

S. Šiljak-Yakovlev, S. Peccenini, E. Muratović, A. Blanco, S. Redžić, J. Vallès & O. Robin

## Taille du genome et différenciation chromosomique dans quelques espèces méditerranéennes du genre *Lilium* (Liliaceae)

### Abstract

Šiljak-Yakovlev, S., Peccenini, S., Muratović, E., Blanco, A., Redžić, S., Vallès, J. & Robin, O.: Genome size and chromosome differentiation in some mediterranean *Lilium* (Liliaceae) species. — *Bocconea* 16(2): 697-702. 2003. — ISSN 1120-4060.

In the frame of a project concerning the knowledge and the protection of some Mediterranean species, we studied, with the techniques of modern cytogenetics, a complex of four closely related taxa of genus *Lilium* (Liliaceae). All species (*L. bosniacum* (G. Beck) G. Beck ex Frish, *L. carniolicum* Bernh., *L. pomponium* L. and *L. pyrenaicum* Gouan) belong to section *Lyriotypus*. They have restricted distribution areas in the Dinaric mountains, the Alps, and the Pyrenees and neighbouring mountains. In spite of a constant chromosome number ( $2n = 24$ ) and a very similar karyotype morphometry, the distribution of heterochromatic bands (detected by fluorochrome banding) and the location of 18S-5.8S-26S ribosomal genes (detected by *in situ* hybridization) allowed us to characterise the karyotypes of the different species. Nuclear DNA amount (assessed by flow cytometry) was also determined.

### Introduction

Dans le cadre de la préparation d'un projet international concernant la connaissance et la protection des espèces endémiques méditerranéennes, nous avons étudié un complexe de quatre espèces très proches du genre *Lilium* (*L. bosniacum* (G. Beck) G. Beck ex Frish, *L. carniolicum* Bernh., *L. pomponium* L. et *L. pyrenaicum* Gouan) par des approches de la cytogénétique moderne.

Les espèces étudiées appartiennent à l'un des quatre groupes de la section *Lyriotypus* (Comber 1949) et sont géographiquement bien délimitées. *Lilium bosniacum*, endémique des Dinarides, est très proche de *L. carniolicum* (Alpes Orientales), et sa position systématique est toujours controversée. Actuellement ce taxon est traité par *Flora Europea* (Matthews 1980) seulement comme une variété de *L. carniolicum*. *Lilium pomponium*, considéré comme une espèce endémique de la Ligurie et des Alpes Maritimes, est très proche aussi bien de *L. carniolicum* que de *L. pyrenaicum* (Pyrénées et montagnes atlantiques voisines). Il était donc intéressant d'entreprendre des études comparatives dans le but d'essayer de comprendre les mécanismes cytogénétiques pouvant être impliqués dans la micro-évolution de ces quatre espèces.

La distribution des bandes d'hétérochromatine (révélée par fluorochrome banding), la localisation des gènes ribosomiques 18S-5,8S-26S (par l'hybridation *in situ*) et la quantité d'ADN (déterminée par cytométrie en flux) ont permis de caractériser le caryotype de la plupart des espèces.

### Matériel et méthodes

L'origine du matériel est présentée dans le Tableau 1. Les bulbes collectés dans les populations naturelles ont été mis dans les pots et cultivés dans la serre de l'Université Paris-Sud à Orsay.

#### PRÉPARATIONS CHROMOSOMIQUES:

Les méristèmes racinaires prélevés sur les bulbes ont été prétraités à la colchicine 0,05% pendant au moins 5 h à la température ambiante et fixés dans l'éthanol-acide acétique (3 :1) au moins 24 à 48 h à +4 °C. Pour la coloration de Feulgen l'hydrolyse a été effectuée dans HCl N 12 min à 60 °C et l'écrasement dans une goutte de carmin acétique. Pour la coloration au fluorochrome et pour l'hybridation *in situ* une digestion enzymatique (3% cellulase Onozuka R10, 1% pectolyase Y23 et 4% hémicellulase à 37 °C, pendant environ 1 h, avait précédé l'étalement des chromosomes dans une goutte d'acide acétique à 45%. Les lamelles ont été décollées selon la technique de Conger & Fairchild (1953) à l'aide de la neige carbonique.

