manuscrit s'organise autour de quatre chapitres:

Le premier chapitre sera consacré à une synthèse bibliographique présentant l'état actuel des connaissances sur la biodiversité des astragales et les recherches liées à la cytogénétique, à la palynologie et à la diversité du genre *Astragalus* ainsi que quelques concepts scientifiques clefs de la cytogénétique et de la palynologie.

Dans le deuxième chapitre, nous décrivons le matériel et les méthodes d'étude utilisés. Dans le troisième chapitre nous présenterons un bilan des résultats obtenus lors des différentes études cytogénétiques et palynologique. Enfin, nous terminerons par une discussion générale qui souligne les conclusions importantes de ce travail d'une part et aborde les perspectives envisageables d'autre part.

Un article scientifique qui reprend une partie des résultats de la thèse, et qui a été publié en novembre 2014 dans la revue Turkish Journal of Botany, est présenté en annexe.

CHAPITRE I
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les Fabacées

Les Fabacées sont une des plus importantes familles parmi les dicotylédones (Bonnier, 1905). C'est un groupe représenté par plus de 20 000 espèces cosmopolites des régions froides à tropicales (Gepts et al., 2005 ; Cronk et al., 2006). La classification phylogénétique APG III (2009) divise ce groupe en 3 sous familles: *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* et *Mimosoideae*.

La sous famille des *Papilionoideae* est monophylétique, cosmopolite et compte près de 11 300 espèces réparties en 440 genres (Labat, 1996) et munies le plus souvent de nodosités racinaires (Raven et al., 2000). Leurs fleurs sont irrégulières et la corolle se présente sous forme de « papillon » (Baillon, 1867) avec un pétale supérieur (étendard) situé à l'extérieur de deux pétales latéraux (ailes) et deux pétales inférieurs soudés (carène) renfermant le style et des étamines soudées. Le fruit est une gousse formée d'un seul carpelle possédant deux zones de suture opposées qui, chez les espèces spontanées, s'ouvrent à maturité pour expulser les graines (Caratini, 1984 ; Polhill, 1994).

Certaines Fabacées sont cultivées essentiellement pour leur richesse en protéines (33% de protéines) pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) ou l'alimentation du bétail (soja, luzerne,...). D'autres espèces sont cultivées comme espèces ornementales, papetières ou encore comme source de produits chimiques (teintures) et pharmaceutiques.

2. Le genre *Astragalus* L.

Le genre *Astragalus*, qui fait partie de la famille des Fabacées, est un ensemble de plus de 3 000 espèces (Scherson et al., 2008) à fort taux de diversification, de spéciation et d'endémisme (Sanderson et Wojciechowski, 1996) et dont l'origine probable est l'Eurasie, régions situées entre les montagnes du sud ouest asiatique et le plateau de l'Himalaya (Podlech, 1986 ; Lock et Simpson, 1991). Deux centres de diversification qui sont l'Eurasie et l'Amérique du Nord ont été identifiés par Wojciechowski et al., (1999).

Le genre est réparti partout dans le monde avec une prédominance dans la région de l'Asie du sud (1 500 espèces), en Europe (500 espèces), en Amérique du Nord (500 espèces) et en Amérique latine, tout le long de la cordillère des Andes où on dénombre 150 espèces (Zarre et Azani, 2013). Dans les pays du bassin Méditerranéen, 500 espèces ont été décrites dont une centaine sont localisées en Afrique du Nord (Dobignard et Chatelain, 2010-2013).

2. 1. Historique de la classification du genre *Astragalus*

La délimitation et la subdivision du genre *Astragalus* sont à ce jour très confuses vu la ressemblance des caractères morphologiques de ce taxon, ce qui a pour conséquence une classification très complexe du genre (Wojciechowski et al., 1999; Kazempour Osaloo et al., 2005 ; Zarre et Azani, 2013).

La 1^{ère} classification a été publiée dans '*Institutiones rei herbariae*' par Joseph Pitton de Tournefort (1700) qui distingue deux genres très proches : *Tragacantha* et *Astragaloides*. Plus tard, Linné (1753) regroupe les genres *Astragalus* et *Tragacantha* sous un seul genre, *Astragalus*, qu'il sépare d'un autre genre très voisin, *Phaca* (correspond à *Astragaloides* L) sur la base de la présence ou de l'absence d'une séparation longitudinale des gousses (Chaudhary et al., 2008). En 1802, de Candolle scinde le genre *Astragalus* en deux genres distincts *Astragalus* et *Oxytropis*, le premier possédant une carène obtuse et une gousse biloculaire à suture ventrale et le deuxième possédant une carène apiculée et une gousse biloculaire à suture dorsale.

Par la suite, un grand nombre d'études ont été réalisées à la fois sur les astragales du Nouveau Monde (Torrey et Gray, 1838; Gray, 1864; Jones, 1923; Rydberg, 1929 ; Johnston, 1938, 1947; Barneby, 1964; Gomez-Sosa, 1979 ; 1981 ; 1982) et de l'Ancien Monde (Bunge ,1868 ; 1869; Boissier, 1872; Gontscharov, 1946; Podlech, 1982). Parmi ceux-ci, on distingue les travaux de Bunge (1868) qui établit huit sous-genres (*Pogonophace*, *Trimeniaeus*, *Phaca*, *Hypoglottis*, *Calycophysa*, *Tragacantha*, *Cercidothrix* et *Calycocystis*) et 105 sections. En 1983, Podlech souligne la ressemblance des caractères morphologiques utilisés dans la classification infra générique de Bunge et suggère de ramener le nombre de sous genres à trois, sur la

base de critères phytodermologiques (trichomes simples ou latéraux). Cependant, Zarre et Podlech (1997) décident, après évaluation des différences morphologiques et anatomiques de réintégrer ces espèces dans le genre *Astragalus* (Fig. 1).

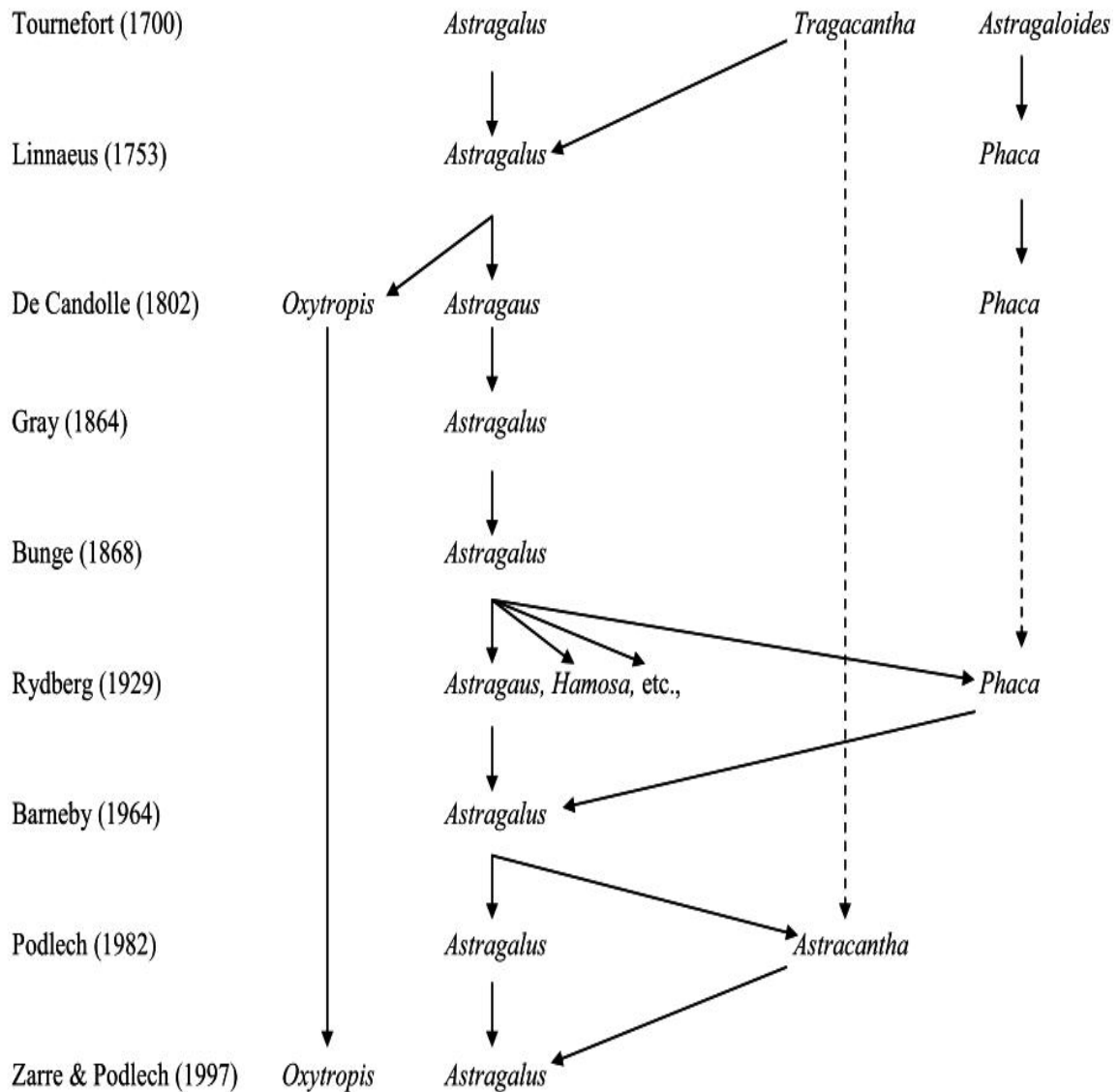


Figure 1. Historique de la taxonomie du genre *Astragalus* L. (Wojciechowski et al.1999).

Les études se sont poursuivies plus tard au niveau des sections (Deml, 1972; Agerer-Kirchoff, 1976; Podlech, 1984 ; 1988 ; 1990 ; 1991 ; 1999 a, b ; 2001; Wenninger, 1991; Tietz et Zarre, 1994; Zarre-Mobarakeh, 2000; Podlech et Xu, 2004 ; 2007). Le tableau 1 présente le nombre de sections, d'espèces ainsi que la répartition géographique du genre dans le monde.

Tableau 1. Historique de la classification infra-générique du genre *Astragalus* L. (Zarre et Azani, 2013).

	De Candolle (1802)	Bunge (1869)	Boissier (1872)	Barneby (1964)	Podlech (1982)	Podlech et Zarre (2013)
Nombre de sections	18	105	91	93	-	136
Nombre d'espèces	244	964	758	368	-	2398
Aire géographique	Monde	Monde	Asie et Afrique	Amérique du nord	Eurasie	Eurasie

Compte tenu de la diversité et du grand nombre d'espèces, les caractères morphologiques et cytologiques ne suffisent plus pour tenter de résoudre les problèmes de phylogénie au sein du genre (Podlech, 1986). L'utilisation de marqueurs moléculaires devient indispensable (Chaudhary et *al.*, 2008), car contrairement aux marqueurs traditionnels, ils ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante (Açik et *al.*, 2004).

Ainsi, pour élucider définitivement les structures et les relations phylogénétiques du genre, plusieurs recherches ont été entreprises à l'aide d'outils moléculaires tels que le polymorphisme de longueur des fragments de Restriction (RFLP), les sites de restriction des gènes RNA polymérase chloroplastiques *Rpoc 1* et *Rpoc 2* (Sanderson, 1991; Liston, 1992; Sanderson et Doyle, 1993; Wojciechowski et *al.*, 1993; 1999; Liston et Wheeler, 1994; Wojciechowski, 2005), les séquences internes de transcription des gènes ribosomiaux (nrDNA ITS) (Kazempour Osaloo et *al.*, 2003; 2005; Kazemi et *al.*, 2009; Abdel Samad et *al.*, 2014), l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), les séquences simples internes répétées (ISSR) et l'amplification directe des minisatellites (DAMD) (Luo et *al.*, 2000; Mehrina et *al.*, 2005; Alexander et *al.*, 2004; Na et *al.*, 2004; Chaudhary et *al.*, 2007).

Ces recherches ont permis d'inclure le clade "Astragalean" (genre *Astragalus* et genre voisin *Oxytropis*) à l'intérieur du groupe "THC" (temperate herbaceous group) des papilionoïdes de Polhill (1981) qui fait lui-même partie du clade IRLC (Inverted Repetition Lacking Clade). Ces recherches ont également abouti à la confirmation de

la monophylie des espèces aneuploïdes américaines et à leur indépendance par rapport aux espèces aneuploïdes eurasiennes (Fig. 2); elles ont démontré l'intégration de nouveaux allèles qui ont permis aux écotypes américains de s'adapter à l'environnement, contribuant ainsi à l'évolution du genre (Wojciechowski, 2005).

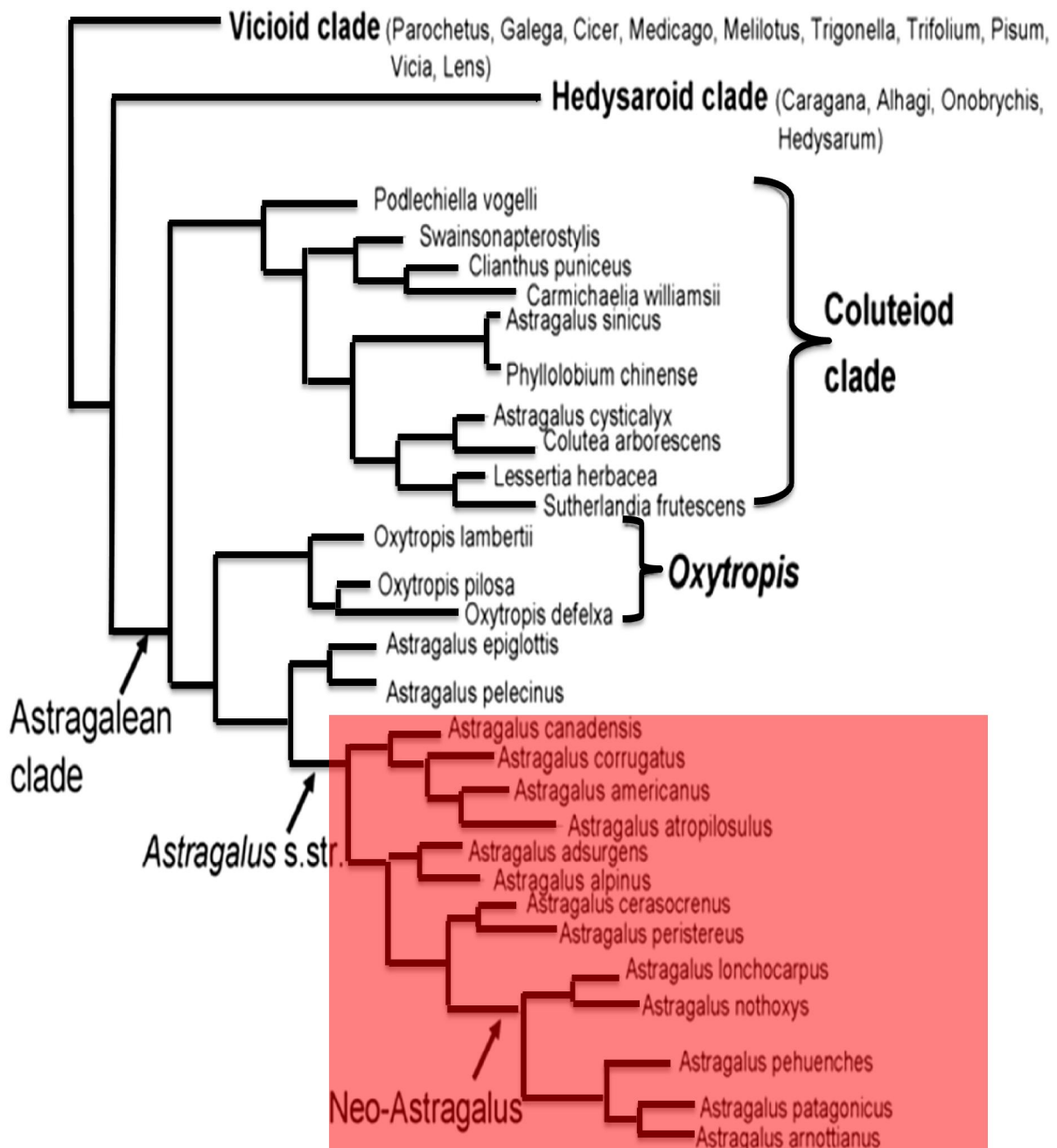


Figure 2. Cladogramme des relations phylogénétiques du groupe IRLC (Wojciechowski, 2005).

2. 2. Corrélation entre la répartition géographique et le nombre de base x

Une très forte corrélation entre la répartition géographique et le nombre de chromosomes a été révélée par Spellenberg (1976). Il divise les astragales en :

- espèces eurasiennes (Ancien Monde)

La majorité de ces espèces possède un nombre de base $x = 8$ (Ledingham, 1960). Un petit nombre possède un nombre de base $x = 5$ ou $x = 6$ (Maassoumi, 1987; Malallah et al., 2001; Badr et Sharawy, 2007). La grande fréquence d'espèces à $x = 8$, a conduit Badr et al., (1996) à conclure que $x = 8$ est le nombre de base primaire et que les espèces à $x = 5$ et $x = 6$ sont issues d'une dispoloïdie descendante.

- espèces américaines (Nouveau Monde)

Le nombre de base fluctue entre $x = 11, 12, 13, 14,$ ou 15 (Ledingham, 1960 ; Ledingham et Rever, 1963), si bien que Ledingham (1960) suggéra un nouveau genre pour ces espèces.

Polhill (1981) confirmera plus tard ces résultats et déduira que les astragales auraient irradiés depuis l'Asie vers l'ensemble du pourtour méditerranéen, puis vers les continents Nord et Sud Américain à la faveur de leurs grandes capacités adaptatives aux conditions climatiques extrêmes (climats froid et aride) et édaphique (sol rocailleux et sol sablonneux).

2. 3. Systématique du genre *Astragalus* L.

Le chemin menant au genre *Astragalus* est le suivant (Lock et Schrire 2005) :

Régne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Sous famille : Papilionoideae

Tribu : Galegeae

Sous tribu : Astragalinae

Genre : *Astragalus* L

2. 4. Description botanique du genre *Astragalus* L.

Selon la flore de Quézel et Santa (1962), les astragales sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces à feuilles composées imparipennées généralement stipulées à plus de 3 folioles. Les fleurs sont hermaphrodites à périanthe double. Le Calice est caduque ou persistant, tubuleux en cloche, à 5 sépales subégales ou inégales. La corolle est papilionacée dont les pétales sont généralement onguiculées. L'étendard est dressé, la carène égalant souvent les ailes, Les étamines sont au nombre de 10, à filets diadelphes soudés en un tube staminal fendu, contenant au sommet un ovaire pluriovulé à ovules sur 2 rangs. Le fruit est une gousse de forme variée, le plus souvent sec, pluriloculaire à 2 loges plus ou moins complètes par introflexion de l'une des sutures, déhiscente ou indéhiscente.

2. 5. Le genre *Astragalus* en Algérie

Le genre *Astragalus* est assez bien représenté en Algérie (Quézel et Santa, 1962). En effet, la flore algérienne comporte 40 espèces d'astragales (45 taxons en comptant les sous espèces). Ces espèces se divisent en espèces annuelles et vivaces qui colonisent plusieurs types d'habitat et appartiennent à différentes aires de répartition (Tab 2). Parmi ces espèces, 4 taxons ont fait l'objet de cette étude et sont décrits dans le tableau 3 et la figure 3 (Quézel et Santa, 1962).

Tableau 2. Espèces du genre *Astragalus* L. en Algérie décrites par Quézel et Santa (1962).

Section*	Espèces	(2n)**	Type de plante	Chorologie	Habitat
Annulares DC	<i>A. cruciatus</i> Link.***	16	A	Méd.- Sah.	Pâturages, clairières, rocailles arides
	<i>A. mauritanicus</i> Coss. et Dur.	28	A	Bét.- Rif.	Pâturages rocailleux
	<i>A. geniorum</i> Maire	16	A	End.	Lit des oueds désertiques
	<i>A. corrugatus</i> Bertol.	32	A	Sah.- Sind.	Pâturages désertiques
	<i>A. gyzensis</i> Del.	48	A	Sah.- Sind.	Pâturages sablonneux
	<i>A. eremophilus</i> Boiss.	16	A	Sah.- Sind.	Lit des oueds sahariens
	<i>A. mareoticus</i> Del.	28	A	Sah.- Can.	Steppes, Oueds sahariens
Sesamei DC	<i>A. gryphus</i> Coss. et Dur.	16	A	End. W.N.A.	Pâturages arides
	<i>A. scorpioides</i> Pourret	48	A	Ibéro.- Maur	Broussailles, pâturages
	<i>A. sesameus</i> L.	16	A	W. Méd.	Pâturages, forêts claires
	<i>A. stella</i> Gouan	16	A	Méd.	Pâturages
	<i>A. geniculatus</i> Desf.	16	A	Ibéro-Maur	Pâturages, forêts
	<i>A. sinaicus</i> Boiss.	16	A	Méd.-Iran-Tour	Pâturages arides
	<i>A. tribuloides</i> Del.	16	A	Sah.	Pâturages désertiques

Astragalus Boiss	<i>A. pseudotrigonus</i> Batt. et Trab. ^{***}	16	A	End.- Sah.	Pâturages sablonneux désertiques
	<i>A. gombo</i> Coss. et Dur.	16	A	End. N. Sah.	Pâturages sablonneux désertiques
	<i>A. gomboeformis</i> Pomel	16	A	End. N. Sah.	Pâturages sablonneux désertiques
	<i>A. akkensis</i> Coss.	N/A	A	End. Sah.	Rocailles désertiques
	<i>A. Faurei</i> Maire	N/A	V	End. Traras	Rocailles
Buceras DC	<i>A. edulis</i> Coss. et Dur.	14, 28	A	Bet.- Mar.	Pâturages
	<i>A. hamosus</i> L.	32, 24, 40, 44, 46, 48	A	Méd.	Pâturages, forêts Claires
Drepanodes Bge	<i>A. falciformis</i> Desf.	16	V	End. E.N.A.	Pâturages
	<i>A. Reinii</i> Ball.	N/A	V	End. G Atlas-Ouar	Broussailles
Hypoglottidei DC	<i>A. glaux</i> L.	16	V	W. Méd.	Forêts claires. Broussailles
	<i>A. bourgeanus</i> Coss.	N/A	V	Ibéro- Mar.	Pâturages
Incani DC	<i>A. incanus</i> L.	16	V	W. Méd.	Pâturages arides
	<i>A. monspessulanus</i> L.	16	V	Méd.- Eur.	Forêts claires, pâturages
Platyglottis Bge	<i>A. Font-queri</i> Maire et Sennen	N/A	V	End. E.Mar.	Pâturages arides
	<i>A. peregrinus</i> Vahl.	16	A	E. Méd.	Steppes
Alopecuroidei DC	<i>A. Narbonensis</i> Gouan	16	V	W. Méd.	Forêts claires, steppes
Caprini DC	<i>A. caprinus</i> L.	16	V	Méd.	Broussailles, pâturages

Cyamodes Bge	<i>A. baeticus</i> L.	30	A	Méd.	Forêts claires
Epiglottis Bge	<i>A. epiglottis</i> L.	16	A	Méd.	Broussailles, pâturages
Herpocaulos Bge	<i>A. Vogelii</i> (Webb.) Borm.	N/A	A	Paléo-trop. Sah.	Pâturages désertiques
Onobrychoidei DC	<i>A. Onobrychis</i> L.	16, 32, 64	V	Eur.- Iran-Tour.	Rocailles arides
Ornithopodium Bge	<i>A. tenuifoliosus</i> Maire	N/A	V	Ibéro- Maur.	Pâturages arides
Pentaglottis Bge	<i>A. echinatus</i> Murr.	28	A	Méd.	Broussailles, terrains argileux
Poterion Bge	<i>A. armatus</i> Willd ^{***}	16	A	End. N.A.	Pâturages arides
Tapinodes Bge	<i>A. depressus</i> L.	16	V	Oro- Méd.	Rochers des hautes montagnes
Incertain	<i>A. lusitanicus</i> Lamk	16	V	Méd.	Forêts claires, broussailles

A : annuelle, V : vivace, N.A. : Nord-Africain, Ibéro-Maur. : Ibéro-Maurétanien, Ibéro-Mar. : Ibéro-Marocain, Mar. : Marocain, Bét-Rif.: Bético-Rifain, Méd. : Méditerranéen, Sah. : Saharien, Sah-Sind. : Sahara –Sindien, Afr. : Africain, End. : Endémique, Trop. : Tropical, Paléo-trop. : Paléo-tropical, Irano-Tour. : Irano-Touranien, Oro. : Montagnard, Eur. : Européen, Can. : Canarien, N.: Nord; S. : Sud; E. : Est; W.: Ouest.

* D'après Podlech (1987) et réactualisé en Décembre 2011.

** Le nombre de chromosomes est compilé à partir des différents rapports fournis par l'International organisation of Plant Biosystematists.

*** Taxons sujet de notre étude

N/A : Non répertorié.



Figure 3. a, b, c : *Astragalus armatus* subsp *tragacanthoides*; d, e, f : *A. armatus* subsp *numidicus*; g, h, i : *A. cruciatus*; j, k, l : *A. pseudotriginus*. Photos K. Baziz.

Tableau 3. Caractères morphologiques des taxons étudiés.

Espèces	Synonymes	Feuilles	Inflorescences	Fruit
<p><i>Astragalus armatus</i> subsp. <i>tragacanthoïdes</i>(Desf.) Maire (Nom invalide)</p>	<p>- <i>A. fontanesii</i> subsp <i>tragacanthoïdes</i> (Desf.) Maire - <i>A. armatus</i> Wild susbp. <i>armatus</i> - <i>Acanthyllis tragacanthoïdes</i> (Desf.) Pomel - <i>Anthyllis</i> <i>tragacanthoïdes</i>Desf.</p>	<p>5- 8 paires de folioles hispidés, rachis devenant épineux</p>	<p>Grappe dense à fleur blanc rosé</p>	<p>Vésicule papyracée</p>
<p><i>Astragalus armatus</i> subsp. <i>numidicus</i> (Coss. et Dur.) Maire</p>	<p>- <i>A. fontanesii</i> subsp. <i>numidicus</i> (Coss. et Durieu ex Murb.) Maire - <i>A. numidicus</i> Coss. et Durieu ex Murb. - <i>Acanthyllis numidica</i> (Coss. et Dur) Pomel - <i>Anthyllis numidica</i> Coss. et Dur.</p>	<p>3- 5 paires de folioles glabres en dessus, rachis devenant épineux</p>	<p>Grappe dense à fleur blanc rosé</p>	<p>Vésicule papyracée</p>

<i>Astragalus cruciatus</i> Link.	A. corrugatus Bertol.	4-6 paires de folioles poilues	Grappe capituliforme, fleur jaune, violet pâle	Gousse cruciforme à extrémité pointue.
<i>Astragalus pseudotrigonus</i> Batt. et Trab. (Nom invalide)	<i>A. trigonus</i> DC.	4-6 paires de folioles dessus glabre, dessous poilu argenté. Le rachis de la feuille devenant épineux	Grappe Jaune à l'aisselle des feuilles	Gousse poilue (2,5 cm), effilée en rostre, glabre

Les noms écrits en gras sont les noms validés par Dobignard et Chatelain (2010- 2013).

2. 6. Importance économique et usages traditionnels

Du point de vue économique et industriel, certaines espèces (*A. gummifer* Labill., *A. microcephalus* Willd., *A. strobiliferus* Royle ex Benth.) sont utilisées comme source de gomme adragante, substance largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique et dans la production de divers produits alimentaires comme les crèmes glacées, les lotions, les spiritueux et les gommes à mâcher (Gentry, 1957 ; Zarre-Mobarakeh, 2000).

En médecine traditionnelle, les plantes sont utilisées depuis des millénaires par les Hindous et les Chinois (Chaudhary et al., 2008). En Inde, la pâte de feuilles est utilisée pour réduire le taux de sucre dans le sang (Anonyme, 1985), alors que les racines sont mâchées par les femmes pour stimuler la lactation. D'autres études bibliographiques ont confirmé qu'*A. malacophyllus* Benth. ex Bunge présente des activités antituberculeuses, antitussives et de purification du sang (Verbeken et al., 2003). En Chine, les racines d'astragales sont utilisées comme tonique, pour le traitement du diabète et des néphrites (Chaudhary et al., 2008). Elles sont également utilisées pour la régénération des tissus, la cicatrisation des plaies et la fabrication de médicaments visant à renforcer le système immunitaire après les traitements anti cancéreux (Gao et al., 2001 ; Duan et Wang, 2002 ; McCulloch et al., 2006 ; Tin et al., 2007).

Outre ces valeurs médicinales, un grand nombre d'astragales est utilisé pour l'alimentation du bétail à l'exemple d'*Astragalus nuttalianus* Speg., *Astragalus cicer* L. (Belkassoui, 2007). D'autres espèces sont toxiques pour certains animaux d'élevage (bovins et ovins) et de la faune sauvage (James et Van Kampen, 1974 ; Majak et Cheng, 1983; El Hamidi et Leipold, 1989). Ces dernières sont classées en trois catégories selon la nature du principe toxique qu'elles renferment (James et Shupe, 1986):

- Les espèces accumulatrices de Sélénium (James et al., 1983).
- Les espèces productrices de produits nitrés (Ebrahimzadeh et al., 1999 ; Niknam, 2002).
- Les espèces renfermant des alcaloïdes indolizidiques (James et al., 1980 ; Cronin et al., 1981).

3. Notions de Cytogénétique

3. 1. L'hétérochromatine

Sur la base d'observations cytologiques faites en utilisant des colorants spécifiques, Heitz (1928) distingua deux types de chromatine : l'euchromatine, modérément colorée, représente la portion du génome génétiquement active et correspond à la phase décondensée durant l'interphase. L'hétérochromatine, plus colorée, pauvre en gènes, correspond, quant à elle, à la portion du génome qui ne se décondense pas au cours du cycle cellulaire. Cette portion est majoritairement composée de séquences répétées de nature et de complexité variables. Le compartiment hétérochromatinien est divisé en deux sous-types : l'hétérochromatine facultative et l'hétérochromatine constitutive (Dorkeld, 1994 ; Harry, 2001; Anthony et *al.*, 2002).

- L'hétérochromatine facultative

L'hétérochromatine facultative est définie comme étant des régions géniques silencieuses du point de vue transcriptionnelle qui présente une structure chromatinienne compactée (Trojer et Reinberg, 2007). Son « état hétérochromatinien » est réversible, et elle garde la faculté de s'interconvertir en euchromatine (Zhimulev et Belyaeva, 2003). Cette réversibilité dépend de la position de l'hétérochromatine vis-à-vis de la périphérie nucléaire, du stade de développement cellulaire et de l'expression génique mono-allélique (Trojer et Reinberg, 2007).

- L'hétérochromatine constitutive

C'est une région qui reste compactée tout au long du cycle cellulaire, quelque soit le stade du développement cellulaire et est donc très peu accessible aux facteurs de transcription. L'hétérochromatine constitutive est formée principalement de séquences d'ADN courtes et répétées en tandem (Sat), d'éléments géniques mobiles (Transposons), et est pauvre en gènes. Ces séquences sont retrouvées principalement autour des régions centromériques, paracentromériques et télomériques (Grewal et Elgin, 2002; Grewal et Moazed, 2003) ou intercalaires

(Siljak-Yakovlev et Cartier, 1986). Selon Wallrath (1998), elles assurent la stabilité du génome et sont essentielles pour la ségrégation des chromosomes. Elles semblent également jouer un rôle dans la sénescence cellulaire (Gaubatz et Cutler, 1990; Rudert, et *al.*, 1995).

Lors d'un examen microscopique, la détection des régions hétérochromatiques est facile. Le C-banding révèle la présence d'hétérochromatine constitutive (Coming, 1978), le DAPI celle de l'hétérochromatine riche en AT (Williamson et Fennel, 1975) et la Chromomycine celle de l'hétérochromatine riche en GC (Schweizer, 1976). La comparaison entre espèces sur la base des différents types de bandes permet la détection des remaniements chromosomiques au cours du processus de spéciation au sein d'un complexe d'espèces (Godelle et *al.*, 1993).

3. 2. Les nucléoles

Les nucléoles sont des structures fibrillaires sphériques et denses du noyau interphasique et prophasique, associées aux chromosomes (Kiss et Darzacq, 2001). Le nucléole contient les gènes codant l'ARN ribosomique (ARNr) ainsi que des particules contenant les ARNr 18S et 28S à différents stades de maturation et d'assemblage avec les protéines ribosomiques, ce qui en fait le centre de synthèse des ARNr et d'assemblage des sous-unités ribosomiques (Hadjiolov, 1985; Hernandez et *al.*, 2004 ; Raska et *al.*, 2004).

La fonction principale de la région nucléolaire est la synthèse de différents types d'ARNr et le traitement des pré-ribosomes. Cependant, d'autres fonctions peuvent être attribuées au nucléole, comme l'inhibition de l'appariement des chromosomes homologues et la formation du complexe synaptonémal (John, 1990).

3. 2. 1. Les NORs et les gènes ribosomiaux

Ce sont des segments spécifiques chromosomiques associés au nucléole qui correspondent à un groupe de gènes ADN ribosomiques 35S codant l'ARN ribosomique (Schwarzacher et Wachtler, 1983 ; Heslop-Harrison, 1991 ; Hernandez-Verdun, 2004) et à des protéines ribosomiques (Sirri et *al.*, 2000 ; Hernandez-Verdun, 2004). Ces gènes sont séparés par des espaceurs transcrits interne et externe. Les premiers sont des unités riches en séquences répétées en tandem GC,

ce qui explique pourquoi les NORs sont généralement marqués quand ils sont soumis à une coloration au fluorochrome Chromomycine A3 (Torres et *al.*, 1990; King, 1991 ; Sumner, 1994). Les NORs sont repérés avec la coloration au nitrate d'argent (Jiménez et *al.*, 1988; Derenzinni, 2000), la précipitation d'argent sur le site Nucleolar Organizer Regions (NORs) étant liée à l'activité transcriptionnelle (Hubel, 1985).

Associés à L'ADNr 5S (extra- nucléolaire), les gènes ADNr 35S contribuent à la fabrication des ribosomes (Hernandez-Verdun, 2004). Les unités codantes des deux familles sont hautement conservées dans tout le règne végétal et sont soit séparées, soit portées par le même chromosome, soit encore situées côte à côte ou colocalisées (Siljak-Yakovlev, 2003). Le nombre et la position des gènes ADNr étant constants dans une espèce, ils peuvent varier entre les espèces, ce qui fait qu'ils représentent un marqueur cytogénétique important pour l'étude de l'évolution chromosomique.

4. Quantité d'ADN

L'estimation de la quantité d'ADN nucléaire, par cytométrie en flux est une des applications les plus fréquemment utilisées dans la systématique des plantes (Suda, 2004). Cette taille donne une estimation du niveau de ploïdie probable d'un individu, en comparaison avec la taille du génome d'une plante référence de ploïdie connue (Kamaté et *al.*, 2001). Cette estimation, en combinaison avec le comptage des chromosomes, fournit des informations précises sur la compréhension des mécanismes évolutifs qui surviennent dans des populations d'une même espèce ou entre plusieurs espèces (Ramirez-Morillo et Brown, 2001 ; Dart et *al.*, 2004; Obermayer et Greilhuber, 2006).

Les angiospermes présentent une très importante variabilité de la taille de génome, allant de 0,1 pg chez *Fragaria viridis* à 127,4 pg chez *Fritillaria assyriaca* (Leitch et *al.*, 1998 ; Soltis et *al.*, 2003 ; Leitch et *al.*, 2005). Malgré cette grande variation, la plupart des angiospermes ont « de petites valeurs » de 2C, comprises entre 0,2-7 pg selon la classification établis par Leitch et *al.* (1998).

En dépit du très grand nombre d'espèces qui composent les astragales, quelques espèces seulement ont fait l'objet d'études pour la détermination de l'ADN nucléaire. La quantité d'ADN nucléaire a été évaluée pour 38 espèces (Siljak-Yakovlev et al., 2010 ; Temsch et al., 2010 ; Bou Dagher-Kharrat et al., 2013 ; Abdel Samad et al., 2014). Les valeurs obtenues pour les quantités d'ADN chez les espèces diploïdes varient de 0.92 pg/2C chez *Astragalus epiglottis* à 4.79 pg/2C chez *Astragalus cedreti* alors que la taille du génome d'*Astragalus oleaefolius*, espèce dodécaploïde ($2n = 12x = 96$ chromosomes) est la plus grande, jusqu'ici publiée, chez ce genre ($2n = 13.25$ pg/2C).

5. Le pollen : taille, morphologie et types aperturaux

L'étude du pollen est particulièrement intéressante, dans le sens où les caractères morphologiques des grains de pollen sont spécifiques de chaque taxon (Donadieu, 1982 ; Diot, 2000). Wodehouse (1928) indique que dans certaines familles, les grains de pollen de toutes les espèces sont très semblables (Poacées, Brassicacées) alors que dans d'autres familles, le pollen est plus diversifié (Astéracées, Fabacées). Pons (1958) considère que l'étude de la morphologie pollinique est «un bon secours pour tester et analyser l'espèce, unité fondamentale de la systématique» et permettre ainsi la compréhension de la phylogénie des espèces.

Le grain de pollen est composé de deux à trois cellules protégées par une double enveloppe protectrice, l'intine et l'exine (Erdtman, 1966 ; Edlund et al., 2004). L'exine comporte des apertures qui correspondent à une région plus fine que le reste de la paroi (Erdtman, 1947). Le rôle le plus souvent cité dans la littérature pour les apertures est qu'ils servent de site de germination du tube pollinique et de porte d'entrée pour l'eau ou d'autres substances (Wodehouse, 1935 ; Furness et Rudall 1999; 2004). L'aperture se présente soit sous forme allongée (sillon) soit sous forme arrondie (pore), et de ce fait, définit le type apertural (Erdtman, 1947).

Ce sont particulièrement l'architecture extrêmement variée de l'exine, ainsi que le nombre et le type d'apertures, qui constituent les principales caractéristiques permettant de déterminer, avec plus ou moins de précision, la position systématique

du grain de pollen (Moore, 1978; Punt et *al.* 1994 ; Duluqo et Tulon, 1998 ; Furness et Rudall, 2004 ; Milne, 2005).

En tant que caractère morphologique fiable et facilement identifiable, la morphologie du grain de pollen, et en particulier le type apertural, a été beaucoup étudiée chez les astragales. Les grains de pollen sont assez diversifiés. Ils sont formés de grains libres (monade), de taille variable, généralement tricolporés ou zonotricolporés. L'exine est généralement microreticulée, réticulée, perforée et psillée au niveau polaire (Perveen et Qaiser, 1998 ; Akan et *al.*, 2005 ; Dane et *al.*, 2007 ; Ekici et *al.*, 2008 ; Al Ghamadi et *al.*, 2013 ; Dinç et *al.* 2013).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET

MÉTHODES

1. Matériel végétal

Le matériel d'étude est constitué de graines de 8 populations représentant 4 taxons. Chaque population est constituée d'un minimum de 10 individus. Ces populations qui proviennent de milieux différents (Fig. 5 et Tab. 4) ont été récoltées et identifiées par K. Baziz et identifiées sur la base de la flore de Quézel et Santa (1962) au sein du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV).

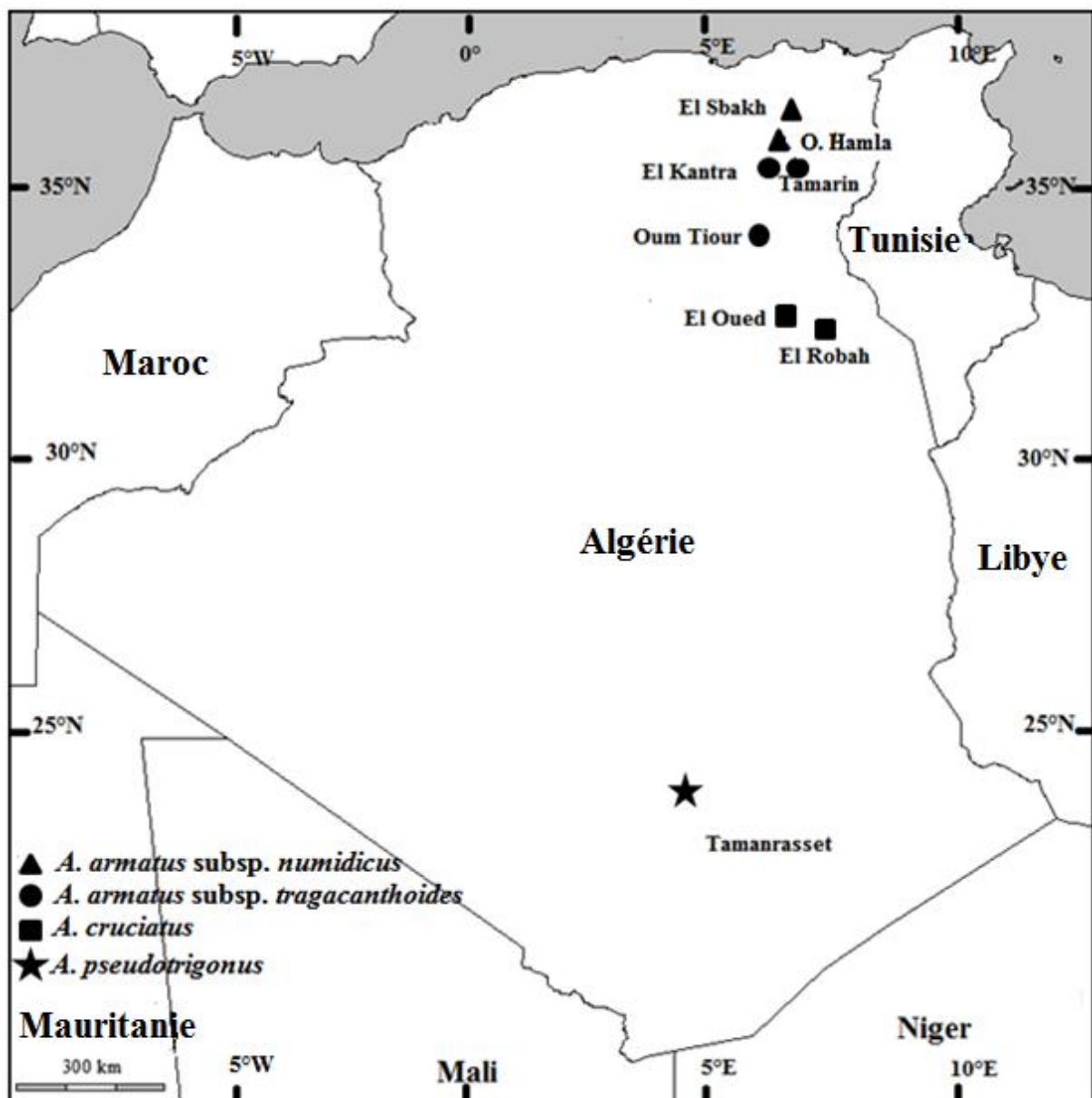


Figure 4. Localisation des sites de prélèvement.

Tableau 4. Données écologiques des populations étudiées

Taxon	Section	Lieu de récolte	Latitude/ Longitude	Altitude (m)	Pluviométrie (mm)	Étage Bioclimatique	Date de récolte
<i>A. armatus</i> subsp <i>tragacanthoides</i>	<i>Poterion</i> Bunge	El Kantara	35° 32' 57" N 06° 04' 74" E	1150	600-300	Semi Aride	Fév. 2006
		Tamarin	35° 51' 54" N 06° 29' 38" E	800	600-300	Semi Aride	Fév. 2006
		Oum Tiour	35° 18' 10" N 05° 48' 49" E	730	600-300	Semi Aride	Juin 2006
<i>A. armatus</i> subsp <i>numidicus</i>	<i>Poterion</i> Bunge	Oued Hamla	35° 19' 22" N 05° 50' 22" E	838	600-300	Semi Aride	Juin 2006
		Sbakh	34° 13' 56" N 05° 40' 15" E	85	600-300	Semi Aride	Juin 2006
<i>A. cruciatus</i>	<i>Annulares</i> DC	El Robah	33° 17' 15" N 06° 55' 01" E	90	100	Saharien	Juin 2009
		El Oued	33° 41' 55" N 06° 41' 08" E	30	100	Saharien	Juin 2009
<i>A. pseudotrigonus</i>	<i>Astragalus</i> Boiss	Tamanrasset	23° 41' 20" N 05° 12' 09" E	980	100	Saharien	Juil. 2009

2. Méthodes

2. 1. Techniques de cytogénétique classique

2. 1. 1. Dénombrement chromosomique et établissement du caryotype

Le dénombrement chromosomique et l'établissement des caryotypes se font sur la base de mitoses racinaires obtenues selon le protocole suivant :

- Scarification des graines

Une incision est pratiquée du côté opposé à l'embryon soit par une lame de rasoir, soit par du papier verre.

- Stérilisation

Les graines sont stérilisées dans un mélange d'eau de javel (12°) et d'eau distillée (1:1) pendant 10 minutes suivi d'un rinçage à l'eau distillée.

- Mise en germination

Les graines scarifiées sont mises à germer dans des boîtes de Pétri, tapissées de papier Whatman et imbibés d'eau distillée à 24°C. La germination est obtenue après un délai de 2 à 6 jours selon les espèces. Nous signalerons ici que le taux de germination n'a pas été très élevé à cause de l'apparition de parasites sur les graines. A cet effet, il nous a fallu près de 500 graines/ espèces pour obtenir un nombre suffisant de racines.

- Prétraitement

Les racines en croissance active sont excisées après avoir atteint une taille de 0.5 à 1 cm et collectées dans la solution à 0.002 M de 8-Hydroxy-Quinoleine pendant 3h 16°C. Cette étape permet le blocage de l'activité du fuseau mitotique et une contraction optimale des chromosomes (Yakar, 1952).

- Fixation

Les racines sont plongées dans la solution Carnoy I, un mélange d'éthanol absolu et d'acide acétique pur (3 :1) durant 48 h à 4°C. Cette étape sert à détruire toute vie

cellulaire et permet ainsi le blocage des divisions cellulaires. Pour le stockage, les racines fixées sont transférées dans l'éthanol à 70% à 04°C.

- Hydrolyse

Cette étape qui a pour but la destruction de la paroi cellulosique est effectuée en trempant les racines dans une solution 1N HCl à 60 °C pendant 8 minutes (Schreiber 1951; Ganesan et *al.*, 1958).

- Coloration

Pour l'observation, les apex racinaires hydrolysés sont colorés avec une solution d'acéto orcéine durant 10 à 20 minutes. Ce colorant se fixe sur les groupements aldéhydiques libérés lors de l'hydrolyse pour donner une coloration rouge aux chromosomes.

- Montage des lames

Après coloration, les apex colorés sont découpés et déposés dans une goutte de carmin acétique sur la lame. La préparation est recouverte avec une lamelle et écrasée soigneusement afin d'assurer une bonne dispersion des chromosomes. Les préparations sont montées ensuite au DPX.

- Observation et photographie

L'observation et la photographie des plaques métaphasiques se font à l'aide d'un microscope ZEISS Axio scope 2 sur lequel est montée une caméra Sony Color Video, model MC 3255 et d'un logiciel Axiovision 2.0.5.

- dénombrement chromosomique et établissement du caryotype

Le caryotype est établi à partir de photographies de 5 plaques métaphasiques provenant de plusieurs individus. Les plaques sont rigoureusement sélectionnées afin d'éviter les erreurs possibles dues aux différents degrés de spiralisation des chromosomes. La différence de longueur des chromosomes ne doit pas dépasser d'une lame à une autre, le seuil de 10 % (Bentzer et *al.*, 1971). Les chromosomes sont ensuite dénombrés, mesurés, appariés et alignés de la plus grande paire à la plus petite (Levan et *al.*, 1964).

Les idiogrammes sont construits d'après les mesures suivantes :

- Longueurs des bras courts (BC) et des bras longs (BL)
- Longueur totale de chaque chromosome $LT = BC + BL$
- Valeur moyenne des rapports bras longs / bras courts $R = BL / BC$
- Indice centromérique pour chaque paire chromosomique $Ic \% = (BC / BL) \times 100$
- Indice d'asymétrie du caryotype $Ias = (\sum BL \times 100) / \sum LT$

Toutes les mesures sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5. Nomenclature chromosomique proposée par Levan et *al.* (1964)

Position du centromère	D	R	Ic	Type chromosomique
Position médiane	00.0	1.0	50.0	M
Région médiane	00.0-02.5	1.0-1.7	50.0-37.5	m
Région submédiane	02.5-05.0	1.7-3.0	37.5-25.0	sm
Région subterminale	05.0-07.0	3.0-7.0	25.0-12.5	st
Région terminale	07.0-10.0	7.0-∞	12.5-00.0	t
Position terminale	10.0	∞	00.0	T

D : bras long (BL) – bras court (BC) ; **R** : bras long (BL)/ bras court (BC) **Ic** : indice centromérique (bras court/ longueur total du chromosome) **M** : métacentrique ; **m** : métacentrique sensu largo, **sm** : Submétacentrique, **st** : subtélocentrique, **t** : acrocentrique, **T** : télocentrique.

2. 2. Coloration au nitrate d'argent AgNO 3

Cette technique, proposée par Howell et Black (1980), permet de mettre en évidence le nombre de nucléoles et par conséquent d'évaluer l'activité des NORs. Les racines sont dans un premier temps rincées plusieurs fois jusqu'à élimination totale du fixateur. Elles sont, ensuite plongées dans une solution de nitrate d'argent à 15 % et à pH 5.5 à une température de 60 °C pendant 16 h, puis transférées dans une solution de révélation contenant de l'hydroquinone à 1% et du formaldéhyde à 10%

pendant 5 mn en agitation douce. Pour chaque population, le nombre de nucléoles est déterminé dans 6 individus à raison de 50 cellules/ individus.

3. Méthodes de cytogénétique moléculaire

- Préparation des protoplastes

Le prélèvement, le prétraitement, la fixation et la conservation des méristèmes racinaires s'effectuent de la même façon que pour les comptages chromosomiques. La technique qui consiste à obtenir des préparations cellulaires sans parois pectocellulosiques, développée par Geber et Schweizer (1987), est légèrement modifiée.

Les racines sont rincées dans un tampon citrate 0.01 M à pH 4.6 pendant 20 min. Elles sont ensuite transférées dans un verre de montre contenant une solution enzymatique composée de 3% de cellulase R10 (Yakult Honsha Corporation, Tokyo, Japan), 1% de pectolyase Y23 (Seishin Corporation, Tokyo, Japan), et 4% d'hémicellulase (Sigma Chemical, Saint-Quentin Fallavier, France). Le verre de montre est placé dans une boîte de Pétri contenant du papier absorbant imbibé d'eau puis mis dans une étuve à 37 °C. La durée de digestion varie d'une espèce à l'autre : elle ne doit être ni trop courte, ce qui induirait la constitution d'un voile sur les chromosomes qui empêche la fixation des sondes d'ADN, ni trop longue, ce qui conduirait à la dégradation des chromosomes. Les racines sont lavées dans le tampon citrate pendant 10 min puis dilacérées sur une lame dans une goutte d'acide acétique à 45% et enfin, recouvertes par une lamelle pour l'observation des chromosomes.

3 .1. Fluorochrome banding (marquage des bases GC par la Chromomycine A3)

La détection des régions d'ADN riche en bandes GC est faite sur les protoplastes en utilisant la Chromomycine A3 (CMA, Sigma, Allemagne) selon la méthode de Schweizer (1976), modifiée par Siljak-Yakovlev et *al.*, (2002). La préparation est réhydratée pendant 15 min, en déposant plusieurs gouttes de tampon McILvaine à pH 7 contenant du MgSO₄. Les lames sont ensuite légèrement secouées afin de les débarrasser de l'excédent de tampon. Un dépôt d'une goutte de chromomycine A₃

est effectué sur la préparation, puis laissée durant 1h à l'obscurité. Les lames sont ensuite rincées avec le tampon McILvaine à pH 7, sans MgSO₄ puis contre colorées avec le vert de méthyle à 0.01 % pendant 7 min. Enfin, les lames sont rapidement rincées avec le tampon McILvaine à pH 5.5 puis drainées et ensuite montées dans une goutte de Citifluor AF1 (Agar Scientific, Stansted Essex, Grande-Bretagne). L'observation se fait au microscope à épifluorescence avec un filtre à une longueur d'onde d'excitation de 450 nm et d'émission de 560nm.

3 .2. Hybridation *in situ* (FISH)

L'hybridation *in situ* est fondée sur la propriété de réassociation spécifique d'une sonde dénaturée (ADN simple brin marqué) en solution avec une préparation chromosomique dénaturée grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques. Les hybrides sonde-préparation sont ensuite révélés par immunodétection et enfin l'observation s'effectue par microscope à épifluorescence.

- Les sondes

Pour l'observation des sites de gènes ribosomiaux 5S et 35S, une double hybridation *in situ* est faite selon Heslop-Harrison et *al.* (1991) avec de légères modifications. Les sondes utilisées lors de l'hybridation sont :

- Le pTa71 (Gerlach et Bedbrook, 1979), utilisée pour la détection du gène ribosomique 35S, est un clone de 4 Kb obtenu à partir d'un fragment EcoR1 incluant les séquences ADNr 35S d'*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Cette sonde est marquée avec le fluorochrome Cy3 (Amersham, Courtaboeuf, France) par nick translation.

- Le pTa794 (Gerlach et Dyer, 1980), utilisée pour la localisation de l'ADNr 5S, est un fragment de 410 pb de *Bam*HI incluant des séquences d'ADNr 5S de *Triticum vulgare* Vill. marqué à la digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Maylan, France) après amplification par PCR utilisant des amorces universelles M13.

- Prétraitement des préparations chromosomiques

Lors de cette étape, les lames subissent une déshydratation dans une série de bains d'alcool à 70%, 90% et 100% pendant 5 min chacun, puis sont asséchées. Elles sont ensuite traitées avec une solution enzymatique avec RNase (100 µg/mL dans 2xSSC) pendant 1 h à 37 °C dans une chambre humide. Cette étape permet la prévention de l'hybridation entre l'ADN et l'ARN cytoplasmique et l'éclaircissement du cytoplasme. Les lames sont rincées dans une solution 2xSSC pendant 3 fois 5 min à température ambiante, puis replongées dans une solution enzymatique de Pepsine (70 µl, 0.1mg/mL dans HCl 0.01 N) pendant 30 min à 37 °C. Les lames sont ensuite lavées 2 fois 5 min dans une solution 2X SSC, puis déshydratées par lavage dans une série de solution d'éthanol glacial (-20 °C) à 70, 90 et 100% pendant 3 min chacun. Les lames sont mises à sécher en position verticale pendant 1 h.

- Préparation de la mixture de la sonde

Parallèlement au prétraitement des lames, les mixtures de sondes sont préparées dans les quantités suivantes:

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

- Dénaturation de la mixture et hybridation

La mixture est dénaturée dans une solution 2x SSC et de formamide 70% pendant 10 min à 70 °C puis refroidie dans de la glace pendant au moins 5 min. La mixture est ensuite déposée sur les lames à raison de 50 µL/lame, recouverte par une lamelle plastifiée et mise dans une boîte hermétique. La boîte est transférée dans un

bain- marie à 55 °C pendant 5 min puis incubée dans une chambre humide pendant toute une nuit à 37 °C pour hybridation.

- Lavage post-hybridation

Ce lavage permet de débarrasser l'excédent de la mixture de sonde qui n'a pu être hybridé. Les lamelles sont enlevées délicatement et les lames rincées successivement avec balancement doux dans une série de 7 bains ;

- 2xSSC pendant 3 min à température ambiante;
- 3 fois 5 min dans 2xSSC à 42 °C;
- 2 fois 5 min dans de la formamide 20% à 42 °C;
- 5 min dans 0.1xSSC à 42 °C;
- 3 fois 5 min dans 2xSSC à 42 °C;
- 5 min dans 4xSSCT à 42 °C;
- 5 min dans 4xSSCT sous agitation à température ambiante.

- Immuno-détection

Les préparations sont incubées à l'obscurité, dans le tampon de détection BSA 5% (sérum d'albumine bovin) contenant de l'anti digoxigenin-fluoresceine pendant 1 h à 37 °C dans une chambre humide puis rincées dans 4xSSCT 3 fois 5 min à température ambiante.

- Contre coloration

La contre-coloration est effectuée à température ambiante et à l'obscurité, en utilisant le DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) dans le liquide de montage VECTASHIELD (Vector Laboratories, Peterborough, UK). Une lamelle recouvre délicatement la préparation en évitant la formation de bulles.

- Analyse d'images

Les lames sont dans un premier temps gardées à l'obscurité dans un frigo durant la nuit. L'observation se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence, Zeiss Axiophot. Une série de filtres (excitation 365 nm, émission > 397 nm pour le DAPI, excitation 490 nm, émission 525 nm pour les signaux 35S, excitation 540-560, émission 580 nm pour les signaux 5S) est utilisée. La détection et les analyses des signaux

fluorescents sont faites à l'aide d'une caméra CCD ultrasensible (RETIGA 2000R, Princeton Instruments, Evry, France) et un analyseur d'images (MetaVue, Evry, France).

3 .3. Cytométrie en flux

La cytométrie de flux est une méthode d'analyse précise et automatique des cellules individuelles entraînées par un flux liquide (Métézeau et *al.*, 1988). Les molécules ou cellules passent une à une, à grande vitesse dans le faisceau d'un laser et la lumière réémise (par diffusion ou par fluorescence) permet de corrélérer son intensité à certains critères cellulaires. Cette technique permet de mesurer la taille du génome en quantifiant l'ADN. Cette taille donne une estimation du niveau de ploïdie probable d'un individu. La cytométrie en flux a été réalisée à l'ISV-CNRS (Gif-Sur-Yvette). La taille du génome et le pourcentage de GC ont été estimés selon Marie et Brown (1993). L'étalon interne utilisé est le *Petunia hybrida* cv. PxPc6 (2C = 2.85 pg).

- L'échantillonnage

Des feuilles fraîches sont prélevées à partir de cinq individus de chacun des taxons. Les feuilles de chaque taxon sont mélangées avec celles du pétunia et hachées à l'aide d'une lame de rasoir dans 600 µL de tampon Gif (45 mM MgCl₂, 30 mM sodium citrate, 60 mM 4-morpholinepropane sulfonate pH 7, 1% polyvinyl pyrrolidone (~10,000 Mr, P6755, Sigma Aldrich, France), 0.1% (w/v) Triton X-100, 10 mM sodium métabisulfite. La suspension est filtrée sur un nylon à pores calibrés (50 µm), puis traitée pendant 15 min avec la RNase (2.5 unités mL⁻¹). L'ADN est estimé en ajoutant un colorant spécifique, l'iodure de propidium (25 µg/ml; Roche, France), à 4 °C.

- Mesure

Après au moins 20 min d'incubation, les mesures sont effectuées sur 5000-10000 noyaux et répétées deux à trois fois pour cinq individus par espèce. Toutes les mesures ont été effectuées à l'aide d'un Cytomètre en Flux (CyFlow SL3, Partec, Munster, Germany) à Laser. L'ADN nucléaire total est estimé en calculant le rapport entre les pics de l'échantillon et ceux de l'étalon (*Astragalus /Petunia*) qui sera

multiplié par le contenu de l'ADN de l'étalon. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type.

4. Etude Palynologique

- Prélèvement des grains de pollen

Les fleurs utilisées pour extraire le pollen sont celles dont la position est toujours la même. Cette condition permet, une interprétation rigoureuse des résultats obtenus et d'éliminer ainsi, une éventuelle variabilité intra-individuelle. Le matériel est prélevé par simple agitation de l'anthère des fleurs avant l'anthèse afin d'éviter tout risque de contamination par un pollen étranger.

- Viabilité des grains de pollen

Le test de viabilité des grains de pollen utilisé est celui du Carmin acétique, décrit par Jahier et *al.*, (1992). La viabilité a été évaluée en dénombrant les grains de pollen sur 5 fleurs par espèces. Cinq comptages ont été réalisés pour chaque espèce à raison de 300 grains de pollen par comptage. Les grains sont considérés viables si la totalité du grain est colorée en rouge et sans déformation. Ils sont considérés non viables si le cytoplasme est vide ou caractérisé par la présence de quelques petits organites non colorés. Les observations et les photographies ont été réalisées au microscope Leica DM 4000 B Led.

- Morphologie des grains de pollen

La détermination des caractères morphologiques des grains de pollen a été faite suivant à la technique d'acétolyse d'Erdtman (1952) modifiée par Siljak-Yakovlev (1986). Pour l'observation en microscopie photonique, le pollen est lavé plusieurs fois dans l'alcool absolu directement sur lame, puis monté dans la gélatine glycérolisée colorée par la Fushine. Les mesures sont effectuées sur un échantillon de 30 grains de pollen provenant de 3 individus. Les caractères mesurés sont le diamètre polaire, le diamètre équatorial, la longueur du sillon, la largeur du sillon ; l'endoaperture, l'ectoaperture, la largeur de l'exine, le mésocolpe et l'apocolpe. La nomenclature adoptée est celle de Punt et *al.*, (1994).

Pour l'observation en microscopie à balayage, les grains de pollen placés dans un mélange acétolysant d'anhydride acétique pur et acide sulfurique concentré

(9:1 v.v.), sont mis dans un bain-marie froid amené à ébullition durant une minute. Après refroidissement pendant 10 min, le mélange est centrifugé à 1000 tours/min durant 10 min. Les grains de pollen sont rincés par centrifugation à l'acide acétique cristallisable puis laissés au repos durant 30 min. Un dernier rinçage à l'alcool absolu est effectué. Un échantillon est prélevé à l'aide d'une pipette et déposé sur une lamelle puis métallisé à l'aide de feuilles d'or dans un métaliseur Cressington Sputter Coater 108. L'observation et les photographies sont prises à l'aide d'un microscope à balayage électronique VEGA TS 5130 MM.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

1. Dénombrement chromosomique

Les comptages chromosomiques réalisés à partir de métaphases mitotiques ont porté sur l'ensemble des populations des 4 taxons étudiés. Ces comptages ont mis en évidence une constance du nombre de chromosomes tant au niveau intra spécifique que interspécifique. Les 7 populations analysées possèdent un nombre de chromosome diploïde $2n = 2x = 16$ avec un nombre de base $x = 8$.

2. Analyse des caryotypes

- *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* et *A. armatus* subsp. *numidicus*

L'analyse des caryotypes a montré une grande similitude entre le caryotype d'*A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* et celui d'*A. armatus* subsp. *numidicus*. Les deux sous espèces présentent la même formule chromosomique composée de sept paires métacentriques et d'une paire submétacentrique avec la présence d'une constriction secondaire observée sur le bras long de la 1^{ère} paire chromosomique (Fig.5 et 6). La formule chromosomique est : $2n = 16 = 12 m + 02 m\text{-}cs + 02 sm$. Une différence est toutefois notée dans l'emplacement de la paire submétacentrique : elle est classée en dernière position pour *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* et en 2^{ème} position chez *A. armatus* subsp. *numidicus*.