Pour caractériser le caryotype de chaque espèce trois méthodes ont été utilisées:

1. Coloration de Feulgen au réactif de Schiff pour l'étude morphométrique des chromosomes. L'établissement des idiogrammes a été réalisé à partir des mesures et des calculs effectués sur 5 plaques chromosomiques par espèce, selon la méthode de Levan & al. (1964).

Tableau 1. Origine du matériel.

Espèces	Localité	Altitude m s. m.	Date de récolte et leg.
<i>L. bosniacum</i>	Mt Jahorina	1800	8.08.1999
	Mt Crepoljsko (Bosnie)	1170	10.06.2000 leg. S. Šiljak-Yakovlev
<i>L. carniolicum</i>	Mt Lanaro Carso Triestino (Italie)	500	20.06.1999 leg. F. Martini
<i>L. pomponium</i>	Colla Melosa Alpi Liguri (Italie)	1500	10.06.1998 leg. S. Peccenini
<i>L. pyrenaicum</i>	Pyrénées Orientales Setcases (au pied de la Coma de l'Orri) (Catalogne, Espagne)	1600	15.05.1999 leg. J. Torrell

2. Fluorochrome banding pour mettre en évidence les régions chromosomiques dans lesquelles l'ADN est riche en bases GC (avec chromomycine A<sub>3</sub>) ou en bases AT (avec bisbenzimidazole Hoechst 33258), selon les techniques de Schweizer (1976) et Martin & Hesemann (1988) respectivement.
3. Hybridation *in situ* pour la localisation des gènes ribosomiques 18S-5,8S-26S, selon la méthode de Heslop-Harrison & al. (1991) avec la modification suivante: la dénaturation des chromosomes et de la sonde est faite simultanément à la température de 80 °C pendant 8 min.

#### CYTOMÉTRIE EN FLUX

L'estimation de la quantité d'ADN a été obtenue en utilisant la méthode de la cytométrie en flux. Le tampon utilisé pour isolation des noyaux était celui de Marie & Brown (1993), et le Blé variété Triple Dirk (2C=30,9 pg, GC=43,7%) a servi comme standard interne. La technique ainsi que le procédé de calcul de composition en bases (GC%) sont décrits en détail dans Godelle & al. (1993).

#### Résultats et discussion

Les quatre espèces présentent des valeurs élevées de la quantité d'ADN qui les placent parmi les plus grands génomes (65 - 70 pg en 2C) au sein des Angiospermes (Bennett & al. 2000; Bennett & Leitch 2003). On remarque une nette distinction entre *L. bosniacum* (le plus petit génome - 65,03 pg) et *L. pomponium* (le plus grand génome - 70,26 pg), tandis que *L. carniolicum* et *L. pyrenaicum* présentent des valeurs très proches (Fig. 1, Tableau 2).

Le pourcentage de bases GC est comparable pour toutes les espèces, avec une différence plus prononcée entre *L. bosniacum* (34,75%) et *L. pyrenaicum* (37,92%).

Le nombre chromosomique (2n=24) est le même, et les caryotypes sont très semblables pour les quatre espèces. Ces résultats entrent bien dans un schéma général observé chez presque tous les représentants du genre dont les caryotypes sont étonnamment uniformes (Stewart 1947).

De manière générale l'organisation des séquences hautement répétées dans les chromosomes des espèces étudiées est semblable. On trouve des séquences AT-riches au niveau des centromères (bandes Hoechst positives), et des séquences GC-riches au niveau des constriction secondaires (bandes chromomycine positives). Certains centromères peuvent être à la fois riches en séquences AT et en GC.

La différenciation interspécifique s'observe surtout au niveau du nombre et de l'emplacement de bandes chromomycine positives et de sites 18S-5,8S-26S (Fig. 2 et Tableau 2). Lim et al. (2001) décrivent une situation comparable chez *L. rubellum* Baker et *L. longiflorum* Thunb.

En conclusion, les quatre espèces étudiées montrent une nette différenciation aussi bien au niveau de la taille du génome qu'au niveau de l'infrastructure moléculaire des chromosomes. Une certaine tendance à l'augmentation de taille du génome s'observe de l'Est vers l'Ouest dans la région géographique étudiée. Les résultats obtenus encouragent vivement la poursuite de ces études qui pourrait donner lieu à une discussion plus argumentée sur l'organisation du génome, sur les mécanismes de la microévolution et de la spéciation de

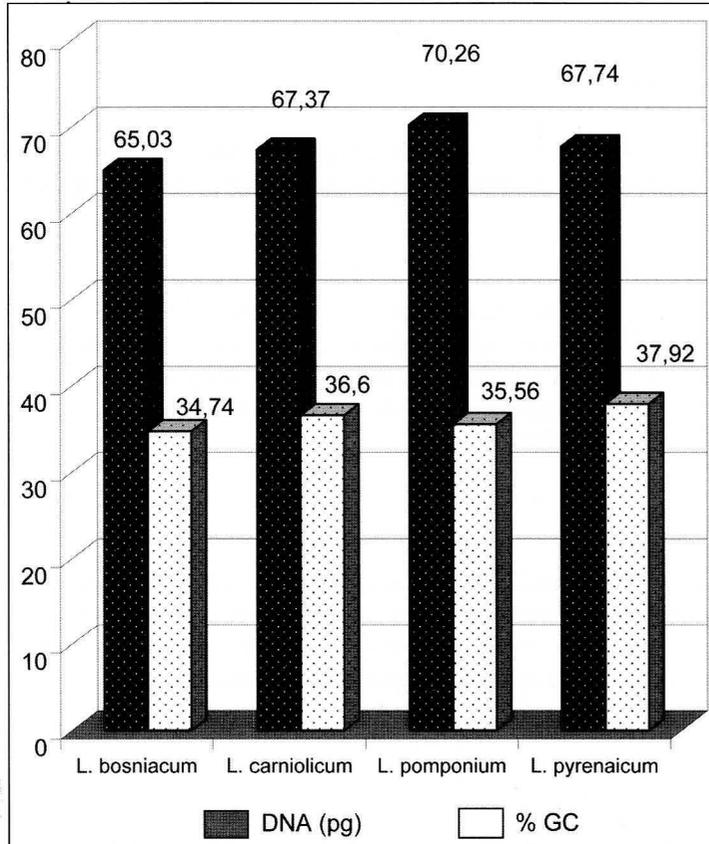


Fig. 1. Quantité d'ADN (pg) et % GC chez les quatre espèces étudiées.

Tableau 2. Comparaison des résultats.

Espèces	2n	2C DNA (pg)	% G-C	CMA bandes	18S-5,6-26 S
<i>L. bosniacum</i>	24	65,03	34,74	8-10	pas de données
<i>L. carniolicum</i>	24	67,37	36,60	10	10 (8 actifs)
<i>L. pomponium</i>	24	70,26	35,56	6-8	6 (tous actifs)
<i>L. pyrenaicum</i>	24	67,74	37,92	12	pas de données

ce complexe d'espèces très proches, ainsi que sur les tendances évolutives au sein du genre *Lilium* en général. Par conséquent ces études seront complétées (nombre et localisation de sites de gènes ribosomiques chez *L. bosniacum* et *L. pyrenaicum*) et élargies aux autres espèces du complexe: *L. albanicum* Griseb., *L. jankae* A. Kerner, *L. chalcidonicum* L.