La longueur totale moyenne des chromosomes d'*A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* est comprise entre $3.80 \pm 0.50 \mu\text{m}$ et $5.47 \pm 0.43 \mu\text{m}$ alors que celle d'*A. armatus* subsp. *numidicus* est légèrement plus grande avec des valeurs comprises entre $3.87 \pm 0.10 \mu\text{m}$ et $5.92 \pm 0.25 \mu\text{m}$. Les caryotypes de ces deux taxons appartiennent à la classe 1A de Stebbins (1971) et possèdent des indices d'asymétrie de 58.48 % et de 59.05 % respectivement pour *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* et *A. armatus* subsp. *numidicus*. (Tab. 6 et Tab.7).

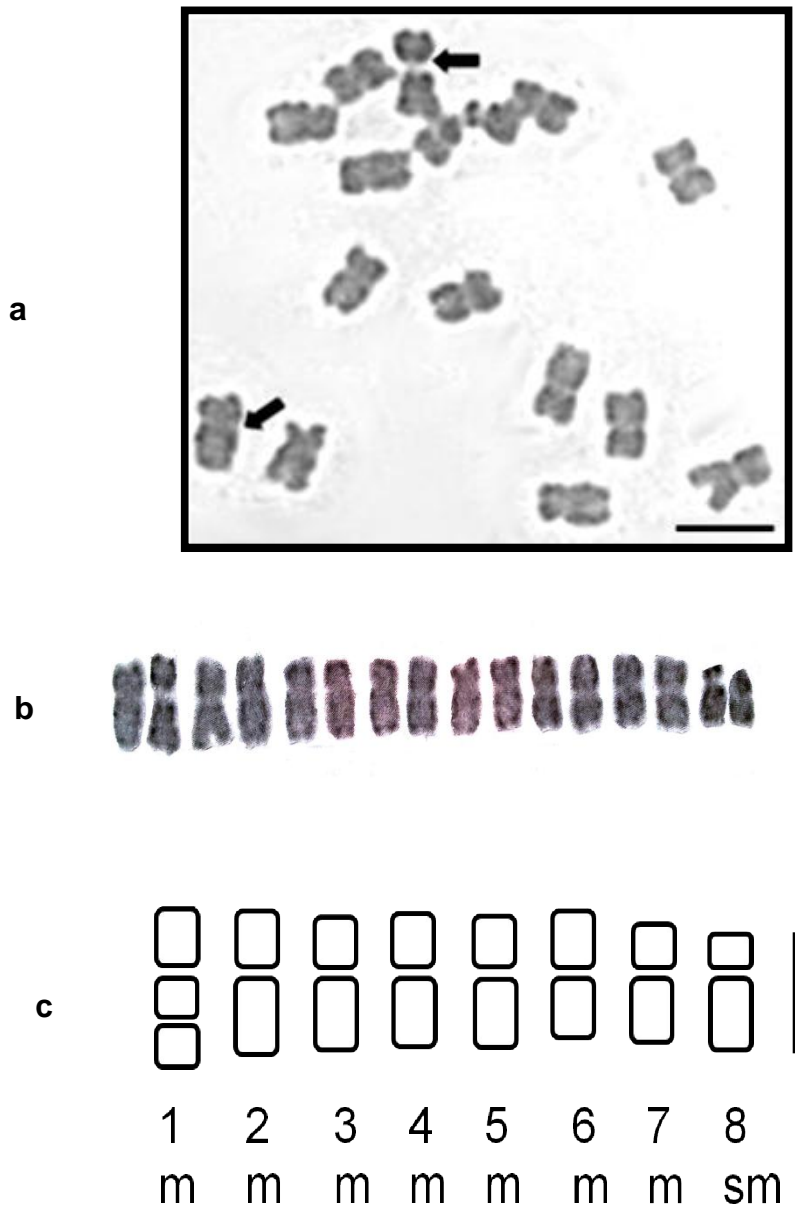


Figure 5. Caryotype d'*A. armatus* subsp. *tragacanthoides* (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme. Echelle= 4 µm. Les flèches indiquent la constriction secondaire.

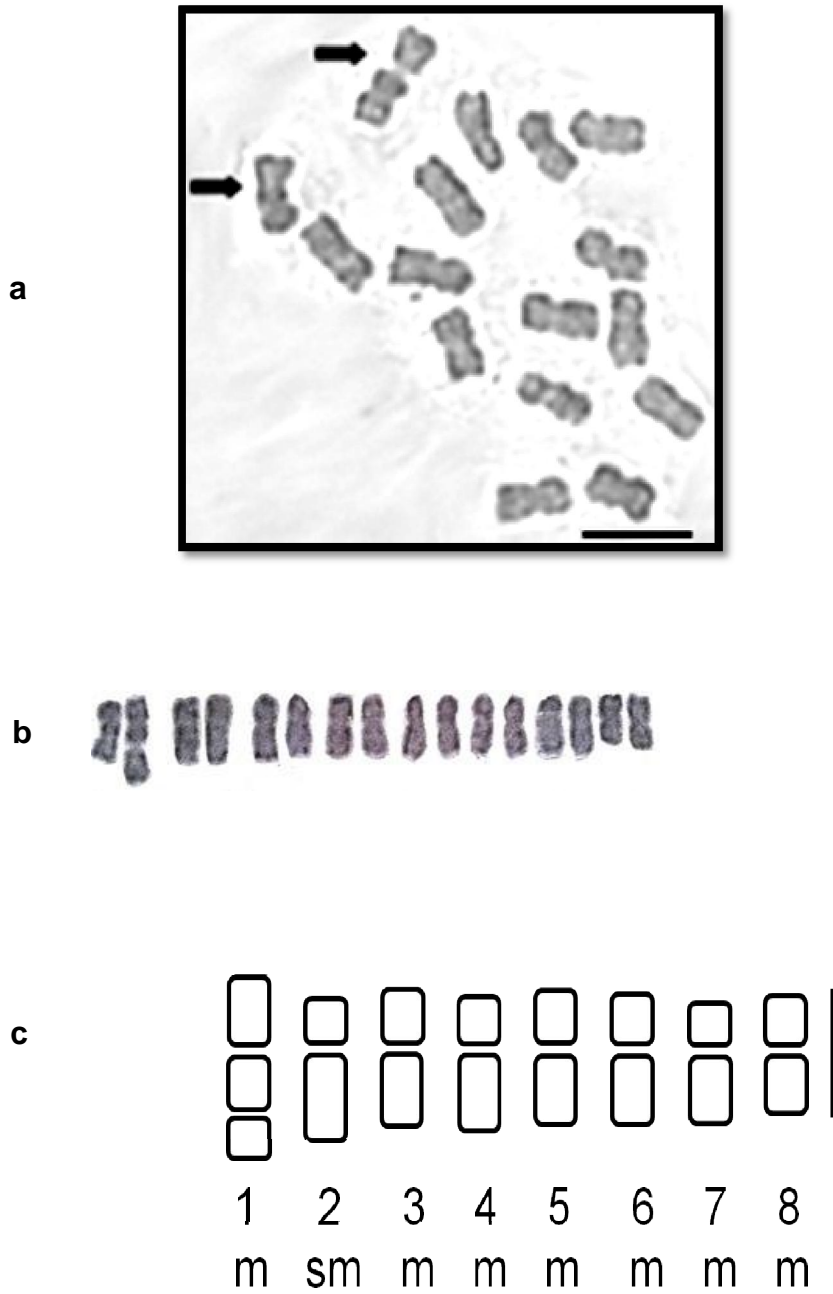


Figure 6. Caryotype d'*A. armatus* subsp. *numidicus* (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme Echelle= 4 μ m. Les flèches indiquent la constriction secondaire.

Tableau 6. Données numériques de la garniture chromosomique d'*A. armatus* subsp. *tragacanthoides*.

CHP	BL	BC	TL	R	IC%	TC	ΣTL	I%	SC
1	3.29 (0.20) ^{SD}	2.18 (0.30)	5.47 (0.43)	1.51	39.85	m-cs			
2	2.90 (0.40)	2.10 (0.10)	5.00 (0.46)	1.38	42.00	m			
3	2.75 (0.20)	1.90 (0.30)	4.65 (0.46)	1.44	40.86	m			
4	2.58 (0.10)	2.04 (0.40)	4.62 (0.60)	1.26	44.16	m	73.22		
5	2.64 (0.10)	1.90 (0.30)	4.54 (0.31)	1.38	41.85	m	(1.59)	8.48	A
6	2.29 (0.20)	2.14 (0.20)	4.43 (0.34)	1.07	48.31	m			
7	2.45 (0.30)	1.65 (0.10)	4.10 (0.27)	1.48	40.24	m			
8	2.51 (0.40)	1.29 (0.30)	3.80 (0.50)	1.94	33.95	sm			

CHP - Paire chromosomique; **BL** – bras long; **BC** – bras court; **LT** – longueur totale du chromosome; **R** – ratio bras long/court; **IC** - Index centromerique = 100 x S/(L+S); **Tc** - Type chromosomique; **m** - métacentrique; **sm** - submétacentrique; **cs** - constriction secondaire; **SD** - Déviation Standard. Toutes les mesures sont effectuées en µm.

Tableau 7. Données numériques de la garniture chromosomique d'*A. armatus* subsp. *numidicus*.

CHP	BL	BC	TL	R	IC%	TC	ΣTL	I%	SC
1	3.43 (0.30) ^{SD}	2.49 (0.20)	5.92 (0.25)	1.37	42.06	m-sc			
2	3.09 (0.20)	1.64 (0.10)	4.73 (0.35)	1.88	34.67	sm			
3	2.62 (0.30)	1.96 (0.30)	4.58 (0.30)	1.33	42.79	m			
4	2.76 (0.20)	1.73 (0.20)	4.49 (0.29)	1.59	38.53	m	72.44		
5	2.50 (0.20)	1.91 (0.20)	4.41 (0.20)	1.31	43.31	m	(2.80)	9.05	A
6	2.49 (0.20)	1.80 (0.10)	4.29 (0.21)	1.38	41.95	m			
7	2.43 (0.30)	1.50 (0.20)	3.93 (0.15)	1.62	38.16	m			
8	2.07 (0.10)	1.80 (0.00)	3.87 (0.10)	1.15	46.51	m			

- *A. cruciatus*

Ce taxon présente un caryotype constitué de deux paires chromosomiques métacentriques (4 et 7), quatre paires submétacentriques (1, 2, 3 et 6) et deux paires subtélocentriques (5 et 8). Une constriction secondaire est présente sur le bras long de la 4^{ème} paire chromosomique (Fig.7 a, b, c). La formule chromosomique est la suivante : $2n = 16 = 02 m + 02 m\text{-cs} + 08 sm + 04 st$. La longueur totale moyenne des chromosomes est comprise entre $3.45 \pm 0.95 \mu\text{m}$ et $5.51 \pm 0.55 \mu\text{m}$. La valeur d'indice d'asymétrie (AI % = 67.54) et la classification de Stebbins (1971) indiquent que le caryotype de cette espèce est asymétrique (Tab. 8).

- *A. pseudotrigonus*

Le caryotype est composé d' une paire métacentrique (8) portant des satellites, trois paires chromosomiques submétacentriques (3, 5 et 7) et quatre paires chromosomiques subtélocentriques (Fig.8 a, b, c). La formule chromosomique est : $2n = 16 = 02 m\text{-sat} + 06 sm + 08 st$. La longueur totale moyenne des chromosomes est comprise entre $2.30 \pm 0.04 \mu\text{m}$ et $6.98 \pm 0.11 \mu\text{m}$. La valeur d'indice d'asymétrie (AI % = 76.86) et la classification de Stebbins (1971) indiquent que le caryotype de cette espèce est asymétrique (Tab. 9).

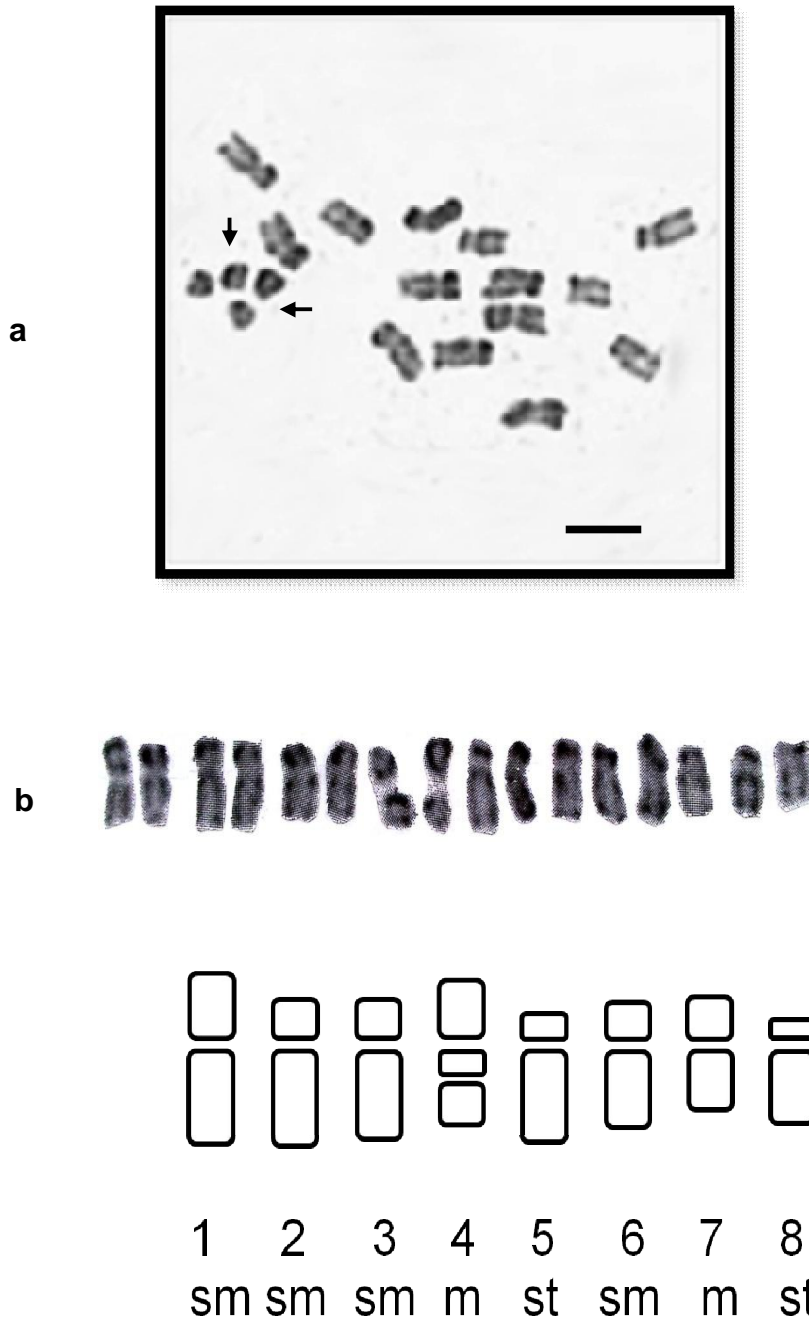


Figure 7. Caryotype d'*A. cruciatus* (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme. Echelle= 4 μ m. Les flèches indiquent la constriction secondaire.

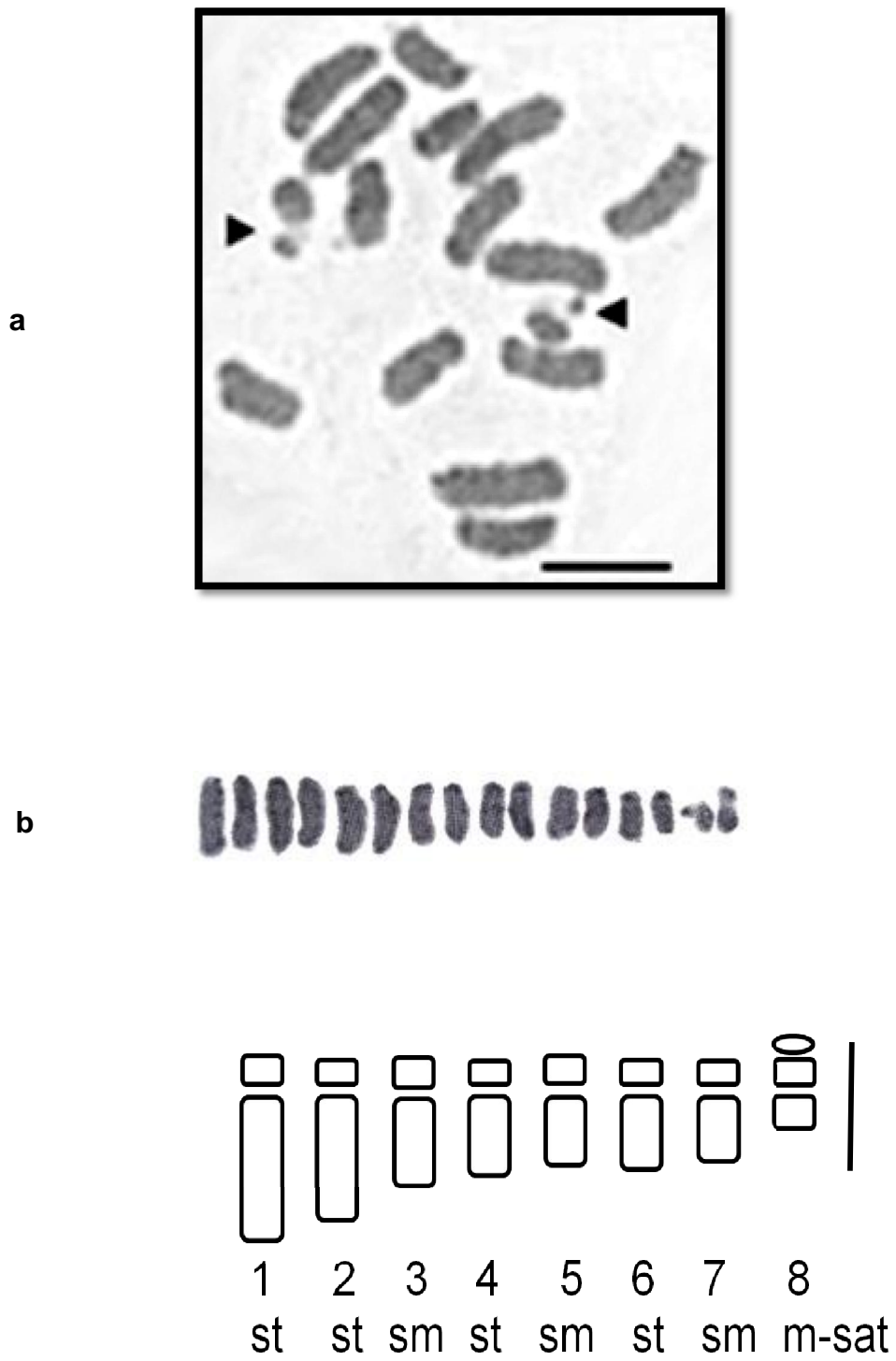


Figure 8. Caryotype d'*A. pseudotrigenus* (a) plaque métaphasique ; (b) caryogramme; (c) idiogramme. Echelle= 4 μ m. Les flèches indiquent le satellite.

Tableau 8. Données numériques de la garniture chromosomique d'*A. cruciatus*.

CHP	BL	BC	TL	R	IC%	TC	ΣTL	I%	SC
1	3.60 (0.30) ^{SD}	1.91 (0.10)	5.51 (0.55)	1.88	34.66	sm			
2	3.65 (0.60)	1.46 (0.30)	5.11 (0.10)	2.50	28.57	sm			
3	3.40 (0.40)	1.46 (0.20)	4.86 (0.70)	2.32	30.04	sm			
4	2.45 (0.30)	2.18 (0.40)	4.63 (0.15)	1.12	47.08	m-cs	72.64		
5	3.52 (0.20)	0.98 (0.30)	4.50 (0.10)	3.59	21.77	st	(2.09)	7.54	A
6	2.90 (0.30)	1.43 (0.40)	4.33 (0.10)	2.02	33.02	sm			
7	2.29 (0.40)	1.64 (0.30)	3.93 (0.61)	1.39	41.73	m			
8	2.72 (0.30)	0.73 (0.10)	3.45 (0.95)	3.72	21.15	st			

CHP - Paire chromosomique; **BL** – bras long; **BC** – bras court; **LT** – longueur totale du chromosome; **R**– ratio bras long/court; **IC** - Index centromérique = 100 x S/(L+S); **Tc** - Type chromosomique; **m** - métacentrique; **sm** - submétacentrique; **cs** - constriction secondaire; **sat** – satellite ; **SD** - Déviation Standard. Toutes les mesures sont effectuées en µm.

Tableau 9. Données numériques de la garniture chromosomique d'*A. pseudotriginus*.

CHP	BL	BC	TL	R	IC%	TC	ΣTL	I%	C
1	5.81 (0.05) ^{SD}	1.17 (0.02)	6.98 (0.11)	4.96	16.76	st			
2	5.00 (0.03)	0.99 (0.04)	5.99 (0.06)	5.05	16.53	st			
3	3.51 (0.04)	1.23 (0.03)	4.74 (0.10)	2.85	25.95	sm			
4	3.19 (0.04)	0.94 (0.02)	4.13 (0.02)	3.39	22.76	st	70.86		
5	2.76 (0.10)	1.12 (0.04)	3.88 (0.12)	2.46	28.86	m	(3.60)	6.43	B
6	2.90 (0.06)	0.95 (0.03)	3.85 (0.07)	3.05	24.67	st			
7	2.61 (0.05)	0.95 (0.03)	3.56 (0.07)	2.75	26.68	sm			
8	1.30 (0.04)	1.00 (0.02)	2.30 (0.07)	1.30	43.48	m-sat			

Sat : Satellite

3. Fluorochrome banding

La coloration à la chromomycine (CMA₃) a permis la révélation de deux types d'organisation de l'hétérochromatine riche en bande GC (Tab. 10) :

- Hétérochromatine GC riche associée aux organisateurs nucléolaires (NORs). Ce type d'hétérochromatine est présent chez tous les taxons étudiés. Ces marquages sont localisés sur les télomères des bras longs de la 1^{ère} paire chromosomique correspondant aux constrictions secondaires chez *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*, *A. armatus* subsp. *numidicus*. Chez *A. cruciatus*, elle est également localisée en position télomérique sur le bras long de la 4^{ème} paire chromosomique et correspond aux constrictions secondaires. Chez *A. pseudotrigonus*, ce marquage se retrouve sur les télomères des bras courts de la 8^{ème} paire de chromosomes qui correspond au satellite. Toutes ces bandes sont de forte intensité à l'exception de celle localisée chez *A. cruciatus* ;

- Hétérochromatine GC riche non associée aux organisateurs nucléolaires (NORs). Ce type d'hétérochromatine est présent chez tous les taxons étudiés à l'exception d'*A. cruciatus*. Chez *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*, il est positionné en région paracentrique sur la dernière paire chromosomique et semble de faible intensité. Il est également faiblement intense chez *A. armatus* subsp. *numidicus* et se positionne en région paracentrique associé au site de gènes ribosomiques 5S sur la 4^{ème} paire de chromosomes. Chez *A. pseudotrigonus*, tous les chromosomes sont marqués et on relève 40 marquages d'intensité variable dans les régions paracentrique, péri-centrique, intercalaire et télomérique.

Tableau 10. Nombre et types d'hétérochromatine observés chez les taxons étudiés

Taxon	GC riche associée au (NORs)	GC riche non associée au (NORs)
<i>A. armatus</i> subsp. <i>tragacanthoïdes</i>	2 cs+t	2 p
<i>A. armatus</i> subsp. <i>numidicus</i>	2 cs +t	2 p
<i>A. cruciatus</i>	2 cs +t	-
<i>A. pseudotrigonus</i>	2 Sat	16 p, 20 i, 4 t

Sat: satellite, **cs** : constriction secondaire, **t**: telomérique, **i**: interstitielle, **p**: para/péri-centrique.

4. Nombre et distribution des ADNr (5S et 35S)

La double Hybridation *in situ* avec les deux sondes des gènes d'ARN 5S et 35S nous ont permis d'observer, chez tous les taxons étudiés, une paire de signaux 5S et une paire de signaux 35S, à intensité variable et à différentes positions (Tab.11 et Fig. 9, 10, 11 et 12).

Chez *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*, *A. armatus* subsp. *numidicus* et *A. cruciatus*, le loci ADNr 35S se situe sur le bras long de la 1^{ère} paire chromosomique au niveau des télomères et correspond aux constriction secondaires. Chez *A. cruciatus*, le signal est situé sur le bras long de la 4^{ème} paire chromosomique au niveau télomérique et correspond également à la constriction secondaire. Il est à noter que l'intensité du signal 35S chez ce taxon est le plus faible de tous les taxons étudiés. Chez *A. pseudotrigonus*, ce signal se situe sur le bras court de la dernière paire de chromosome en région télomérique et correspond au satellite.

Chez *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* et *A. armatus* subsp. *numidicus*, un signal 5S faiblement intense, est situé sur le bras court de la 6^{ème} paire chromosomique en position paracentrique, à la différence que le loci présent chez *A. armatus* subsp. *numidicus* est colocalisé avec une bande riche en GC. Chez *A. cruciatus*, un signal 5S, de faible intensité est localisé en position télomérique sur le bras court de la 4^{ème} paire chromosomique. Chez *A. pseudotrigonus*, le loci 5S est localisé en position subtélocentrique sur le bras long de la dernière paire chromosomique.

Tableau 11. Nombre et position des loci 35S et 5S observés chez les taxons étudiés

Taxon	35S	5S
<i>A. armatus</i> subsp. <i>tragacanthoïdes</i>	2 cs+t	2 p
<i>A. armatus</i> subsp. <i>numidicus</i>	2 cs+t	2 p
<i>A. cruciatus</i>	2 cs+t	2 t
<i>A. pseudotrigonus</i>	2 Sat+t	2 st

Sat: satellite, **cs** : constriction secondaire, **t**: télomérique, **st**: subtélomérique; **i**: interstitielle, **p**: para/péricentrique.

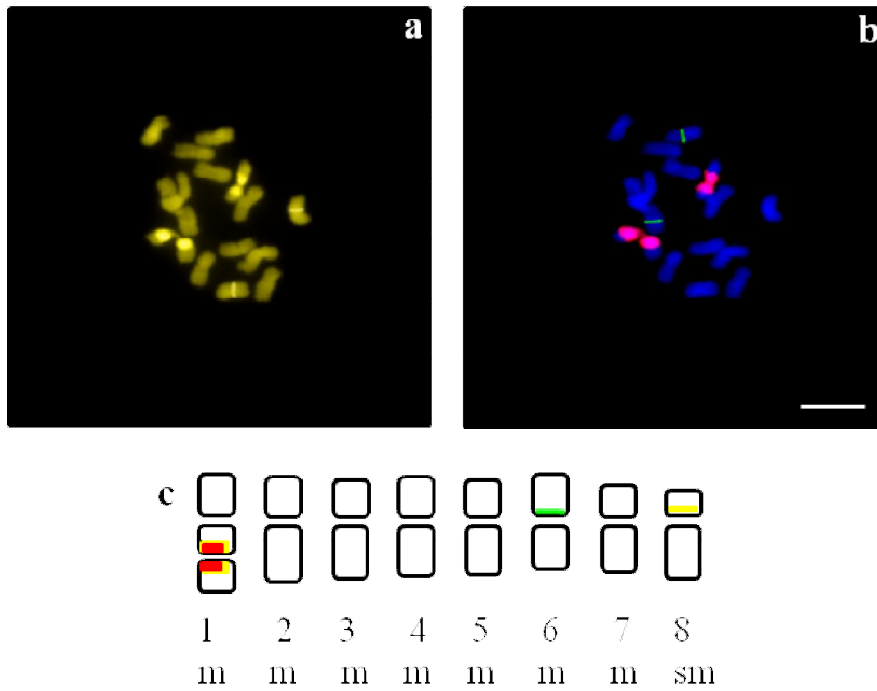


Figure 9. Coloration à la : a- chromomycine ; b- hybridation *in situ* avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaque métaphasique et idiogramme d'*A. armatus* subsp. *tragacanthoides*. Echelle = 10 μ m. CMA⁺ ■ 5S ■ 35S ■

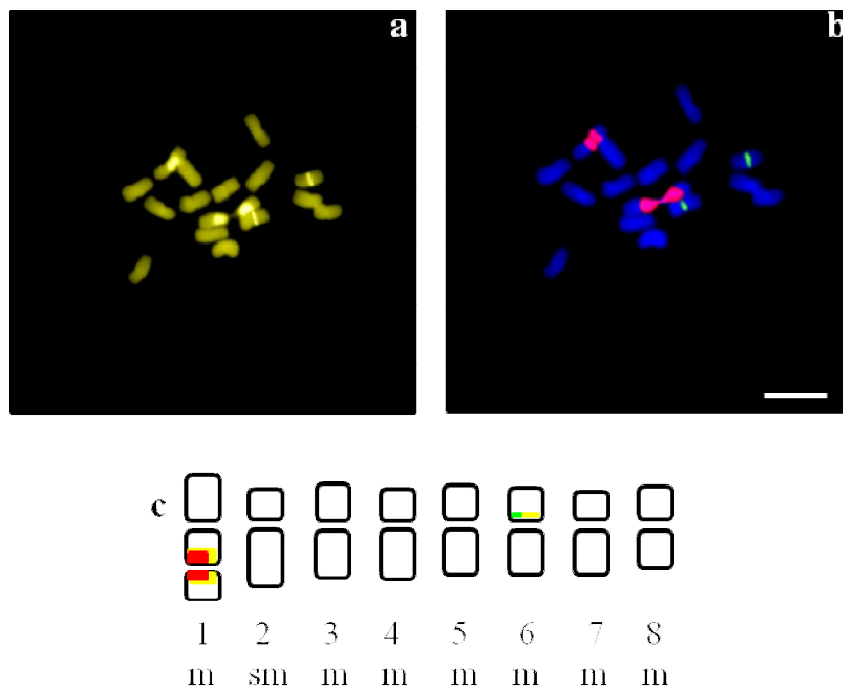


Figure 10. Coloration à la : a- chromomycine ; b- hybridation *in situ* avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaque métaphasique et idiogramme d'*A. armatus* subsp. *numidicus*. Echelle = 10 μ m. . CMA⁺ ■ 5S ■ 35S ■

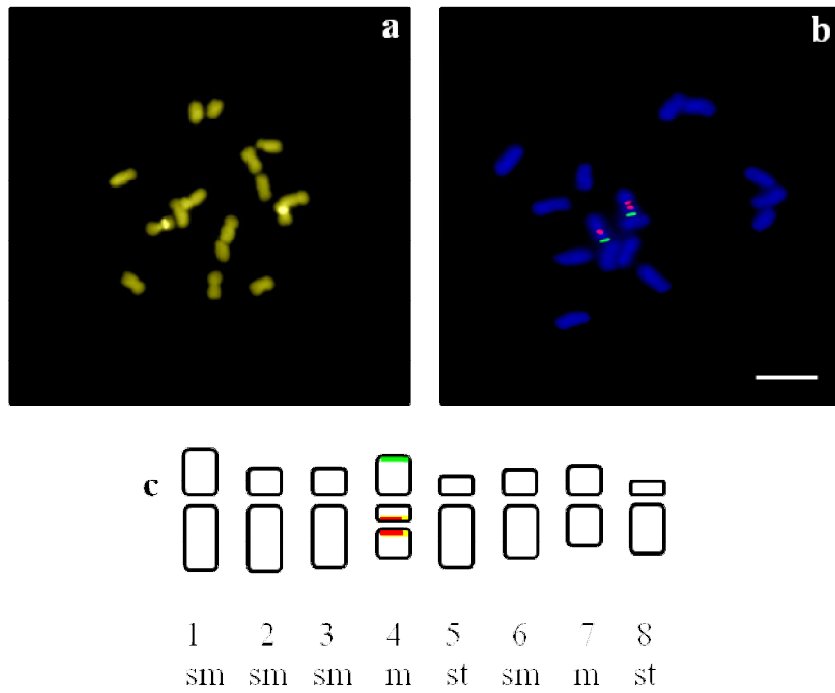


Figure 11. Coloration à la : a- chromomycine ; b- hybridation *in situ* avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaque métaphasique et idiogramme d'*A. cruciatus*. Echelle = 10 μ m. CMA⁺ ■ 5S ■ 35S ■

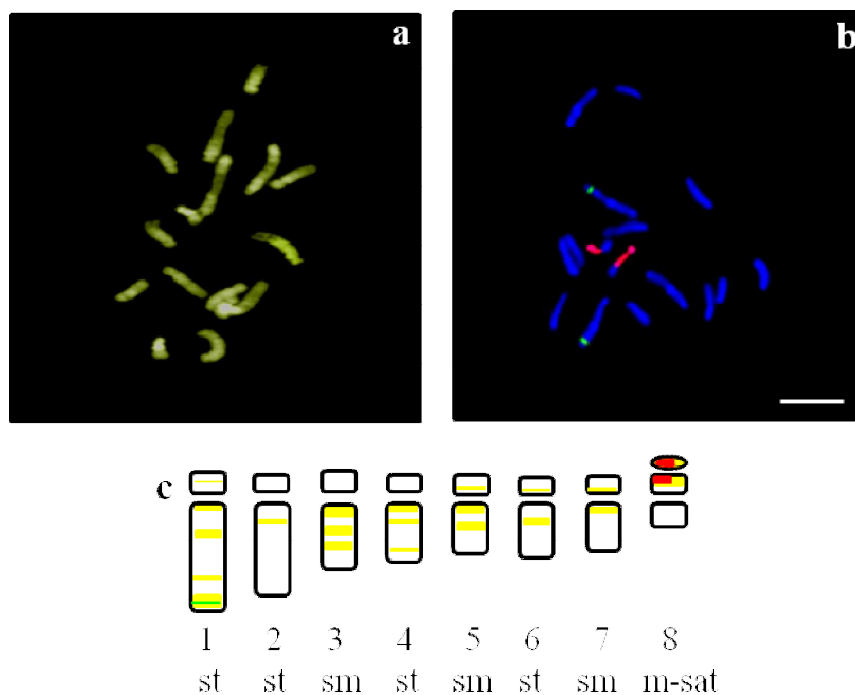


Figure 12. Coloration à la : a- chromomycine ; b- hybridation *in situ* avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaque métaphasique et idiogramme d'*A. pseudotriginus*. Echelle = 10 μ m. CMA⁺ ■ 5S ■ 35S ■

5. Activité transcriptionnelle de l'ADNr 35S

Les loci des gènes ribosomiaux actifs ont été détectés indirectement par le nombre maximal de nucléoles révélés par la coloration au nitrate d'argent. Les résultats de l'analyse sont reportés dans les figures 13 et 14. Ils montrent que le nombre de nucléoles par cellule varie de 1 à 3, 1 étant le nombre le plus observé avec une fréquence de 96 % chez *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*. La taille des nucléoles diffère d'une cellule à une autre.

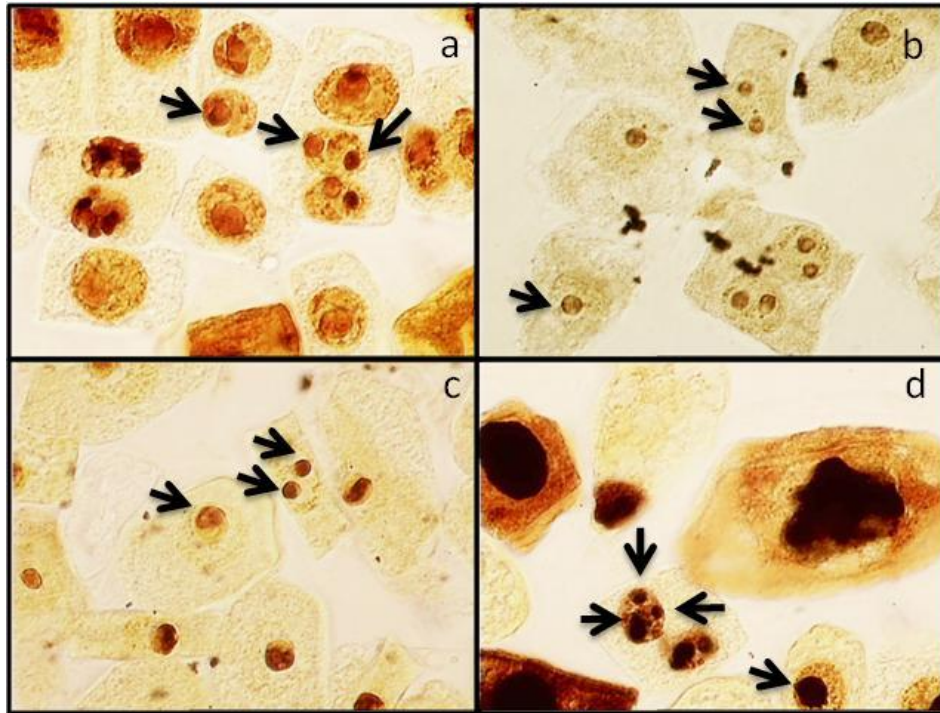


Figure 13. Coloration des nucléoles au nitrate d'argent : (a) *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes*; (b) *A. armatus* subsp. *numidicus*; (c) *A. cruciatus*; (d) *A. pseudotriginus*. Echelle 4 μ m. Les flèches indiquent les nucléoles.

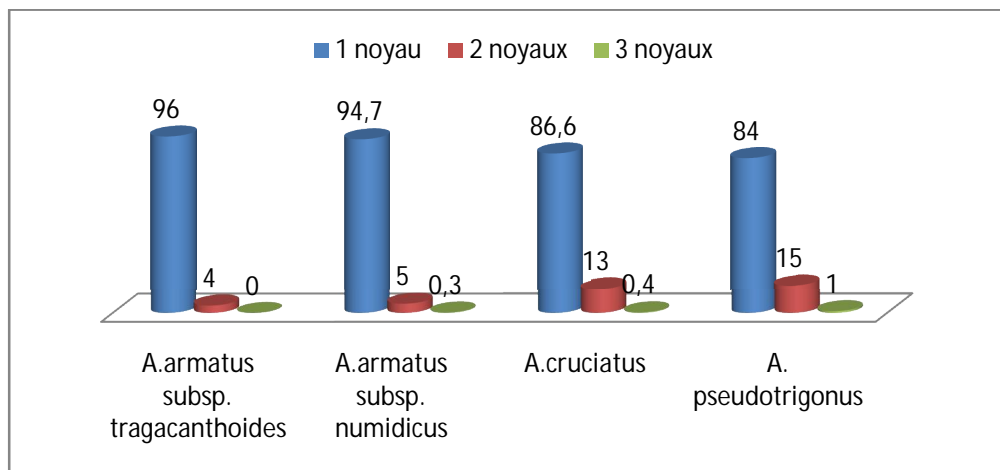


Figure 14. Fréquence des nucléoles dans les noyaux interphasiques.

6. Taille du génome

La taille des génomes est par convention, estimée grâce à la " valeur C " d'un organisme qui représente la quantité d'ADN nucléaire présente dans le noyau des gamètes à l'état non répliqué (Greilhuber et *al.*, 2005). Cette valeur, exprimée en picogrammes est généralement convertible en nombre de paires de bases puisque 1 pg = 978 Mb Doležel et *al.*, (2003).

La quantité d'ADN nucléaire 2C (diploïde) a été obtenue pour les 4 taxons étudiés avec 5 répétitions pour chacun des taxons (Tab. 12). Ces quantités d'ADN nucléaire 2C sont comprises entre 2.71 (\pm 0.06) pg et 1.39 (\pm 0.01) pg/ 2C. Les coefficients de variation intra-spécifique n'excèdent pas 3%. Les deux sous espèces d'*Astragalus armatus* présentent des tailles de génome très similaires.

Tableau 12. Estimation de la taille du génome par cytométrie en flux des taxons étudiés.

Taxon	2n	Niveau de ploïdie	2C ADN \pm SD (pg)	CV%	2C ADN Min-Max (pg)	1 C ADN (mbp)	1 CX (pg)
<i>A. armatus</i> subsp. <i>tragacanthoides</i>	16	2x	2.71 \pm 0.06	2.13	2.61-2.77	1311	1.34
<i>A. armatus</i> subsp. <i>numidicus</i>	16	2x	2.68 \pm 0.06	2.07	2.59-2.74	1325	1.36
<i>A. cruciatus</i>	16	2x	1.39 \pm 0.01	0.01	1.37-1.42	680	0.7
<i>A. pseudotrigonus</i>	16	2x	1.55 \pm 0.01	0.69	1.54 -1.57	758	0.78

pg = picogramme; SD= écart type ; CV% = coefficient de variation; Min = minimum; Max =maximum; N = nombre des échantillons ; 1CX = valeur monoploïde du génome selon Greilhuber et *al.* (2005) ; 1pg = 978 Mbp selon Doležel et *al.*, (2003).

7. Viabilité des grains de pollen

La viabilité du pollen estimée par le carmin acétique est très importante chez les taxons étudiés. Les résultats donnés dans le tableau 13, indiquent une viabilité pollinique supérieure à 97%. Les grains de pollen colorés en rose, sont considérés comme viables (Fig. 15). L'étude palynologique d'*Astragalus pseudotrigonus* n'a pas été réalisée par manque de matériel (fleurs).

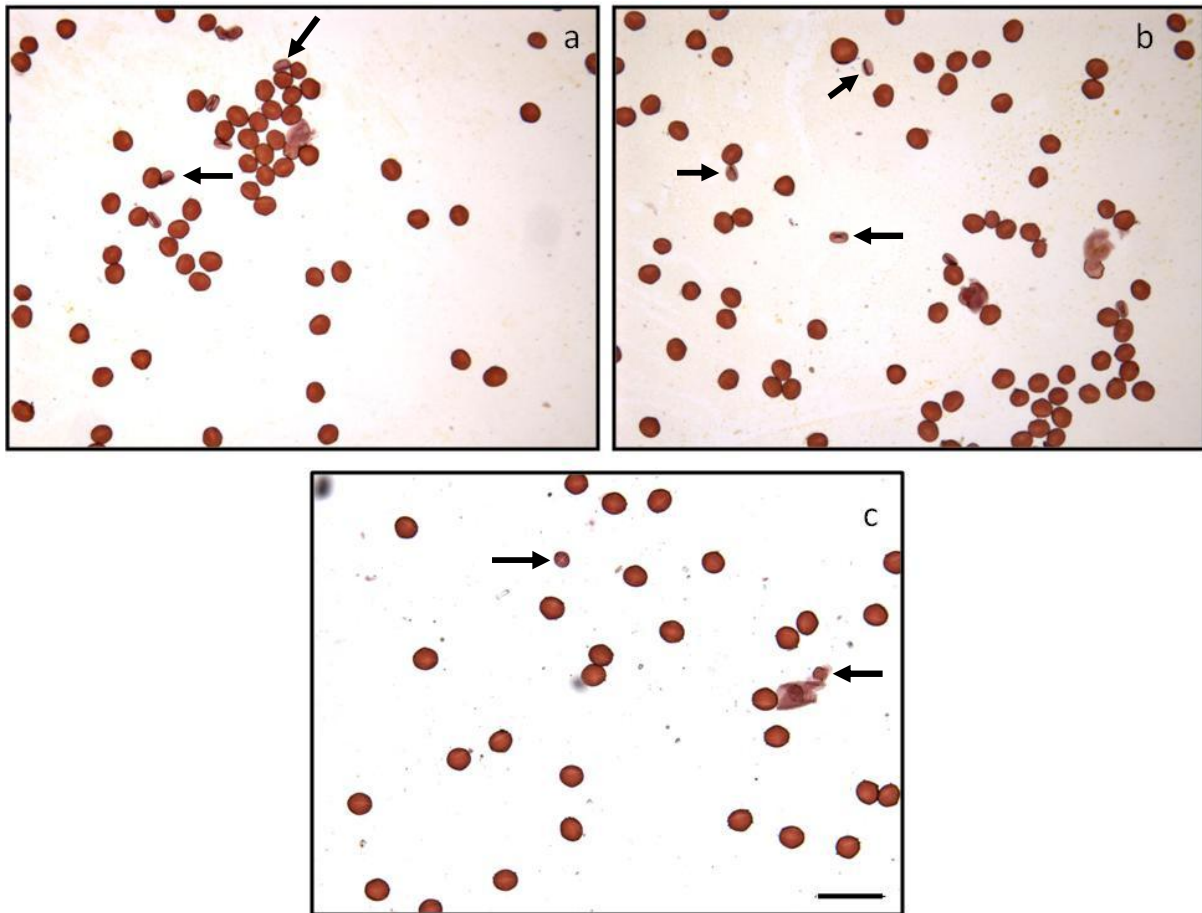


Figure 15. Pollen observé au microscope photonique chez a) *A. armatus* subsp. *tragacanthoides*, b) *A. armatus* subsp. *numidicus* et c) *A. cruciatus*. Les flèches indiquent le pollen non viable. Echelle 100 μ m

7.1. Description des grains de pollen

Un examen au microscope photonique et un autre au microscope à balayage électronique ont été effectués pour déterminer l'aspect morphologique des grains de pollen et identifier l'ornementation de l'exine des différents taxons.

A. armatus subsp. *tragacanthoïdes* et *A. armatus* subsp. *numidicus* présentent des eumonades (grains de pollen libres) à 3 ouvertures complexes (3 sillons méridiens associés à 3 pores équatoriaux) : ils sont de type trizonocolporé. En vue équatoriale, le grain est longi-axe ($P > E$) à symétrie radiale, isopolaire et de forme prolé sphéroïdale. En vue polaire, le grain de pollen est circulaire pour *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* et circulaire à lobé pour *A. armatus* subsp. *numidicus* (Tab. 13 et Fig. 16 a-d). L'exine apparaît sous forme d'un réseau de maille plus ou moins uniforme, que ce soit dans les pôles ou dans les régions équatoriales. Le diamètre des mailles de ces 2 taxons est toujours inférieur à 1 μm . Il s'agit d'un micro réticulum ou d'un réseau à mailles très fines et serrées (Fig. 17 a-f).

Les grains de pollen d'*A. cruciatus* sont libres et de type trizonocolporé. En vue équatoriale, ils sont longi-axes à symétrie radiale, isopolaires et de forme subprolée. En vue polaire, ils sont de forme circulaire (Tab. 13 et Fig. 16 e-f). La structure de l'exine est de type réticulé au niveau de l'équateur et psilé au niveau des pôles où on note la disparition progressive du réticulum (Fig. 19 g-i).

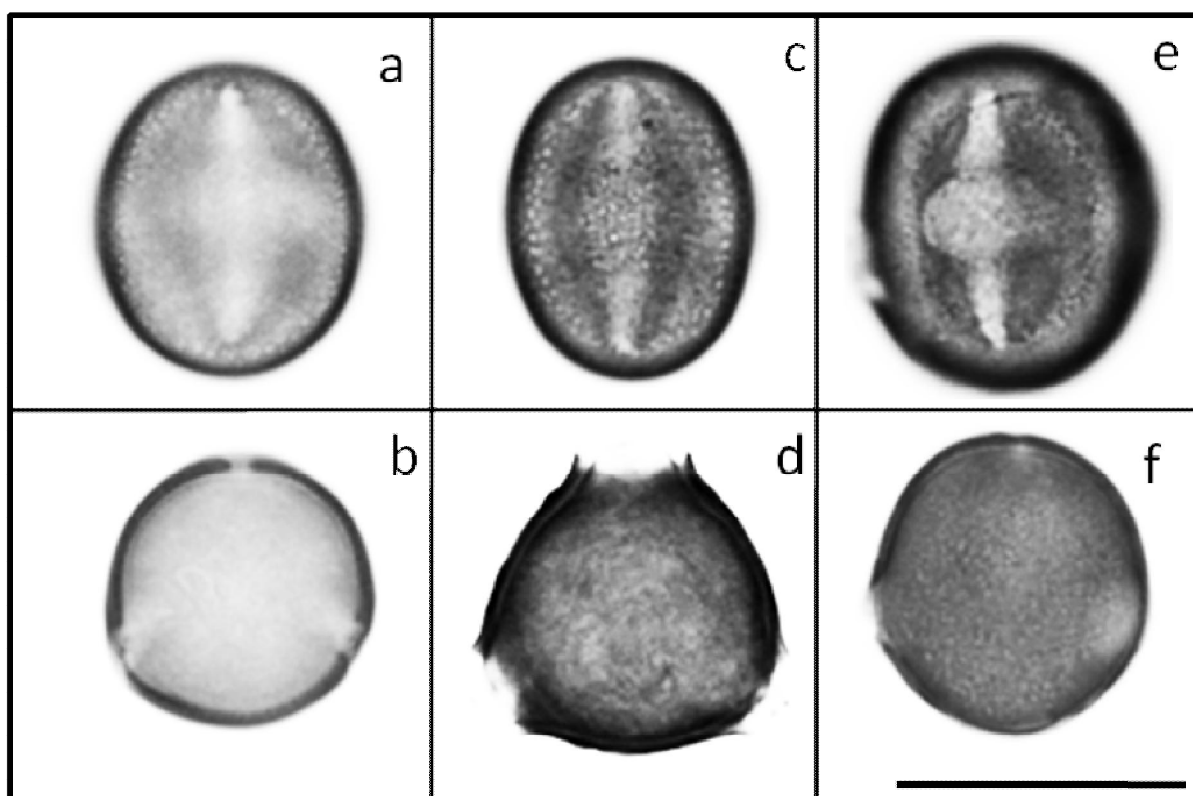


Figure 16. Pollen observé au microscope photonique (a, c, e) vue équatoriale ; (b, d, f) vue polaire. *A. armatus* subsp. *tragacanthoides*; (a, b) *A. armatus* subsp. *numidicus*; (c, d) *A. cruciatus* (e, f). Echelle 30 μm .

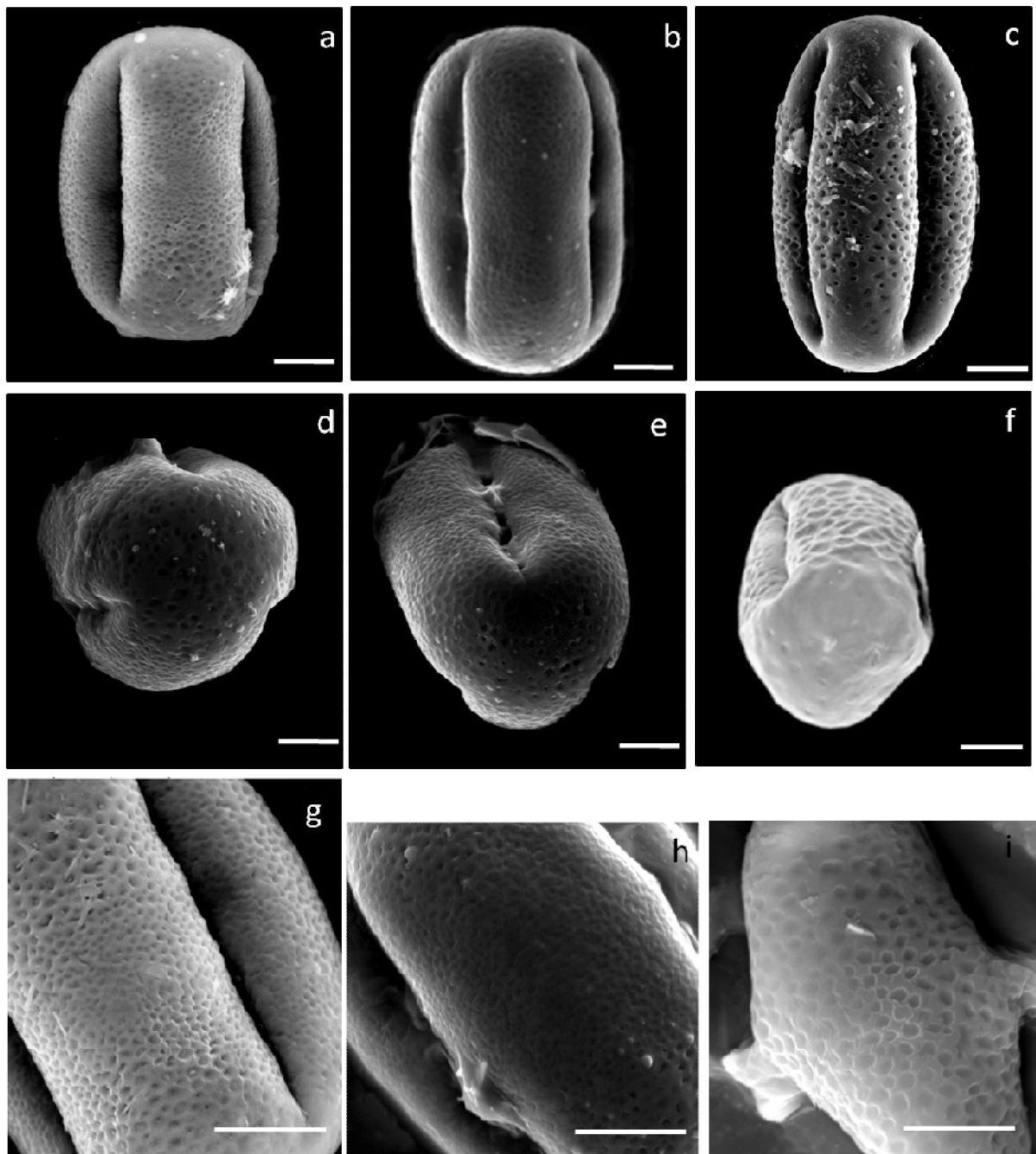


Figure 17. Pollen observé au microscope électronique (a, b, c) vue équatoriale; (d, e, f) ; structure de l'exine. (a, d, g) *A. armatus* subsp. *tragacanthoides*; (b, e, h) *A. armatus* subsp. *numidicus*; (c, f, i) *A. cruciatus*. Echelle 5 μ m.

Tableau. 13 Viabilité et morphométrie des grains de pollen

Taxon	V	P	E	P/E	Slg	Sla	Eda	Eca	Ex	Me	Ap	Forme	Aperture
<i>A. armatus</i> subsp. <i>tragacanthoïdes</i>	98.89	32.43 (1.63) ^{sd}	29.28 (1.12)	1.11	24.60 (2.07)	3.75 (0.81)	7.72 (1.24)	7.27 (1.24)	1.80 (0.48)	17.64 (1.32)	11.00 (1.27)	Prolé sphéroïdale	Trizono Colporé
<i>A. armatus</i> subsp. <i>numidicus</i>	98.56	29.81 (1.89)	26.87 (1.42)	1.11	21.21 (2.85)	4.01 (0.91)	6.68 (1.23)	5.55 (1.61)	2.08 (0.72)	14.31 (1.33)	11.02 (0.75)	Prolé sphéroïdale	Trizono Colporé
<i>A. cruciatus</i>	97.52	29.73 (1.98)	24.31 (1.44)	1.23	24.98 (1.08)	3.46 (0.62)	8.13 (1.55)	7.95 (1.46)	2.60 (0.50)	13.18 (1.51)	09.71 (1.36)	Subprolé	Trizono Colporé

V : viabilité (%) ; **P** : diamètre polaire; **E** : diamètre équatorial; **Slg** : longueur du sillon ; **Sla** : largeur du sillon ; **Eda** : endoaperture ;

Eca : ectoaperture; **Ex** : largeur de l'exine ; **Me** : mésocolpe ; **Ap** : apocolpe. **SD** : déviation standard. Toutes les mesures sont en µm.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

DISCUSSION

1. Dénombrement chromosomique et morphologie des caryotypes

À l'issue des comptages chromosomiques, nous avons montré que les nombres de base et de chromosomes sont identiques pour l'ensemble des taxons étudiés et correspondent à une forme diploïde ($2n = 2x = 16$). Ceci est en conformité avec les travaux de Ledingham (1960) et Ledingham et Fahselt (1964) qui notent que ce nombre de base est très fréquent chez les espèces eurasiennes, qui sont dans une large proportion, des diploïdes.

Ces résultats confirment le nombre chromosomique signalé par Amin (1972), Zhakaryeva (1985) et Badr et al. (1996) pour *Astragalus pseudotrigonus*, et Goldblatt et Johnson (1991) pour *A. armatus* subsp. *numidicus*. Pour *A. cruciatus*, Malallah et al. (2001) signalent un nombre de chromosomes $2n = 32$ sous le nom synonymique d'*A. corrugatus* Bertol. Signalons enfin que pour *A. armatus* subsp. *tragacanthoides*, notre étude est la première à mettre en évidence le nombre de chromosomes de ce taxon.

Nous avons pu observer qu'aucune variabilité tant au niveau intra-individu, intra-population que inter-population n'a été décelée. Nous avons également remarqué que ni le type de substrat édaphique ni le type de bioclimat n'a d'incidence sur le nombre de chromosomes. Ceci confirme la forte stabilité du nombre chromosomique au sein des 4 taxons étudiés.

L'étude de la morphologie et de l'organisation des chromosomes montre des caryotypes très similaires entre *A. armatus* subsp. *tragacanthoides* et *A. armatus* subsp. *numidicus*, un caractère en commun entre les deux sous espèces d'*A. armatus* et *A. cruciatus* alors que le caryotype d'*A. pseudotrigonus* est complètement différent. Ainsi, nous avons noté la présence d'une constriction secondaire (SC) chez *A. armatus* subsp. *tragacanthoides*, *A. armatus* subsp. *numidicus* et *A. cruciatus* tandis que chez *A. pseudotrigonus* nous notons la présence d'un satellite (SAT). Si plusieurs auteurs ont révélé la présence d'un satellite (Liu 1984 ; Badr et Sharawy

2007 ; Kazem et *al.* 2010) ou de deux satellites (Martin et *al.* 2008) chez ce genre, aucun auteur n'indique la présence de constriction secondaire.

Nous avons également pu révéler que la longueur totale du caryotype est pratiquement identique chez les deux sous espèces d'*A. armatus* et *A. cruciatus* et légèrement supérieur à celle d'*A. pseudotrigonus*. Il est important de noter que ces longueurs sont assez grandes comparativement à celles déjà publiées (Dvořák et *al.*, 1977 ; Badr et Sharawy, 2007 ; Sheidai et *al.*, 2009 ; Çetin et *al.*, 2010 ; Kazem et *al.* 2010). Ces auteurs notent une longueur totale du caryotype oscillant entre 10.44 µm et 61.22 µm mais qui demeure cependant inférieure à ce qui a été rapporté pour une espèce diploïde *A. cornu-caprae* Širj. & Rech.f. (83.22 µm) (Sheidai et Gharemani-nejad, 2008). Les valeurs de la taille des chromosomes sont également grandes comparativement à celles d'autres travaux. En effet, nos valeurs varient entre 3.45 µm et 6.98 µm alors qu'elles oscillent entre 0.75 µm chez *A. talimansurensis* Serj et Rech. F (Sheidai et Gharemani-nejad, 2008) et 5.73 µm chez *A. mongholicus* Bunge (Kim, 2006).

Les caryotypes d'*Astragalus armatus* subsp. *tragacanthoides* et *A. armatus* subsp. *numidicus*, endémiques de l'Afrique du Nord sont symétriques et homogènes ce qui concorde avec la majorité des travaux antérieurs (Liu, 1984 ; Kim et *al.* 2006 ; Badr et Sharawy, 2007 ; Sheidai et Gharemani-nejad, 2008 ; Sheidai et *al.* 2009 ; Çetin, 2010 ; Kazem et *al.* 2010). A l'inverse, les caryotypes d'*A. cruciatus* et *A. pseudotrigonus* sont asymétriques, ce qui semble assez rare pour être signalé (Dvořák et *al.* 1977 ; Manandhar et Sakya, 2004 ; Martin et *al.* 2008). Lewitzky et Araratian(1931), Stebbins (1950, 1971) et Siljak-Yakovlev (1986) estiment que l'évolution s'est faite à partir des caryotypes symétriques vers les caryotypes asymétriques. Dans ce sens, nous pouvons affirmer que les caryotypes d'*Astragalus armatus* subsp. *tragacanthoides* et *A. armatus* subsp. *numidicus* sont primitifs et moins évolués que ceux d'*A. cruciatus* et *A. pseudotrigonus*. Nous pouvons également affirmer qu'*A. armatus* subsp. *tragacanthoides* et *A. armatus* subsp. *numidicus* sont des paléoendémiques, selon la classification des espèces endémiques établis par Favarger et Siljak-Yakovlev (1986) et Siljak-Yakovlev et Peruzzi (2012).

2. L' hétérochromatine GC

Au cours de cette étude, la coloration à la Chromomycine A₃ a été utilisée pour la 1^{ère} fois sur le genre. Cette coloration a permis de mettre en évidence des différences importantes concernant le nombre, la taille et la position des bandes hétérochromatiques riches en bases GC entre les 4 taxons. Ainsi, nous avons pu identifier des bandes de Chromomycine positives (CMA+) situées au niveau de la constriction secondaire associée au locus d'ADNr 35S chez tous les taxons, des bandes libres ou associées au locus 5S chez *A. armatus* subsp. *numidicus* et *A. pseudotriginus*. Chez ce dernier taxon, le nombre de bandes riches en bases GC est beaucoup plus élevé et peut constituer un caractère distinctif par rapport aux autres taxons.

Des conditions environnementales comme l'habitat, l'altitude et la longitude peuvent induire une hausse du nombre de bandes GC (Vosa et Stergianou, 1990 ; Vosa, 1996 ; Bogunic et al., 2007). Par contre, d'autres auteurs imputent cette variation à des facteurs « endogènes » tel que la duplication en tandem (Greilhuber et Speta 1976) ou les phénomènes de transposition (Schubert et Wobus, 1985). Dans le cas d'*A. pseudotriginus*, la hausse du nombre de bandes hétérochromatiques pourrait refléter une adaptation à l'environnement sec de haute montagne régnant dans le site de récolte de ce taxon et une réponse aux pressions de sélection.

De notre étude, il est intéressant de noter la forte corrélation entre les régions d'ADN riches en bases GC et le locus 35S. Plusieurs travaux ont signalé cette colocalisation chez de nombreuses espèces comme *Brassica* L., *Cedrus* Mill., *Picea* Mill., *Solanum* L., *Hydrangea* L. et *Cenchrus* L. (Hasterok et Maluszynska 2000; Bou Dagher-Kharrat et al. 2001; Siljak-Yakovlev et al. 2002; Srebniak et al. 2002; Mortreau et al., 2010; Kharrat-Souissi et al., 2012). A l'inverse, la colocalisation avec des sites 5S est assez rare chez les végétaux supérieurs pour être signalée (Fuchs et al., 1998; Martins et Wasko, 2004) ; mais elle a été rapportée chez quelques espèces comme *Artemisia* L., *Coffea* L., *Ricinus* L et *Amarantha* L. (Hamon et al., 2009 ; Péllicier et al., 2008 ; Vasconcelos et al., 2010 ; Kolano et al., 2013). Cela est sans doute dû à la rareté des travaux associant techniques de banding et hybridation *in situ* avec une sonde 5S (Benmiloud-Mahieddine, 2011).