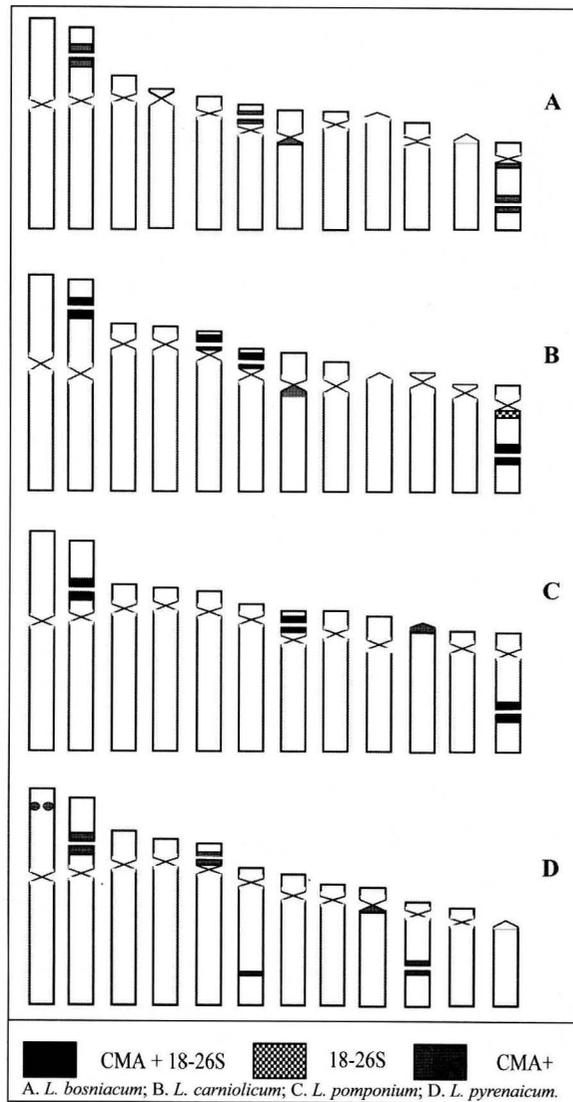


Fig. 2. Idiogrammes montrant la disposition des marquages CMA<sup>+</sup> (en gris) et des sites d'ADNr 18 - 26S (en pointillé). Les bandes noires indiquent la coïncidence des marquages chromomycine et des loci d'ADNr.

### Remerciements

Nous remercions S. Brown et M-T. Crosnier pour leur assistance précieuse en cytométrie en flux et F. Martini et J. Torrell pour la récolte du matériel.

### Références bibliographiques

- Benett, M. D., Bhandol, P. & Leitch, I. J. 2000: Nuclear DNA amounts in Angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. — *Annals of Botany* **86**: 859-909.
- & Leitch, I. J. 2003: Angiosperm DNA C-values database (release 4.0, Jan. 2003). — <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>.
- Comber, H. F. 1949: A new classification of the genus *Lilium*. — *R. Hort. Soc. Lily Yearb.* **13**: 86-105.
- Conger, A. D. & Fairchild, L. M. 1953: A quick-freeze method for making smear slides permanent. — *Stain Technology* **28**: 281-283.
- Godelle, B., Cartier, D., Marie, D., Brown, C. S. & Šiljak-Yakovlev, S. 1993: Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. — *Cytometry* **14**: 618-626.
- Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T., Anamthawat-Jonsson, K. & Leitch, I. J. 1991: In situ hybridization with automated chromosome denaturation techniques. — *Meth Cell Mol Biol* **3**: 109-116.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. A. 1964: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. — *Hereditas* **52**: 201-220.
- Lim, K. B., Wennekes, de Jong, J. H., Jacobsen, E. & van Tuyl, J. M. 2001: Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridisation. — *Genome* **44**: 911-918.
- Marie, D. & Brown, S. C. 1993: A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values of 70 species. — *Biol Cell* **78**: 41-51.
- Martin, J. & Hesemann, C. U. 1988: Evaluation of improved Giemsa C- and fluorochrome banding techniques in rye chromosomes. — *Heredity* **6**: 459-467.
- Mattews, W. A. 1980: *Lilium* L. Pp. 34-35 in: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M. & Webb, D. A. (eds), *Flora Europaea*, **5**. — Cambridge.
- Schweizer, D. 1976: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. — *Chromosoma* **58**: 307-324.
- Stewart, R. N. 1947: The morphology of somatic chromosomes in *Lilium*. — *Amer. J. Bot.* **34**: 9-26.

#### Adresses des auteurs:

Sonja Šiljak-Yakovlev & Odile Robin, Université Paris-Sud, Laboratoire d'Evolution et Systématique, UPRESA CNRS 8079, Bat. 360, 91405 Orsay Cedex, France.

Simonetta Peccenini, Università di Genova, Corso Dogali 1/M, 16136 Genova, Italie.

Edina Muratović, Sulejman Redžić & Sonja Šiljak-Yakovlev, Université de Sarajevo, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire d'étude et de la protection des ressources endémiques, Zmaja od Bosne 35, 71000 Sarajevo, Bosnie-Herzégovine.

Alfonso Blanco, Facultade de Ciencias da Universidade de Vigo, Depto. Bioloxía Vexetal e Ciencia do Solo, Apdo. 874. E-36200 Vigo, Espagne.

Joan Vallès, Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia, Laboratori de Botànica, Av. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Catalogne, Espagne.