3. Cartographie de l'ADNr

La double hybridation *in situ* a mis en évidence la présence d'une seule paire de signaux 35S et 5S pour les 04 taxons. Cette stabilité du nombre de signaux est décrite par Seijo et al (2004) comme étant une constante chez la famille des Fabacées.

Nos résultats indiquent une distribution préférentielle des sites ADNr 35S de forte intensité sur les constriction secondaires associés à des bandes d'hétérochromatine GC, avec toutefois une taille beaucoup plus petite et de moindre intensité chez *A. cruciatus*. Ces sites représentent également le site des organisateurs nucléolaires.

Le locus ADNr 5S se caractérise par un signal de la même taille, de moindre intensité et par une localisation plus variée. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les sites des signaux 5S et 35S se trouvent sur les mêmes chromosomes chez les deux sous espèces d'*A. armatus* avec cependant une colocalisation entre ADNr 5S et bande GC chez *A. armatus* subsp. *numidicus* (voir plus haut).

La variation de l'intensité et de la taille des signaux des gènes d'ADNr s'expliquent par l'activité de transcription de ces gènes et par la différence du nombre de copies de ces gènes (Maluszynska et Heslop-Harrison, 1991).

A ce jour, on ne comptabilise que deux travaux analysant la cartographie des ADNr chez *Astragalus* dans lesquels, Kim (2006) mentionne un locus 45S et 5S pour *A. membranaceus* Bunge et *A. mongholicus* et deux loci 5S pour *A. mongholicus* var. *alpinus* Nakai alors que Sang et al. (2013) signalent un locus 45S et 2 loci 5S pour *A. koraiensis* Y. N. Lee. Nos résultats associés aux résultats de ces travaux nous permettent de dire que chez les astragales diploïdes, la position des sites d'ADNr 5S et 35S ainsi que leur intensité varie d'une espèce à l'autre. Cette variation, comme l'explique Heslop-Harrison (2000) peut avoir des implications phylogénétiques, vu que les espèces phylogénétiquement proches devraient présenter le même nombre et la même intensité de marquages ; elle pourrait également renseigner sur les tendances évolutives au sein d'un genre (Castilho et Heslop-Harrison, 1995; de Bustos et al., 1996; Ansari et al., 1999 ; Taketa et al., 1999).

Compte tenu de ces résultats, nous pouvons confirmer que les deux sous espèces d'*A. armatus* sont très proches l'une de l'autre du point de vue phylogénétique.

4. Activité transcriptionnelle de l'ADNr 35S

Les nucléoles se forment à partir de sites spécifiques (région organisatrice nucléolaire) où l'ADN ribosomal est transcriptionnel, actif et à forte expression génétique (Howell et Black, 1980 ; Leitch 2000 ; Hernandez-Verdun, 2006; Raska et *al.* 2006 a, b). Leur nombre par noyau est généralement équivalent au nombre de chromosomes nucléolaires et traduit une intense activité cellulaire (Golczyk et *al.* 2005). Il découle de nos observations l'existence de 1 à 3 nucléoles par noyau interphasique, 1 nucléole par noyau étant le nombre le plus fréquent. Par conséquent, le nombre de nucléoles correspondrait au nombre de constriction secondaires observées et au nombre de sites NORs actifs repérés chez nos taxons. L'existence d'un seul nucléole constituerait donc une caractéristique des diploïdes de ce genre comme cela a été démontré chez les genres *Brassica* L., *Jatropha* L. et *Heliconia* L. (Hasterok et Maluszynska, 2000 ; Mergonar et *al.*, 2010 ; Do Nascimento et *al.*, 2014).

5. Taille du génome

La taille d'un génome est constante pour une espèce déterminée. Cependant, des variations considérables sont observées d'une espèce à l'autre, que ce soit au sein d'une même division (Greilhuber *al.* 2004), d'une même famille (Young et *al.* 2003) ou d'un même genre taxonomique (Weiss-Schneeweiss et *al.* 2005). Ces variations dues essentiellement à l'adaptation, l'évolution et la spéciation par accumulation ou perte d'ADN répétitif (Petrov et Wendel 2006), font que l'estimation du contenu de l'ADN est utilisé comme un marqueur permettant de fournir des informations utiles à la définition et / ou la différenciation des espèces (Garnatje et *al.* 2004; Mahelka et *al.* 2005; Bogunić et *al.* 2007 ; Loureiro et *al.* 2007; Suda et *al.* 2007; Perný et *al.* 2008; Ekrt et *al.* 2010) et à la caractérisation de la variabilité intraspécifique (Leong-Škorničková et *al.* 2007; Siljak-Yakovlev et *al.* 2008 ; Slovák et *al.* 2009).

Les 4 taxons étudiés présentent différentes valeurs de la quantité d'ADN qui les placent parmi les très petits génomes selon la classification de Leitch et *al.* (1998), confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus indiquant que les espèces à petits génomes sont très répandues (Siljak-Yakovlev et *al.*, 2010 ; Bou Dagher-

Kharrat et *al.*, 2013 ; Vallès et *al.*, 2014). Cette variation ne semble être liée ni au nombre de chromosomes ni au niveau de ploïdie, ceux-ci étant les mêmes chez les 4 taxons.

À l'heure actuelle, le contenu en ADN nucléaire a été estimé pour 44 taxons (données englobant l'étude en cours) soit environ 2 % des 3 000 espèces connues d'*Astragalus*. Selon les données disponibles dans les travaux de Siljak-Yakovlev et *al.* (2010), Temsch et *al.* (2010), Bou Dagher-Kharrat et *al.* (2013), Pustahija et *al.* (2013) Abdel Samad et *al.* (2014) et Vallès et *al.* (2014), la taille du génome du genre varie de 0,92 à 10.46 pg pour les individus diploïdes. On observe également une variabilité au sein même des sections indépendamment de l'origine géographique des taxons. *A. pseudotrigonus*, possède pratiquement la même quantité d'ADN qu'*A. goembiformis* Pomel (1.56 pg) et un génome plus petit que celui d'*A. gombo* Coss. et Dur. (1.66 pg) et *A. macrocarpus* DC. (2.56pg) (voir Annexe 4). Ceci confirme la variation intra-générique observée chez différents genre comme par exemple chez *Hordeum* L. (Jakob et *al.* 2004), *Vicia* L. (Neumann et *al.* 2006), *Lupinus* L. (Mahé et *al.* 2011), *Retama* Raf. (Benmiloud-Mahieddine et *al.* 2011) ou bien *Hedysarum* L. (Benhizia et *al.* 2013).

De telles variations de la taille des génomes a soulevé plusieurs questions quant aux causes de son origine ainsi qu'aux conséquences sur l'évolution et l'adaptation des plantes. L'augmentation de la taille du génome est associée à plusieurs mécanismes dont le plus important est sans doute la dissémination des familles de transposons et les mutations qui s'ensuivent (Bohr et Wassermann, 1988 ; San Miguel et Bennetzen, 1998 ; Wendel, 2000), ainsi que celle des rétrotransposons et autres séquences répétées (Morgante et *al.*, 2002). Ces éléments sont capables d'augmenter considérablement la taille du génome en multipliant le nombre de copies de gènes (Bennetzen, 2000). D'autres mécanismes contribuent à la variation de la taille du génome comme les phénomènes de pertes, de délétions et de recombinaisons chromosomiques (Ma et *al.*, 2004; Vitte et Panaud, 2005; Piegu et *al.*, 2006), le transfert du matériel chromosomique des organites vers le noyau (Adams et Palmer, 2003; Shahmuradov et *al.*, 2003) et enfin la variation de taille et de nombre des introns (Deutsch et Long, 1999).

D'autres études ont essayé d'établir des corrélations entre la taille du génome et divers paramètres écologiques comme la latitude et l'altitude avec des résultats contradictoires. Levin et Funderburg (1979), Bennett et *al.* (1982), Bennett (1987) Rayburn (1990), Rayburn et Auger (1990), Knight et Ackerly (2002) et Knight et *al.* (2005) suggèrent que la véritable relation entre la taille du génome et l'altitude et/ ou la latitude est représentée par une distribution unimodale où les espèces à petite quantité d'ADN peuvent exister sous n'importe quelle altitude ou latitude et que les espèces à grande taille de génome peuvent être exclus des milieux à conditions climatiques extrêmes. Dans le cas de nos taxons, aucune corrélation n'a pu être établie entre la taille du génome, le lieu de récolte et les conditions bioclimatiques des sites de prélèvement. On notera cependant que les échantillons d'*A.armatus* subsp. *tragacanthoides*, *A.armatus* subsp. *numidicus* qui proviennent des régions des «Hauts Plateaux» du Nord-Est caractérisés par des précipitations moyennes ont montré de plus grandes quantités d'ADN par rapport aux autres taxons. Ceci pourrait nous amener à déduire que la quantité d'ADN de nos taxons est peut être corrélée avec leur distribution éco-géographique.

6. Viabilité du pollen et caractères palynologiques

Dans cette étude, nous avons utilisé la coloration au carmin acétique qui révèle la présence de matériel génétique dans le grain de pollen. Towill (1985) estime que ce test est amplement suffisant pour avoir une estimation approximative de la viabilité du pollen. L'évaluation de ce taux a révélé un très grand pourcentage de viabilité qui traduit un déroulement normal de la microsporogénèse. Stebbins (1971) indique que les espèces diploïdes produisent une méiose régulière. Celle-ci s'exprimerait par la production de grains de pollen de taille régulière et hautement viable. Un taux élevé de viabilité est également considéré comme un indicateur de l'adaptation des espèces à certaines conditions écologiques (Char et *al.* 1973 ; Qureschi et *al.* 2002 ; Ozeker et *al.* 2006). On pourrait donc suggérer que nos taxons sont bien adaptés à leurs milieux.

La taille des grains de pollen varie d'un taxon à l'autre et correspond à la taille moyenne des grains de Fabacée déjà observée (Perveen et Qaiser, 1998 ; Hormat, 2004 ; Kahraman et *al.*, 2012 ; Pinar et *al.*, 2014). De précédents travaux ont

suggéré l'existence de corrélation de la taille des grains de pollen avec l'altitude et la latitude comme chez le genre *Ilex* L. (Lobreau-Callen 1975) alors que Kurtz et Liverman (1958) signalent la présence de petits grains de pollen dans les milieux arides. Belhaj et al. (2007), dans une étude palynologique faite sur *Pistacia atlantica* Desf. estiment que la variation de la taille du grain de pollen, bien que corrélée avec la position géographique peut également provenir de la nutrition minérale ainsi que des facteurs génétiques. Dans le cas de notre étude, la variation de la taille du grain de pollen ne donne aucune indication claire vis-à-vis des sites de récolte ou des conditions bioclimatiques.

Nos taxons présentent des apertures situés dans la même zone au niveau des sillons, ce qui correspond aux nombre et types d'apertures retrouvés chez l'ensemble des taxons d'*Astragalus* étudiés jusqu'à présent (Perveen et Qaiser 1998 ; Akan et al., 2005 ; Ekici et al., 2005, 2008 ; El-Sayed et al., 2010 ; Al Ghamadi et al., 2013 ; Ceter et al., 2013 et Dinç et al., 2013). Walker et Dolye (1975) considèrent que le pollen inaperturé est un caractère relativement plus primitif que celui monoaperturé, di, tri et poly-aperturé. Till et al. (1989), Dajoz et al. (1991), Domnez et Pinar (2001), Furness et Rudall (2004) s'accordent à dire que l'aperture étant le point de germination du tube pollinique, une multiplication du nombre d'apertures et de sillons peut apparaître comme un avantage sélectif vis-à-vis de la fécondation car elle augmente la probabilité de contact entre le site de la germination et la surface du stigmate. La présence de trois sillons et de trois pores pourrait donc être considérée comme un caractère intermédiaire et avancé.

Les grains de pollen de nos taxons ont montré une variabilité de la forme et de la structure de l'exine entre les différents taxons. Ceci est en accord avec la description des grains de pollen de différents taxons d'*Astragalus* effectuée par Perveen et Qaiser (1998), Akan et al. (2005), Ekici et al. (2005, 2008), El-Sayed et al. (2010) ; Al Ghamadi et al. (2013), Ceter et al. (2013) et Dinç et al. (2013). Ces auteurs décrivent un grain de pollen essentiellement prolée ou subprolée avec une tendance à la forme sphéroïde.

Concernant la sculpture de l'exine, toutes les études effectuées sur le genre *Astragalus* font état d'une variabilité de l'ornementation : ornementation

microreticulée (Akan et al. 2005 ; Pinar et al. 2009), réticulée (Oskouian et al. 2007), microreticulée, perforée, microréglée-microréticulée, microreticulée-perforée, microreticulée-granulée et perforée-granulée (Ceter et al. 2013). Lors de nos analyses, nous avons observé chez *A. cruciatus* une exine réticulée qui tend à disparaître pour laisser place à une ornementation psillée aux pôles, ce qui est une 1^{ère} chez ce genre. Moore et al. (1991) indiquent que l'ornementation grainée ou réticulée est un caractère évolué qui permet au grain de pollen d'augmenter son adhérence aux insectes pollinisateurs et aux stigmates. Walker et Doyle (1975) abondent dans le même sens et considèrent l'ornementation psillée comme un caractère primitif.

En comparant les caractéristiques des grains de pollen de nos taxons avec d'autres Fabacées, nous avons remarqué qu'ils sont identiques aux grains de certains genres de Papilionacées, appartenant tous à l'Astragalean Clade (*Oxytropis* DC, *Colutea* L., *Melilotus* Mill., *Ononis* L. *Caragana* Lam.). Il s'agit, en effet, de pollen isopolaire, prolée ou subprolée, circulaire en vue polaire, à ornementation de l'exine réticulé ou micro réticulée (Fergusson et Skvarla, 1982; Faegri et Iversen 1989; Moore et al., 1990; Perveen et Qaiser, 1998; Beug, 2004; Pavlova 2013). Tous ces résultats inciteraient à considérer les caractéristiques palynologiques d'*Astragalus* comme étant des indicateurs de tendances évolutives au sein du genre. D'un point de vue palynologique donc, *A. armatus* subsp. *tragacanthoïdes* et *A. armatus* subsp. *numidicus* qui possèdent une ornementation microréticulé uniforme paraissent légèrement plus évolués qu'*A. cruciatus* qui présente une ornementation réticulée avec disparition du réticulum vers les pôles.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de caractériser 4 taxons d'*Astragalus* provenant de différents sites de l'Algérie et de décrire les relations de parenté intra spécifique et inter spécifique, pouvant aboutir à la compréhension de la manière avec laquelle les génomes s'organisent dans l'environnement respectif de chaque taxon. À cette fin, nous avons établi le caryotype (par coloration à l'acéto orceine), étudié la distribution des bandes d'hétérochromatine (révélée par fluorochrome banding), la localisation des gènes ribosomiques 5S et 35S (par l'hybridation *in situ*), la quantité d'ADN (déterminée par cytométrie en flux) et enfin les caractères palynologiques (par observation au microscope photonique et électronique). Cette diversité des approches nous à fourni une multitude de renseignements qui nous ont permis de formuler les conclusions suivantes :

- Le nombre de chromosome d'*A. armatus* subsp. *tragacanthoides* à été déterminé pour la 1^{ère} fois.
- La coloration classique à l'acéto orceine nous à permis d'établir les caryotypes des 4 taxons, mais ne nous à pas permis de différencier *A. armatus* subsp. *tragacanthoides* de *A. armatus* subsp. *numidicus*.
- Le nombre et l'emplacement des bandes d'hétérochromatine GC et la localisation des gènes ribosomiques 5 S et 35S nous ont permis de faire la distinction entre *A. armatus* subsp. *tragacanthoides* et *A. armatus* subsp. *numidicus*.
- On observe les mêmes caractéristiques du caryotype et du pollen, la même organisation de l'hétérochromatine, la même quantité d'ADN au niveau spécifique, indépendamment de la situation géographique des sites de prélèvement des populations et les différents types d'habitats et de bioclimats dans lesquels elles évoluent.

- Au niveau palynologique, les caractéristiques du pollen se sont révélées être de bons marqueurs de différenciation inter spécifique. Au rang inter générique, ces caractéristiques ne peuvent constituer un critère de distinction, vu la similarité des grains de pollen avec les genres constituant le clade *Astragalean*.

- L'ensemble des marqueurs semblent indiquer que les deux sous espèces d'*A. armatus* sont très proches confirmant ainsi leur grande ressemblance morphologique, mais constituent cependant deux taxons distincts.

- Abstraction faite des données palynologiques (manque de données), il semblerait qu'*A. cruciatus* et *A. pseudotrigonus* soient plus évolués que les deux sous espèces d'*A. armatus*.

Au terme de cette thèse, nous avons obtenu d'importantes d'informations sur la variabilité et l'organisation des génomes des 4 taxons d'*Astragalus*. Il reste cependant à :

- Élargir les zones de prospection, le nombre de populations et le nombre d'espèces afin de vérifier si l'organisation de l'hétérochromatine GC et la quantité d'ADN reflètent les conditions environnementales dans lesquelles se développent ces populations.

- La cytogénétique moléculaire et la taille du génome s'avèrent de bons outils de différenciation intra et interspécifique particulièrement quand les caractères morphologiques ne le permettent pas. Nous préconisons de continuer à court et moyen terme la caractérisation cytogénétique et le taille du génome des espèces algériennes du genre *Astragalus*. Une banque de données sera constituée et pourra ainsi représenter un bon outil de caractérisation et une contribution à la connaissance de notre biodiversité.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Latif R.R., Shabana M.H., El-Gandour A.H., Mansour R.M., Sharaf M., 2003.** A New Isoflavone from *Astragalus peregrinus*. Chemistry of Natural Compounds. 39: 536-537.
- Abdel Samad F., Baumel A., Juin M., Pavon D., Siljak-Yakovlev S., Médail F., Bou Dagher Kharrat M., 2014.** Phylogenetic diversity and genome sizes of *Astragalus* (Fabaceae) in the Lebanon biogeographical crossroad. Plant Syst Evol, 300:819-830.
- Açık L., Ekici M., Çelebi A., 2004.** Taxonomic Relationships in *Astragalus* L. Sections *Hololeuce* Bunge and *Synochreati* DC. (Fabaceae): evidence from RAPDPCR and SDS - PAGE of Seed Proteins. " Annales Botanici Fennici 41: 305-317.
- Adams K.L., Palmer J.D., 2003.** Evolution of mitochondrial gene content: Gene loss and transfer to the nucleus. Mol Phylogenet Evol, 29:380-395.
- Agerer-Kirchhoff C., 1976.** Revision von *Astragalus* L. sect. *Astragalus* (Leguminosae). Boissiera, 25: 1-197.
- Akan H., Tatlidil S., Biçakci A., 2005.** Pollen Morphology of *Astragalus* L. section *Alopecuroidei* DC. (Fabaceae) in Turkey. Int J Bot, 1: 28-50.
- Al Ghamadi F., Osman A.K., Guetat A., 2013.** Contributions to the morphology of genus *Astragalus* L. (Fabaceae) and its Taxonomic Implications. Asian J Pl Sci, 12: 176-189.
- Alexander J.A., Liston A., Popovich S.J., 2004.** Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). Am J Bot, 91: 2004-2012.
- Amin A., 1972.** In IOPB chromosome number reports XXXVIII. Taxon 21: 679-684
- Anonyme , 1985.** The Wealth of India (Revised) 1: 476-477. Publication & Information Directorate, CSIR, New Delhi, India.
- Ansari H.A., Ellison N.W., Reader S.M., Badaevas E.D., Friebe B., Miller T.E., Williams W.M., 1999.** Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S-26S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. Ann Bot 83:199-206.

- Anthony Griffiths J.F., David Suzuki T., Chrystelle S., 2002:** Introduction à l'analyse génétique. Ed De Boeck Université. Paris. P 87
- Badr A., Hamoud M., El-Rabey H., 1996.** Chromosomal studies in the Egyptian flora V. Chromosomal relationships in the genus *Astragalus* L. (Fabaceae) and their taxonomic inferences. *Cytologia*, 61: 105-111.
- Badr A., Sharawy S.M., 2007.** Karyotype analysis and systematic relationships in the Egyptian *Astragalus* L. (Fabaceae). *Int J Bot*, 3: 147-159.
- Baillon H., 1867.** Histoire des plantes. Paris, Librairie Hachette et Cie.
- Barneby R.C., 1964.** Atlas of North american *Astragalus*. Memories of the New York Botanical Garden. 13: 1-1188.
- Battandier Trabut., 1884.** Flore de l'Algérie. Ed Adolphe Jourdain. 892 p.
- Belhadj S., Derridj A., Civeyrel L., Gers C., Aigouy T., Otto T., Gauquelin T., 2007.** Pollen morphology and fertility of wild Atlas pistachio (*Pistacia atlantica* Desf., Anacardiaceae). *Grana*, 46:148-156.
- Bel-Kassaoui H., Lamnaouer D., Jossang A., Bodo B., Abdennebi E.H., 2007.** Intoxication expérimentale par des extraits et fractions d'*Astragalus lusitanicus* Lam. chez le mouton. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158: 269-273
- Benhizia H., Benhizia Y., Ghernoub L., Siljak-Yakovlev S., Khalfallah N., 2013.** Meiotic behaviour and karyotype features of endangered endemic fodder species *Hedysarum perrauderianum* (Fabaceae) in some populations from Algeria. *Caryologia*, 6. DOI:10.1080/00087114.2013.821838
- Benmiloud-Mahieddine .R, Abirached-Darmency M., Brown S.C., Kaid-Harche M., Siljak-Yakovlev S., 2011.** Genome size and cytogenetic characterization of three Algerian *Retama* species. *Tree Genetics & Genomes* DOI 10.1007/s11295-011-0389-z
- Bennett M.D., 1987.** Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytol*, 106: 177-200.
- Bennett M.D., Smith J.B., Heslop-Harrison J.S., 1982.** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 16: 179-199.
- Bennetzen J.L., 2000.** Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol*. 42: 251-269.
- Bentzer B., v Bothmer R., Engstrand L., Gustafsson M., Snogerup S., 1971.** Some sources of error in the determination of arm ratios of chromosomes. *Bot Notiser*, 124: 66-74.

- Beug H.J., 2004.** Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete. Verlag Dr. Friedrich Pfeil – München.
- Bogunic F., Muratovic E., Ballian D., Siljak-Yakovlev S., Brown S.C., 2007.** Genome size stability of five subspecies of *Pinus nigra* Arnold s.l. *Env Exp Bot* 59:354-360.
- Bohr V.A., Wassermann K., 1988.** DNA repair at the level of the gene, *Trends Biochem Sci*, 13: 429-433.
- Boissier E., 1872.** *Astragalus*. In: *Flora Orientalis*, Vol. 2. H. Georg., Geneva: pp. 205-498.
- Bonnier G., 1905.** Cours de Botanique: Phanérogames. Eds Librairie Générale de l'Enseignement.
- Bou Dagher-Kharrat M., Grenier G., Bariteau M., Brown S.C., Siljak-Yakovlev S., Savouré A., 2001.** Karyotype analysis reveals interspecific differentiation in the genus *Cedrus* despite genome size and base composition constancy. *Theor Appl Genet*, 103: 846-854.
- Bou Dagher-Kharrat M., Siljak-Yakovlev S., Abdel-Samad N., Douaihy B.C., Abdel-Samad F., Bourge M., Brown S.C., 2013.** Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora. *Plant Biosyst*, 147:1228-1237.
- Bunge A.V., 1868.** Generis *Astragali* species *Gerontogaeae*, Pars prior. Claves diagnosticae. *Mém. Acad. Imp. Sci. Saint Pétersbourg*, 11: 1-140.
- Bunge A.V., 1869.** Generis *Astragali* species *Gerontogaeae*. Pars altera. Specierum enumeratio diagnosticae. *Mem. Acad. Imp. Sci.-St. Petersburg*, 15: 1-245.
- Candolle P., 1802.** *Astragalogia*, nempe *Astragali*, *Biserrulae* et *Oxytropidis*, nec non *Phaca*, *Coluteae* et *Lessertiae*, Historia iconibus illustrata. Ed Parisiis sumptibus Joann Bapt Garnery.
- Caratini R., 1984.** Les plantes. Ed. Bordas, Paris.
- Castilho A., Heslop-Harrison J.S., 1995.** Physical mapping of 5S and 18S-25S DNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome* 38: 91-96.
- Ceter T., Ekici M., Pinar N.M., Özbek F., 2013.** Pollen morphology of *Astragalus* L. section *Hololeuce* Bunge (Fabaceae) in Turkey. *Act Bot Gal* DOI:10.1080/12538078.2013.791641.

- Cetin O., Martin E., Duran A., Ozdemir A., 2010.** Karyological study on endemic *Astragalus stereocalyx* bornm. (Milk-vetch) in Turkey. *Biol Diversity Conservation*, 3: 153-157.
- Char M.B.S., Swamy M.S.N., Cheluviah M.C., 1973.** A critical evaluation of the adaptive significance of the monads and compound grains in angiosperms. *J Paly*, 9: 39-44.
- Chaudhary L.B., Rana T.S., Anand K.K., 2008.** Current status of the systematics of *Astragalus* L. (Fabaceae) with special reference to the Himalayan species in India. *Taiwania*, 53: 338-355.
- Chaudhary L.B., Rana T.S., Narzary D., Verma S., 2007.** A new species of *Astragalus* L. (Leguminosae) from India based on morphological and molecular markers. *Bot J Linn Soc*, 154: 27-34.
- Coming D.E., 1978.** Mechanisms of chromosome banding and its implications for chromosome structure. *Ann Rev Genet*, 12: 25-46.
- Cronin E.H., Williams M.C., Olsen J.D., 1981.** Toxicity and control of Kelsey milkvetch. *J. Range Manag*, 34: 181-183.
- Cronk Q., Ojeda I., Pennington R.T., 2006.** Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Curr Opin Plant Biol*, 9: 99-103. d'Afrique du Nord. vol. 1 - 5.
- Dajoz I., Till-Bottraud I., Gouyon P.H., 1991.** Evolution of pollen morphology. *Science*, 253: 66-88.
- Dane F., Aksoy O.D, Yılmaz G., 2007.** Karyological and palynological studies on *Astragalus hamosus* and *A. glycyphyllos* in Turkey. *Phytologia Balcanica*, 13: 387-391.
- Dart S., Kron P., Mable B.K., 2004.** Characterizing polyploidy in *Arabidopsis lyrata* using chromosome counts and flow cytometry. *Can J Bot*, 82: 185-197.
- de Bustos A., Cuadrado A., Soler C., Jouve N., 1996.** Physical mapping of repetitive DNA sequences and 5S and 18S-26S rDNA in five wild species of the genus *Hordeum*. *Chromosome Res.* 4:491-499.
- Deml I., 1972.** Revision der Sektionen *Acanthophaea* Bunge und *Aegacantha* Bunge der Gattung *Astragalus* L. *Boissiera*, 21: 1-235.
- Derenzini M., 2000.** The AgNORs. *Micron*, 31: 117-120.
- Deutsch M., Long M., 1999.** Intron-exon structure of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acid Res*, 27: 3219-3228.

- Dinç M., Aytaç Z., Doğu S., 2013.** A new species of *Astragalus* (Fabaceae) from Turkey. *Turk J Bot*, 37: 841-846.
- Diot M.F., 2000.** Le végétal en archéologie : Pollen et palynologie. Ed. CNRS. Périgueux.
- Dobignard A., Chatelain C., 2010-2013.** Index synonymique et bibliographique de la flore. Ed. Conservatoire et Jardin Botaniques, Genève. <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/> [consulté le 10/10/2014].
- Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J., 2003.** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*, 51A: 127-128.
- Dömnez E.O., Pinar N.M., 2001.** The clypeate pollen grains of Turkish *Iris* L. (Iridaceae): Subgenus *Scorpiris* Sach. *Turk J Bot*, 25: 57-62.
- Donadieu Y., 1982.** Le pollen thérapeutique naturel .Ed. Maloine, Paris.
- Dorkeld F., 1994.** Un modèle objet dédié à la cartographie comparée des génomes de mammifères. Université Claude Bernard. Thèse de Doctorat. Lyon
- Duan P., Wang Z.M., 2002.** Clinical study on effect of *Astragalus* in efficacy enhancing and toxicity reducing of chemotherapy in patients of malignant tumor. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 22: 515-7.
- Dulucq N., Tulon M., 1998.** La palynologie et l'environnement du passé .Centre National de préhistoire. Ed du C.N.R.S. France.
- Dvořák F., Dadáková B., František G., 1977.** Studies of the morphology of chromosomes of some selected species. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 12: 343-375.
- Ebrahimzadeh H., Niknam V., Maassoumi A.A., 1999.** Nitro compounds in *Astragalus* species from Iran. *Biochem. Syst Ecol*, 27: 743-751.
- Edlund A.F., Swanson R., Preuss D., 2004.** Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell*, 16 (suppl.): S84-S97.
- Ekici M., Aytaç Z., Akan H., Pinar M., 2008.** A new species of *Astragalus* L. (section *Onobrychoidei* DC.: Fabaceae) from Turkey. *Bot J Linn Soc*, 157: 741-747.
- Ekici M., Yüzbaşıoğlu D., Aytaç Z., 2005.** Morphology, pollen, seed structure and karyological study on *Astragalus ovalis* Boiss & Balansa (sect. *Ammodendron*) in Turkey. *Int J Bot*, 1: 74-78.
- Ekrt L., Holubová .R, Trávníček P., Suda J., 2010.** Species boundaries and frequency of hybridization in the *Dryopteris carthusiana* (Dryopteridaceae)

- complex: a taxonomic puzzle resolved using genome size data. *Am J Bot*, 97:1208-1219.
- El Hamidi M., Leipold H.W., 1989.** Poisoning of Sheep by *Astragalus lusitanicus* in Morocco: Field and Experimental Studies. *J Vet Med Series A*, 36: 115-121.
- Erdtman G., 1947.** Suggestions for the classification of fossil and recent pollen grains and spores. *Svensk Bot. Tidskr*, 41: 104-114.
- Erdtman G., 1952.** Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms. Ed. Almqvist and Wiksell, Stockholm.
- Erdtman G., 1966.** Pollen morphology and plant taxonomy. Ed. Hafner, New York.
- Faegri K.J., Iversen, 1989.** Textbook of pollen analysis. Ed. John Wilry & Sones, Chichester.
- Ferguson I.K., Skvarla J.J., 1982.** The pollen morphology of the subfamily Papilionoideae (Leguminosae). In: *Advances in Legume Systematics*, Polhill RM and Raven PH (Eds), pp. 859-896.
- Fuchs J., Strehl S., Brandes A., Scheizer D., Schubert I., 1998.** Molecular-cytogenetic characterization of the *Vicia faba* genome - Heterochromatin differentiation, replication and sequence localization. *Chromosome Res* 6:219-230.
- Furness C.A., Rudall P.J., 1999.** Inaperturate pollen in mono-cotyledons. *Int J Plant Sci*, 160: 395-414.
- Furness C.A., Rudall P.J., 2004.** Pollen aperture evolution - a crucial factor for eudicot success? *Trends in Plant Sci*, 9: 154-158.
- Furness C.A., Rudall P.J., Sampson F.B., 2002.** Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *Int J Plant Sci*, 163: 235-260.
- Ganesan A.T., Holter H., Roberts C., 1958.** Some observations on sporulation in *Saccharomyces*. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol*, 31: 1-6.
- Gao X.P., Zhao W.X., Zhang Z.L., 2001.** Effect of huangqi zengmian powder on interstitial response in patients with esophageal cancer at peri-operational period. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 21:171-3.
- Garnatje T., Vallés J., Garcia S., Hidalgo O., Sanz M., Canela A.M., Siljak-Yakovlev S., 2004.** Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): Karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biol Cell*, 96: 117-124.

- Gaubatz J.W., Cutler R.G., 1990.** Mouse satellite DNA is transcribed in senescent cardiac muscle. *J Biol Chem*, 265: 17753-17758.
- Geber G., Schweizer D., 1987.** Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Syst Evol.* 158:97-106.
- Gentry H.S., 1957.** Gum Tragacanth in Iran. *Econ Bot*, 11: 40-63.
- Gepts P., Beavi W.D., Brummer E.C., Shoemaker R.C., Stalker H.T., Weede N.F., Young N.D., 2005.** Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol*, 137: 1228-1235.
- Gerlach W.L., Bedbrook J.R., 1979.** Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acid Res*, 7: 1869-1885.
- Gerlach W.L., Dyer T.A., 1980.** Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucl Acid Res*, 8:4851- 4865.
- Godelle B., Cartier D., Marie D., Brown S.C., Siljak-Yakovlev S., 1993.** Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry*, 14: 618-626.
- Golczyk H., Hasterok R., Joachimiak A.J., 2005.** FISH-aimed karyotyping and characterization of Renner complexes in permanent heterozygote *Rhoeo spathacea*. *Genome*, 48: 145-153.
- Goldblatt P., Johnson D.E., 1991.** Index to plant chromosome numbers 1988-1989. - Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 40. Goldblatt P and Johnson DE (eds)
- Gomez-Sosa E., 1979.** Las especies Sudamericanas del genero *Astragalus* (Leguminosae) I. Las especies Patagónicas Argentinas. *Darwiniana*, 22: 313-376.
- Gomez-Sosa E., 1981.** Novedades en el genero *Astragalus* (Leguminosae-Galegeae). *Darwiniana*, 23: 507-516.
- Gomez-Sosa E., 1982.** Novedades en el genero *Astragalus*, II (Leguminosae-Galegeae). *Darwiniana*, 24: 23-31.
- Gontscharov N.F., Borissova A.G., Gorschkova S.G., Popov M.G., Vassilczenko I.T., 1946.** *Astragalus*. In: Komarov VL, Shishkin BK (eds.) *Flora URSS*, vol. 12. *Editio Academiae Scientiarum URSS*, Moskow, Leningrad, pp. 1-918.

- Gray A., 1864.** A revision and arrangement (mainly by the fruit) of the North American species of *Astragalus* and *Oxytropis*. Proc Amer Acad Arts, 6: 188-236.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M.A., Bennett M.D., 2005.** The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. Annals Bot, 95: 255-260.
- Greilhuber J., Speta F., 1976.** C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia* (Liliaceae). Plant Syst Evol, 126:149-188.
- Grewal S.L., Elgin S.C., 2002.** Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. Curr Opin Genet Dev, 12:178-87.
- Grewal S.L., Moazed D., 2003.** Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. Science, 301:798-802.
- Hadjiolov A.A., 1985.** *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis*. New York: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 1-268.
- Hamon P., Siljak-Yakovlev S., Srisuwan S., Robin O., Poncet V., Hamon S., De Kochko A., 2009.** Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: a revised view of species differentiation. Chrom Res 17: 291–304.
- Harry M. 2001.** Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine, Paris.
- Hasterok R., Maluszynska J., 2000.** Cytogenetic analysis of diploid *Brassica* species. Acta Biol Cracov Bot, 42:145-153.
- Heitz E., 1928.** Das heterochromatin der moose. I Jahrb Wiss Botanik, 69: 762-818.
- Hernandez-Verdun D., 2000.** In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. J Cell Biol, 148:259-70.
- Hernandez-Verdun D., 2004.** Behavior of the nucleolus during mitosis. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 41-57.
- Heslop-Harrison J.S. 1991.** The molecular cytogenetics of plants. Commentary. J Cell Sci, 100: 15-21.
- Heslop-Harrison J.S., 2000.** Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. The Plant Cell Online 12 : 617-635

- Heslop-Harrisson J.S., Schwarzacher T., Anamthawat-Jonsson K., Leitch A.R., Shi M., Leitch I.J., 1991.** In *situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique*, 3:109-116.
- Howell W.M., Black D.A., 1980.** Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015.
- Hubel H.R., 1985.** Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol*, 60: 285-294.
- Jahier J., Chevre A.M., Delourme R., Eber F., Tanguy A.M., 1992.** *Techniques de cytogénétique végétale*. Ed. INRA. Paris.
- Jakob S.S., Meister A., Blattner FR., 2004.** Considerable genome size variation of *Hordeum* species (Poaceae) is linked to phylogeny, life form, ecology and speciation rates. *Mol Biol Evol*, 21: 860-869.
- James L.F., Hartely W.J., Williams M.C., Van Kampen K.R., 1980.** Field and experimental studies in cattle and sheep poisoned by nitrobearing *Astragalus* or their toxins. *Am J Vet Res*, 41: 377- 382.
- James L.F., Shupe J.L., 1986.** Selenium accumulators. In *current Veterinary Therapy, Food animal practice 2*, Howard J.L., ed. Philadelphia, WB Saunders : pp 394-396.
- James L.F., Van Kampen K.R., 1974.** Effect of protein and mineral supplementation on potential locoweed (*Astragalus* spp.) poisoning in sheep. *J Am Vet Med Assoc*, 164: 1042-1043.
- James L.F., Van Kampen K.R., Hartley W.J., 1983.** *Astragalus bisulcatus*: a cause of selenium or Locoweed poisoning. *Vet. Hum. Toxicol.*, 25 (2) : 86- 89.
- Jiménez R., Burgos M., Diaz Guardia R., 1988:** A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity* 60: 125-127.
- John B., 1990.** *Meiosis*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Johnston I.M., 1938.** Notes on some *Astragalus* species of Ecuador and Peru. *J. Arnold Arbor*, 19:88-96.
- Johnston I.M., 1947.** *Astragalus* in Argentina, Bolivia, and Chile. *J. Arnold Arbor*, 28:336-409.
- Jones M.E., 1923.** *Revision of North American Astragalus*. Published by the author, Salt Lake City, Utah.

- Kamaté K., Brown S.C., Durand P., Bureau M.J., Nay de D., Trinh H.T., 2001.** Nuclear DNA content and base composition in 28 taxa of *Musa*. *Genome*, 44: 622-627.
- Käpylä M., 1991.** Testing the age and viability of airborne pollen. *Grana*, 29: 430-433.
- Kazem Y., Houshmand S., Zamani Dadane G., 2010.** Karyotype analysis of *Astragalus effusus* Bunge (Fabaceae). *Caryologia*, 63: 257-261.
- Kazemi M., Kazempour Osaloo S.H., Maassoumi A.A., Rastegar Pouyani E., 2009.** Molecular phylogeny of selected Old World *Astragalus* (Fabaceae): incongruence among chloroplast trnL-F, ndhF and nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Nordic J Bot*, 27:425-436.
- Kazempour Osaloo S.H., Maassoumi A.A., Murakami N., 2003.** Molecular systematics of the genus *Astragalus* L. (Fabaceae): Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers and chloroplast gene ndhF sequences. *Plant Syst Evol*, 242: 1-32.
- Kazempour Osaloo S.H., Maassoumi A.A., Murakami N., 2005.** Molecular systematics of the Old World *Astragalus* (Fabaceae) as inferred from nrDNA ITS sequence data. *Brittonia*, 57: 367-381.
- Kharrat-Souissi A., Siljak-Yakovlev S., Pustahija F., Chaieb M., 2012.** Physical mapping of 5S and 18S-5.8S-26S RNA gene families in polyploid series of *Cenchrus ciliaris* Linnaeus, 1771 (Poaceae). *Comp Cytogen*, 6: 273-286.
- Kim S.Y., Choi H.W., Kim C.S., Sung J.S., Lee J., Bang J.W., 2006.** Cytogenetics analyses of *Astragalus* species. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 14: 250-254.
- King M., 1991.** The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In: D.M. Green and S.K. Amph Cytog Evol: 359-391.
- Kiss T., Darzacq X., 2001.** Plus d'un siècle après sa découverte, un nouveau regard sur le Nucléole. *Médecine et Sciences*, 17: 730-6.
- Knight A.C., Ackerly D.D., 2002.** Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. *Eco Let*, 5: 66-76.
- Knight A.C., Molinari A.N., Petrov A.D., 2005** The Large Genome constrain Hypothesis: Evolution, Ecology and Phenotype. *Annals Bot*, 95: 177-190
- Kolano B., Saracka K., Broda-Cnota A., Maluszynska J., 2013.** Localization of ribosomal DNA and CMA3/DAPI heterochromatin in cultivated and wild *Amaranthus* species. *Scientia Horticulturae*. 164:249–255.

- Kurtz E.B., Liverman J.L., 1958.** Some effects of temperature on pollen Characters. Bull. Torrey Bot Club, 85 : 136-138.
- Labat J.N., 1996.** Biogéographie, endémisme et origine des légumineuses papilionacées de Madagascar. Biogéographie de Madagascar: pp 95-108.
- Ledingham G.F., 1960.** Chromosome number in *Astragalus* and *Oxytropis*. Can J Genet Cytol, 2: 119-128.
- Ledingham G.F., Fahselt M.D., 1964.** Chromosome numbers of some North American species of *Astragalus* (Leguminosae). Sida, 6: 313-327.
- Ledingham G.F., Rever B.M., 1963.** Chromosome numbers of some Southwest Asian species of *Astragalus* and *Oxytropis* (Leguminosae). - Canad J Genet Cytol 5: 18-32.
- Leitch A.R., 2000.** Higher levels of chromatin in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells. Microbiol. Mol Biol Rev, 64: 138-152.
- Leitch I.J., Bennet M.D., 2005.** Plant Genome Size Research: A Field In Focus Annals Bot, 95: 1-6.
- Leitch I.J., Chase M.W., Bennett M.D., 1998.** Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. Ann Bot, 82: 85-94.
- Leong-Škorničková J., Šída O., Jarolímová V., Sabu M., Suda J., 2007.** Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). Ann Bot, 100: 505-526
- Levan A., Fredga K., Sandberg A.A., 1964.** Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201-220.
- Levin D.A., Funderburg S.W., 1979.** Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. The American Naturalist, 114: 784-795.
- Lewitsky G.A., Araratian G., 1931.** Transformations of chromosomes under the influence of X-rays. Bull. Appl. Bot., 27: 265-303.
- Linné C., 1753.** *Species Plantarum*. Ed. Holmiae, Stockholm.
- Liston A., 1992.** Isozyme systematics of *Astragalus* L. sect. *Leptocarpis* subsect. *Californici* (Fabaceae). Syst Bot, 17: 367-379.
- Liston A., Wheeler J.A., 1994.** The phylogenetic position of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from the chloroplast genes rpoC1 and rpoC2. Biochem Syst Ecol, 22: 377-388.

- Liu Y.H., 1984.** Karyotype Analysis of 5 Species of Genus *Astragalus*. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 22: 125-127.
- Lobreau-Callen D., 1975.** Les variations dimensionnelles du pollen du genre *Ilex* (Aquifoliaceae) et leurs rapports avec le climat. *Bulletin de La Société Botanique de France* 122: 179-199.
- Lock J.M., Schrire B.D., 2005.** Tribe Galegeae, in: Lewis, G., Schire, B., Mackinder, B. and Lock, M. (eds.) *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lock J.M., Simpson K., 1991.** *Legumes of West Asia, a check list*. Royal Botanical Gardens, Kew.
- Loureiro J., Rodriguez E., Doležal J., Santos C., 2006.** Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Annals Bot*, 98: 515-527.
- Luo M.C., Hwu K.K., Huang T.C., 2000.** Taxonomic study of Taiwan *Astragalus* based on genetic variation. *Taxon*, 49: 35-46.
- Ma J., Devos K.M., Bennetzen J.L., 2004.** Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. *Genome Res*, 14: 860-869.
- Maassoumi A.A., 1987.** Notes on the genus *Astragalus* in Iran I, cytotaxonomic studies on some species. *Iran J Bot*, 3: 117-128.
- Mahé F., Pascual H., Coriton O.O., Huteau V., Perris A.N., Misset M.-T., Aïnouche A., 2011.** New data and phylogenetic placement of the enigmatic old world lupin: *Lupinus mariae-josephi* H. Pascual. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58: 101-114
- Mahelka V., Suda J., Jarolímová J., Trávníček P., Krahulec F., 2005.** Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (Poaceae: Triticeae) and their hybrid. *Folia Geobot*, 40:367-384.
- Taketa S., Harrison G.E., Heslop-Harrison J.S., 1999.** Comparative physical mapping of the 5S and 18S–25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theor Appl Genet*, 98, 1–9.
- Maire R., 1952-1987.** *Flore de l'Afrique du Nord*. Ed. Paul Le Chevalier.
- Majak W., Cheng K.J., 1983.** Recent studies on ruminal metabolism of 3-nitropropanol in cattle. *Toxicon*, 3 (Suppl.): 265- 268.
- Malallah G.A., Masood M., Al-Dosari M., 2001.** Chromosome numbers of the Kuwaiti flora, III: 411-418.

- Maluszynska J., Heslop-Harrison J.S., 1991.** Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1: 159-166.
- Manandhar L., Sakya S.R., 2004.** Cytotaxonomic studies in two species of *Astragalus*. *J Cytol Genet*, 5:13-20.
- Marie D., Brown S.C., 1993.** A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol of the Cell*, 78: 41-51.
- Martin E., Duran A., Dinç M., Erişen S., 2008.** Karyotype analyses of four *Astragalus* L. (Fabaceae) species from Turkey. *Phytologia*, 90:147-159.
- Martins C., Wasko A.P., 2004.** Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR (ed) *Focus on Genome Research*. New Science Publishers, Hauppauge, pp 289-318.
- McCulloch M., See C., Shu X.J., Broffman M., Kramer A., Fan W.Y., Gao J., Lieb W., Shieh K., Colford J.M. Jr., 2006.** *Astragalus*-based Chinese herbs and platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol*, 24:419-30.
- Mehrina M., Zarre S., Sokhan-Sanj A., 2005.** Intra- and inter-specific relationships within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. *Bioch Syst Ecol*, 33:149-158.
- Metezeau Ph., Ronot X., Le Noan-Merdrignac G., Ratinaud M.H., 1988.** La cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique. *Medsis/McGraw-Hill*, vol 1, 561p.
- Milne L., 2005.** *A Grain of Truth. How Pollen Brought a Murderer to Justice*. Reed New Holland Publ., Sydney, Australia
- Moore P.D., Webb J.A., 1978.** *An illustrated guide to pollen analysis*. Hodder & Stoughton Ltd., London, Sidney, Auckland, Toronto.
- Moore P.D., Webb J.A., Collinson M., 1991.** *Pollen analysis*, Ed. I. Blackwell Sci. Publication.
- Morgante M., Hanafey M., Powell W., 2002.** Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet*, 30: 194-200.
- Mortreau .E, Siljak-Yakovlev S., Cerbah M., Brown S.C., Bertrand H., Lambert C., 2010.** Cytogenetic characterization of *Hydrangea involucrata* Sieb. and *H. aspera* D. Don complex (Hydrangeaceae): genetic, evolutionary, and taxonomic implications. *Tree Genet Genomes*, 6: 137-148.

- Na H.J., Um J.Y., Kim S.C., Koh K.H., Hwang W.J., Lee K.M., Kim C.H., Kim H.M., 2004.** Molecular discrimination of medicinal *Astragalus* radix by RAPD analysis. *Immunopharm Immunot*, 26: 265-272.
- Neumann P., Koblížková A., Navrátilová A., Macas J., 2006.** Significant expansion of *Vicia pannonica* genome size mediated by amplification of a single type of giant retroelement. *Genetics*, 173: 1047-1056.
- Niknam V., Salehi Lisar Y., 2002.** Chemical Composition Of *Astragalus*: Carbohydrates and Mucilage Content. *Pak J Bot*, 36: 381-388
- Obermayer R., Greilhuber J., 2006.** Cryptopolyploidy revisited: the case of *Vinca* (Apocynaceae). *Plant Syst Evol*, 256: 201-208.
- Oskouian R., Kazempour Oosaloo S.H., Masoumi A.A., 2007.** Pollen Morphology of *Astragalus* Section *Malacothrix* and its Allies (Fabaceae) in Iran. *Journal of Science (University Of Tehran) (JSUT)* 32 (4(Section: Biology 2)): 177 - 181.
- Ozeker E., Isfendiyaroglu M., Misirli A., 2006.** Comparison of different *Pistacia* spp. in terms of pollination biology in the Yunt Mountains of Manisa Province in Turkey. *Pak J Biol Sci*, 9: 371-376.
- Pavlova D., 2013. Pollen morphology of some balkan species from genus *Oxytropis* DC (*Fabaceae*) *Genetics and Plant Physiology*. Volume 3: 42–54
- Pellicer J., Garcia S., Canela M.Á., Garnatje T., Korobkov A.A., Twibell J.D., Vallès J., 2010.** Genome size dynamics in *Artemisia* L. (Asteraceae): following the track of polyploidy. *Plant Biol*. 12: 820–830.
- Perný M., Kolarčík V., Majeský L., Mártonfi P., 2008.** Cytogeography of the *Phyleum pratense* group (Poaceae) in the Carpathian and Pannonia. *Bot. J Linn Soc*, 157:475-485
- Perveen A., Qaiser M., 1998.** Pollen Flora of Pakistan - VIII Leguminosae (Subfamily: Papilionoideae). *Tur J Bot*, 22: 73 - 91.
- Petrov D.A., Wendel J.F., 2006.** Evolution of eukaryotic genome structure. In C. W.Fox & J. B. Wolf (Eds.), *Evolutionary genetics: Concepts and case studies* (chap. 10).Oxford University Press.
- Piegu B., Guyot R., Picault N., Roulin A., Sanyal A., Kim H., Collura K., Brar D.S., Jackson S., Wing R.A., Panaud O., 2006.** Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res*, 16: 1262-1269.

- Pinar N.M., Akan H., Ceter T., Aytac Z., Ekici M., Acar A., Akdogan S., 2014.** Comparative pollen morphology of annual *Trigonella* L. (Fabaceae) in Turkey. *Plant Syst Evol.*300:689–708
- Pinar N.M., Ekici M., Aytac Z., Akan H., Ceter T., Alan Ş., 2009.** Pollen morphology of *Astragalus* L. sect. *Onobrychoidei* DC. (Fabaceae) in Turkey. *Turk J Bot*, 33: 291-303.
- Podlech D., 1982.** Neue Aspekte zur Evolution und Gliederung der Gattung *Astragalus* L. *Mitt. Staatssamml. München*, 18: 359-378.
- Podlech D., 1983.** Zur Taxonomie und Nomenklatur der tragacanthoiden Astragali. *Mitt. Bot. Staatssamml. München*, 19: 1-23.
- Podlech D., 1984.** Revision von *Astragalus* L. sect. *Herpocaulos* Bunge. *Mitt. Bot. Staatssamml. München* 20: 441-449.
- Podlech D., 1986.** Taxonomic and phytogeographical problems in *Astragalus* of the Old World and South West Asia. *Proc Roy Soc*, 89: 37-43.
- Podlech D., 1987.** The s a u r u s a s t r a g a l o r u m. Index of all taxa described within the genus *Astragalus* L. and other genera but belonging to the genus *Astragalus*. *Taxa of the Old World and related taxa of the New World*. 1- 324.
- Podlech D., 1988.** Revision von *Astragalus* L. sect. *Caprini* DC. Bunge. *Mitt. Bot. Staatssamml. München* 25: 1-924.
- Podlech D., 1990.** Revision von *Astragalus* L. sect. *Platyglottis* Bunge (Leguminosae). *Mitt Bot Staats*, 29: 541-572.
- Podlech D., 1991.** The systematics of the annual species of the genus *Astragalus* L. (Leguminosae). *Flora et Vegetatio Mundi* IX: 1-8.
- Podlech D., 1999.** New *Astragali* and *Oxytropis* from North Africa and Asia, including some new combinations and remarks on some species. *Sendtnera*, 6: 135-174.
- Podlech D., 1999.** Papilionaceae III: *Astragalus*. In: Rechinger K. H. (ed.) *Flora Iranica*, No. 174. Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, Graz, pp. 1-350.
- Podlech D., 2001.** Contributions to the knowledge of the genus *Astragalus* L. (Leguminosae) VII-X. *Sendtnera* 7: 163-201.
- Podlech D., Xu L.R., 2004.** New species and combinations in *Astragalus* (Leguminosae) from China and the Himalayas. *Novon*, 14: 216-226.
- Podlech D., Xu L.R., 2007.** New species and new combination in *Astragalus* (Leguminosae) from China. *Novon*, 17: 228-254.

- Polhill R.M., 1981.** Tribe Galegeae, in: Polhill, R.M. and Raven, E.H. (eds.), Advances in Legume systematics. Royal Botanical Gardens, Kew. pp 357-363.
- Polhill R.M., 1994.** Classification of the Leguminosae. Dans Bisby FA, Buckingham J, Harborne JB. *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae, Plants and Their Constituents, Volume 1*. Chapman and Hall/CRC Press, London. pp. xxv-xlvi.
- Pons A., 1958.** Le pollen. PUF- Que Sais-Je ? n° 786.
- Punt W., Blackmore S., Nilsson S., Le Thomas A., 1994.** Glossary of pollen and spore terminology. Lab. Palaeobot. Palynol Foundation. Utrecht.
- Pustahija F., Brown S.C., Bogunić F., Bašić N., Muratović E., Ollier S., Hidalgo O, Bourge M., Stevanović V., Siljak-Yakovlev S., 2013.** Small genomes dominate in plants growing on serpentine soils in West Balkans, an exhaustive study of 8 habitats covering 308 taxa. *Plant soil*, 373: 427-453.
- Quézel P., Santa S., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome 1). Editions du C.N.R.S. France.
- Qureshi S.J., Awan A.G., Khan M.A., Bano S., 2002. Study of pollen fertility of the genus *Launaea* from Pakistan. *Asian J Plant Sci*, 1: 73-74.
- Ramirez - Morillo I.M., Brown G.K., 2001.** The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Syst Bot*, 26: 722-726
- Raska I., Koberna K., Malinsky J., Fidlerova H., Masata M., 2004.** The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell*, 96: 579-594.
- Raska I., Shaw P.J., Cmarko D., 2006 a.** Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr. Opin. Cell Biol*, 18: 325-334.
- Raska I., Shaw P.J., Cmarko D., 2006 b.** New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol*, 255: 177-235.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichlorn S.E., 2000.** Biologie végétale. 6ème Edition de boeck,
- Rayburn A.L., Auger J.A., 1990.** Genome size variation in *Zea mays* ssp *mays* adapted to different altitudes. *Theor App Genet*, 79 :470-474.
- Rayburn, A.L., 1990.** Genome size variation in southwestern Indian maize adapted to various altitudes. *Evol. Trends Plants* 4:53-57.

- Rudert F., Bronner S., Garnier J.M., Dolle P., 1995.** Transcripts from opposite strands of gamma satellite DNA are differentially expressed during mouse development. *Mamm. Genome*, 6: 76-83
- Rydberg P.A., 1929.** *Astragalanae*. *North American Flora* 24: 251-462.
- San Miguel P., Bennetzen J.L., 1998.** Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals Bot*, 82 (suppl A): 37-44.
- Sanderson M.J., 1991.** Phylogenetic relationships within North American *Astragalus* (Fabaceae). *Syst Bot*, 16: 414-430.
- Sanderson M.J., Doyle J.J., 1993.** Phylogenetic relationships in North American *Astragalus* (Fabaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation. *Syst Bot*, 18: 395-408.
- Sanderson M.J., Wojciechowski M.F., 1996.** Diversification rates in a temperate legume clade: Are there so many species of *Astragalus* (Fabaceae)? *Amer J Bot*, 83: 1488-1502.
- Sang E.h, Kim H.H., Heo K., 2013.** A cytogenetic study of *Astragalus koraiensis* Y. N. Lee. *Korean J PI Taxon*, 43: 139-145.
- Scherson R.A., Vidal R., Sanderson M.J., 2008.** Phylogeny, biogeography and rates of diversification of New World *Astragalus* (Leguminosae) with an emphasis on South American radiations. *Am J Bot*, 95: 1030-1039.
- Schreiber J., 1951.** A schedule for the study of somatic chromosomes in *Bromus*. *Stain Technol*, 26: 247-250.
- Schubert I., Wobus U., 1985.** In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma*, 92: 143-148.
- Schwarzacher H.G., Wachtler F., 1983.** Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum Genet*, 63: 89-99.
- Schweizer D., 1976.** Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.
- Senn H.A., 1938.** Chromosome number relationships in the Leguminosae. *Bibliographica Genetica* 12:175-336.
- Shahmuradov I.A., Akbarova Y.Y., Solovyev V.V., Aliyev J.A., 2003.** Abundance of plastid DNA insertions in nuclear genomes of rice and *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 52: 923-934.

- Sheidai M., Gharemani-Nejad F., 2008.** New Chromosome number and Karyotype analysis in four *Astragalus* L. (Fabaceae) species. *Iran J Bot*, 15: 21-26.
- Sheidai M., Zarre S., Ismeilzadeh J., 2009.** New chromosome number reports in tragacanthic *Astragalus* species. *Caryologia*, 62: 30-36.
- Siljak-Yakovlev S., 1986.** Etude cytogénétique et palynologique de Compositae endémiques ou reliques de la flore yougoslave. Thèse d'Etat, Université de Paris-Sud.
- Siljak-Yakovlev S., Cartier D., 1986.** Heterochromatin patterns in some taxa of *Crepis praemorsa* complex. *Caryologia*, 39: 27-32.
- Siljak-Yakovlev S., Cerbah M., Coulaud J., Stoian V., Brown S.C., 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., Peceenini S., Muratovic E., Zoldos V., Robin O., Valles J., 2003.** Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species. *Plant Syst Evol*, 236: 165-173.
- Siljak-Yakovlev S., Peruzzi L., 2012.** Cytogenetic characterization of endemics: past and future, *Plant Biosyst*, 146: 694-702
- Siljak-Yakovlev S., Pustahija F., Šolić E.M., Bogunić F., Muratović E., Bašić N., Catrice O., Brown S.C., 2010.** Towards a genome size and chromosome number database of Balkan Flora: C-Values in 343 taxa with novel values for 242. *Adv Sci Lett*, 3: 190-213.
- 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. *Environ Exp Bot*, 62:101-112.
- Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D., 2000.** In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* 148: 259-270.
- Slovák M., Vit P., Urfus T., Suda J., 2009.** Complex pattern of genome size variation in a polymorphic member of the Asteraceae. *J Biogeogr*, 36:372-384.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Bennett M.D., Leitch I.J., 2003.** Evolution of genome size in the angiosperms. *Am J Bot*, 90: 1596-1603.
- Spellenberg R., 1976.** Chromosome numbers and their cytotaxonomic significance for North American *Astragalus* (Fabaceae). *Taxon*, 25: 463-476.

- Srebniak M., Rasmussen O., Maluszynska J., 2002.** Cytogenetic analysis of an asymmetric potato hybrid. *J Appl Genet*, 43:19-31.
- Stace C.A., 1991.** *Plant Taxonomy and Biosystematics*. Cambridge University Press. pp 264.
- Stebbins G.L., 1950.** *Variation and evolution in plants*, Columbia Univ. Press, New York, 1-64.
- Stebbins G.L., 1971.** *Chromosomal evolution in higher plants*. E. London: Arnold, 216 p.
- Suda J., 2004.** An employment of flow cytométrie into plant biosystematics. PhD thesis, Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Botany. pp 55.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Rosenbaumová R., Peckert T., Krahulec F., 2007.** Genome size variation and species relationships in *Hieracium* subgenus *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. *Ann Bot*, 100: 1323-1335.
- Sumner A.T., 1994.** *Chromosome Banding and Identification . Methods in Molecular Biology*, Vol: 29. Edited by JR Gosden .Humana Press Inc, Totowa, NJ.
- Temsch E.M., Temsch W., Ehrendorfer-Schratt L., Greilhuber J., 2010.** Heavy Metal Pollution, Selection, and Genome Size: The Species of the Žerjav Study Revisited with Flow Cytometry. *J Bot*, vol. 2010, Article ID 596542, 11 pages. DOI:10.1155/2010/596542
- Tietz S., Zarre M.S., 1994.** Revision von *Astragalus* L. sect. *Megalocystis* Bunge (Fabaceae). *Sendtnera*, 2: 287-363.
- Till I., Valdeyron G., Gouyon P.H., 1987.** Polymorphisme pollinique et polymorphisme génétique. *Can J Bot*, 67: 538-543.
- Tin M.M., Cho C.H., Chan K., James A.E., Ko J.K., 2007.** *Astragalus saponins* induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft. *Carcinogenesis*, 28:1347-55
- Torres R.A., Ganal M., Hemleben V., 1990.** GC balance in the internal transcribed spacer ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J Mol Evol*, 30:170-181.
- Torrey J., Gray A., 1838.** Tribe *Astragaleae*. *A Flora of North America*, 1: 328-353.
- Tournefort J.P. De, 1700.** *Institutiones rei herbariae*. Typographia regia, Parisiis France. 697pp.

- Towill L.E., 1985.** Low temperature and freeze-vacuum drying preservation of pollen. Dans: K.K. Katho (éd.). Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press Inc., Boca Raton: 171-198.
- Trojer P., Reinberg D., 2007.** Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell*, 28: 1-13.
- UICN 2001.** Rapport de l'Agence Nationale Algérienne Pour la Conservation de la Nature et de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature sur la Connaissance, Valorisation et Contrôle de l'Utilisation de la Flore Sauvage en Médecine Traditionnelle (Plantes Médicinales).
- Vallès J., Bašić N., Bogunić F., Bourge M., Brown S.C., Garnatje T., Hajrudinović A., Muratović E., Pustahija F., Šolić E.M., Siljak-Yakovlev S., 2014.** Contribution to plant genome size knowledge: first assessments in five genera and 30 species of angiosperms from western Balkans. *Botanica Serbica*, 38: 25-33.
- Vasconcelos S., Souza A.A., Gusmão C.L., Milani M., Benko-Iseppon A.M., Brasileiro-Vidal A.C. 2010.** Heterochromatin and rDNA 5S and 45S sites as reliable cytogenetic markers for castor bean (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). *Micron*.41:746-53.
- Verbeken D., Dierckx S., Dewettinck K., 2003.** Exudate gums: occurrence, production and application. *App Microbiol Biotechnol*, 63: 10-21.
- Vitte C., Panaud O., 2005.** LTR retrotransposons and plant genome size: Emergence of the increase/decrease model. *Cytogenetics Genome Res*, 110: 91-107.
- Vosa C.G., 1996.** Some aspects of karyotype evolution in Liliiflorae: heterochromatin variation and ecology in *Allium pulchellum*. *Bocconeae*, 5: 267-270.
- Vosa C.G., Stergianou C., 1990.** The cytoecology of the genus *Pleione*. *J Orchid Soc India*, 4: 29-35.
- Walker J.W., Doyle J.A., 1975.** The bases of angiosperm phylogeny: palynology. *Ann Missouri Bot Garden*, 62: 664-723.
- Wallrath L., 1998.** Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev*, 8: 147-153.
- Weiss-Schneeweiss H., Greilhuber J., Schneeweiss G., 2006.** Genome size evolution in holoparasitic Orobanchaceae (Orobanchaceae) and related genera. *Am J Bot*, 93: 148-156.

- Wendel J.F., 2000.** Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, 42: 225-249.
- Wenninger J., 1991.** Revision von *Astragalus* L. sect. *Chlorostachys* Bunge, sect. *Phyllolobium* Bunge und sect. *Skythropos* Bunge (Leguminosae). *Mitt. Bot. Staatssamml. München*, 30: 1-196.
- Williamson D.H., Fennell D.J., 1975.** The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. *Methods Cell Biol*, 12: 335-351.
- Wodehouse R.P., 1928.** The Phylogenetic Value of Pollen-Grain Characters. *Annals Bot*, XLII: 891-936.
- Wodehouse R.P., 1935.** Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine. McGraw-Hill Book Company, New York London. 574 p.
- Wojciechowski M.F., 2005.** *Astragalus* (Fabaceae): A molecular phylogenetic perspective. *Brittonia*, 57: 382-396.
- Wojciechowski M.F., Sanderson M.J., Baldwin B.G., Donoghue M.J., 1993.** Monophyly of aneuploid *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Am J Bot*, 80: 711-722.
- Wojciechowski M.F., Sanderson M.J., Hu J.M. 1999.** Evidence on the monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL intron data. *Syst Bot*, 24: 409-437.
- Yakar N., 1952.** Mitotic disturbances caused by chloranil. *Am J Bot*, 39: 540-546.
- Yip P.Y., Kwan H.S., 2006.** Molecular identification of *Astragalus membranaceus* at the species and locality levels. *J. Ethnopharmacology*. 106: 222-229.
- Young N.D., Mudge J., Ellis T.H.N., 2003.** Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:199-204.
- Zakharyeva O.I., 1985.** Chromosome numbers of some flowering plants from the Caucasus and Middle Asia. *Bot Zhurn SSSR*, 70: 1699–1701.
- Zarre M.S., Azani N., 2013.** Perspectives in taxonomy and phylogeny of the genus *Astragalus* (Fabaceae): a review. *P Bio Sci*, 3: 1-6.
- Zarre M.S., Podlech D., 1997.** Problems in the taxonomy of tragacanthic *Astragalus*. *Sendtnera*, 4: 243-250.
- Zarre-Mobarakeh S., 2000.** Systematic revision of *Astragalus* sect. *Adiaspastus*, sect. *Macrophyllium* and sect. *Pterophorus* (Fabaceae). *Englera*, 18: 1-219.

Zeraïa L., 1983. Protection de la flore. Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes. Station Centrale de Recherche en Ecologie Forestière, Alger, Algérie.

Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., 2003. Intercalary heterochromatin and genetic silencing. *Bioessays*, 25: 1040-1051.

ANNEXES

ANNEXE 1

Préparation de produits pour coloration à l'Acéto Orceine

1- La 8-hydroxyquinoléine à 0.002%

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

2- Acéto orceine à 1%

Porter à ébullition 45 ml d'acide acétique à 45% et 55 mL d'eau distillée. Rajouter 1 gr d'Orceine et laisser bouillir pendant 10 min. laisser refroidir puis filtrer et stocker au réfrigérateur.

Produits pour la digestion enzymatique

1- Tampon phosphate

Mélanger 1.17 g de phosphate di sodique (Na_2HPO_4) avec 0.69 g de phosphate monopotassique (KH_2PO_2) dans 100 ML d'eau distillée. Ajuster le pH à 6.8.

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

Mélanger 17.5 g de chlorure de sodium et 8.8 g de citrate de sodium dans 1L d'eau.

ANNEXE 2

Préparation de produits pour Fluorochrome banding

1- Tampon citrate 0.01M

Le tampon citrate est formé de deux solutions A et B

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

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

- Pour un pH 4.6,

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

- Pour une préparation 0.05M (pour la préparation de l'enzyme R)

A : solution d'acide citrique 0.48g/ 50ml

B : solution de citrate de sodium 0.73g/ 50ml

2- Préparation de l'enzyme R

Hémicellulase 4%

Pectolyase 1%

Cellulase R10 4%

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

3- Tampon 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 puis 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 puis compléter à 200ml par de l'eau distillée

-Tampon McIlvaine pH 7 + MgSO₄

Prendre 50ml du tampon McIlvaine (pH 7) puis rajouter 61.62mg de MgSO₄.

4- Préparation de la chromomycine

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

Conserver à 4°C dans un flacon à l'abri de la lumière.

ANNEXE 3

Préparation de produits pour la FISH

- 20 x SSC

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

- 4 x SSC Tween

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

- 4 x SSC

20 x SSC 100ml
Eau ultra pure 400ml

- 2 x SSC

20 x SSC 100ml
Eau ultra pure 200ml

- 0.1 x SSC

2 x SSC 13ml
Eau ultra pure 247ml

- Formamide 20%

0.1 x SSC 160ml
Formamide 40ml

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

RNase à 10mg/ml 16 μ l
2 x SSC 1584 μ l

- Pepsine (stock à 500mg/ml)

Pepsine 500 mg
HCl 0.01 M 1ml

- Tampon de détection (préparé extemporanément)

5% BSA (Bovine Serum Albumin): 0.1g de BSA dans 2ml 4 x SSCT.
Diluer dans un petit récipient et laisser à 37°C jusqu'à dilution complète.

Annexe 4

Tableau compilant les différentes tailles de génome du genre *Astragalus* recensées dans la littérature (ces données englobent les tailles mesurées durant cette étude).

Taxon	Section	Origine	(2n)	2C (pg)	1C (pg)	1C (Mbp)	Sources
<i>A. angulosus</i> DC.	<i>Incani</i>	Liban	N/A	2.12	1.06	1037	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>A. angustifolius</i> Lam.	<i>Tragacantha</i>	Liban	16	1.4	0.7	685	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. angustifolius</i> Lam. subsp. <i>angustifolius</i>	<i>Tragacantha</i>	Liban	16	1.56	0.78	763	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. angustifolius</i> Lam. subsp. <i>biokovoensis</i> Kusan	<i>Tragacantha</i>	Croatie	16	1.45	0.73	714	Siljak-Yakovlev et al. 2010
<i>A. armatus</i> subsp. <i>numidicus</i> (Coss. et Dur.) Maire	<i>Poterion</i>	Algérie	16	2.68	1.34	1311	Présente étude
<i>A. armatus</i> subsp. <i>tragacanthoides</i> (Desf.) Maire	<i>Poterion</i>	Algérie	16	2.71	1.36	1325	Présente étude
<i>A. baalbekensis</i> Bornm.	<i>Rhacophorus</i>	Liban	N/A	4.15	2.08	2029	Abdel Samad et al. 2014

<i>A. barbatus</i> Lam.	<i>Stereothrix</i>	Liban	N/A	1.9	0.95	929	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. berytheus</i> Boiss.	<i>Platyglottis</i>	Liban	16	2.81	1.41	1374	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>A. bethlehemiticus</i> Boiss.	<i>Rhacophorus</i>	Liban	N/A	4.5	2.25	2201	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>A. cedreti</i> Boiss.	<i>Dasyphyllium</i>	Liban	N/A	4.99	2.5	2440	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. cephalotes</i> Banks & Solander	<i>Macrophyllium</i>	Liban	N/A	2.12	1.06	1037	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. coluteoides</i> Willd.	<i>Anthylloidei</i>	Liban	16	2.17	1.09	1061	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. cruciatus</i> Link.	<i>Annulares</i>	Algérie	16	1.39	0.7	680	Présente étude
<i>A. cruentiflorus</i> Boiss.	<i>Rhacophorus</i>	Liban	N/A	4.58	2.29	2240	Abdel Samad et al. 2014
<i>Astragalus dictyocarpus</i> Boiss.	<i>Incani</i>	Liban	N/A	1.71	0.86	836	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>A. drusorum</i> var. <i>maroniticus</i> Boiss. & Blanche	<i>Pterophorus</i>	Liban	16	2.15	1.08	1051	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. echinops</i> Boiss.	<i>Alopecuroidei</i>	Liban	N/A	2.38	1.19	1164	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>A. ehdenensis</i> Mout.	<i>Dissitiflori</i>	Liban	16	3.13	1.57	1531	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013

<i>A. ehrenbergii</i> Bunge	<i>Alopecuroidei</i>	Liban	16	2.16	1.08	1056	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>A. emarginatus</i> Labill.	<i>Dasyphyllium</i>	Liban	16	4.73	2.37	2313	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. epiglottis</i> L.	<i>Epiglottis</i>	Liban	16	0.92	0.46	450	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. glycyphyllos</i> L.	<i>Glycyphyllos</i>	Slovénie	16	1.5	0.75	734	Temsch et al. 2010
<i>A. gomboeformis</i> Pomel	<i>Astragalus</i>	Algérie	16	1.66	0.83	812	Données personnelles
<i>A. gombo</i> Coss. & Dur.	<i>Astragalus</i>	Algérie	16	1.56	0.78	763	Données personnelles
<i>A. gyzensis</i> Delile	<i>Annulares</i>	Algérie	48	2.46	1.23	1203	Données personnelles
<i>A. gummifer</i> Labill.	<i>Rhacophorus</i>	Liban	16	2	1	978	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. hirsutissimus</i> DC.	<i>Dasyphyllium</i>	Liban	16	3.97	1.99	1941	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>Astragalus illyricus</i> Bernh. [<i>A. monspessulanus</i> L. subsp. <i>illyricus</i> (Bernh.) Chater]	<i>Incani</i>	Bosnie Herzegovine	N/A	2.11	1.055	1030	Vallès et al. 2014
<i>A. kurnet-es saudae</i> Eig	<i>Hololeuce</i>	Liban	N/A	6.29	3.145	3076	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. lepidanthus</i> Boiss.	<i>Rhacophorus</i>	Liban	N/A	4.38	2.19	2142	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. lusitanicus</i> subsp. <i>orientalis</i> Chater & Meikle	<i>Erophaca</i>	Liban	16	1.78	0.89	870	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. macrocarpus</i> DC.	<i>Astragalus</i>	Liban	N/A	2.51	1.26	1227	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. oleaefolius</i> DC.	<i>Macrophyllium</i>	Liban	96	12.87	6.44	6293	Abdel Samad et al. 2014

<i>A. onobrychis</i> L.	<i>Onobrychoidei</i>	Bosnie Herzegovine	16	1.66	0.83	812	Pustahija et al. 2013
<i>A. pinetorum</i> Boiss.	<i>Caprini</i>	Liban	16	2.02	1.01	988	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>A. pseudotrigonus</i> Batt. et Trab.	<i>Astragalus</i>	Algérie	16	1.55	0.78	758	Présente étude
<i>A. psilodontius</i> Boiss.	<i>Rhacophorus</i>	Liban	N/A	2.83	1.415	1384	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. schizopterus</i> Boiss.	<i>Incani</i>	Liban	16	2.42	1.21	1183	Abdel Samad et al. 2014; Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>A. sofarensis</i> (J. Thiebaut) Podl.	<i>Macrophyllum</i>	Liban	16	10.46	5.23	5115	Bou Dagher-Kharrat et al. 2013
<i>A. trichopterus</i> Boiss.	<i>Caprini</i>	Liban	N/A	1.97	0.99	963	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. vesicarius</i> L. subsp. <i>carniolicus</i> (A. Kerner) Chater	<i>Dissitiflori</i>	Croatie	16	2.29	1.15	1125	Siljak-Yakovlev et al. 2010
<i>A. trifoliolatus</i> Boiss.	<i>Onobrychoidei</i>	Liban	N/A	1.68	0.84	822	Abdel Samad et al. 2014
<i>A. zachlensis</i> Bunge	<i>Rhacophorus</i>	Liban	28	4.5	2.25	2201	Abdel Samad et al. 2014

1 pg = 978 Mbp selon Doležel et al. (2003).

First karyotype analysis, physical rDNA mapping, and genome size assessment in 4 North African *Astragalus* taxa (Fabaceae)

Karim BAZIZ^{1,2,*}, Meriem BENAMARA-BELLAGHA^{1,3}, Fatima PUSTAHİJA⁴,
Spencer C. BROWN⁵, Sonja SILJAK-YAKOVLEV⁶, Nadra KHALFALLAH¹

¹Laboratory of Genetics, Biochemistry, and Plant Biotechnologies, University of Constantine 1, Constantine, Algeria

²Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Hadj-Lakhdar, Batna, Algeria

³Department of Food Biotechnologies, Institute of Nutrition, Food, and Agro-Technologies (INATAA), Constantine, Algeria

⁴Faculty of Forestry, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

⁵Institute of Plant Sciences (ISV), National Center for Scientific Research (CNRS UPR 2355) and Imagif Light Microscopy Facility, Gif-sur-Yvette, France

⁶Laboratory of Ecology, Systematics, and Evolution, University Paris-Sud, National Center for Scientific Research (CNRS UMR 8079, CNRS-UPS-AgroParisTech), Orsay, France

Received: 15.05.2014 • Accepted: 27.10.2014 • Published Online: 17.11.2014 • Printed: 28.11.2014

Abstract: Four taxa of Algerian *Astragalus* L. were studied for their chromosome number, karyotype features, and genome size. Fluorochrome banding was done for detection of GC-rich DNA regions, fluorescence in situ hybridization (FISH) for physical mapping of 35S and 5S rRNA genes, and flow cytometry for nuclear DNA content. All the taxa present the same chromosome number ($2n = 2x = 16$) and single 35S and 5S rDNA loci, but their distributions on chromosomes are different. The GC heterochromatin pattern was different among studied taxa and an unusually high number of chromomycin-positive bands were observed in *A. pseudotrigonus* Batt. & Trab. The genome size differed between species, ranging from $2C = 1.39$ pg in *A. cruciatus* Link. to $2C = 2.71$ pg in *A. armatus* subsp. *tragacanthoides* (Desf.) Maire. No difference in nuclear DNA amount was detected between the 2 subspecies of *A. armatus*. Although *Astragalus* is a large genus comprising some 3000 species, such morphometric and molecular cytogenetic karyotype analyses, with genome sizes, are particularly scarce therein. Therefore, published genome sizes have also been compiled into one table.

Key words: *Astragalus*, DNA content, fluorescence in situ hybridization, fluorochrome banding, rDNA mapping

1. Introduction

The genus *Astragalus* L. (Fabaceae) is one of the largest genera of vascular plants in the world, comprising about 3000 species (Scherson et al., 2008) grouped in 150 sections (Podlech, 1986). The genus is especially abundant in both the Old World (around 2400 species) and the New World (500 species) (Zarre and Azani, 2013). The geographic centers of origin and diversification of the genus *Astragalus* are the steppes and mountains from southwestern to south-central Asia and the Himalayan Plateau (Wojciechowski, 2005). In Algeria, the genus is represented by 40–45 species (Quézel and Santa, 1962), belonging to 18 sections and distributed in different phytogeographical regions.

Earlier karyotaxonomic investigations of *Astragalus* species have been restricted to chromosome number determination. Senn (1938) established that the most common basic chromosome number of Old World

species is $x = 8$. Later studies confirmed Senn's report and demonstrated that $x = 11, 12, 13, 14,$ and 15 were common for the New World species (Kazempour Osaloo et al., 2005 and references therein). Many cytological studies of *Astragalus* have since been performed throughout the world (Manandhar and Sakya, 2004; Badr and Sharawy, 2007; Martin et al., 2008; Kazem et al., 2010; Abdel Samad et al., 2014).

Despite the botanical and economic importance of the genus, investigations employing molecular cytogenetic techniques are scarce. There is one paper on chromosome fluorescence in situ hybridization (FISH) mapping (Kim et al., 2006) and reports on *Astragalus* genome size concerning Balkan and Lebanese floras (Siljak-Yakovlev et al., 2010; Temsch et al., 2010; Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014; Vallès et al., 2014).

In order to determine karyotype features and genome size, we investigated 3 endemic taxa from North Africa:

* Correspondence: bazizkarim@gmail.com

A. armatus subsp. *tragacanthoides* (Desf.) Maire and *A. armatus* subsp. *numidicus* (Coss. & Dur.) Maire from section *Poterion* Bunge, and *A. pseudotrigonus* Batt. & Trab from section *Astragalus* Boiss. One widespread species, *A. cruciatus* Link. from section *Annulares* DC., was also sampled from different geographic localities of Algeria (Agerer-Kirchhof, 1976; Tietz, 1988; Podlech, 1994).

In order to increase the knowledge of the 4 studied North African *Astragalus* taxa and their relationships, the main objectives of our study were a) to construct the karyotypes of these taxa, b) to assess the number and distribution of their GC-rich DNA regions, c) to determine their 5S and 35S rRNA gene patterns, and d) to assess their nuclear DNA contents.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Eight populations belonging to 4 taxa of the genus *Astragalus* were included in this study. Plants were collected from different localities in the semiarid and Saharan bioclimatic zone of Algeria as shown in Table 1 and Figure 1. The vouchers were deposited at the herbarium of the Laboratory of Genetics, Biochemistry, and Plant Biotechnologies, Faculty of Natural Sciences, University of Constantine 1, Constantine, Algeria. Taxonomic identification was assessed following Quézel and Santa (1962).

2.2. Karyotype analysis

The seeds were germinated on moist filter paper in petri dishes at room temperature (18–24 °C) for 4 days for all species. Root tips of about 0.5–1 cm in length were excised between 0800 and 1100 hours, pretreated with 8-hydroxyquinoline (0.002 M) for 3 h at 16 °C, and fixed in freshly prepared absolute ethanol-acetic acid (v/v, 3:1) solution. Fixed root tips were kept at 4 °C in the first fixative for a few days or for several months in 70% ethanol, until use.

For morphometrical analysis, meristems were hydrolyzed in 1 N HCl at 60 °C for 8 min, stained, and squashed in a drop of aceto-orcein. After freezing at –80 °C for 24 h, cover slips were removed; preparations were air-dried for at least 24 h and then mounted in DPX. Chromosome counts were made on well-spread metaphase plates from a minimum of 20 seeds per population. Karyotype was determined by examining 5 metaphase plates obtained from different individuals. Determination of centromere position and chromosome type was done according to Levan et al. (1964). The mean total length (TL) of chromosomes, the arms ratio ($r = \text{long arm} / \text{short arm}$), the centromeric index [$Ci = 100 \times \text{short arm} / (\text{long} + \text{short arm})$], the total length of diploid chromosome complement (ΣTL), asymmetry index [$Ai\% = (\Sigma \text{long arms} / \Sigma \text{total chromosome lengths}) \times 100$, according to Arano and Saito (1980)], and symmetry class according to Stebbins (1971) were calculated.

2.3. Chromosome preparation for FISH and fluorochrome banding

A slightly modified air drying technique (Geber and Schweizer, 1987) was used for chromosome preparation. Root tips were rinsed in 0.01 M citrate buffer (pH 4.7) for 20 min and then softened in an enzymatic mixture containing 3% cellulase R10 (Yakult Honsha Corporation, Tokyo, Japan), 1% pectolyase Y23 (Seishin Corporation, Tokyo, Japan) and 4% hemicellulase (Sigma Chemical, Saint-Quentin Fallavier, France). The digestion was done in a moist chamber at 37 °C for 10–20 min. The obtained protoplasts were dropped on a clean slide and kept for different staining techniques.

2.4. Fluorochrome banding

For detection of GC-rich DNA regions, chromomycin A₃ (CMA; Sigma, Germany) was used according to Schweizer (1976) with minor modification as described by Siljak-Yakovlev et al. (2002). The slides were incubated in McIlvaine buffer (pH 7, with 5 mM MgSO₄) for 15 min

Table 1. Geographical origins and bioclimatic characteristics of studied *Astragalus* populations.

Taxon	Section	Locality	Latitude and longitude	Altitude (m)	Rainfall (mm)	Bioclimatic zone
<i>A. armatus</i> subsp. <i>tragacanthoides</i>	<i>Poterion</i> Bunge	El Kantara	35°32'57"N, 6°04'74"E	1150	300–600	Semiarid
		Tamarin	35°51'54"N, 6°29'38"E	800	300–600	Semiarid
		Oum Tiour	35°18'10"N, 5°48'49"E	730	300–600	Semiarid
<i>A. armatus</i> subsp. <i>numidicus</i>	<i>Poterion</i> Bunge	Oued Hamla	35°19'22"N, 5°50'22"E	838	300–600	Semiarid
		Sbakh	34°13'56"N, 5°40'15"E	85	300–600	Semiarid
<i>A. cruciatus</i>	<i>Annulares</i> DC.	El Robah	33°17'15"N, 6°55'01"E	90	100	Saharan
		El Oued	33°41'55"N, 6°41'08"E	30	100	Saharan
<i>A. pseudotrigonus</i>	<i>Astragalus</i> Boiss.	Tamanrasset	23°41'20"N, 5°12'09"E	980	100	Saharan

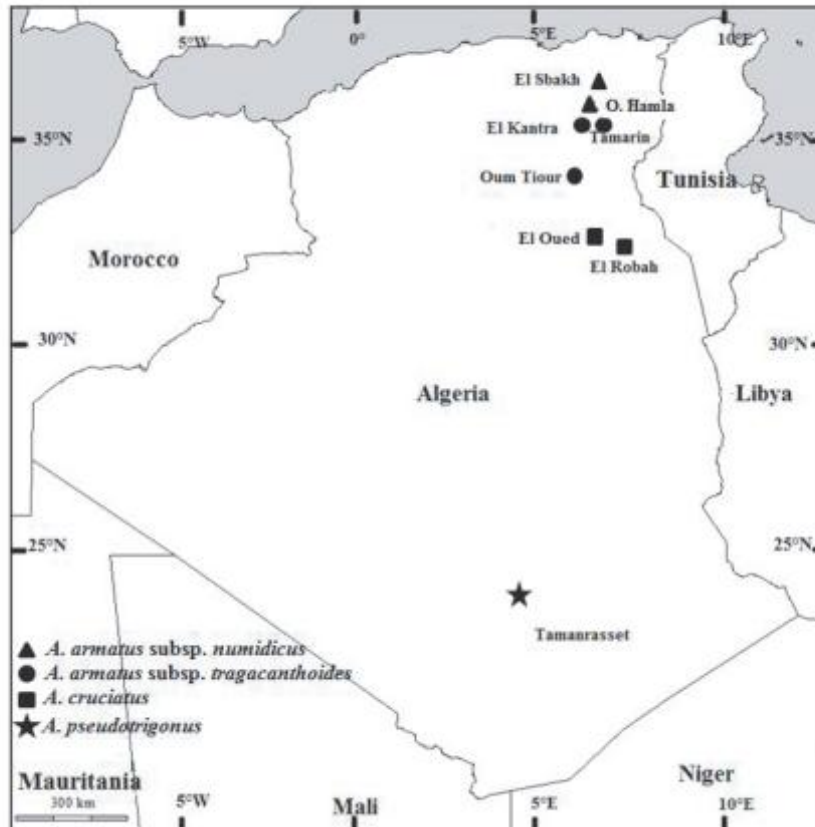


Figure 1. Geographical origin of the 8 Algerian populations studied corresponding to 4 *Astragalus* species.

and stained with CMA₃ (0.2 mg/mL in the same buffer) for 1 h in the dark. The slides were then rinsed in the same buffer (without MgSO₄), counterstained with methyl green (0.5% in McIlvaine buffer, pH 5.5) for 7 min, and finally rinsed in McIlvaine buffer (pH 5.5). The slides were mounted in Citifluor AF1 anti-fade agent (Agar Scientific, Stansted, UK).

2.5. Fluorescence in situ hybridization

A double FISH experiment was carried out with 2 DNA probes according to the protocol of Heslop-Harrison et al. (1991) with slight modifications. The probe 35S rDNA is a clone of a 4-kb *Eco*RI fragment, including 35S rDNA from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. labeled by nick translation with direct Cy3 (Amersham, Courtaboeuf, France). The pTa 794 probe is a 410-bp *Bam*HI fragment of the 5S rDNA from *Triticum vulgare* Vill. labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Meylan, France) after PCR amplification using universal M13 primers and revealed by antidigoxigenin-fluorescein (Roche Diagnostics). Slides were counterstained and mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories, Peterborough, UK) with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Chromosome plates were observed using an

epifluorescence Zeiss Axiophot microscope with different combinations of excitation and emission filter sets (01, 07, 15, and triple 25). The acquisition and treatment of images were performed using a highly sensitive CCD camera (RETIGA 2000R, Princeton Instruments, Evry, France) and an image analyzer (MetaVue, Evry, France).

2.6. Nuclear DNA content assessment by flow cytometry

The total nuclear DNA was assessed by flow cytometry according to Marie and Brown (1993). *Petunia hybrida* Vilm. 'PxC6' (2C = 2.85 pg) was used as internal standard for all investigated *Astragalus* taxa. At least 5 individuals per population were measured. The leaves of the sample and the internal standard were chopped together using a razor blade in a plastic petri dish in 600 µL of Gif nuclear buffer, namely an autoclaved stock of 45 mM MgCl₂, 30 mM sodium citrate, 60 mM 4-morpholinepropane sulfonate (pH 7), 1% polyvinyl pyrrolidone (~10,000 Mr, P6755, Sigma Aldrich, France), 0.1% (w/v) Triton X-100, and 10 mM sodium metabisulfite supplemented with RNase (2.5 U/mL, Roche). The suspension was passed through a 50-µm mesh nylon filter. The nuclei were stained with 50 µg/mL propidium iodide, a DNA intercalating dye, and analyzed after 5 min at 4 °C. DNA content of 5000–

10,000 stained nuclei was determined for each sample using a CyFlow cytometer with a 532-nm, 30-mW laser (CyFlow SL3, Partec, Münster, Germany).

The 2C DNA value was calculated using the linear relationship between the fluorescent signals from stained nuclei of *Astragalus* specimens and the internal standard.

3. Results

3.1. Karyotype analysis

In all studied taxa, mitotic metaphases showed both the same diploid ($2n = 2x = 16$) and basic ($x = 8$) chromosome number. Karyomorphometric data concerning the karyotypes are presented in Table 2.

The karyotype of *Astragalus armatus* subsp. *tragacanthoides* presents 7 metacentric chromosome pairs and 1 submetacentric pair (Table 2; Figures 2 and 3). Chromosome length ranged from $3.80 \pm 0.50 \mu\text{m}$ to $5.47 \pm 0.43 \mu\text{m}$, with the longest total chromosome length ($73.22 \pm 1.59 \mu\text{m}$) among the studied taxa. The karyotype symmetry was type 1A according to Stebbins (1971), and the asymmetry index (58.48%) according to Arano and Saito (1980) was the lowest among these taxa. A secondary constriction was clearly visible at the intercalary position of the long arm of chromosome pair 1.

In *A. armatus* subsp. *numidicus*, the karyotype also possesses 7 metacentric chromosome pairs and 1 submetacentric chromosome pair (Table 2; Figures 2 and 3). Chromosome length ranged from $3.87 \pm 0.10 \mu\text{m}$ to $5.92 \pm 0.25 \mu\text{m}$, and total chromosome length was $72.44 \pm 2.80 \mu\text{m}$. Karyotype symmetry was type 1A and the asymmetry index 59.05%. An intercalary secondary constriction was observed on the long arm of chromosome pair 1.

In *A. cruciatus*, the karyotype showed 2 metacentric, 4 submetacentric, and 2 subtelocentric chromosome pairs (Table 2; Figures 2 and 3). Chromosome length ranged from $3.45 \pm 0.95 \mu\text{m}$ to $5.51 \pm 0.55 \mu\text{m}$. The total chromosome length was $72.64 \pm 2.09 \mu\text{m}$. The karyotype symmetry was type 2A and the asymmetry index 67.54%. A secondary constriction was observed adjacent to the centromere on the long arm of chromosome pair 4.

In *A. pseudotrigonus*, the karyotype presented 1 metacentric satellite pair and 3 submetacentric and 4 subtelocentric chromosome pairs (Table 2; Figures 2 and 3). Chromosome sizes ranged from $2.30 \pm 0.04 \mu\text{m}$ to $6.98 \pm 0.11 \mu\text{m}$. Total chromosome length was the smallest among studied taxa ($70.86 \pm 3.60 \mu\text{m}$). The karyotype symmetry type and the asymmetry index were respectively 2B and 76.43%.

3.2. Physical mapping of heterochromatin and rRNA genes

The number and distribution of GC-rich heterochromatic bands (CMA⁺) and 5S and 35S rDNA loci are given in Table 3 and Figure 3. The patterns obtained by CMA staining

showed the strongest GC-rich heterochromatic bands on both sides of the secondary constriction on chromosome pair 1 in *A. armatus* subsp. *tragacanthoides* and *A. armatus* subsp. *numidicus* and on pair 4 in *A. cruciatus* (Figure 3). One supplementary weak CMA⁺ signal was localized on pair 8 of *A. armatus* subsp. *tragacanthoides* and pair 6 of *A. armatus* subsp. *numidicus* adjacent to the centromere on short arms. In *A. pseudotrigonus*, several bright CMA⁺ bands were detected: 1 in telomeric region of chromosome pair 1; 8 in paracentromeric regions of chromosome pairs 1, 3, 4, 5, 6, and 7; 10 in intercalary positions on chromosome pairs 1, 2, 3, 4, 5, and 6; and, finally, 2 on the short arm and satellite of the smallest chromosome pair (Figure 3). Numerous thin CMA⁺ bands were also distributed across the chromosome set in different positions.

In *A. armatus* subsp. *tragacanthoides* and *A. armatus* subsp. *numidicus*, FISH revealed 2 strong 35S rDNA signals situated at each side of the secondary constriction in chromosome pair 1 colocalized with CMA⁺ bands, and 2 thin 5S rDNA signals localized on chromosome pair 6 in the paracentromeric region of short arm (Figure 3). In *A. armatus* subsp. *numidicus*, the 5S rDNA signals were colocalized with CMA⁺ bands (Figure 3). In *A. cruciatus*, 35S and 5S rDNA signals were situated on chromosome pair 4. The 35S rDNA signals were situated at each side of the secondary constriction and colocalized with CMA⁺ bands, while the 5S rDNA signals were situated in the telomeric region of the short arm (Figure 3). In *A. pseudotrigonus*, 2 35S rDNA signals were colocalized with CMA⁺ bands on the satellites and short arm of the smallest chromosome pair. The weak 5S rDNA signals were located between 2 strong CMA⁺ bands in the subtelomeric region of the long arm of chromosome pair 1 (Figure 3).

3.3. Genome size

Nuclear DNA content ranged from $2C = 1.39 \text{ pg}$ in *A. cruciatus* to 2.71 pg in *A. armatus* subsp. *tragacanthoides*, which presented a 1.95-fold genome increment at the same ploidy level. No significant differences were found between the 2 subspecies of *A. armatus*. *Astragalus pseudotrigonus* possessed an intermediary genome size of 1.55 pg (Table 3).

4. Discussion

4.1. Chromosome number and karyotype features

The diploid chromosome number of $2n = 16$ found in these taxa agrees with data previously reported for numerous *Astragalus* taxa (Badr and Sharawy, 2007; Kazem et al., 2010; Abdel Samad et al., 2014).

Chromosomes were medium-sized and their length ranged from 2.30 to $6.98 \mu\text{m}$, in contrast with the majority of *Astragalus* species, which have smaller chromosomes ($<4 \mu\text{m}$) (Badr and Sharawy, 2007; Martin et al., 2008; Kazem et al., 2010). This is certainly one reason for

Table 2. Morphometric data for the chromosome sets of the 4 *Astragalus* taxa.

Taxon	Chp	L (µm) (±SD)	S (µm) (±SD)	TL (µm) (±SD)	r	Ci	Ct	ΣTL (±SD)	Ai%	SyC
<i>A. armatus</i> subsp. <i>tragacanthoides</i>	1	3.29 (0.20)	2.18 (0.30)	5.47 (0.43)	1.51	39.85	m*	73.22 (1.59)	58.48	1A
	2	2.90 (0.40)	2.10 (0.10)	5.00 (0.46)	1.38	42.00	m			
	3	2.75 (0.20)	1.90 (0.30)	4.65 (0.46)	1.44	40.86	m			
	4	2.58 (0.10)	2.04 (0.40)	4.62 (0.60)	1.26	44.16	m			
	5	2.64 (0.10)	1.90 (0.30)	4.54 (0.31)	1.38	41.85	m			
	6	2.29 (0.20)	2.14 (0.20)	4.43 (0.34)	1.07	48.31	m			
	7	2.45 (0.30)	1.65 (0.10)	4.10 (0.27)	1.48	40.24	m			
	8	2.51 (0.40)	1.29 (0.30)	3.80 (0.50)	1.94	33.95	sm			
<i>A. armatus</i> subsp. <i>numidicus</i>	1	3.43 (0.30)	2.49 (0.20)	5.92 (0.25)	1.37	42.06	m*	72.44 (2.80)	59.05	1A
	2	3.09 (0.20)	1.64 (0.10)	4.73 (0.35)	1.88	34.67	sm			
	3	2.62 (0.30)	1.96 (0.3)	4.58 (0.30)	1.33	42.79	m			
	4	2.76 (0.20)	1.73 (0.20)	4.49 (0.29)	1.59	38.53	m			
	5	2.50 (0.20)	1.91 (0.20)	4.41 (0.20)	1.31	43.31	m			
	6	2.49 (0.20)	1.80 (0.10)	4.29 (0.21)	1.38	41.95	m			
	7	2.43 (0.30)	1.50 (0.20)	3.93 (0.15)	1.62	38.16	m			
	8	2.07 (0.10)	1.80 (0.00)	3.87 (0.10)	1.15	46.51	m			
<i>A. cruciatus</i>	1	3.60 (0.30)	1.91 (0.10)	5.51 (0.55)	1.88	34.66	sm	72.64 (2.09)	67.54	2A
	2	3.65 (0.60)	1.46 (0.30)	5.11 (0.10)	2.50	28.57	sm			
	3	3.40 (0.40)	1.46 (0.20)	4.86 (0.70)	2.32	30.04	sm			
	4	2.45 (0.30)	2.18 (0.40)	4.63 (0.15)	1.12	47.08	m*			
	5	3.52 (0.20)	0.98 (0.30)	4.50 (0.10)	3.59	21.77	st			
	6	2.90 (0.30)	1.43 (0.40)	4.33 (0.10)	2.02	33.02	sm			
	7	2.29 (0.40)	1.64 (0.30)	3.93 (0.61)	1.39	41.73	m			
	8	2.72 (0.30)	0.73 (0.10)	3.45 (0.95)	3.72	21.15	st			
<i>A. pseudotrigonus</i>	1	5.81 (0.05)	1.17 (0.02)	6.98 (0.11)	4.96	16.76	st	70.86 (3.60)	76.43	2B
	2	5.00 (0.03)	0.99 (0.04)	5.99 (0.06)	5.05	16.53	st			
	3	3.51 (0.04)	1.23 (0.03)	4.74 (0.10)	2.85	25.95	sm			
	4	3.19 (0.04)	0.94 (0.02)	4.13 (0.02)	3.39	22.76	st			
	5	2.76 (0.10)	1.12 (0.04)	3.88 (0.12)	2.46	28.86	sm			
	6	2.90 (0.06)	0.95 (0.03)	3.85 (0.07)	3.05	24.67	st			
	7	2.61 (0.05)	0.95 (0.03)	3.56 (0.07)	2.75	26.68	sm			
	8	1.30 (0.04)	1.00 (0.02)	2.30 (0.04)	1.30	43.48	m-sat			

Chp- chromosome pair, L- long arm, S- short arm, TL- total chromosome length, r- arm ratio, Ci- centromeric index, and Ct- chromosome type according to Levan et al. (1964); ΣTL- total length of diploid chromosome complement and Ai%- index of karyotype asymmetry according to Arano and Saito (1980); SyC- symmetry class according to Stebbins (1971); sat- satellite; *- presence of secondary constriction; SD- standard deviation.

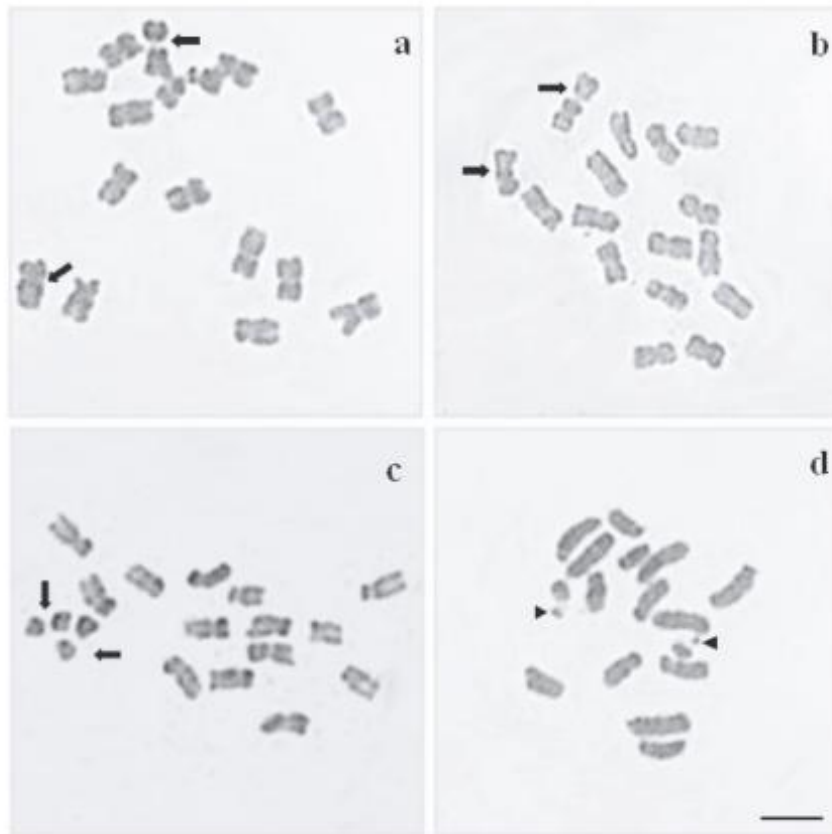


Figure 2. Metaphase plates of 4 *Astragalus* taxa: (a) *Astragalus armatus* subsp. *tragacanthoides*, (b) *A. armatus* subsp. *numidicus*, (c) *A. cruciatus*, (d) *A. pseudotrigonus*. Arrows indicate position of intercalary secondary constrictions. Arrowheads indicate satellites in d. Scale bar = 4 μ m.

the paucity of karyotype descriptions for *Astragalus* species. In this study satellites have been observed in *A. pseudotrigonus*. It is possible that more satellites exist, but they are not always detectable, depending on the degree of chromatin condensation. Previous reports indicate the presence of satellites in the species belonging to other sections. Namely, in *A. stella* L. of section *Sesamei* DC., Badr and Sharawy (2007) found a single chromosome pair with satellites. Martin et al. (2008) reported 2 satellite chromosome pairs in *A. nezaketiae* A. Duran & Aytac of section *Incani* DC., while Manandhar and Sakya (2004) observed 3 chromosome pairs bearing satellites in *A. chlorostachys* Lindl. of section *Chlorostachys* Bunge.

Secondary constrictions were detected in *A. armatus* subsp. *numidicus*, *A. armatus* subsp. *tragacanthoides*, and *A. cruciatus*. Otherwise, only Ma et al. (1984) have reported the existence of intercalary secondary constrictions in 2 species from section *Cenantrum* Bunge: *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge and *A. mongholicus* Bunge.

The values of asymmetry indices (Arano and Saito, 1980) and Stebbins' classes (1971) give indications about the chromosome evolution. *Astragalus armatus* subsp.

tragacanthoides and *A. armatus* subsp. *numidicus* are characterized by very symmetrical karyotypes with a predominance of metacentric chromosomes, which seems to be a common trait in the genus (Manandhar and Sakya, 2004; Badr and Sharawy, 2007; Martin et al., 2008). On the other hand, *A. cruciatus* and especially *A. pseudotrigonus* possess asymmetrical karyotypes with predominance of submetacentric and subtelocentric chromosomes. Stebbins (1971) indicated that a group of angiosperms with a more asymmetrical karyotype could be derived from a rather symmetrical group. Following this idea, *A. cruciatus* and *A. pseudotrigonus* could be considered as more derived species than *A. armatus* subsp. *tragacanthoides* and *A. armatus* subsp. *numidicus*.

4.2. rDNA and heterochromatin patterns

To our knowledge, this is the first report describing GC-rich DNA regions by fluorochrome banding in this genus. The heterochromatin patterns of the studied taxa showed variation in number, intensity, and position of CMA bands along the chromosomes. *Astragalus pseudotrigonus* presented an unusually high number of CMA bands with a distribution across all chromosomes

Table 3. GC-rich DNA regions, rDNA sites, and DNA content in 4 *Astragalus* taxa.

Taxa	CMA ⁺ bands	35S rDNA locus	5S rDNA locus	2C DNA in pg (±SD)
<i>A. armatus</i> subsp. <i>tragacanthoides</i>	2 p, 2 SC	1 SC	1 p	2.71 (0.06)
<i>A. armatus</i> subsp. <i>numidicus</i>	2 p, 2 SC	1 SC	1 p	2.68 (0.06)
<i>A. cruciatus</i>	2 SC	1 SC	1 t	1.39 (0.02)
<i>A. pseudotrigonus</i>	16 p, 20 i, 4 t, 2sat	1sat+t	1 st	1.55 (0.01)

sat- satellite; sat+t- both sides of secondary constriction; SC- secondary constriction; t- telomeric; st- subtelomeric; i- interstitial; p- para/pericentromeric; SD- standard deviation.

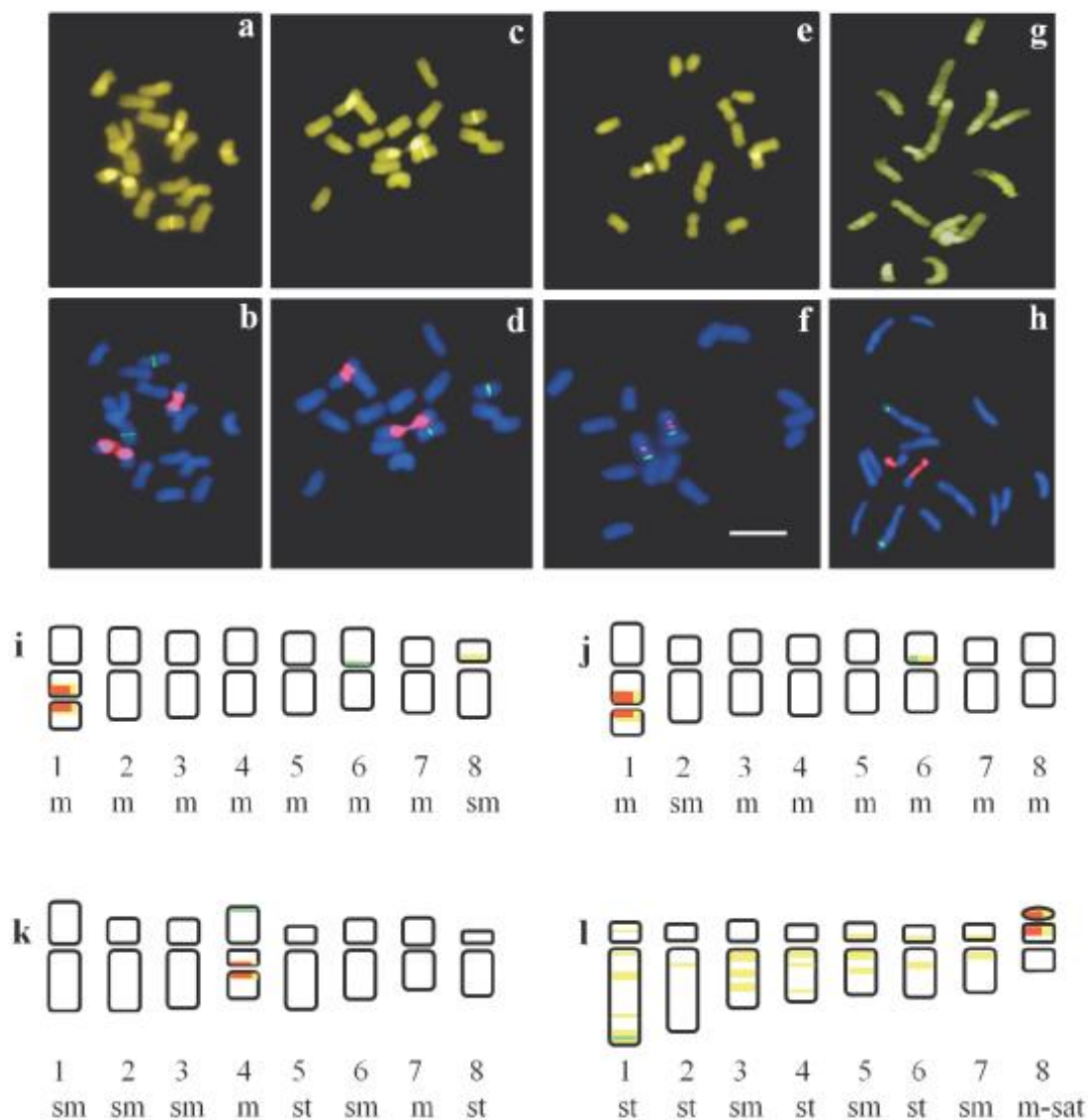


Figure 3. Karyotypes and idiograms of 4 *Astragalus* taxa. Chromomycin staining (yellow), in situ hybridization with 5S (green) and 35S (red) rDNA probes on DAPI (blue), and idiograms: *Astragalus armatus* subsp. *tragacanthoides* (a, b, i), *A. armatus* subsp. *numidicus* (c, d, j), *A. cruciatus* (e, f, k), and *A. pseudotrigonus* (g, h, l). Scale bar = 4 μ m.

Table 4. Compilation of genome size values for the *Astragalus* species studied here and those retrieved from the literature.

Taxon	Section	Origin	(2n)	2C (pg)	1C (pg)	1C (Mbp)	Sources
<i>A. angulosus</i> DC.	<i>Incani</i>	Lebanon	N/A	2.12	1.06	1037	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. angustifolius</i> Lam.	<i>Tragacantha</i>	Lebanon	16	1.4	0.7	685	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. angustifolius</i> Lam. subsp. <i>angustifolius</i>	<i>Tragacantha</i>	Lebanon	16	1.56	0.78	763	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. angustifolius</i> Lam. subsp. <i>biokovoensis</i> Kusan	<i>Tragacantha</i>	Croatia	16	1.45	0.73	714	Siljak-Yakovlev et al., 2010
<i>A. armatus</i> subsp. <i>numidicus</i> (Coss. & Dur.) Maire	<i>Poterion</i>	Algeria	16	2.68	1.34	1311	Present study
<i>A. armatus</i> subsp. <i>tragacanthoides</i> (Desf.)Maire	<i>Poterion</i>	Algeria	16	2.71	1.36	1325	Present study
<i>A. baalbekensis</i> Bornm.	<i>Rhacophorus</i>	Lebanon	N/A	4.15	2.08	2029	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. barbatus</i> Lam.	<i>Stereothrix</i>	Lebanon	N/A	1.9	0.95	929	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. berytheus</i> Boiss.	<i>Platyglottis</i>	Lebanon	16	2.81	1.41	1374	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. bethlehemiticus</i> Boiss.	<i>Rhacophorus</i>	Lebanon	N/A	4.5	2.25	2201	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. cedreti</i> Boiss.	<i>Dasyphyllium</i>	Lebanon	N/A	4.99	2.5	2440	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. cephalotes</i> Banks & Solander	<i>Macrophyllium</i>	Lebanon	N/A	2.12	1.06	1037	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. coluteoides</i> Willd.	<i>Anthylloidei</i>	Lebanon	16	2.17	1.09	1061	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. cruciatus</i> Link.	<i>Annulares</i>	Algeria	16	1.39	0.7	680	Present study
<i>A. cruentiflorus</i> Boiss.	<i>Rhacophorus</i>	Lebanon	N/A	4.58	2.29	2240	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. dictyocarpus</i> Boiss.	<i>Incani</i>	Lebanon	N/A	1.71	0.86	836	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. drusorum</i> var. <i>maroniticus</i> Boiss. & Blanche	<i>Pterophorus</i>	Lebanon	16	2.15	1.08	1051	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. echinops</i> Boiss.	<i>Alopecuroidei</i>	Lebanon	N/A	2.38	1.19	1164	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. ehdenensis</i> Mout.	<i>Dissitiflori</i>	Lebanon	16	3.13	1.57	1531	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. ehrenbergii</i> Bunge	<i>Alopecuroidei</i>	Lebanon	16	2.16	1.08	1056	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. emarginatus</i> Labill.	<i>Dasyphyllium</i>	Lebanon	16	4.73	2.37	2313	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. epiglottis</i> L.	<i>Epiglottis</i>	Lebanon	16	0.92	0.46	450	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. glycyphyllos</i> L.	<i>Glycyphyllos</i>	Slovenia	16	1.5	0.75	734	Temsch et al., 2010
<i>A. gomboeformis</i> Pomel	<i>Astragalus</i>	Algeria	16	1.66	0.83	812	Our unpublished data
<i>A. gombo</i> Coss. & Dur.	<i>Astragalus</i>	Algeria	16	1.56	0.78	763	Our unpublished data
<i>A. gyzensis</i> Delile	<i>Annulares</i>	Algeria	48	2.46	1.23	1203	Our unpublished data
<i>A. gummifer</i> Labill.	<i>Rhacophorus</i>	Lebanon	16	2	1	978	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. hirsutissimus</i> DC.	<i>Dasyphyllium</i>	Lebanon	16	3.97	1.99	1941	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. illyricus</i> Bernh. [<i>A. monspessulanus</i> L. subsp. <i>illyricus</i> (Bernh.) Chater]	<i>Incani</i>	Bosnia and Herzegovina	N/A	2.11	1.055	1030	Vallès et al., 2014
<i>A. kurnet-es saudae</i> Eig	<i>Hololeuce</i>	Lebanon	N/A	6.29	3.145	3076	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. lepidanthus</i> Boiss.	<i>Rhacophorus</i>	Lebanon	N/A	4.38	2.19	2142	Abdel Samad et al., 2014

Table 4. (Continued).

<i>A. lusitanicus</i> subsp. <i>orientalis</i> Chater & Meikle	<i>Erophaca</i>	Lebanon	16	1.78	0.89	870	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. macrocarpus</i> DC.	<i>Astragalus</i>	Lebanon	N/A	2.51	1.26	1227	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. oleaeifolius</i> DC.	<i>Macrophyllium</i>	Lebanon	96	12.87	6.44	6293	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. onobrychis</i> L.	<i>Onobrychoidei</i>	Bosnia and Herzegovina	16	1.66	0.83	812	Pustahija et al., 2013
<i>A. pinetorum</i> Boiss.	<i>Caprini</i>	Lebanon	16	2.02	1.01	988	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. pseudotrigonus</i> Batt. & Trab.	<i>Astragalus</i>	Algeria	16	1.55	0.78	758	Present study
<i>A. psilodontius</i> Boiss.	<i>Rhacophorus</i>	Lebanon	N/A	2.83	1.415	1384	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. schizopterus</i> Boiss.	<i>Incani</i>	Lebanon	16	2.42	1.21	1183	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014
<i>A. sofarensis</i> (J. Thiebaut) Podl.	<i>Macrophyllium</i>	Lebanon	16	10.46	5.23	5115	Bou Dagher-Kharrat et al., 2013
<i>A. trichopterus</i> Boiss.	<i>Caprini</i>	Lebanon	N/A	1.97	0.99	963	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. vesicarius</i> L. subsp. <i>carniolicus</i> (A.Kerner) Chater	<i>Dissitiflori</i>	Croatia	16	2.29	1.15	1125	Siljak-Yakovlev et al., 2010
<i>A. trifoliolatus</i> Boiss.	<i>Onobrychoidei</i>	Lebanon	N/A	1.68	0.84	822	Abdel Samad et al., 2014
<i>A. zachlensis</i> Bunge	<i>Rhacophorus</i>	Lebanon	28	4.5	2.25	2201	Abdel Samad et al., 2014

1 pg = 978 Mbp according to Doležel et al. (2003).

at paracentromeric, intercalary, subtelomeric, and satellite positions, while the 3 remaining taxa possessed only 2 or 4 CMA bands (mainly colocalized with rDNA). Several authors pointed out the existence of relationships between heterochromatin (number of bands) and environmental parameters such as type of habitat, altitude, and longitude (Vosa and Stergianou, 1990; Bogunic et al., 2007). Such numerous CMA bands in *A. pseudotrigonus* could reflect an adaptation to high mountain environments under dry conditions. These variations can be interpreted as a response to selection pressures in ecological conditions where growing period is short, as shown by Vosa and Stergianou (1990). Heterochromatin variations could also be attributed to other mechanisms like tandem duplications (Greilhuber and Speta, 1976) or transposition events (Schubert and Wobus, 1985).

All these species present 2 signals (1 locus) for each of the 35S and 5S FISH probes. All 35S rDNA signals corresponded to bright and large CMA⁺ bands. This seems to be a general feature, observed in numerous genera such as *Cedrus* Mill., *Picea* Mill., *Solanum* L., and *Hydrangea* L. (Bou Dagher-Kharrat et al., 2001; Siljak-Yakovlev et al., 2002; Srebniak et al., 2002; Mortreau et al., 2010) where GC-rich bands are linked to nucleolar organizing regions, where 35S rDNA is located (Siljak-Yakovlev et al., 2002).

The 5S rDNA sites were finer and more varied, distributed in paracentromeric, subtelomeric, or telomeric chromosome regions, either on the same chromosome as

that bearing the 35S locus (*A. cruciatus*) or on separate chromosomes as for the other 3 taxa. In *A. armatus* subsp. *numidicus* and *A. pseudotrigonus*, 5S rDNA loci were adjacent to GC-rich regions. This type of colocalization has also been reported for some other genera: *Lilium* L. (Muratović et al., 2010) and *Coffea* L. (Hamon et al., 2009). The intensity of 5S signals was weaker in *A. cruciatus* and *A. pseudotrigonus* than in the 2 subspecies of *A. armatus*, suggesting differences in gene copy numbers (Maluszynska and Heslop-Harrison, 1991).

4.3. Nuclear DNA amount variation

The 2C DNA values found in the 4 studied taxa vary from 1.39 pg to 2.71 pg. According to the classification of Leitch et al. (1998), our investigated taxa have "very small" 1C values (<1.4 pg).

To date, less than 2% of all *Astragalus* species have been assessed for DNA amount (Siljak-Yakovlev et al., 2010; Temsch et al., 2010; Bou Dagher-Kharrat et al., 2013; Pustahija et al., 2013; Abdel Samad et al., 2014; Vallès et al., 2014), including the current 4 studied taxa plus 3 other taxa (unpublished data). Table 4 compiles all data and demonstrates that 2C values ranged from 0.92 pg for diploid *A. epiglottis* L. of section *Epiglottis* Bunge to 13.25 pg for highly polyploid (12x) *A. oleaeifolius* DC. of section *Macrophyllium* Boiss. (Abdel Samad et al., 2014).

Comparison of values indicates variability of DNA amount within the same section, independently of geographical origin. For example, *A. pseudotrigonus*,

which belongs to the same section as *A. macrocarpus* DC., has a smaller genome, but there are no data about ploidy level for this species. This value is also very close to *A. angustifolius* Lam. of section *Tragacantha* Bunge (2C=1.55 pg).

Variation of 2C DNA in a genus could result from 2 factors: genomic increase, caused by retrotransposition, and genomic decrease, induced by recombination and deletion (Piegu et al., 2006). Other mechanisms appear to have a small impact on genome size differences among closely related species. These include variation in intron size (Deutsch and Long, 1999), expansion of tandemly repeated DNA sequences (Morgante et al., 2002), accumulation of pseudogenes (Zhang, 2003), and transfer of organellar DNA to the nucleus (Adams and Palmer, 2003). Among our results, we observe interspecific but not intraspecific differences; the 2 subspecies of *A. armatus* possess the same 2C DNA value.

Some authors reported significant correlations between DNA content and environmental conditions (Lysák et al., 1999); others, on the contrary, detected no significant correlations (Mortreau et al., 2010). In our case, the sampling does not allow us to confirm or refute these hypotheses.

References

- Abdel Samad F, Baumel A, Juin M, Pavon D, Siljak-Yakovlev S, Médail F, Bou Dagher Kharrat M (2014). Phylogenetic diversity and genome sizes of *Astragalus* (Fabaceae) in the Lebanon biogeographical crossroad. *Plant Syst Evol* 300: 819–830.
- Adams KL, Palmer JD (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* 29: 380–395.
- Agerer-Kirchhoff C (1976). Revision von *Astragalus* L. sect. *Astragalus* (Leguminosae). *Boissiera* 25: 1–197 (in German).
- Arano H, Saito H (1980). Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in subtribe *Seselinae*. *La Kromosomo* 2: 471–480.
- Badr A, Sharawy SM (2007). Karyotype analysis and systematic relationships in the Egyptian *Astragalus* L. (Fabaceae). *Int J Bot* 3: 147–159.
- Bogunic F, Muratovic E, Ballian D, Siljak-Yakovlev S, Brown S (2007). Genome size stability of five subspecies of *Pinus nigra* Arnold s.l. *Env Exp Bot* 59: 354–360.
- Bou Dagher-Kharrat M, Grenier G, Bariteau M, Brown SC, Siljak-Yakovlev S, Savouré A (2001). Karyotype analysis reveals interspecific differentiation in the genus *Cedrus* despite genome size and base composition constancy. *Theor Appl Genet* 103: 846–854.
- Bou Dagher-Kharrat M, Siljak-Yakovlev S, Abdel-Samad N, Douaihy BC, Abdel-Samad F, Bourge M, Brown SC (2013). Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: case of the Lebanese flora. *Plant Biosyst* 147: 1228–1237.
- Deutsch M, Long M (1999). Intron-exon structure of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res* 27: 3219–3228.
- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51: 127–128.
- Geber G, Schweizer D (1987). Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Syst Evol* 158: 97–106.
- Greilhuber J, Speta F (1976). C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia* (Liliaceae). *Plant Syst Evol* 126: 149–188.
- Hamon P, Siljak-Yakovlev S, Srisuwan S, Robin O, Poncet V, Hamon S, De Kochko A (2009). Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: a revised view of species differentiation. *Chrom Res* 17: 291–304.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anamthawat-Jónsson K, Leitch AR, Shi M, Leitch IJ (1991). In situ hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3: 109–116.
- Kazem Y, Houshmand S, Zamani Dadane G (2010). Karyotype analysis of *Astragalus effusus* Bunge (Fabaceae). *Caryologia* 63: 257–261.
- Kazempour Osaloo S, Maassoumi AA, Murakami N (2005). Molecular systematics of the Old World *Astragalus* (Fabaceae) as inferred from nrDNA ITS sequence data. *Brittonia* 57: 367–381.

- Kim SY, Choi HW, Kim CS, Sung JS, Lee J, Bang JW (2006). Cytogenetics analyses of *Astragalus* species. Korean Journal of Medicinal Crop Science 14: 250–254.
- Leitch IJ, Chase MW, Bennett MD (1998). Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. Ann Bot 82: 85–94.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromere position in chromosomes. Hereditas 52: 201–220.
- Lysák MA, Čihalíková J, Kubaláková M, Simková H, Künzel G, Doležel J (1999). Flow karyotyping and sorting of mitotic chromosomes of barley (*Hordeum vulgare* L.). Chromosome Res 7: 431–444.
- Ma XH, Qin RL, Xing WB (1984). Chromosome observations of some medical plants in Xinjiang. Acta Phytotaxon Sin 22: 243–249 (in Chinese with English abstract).
- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS (1991). Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 1: 159–166.
- Manandhar L, Sakya SR (2004). Cytotaxonomic studies in two species of *Astragalus*. J Cytol Genet 5: 13–20.
- Marie M, Brown SC (1993). A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. Biol Cell 78: 41–51.
- Martin E, Duran A, Dinç M, Erişen S (2008). Karyotype analyses of four *Astragalus* L. (Fabaceae) species from Turkey. Phytologia 90: 147–159.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002). Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes. Nat Genet 30: 194–200.
- Mortreau E, Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Brown SC, Bertrand H, Lambert C (2010). Cytogenetic characterization of *Hydrangea involucrata* Sieb. and *H. aspera* D. Don complex (Hydrangeaceae): genetic, evolutionary, and taxonomic implications. Tree Genet Genomes 6: 137–148.
- Muratović E, Robin O, Bogunić F, Šoljan D, Siljak-Yakovlev S (2010). Karyotype evolution and speciation of European lilies from *Lilium* sect. *Liriotypus*. Taxon 59: 165–175.
- Piegu B, Guyot R, Picault N, Roulin A, Sanyal A, Kim H, Collura K, Brar DS, Jackson S, Wing RA et al. (2006). Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposon-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. Genome Res 16: 1262–1269.
- Podlech D (1986). Taxonomic and phytogeographical problems in *Astragalus* of the Old World and South West Asia. P Roy Soc Edinb B 89: 37–43.
- Podlech D (1994). Revision der altweltlichen anuellen Arten der Gattung *Astragalus* L. (Leguminosae). Sendtnera 2: 39–170 (in German).
- Pustahija F, Brown SC, Bogunić F, Bašić N, Muratović E, Ollier S, Hidalgo O, Bourge M, Stevanović V, Siljak-Yakovlev S (2013). Small genomes dominate in plants growing on serpentine soils in West Balkans, an exhaustive study of 8 habitats covering 308 taxa. Plant Soil 373: 427–453.
- Quézel P, Santa S (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome 1). Paris, France: Editions du CNRS (in French).
- Scherson RA, Vidal R, Sanderson MJ (2008). Phylogeny, biogeography and rates of diversification of New World *Astragalus* (Leguminosae) with an emphasis on South American radiations. Am J Bot 95: 1030–1039.
- 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 58: 307–324.
- Senn HA (1938). Chromosome number relationships in the Leguminosae. Bibliographia Genetica 12: 175–336.
- Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Coulaud J, Stoian V, Brown SC, Jelenic S, Papes D (2002). Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. Theor Appl Gene 104: 505–512.
- 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. Adv Sci Lett 3: 190–213.
- Srebniak M, Rasmussen O, Maluszynska J (2002). Cytogenetic analysis of an asymmetric potato hybrid. J Appl Genet 43:19–31.
- Stebbins GL (1971). Chromosomal Evolution in Higher Plants. London, UK: Edward Arnold.
- Temsch EM, Temsch W, Ehrendorfer-Schratt L, Greilhuber J (2010). Heavy metal pollution, selection, and genome size: the species of the Žerjav Study revisited with flow cytometry. Journal of Botany 2010: 596542.
- Tietz S (1988). Revision von *Astragalus* L. section *Campylanthus* Bunge, section *Microphysa* Bunge und section *Poterion* Bunge. Mitt Bot Staatss München 27: 135–380 (in German).
- Vallès J, Bašić N, Bogunić F, Bourge M, Brown SC, Garnatje T, Hajrudinović A, Muratović E, Pustahija F, Šolić EM et al. (2014). Contribution to plant genome size knowledge: first assessments in five genera and 30 species of angiosperms from western Balkans. Bota Serb 38: 25–33.
- Vosa CG, Stergianou C (1990). The cytoecology of the genus *Pleione*. Journal of the Orchid Society of India 4: 29–35.
- Wojciechowski MF (2005). *Astragalus* (Fabaceae): A molecular phylogenetic perspective. Brittonia 57: 382–396.
- Zarre S, Azani N (2013). Perspectives in taxonomy and phylogeny of the genus *Astragalus* (Fabaceae): a review. P Bio Sci 3: 1–6.
- Zhang J (2003). Evolution by gene duplication: an update. Trends Ecol Evol 18: 292–298.